

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。赤文字で示したのが site-directed mutagenesis により機能的な重要性が示された残基。多型残基は、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。

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、機能的な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、これら機能的な残基は、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。

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、ゲノム DNA 及び cDNA の塩基配列解析により検討した。

昨年度既に、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った一群は、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 の翻訳効率が低下し、タンパク質発現量が著しく低下した。

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

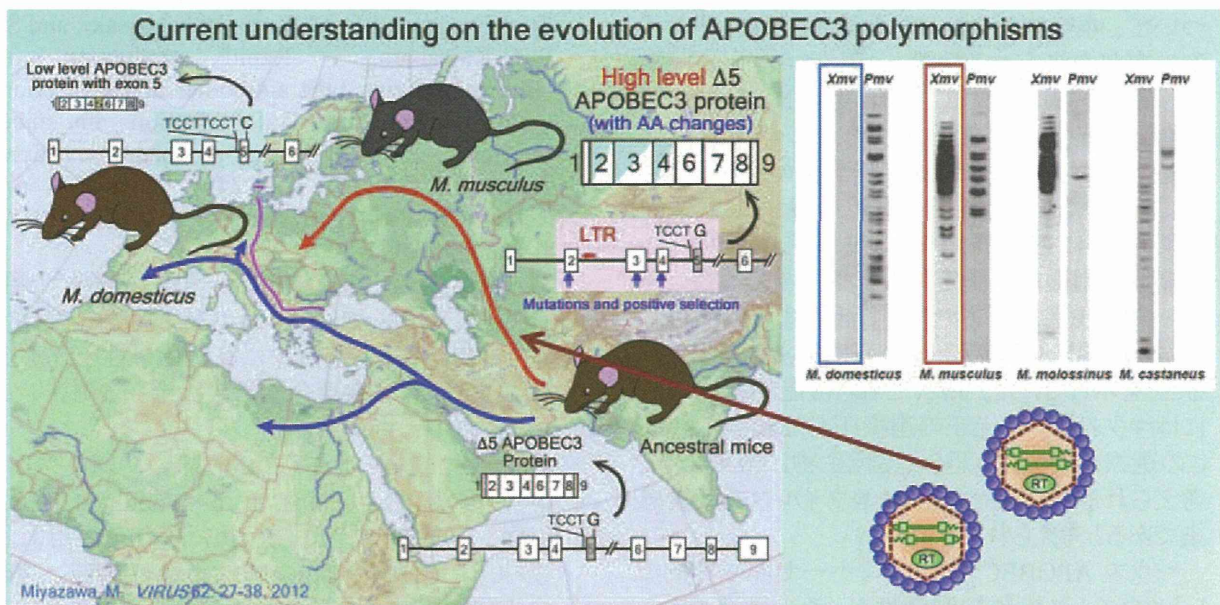


図4. マウス *APOBEC3* 遺伝子多型の獲得と選択の過程 インド亜大陸に出現したマウスの祖先は、現在の低機能型 *d* アリル産物と同じ N-末端側アミノ酸配列を持ち、第5エクソンを欠く、祖先型 *APOBEC3* を発現していた。インド亜大陸からカスピ海東岸を経てシベリアへと拡散した集団(赤矢印)では、N-末端側ドメインにアミノ酸置換を伴う変異が繰り返し独立して起こり(小さな縦の矢印)、高機能なアミノ酸配列(水色)が選択された。また、これとは独立に第2イントロンへのレトロウイルス LTR 組込みが起こり、第5エクソンを欠く mRNA が高発現となった。一方、地中海沿岸を西進した集団では第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。

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* 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、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* は現存

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(図4右側の赤い四角)。これに対して、*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(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。

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。

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たい。

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.

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⁺ 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 α 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⁺ 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.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し

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 (京都大学大学院医学研究科 教授)

研究要旨 APOBEC3 と同じファミリーに属する AID はリンパ腫や胃がん発症への関与が報告されていたが、APOBEC3 が宿主ゲノム DNA に変異を導入できるかどうかは不明であった。我々は、主に核内に存在する APOBEC3B が宿主のゲノムに変異を導入する能力を有することを見出した。さらに、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。

A. 研究目的

APOBEC3 と同じファミリーに属する一本鎖 DNA シトシン脱アミノ化酵素 AID は、リンパ腫や胃がん発症への関与が報告されている。そこで我々は、APOBEC3 が AID と同様に宿主ゲノム DNA に変異を導入できるかどうかを検討した。

B. 研究方法

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に、*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 細胞や SUDHL-6 細胞を用い、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。

【倫理面への配慮】

本研究では、遺伝子組換え生物を用いるため、施設の承認を受けた上で行った。また、患者検体の解析は、施設の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。

C. 研究結果

APOBEC3A や APOBEC3B は AID と同様にヒトの細胞でゲノムに変異を導入することを見出した。我々が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。

D. 考察

我々は、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、リンパ腫などの発生にかかわっている可能性が示唆される。APOBEC3 群蛋白は抗ウイルス蛋白であり、その AIDS 治療への応用が期待されているが、その過剰発現は発がんを引き起こす可能性もあり、慎重な検討が必要である。

E. 結論

APOBEC3 蛋白の新たな機能を明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

5) 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.

2. 学会発表

1) 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.

2) 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 β 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.

3) 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 亙, 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.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

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（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

研究要旨 マウスのレトロウイルスに対する生理的抵抗因子である APOBEC3 分子には多型が存在し、レトロウイルス感染抵抗性に差異を生じている。しかしながら、この多型がタンパク質の立体構造に与える影響や、多型と抵抗性との相関の分子構造基盤は明らかになっていない。

これらの点を解明するために、X線結晶解析によるマウス APOBEC3 分子の構造解析をめざし、ウイルスの複製抑制活性に関与している N-末端側ドメインの立体構造解析を目的に、このドメインの大量発現系の改善と結晶化条件の探索を行った。また、ホモロジーモデリングによる構造予測も行った。

A. 研究目的

マウスはレトロウイルスに対する生理的抵抗因子として APOBEC3 (mA3) を持っているが、その遺伝子には多型が存在し、ウイルスに対する自然抵抗性と密接に関連している。

mA3 は N 末端側の Z2 ドメインと C 末端側の Z3 ドメインからなるが、このうち N 末端側 Z2 ドメイン (mA3-N) がウイルス抵抗性に関与していることが明らかになっている。このドメインはヒトの APOBEC3G の N 末端側 Z2 ドメインと相同であるため、mA3-N のウイルス抑制機能に関する知見は、ヒト APOBEC3G と HIV-1 の関係にも重要な示唆を与えうると考えられる。

昨年度、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。

B. 研究方法

1) mA3-N の発現系の改善

昨年度構築した 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、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と変えたコンス

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つけたものや、His-tag を持たない発現系も構築し、発現・精製を試みた。

2) mA3-N の結晶化

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 マウスの両系統に由来する mA3 について、His-tag がアミノ末端に残った mA3-N の高純度試料を用いて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。

3) ホモロジーモデリングによる解析

結晶化条件の探索と並行して、ホモロジーモデリングによる mA3-N の構造予測を行った。

最近、mA3-N と同じ Z2 ドメインを有するヒト APOBEC3C の構造が報告された (Kimura *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**: 1005-1010, 2012)。この構造 (PDB ID: 3vow) を基に、MODELLER (Marti-Renom *et al.*, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**: 291-325, 2000) を用いて構造モデルを作成し、多型の影響を検討した。

また、昨年度の動的光散乱実験の結果から、mA3-N 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。

【倫理面への配慮】

本研究はマウス由来のタンパク質をバクテリアで発現させるものであるため、倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

1) mA3-N の発現系の改善

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1)。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 の切断が見られた。

この発現系では、従来のもの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従来のものより、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。

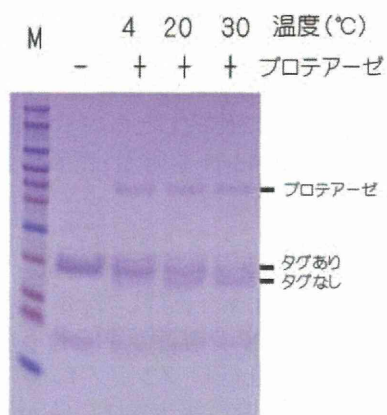


図1. プロテアーゼによる精製タグ(His-tag)の切断 SDS-PAGE, "M"は分子量マーカー。

2) mA3-N の結晶化

昨年度確立した発現系と精製法により得た、タグのついた mA3-N の高純度試料を用いて結晶化条件の探索を行ったが、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、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、抵抗性型 B6 マウスと感受性型 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。

3) ホモロジーモデリングによる解析

ホモロジーモデリングにおいては、ヒト APOBE3Cあるいはヒト APOBEC2を基にした解析の双方で、立体化学的に大きな問題のない、妥当な mA3-N の構造が得られた(図2)。

得られたモデルによると、多型に関与している残基の位置はかなり偏っており、その中でアミノ酸の特性が大きく変わるものはさらに小さなエリアに集積していることが判った。

また、APOBEC2 の二量体から得たモデルでは、mA3-N もその β 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。

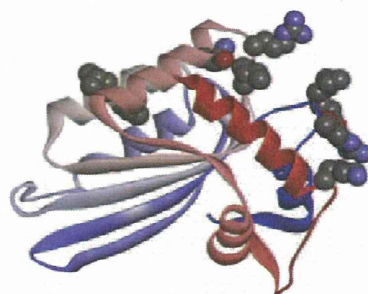


図2. ホモロジーモデリングによる mA3-N の予測構造 (上) ヒト APOBEC3C の構造をもとに予測された三次構造モデル。主鎖のリボンモデル上に、多型に関与している残基の側鎖を示している。(下) ヒト APOBEC2 の構造に基づく二量体モデル。

D. 考察

本研究では、マウスの APOBEC3 の多型と HIV-1 に対する感受性との関係を分子構造の点から調べるために、立体構造解析をめざし、発現系の改善、結晶化条件の探索、ホモロジーモデリ

ングによる構造予測を行った。

タンパク質の精製によく用いられる His-tag は、一般的には結晶化に好ましくなく、精製後は除去されるべきものである。昨年度構築した発現系では、これができなかったが、今年度数種類のプロテアーゼ認識サイトと制限酵素サイトの組み合わせで、一つだけ比較的効率よく His-tag が除去されるものが見つかった。

同じプロテアーゼを用いる場合でも、mA3-N 遺伝子の挿入位置がわずかに違うだけで、切断効率が大きく落ちること、また、効率よく切断れるものは、可溶性発現量が低いことなどは、この部分が mA3-N 本体と何らかの相互作用をしている可能性をうかがわせる(下記参照)。また、結晶解析に向けて、発現量の改善も必要と思われる。

昨年度構築した発現・精製系を用いた mA3-N の試料を主に用いて、幅広い結晶化条件の探索を行ったが、未だに結晶は得られていない。比較的分子量が小さく、かつコンパクトな構造をもつと思われる mA3-N が結晶化しない理由としては、精製に用いた His-tag の影響が考えられるほか、mA3-N が核酸に作用するため、電荷をもつアミノ酸残基を比較的多く持つことが原因である可能性も考えられる。前者は、今年度作成した新たな発現系で得た試料を用いることで対応できるが、後者の場合にはリジン残基のメチル化や変異の導入などの検討が必要となるかもしれない。

ホモロジーモデリングにより構築された mA3-N の構造により、多型に関与するアミノ酸残基のすべてが mA3-N の片面に集中しており、さらにアミノ酸残基の特性が大きく変わる多型はさらに限定された部分に局在していることが判った。mA3-N とウイルス側因子が直接相互作用するものと仮定した場合、この部位が相互作用部位に含まれる可能性が考えられる。

また、ヒト APOBEC2 の二量体に基づいたモデルでは、理論的に mA3-N も二量体を形成することが可能であることを示した。これは、昨年度の動的光散乱実験で、His-tag のついた mA3-N が二量体を形成していることを示唆するデータが得られていることを考慮すると興味深い。さらに、このモデルでは、mA3-N のアミノ末端が二量体のサブユニットの界面に比較的近い位置にあることを示している。アミノ末端にある His-tag の除去が容易ではないこと、また、除去が容易なコンストラクトでは可溶性発現量が減ることなどから、アミノ末端が mA3-N の二量体形成、ひいては安定性に影響を及ぼしている可能性がある。

E. 結論

マウス APOBEC3 のアミノ端側ドメインの発現系を改良し、精製タグ(His-tag)を除去した試料の調製・精製することができた。

タグをもった試料で、広範な結晶化条件の探索を行ったが、今のところ結晶は得られていない。

ホモロジーモデリングにより、同ドメインの構造予測を行った結果、多型に関与する変異のうち、アミノ酸の特性が大きく変わるものが局在している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2. 学会発表

1) 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.

2) 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.

3) Tamashiro, T., Y. Tanabe, K. Kanaori, T. Ikura, N. Ito, and M. Oda. Contribution of Trp273 in the α -repeat of the carbohydrate-binding module of endo-1,3- β -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.

4) 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.

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

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し

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 (長崎大学熱帯医学研究所 教授)

研究要旨 APOBEC3Gのtype Iインターフェロン反応性に見られる個人差は、個人のHIV-1感染感受性・抵抗性に寄与していることが想定される。本課題では、2000年に開始した、タイ北部のHIV感染者とその配偶者コホートの研究に際して収集・保存した凍結検体より、CD14陽性単球分画とCD4陽性Tリンパ球分画を分離して、IFN α 反応性APOBEC3G発現量を定量し、HIV感染抵抗性と相関する発現パターンを明らかにすることを目的とする。本年度は、凍結保存され細胞を用いた実験系を確立し、試験的に本コホートのHIV-1陰性者4名由来の検体を用いて実験したところ、細胞種によって異なるIFN α 反応性APOBEC3G発現に明らかな個人差があることが判明した。今後、残り約100名のHIV暴露者由来の検体を評価し、HIV感染抵抗性のある群に特徴的なAPOBEC3G発現様式の有無を明らかにする予定である。

A. 研究目的

ウイルス感染細胞に内在する感染抵抗性因子としてシチジンデアミナーゼが注目されている。その中でもAPOBEC3Gは、酵素活性とは独立した機序での抗HIV活性も知られており、感染の標的細胞における発現量や細胞種特異的スプライシング等における個人差は、宿主の感染後の転帰を左右する要因となっていることが想定される。我々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コホート研究」では、ART導入前の自然経過や性交渉による感染成立、ART導入による延命や副作用の出現等の臨床像にどのような要因が働いているかを解明してきた。この研究基盤で収集した末梢血単核細胞(PBMC)検体が、宿主応答の分析に適用可能な状態で保管されている。本分担研究は、Biasinら(2007)がイタリアの夫婦間曝露後非感染者で観察した、APOBEC3Gのtype Iインターフェロン反応性発現の個体差が、北タイの集団でも観察できるか否かを検証することを目的とした。本年度は、ランパンHIVコホート研究対象者由来の凍結保存細胞を用いて、実験条件を検討した。

B. 研究方法

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PBMC検体を用いるにあたり、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

存在下に4時間培養して、RNAを調製した。これを検体として、APOBEC3G、内部標準としてのGAPDH、type Iインターフェロン反応性の陽性対象としてのMXI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。なお、得られたtype Iインターフェロン反応性遺伝子発現は、並行して実施した健常者ボランティアの新鮮分離PBMCと同等の発現レベルであり、凍結保存中の反応劣化は無視できると考えた。

【倫理面への配慮】

HIV感染患者および配偶者の遺伝子および疫学研究にあたって、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)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。今回、コホート研究開始当初の検体収集時から、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。

C. 研究結果

夫婦間曝露後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約100名のHIV感染者の配偶者を対象とした。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type Iインターフェロン反応性遺伝子発現を検討した結果、MXIの反応性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(#341, N-PBMC)、高値/

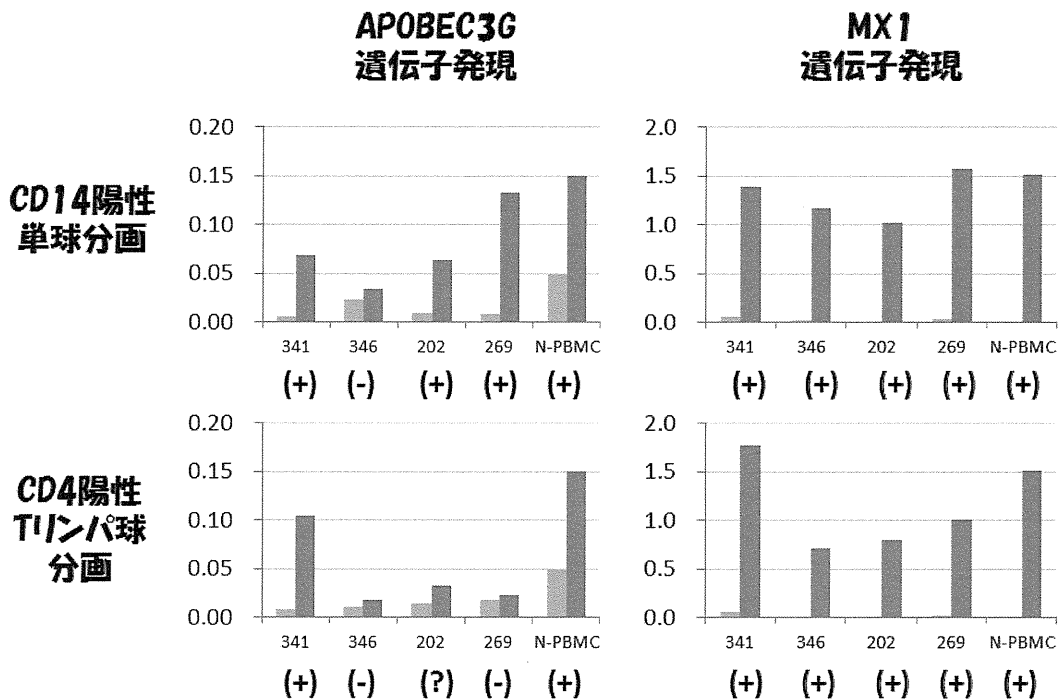


図1 HIV 暴露・非感染者における *APOBEC3G* 遺伝子発現実験 4名の HIV 感染者の非感染配偶者、および1名の健常人新鮮分離 PBMC(右端)に由来する CD14 陽性細胞(単球)と CD4 陽性細胞の、IFN α 刺激の有無による相対遺伝子発現の変化 (*GAPDH* 遺伝子を標準とする)

低値(#202, #269)、低値/低値(#346)の3群に分かれた。すなわち、細胞種によって異なる *APOBEC3G* の反応性の個体差が存在することを観察した(図1)。

D. 考察

ランパンHIVコホートの、HIV感染者を配偶者としてもつ非HIV感染者の集団(約100名)は、HIV暴露歴によって、濃厚なHIV-1曝露(毎月10回以上の曝露)があった陰性者(約25%)、中程度(月9回以下)の曝露があった陰性者(約60%)、暴露歴のなかった陰性者(約15%)の3群に分けることができる。本年度、10年以上保存された凍結細胞を用い、タイ国内で実験を行うという難しい条件下において、*APOBEC3G* の発現量における個体差を評価する実験系を確立できたことは、非常に意義がある。今後、残りの約100検体を用いて *APOBEC3G* 発現パターンを調べることにより、*APOBEC3G* と HIV 感染抵抗性(すなわち、暴露の程度)との量的相関の有無や、曝露後非感染者に特徴的な発現パターンを探る計画である。また、得られたRNAを用いて、*APOBEC3G* の発現量だけでなく、スプライシングパターンに特徴的な相違がないかも検討する。さらには、HIV感染者の自然経過との関連についても検索を進める予定で

ある。

E. 結論

細胞内在性抗 HIV 抵抗性因子である *APOBEC3G* の発現が type I インターフェロンに反応して増強するか否かに、細胞種によって様相の異なる個人差の存在することを実験的に明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sapsutthipas, S., N. Tsuchiya, P. Pathipavanich, 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.
- 2) 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.

3) 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.

1) 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) 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.

1) 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. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
(該当なし)
2. 実用新案登録
(該当なし)
3. その他
(該当なし)

ヒト APOBEC3 遺伝子の機能性多型の探索

研究分担者 木村 彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

研究要旨 HIV 感染もしくは AIDS 発症の感受性・抵抗性を規定するヒト宿主主要因の同定を目的として、ヒト集団における HIV/AIDS 関連多型の探索を行った。霊長類の比較ゲノム解析から *TIMI* 遺伝子、*OAS1* 遺伝子、*APOBEC3* 遺伝子群が進化的に強い選択圧を受けたことが示唆された。また、昨年度までに *TIMI* 遺伝子では Mucin ドメインに強い選択圧がかかったこと、タイ人集団で *TIMI* 多型が HIV 感染後 AIDS 発症感受性と関連することを報告した。今年度はインド人集団を対象とした解析から、*TIMI* 多型は HIV 感染後の CD4 数減少度と関連することを確認した。また、*OAS1* 遺伝子では特定のドメインではなく、全体に渡る選択圧の存在が示唆され、日本人およびインド人集団で *OAS1* 多型と HIV 感染後のウイルス量との関連が示唆された。一方、B 細胞株を用いて、*APOBEC3* 遺伝子領域内遺伝子群の多型と発現性を検討したところ、これらの間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* 遺伝子領域のメチル化を検討したところ、*APOBEC3H* の上流および下流のメチル化に有意な性差が認められた。さらに、*APOBEC3H* 上流のメチル化と *APOBEC3H* 遺伝子発現性には正の関連があった。このことから、*APOBEC3* 領域と HIV/AIDS との関連を検討する上では、性差を考慮することが必要であると考えられた。

A. 研究目的

HIV 感染症は人類が新たに遭遇したウイルス感染症であり、無治療であれば大半の患者が免疫不全症である AIDS を発症する。しかしながら、HIV 感染ないし AIDS 発症の感受性・抵抗性には個体差があり、そこにはウイルス側の要因と宿主側の要因が関わる。一般にウイルスと宿主は相互に関連しながら進化を遂げるが、HIV も例外ではない。ウイルスゲノムの比較解析から、旧世界ザルの SIVmac が、チンパンジー内で変異を集積した SIVchz が、約 120 年前にヒトに感染したものが HIV であると考えられている。一方、宿主側の要因を霊長類の進化と合わせて考えると、SIVmac は旧世界ザルと共存進化の関係にあり、チンパンジーは SIVcpz に感染するも比較的 AIDS に抵抗性である形質を進化的に獲得しているのに対し、ヒトは HIV の出現からそれほど時間が経っていないため、進化的な共存関係には至っていないと言える。このような進化的な視点から HIV/AIDS 感受性・抵抗性の宿主主要因を解明することは、新たな HIV/AIDS 治療ないし予防戦略をもたらす。

我々は HIV/AIDS 感受性・抵抗性を規定する宿主主要因を解明することを最終目的として、霊長類比較ゲノム解析による免疫・感染症関連遺伝子群における進化圧の検討を通じた候補遺伝子

領域の選択、ヒト集団における候補遺伝子領域の多型探索と連鎖不平衡解析、およびアジア民族集団を対象にした HIV/AIDS 関連解析を行うことを本研究の目的とする。ことに、これまでの進化的検討から霊長類の進化上選択圧がかかったことが明らかとなっている *APOBEC* 遺伝子群、*HLA* 遺伝子群、NK 細胞機能に関わる遺伝子群を解析の中心に据える。

B. 研究方法

1) インド人集団における *TIMI* 多型と HIV/AIDS との関連解析

インド人 HIV 感染者 200 名について、*TIMI* 遺伝子のムチンドメインをシーケンシングし、ハプロタイプ構造を推定した。ついで、*TIMI* ハプロタイプと HIV 感染感受性、感染後 CD4 数、ウイルス量との関連を検討した。

2) 霊長類の比較ゲノム解析による *OAS1* 遺伝子における進化選択圧の検討

全ゲノム配列が解明されているヒト、チンパンジー、アカゲザル、マーモセットを対象として免疫関連遺伝子群のゲノム配列を比較し、 $\Sigma Bn/Bs$ を算出した。また、各系統における Bn/Bs 比の分布から、進化選択圧が推定される遺伝子として *OAS1* を選択した。ついで、これらの霊長類の進化過程において有意な進化選択圧が存在したと推定さ

表1. *TIM1* ハプロタイプと HIV 感染後 CD4 数との関連

ハプロタイプ	D1		D3-A		D3-C		D4		W-A	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
未治療群 (n=99)	n=5	n=94	n=77	n=22	n=43	n=56	n=34	n=65	n=8	n=91
Median CD4+T Counts	448	439	448	400	425	457	410	468	451	440
p value	0.96		0.44		0.76		0.1		0.81	
治療中群 (n=101)	n=4	n=97	n=66	n=35	n=41	n=60	n=41	n=60	n=11	n=90
Median CD4+T Counts	284	239	262	211	219	253	222	261	225	250
p value	0.99		0.07		0.39		0.33		0.96	
全体 (n=200)	n=9	n=191	n=143	n=57	n=84	n=116	n=75	n=125	n=19	n=181
Median CD4+T Counts	324	355	368	313	358	344	324	364	355	355
p value	0.89		0.02		0.82		0.07		0.96	

れるアミノ酸を推定した。

3) *OAS1* 遺伝子多型と HIV/AIDS との関連

日本人 HIV 感染者 46 名、インド人 HIV 感染者 137 名について、ダイレクトシーケンス法により *OAS1* 多型を検討し、HIV 感染後のパラメーター(ウイルス量、CD4 数)との関連を検討した。

4) *APOBEC3* 領域遺伝子の発現における性差の検討

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性および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。得られた情報を合わせて *APOBEC3* 領域遺伝子群の発現性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】

本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ている。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)。

C. 研究結果

1) インド人集団における *TIM1* 多型と HIV/AIDS との関連解析

インド人 HIV 感染者の *TIM1* 遺伝子ハプロタイプを決定したところ、D1, D3-A, D3-C, D4, W-A の 5 ハプロタイプに分類された。ついで、未治療群、抗ウイルス薬治療群、コホート全体で CD4 陽性細胞数を比較したところ、コホート全体で D3-A の有無で CD4 数に有意な相違が認められた(表1)。

すなわち、D3-A 陽性者は HIV 感染後の CD4 細胞数が比較的高値に保たれていた。また、この傾向は未治療群、治療群のいずれにおいても観察された一方、ウイルス量にはこのような関連は認められなかった。

2) 霊長類の比較ゲノム解析による *OAS1* 遺伝子における進化選択圧の検討

霊長類を対象とした免疫関連遺伝子の比較ゲノム解析を行った。ヒト、チンパンジー、アカゲザル、マーモセットのそれぞれの系統で、Bn/Bs 比から有意な選択圧が存在したと考えられる遺伝子を 13 種類同定した(図1)。昨年度報告したように、*APOBEC3G* はヒト系統で有意な選択圧がかかっていた。また、*OAS1* はヒト、チンパンジーの両系統で有意な選択圧がかかった遺伝子であることが判明した。

OAS1 は選択的スプライシングによって複数のアイソフォームが形成されるが、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、マーモセットの4種で有意な選択圧が推定されるアミノ酸配列を検討したところ、特定のドメイン内ではなく、全体に分布していた(図2)。また、特徴的なこととして、チンパンジーでは *OAS* ドメインに終止コドンが存在し、その C 末側が欠損していた。

Pairwise comparison plots of Bn and Bs for five primate lineages and Σ (n = 1222)

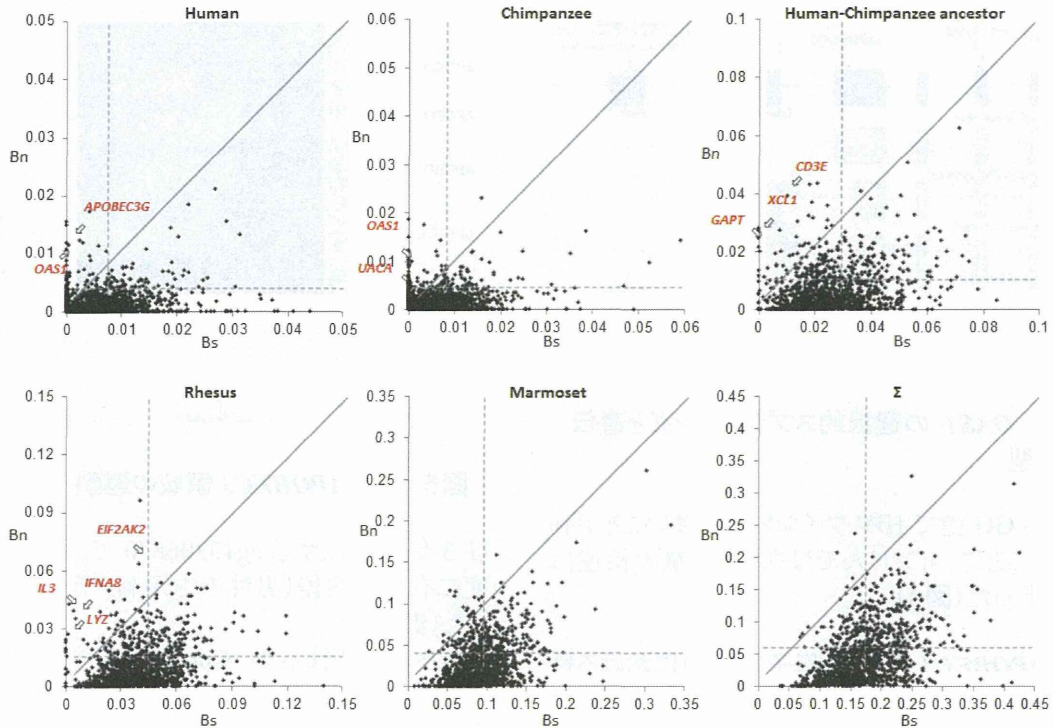


図1. 霊長類における免疫関連遺伝子の進化選択圧

3) *OAS1* 遺伝子多型と HIV/AIDS との関連

前述のように、*OAS1* 遺伝子ではエクソン 5, 6, 7 の選択的スプライシングによって複数のアイソフォームが形成される(図3)。また、*OAS1* 遺伝子の多型のうち、rs10774671 (A>G) はスプライシングアクセプターサイトに存在しているためエクソン6の

プライシングパターンが異なり、A 型では低酵素活性の p48/p52 を、G 型では高酵素活性の p46 をコードすることが知られている(図3)。

そこで、日本人およびインド人集団で HIV 感染者の *OAS1* 多型を解析し、HIV ウイルス量との関連を検討した。その結果、いずれの民族集団に



図2. 霊長類における *OAS1* の進化選択圧

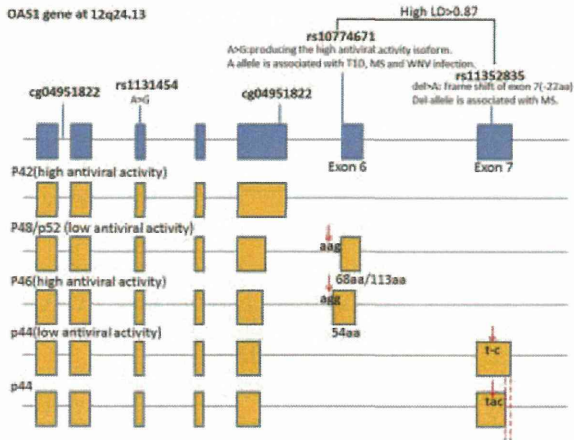


図3. *OAS1* の選択的スプライシングと遺伝子多型

においても GG 型で HIV ウイルス量が多いことが判明した。ことに、インド人ではウイルス量の相違は有意であった(図4)

4) *APOBEC3* 領域遺伝子の発現における性差の検討

昨年度までに、92 種類の B 細胞株を対象として *APOBEC3* 領域の遺伝子多型をタイピングし、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5)。また、この領域内の5か所の CpG アイランドについてメチル化の程度を検討するとともに、*APOBEC3-D, -F, -G, -H* および *CBX7* の遺伝子発現量を検討したが、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。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* の発現量には有意な性差(男性の方が高値)が存在した(表2)。また、*APOBEC3H* の 5' 側に存在する cg17972162 およ

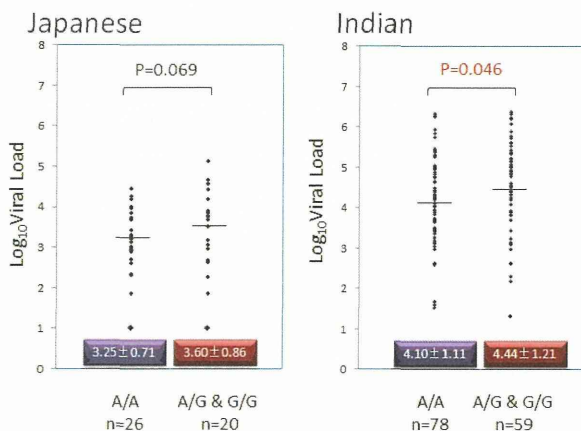


図4. *OAS1* 遺伝子 rs10774671 多型と HIV ウイルス量の関係

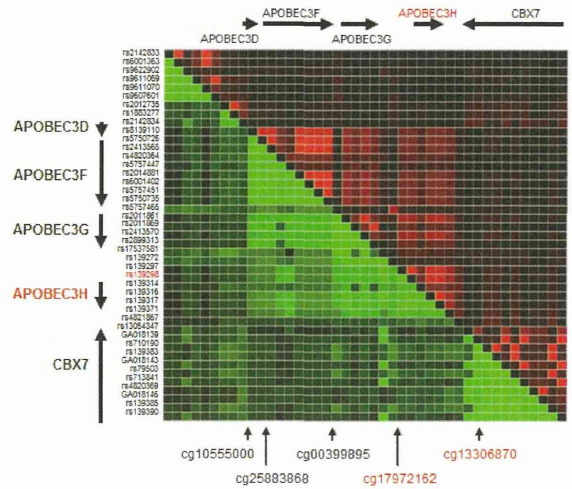


図5. ヒト *APOBEC3* 領域の連鎖不平衡構造

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(表2)。

さらに、これらの 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 は正の相関、cg13306870 は負の相関を示した(図6)。

D. 考察

本研究で、霊長類において進化選択圧を受けた免疫関連遺伝子を同定したが、そのうち *TIMI* および *OAS1* について HIV/AIDS との関連を検討したところ、前者は HIV 感染後の AIDS 関連予後、後者は HIV ウイルス量の個体差と関連することが示唆された。*OAS1* の rs10774671 多型については、高酵素活性でありウイルス増殖を抑制すると推定される GG 型でむしろ HIV ウイルス量が高く、予想とは逆の結果が得られた。以前に、欧米人で *OAS1* 多型と HIV ウイルス量との関連を検討した

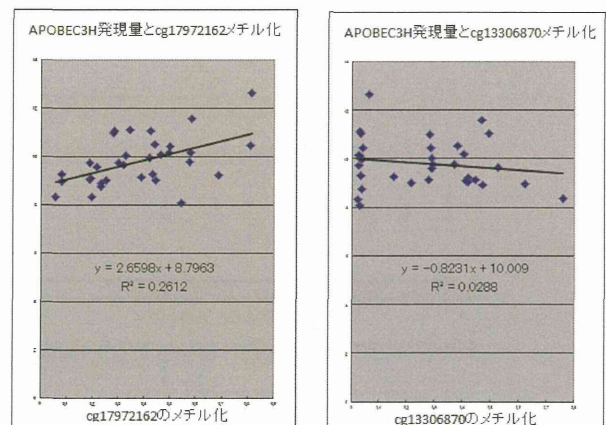


図6. *APOBEC3H* 遺伝子発現とメチル化との関連

報告があるが、その報告では明瞭な関連が認められていないため、rs10774671 多型自体が HIV ウイルス量を遺伝的に制御していない可能性が考えられる。OAS1 遺伝子には他にも多数の多型が存在し、そのうちいくつかは rs10774671 と連鎖不平衡にある(図3)ため、今後症例数を増やすとともに、他の多型についても検討することとしている。さらに、以下に示すように、性差は重要な要因であることが示唆されるため、OAS1 の解析でも性差に着目したい。

これとは別に、本研究で、APOBEC3 領域の遺伝子発現や CpG メチル化の程度に性差があることが明らかになった。このような知見は従来報告されていないため、HIV/AIDS 感受性・抵抗性の遺伝的制御に関するまったく新たな視点からのアプローチになると考えられる。

E. 結論

霊長類の比較ゲノム解析で TIM1 や OAS1 に進化選択圧がかかったことが推定され、日本人およびインド人を対象にした研究から、これらが HIV/AIDS 関連遺伝子であることが推定された。一方、APOBEC3H 遺伝子の発現性とその周辺の CpG アイランドのメチル化には有意な性差が存在する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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⁺ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* **8**:e54300, 2013.
- 4) 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⁺ T cell counts in HIV-1 seroprevalent north Indians. *Hum. Immunol.* **74**:163-165, 2013.

5) 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 TRIM5a 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).

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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。

9) 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。

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Miyazawa, M., K. Okubo, K. Shiraki, M. Maruyama, J. Yamada, and H. Yamada.	Immunological approaches for healthy longevity.	<i>Anti-Aging Medicine</i>	9	43-50	2012
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.	<i>J. Med. Chem.</i>	55	4373–4381	2012
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.	<i>Scientific Reports</i>	2	806	2012
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.	<i>Eur. J. Immunol.</i>	43	93-103	2011
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.	<i>J. Proteomics</i>	75	4863-4873	2012

Furukawa, A., H. Okamura, R. Morishita, S. Matsunaga, N. Kobayashi, T. Ikegami, T. Kodaki, <u>A. Takaori-Kondo</u> , A. Ryo, T. Nagata, and M. Katahira.	NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	425	284-289	2012
Chonabayashi, K., M. Hishizawa, S. Kawamata, Y. Nagai, T. Ohno, T. Ishikawa, T. Uchiyama, and <u>A. Takaori-Kondo</u> .	Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3.	<i>Leukemia</i>	advance online publication 14 Dec. 2012	doi: 10.1038/leu.2012.333	2012
Ohtani, H., T. K. Naruse, Y. Iwasaki, T. Ishida, H. Akari, T. Matano, and <u>A. Kimura</u> .	Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates.	<i>Immunogenet.</i>	64	669-678	2012
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, <u>A. Kimura</u> , and T. Matano.	Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques.	<i>J. Virol.</i>	86	6481-6490	2012
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, <u>A. Kimura</u> , and T. Matano.	A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8 ⁺ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques.	<i>PLoS One</i>	8	e54300	2013
Sharma, G., H. Ohtani, G. Kaur, T. K. Naruse, S. K. Sharma, M. Vajpayee, <u>A. Kimura</u> , and N. K. Mehra.	Status of TIM-1 exon 4 haplotypes and CD4 ⁺ T cell counts in HIV-1 seroprevalent north Indians.	<i>Hum. Immunol.</i>	74	163-165	2013
Nakayama, E. E., T. Nakajima, G. Kaur, J. Miyama, H. Terunuma, N. K. Mehra, <u>A. Kimura</u> , and T. Shioda.	A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 α linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection.	<i>AIDS Res. Hum. Retroviruses</i>	in press	doi:10.1089/AID.2012.0369	2013