

201226012A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

**APOBEC3分子のタンパク質レベルの機能性多型を  
基礎としたHIV-1複製抑制機構の分子基盤の解明**

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮澤 正顯  
(近畿大学医学部)

平成25年 3月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

APOBEC3 分子のタンパク質レベルの機能性多型を  
基礎とした HIV-1 複製抑制機構の分子基盤の解明

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮澤 正顯

(近畿大学医学部)

平成 25 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

APOBEC3 分子のタンパク質レベルの機能性多型を基礎とした HIV-1 複製抑制機構の分子基盤の解明

研究代表者: 宮澤 正顯

3

## II. 分担研究報告書

1. マウス APOBEC3 機能性多型の分子基盤解析

研究分担者: 宮澤 正顯

17

2. ヒト APOBEC3GZ2 ドメインの比較構造・機能解析

研究分担者: 高折 晃史

23

3. マウス APOBEC3 多型がタンパク質立体構造に与える影響の解析

研究分担者: 伊藤 暢聡

25

4. ヒト APOBEC3 タンパク質発現とスプライシングパターンの解析

研究分担者: 有吉 紅也

29

5. ヒト APOBEC3 遺伝子の機能性多型の探索

研究分担者: 木村 彰方

33

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

41

# I. 総括研究報告書

## APOBEC3 分子のタンパク質レベルの機能性多型を基礎とした HIV-1 複製抑制機構の分子基盤の解明

研究代表者 宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）

**研究要旨** APOBEC3 は一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼであり、細胞内でレトロウイルス複製制限因子として機能する。既存の感染性レトロウイルスは自然宿主の APOBEC3 に対抗する機能を獲得しており、APOBEC3 は異種由来レトロウイルスに対してしか効果が無いと信じられて来た。我々はマウスの APOBEC3 (mA3) が同種由来レトロウイルスに対して強い複製制限効果を示しうること、マウス *APOBEC3* 遺伝子には多型があり、感染抵抗性の系統で発現する対立遺伝子は転写レベルで高発現であって、第5エクソンを含まないことを見出していた。今年度宮澤らは、mA3 N-末端側のアミノ酸配列多型がウイルス複製抑制機能に与える影響を明らかにし、伊藤らと共同して N-末端ドメインの立体構造上で上記の機能的多型残基が占める位置を解析した。また、進化論的考察から、N-末端側の機能性多型と第5エクソンの獲得とが独立に起こり、外来性レトロウイルスの脅威の下でそれぞれの抵抗性遺伝子型が選択されて来たことを明らかにした。伊藤らはさらに、βシート間の相互作用による mA3 分子の二量体化に、N-末端側のアミノ酸残基が影響する可能性を示した。一方高折らは、主に核内に存在するヒト APOBEC3B が、宿主ゲノムに変異を導入することを見出した。APOBEC3B は一部のリンパ腫で発現が亢進しており、*cMYC* などのがん遺伝子の変異に関与している可能性がある。これは、外来性レトロウイルスによる脅威が少ない条件下では、APOBEC3 タンパク質の発現量が低下するような遺伝子型が進化上優位になるという、宮澤らの結論と一致する。木村らは、ヒト B 細胞株を用いて *APOBEC3* 遺伝子群の多型と発現の関係を検討した。両者に明瞭な関連は認められなかったが、*APOBEC3H* の発現量には有意な性差が存在した。また、*APOBEC3* 領域のメチル化を検討したところ、*APOBEC3H* 遺伝子の上流および下流のメチル化に有意な性差が認められ、上流のメチル化と遺伝子発現には正の相関があった。有吉らは、北タイ・ランパンコホートの凍結保存末梢血検体を用いて I 型インターフェロン刺激による *APOBEC3G* 遺伝子発現誘導を解析し、細胞種毎で異なる発現誘導に個体差があることを見出した。

### 研究分担者

高折 晃史（京都大学大学院医学研究科・教授）

伊藤 暢聡（東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授）

有吉 紅也（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

木村 彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授）

の内在性レトロウイルスには、他の如何なる宿主側抵抗性因子によるよりも、APOBEC3 による複製制限の痕跡が数多く残されている。一方、哺乳類による APOBEC3 獲得後に霊長類に感染するようになったレンチウイルス群は、Vif タンパク質を獲得することにより APOBEC3 の細胞内分解を促進し、標的細胞での複製阻害を回避している。しかし、自然宿主でないマウスの APOBEC3 は、Vif の有無に関わらず HIV-1 複製を強く阻害出来る。

我々はマウス APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対する生理的複製制限因子であり、自然抵抗性の異なる系統間に機能的遺伝子多型があることを、米国の Warner Greene らと同時に、世界で初めて報告した。抵抗性対立遺伝子は転写レベルでもタンパク質レベルでも発現量が高く、その産物が第5エクソンを欠くのに対し、感受性対立遺伝子は低発現で、その産物は全長型主体であ

### A. 研究目的

強力な生物学的変異原であるレトロウイルスの染色体組込みを阻止するため、哺乳類は複数の細胞内複製制限因子を獲得して来た。一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼ APOBEC3 はその一つであり、霊長類染色体上

ること、両対立遺伝子産物は互いにアミノ酸配列が異なり、N-末端側が複製抑制活性を決定すること、抵抗性遺伝子産物によるレトロウイルス複製抑制はデアミナーゼ活性非依存的であることは、我々が Greene らに先駆けて正確に示した。

マウス APOBEC3 とヒト APOBEC3G の N-末端側 Z2ドメインは、系統発生的にもデアミナーゼ活性部位のアミノ酸配列からも相同であるから、Z2ドメインの機能的アミノ酸配列多型と第5エクソンの有無とが APOBEC3 機能に影響を与える機構を明らかにすれば、ヒト APOBEC3G に Vif による阻害を受けない HIV-1 複製抑制能を付与する分子設計の基盤が築けると期待される。しかし、過去に X 線結晶構造解析が行われているのはヒト APOBEC3G の C-末端側 Z3ドメインのみであり、N-末端側ドメインの詳細な構造機能相関は、ヒトでもマウスでも明らかでない。

本研究は、マウス APOBEC3 遺伝子座における機能的多型の存在を基礎に、APOBEC3 タンパク質の構造安定性と機能に与える N-末端側多型残基と第5エクソンの役割を明らかにし、最終的に Z2 ドメインの立体構造とデアミナーゼ非依存的なレトロウイルス複製抑制機構の関係を分子レベルで明らかにすることを目的としている。また、これに関連してヒト APOBEC3 タンパク質群及びそれらの遺伝子の多型と HIV 感染/AIDS 発症との関連を明らかにし、APOBEC3 タンパク質或いはその誘導体を用いた HIV 感染/AIDS 発症制御の方策を探ることを目指す。

昨年度の研究で、マウス APOBEC3 の第5エクソンの有無がタンパク質翻訳効率を左右することを明らかにしたので、今年度は N-末端側多型残基の機能と進化に関する解析を実施した。

結晶化については、昨年度マウス APOBEC3 N-末端ドメイン(mA3-N)のバクテリアによる大量発現系と精製方法を確立した。今年度は、精製用タグの除去を主な目的とした発現・精製系の改善と、精製タグのついた試料による結晶化条件の探索を目的とした。また、ホモロジーモデリングによる mA3-N の構造予測も行うこととした。

なお、宮澤はデアミナーゼ活性非依存的なレトロウイルス複製抑制機構について、今年度重要な発見を行ったが、現在原著論文投稿前であるので、これについては本報告書に記載しない。

## B. 研究方法

### 1) マウス APOBEC3 各対立遺伝子産物間の相互残基置換

宮澤は、マウスレトロウイルス感染抵抗性で、高機能型の APOBEC3 を高く発現する C57BL/6 (B6) マウスと、感染感受性で低機能型の

APOBEC3 を低く発現する BALB/c マウスから、それぞれ APOBEC3 cDNA を発現ベクターにクローニングし、site-directed mutagenesis により、多型の認められるアミノ酸残基を相互に入れ替えた変異クローンを作製した。得られた変異クローンを BALB 3T3 細胞に導入して安定発現細胞株を樹立、各細胞株における APOBEC3 分子発現は、RT-PCR による mRNA 検出と、発現産物末端に挿入したタグによる Western blot 法で確認した。

### 2) APOBEC3 発現細胞株におけるレトロウイルス複製効率の解析

宮澤は、B-tropic のフレンド白血病ヘルパーウイルス (F-MuLV) 分子クローン FB29 を、1) で樹立した各 APOBEC3 変異クローン発現細胞に接種し、上清中の感染性ウイルス量を、*Mus dunni* 細胞における感染フォーカス形成で定量した。感染フォーカスの検出には、F-MuLV *env* 遺伝子産物に特異的なモノクローナル抗体 720 を用いた。

### 3) ホモロジーモデリングによるマウス APOBEC3 N-末端ドメインの立体構造の解析

最近岩谷らは、マウス APOBEC3 及びヒト APOBEC3G の N-末端ドメインと相同である、単一 Z2 ドメインのヒト APOBEC3 パラログ、APOBEC3C の結晶化と X 線構造解析に成功し、そのデータを発表した (Kimura *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* 19:1005-1010, 2012)。そこで、伊藤は上記岩谷らのデータ (PDB ID: 3vow) を参考に、MODELLER (Marti-Renom *et al. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:291-325, 2000) を用いてマウス APOBEC3 の立体構造シミュレーションを行い、多型のある残基の位置をプロットして、それらの側鎖のオリエンテーションを解析した。

また、昨年度の動的光散乱実験の結果から、マウス APOBEC3 N-末端ドメインが二量体を形成している可能性が示唆されていたため、ヒトの APOBEC2 の構造 (Prochnow *et al. Nature* 445: 447-451, 2007. PDB ID: 2NYT) を基礎に、同様のモデリングを行った。

### 4) マウス APOBEC3 N-末端ドメイン (mA3-N) 発現系の改善

昨年度、宮澤らのクローニングした遺伝子を用いて伊藤が構築した、mA3-N のバクテリアによる発現・精製系によって、高純度かつ高濃度の mA3-N 試料を得ることができたが、精製に用いたタグ (His-tag) の除去ができず、結晶化に対するネガティブな影響が懸念された。そこで、伊藤は発現系を改善して、タグの除去を目指した。

発現ベクターに種々のプロテアーゼ認識サイト

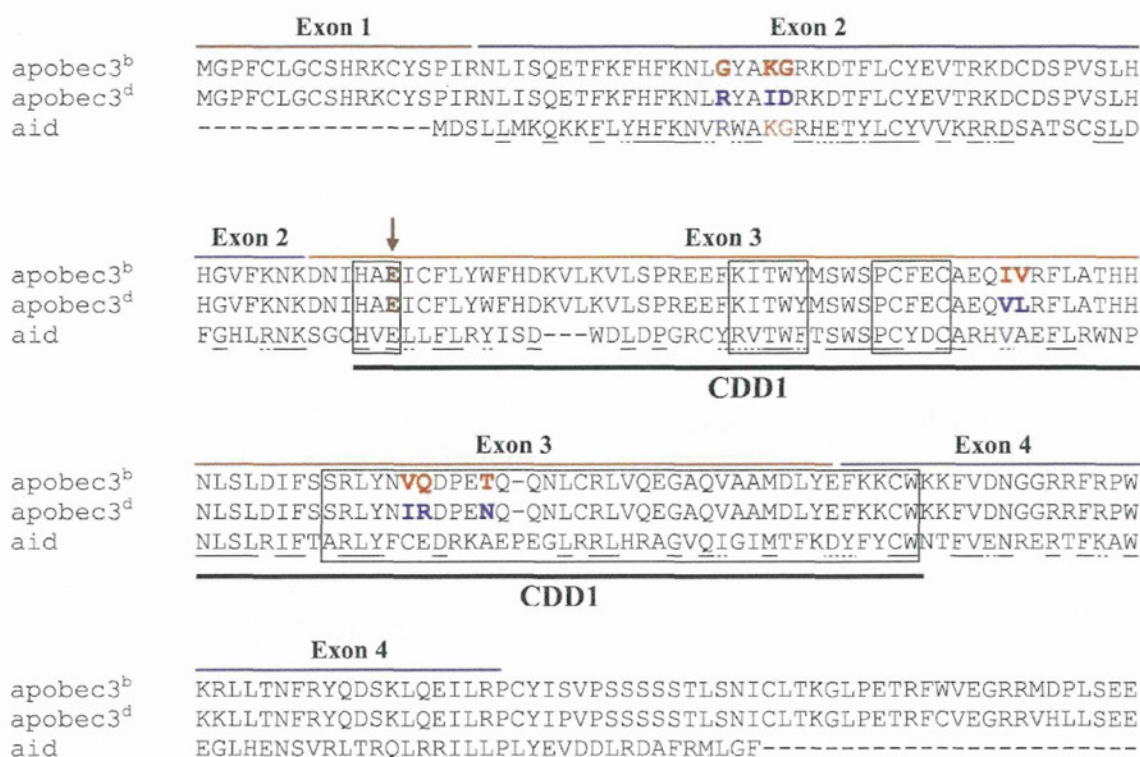


図1. マウス APOBEC3 N-末端ドメインのアミノ酸配列多型 B6 マウスで発現する高機能型対立遺伝子 (*b* アリル) 産物と、BALB/c マウスで発現する低機能型対立遺伝子 (*d* アリル) 産物の一次構造を、マウスの activation-induced cytidine deaminase (AID) と比較した。アリル間で異なるアミノ酸残基に色を付け、AID との間で保存された残基には下線を付けてある。四角で囲んだのはデアミナーゼ活性ドメインの共通モチーフ。矢印で示す E 残基が、マウス APOBEC3 のデアミナーゼ活性中心であることがわかっている。

を導入し、大腸菌で発現させた後、ニッケルカラムによるアフィニティー精製を行い、対応するプロテアーゼでタグの切断を行った。さらに、同じプロテアーゼ認識部位を持つ発現ベクターでも、mA3-N を挿入する制限酵素サイトを変えたコンストラクトも作成した。タグの切断は SDS-PAGE でモニターした。また、His-tag をカルボキシル末端に付けたものや、His-tag を持たない発現系も構築し、mA3-N の発現・精製を試みた。

#### 5) マウス APOBEC3 N-末端ドメインの結晶化

伊藤が昨年度確立した発現系と精製法により、抵抗性 B6 マウスと感受性 BALB/c マウスの両系統で発現する mA3-N について、His-tag がアミノ末端に残った高純度試料を用いて、引き続き結晶化条件の探索を行った。各種スクリーニングキットを利用し、pH や沈殿剤・添加剤などを広範囲に探索した。さらに、今年度新たに作成したカルボキシル末端に His-tag を持つ mA3-N も発現・精製し、同様に結晶化条件の探索を行った。

#### 6) マウス APOBEC3 多型の進化の解析

齧歯類の進化の過程で、APOBEC3 遺伝子の機能的多型がいつ、どのように獲得されたのか、また、遺伝子多型の選択過程に外来性レトロウイルスによる感染の脅威がどのように関与していたかを明らかにするため、宮澤は米国 NIH, NIAID の Kozak らと共同して、野生マウスを含む多数種の齧歯類のゲノム DNA における APOBEC3 遺伝子の塩基配列、及びその転写産物発現パターンを解析した。本解析は、N-末端ドメインの多型部位と第5エクソンの発現調節部位を中心に行った。

#### 7) ヒト APOBEC3 による細胞ゲノム DNA 変異誘導の解析

高折は HEK293 細胞のゲノムに EGFP 遺伝子を導入し、この細胞に APOBEC3 を過剰発現させたとき、EGFP に変異が導入されるかを検討した。さらに、リンパ腫の細胞株である KIS1 や SUDHL-6 を用い、APOBEC3 の発現と cMYC や PAX5 などのがん遺伝子の変異との関連を検討した。

## 8) ヒト APOBEC3 タンパク質発現とスプライシングパターンの解析

有吉がタイ北部の都市ランパンで2000年から約10年にわたって実施した、HIV感染者とその配偶者の長期経過観察研究、「ランパンHIVコホー

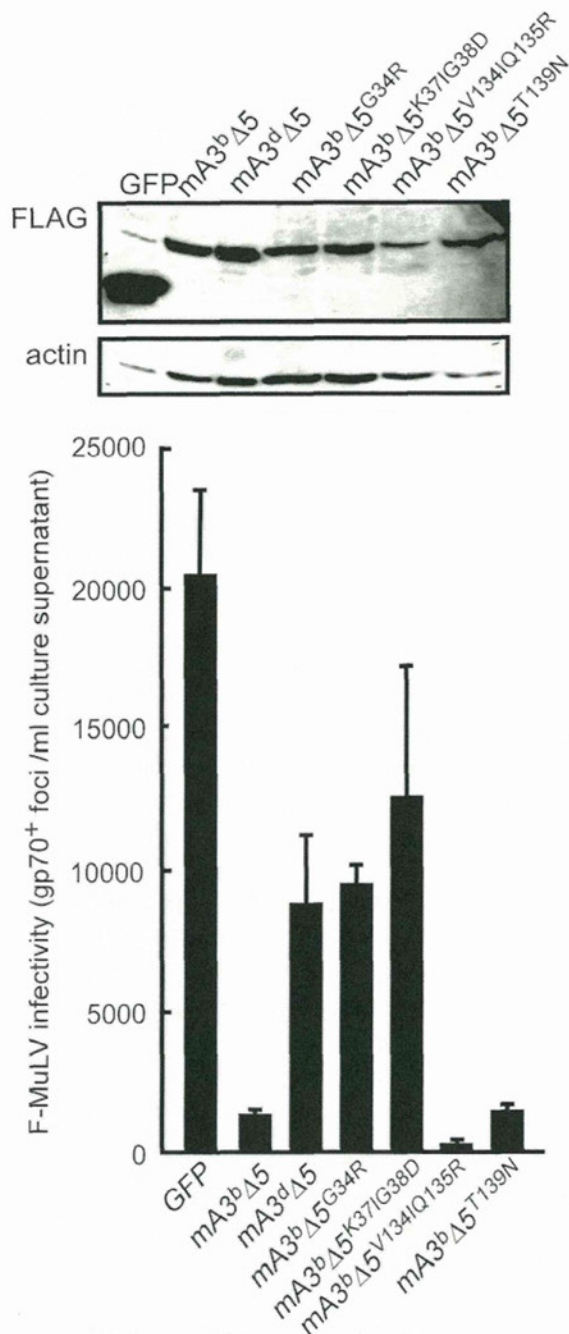


図2. Site-directed mutagenesis による多型残基の機能解析 B6 マウスで発現する、第5エクソン欠損型の高機能型対立遺伝子産物 (mA3<sup>b</sup>Δ5) を基盤に、その多型残基をそれぞれ BALB/c 型に置換した。変異 cDNA の持続発現細胞株に F-MuLV の分子クローンを感染させ、その複製に対する抑制効果を野生型遺伝子産物と比較した。

ト研究」で収集した末梢血単核細胞(PBMC)検体は、採取後数年間にわたって液体窒素保管庫内に保存されてきた。この PBMC 検体を用いるにあたり、宮澤と共同して様々な予備実験を実施した結果、限られた数の細胞から CD14 陽性単球分画と CD4 陽性 T リンパ球分画を最も効率よく分離する、抗体固相化磁気ビーズ(EasySep kit)を用いることにした。各細胞分画を一定数 96 ウェル丸底プレートに播種し、一晚培地に馴化したのちに、IFN α 存在下、または非存在下で 4 時間培養して全 RNA を調製した。APOBEC3G、内部標準としての GAPDH、type I インターフェロン反応の陽性対照としての MX1 の3遺伝子の相対発現量を、リアルタイム RT-PCR 法で測定した。

## 9) APOBEC3 領域遺伝子発現における性差の検討

木村は日本人由来の 92 種の B 細胞株を用いて、APOBEC3 領域内遺伝子群の発現および5か所の CpG サイトのメチル化を検討した。また、これらの B 細胞株について、Amelogenin 遺伝子を用いてXY型を決定した。得られた情報を総合して、APOBEC3 領域遺伝子群の発現およびメチル化における性差を検討した。

### 【倫理面への配慮】

有吉らによる北タイ・ランパンコホートのHIV感染者および配偶者のヒトゲノム遺伝子および疫学研究にあたっては、日本(長崎大学熱帯医学研究所)およびタイ(保健省医学研究倫理委員会)のそれぞれの機関で倫理審査委員会の審査を受け、承認を得た。なお、今回はコホート研究開始当初の検体収集から、かなりの時間が経過していたため、タイ国での承認に際していくつかの問題を解決する必要があった。また、検体の持ち出しに関して制限規則があるため、実験をタイ国立公衆衛生研究所内で行なう必要があった。木村らの研究に関わるヒトゲノム遺伝子解析研究は、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会に研究計画を申請し、審査を受けた後、研究機関長による実施承認を受けた(研究課題:「HIVウイルス感染防御機構の究明に関わる研究」 実施責任者 木村彰方、平成18年7月6日付承認、平成23年7月19日付部分変更承認、承認番号2011-002号)。また、高折らは患者検体の解析に当たり、所属施設倫理委員会の承認を受けた上で、文書による患者の同意を得て行った。

宮澤と伊藤の研究計画にはヒト検体を用いた解析を含まないが、遺伝子組換え実験を含む。研究代表者・研究分担者は全員、遺伝子組換え実験について、各所属機関遺伝子組換え実験安全管



理員委員会による承認を得て、必要な拡散防止措置の下でこれを実施した。

### C. 研究結果

#### 1) マウス APOBEC3 N-末端ドメイン多型残基の構造-機能相関

B6 マウスで発現する高機能型のマウス APOBEC3 対立遺伝子産物と、BALB/c マウスで発現する低機能型対立遺伝子産物とで、その N-末端側ドメインには8ヶ所のアミノ酸残基置換が認められる。このうち、デアミナーゼ共通モチーフ内に認められるアミノ酸配列多型は5残基であり、残り3残基は、共通モチーフよりも N-末端側に位置している(図1)。

そこで、宮澤らはこれらの多型残基を相互置換し、変異遺伝子産物のマウスレトロウイルス複製抑制活性を、野生型遺伝子産物のそれと比較した。同じ第5エクソン欠損型の APOBEC3 を、持続発現細胞株でほぼ等量発現させた場合(図2の上段に Western blot 法によるタンパク質発現量の比較を示す)、高機能型である B6 マウス由来 *b* アリル産物は、強い F-MuLV 複製抑制活性を示した。一方、BALB/c マウス由来 *d* アリル産物の複製抑制効果は、第5エクソン欠損型であって

も弱かった(図2)。高機能型 *b* アリル産物を基礎に、その N-末端側 G34 残基を *d* アリル型(R)に置換した場合、或いは K37 及び G38 残基を同時に *d* アリル型に置換した場合(K37I, G38D)は、何れも F-MuLV 複製抑制活性が低機能型 *d* アリル産物と同じ程度にまで低下した。これに対して、デアミナーゼモチーフ内の V134 及び Q135 残基、或いは T139 残基を *d* アリル型に置換した場合には、*b* アリル産物の高いウイルス複製抑制活性が保たれた(図2)。

このことから、系統間で多型のあるアミノ酸残基のうち、デアミナーゼモチーフより遥かに N-末端側の、G/R34, K/I37, G/D38 の3残基が、ウイルス複製抑制活性に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

#### 2) 機能性残基が APOBEC3 分子三次構造上で占める位置の解析

1) で解明した機能上重要な多型残基が、APOBEC3 分子の立体構造上でどのような位置を占めるかを明らかにするため、最近解明されたヒト APOBEC3C 分子の X 線結晶構造解析データを基礎に、伊藤がコンピュータによるシミュレーションを行った。ヒト APOBEC3C とマウス APOBEC3

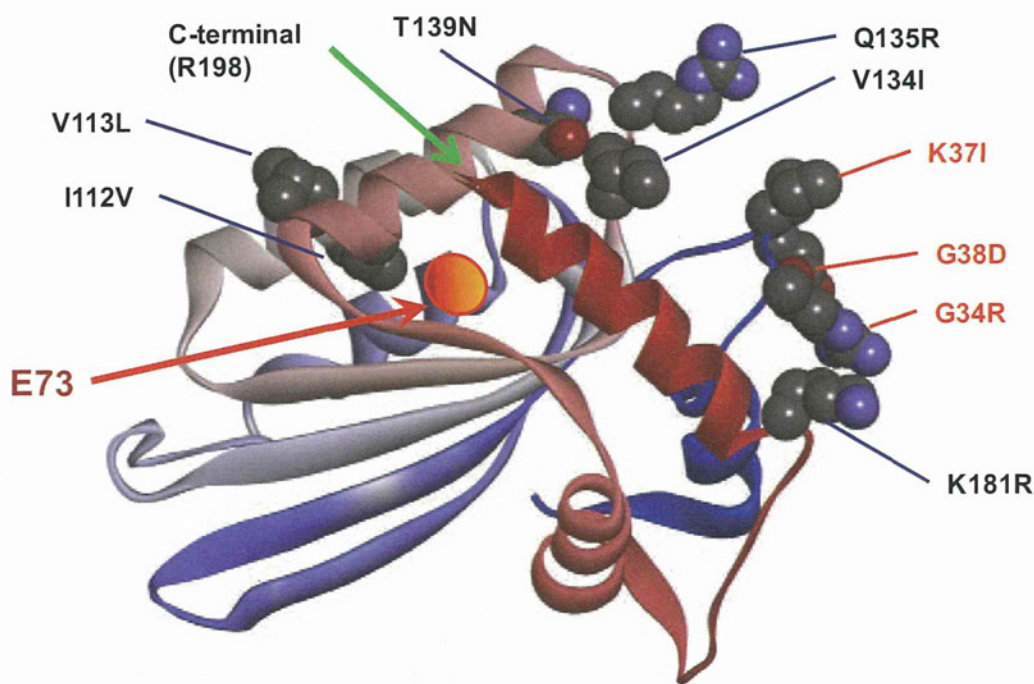


図3. マウス APOBEC3 分子 N-末端側ドメインの立体構造における多型残基の存在部位 ヒト APOBEC3C の X 線結晶構造解析データを基礎に、Discovery Studio 3.5 を用いてシミュレーションを行った。図2で解析した多型残基の側鎖がどちらを向くかを、それらだけ空間充填モデルで示してある。赤で示したのが site-directed mutagenesis により機能的重要性が示された残基である。多型残基が、疎水性残基間の多型である I112V と V113L を除き、全て同一表面に集まっていることがわかる。ポリペプチドの N-末端側を青で、C-末端側を赤で示し、二次構造はリボンモデルで表示した。

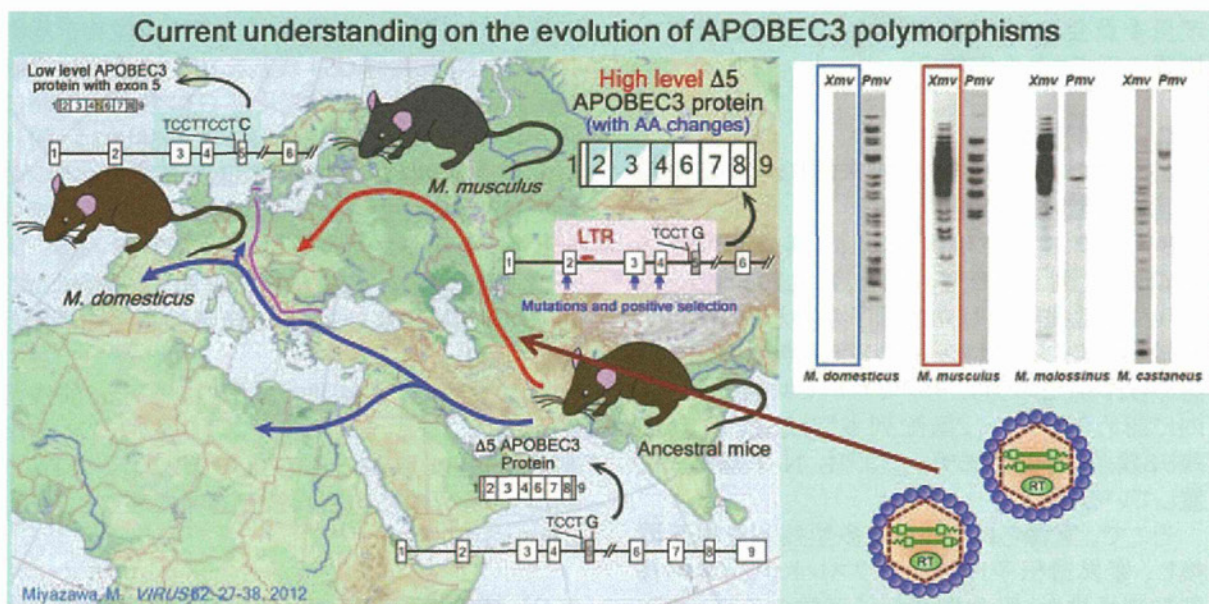


図4. マウス *APOBEC3* 遺伝子多型の獲得と選択の過程 インド亜大陸に出現したマウスの祖先は、現在の低機能型 *d* アリル産物と同じ N-末端側アミノ酸配列を持ち、第5エクソンを欠く、祖先型 *APOBEC3* を発現していた。インド亜大陸からカスピ海東岸を経てシベリアへと拡散した集団(赤矢印)では、N-末端側ドメインにアミノ酸置換を伴う変異が繰り返し独立して起こり(小さな縦の矢印)、高機能なアミノ酸配列(水色)が選択された。また、これとは独立に第2イントロンへのレトロウイルス LTR 組込みが起こり、第5エクソンを欠く mRNA が高発現となった。一方、地中海沿岸を西進した集団では第4イントロンと第5エクソンに遺伝子変異が生じ(TCCT の反復と G/C 置換)、転写産物への第5エクソン取り込みが起こった。その結果、この集団では *APOBEC3* タンパク質の発現量が激減した。右半には、これら *M. musculus* と *M. domesticus* に代表される集団のゲノム DNA における、内在性異種指向性(Xmv)及び多指向性(Pmv)レトロウイルス組み込みの違いを示す(Kozak, C.A. *Retrovirology* 7:101, 2010)。

の N-末端ドメインは、その一次構造の特徴から、何れも Z2ドメインに属することが知られている。

図3に示す通り、アリル間で多型の認められるアミノ酸残基は、全て N-末端ドメインの同一面に集まっており、機能的多型残基の側鎖は互いに近接していることがわかった。また、これら機能的残基は、デアミナーゼ活性中心の E73 残基(図3にオレンジの球で示す)からは離れた位置にあり、マウスレトロウイルスに対する *APOBEC3* の複製抑制効果がデアミナーゼ活性に非依存性であることを良く反映していると考えられた。

また、ヒト *APOBEC2* の二量体を基礎としたモデルでは、mA3-N もその  $\beta$ シートを介して二量体を形成することが可能であることが判った。

### 3) 齧歯類進化過程における *APOBEC3* 多型の選択

昨年度見出した、*APOBEC3* 遺伝子転写産物のスプライシング制御部位多型と、今年度確認した N-末端側機能性アミノ酸配列多型が、マウスの進化の過程でどのように選択されて来たかを、宮澤らがゲノム DNA 及び cDNA の塩基配列解析により検討した。

宮澤らは既に昨年度、インド亜大陸に出現したマウスの祖先は第5エクソンを発現しない祖先型遺伝子を持っていたことを示している。この祖先型 *APOBEC3* の N-末端側アミノ酸配列は、現在の低機能型 *d* アリル産物と同じであった(図4)。マウスの祖先がユーラシア大陸西部に分布を拡大していく際、カスピ海東岸を経てシベリアに分布していた一群は、図4に青い縦の小矢印で示す、N-末端側ドメインのアミノ酸配列多型をそれぞれ独立に獲得し、そのうち高機能型のアミノ酸配列(*b*アリル型)に対して正の選択圧が加わった。また、これとは独立に、カスピ海沿岸を北上した集団の一部に第2イントロンへの異種指向性レトロウイルス LTR の組込みが起こり(図4に赤い水平の小矢印で示す)、これを獲得した群では、LTR のエンハンサー機能により、第5エクソンを欠く *APOBEC3* の発現が上昇した。

一方、地中海沿岸を西進して西ヨーロッパや北アフリカに分布した一群では、N-末端側のアミノ酸配列は祖先型のままに保たれ、第4イントロンと第5エクソンに遺伝子変異が生じて、発現産物に第5エクソンが取り込まれるようになった。その結果、昨年度示したように *APOBEC3* mRNA の翻訳効

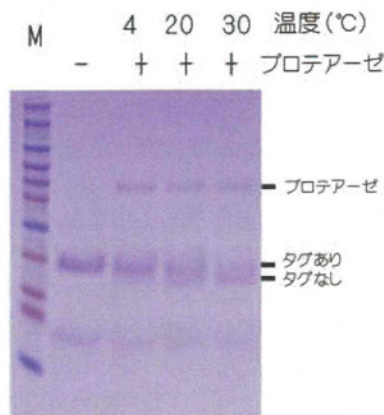


図5. プロテアーゼによる精製用タグ(His-tag)の切断 SDS-PAGE、Mは分子量マーカー。

率が低下し、タンパク質発現量が著しく低下したと考えられた。

#### 4) マウス APOBEC3 N-末端側ドメイン(mA3-N)発現系の改善

伊藤が今回試した種々のプロテアーゼおよびコンストラクトの中で、His-tag が比較的効率良く切除されるものが一つだけあった。今回の実験条件下では、温度依存的にタグの切断がみられ、高温での反応の方が、切断効率が高かった(図5)。しかし、37°Cでは、非特異的プロテアーゼ活性によるものと思われる mA3-N 自体の切断が見られた。また、この発現系では、従来の系より可溶性タンパク質の発現量が少なく、その多くが不溶画分にある傾向があった。

カルボキシル末端に His-tag を持つ mA3-N は、アミノ末端にタグを持つものより若干発現量が低下したものの、結晶化に十分な濃度・純度をもつ試料が得られた。

タグを全く持たない mA3-N に関しては、大腸菌で弱いながらも可溶性発現を得たが、夾雑物が多く、イオン交換クロマトグラフィー等で精製を試みたものの、適切な精製条件を見つけることはできなかった。

#### 5) mA3-N の結晶化

伊藤は、昨年度確立した発現系と精製法によって得た、タグの付いた mA3-N の高純度試料を用いて、種々の条件で結晶化の探索を行ったが、現時点で結晶を得ることはできていない。また、今年度新たに作成したカルボキシル末端に His-tag を持つ mA3-N についても、同様の検討を行ったが、未だ結晶を得られてはいない。

なお、結晶化条件の探索において、感染抵抗性 B6 マウスと感受性 BALB/c マウスの両系統に

由来する mA3-N の挙動に、大きな差は見られなかった。

#### 6) ヒト APOBEC3 によるゲノム DNA の修飾

高折は、ヒト APOBEC3A や APOBEC3B が AID と同様に、ヒト細胞でゲノムに変異を導入することを見出した。高折が現在までに検討したリンパ腫細胞株のなかでは、KIS1 細胞で APOBEC3B の発現が高く、APOBEC3B の発現が低い SUDHL-6 細胞より多くの変異が *cMYC* や *PAX5* に蓄積していることが判明した。さらに、SUDHL-6 細胞に APOBEC3B を過剰発現させることにより、新たな *cMYC* の変異が出現することを確認した。

#### 7) ヒト APOBEC3 タンパク質発現とスプライシングパターンの解析

有吉らは、夫婦間曝露後 HIV 感染に対する抵抗性における APOBEC3G の働きを解明するために、曝露の密度・期間の情報が明らかな、北タイコホートの約 100 名の HIV 感染者の配偶者を対象とした。今年度はこのうち 4 名の凍結保存 PBMC 検体を用い、CD14 陽性単球分画と CD4 陽性 Tリンパ球分画の、I 型インターフェロン反応性遺伝子発現を検討した結果、*MX1* の発現誘導が良好に見られる条件下において、CD14 陽性単球分画/CD4 陽性 Tリンパ球分画における APOBEC3G の発現量が、高値/高値、高値/低値、低値/低値の 3 群が存在することを見出した。すなわち、細胞種によって異なる、APOBEC3G の IFN  $\alpha$  反応性に、明確な個体差が存在することを観察した。

#### 8) APOBEC3 領域遺伝子発現における性差の検討

木村らは昨年度までに、92 種類のヒト B 細胞株を対象として APOBEC3 領域の遺伝子多型をタイ

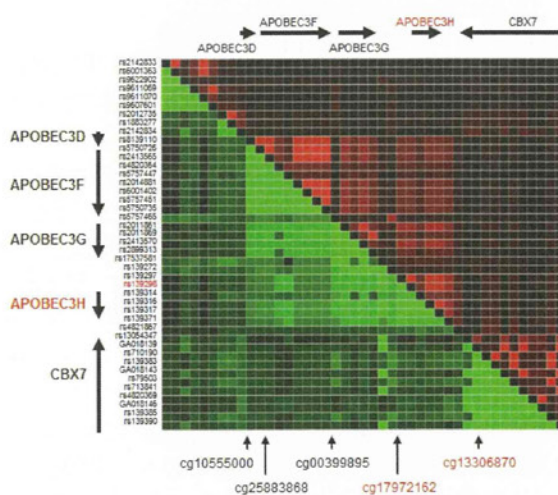


図6. ヒト APOBEC3 領域の連鎖不平衡構造

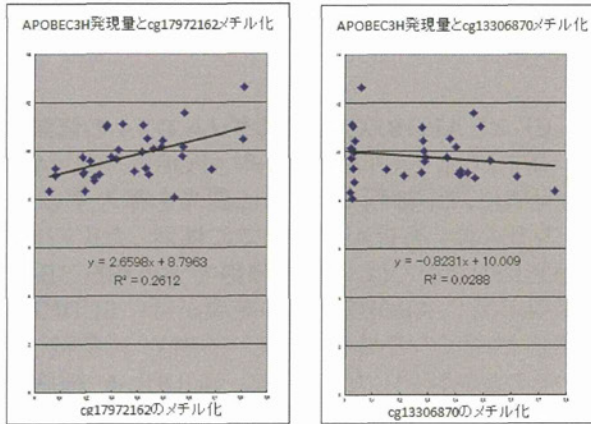


図7. *APOBEC3H* 遺伝子発現とメチル化との関連

ピングし、これを参考にして、連鎖不平衡ブロック構造を決定した(図6)。また、この領域内の5か所の CpG アイランドについて、それらのメチル化の程度を検討するとともに、*APOBEC3D*, *-F*, *-G*, *-H* および *CBX7* の遺伝子発現量を検討した。その結果、個々の CpG サイトのメチル化とそれぞれの遺伝子の発現量との間には、明瞭な関連は認められなかった。そこで本年度は、これらの B 細胞株の XY 型を決定し、遺伝子発現量やメチル化における性差を検討した。

その結果、*APOBEC3H* の発現量に有意な性差(男性の方が高値)が存在した。また、*APOBEC3H* の 5'側に存在する cg17972162、および 3'側に存在する cg13306870 で、メチル化の程度に有意な性差(男性の方が高メチル化)が存在した。そこで、これら CpG サイトのメチル化と *APOBEC3H* 遺伝子発現との関連を検討したところ、cg17972162 のメチル化は *APOBEC3H* 発現と正の相関を、cg13306870 のメチル化は負の相関を示した(図7)。

#### D. 考察

我々は昨年度、マウス *APOBEC3* の第4イントロンと第5エクソンに存在する遺伝子多型が、転写産物への第5エクソン取り込みの有無を介してタンパク質翻訳効率に影響を与え、第5エクソン発現型と欠損型の対立遺伝子を持つ個体間で、細胞内での *APOBEC3* タンパク質発現量が大きく異なることを明らかにした。本年度は、第5エクソンの有無以外に対立遺伝子間で多型の認められる N-末端側のアミノ酸配列について、その機能的意味を解析した。その結果、デアミナーゼ共通配列より N-末端側に位置する、G/R34, K/I37, G/D38 の3つの多型残基が、ウイルス複製抑制活性に重大な影響を及ぼすことが明らかとなった。立体構造解析の結果、これら3残基は *APOBEC3*

分子 N-末端側ドメインの同一面に露出していると考えられ、それらの側鎖の位置は、分子内でデアミナーゼ活性中心から離れていた。この結果は、マウス *APOBEC3* によるレトロウイルス複製阻害にデアミナーゼ活性は必要でないとする、我々の以前の観察と符合する。

デアミナーゼ非依存的なレトロウイルス複製阻害の機構については、既に決定的なデータが得られており、現在原著論文を準備中である。

一方、N-末端側アミノ酸配列多型の出現と選択の過程について、祖先型の *APOBEC3* は既存の低機能型 *d* アリルと同じアミノ酸配列をコードしていたこと、カスピ海東岸を北上した集団では、N-末端側に複数の塩基置換がそれぞれ独立して繰り返して起こり、そのうち高機能型のアミノ酸配列に対して正の選択が加わった結果、現在の感染抵抗性 *b* アリルが生じたと考えられることが明らかとなった。興味深いことに、カスピ海東岸を北上した個体群のゲノム DNA には、内在性異種指向性レトロウイルス(*Xmv*)の組込みが多数認められるが(図4右側の赤い四角)、*APOBEC3* 分子 N-末端側のアミノ酸配列が祖先型のままに留まっている、地中海沿岸を西進した個体群には、内在性異種指向性レトロウイルスの組込みが検出されないことが知られている(図4右側の青い四角)。このことから、マウス *APOBEC3* 分子 N-末端側のアミノ酸配列多型に対して加わった選択圧の少なくとも一部は、異種生物に由来すると考えられる、異種指向性レトロウイルスによる感染の脅威であったと推測される。

今回高折らは、広くヒトの組織に発現している *APOBEC3B* がゲノムに変異を導入することを見出したが、通常では、たとえ *APOBEC3B* による塩基修飾が生じて、ヒト細胞内の DNA 修復機構によりゲノムの恒常性が維持されていると考えられる。しかし、ひとたび *APOBEC3B* の過剰発現や DNA 修復系の抑制が起これば、*APOBEC3B* が発癌遺伝子に変異を導入することでリンパ腫などの発症に関わる可能性が示唆される。*APOBEC3* は抗ウイルスタンパク質であり、その AIDS 治療への応用が期待されているが、*APOBEC3* の過剰発現は、宿主ゲノムの修飾を介して発癌を引き起こす可能性もあり、慎重な検討が必要である。

高折らによるこの発見は、宮澤らが示した、外来性レトロウイルスの脅威が少ない条件下では、*APOBEC3* 発現量が低下するような遺伝子変異に正の選択圧が加わるという結論と良く符合する。

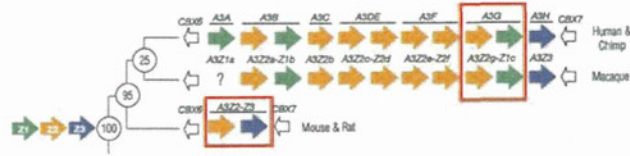
今年度有吉は、ヒト *APOBEC3G* の IFN $\alpha$  による発現誘導には個人差があることを見出した。これは、宮澤らが以前に示した、HIV 曝露非感染者における IFN $\alpha$  誘導 *APOBEC3G* 発現の高値という

## 背景

- ・マウスAPOBEC3はVifに阻害されずにHIV-1複製を抑制出来る
- ・マウスAPOBEC3にはN-末端側に機能性のアミノ酸配列多型がある
- ・マウスAPOBEC3のZ2ドメインはヒトAPOBEC3GのZ2ドメインと相同である

## 目的

- ・感染抵抗性系統のマウスAPOBEC3が獲得したデアミナーゼ非依存的なレトロウイルス複製抑制活性のしくみを構造面から明らかにし、Vifに阻害されずにヒト細胞内でHIV-1の複製を抑制する薬剤の分子設計を目指す基盤データを得る



## 資源

- ・マウスAPOBEC3対立遺伝子と変異体発現ベクター(宮澤ら)
- ・ヒトAPOBEC3B、3G発現ベクターとタンパク質構造情報(高折ら)
- ・タンパク質結晶構造解析、相互作用解析の技術(伊藤ら)
- ・APOBEC3発現細胞株(宮澤ら)
- ・ヒトAPOBEC3遺伝子座のゲノム解析情報(木村ら)
- ・HIV-1感染者および曝露非感染者の凍結細胞検体(RNA、タンパク質の解析可能)(有吉ら)

## 当初計画と平成24年度迄の成果、最終年度計画

- ・APOBEC3対立遺伝子とその変異体産物が結合するHIV及び細胞側標的分子の同定(宮澤、高折)→**ウイルスタンパク質及びゲノムDNAが標的**→**ウイルスタンパク質、DNA結合部位の同定**
- ・マウスAPOBEC3対立遺伝子及びそれら変異体産物の立体構造解析(伊藤)→**可溶性N末端ドメインの大量発現に成功、二量体化を検出**→**結晶化に邁進、溶液中でのデータも得る**
- ・APOBEC3転写・翻訳制御機構と立体構造の解析(宮澤、伊藤)→**exon5が翻訳に与える影響とスプライシング制御部位多型の解明**→**デアミナーゼ非依存活性が異種指向性ウイルスへの対抗手段として進化した可能性の追求**
- ・ヒトAPOBEC3Gのタンパク質レベルでの発現量の解析(有吉、宮澤)→**タイコホートでの発現多型発見**→**曝露非感染状態との相関解析**
- ・ヒトAPOBEC3遺伝子多型の探索(有吉、木村)→**プロモーター部位多型の発見**→**メチル化と発現量の相関解析**

図8. 研究の進捗状況と平成25年度の計画

観察を支持する可能性があり、今後イタリアコホートに続いて、タイ人コホートでもI型IFN誘導APOBEC3G発現量とHIV-1感染抵抗性との相関が見られるか否かを明らかにすることが期待される。その際、今年度木村が見出したように、APOBEC3遺伝子発現に性差が見られる可能性があり、タイコホートでAIDS寡婦を含めて、曝露非感染女性が多いことを考慮に入れて、ゲノムDNAのメチル化を含めた解析を続ける必要があると考えられる。

## E. 結論

生理的な同種由来レトロウイルス複製制限因子であるマウスAPOBEC3の、機能的遺伝子多型について、昨年度明らかにした第5エクソン取り込みの有無を決定する機構と、第5エクソンの機能的役割の解明に続いて、今年度はN-末端側アミノ酸配列多型の機能的意味と、タンパク質立体構造上における多型残基存在部位の配置を明らかにした。得られた結果は、デアミナーゼ共通配列より遥かにN-末端寄りの3残基が、レトロウイルス複製抑制機能に決定的な影響を与えること、それら機能残基はデアミナーゼ活性中心から離れて、N-末端ドメインの一つの面に集まって存在することを示していた。また、これら機能的な多型残基にはマウスの進化上正の選択圧が加わっており、この選択の要因は、恐らく異種生物に由来すると考えられる、異種指向性レトロウイルスの反復感染であると考えられた。また、外来性ウ

イルスの脅威が少ない条件下では、APOBEC3の発現が低下するような遺伝子型が進化上有利になると考えられたが、実際ヒトAPOBEC3の高発現は、ゲノムDNAの変異を通じて発がんに関わることを明らかにした。

マウスAPOBEC3のデアミナーゼ非依存的なレトロウイルス複製抑制活性が、その構造面からも裏付けられたので、来年度はデアミナーゼ非依存的複製抑制活性の分子実体を明らかにし、HIV複製抑制への応用の途を示したい(図8)。

## F. 健康危険情報

該当するもの無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 宮澤 正顯. 生理的に機能するレトロウイルス複製制限因子APOBEC3の分子進化. *ウイルス* 62: 27-38, 2012.
- 2) Miyazawa, M., K. Okubo, K. Shiraki, M. Maruyama, J. Yamada, and H. Yamada. Immunological approaches for healthy longevity. *Anti-Aging Medicine* 9: 43-50, 2012.
- 3) Yoshimoto, N., Y. Sakamaki, M. Haeta, A. Kato, Y. Inaba, T. Itoh, M. Nakabayashi, N. Ito, and K. Yamamoto. Butyl pocket formation in the vitamin D receptor strongly affects the agonistic or antagonistic behavior of ligands. *J. Med. Chem.* 55: 4373-4381, 2012.
- 4) Shinohara, M., K. Io, K. Shindo, M. Matsui,

- T. Sakamoto, K. Tada, M. Kobayashi, N. Kadowaki, and A. Takaori-Kondo. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Scientific Reports* 2:806, 2012.
- 5) Fujita, H., T. Kitawaki, T. Sato, T. Maeda, S. Kamihira, A. Takaori-Kondo, and N. Kadowaki. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. *Eur. J. Immunol.* 43:93-103, 2012.
- 6) Matsunaga, S., T. Sawasaki, H. Ode, R. Morishita, A. Furukawa, R. Sakuma, W. Sugiura, H. Sato, M. Katahira, A. Takaori-Kondo, N. Yamamoto, and A. Ryo. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J. Proteomics* 75: 4863-4873, 2012.
- 7) Furukawa, A., H. Okamura, R. Morishita, S. Matsunaga, N. Kobayashi, T. Ikegami, T. Kodaki, A. Takaori-Kondo, A. Ryo, T. Nagata, and M. Katahira. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425:284-289, 2012.
- 8) Chonabayashi, K., M. Hishizawa, S. Kawamata, Y. Nagai, T. Ohno, T. Ishikawa, T. Uchiyama, and A. Takaori-Kondo. Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. *Leukemia* advance online publication 14 December 2012; doi: 10.1038/leu.2012.333.
- 9) Ohtani, H., T. K. Naruse, Y. Iwasaki, T. Ishida, H. Akari, T. Matano, and A. Kimura. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenet.* 64:669-678, 2012.
- 10) Nomura, T., K. Terahara, H. Yamamoto, T. Shiino, N. Takahashi, T. Nakane, N. Iwamoto, H. Ishii, T. Tsukamoto, M. Kawada, S. Matsuoka, A. Takeda, K. Terahara, Y. Tsunetsugu-Yokota, N. Iwata-Yoshikawa, H. Hasegawa, T. Sata, T. K. Naruse, A. Kimura, and T. Matano. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J. Virol.* 86:6481-6490, 2012.
- 11) Takahashi, N., T. Nomura, Y. Takahara, H. Yamamoto, T. Shiino, A. Takeda, M. Inoue, A. Iida, H. Hara, T. Shu, M. Hasegawa, H. Sakawaki, T. Miura, T. Igarashi, Y. Koyanagi, T. K. Naruse, A. Kimura, and T. Matano. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS One* 8:e54300, 2013.
- 12) Sharma, G., H. Ohtani, G. Kaur, T. K. Naruse, S. K. Sharma, M. Vajpayee, A. Kimura, and N. K. Mehra. Status of TIM-1 exon 4 haplotypes and CD4<sup>+</sup> T cell counts in HIV-1 seroprevalent north Indians. *Hum. Immunol.* 74:163-165, 2013.
- 13) Nakayama, E. E., T. Nakajima, G. Kaur, J. Miyama, H. Terunuma, N. K. Mehra, A. Kimura, and T. Shioda. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 $\alpha$  linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press, 2013 (doi:10.1089/AID.2012.0369).
- 14) Sapsutthipas, S., N. Tsuchiya, P. Pathipvanich, K. Ariyoshi, P. Sawanpanyalert, N. Takeda, P. Isarangkura-na-ayuthaya, and M. Kameoka. CRF01\_AE-specific neutralizing activity observed in plasma derived from HIV-1-infected Thai patients residing in northern Thailand: comparison of neutralizing breadth and potency between plasma derived from rapid and slow progressors. *PLoS One* 8:e53920, 2013.
- 15) Mori, M., K. Matsuki, T. Maekawa, M. Tanaka, B. Sriwanthana, M. Yokoyama, and K. Ariyoshi. Development of a novel in silico docking simulation model for the fine HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitope mapping. *PLoS One* 7:e41703, 2012.
- 16) Sriwanthana, B., M. Mori, M. Tanaka, S. Nishimura, T. Miura, P. Pathipvanich, P. Sawanpanyalert, and K. Ariyoshi. The effect of HLA polymorphisms on the recognition of Gag epitopes in HIV-1 CRF01\_AE infection. *PLoS One* 7:e41696, 2012.
- 17) Tsuchiya, N., P. Pathipvanich, A. Rojanawiwat, N. Wichukchinda, I. Koga, M. Koga, W. Auwanit, P. E. Kilgore, K. Ariyoshi, and P. Sawanpanyalert. Chronic hepatitis B and C co-infection increased all-cause mortality in HAART-naive HIV patients in northern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 1:1-9, 2012.

## 2. 学会発表

- 1) Takamura, S., J. E. Kohlmeier, H. Yagi, T. Nakayama, M. Tomura, K. Matsushima, D. L. Woodland, and M. Miyazawa. CD69 controls a balance between S1P- and CXCL16-induced chemotaxes during the process of memory CD8<sup>+</sup> T cell recruitment to the lung airways. **Keystone Symposium on Viral Immunity and Host Gene Influence.** March 21-26, 2012, Keystone, Colorado, U.S.A.
- 2) Miyazawa, M., M. Kato, Y. Kawasaki, and S. Tsuji-Kawahara. Rapid production of

virus-neutralizing IgM antibodies and protection against lethal retroviral infection in mice deficient of activation-induced cytidine deaminase (AID). **The 24th Workshop on Retroviral Pathogenesis.** Oct. 24-27, 2012, Philadelphia, U.S.A.

3) 本園 千尋, J. J. Miles, 宮澤 正顯, 上野 貴将, A. K. Sewell. HLA-B35 拘束性 HIV 特異的 TCR は野生型抗原に高い特異性を有する. **第 21 回日本組織適合性学会大会.** 2012 年 9 月 15-17 日, 東京.

4) 高村 史記, J. E. Kohlmeier, 八木 秀樹, 中山 俊憲, 松島 綱治, D. L. Woodland, 宮澤 正顯. CD69, S1P1, CXCR6 の相互作用によるメモリー CD8T 細胞の肺粘膜移行調節. **第 60 回日本ウイルス学会学術集会.** 2012 年 11 月 13-15 日, 大阪.

5) Miyazawa, M. Evolution of genetically determined resistance mechanisms to retroviral infections: Are we winners? International Symposium on Basic Research towards HIV Control. **第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会.** 2012 年 11 月 24-26 日, 横浜.

6) Motozono, C., J. S. Bridgeman, M. Miyazawa, A. K. Sewell, and T. Ueno. The impact of a single amino acid difference in CDR3 $\alpha$  on TCR $\alpha\beta$  cross-reactivity. **第 41 回日本免疫学会学術集会.** 2012 年 12 月 5-7 日, 神戸.

7) Takamura, S., J. E. Kohlmeier, H. Yagi, T. Nakayama, M. Tomura, K. Matsushima, D. L. Woodland, and M. Miyazawa. CD69 controls a balance between S1P- and CXCL16-induced chemotaxes during the process of memory CD8<sup>+</sup> T cell recruitment to the lung airways. **第 41 回日本免疫学会学術集会.** 2012 年 12 月 5-7 日, 神戸.

8) 伊藤 暢聡. タンパク質リン酸化酵素の阻害剤複合体の構造からみるユニークな阻害メカニズム. (招待講演) **第 12 回日本タンパク質科学学会年会.** 2012 年 6 月 20-22 日, 名古屋.

9) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. Pin1 のタウタンパク質凝集阻害能の解析. **第 12 回日本タンパク質科学学会年会.** 2012 年 6 月 20-22 日, 名古屋.

10) Tamashiro, T., Y. Tanabe, K. Kanaori, T. Ikura, N. Ito, and M. Oda. Contribution of Trp273 in the  $\alpha$ -repeat of the carbohydrate-binding module of endo-1,3- $\beta$ -glucanase to laminarin binding. **第 50 回日本生物物理学会年会.** 2012 年 9 月 22-24 日, 名古屋.

11) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. タウタンパク質の凝集の初期段階の解析. **第 50 回日本生物物理学会年会.** 2012 年 9 月 22-24 日, 名古屋.

屋.

12) Ito, N. Protein Data Bank & Structure Deposition at PDBj. (招待講演) **CCP4 Workshop.** October 29 - November 2, 2012, Fukuoka.

13) Io, K., Y. Matsui, K. Shindo, T. Izumi, M. Matsui, M. Shinohara, and A. Takaori-Kondo. HIV-1 Vif induces serine phosphorylation of p53 likely through proteasomal degradation of cellular targets. **Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses.** May 21 - 26, 2012, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.

14) 松井 佑亮, 新堂 啓祐, 永田 佳代子, 永井 雄也, 井尾 克宏, 篠原 正信, 多田 浩平, 阪本 貴士, 小林 正行, 高折 晃史. BiFC 法(蛍光蛋白再構成法)による HIV-1 Vif と CBF $\beta$  の相互作用解析. **第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会.** 2012 年 11 月 24-26 日, 横浜.

15) 井尾 克宏, 新堂 啓祐, 泉 泰輔, 西澤 正俊, 松井 道志, 篠原 正信, 阪本 貴士, 多田 浩平, 松井 佑亮, 丸山 互, 小林 正行, 高折 晃史. Vif は p53 のリン酸化を介して HIV-1 の感染性を増強する. **第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会.** 2012 年 11 月 24-26 日, 横浜.

16) 安 健博, 中島 敏晶, 柴田 宏樹, 成瀬 妙子, 有村 卓朗, 安波 道郎, 木村 彰方. NFKBIL1 はヒトおよびウイルス遺伝子のスプライシングを制御する. **第 21 回日本組織適合性学会大会.** 2012 年 9 月 15-17 日, 東京.

17) 成瀬 妙子, 森 一泰, 明里 宏文, 俣野 哲朗, 木村 彰方. アカゲザル ULBP2/RAET1H 遺伝子の多様性解析. **第 21 回日本組織適合性学会大会.** 2012 年 9 月 15-17 日, 東京.

18) 成瀬 妙子, 小西 真紀子, 柳田 梨紗, 照沼 裕, G. Sharma, G. Kaur, Narinder, K Mehra, 木村 彰方. HIV/AIDS 感受性の個体差と KIR, HLA 遺伝子多型. **第 21 回日本組織適合性学会大会.** 2012 年 9 月 15-17 日, 東京.

19) 木村 彰方, 大谷 仁志, 成瀬 妙子, G. Sharma, G. Kaur, N. K Mehra, 明里 宏文, 石田 貴文, 俣野 哲朗. 霊長類における TIM1 遺伝子進化と HIV/AIDS. **第 21 回日本組織適合性学会大会.** 2012 年 9 月 15-17 日, 東京.

20) 安 健博, 中島 敏晶, 柴田 宏樹, 成瀬 妙子, 有村 卓朗, 安波 道郎, 木村 彰方. HLA 領域内の NFKBIL1 はヒトおよびウイルス遺伝子の選択的スプライシングを制御する. **日本人類遺伝学会第 57 回大会.** 2012 年 10 月 24-27 日. 東京.

- 21) 成瀬 妙子, 森 一泰, 明里 宏文, 俣野 哲朗, 木村 彰方. 旧世界ザル ULBP2/RAET1H 遺伝子の多様性解析. 日本人類遺伝学会第 57 回大会. 2012 年 10 月 24-27 日. 東京.
- 22) 高橋 尚史, 野村 拓志, 高原 悠佑, 山本 浩之, 成瀬 妙子, 木村 彰方, 俣野 哲朗. サルエイズモデルにおける Gag 以外のウイルス抗原特異的 CTL 反応が関与する SIV 複製抑制機序. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月 13-15 日, 大阪.
- 23) 高橋 尚史, 山本 浩之, 成瀬 妙子, 木村 彰方, 俣野 哲朗. サルエイズモデルにおける Nef 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球反応が関与するウイルス複製制御機序に関する研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012 年 11 月 24-26 日, 横浜.
- 24) 中村 碧, 高原 悠佑, 松岡 佐織, 阪脇 廣美, 三浦 智行, 五十嵐 樹彦, 小柳 義夫, 成瀬 妙子, 木村 彰方, 俣野 哲朗. サルエイズモデルにおける抗 HIV 薬投与下の CTL 誘導治療ワクチン接種効果の解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012 年 11 月 24-26 日, 横浜.
- 25) 安波 道郎, 有吉 紅也. 東南アジアの臨床疫学フィールドから学ぶウイルス感染症学. シンポジウム2「熱帯感染症」S2-5. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月 13-15 日, 大阪.
- 26) Mori, M., N. Wichukchinda, R. Miyahara, M. Yasunami, P. Pathipvanich, K. Ariyoshi, and P. Sawanpanyalerti. Viral adaptation against KIR2D-associated Gag immune pressure & their effect on clinical outcome among HIV-1 CRF01\_AE-infected Thais. **19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.** March 5-9, 2012, Seattle, United States.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し



## Ⅱ. 分担研究報告書

## マウス APOBEC3 機能性多型の分子基盤解析

研究分担者 宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）

**研究要旨** APOBEC3 は一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼであり、細胞内でレトロウイルス複製制限因子として機能する。既存の感染性レトロウイルスは自然宿主の APOBEC3 に対抗する機能を獲得しており、APOBEC3 は異種由来レトロウイルスに対してしか効果が無いと信じられて来た。我々はマウスの APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対して強い複製制限効果を示しうること、マウス *APOBEC3* 遺伝子には多型があり、感染抵抗性の系統で発現する対立遺伝子は転写レベルで高発現であって、第5エクソンを含まないことを見出していた。今年度は、N-末端側のアミノ酸配列多型がウイルス複製抑制機能に与える影響を明らかにし、N-末端ドメインの立体構造上で上記の機能的な多型残基が占める位置を解析した。また、進化論的考察から、N-末端側の機能性多型と第5エクソンの獲得とが独立に起こり、外来性レトロウイルスの脅威の下でそれぞれの抵抗性遺伝子型が選択されて来たことを明らかにした。

### A. 研究目的

強力な生物学的変異原であるレトロウイルスの染色体組込みを阻止するため、哺乳類は複数の細胞内複製制限因子を獲得して来た。一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼ APOBEC3 はその一つであり、霊長類染色体上の内在性レトロウイルスには、他の如何なる宿主側抵抗性因子によるよりも、APOBEC3 による複製制限の痕跡が数多く残されている。一方、哺乳類による APOBEC3 獲得後に霊長類に感染するようになったレンチウイルス群は、Vifタンパク質を獲得することにより APOBEC3 の細胞内分解を促進し、標的細胞での複製阻害を回避している。しかし、自然宿主でないマウスの APOBEC3 は、Vif の有無に関わらず HIV-1 複製を強く阻害出来る。

我々はマウス APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対する生理的複製制限因子であり、自然抵抗性の異なる系統間に機能的な遺伝子多型があることを、米国の Warner Greene らと同時に、世界で初めて報告した。抵抗性対立遺伝子は転写レベルでもタンパク質レベルでも発現量が高く、その産物が第5エクソンを欠くのに対し、感受性対立遺伝子は低発現で、その産物は全長型主体であること、両対立遺伝子産物は互いにアミノ酸配列が異なり、N-末端側が複製抑制活性を決定すること、抵抗性遺伝子産物によるレトロウイルス複製抑制はデアミナーゼ活性非依存的であることは、我々が Greene らに先駆けて正確に示した。

マウス APOBEC3 とヒト APOBEC3G の N-末端

側 Z2 ドメインは、系統発生的にもデアミナーゼ活性部位のアミノ酸配列からも相同であるから、Z2 ドメインの機能的アミノ酸配列多型と第5エクソンの有無とが APOBEC3 機能に影響を与える機構を明らかにすれば、ヒト APOBEC3G に Vif による阻害を受けない HIV-1 複製抑制能を付与する分子設計の基盤が築けると期待される。しかし、過去に X 線結晶構造解析が行われているのはヒト APOBEC3G の C-末端側 Z3 ドメインのみであり、N-末端側ドメインの詳細な構造機能相関は、ヒトでもマウスでも明らかでない。

本研究は、マウス *APOBEC3* 遺伝子座における機能的な多型の存在を基礎に、APOBEC3 タンパク質の構造安定性と機能に与える N-末端側多型残基と第5エクソンの役割を明らかにし、最終的に Z2 ドメインの立体構造とデアミナーゼ非依存的なレトロウイルス複製抑制機構の関係を分子レベルで明らかにすることを目的としている。

昨年度の研究で、第5エクソンの有無がタンパク質翻訳効率を左右することを明らかにしたので、今年度は N-末端側多型残基の機能と進化に関する解析を実施した。なお、デアミナーゼ活性非依存的なレトロウイルス複製抑制機構について、今年度重要な発見があったが、原著論文投稿前であるのでこれについては記載しない。

### B. 研究方法

#### 1) マウス *APOBEC3* 各対立遺伝子産物間の相互残基置換

マウスレトロウイルス感染抵抗性で、高機能型の APOBEC3 を高く発現する C57BL/6 (B6)マウスと、

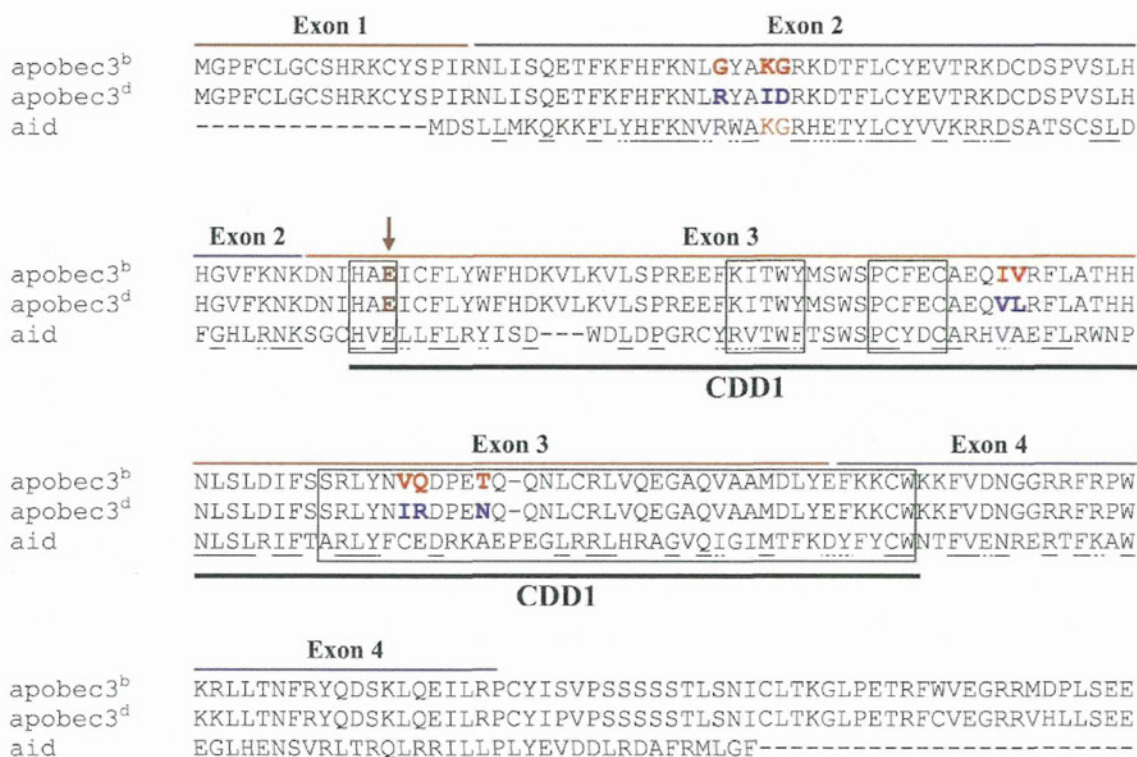


図1. マウス APOBEC3 N-末端ドメインのアミノ酸配列多型 B6 マウスで発現する高機能型対立遺伝子 (*b* アリル) 産物と、BALB/c マウスで発現する低機能型対立遺伝子 (*d* アリル) 産物の一次構造を、マウスの activation-induced cytidine deaminase (AID) と比較した。アリル間で異なるアミノ酸残基に色を付け、AID との間で保存された残基には下線を付けてある。四角で囲んだのはデアミナーゼ活性ドメインの共通モチーフ。矢印で示す E 残基が、マウス APOBEC3 のデアミナーゼ活性中心であることがわかっている。

感染感受性で低機能型の APOBEC3 を低く発現する BALB/c マウスから、それぞれ APOBEC3 cDNA を発現ベクターにクローニングし、site-directed mutagenesis により、多型の認められるアミノ酸残基を相互に入れ替えた変異クローンを作製した。得られた変異クローンを BALB 3T3 細胞に導入して安定発現細胞株を樹立、各細胞株における APOBEC3 分子発現は、RT-PCR による mRNA 検出と、発現産物末端に挿入したタグによる Western blot 法で確認した。

## 2) APOBEC3 発現細胞株におけるレトロウイルス複製効率の解析

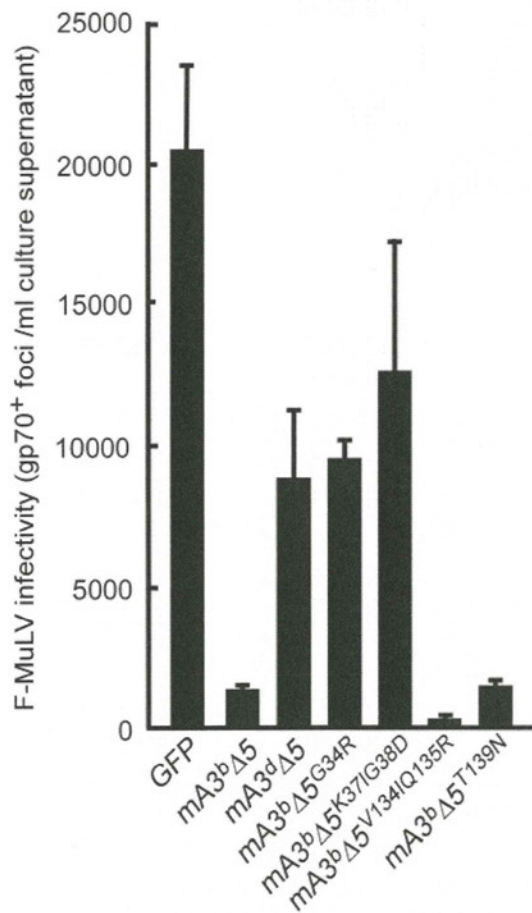
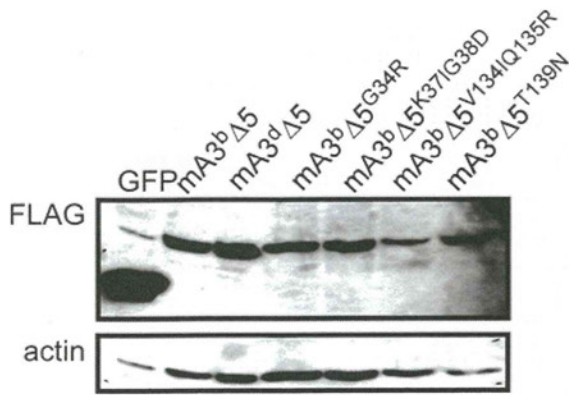
B-tropic のフレンド白血病ヘルパーウイルス (F-MuLV) 分子クローン FB29 を、1) で樹立した各 APOBEC3 変異クローン発現細胞に接種し、上清中の感染性ウイルス量を、*Mus dunni* 細胞における感染フォーカス形成で定量した。感染フォーカスの検出には、F-MuLV *env* 遺伝子産物に特異的なモノクローナル抗体 720 を用いた。

## 3) マウス APOBEC3 N-末端ドメインの立体構造の解析

最近岩谷らは、マウス APOBEC3 及びヒト APOBEC3G の N-末端ドメインと相同である、単一 Z2 ドメインのヒト APOBEC3 パラログ、APOBEC3C の結晶化と X 線構造解析に成功し、そのデータを発表した。そこで、研究分担者の伊藤と協力し、岩谷らのデータを参考に、タンパク質構造解析ソフトウェア Discovery Studio 3.5 を用いてマウス APOBEC3 の立体構造シミュレーションを行い、多型のある残基の位置をプロットして、それらの側鎖のオリエンテーションを解析した。

## 4) マウス APOBEC3 遺伝子多型の進化の解析

齧歯類の進化の過程で、APOBEC3 遺伝子の機能的多型がいつ、どのように獲得されたのか、また、遺伝子多型の選択過程に外来性レトロウイルスによる感染の脅威がどのように関与していたかを明らかにするため、米国 NIH, NIAID の Kozak 博士と共同して、野生マウスを含む多数種の齧歯類のゲノム DNA における APOBEC3 遺伝子の塩



**図2. Site-directed mutagenesis による多型残基の機能解析** B6 マウスで発現する、第5エクソン欠損型の高機能型対立遺伝子産物 (mA3<sup>b</sup>Δ5) を基盤に、その多型残基をそれぞれ BALB/c 型に置換した。変異 cDNA の持続発現細胞株に F-MuLV の分子クローンを感染させ、その複製に対する抑制効果を野生型遺伝子産物と比較した。

基配列、及びその転写産物発現パターンを解析した。その際、解析の中心は N-末端ドメインの多型部位と第5エクソンの発現調節部位に絞った。

### 【倫理面への配慮】

本研究計画にはヒト検体を用いた解析を含まないが、遺伝子組換え実験を含む。遺伝子組換え実験については、近畿大学遺伝子組換え実験安全管理員委員会による承認を得て、必要な拡散防止措置の下で実施した。

### C. 研究結果

#### 1) マウス APOBEC3 N-末端ドメイン多型残基の構造-機能相関

B6 マウスで発現する高機能型のマウス APOBEC3 対立遺伝子 (mA3<sup>b</sup>) 産物と、BALB/c マウスで発現する低機能型対立遺伝子 (mA3<sup>d</sup>) 産物とで、その N-末端側ドメインには8ヶ所のアミノ酸残基置換が認められる。このうち、デアミナーゼ共通モチーフ内に認められるアミノ酸配列多型は5残基であり、残り3残基は、共通モチーフよりも N-末端側に位置している (図 1)。

そこで、これらの多型残基を相互置換し、変異遺伝子産物のマウスレトロウイルス複製抑制活性を、野生型遺伝子産物のそれと比較した。同じ第5エクソン欠損型の APOBEC3 を、持続発現細胞株でほぼ等量発現させた場合 (図 2 の上段に Western blot 法によるタンパク質発現量の比較を示す)、高機能型である B6 マウス由来 b アリル産物は、強い F-MuLV 複製抑制活性を示した。一方、BALB/c マウス由来 d アリル産物の複製抑制効果は、第5エクソン欠損型であっても弱かった (図 2)。高機能型 b アリル産物を基礎に、その N-末端側 G34 残基を d アリル型 (R) に置換した場合、或いは K37 及び G38 残基を同時に d アリル型に置換した場合 (K37I, G38D) は、何れも F-MuLV 複製抑制活性が低機能型 d アリル産物と同じ程度にまで低下した。これに対して、デアミナーゼモチーフ内の V134 及び Q135 残基、或いは T139 残基を d アリル型に置換した場合には、b アリル産物の高いウイルス複製抑制活性が保たれた (図 2)。

このことから、系統間で多型のあるアミノ酸残基のうち、デアミナーゼモチーフより遥かに N-末端側の、G/R34, K/I37, G/D38 の3残基が、ウイルス複製抑制活性に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

#### 2) 機能性残基が APOBEC3 分子三次構造上で占める位置の解析

1) で解明した、機能上重要な多型残基が APOBEC3 分子の立体構造上でどのような位置を占めるかを明らかにするため、最近解明されたヒト APOBEC3C 分子の X 線結晶構造解析データを基礎に、コンピュータによるシミュレーションを行った。ヒト APOBEC3C とマウス APOBEC3 の N-末端