

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

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、レトロウイルス抵抗性に差異を生じている。この多型がタンパク質の立体構造に与える影響や、立体構造上の変化と抵抗性との関連など、この現象の分子構造からの理解はなされていない。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、結晶化条件の探索を行った。また、APOBEC3 の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関与する因子 X と APOBEC3 との相互作用の解析を目指して、因子 X の発現・精製系の構築、表面プラズモン共鳴による相互作用の同定、大腸菌における共発現系の構築などに着手した。

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。

APOBEC3 ファミリーは Z1, Z2, Z3 の3種類の Z ドメインの組み合わせとして構成されているが、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。このうち N 末端側 Z2 ドメイン (mA3-N) がデアミナーゼ活性および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 の関係にも重要な知見を与えうると考えられる。

一方、宮澤らは mA3 の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関連して、mA3 と相互作用する蛋白質因子 X を同定したが、その相互作用の詳細は不明である。

本研究では、mA3-N の立体構造を X 線結晶解析により決定し、多型が立体構造に与える影響を明らかにすることを目指した。さらに、因子 X と mA3 の相互作用を溶液中で定量的に解析する系の確立にも着手した。

なお、因子 X とその周辺実験については、原著論文投稿および特許出願前であるので、詳細は記載しない。

B. 研究方法

1) マウス APOBEC3 アミノ端側 Z ドメインの精製と結晶化条件の探索

昨年度までに、アミノ末端に精製用の His-tag タグを持ち、かつこのタグをプロテアーゼで除去で

きる系を大腸菌で確立したが、発現量や非特異的切断などの問題があった。そこで、発現条件や精製条件の見直しを行った。

また、mA3 は核酸に結合するため表面に正電荷を多くと持つと考えられ（実際 mA3-N は陽イオン交換樹脂に結合する）、これが結晶化に悪影響を与えている可能性を考え、蛋白質の結晶化でしばしば行われるリジン残基のメチル化を試みた。具体的にはジメチルアミンボランとホルムアルデヒドを用いて選択的メチル化を行った。

得られた野生型またはメチル化された mA3-N 試料を用いて結晶化条件の探索を行った。ハンギングドロップによる蒸気拡散法により、各種スクリーニングキット等を利用した。また、低温での結晶化や界面活性剤などの添加等も試みた。得られた結晶様物質は実際に X 線を照射し、評価した。

2) 因子 X の発現と精製

mA3 との相互作用の詳細かつ定量的な解析のためには、高純度の因子 X 試料が必要である。そこで、大腸菌による発現系を構築した。因子 X の cDNA を各種ベクターに挿入し、発現タグ、温度、誘導条件などを検討した。

発現が確認された後は各種クロマトグラフィーによる精製を行い、精製タグの除去等の条件も検討した。

3) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との相互作用解析

mA3-N と因子 X との相互作用を定量的に解析するために、Biacore T100 を使い、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による測定を行った。



図1. マウス APOBEC3 N-末端ドメイン (mA3-N)の精製 M: 分子量マーカー Lane 1: His-tag がついた状態 Lane 2: His-tag 切断後のイオン交換クロマトグラフィーにより精製された mA3-N.

4) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との共発現系の構築

上記2)で得られた因子 X の発現系をもとに、大腸菌による因子 X と mA3-N の共発現を試みた。

複合体の形成を検知するために、因子 X と mA3-N には異なる精製用タグを付加した。発現条件は上流にある因子 X のものを用い、それぞれの精製タグで別個に精製し、精製試料に他方が含まれるかをみることで、複合体の形成を検知することにした。

【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、東京医科歯科大学遺伝子組換え生物等実験安全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 アミノ端側 Zドメインの精製と結晶化条件の探索

発現および精製条件の再検討を行った結果、精製用 His-tag を除去した mA3-N をミリグラム単位で安定に精製することが可能になった(図1)。発現量や精製における挙動などに関して、抵抗性型 B6 マウスと感受性型 BALB/c マウスの

mA3-N 間に大きな差は見られなかった。

リジン残基のメチル化では、多くの沈殿を生じたものの、精製可能な程度の可溶蛋白質を回収できた。メチル化後の mA3-N は、予想通り陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて野生型とは異なるイオン強度で溶出された。

結晶化は数多くの条件で検討したが、一部で塩結晶の析出が見られた以外、結晶様のものを得ることはできなかった。メチル化した試料は野生型のものより溶解度が低くなり、沈殿が多くみられる傾向はあったものの、結晶化には至らなかった。また、結晶化においても、抵抗性型と感受性型の mA3-N のあいだに大きな差異は見られなかった。

2) 因子 X の発現と精製

因子Xは、大腸菌で融合蛋白質として可溶性形で発現することができた。その後、アフィニティークロマトグラフィー、精製タグの切断、イオン交換クロマトグラフィーなどを経て、高純度の試料を得ることができた(図2)。

3) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との相互作用解析

現状では暫定的な結果ではあるが、SPR により、mA3-N と因子Xの間に結合が見られた。結合に関する定量的な解析はできなかったが、解離に関しては早い解離と遅い解離の2つが混在すると仮定した場合、妥当なフィッティングが得られた。

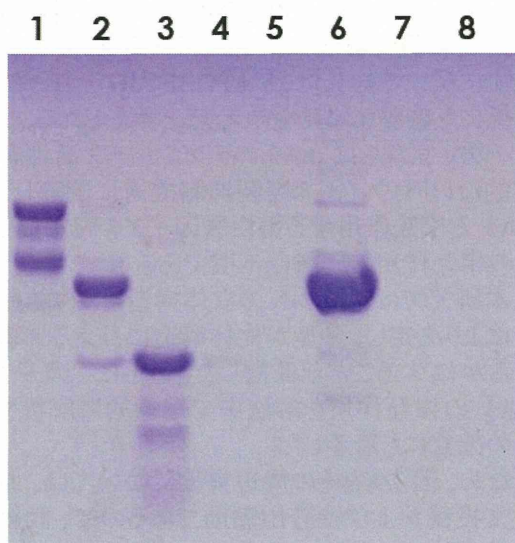


図2. 因子Xの発現と精製 Lane 1: 精製タグとの融合蛋白質 Lane 2: プロテアーゼによる精製タグの切断 Lane 3-8: 切断後のイオン交換クロマトグラフィーによる精製画分 (Lane 3 が因子Xに、Lane 6 が除去されたタグに相当)

4) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との共発現系の構築

共発現した大腸菌を破碎し、遠心後の上清を mA3-N と因子 X、それぞれの精製タグによりアフィニティー精製したものを SDS-PAGE で調べたところ、通常の CBB 染色では、明確にもう一方のタンパク質の結合を示すバンドは見られなかった。そこで、抗体によるブロッティングを行った結果、mA3-N と因子 X が共精製されてきたことを示唆するバンドが見られた。

D. 考察

昨年度まで、我々は精製用の His-tag を持ったままの mA3-N 試料を用いて結晶化条件の検討を行ってきた。比較的分子量の低い mA3-N において、His-tag の負の影響は大きいと考え、その除去を行ったが結晶を得ることができなかった。mA3-N の中にしっかりした立体構造を持たない部分がある可能性が考えられるほか、mA3 が核酸結合蛋白質であることから、表面電荷の分布特性などが結晶化の障害となっている可能性がある。今後、変異の導入や特異的抗体フラグメントなどとの共結晶化などの検討が必要となろう。その意味では、mA3 と相互作用する他の蛋白質との共結晶化も重要となろう。

因子 X と mA3-N の相互作用については、SRP 法と共発現の両方で両者の結合を示唆するデータが得られた。特に、SRP 法で両者の解離が2段階で進む可能性が示されたのは興味深い。静電相互作用のような静的な結合だけでなく、構造変化を含むような複合体の形成がなされているのかもしれない。ただし、二つの実験結果はまだ暫定的なものであり、明確な結論を得るためには、実験系の改善と、そこから得られるであろうデータの詳細な解析を待つ必要がある。

E. 結論

本研究では、マウスの APOBEC3 の多型とウイルス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、X線結晶解析による立体構造解析をめざした。その結果、高純度の試料を得る精製方法の確立には成功したものの、結晶は得られなかった。

マウスの APOBEC3 の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関与すると思われる因子 X との直接的な相互作用を暫定的ながら示すことができた。マウスの APOBEC3 と因子 X との複合体が安定なものなのかなどの問題点も考えられるが、最終的には複合体の構造を結晶解析で明らかにしたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakabayashi, M., Y. Tsukahara, Y. Iwasaki-Miyamoto, M. Mihori-Shimazaki, S. Yamada, S. Inaba, M. Oda, M. Shimizu, M. Makishima, H. Tokiwa, T. Ikura, and N. Ito. Crystal structures of hereditary vitamin D-resistant rickets-associated vitamin D receptor mutants R270L and W282R bound to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and synthetic ligands. *J. Med. Chem.* **56**: 6745–6760, 2013.
- 2) Masuno, H., T. Ikura, D. Morizono, I. Orita, S. Yamada, M. Shimizu, and N. Ito. Crystal structures of complexes of vitamin D receptor ligand-binding domain with lithocholic acid derivatives. *J. Lipid Res.* **54**: 2206–2213, 2013.
- 3) Ikura, T., and N. Ito. Peptidyl-prolyl isomerase activity of FK506 binding protein 12 prevents tau peptide from aggregating. *Protein Engineering, Design and Selection* **26**: 539–546, 2013
- 4) Higo, K., T. Ikura, M. Oda, H. Morii, J. Takahashi, R. Abe, and N. Ito. High resolution crystal structure of the Grb2 SH2 domain with a phosphopeptide derived from CD28. *PLoS One* **8**: e74482, 2013.

2. 学会発表

- 1) Ito, N. Structure Deposition at PDBj. **OIST/CCP4 Workshop**, November 4–9, 2013. Onna, Okinawa.
- 2) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. プロリン異性化反応がタウタンパク質の凝集を阻害する. **第 13 回日本蛋白質科学会年会**. 2013 年 6 月 12–14 日, 鳥取.
- 3) 沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 伊藤 暢聡, 福森 義宏, 三木 邦夫. 巨大ヘモグロビン結晶中での酸素結合状態の操作. **日本結晶学会 2013 年度年会**, 2013 年 10 月 12–13 日, 熊本.
- 4) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. タウタンパク質に対する Pin1 のプロリン異性化活性を測定するための新しい方法. **第 51 回日本生物物理学会年会**, 2013 年 10 月 28–30 日, 京都.
- 5) 品川 健朗, 沼本 修孝, 鏑田 武志, 伊藤 暢聡. CD72 の構造解析に向けて. **第 51 回日本生物物理学会年会**, 2013 年 10 月 28–30 日, 京都.

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* 発現の I 型インターフェロン反応性に見られる個人差は、各個人の HIV-1 感染への感受性・抵抗性を規定すると考えられる。本研究課題では 2000 年に開始したタイ北部のランパンでの HIV 感染者とその配偶者の長期フォローアップ研究に際して収集した凍結保存 PBMC 検体を用い、CD14 陽性単球と CD4 陽性 T リンパ球を分画後、それぞれの IFN α 反応性 *APOBEC3G* mRNA 発現を定量した。HIV 曝露後非感染者(HIV-exposed seronegatives, ESN) 61 名の CD14 陽性細胞と CD4 陽性細胞での *APOBEC3G* 発現には有意な相関は見られず、個人によって異なる細胞種特異的な発現制御機構の存在が推測された。また、10 名の HIV 感染者との比較では、CD14 陽性細胞の *APOBEC3G* 発現に有意な違いを見るには至らなかったものの、高発現群には HIV 感染者がいないことから *APOBEC3G* 高発現の HIV 感染抵抗性への寄与を支持するものと思われた。さらにエピジェネティックな制御の寄与を考え、*APOBEC3G* 遺伝子上流域の DNA メチル化状態をバイサルファイト修飾法により検索した。

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 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G) は、ウイルスゲノムに致死的な変異を惹起する酵素活性を示すとともに、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であると想定される。我々はタイ北部の都市ランパンで 2000 年から約 10 年にわたり、HIV 感染者とその配偶者の長期経過観察を実施した(「ランパン HIV コホート研究」)。その結果、ART 導入前の自然経過や性行為による感染成立、ART 導入による延命や副作用の出現等々の臨床像にどのような要因が働いているかを解明し、また、収集した末梢血単核細胞(PBMC)検体の一部を宿主応答の分析に適用可能な状態で保存した。本研究課題では Biasin ら(*J. Infect. Dis.* **195**:960-964, 2007) がイタリアの夫婦間曝露後非感染者群で観察した *APOBEC3G* の高い I 型インターフェロン反応性発現が、この北タイの集団でも HIV 感染抵抗性因子として観察できるかを検証することを目的とした。

B. 研究方法

1) I 型インターフェロン反応性遺伝子発現解析

抗体固相化磁気ビーズ(EasySep®)を用いて

曝露の密度・期間の情報が明らかな 61 名の Exposed but HIV-seronegative (ESN)、および AIDS 未発症の HIV 感染者 10 例より採取後長期間凍結保存した PBMC 検体から、CD14 陽性単球分画と CD4 陽性 T リンパ球分画を分離した。これらの臨床検体については、試料の量が限られることから、タンパクレベルでの分析は難しく、転写産物の分析を行なうこととした。各細胞分画を一定数 96 ウェル丸底プレートに播種して一晚培地に馴化したのちに、IFN α 存在下に 4 時間培養後の RNA を調製した。IFN α を含まない条件での RNA も並行して調製した。リアルタイム RT-PCR 法で *APOBEC3G*、*GAPDH* (内部標準として)、*MX1* (I 型インターフェロン反応性の陽性対照として) の 3 遺伝子の mRNA を定量し、内部標準に対する *APOBEC3G* 相対発現量ならびに IFN α 有無での *APOBEC3G* 相対発現量比を算出した。

2) *APOBEC3G* 遺伝子上流ゲノム領域の DNA メチル化分析

組織特異的なエピジェネティックな遺伝子発現制御の存在を示唆するシトシン塩基のメチル化状態の細胞種間差・個人差をバイサルファイト修飾法により分析した。

【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)およびタイ(タイ国保健省・国立公衆衛生研究所)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。

C. 研究結果

1) ESN 由来 CD14 陽性細胞での I 型インターフェロン反応性 APOBEC3G 遺伝子の発現

夫婦間曝露後感染の抵抗性における APOBEC3G の寄与を解明するために、曝露の密度・期間の情報が明らかな 61 名の ESN(女性 36 名、男性 25 名)を対象として I 型インターフェロン反応性遺伝子発現解析を実施した。CD14 陽性細胞と CD4 陽性細胞での APOBEC3G 発現には有意な相関は見られず(図1)、細胞種毎に別個の発現制御機構があり、特に CD14 陽性細胞での発現制御機構に大きい個人差が存在することが想定された。

また、同様に収集した AIDS 未発症の HIV 感染者 10 例(すべて女性)についても測定し、ESN 群との相違を検討したところ(図2)、HIV の夫婦間曝露での侵入門戸と考えられる CD14 陽性細胞の APOBEC3G 発現量に有意な違いを見るには至らなかったものの($p = 0.25$, t -test)、集団を便宜的に高・中・低発現の 3 群に分類した際に、高発現群には HIV 感染者がいないことから、APOBEC3G 高発現の HIV 抵抗性への寄与を支持するものと思われた($p = 0.0522$, 2×3 Kruskal-Wallis test)。

2) APOBEC3G 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構の組織特異性

APOBEC3G 遺伝子は比較的 GC 含量が高く、第 1 エクソン近傍に CpG アイランドの特徴を示す領域が存在する。この CpG アイランドを含む

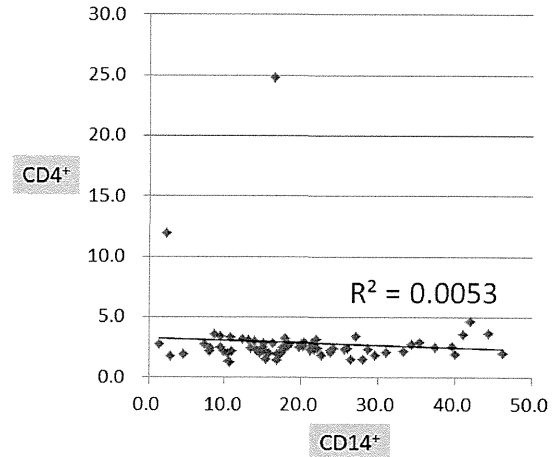


図 1. 北タイ集団における APOBEC3G 発現の I 型インターフェロン反応性の個人差

ESN61 名と HIV 感染者 10 名を併せた 71 名の CD14 陽性細胞と CD4 陽性細胞での IFN α による APOBEC3G 発現誘導 (fold increase) を散布図としてプロットした。CD14 陽性細胞での発現誘導と CD4 陽性細胞での発現誘導にはほとんど相関がなく ($R^2=0.0053$)、CD14 陽性細胞において、より大きい個人差が観察された。

APOBEC3G 遺伝子上流域は、隣接する APOBEC3F 遺伝子、APOBEC3H 遺伝子の上流域との相同性が非常に高いため、バイサルファイト修飾 DNA から APOBEC3G 遺伝子上流域を選択的に増幅させているかを確認した上でシトシンのメチル化レベルの分析を進めた。日本人ボランティア 3 名の CD14 陽性単球分画と CD4 陽性 T リンパ球分画、並びに CD14 陽性単球様の表現

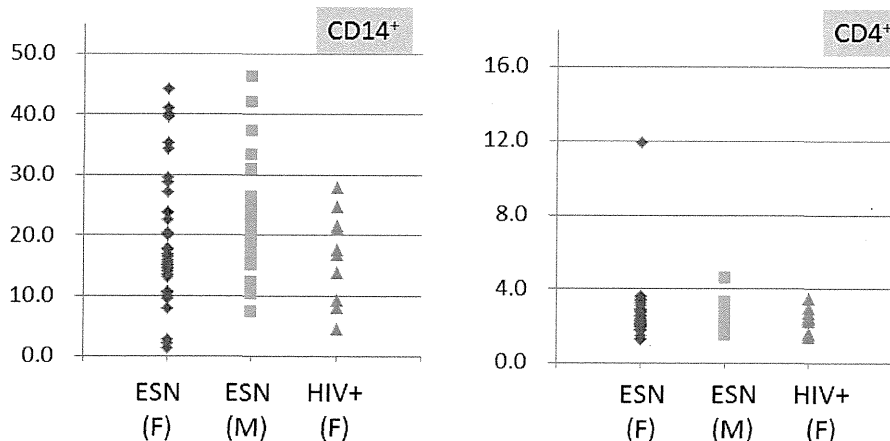


図 2. 細胞種特異的 APOBEC3G 発現の群間差

CD14 陽性細胞(左)と CD4 陽性細胞(右)での IFN α による APOBEC3G 発現誘導 (fold increase) を、女性 (F) の ESN 36 名、男性 (M) の ESN 25 名、HIV 感染者 10 名に分けてプロットした。

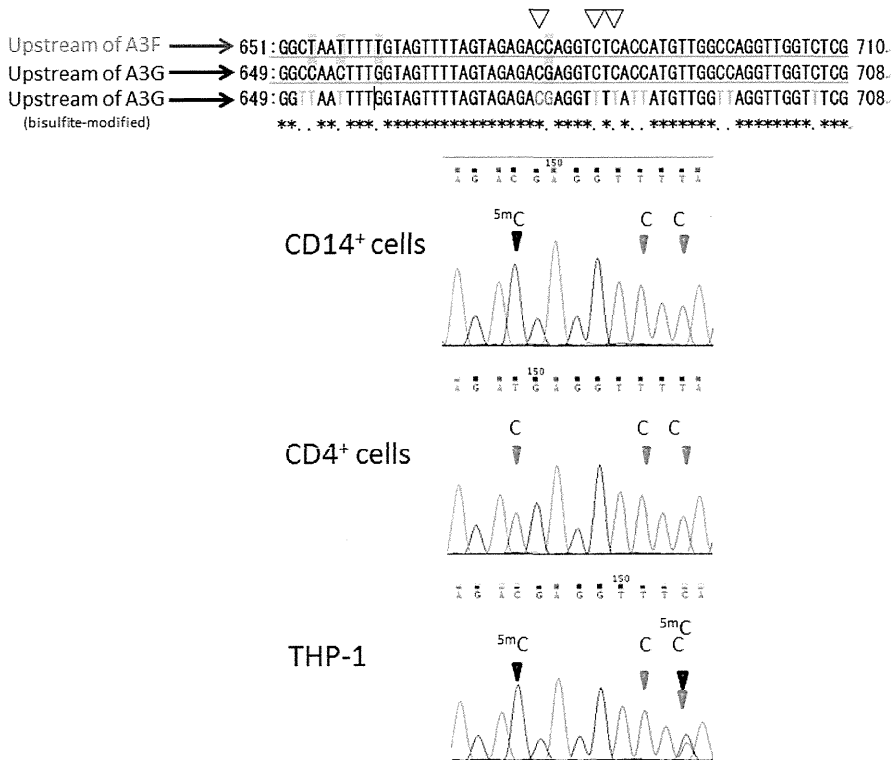


図 3. バイサルファイト修飾によるシトシンメチル化状態の探索例

バイサルファイト処理後の DNA を鋳型として PCR により目的の配列を増幅すると、メチル化シトシンはシトシンのまま残るが、メチル化を受けていないシトシンはチミンに転換される。この領域の3か所のシトシン(▽)のうち、左端のものは CpG 配列を構成するメチル化の標的配列である。この塩基は CD14 陽性細胞および THP-1 細胞でほぼ 100%メチル化されているが、CD4 陽性細胞では、ほとんどメチル化されていないことがわかった。(偶然な発見であるが、右端のシトシンは THP-1 細胞で非典型的なメチル化を受けている可能性がある。)

型を呈する白血病細胞由来の細胞株 THP-1 の DNA を用い、APOBEC3G 遺伝子の CpG アイランドが、どの細胞においてもシトシンメチル化を受けていないことに加え、CpG アイランドの上流側隣接領域に細胞種によってシトシンメチル化レベルの異なる塩基が存在することが明らかとなった(図 3)。今後、北タイ集団を対象として APOBEC3G 遺伝子のシトシンメチル化レベルと組織特異的遺伝子発現とを関連付けられるかを検討する。

D. 考察

Biasin ら(2007)がイタリアでの夫婦間曝露の ESN で観察した、CD14 陽性細胞における APOBEC3G の高い I 型インターフェロン反応性発現は、北タイの集団では同様には再現されなかったが、CD14 陽性細胞における APOBEC3G の I 型インターフェロン反応性発現は CD4 陽性細胞に比べ個人差が大きく、ESN の中には高い反応性を示すものがより多い傾向があった。今回の研究では、APOBEC3G の転写産物定量に際

して Biasin らの用いた第 2、第 3 エクソン間の RT-PCR を適用したが、第 2 エクソンを含まず、翻訳開始部位の異なる選択的スプライシング産物については十分に検討できておらず、今後の課題として残された。

細胞種特異的な発現量の個人差を説明するものとして、組織特異的なエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の存在が想定できる。近年 CpG アイランドに隣接するゲノム領域(CpG ショア)におけるエピゲノム修飾の個人差がいくつかの疾患感受性に関与するとの報告がある(Reinius, L. E. et al. *PLoS One* 7:e41361, 2012)。APOBEC3G 遺伝子の塩基配列から、第 1 エクソン近傍に CpG アイランドの特徴を示す領域を見いだすことができる。この部分は CD14 陽性細胞、CD4 陽性細胞ともにシトシンのメチル化が抑制されていたが、上流側には細胞種・個人によってメチル化の程度が異なる塩基が存在することが判った。メチル化の個人差が APOBEC3G 遺伝子の発現制御にどのように関与するか、今後明らかにしていく予定である。

E. 結論

細胞内在性抗 HIV 抵抗性因子である APOBEC3G の発現が I 型インターフェロンに反応して増強するか否かに、特に CD14 陽性細胞において、大きな個人差の存在することを実験的に明らかにした。遺伝子発現制御機構の差異を説明する現象としてエピジェネティックなゲノム修飾に組織特異性・個人間差がある可能性があることを示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Pathipvanich, P., N. Tsuchiya, A. Rojanawiwat, W. P. Schmidt, W. Auwanit, P. Sawanpanyalert, and K. Ariyoshi. Changing burden of HIV/AIDS to clinical settings in Northern Thailand over 15 years. *Jpn. J. Infect Dis.* **66**:375-358, 2013.

2) Mori, M., N. Wichukchinda, R. Miyahara, A. Rojanawiwat, P. Pathipvanich, T. Maekawa, T. Miura, P. Goulder, M. Yasunami, K. Ariyoshi, and P. Sawanpanyalert. *HLA-B*35:05* is a protective allele with a unique structure among HIV-1 CRF01_AE-infected Thais, in whom the *B*57* frequency is low. *AIDS* **28**:959-967, 2014.

2. 学会発表

1) Yasunami, M., N. Wichukchinda, A. Takaki, A. Rojanawiwat, P. Pathipvanich, P. Sawanpanyalert, and K. Ariyoshi. Cell type-specific, type I interferon-induced expression of APOBEC3G in HIV-exposed seronegatives. **The 11th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP)**. 18-22 November, 2013. Bangkok, Thailand.

2) Tsuchiya, N., P. Pathipvanich, N. Wichukchinda, A. Rojanawiwat, W. Auwanit, K. Ariyoshi, and P. Sawanpanyalert. B*3505 but not B*4001 was a strong predictor of severe side effects causing modifying generic first-line fixed-dose combination antiretroviral drug regimen with stavudine, lamivudine and nevirapine among HIV-infected patients in Thailand. **The 11th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP)**. 18-22 November 2013. Bangkok, Thailand.

3) Ruchusatsawat, K., P. Pathipvanich, N. Tsuchiya, A. Rojanawiwat, J. Boon-Long, P. Sawanpanyaler, Y. Tanaka, and K. Ariyoshi. Impact of lamivudine (3TC)-containing antiretroviral therapy on HBV infection among HIV-infected patients in Thailand. **The 11th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP)**. 18-22 November 2013. Bangkok, Thailand.

4) Mori, M., N. Wichukchinda, E. Miyahara, A. Rojanawiwat, P. Pathipvanich, T. Maekawa, P. Goulder, M. Yasunami, K. Ariyoshi, and P. Sawanpanyalert. *HLA-B*35:05* is a protective allele with a unique structure amongst CRF01_AE-infected Thais. **Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection (CROI)**, 3-6 March 2014. Boston, Massachusetts, USA.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当無し

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要因の同定を目的とし、APOBEC3 遺伝子群に着目した検討を進めた。本年度は、日本人およびインド人の HIV 感染患者と健常対照者について、APOBEC3H 内の2か所の機能多型 (N15del および G105R) で構成されるハプロタイプ (ディプロタイプ) 頻度を比較した。その結果、日本人 HIV 感染者集団ではディプロタイプ I (15N-105G) 頻度の減少、ディプロタイプ III (15del-105R) 頻度の増加が有意であった。さらに、インド人 HIV 感染者集団の解析ではディプロタイプ II (15N-105R) 頻度の減少、ディプロタイプ III 頻度の増加が有意であった。一方、日本人 HIV 感染後長期未発症者ではディプロタイプ II 頻度の増加、ディプロタイプ III 頻度の減少が有意であった。これらのことから、APOBEC3H 多型の HIV/AIDS 感受性・抵抗性への寄与度は人種・民族で異なっている可能性があるが、15del-105R ディプロタイプが HIV 感染感受性と関連することが明らかになった。これとは別に、HLA 領域内にマップされ、自己免疫疾患や慢性炎症性疾患への感受性・抵抗性を制御することが知られていた IkBL の機能解析を行った結果、これが選択的スプライシング制御因子であり、CLK1 に拮抗して、免疫関連遺伝子やウイルス遺伝子のスプライシング効率を制御することを解明した。

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 SIVcpz 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。このような進化学的な視点から HIV/AIDS 感受性・抵抗性の宿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、これまでの進化学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) 日本人およびインド人集団における APOBEC3H 多型と HIV/AIDS との関連解析

日本人 HIV 感染者 191 名、HIV 感染後長期未発症者 93 名、日本人健常対照者 231 名、インド人 HIV 感染者 236 名、インド人健常対照者 337 名について、APOBEC3H 遺伝子の2箇所の機能多型 (N15del および G105R) をタイピングし、連鎖不平衡情報をもとに個々の N15del-G105R ディプロタイプを推定した。ついで、APOBEC3H ディプロタイプと HIV 感染感受性、感染後 AIDS 発症感受性との関連を検討した。

2) IkBL 分子 (NFKBIL1 遺伝子) の機能解析

HLA 内のクラス I 領域とクラス III 領域の境界部にマップされる遺伝子 (NFKBIL1 遺伝子) にコードされ、関節リウマチ等の自己免疫疾患や高安動脈炎等の慢性炎症性疾患との関連が知られている IkBL 分子の機能解析を行った。酵母2ハイブリ

ッド法で IkBL が CLK1 と結合することを明らかにしたが、CLK1 はスプライシングに関与することが知られていたため、IkBL および CLK1 の細胞内局在、結合に必要なドメイン構造、免疫関連遺伝子群 (CD45、CTLA4、CD72) のスプライシング制御、hnRNA や RNP 等のスプライシング因子との相互作用、CLK1 のキナーゼ活性の関与、さらにはインフルエンザウイルス M 遺伝子のスプライシング制御への関わりを検討した。

【倫理面への配慮】

本研究に関わるヒトゲノム解析研究は、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) 日本人およびインド人集団における APOBEC3H 多型と HIV/AIDS との関連解析

昨年度までに APOBEC3 遺伝子座の連鎖不平衡構造と、メチル化パターンと発現性との関連を明らかにしたが、本年度は当該領域内にマップされる APOBEC3H 遺伝子の多型と HIV/AIDS 感受性・抵抗性との関連を検討することとし、APOBEC3H 遺伝子内の 2 個の機能多型 (N15del および G105R) をタイピングし、それらで構成される 15-105 ディプロタイプを推定し、患者集団と健常対照集団で頻度を比較した(表1)。

表1 APOBEC3H の多型とハプロタイプ構造

| APOBEC3H haplotype | polymorphism | | | | | 15-105 diplotype |
|--------------------|--------------|------|-------|-------|-------|------------------|
| | N15del | L18R | G105R | K121E | E178D | |
| h1 | N | L | G | K | E | I |
| h2 | N | L | R | E | D | II |
| h3 | del | L | R | E | D | III |
| h4 | del | R | R | E | D | |

まず日本人 HIV 感染患者集団と健常対照集団との比較では、患者集団でディプロタイプ I 頻度の有意な減少とディプロタイプ III 頻度の有意な増加が観察された(表2)。

表2 日本人 HIV 感染と APOBEC3H との関連

| diplotype | %健常対照 2n=462 | %HIV患者 2n=382 | OR | p |
|-----------|-----------------|------------------|------|-------|
| I | 0.716 | 0.626 | 0.66 | 0.006 |
| II | 0.028 | 0.047 | 1.71 | ns |
| III | 0.255 | 0.327 | 1.42 | 0.022 |

一方、インド人集団においても同様の関連が観察されるかどうかを検討したところ、ディプロタイプ II 頻度の有意な減少とディプロタイプ III 頻度の有

意な増加が観察された(表3)。

表3 インド人 HIV 感染と APOBEC3H との関連

| diplotype | %健常対照 2n=674 | %HIV患者 2n=472 | OR | p |
|-----------|-----------------|------------------|------|--------|
| I | 0.518 | 0.485 | 0.88 | ns |
| II | 0.068 | 0.021 | 0.30 | 0.0002 |
| III | 0.414 | 0.494 | 1.38 | 0.0079 |

日本人集団での解析結果とインド人集団での解析結果を合わせると、ディプロタイプ III は HIV 感染感受性と関連すると考えられたが、ディプロタイプ III を構成する 15del 多型は APOBEC3H 活性を著しく低下させることが報告されているため、この結果は HIV 感染制御において、APOBEC3H が宿主因子として生体内で関わることを示唆するものであった。また、日本人感染者で頻度が有意に低下しているディプロタイプ I は、インド人感染者でも頻度が低い傾向にあることから、感染抵抗性と関連している可能性がある。ディプロタイプ II については、集団中の頻度が低いため、結論を得るにはさらなる検討が必要である。

一方、HIV に感染しても長期に渡って未治療で AIDS 発症に至らない患者集団 (long-term non-progressor; LTNP) が存在することがよく知られており、この集団は HIV に感染するものの AIDS 発症抵抗性であると考えられている。そこで、日本人 LTNP 集団についても同様の解析を行ったところ、ディプロタイプ II 頻度の有意な増加とディプロタイプ III 頻度の有意な減少が観察された(表4)。

表4 日本人 LTNP と APOBEC3H との関連

| diplotype | %健常対照 2n=462 | %LTNP 2n=186 | OR | p |
|-----------|-----------------|-----------------|------|------|
| I | 0.716 | 0.742 | 1.14 | ns |
| II | 0.028 | 0.081 | 3.03 | 0.01 |
| III | 0.255 | 0.177 | 0.63 | 0.04 |

この結果は、HIV 感染感受性であるディプロタイプ III を有している者は LTNP になり難い、すなわち AIDS を発症しやすいことを推定させる。一方で、ディプロタイプ II については、集団中の頻度が低いことから、さらなる検討を要する。

2) IkBL 分子 (NFKB1 遺伝子) の機能解析

HLA 領域内に遺伝子がマップされ、自己免疫疾患や慢性炎症性疾患に関わることから、免疫・炎症制御に関与すると考えられる IkBL 分子は、アンキリンリピートを有することから I kappa B-like (IkBL) と命名されていたが、その機能は不明であった。我々は HLA による免疫応答制御との関わりで、IkBL 分子の機能解析を行った。

まず、ヒト-マウス間の比較から IkBL のドメイン

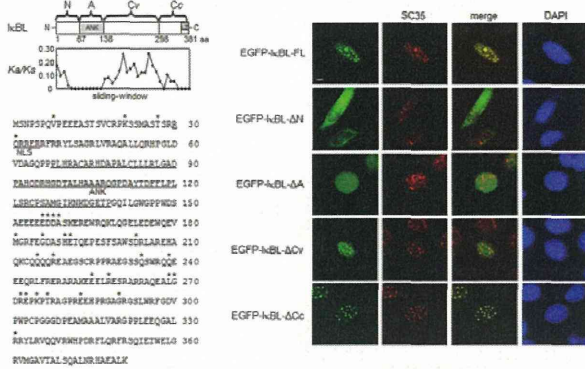


図1 IκBBL 分子のドメイン構造と細胞内局在

構造を検討したところ、N 末ドメイン、アンキリンリピートドメイン、C 末可変ドメイン、C 末保存ドメインの4ドメイン構造をとると考えられたため、それぞれの欠失変異体を作製して HeLa 細胞に導入したところ、IκBBL は核スペックルに局在すること、この局在にはC末保存ドメイン以外の全てのドメインが必要であることが判明した(図1)。

ついで、CD45 ミニジーンを構築し、そのスプライシングパターンに及ぼす IκBBL 分子の効果を検討したところ、IκBBL はスプライシング抑制に働くこと、この機能の発揮には図1で示した核内スペックル局在に必須のドメインを必要とすることが判明した(図2)。また、CD45 のスプライシングには hnRNPL あるいは hnRNPL が補因子として必要であった。

昨年までの酵母2ハイブリッド法による検討で、IκBBL は CLK1 と結合することを見出していたため、IκBBL と CLK1 との結合、およびこれに関わるドメインを検討したところ、IκBBL と CLK1 は核スペックルに共局在し、IκBBL と CLK1 との結合には RNA を必要としないこと、また、図1および図2で示した核内スペックル局在およびスプライシング抑制に必須のドメインが CLK1 との結合に必要とであることが判明した。さらに、siRNA を用いた実験から、

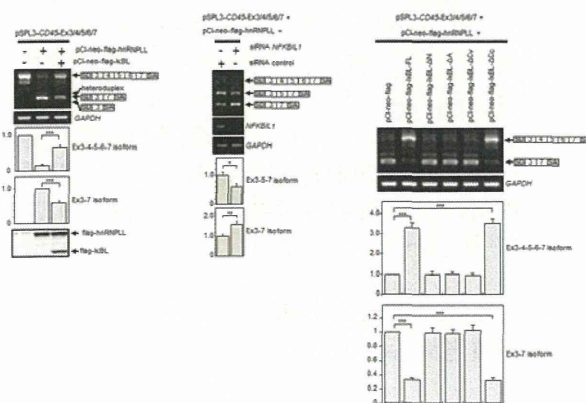


図2 IκBBL による CD45 スプライシング制御

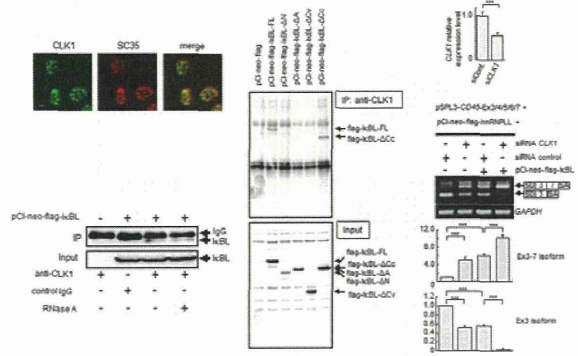


図3 IκBBL は CLK1 に結合し、スプライシングを阻害する

IκBBL は CLK1 によるスプライシング促進に拮抗的に働くものであることが分かった(図3)。

CLK1 はキナーゼ活性を有し、スプライシング制御の際に補因子である ASF/SF2 をリン酸化することが知られていたため、IκBBL によるスプライシング制御と CLK1 による ASF/SF2 リン酸化との関連を検討したところ、IκBBL は ASF/SF2 リン酸化に影響しないこと、CLK1 による CD45 スプライシング制御には CLK1 キナーゼ活性を必要としないこと、キナーゼドメインを欠失した CLK1 は IκBBL と結合することが明らかになった(図4)。

本研究において IκBBL が CD45 のスプライシング抑制に関わることを明らかになったため、免疫関連遺伝子で選択的スプライシングが知られている CTLA4 や CD72 についてもミニジーンを作製して同様の解析を行ったところ、IκBBL は FOX1 依存性の CTLA4 スプライシングおよび CLK1 依存性の CD72 スプライシングをいずれも抑制することが判明したため、IκBBL は免疫関連遺伝子のスプライシング抑制因子であると考えられた。

一方、最近 CLK1 がインフルエンザウイルスの

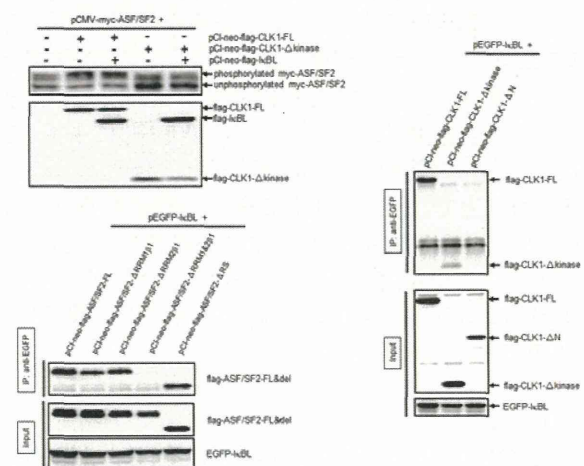


図4 IκBBL によるスプライシング制御と CLK1

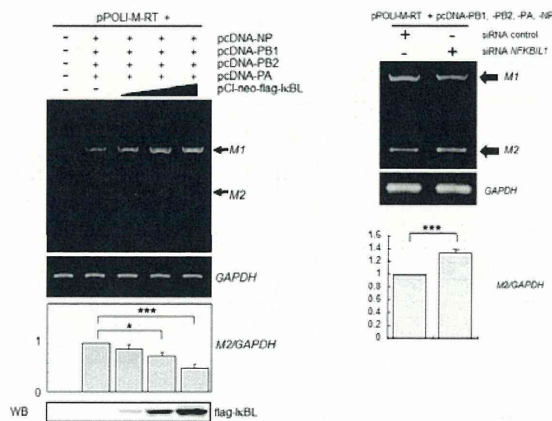


図5 IkBL による M2 遺伝子スプライシング制御

M 遺伝子のスプライシングを促進し、ウイルス増殖を促進することが報告されたため、IkBL によるインフルエンザウイルス M 遺伝子のスプライシング制御について、*in vitro* 再構築系を用いて検討した。その結果、IKBLはM遺伝子のスプライシングを抑制することが判明した(図5)。

D. 考察

本研究で、APOBEC3H 遺伝子多型が HIV 感染感受性ならびに AIDS 発症感受性を制御することが明らかになった。従来の細胞レベルでの研究によって APOBEC3H が HIV ウイルス複製制御因子であることが報告されていたが、本研究は、生体における HIV 制御に APOBEC3H が大きく関与することを示すものである。昨年までの研究によって APOBEC3H の発現にはメチル化と性差が関わることを明らかにしているため、今 APOBEC3H 多型と発現性差との関連を検討することが必要であると考えられた。

一方、本研究でこれまで機能が不明であった HLA 領域内の遺伝子でコードされる IkBL 分子が、免疫関連遺伝子のスプライシングを制御すると同時に、インフルエンザウイルス M 遺伝子のスプライシングをも制御することを明らかにした。このことは、HLA 領域による免疫・感染制御において IkBL がスプライシング制御を介して寄与することを示すことで、HLA 機能に新たな視点を与えるものである。HIV/AIDS 感受性制御に HLA が大きく関わることは以前よりよく知られていたが、今後 IkBL による HIV/AIDS 制御の観点からの研究が必要であると考えられる。

E. 結論

APOBEC3H 多型は生体における HIV/AIDS 制御に寄与する。一方、HLA 領域内の IkBL が免疫関連遺伝子やウイルス遺伝子のスプライシング制

御を介して免疫・感染制御に関与する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* **29**: 919-924, 2013.
- 2) An, J., T. Nakajima, H. Shibata, T. Arimura, M. Yasunami, and A. Kimura. A novel link of HLA locus to the regulation of immunity and infection: NFKBIL1 regulates alternative splicing of human immune-related genes and influenza virus M gene. *J. Autoimmun.* **47**: 25-33, 2013.
- 3) An, J., and A. Kimura. IkBL mapped within the HLA region is a novel regulator of alternative splicing involved in the pathogenesis of immune-related diseases. *MHC* **20**:191-197, 2013.
- 4) Naruse, T. K., H. Akari T. Matano, and A. Kimura. Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics* **66**: 161-170, 2014.

2. 学会発表

- 1) 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 遺伝子の種特異的多様性. 第 22 回日本組織適合性学会. 2013 年 9 月 15 日. 福島.
- 2) 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 遺伝子の種特異的多様性. 日本人類遺伝学会第 58 回大会. 2013 年 11 月 21 日. 仙台.
- 3) 中村 碧、高原 悠佑、松岡 佐織、三浦 智行、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による SIV 増殖抑制能の増強効果の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10~12 日. 神戸.

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 |
|---|--|---------------------|------------|-------------|------|
| Takamura, S., E. Kajiwara, S. Tsuji-Kawahara, T. Masumoto, M. Fujisawa, M. Kato, T. Chikaishi, Y. Kawasaki, S. Kinoshita, M. Itoi, N. Sakaguchi, and <u>M. Miyazawa</u> | Infection of adult thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents functional memory CD8 ⁺ T cell differentiation. | <i>PLoS Pathog.</i> | 10 | e1003937 | 2014 |
| Tsuji-Kawahara, S. and <u>M. Miyazawa</u> | Elimination of Friend retrovirus in the absence of CD8 ⁺ T cells. | <i>J. Virol.</i> | 88 | 1854-1855 | 2014 |
| Tsuji-Kawahara, S., H. Kawabata, H. Matsukuma, S. Kinoshita, T. Chikaishi, M. Sakamoto, Y. Kawasaki, and <u>M. Miyazawa</u> | Differential requirements of cellular and humoral immune responses for Fv2-associated resistance to erythroleukemia and for the regulation of retrovirus-induced myeloid leukemia development. | <i>J. Virol.</i> | 87 | 13760-13774 | 2013 |
| Tsumiyama K, A. Hashiramoto, M. Takimoto, S. Tsuji-Kawahara, <u>M. Miyazawa</u> , and S. Shiozawa | IFN- γ -producing effector CD8 T lymphocytes cause immune glomerular injury by recognizing antigen presented as immune complex on target tissue. | <i>J. Immunol.</i> | 191 | 91-96 | 2013 |
| Matsui, Y., K. Shindo, K. Nagata, K. Io, K. Tada, F. Iwai, M. Kobayashi, N. Kadowaki, R. Harris, and <u>A. Takaori-Kondo</u> | Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBF β by site-directed mutagenesis. | <i>Virology</i> | 449 | 82-87 | 2014 |
| Yoshioka, S., Y. Miura, H. Yao, S. Satake, Y. Hayashi, A. Tamura, T. Hishita, T. Ichinohe, H. Hirai, <u>A. Takaori-Kondo</u> , and T. Maekawa | C/EBP β expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells regulates early B-cell lymphopoiesis. | <i>Stem cells</i> | 32 | 730-740 | 2014 |

| | | | | | |
|---|---|--|-----|-----------|------|
| Arai, Y., Y. Nishinaka, T. Arai, M. Morita, K. Mizugishi, S. Adachi, <u>A. Takaori-Kondo</u> , T. Watanabe, and K. Yamashita | Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. | <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> | 443 | 556-561 | 2014 |
| Sakamoto, T., M. Kobayashi, K. Tada, M. Shinohara, K. Io, K. Nagata, F. Iwai, Y. Takiuchi, Y. Arai, K. Yamashita, K. Shindo, N. Kadowaki, Y. Koyanagi, and <u>A. Takaori-Kondo</u> | CKIP-1 is an intrinsic negative regulator of T-cell activation through an interaction with CARMA1. | <i>PLoS One</i> | 9 | e85762 | 2014 |
| Furukawa, A., K. Sugase, R. Morishita, T. Nagata, T. Kodaki, <u>A. Takaori-Kondo</u> , A. Ryo, and M. Katahira | Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy. | <i>Angew Chem. Int. Ed. Engl.</i> | 53 | 2349-2352 | 2014 |
| Mori, F., T. Ishida, A. Ito, F. Sato, A. Masaki, T. Narita, S. Suzuki, T. Yamada, H. Takino, M. Ri, S. Kusumoto, H. Komatsu, M. Hishizawa, K. Imada, <u>A. Takaori-Kondo</u> , A. Niimi, R. Ueda, H. Inagaki, and S. Iida | Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. | <i>Eur. J. Haematol.</i> | 92 | 219-228 | 2014 |
| Sato, T., T. Kitawaki, H. Fujita, M. Iwata, T. Iyoda, K. Inaba, T. Ohteki, S. Hasegawa, K. Kawada, Y. Sakai, H. Ikeuchi, H. Nakase, A. Niwa, <u>A. Takaori-Kondo</u> , and N. Kadowaki | Human CD1c ⁺ myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D ₃ . | <i>J. Immunol.</i> | 191 | 3152-3160 | 2013 |
| Nakabayashi, M., Tsukahara, Y., Iwasaki-Miyamoto, Y., Mihori-Shimazaki, M., Yamada, S., Inaba, S., Oda, M., Shimizu, M., Makishima, M., Tokiwa, H., Ikura, T., and <u>Ito, N.</u> | Crystal structures of hereditary vitamin D-resistant rickets-associated vitamin D receptor mutants R270L and W282R bound to 1,25-dihydroxyvitamin D ₃ and synthetic ligands. | <i>J. Med. Chem.</i> | 56 | 6745-6760 | 2013 |
| Masuno, H., Ikura, T., Morizonno, D., Orita, I., Yamada, S., Shimizu, M. and <u>Ito, N.</u> | Crystal structures of complexes of vitamin D receptor ligand-binding domain with lithocholic acid derivatives. | <i>J. Lipid Res.</i> | 54 | 2206-2213 | 2013 |
| Ikura, T., and <u>Ito, N.</u> | Peptidyl-prolyl isomerase activity of FK506 binding protein 12 prevents tau peptide from aggregating. | <i>Protein Engineering, Design and Selection</i> | 26 | 539-546 | 2013 |

| | | | | | |
|--|--|------------------------------------|-----------|---------|------|
| Higo, K., Ikura, T., Oda, M., Morii, H., Takahashi, J., Abe, R. and <u>Ito, N.</u> | High resolution crystal structure of the Grb2 SH2 domain with a phosphopeptide derived from CD28. | <i>PLoS One</i> | 8 | e74482 | 2013 |
| Naruse, T. K., H. Akari, T. Matano, and <u>A. Kimura</u> | Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. | <i>Immuno-genetics</i> | 66 | 161-170 | 2014 |
| 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 TRIM5a linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection | <i>AIDS Res. Hum. Retroviruses</i> | 29 | 919-924 | 2013 |
| An, J., T. Nakajima, H. Shibata, T. Arimura, M. Yasunami, and <u>A. Kimura</u> | A novel link of HLA locus to the regulation of immunity and infection: NFKBIL1 regulates alternative splicing of human immune-related genes and influenza virus M gene | <i>J. Autoimmun.</i> | 47 | 25-33 | 2013 |
| An, J., and <u>A. Kimura</u> | IκBL mapped within the HLA region is a novel regulator of alternative splicing involved in the pathogenesis of immune-related diseases. | <i>MHC</i> | 20 | 191-197 | 2013 |
| Mori, M., N. Wichukchinda, R. Miyahara, A. Rojanawiwat, P. Pathipvanich, T. Maekawa, T. Miura, P. Goulder, M. Yasunami, <u>K. Ariyoshi</u> , and P. Sawanpanyalert | HLA-B*35: 05 is a protective allele with a unique structure among HIV-1 CRF01_AE-infected Thais, in whom the B*57 frequency is low. | <i>AIDS</i> | 28 | 959-967 | 2014 |
| Pathipvanich, P., N. Tsuchiya, A. Rojanawiwat, W. P. Schmidt, W. Auwanit, P. Sawanpanyalert, and <u>K. Ariyoshi</u> | Changing burden of HIV/AIDS to clinical settings in Northern Thailand over 15 years. | <i>Jpn. J. Infect. Dis</i> | 66 | 375-378 | 2013 |

201319004A (2/2)

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 25 年度 総括・分担研究報告書

2/2冊

(研究成果刊行物の別刷)

研究代表者 宮澤 正顯

(近畿大学医学部)

平成 26 年 3 月

Infection of Adult Thymus with Murine Retrovirus Induces Virus-Specific Central Tolerance That Prevents Functional Memory CD8⁺ T Cell Differentiation

Shiki Takamura^{1*}, Eiji Kajiwara¹, Sachiyo Tsuji-Kawahara¹, Tomoko Masumoto¹, Makoto Fujisawa¹, Maiko Kato¹, Tomomi Chikaishi¹, Yuri Kawasaki¹, Saori Kinoshita¹, Manami Itoi², Nobuo Sakaguchi³, Masaaki Miyazawa^{1*}

1 Department of Immunology, Kinki University Faculty of Medicine, Osaka, Japan, **2** Department of Immunology and Microbiology, Meiji University of Integrative Medicine, Kyoto, Japan, **3** Department of Immunology, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan

Abstract

In chronic viral infections, persistent antigen presentation causes progressive exhaustion of virus-specific CD8⁺ T cells. It has become clear, however, that virus-specific naïve CD8⁺ T cells newly generated from the thymus can be primed with persisting antigens. In the setting of low antigen density and resolved inflammation, newly primed CD8⁺ T cells are preferentially recruited into the functional memory pool. Thus, continual recruitment of naïve CD8⁺ T cells from the thymus is important for preserving the population of functional memory CD8⁺ T cells in chronically infected animals. Friend virus (FV) is the pathogenic murine retrovirus that establishes chronic infection in adult mice, which is bolstered by the profound exhaustion of virus-specific CD8⁺ T cells induced during the early phase of infection. Here we show an additional evasion strategy in which FV disseminates efficiently into the thymus, ultimately leading to clonal deletion of thymocytes that are reactive to FV antigens. Owing to the resultant lack of virus-specific recent thymic emigrants, along with the above exhaustion of antigen-experienced peripheral CD8⁺ T cells, mice chronically infected with FV fail to establish a functional virus-specific CD8⁺ T cell pool, and are highly susceptible to challenge with tumor cells expressing FV-encoded antigen. However, FV-specific naïve CD8⁺ T cells generated in uninfected mice can be primed and differentiate into functional memory CD8⁺ T cells upon their transfer into chronically infected animals. These findings indicate that virus-induced central tolerance that develops during the chronic phase of infection accelerates the accumulation of dysfunctional memory CD8⁺ T cells.

Citation: Takamura S, Kajiwara E, Tsuji-Kawahara S, Masumoto T, Fujisawa M, et al. (2014) Infection of Adult Thymus with Murine Retrovirus Induces Virus-Specific Central Tolerance That Prevents Functional Memory CD8⁺ T Cell Differentiation. *PLoS Pathog* 10(3): e1003937. doi:10.1371/journal.ppat.1003937

Editor: Michael S. Diamond, Washington University School of Medicine, United States of America

Received: July 18, 2013; **Accepted:** January 7, 2014; **Published:** March 20, 2014

Copyright: © 2014 Takamura et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants-in-aid for scientific research from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, including the High-Tech Research Center and Anti-Aging Center projects, those from the Japan Society for Promotion of Science, KAKENHI (B), those from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan for Research on HIV/AIDS (MM), a Grant-in-Aid for Young Scientists (B), and grants from The Ichiro Kanehara Foundation, Astellas Foundation for Research on Metabolic Disorders (ST). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: takamura@med.kindai.ac.jp (ST); masaaki@med.kindai.ac.jp (MM)

Introduction

Antigen-specific CD8⁺ T cell populations are a major component that eliminate cells infected with intracellular pathogens. After infections that are cleared acutely, antigen-specific CD8⁺ T cells can differentiate into functionally competent memory CD8⁺ T cells, and can persist for a long time in the apparent absence of relevant antigens [1]. In contrast, in the case of chronic infections where the antigens are presented persistently, CD8⁺ T cells primed during the early phase of infection succumb to progressive functional defects, such as impaired ability to proliferate, kill infected cells, and/or produce effector cytokines in response to the antigen-specific stimulation [2]. In most cases, this loss of effector functions is due to signaling through inhibitory molecules such as programmed cell death 1 (PD-1), lymphocyte activation gene 3 (LAG-3), CD244, CD160, and T cell Ig domain and mucin domain 3 (Tim-3), and is called exhaustion [2]. The severity of this

dysfunction, which is in correlation with the numbers and extent of inhibitory molecules expressed on exhausted CD8⁺ T cells, is critically linked with the levels of repetitive exposure to the relevant antigen [3]. In addition to their negative effects on the functionality of antigen-experienced CD8⁺ T cells, persisting antigens also induce stable proliferation of already-exhausted memory CD8⁺ T cells [4]. The resultantly sustained numbers of functionally impaired memory CD8⁺ T cells potentially inhibit optimal priming of otherwise functional fresh memory CD8⁺ T cells via physiological competition for the niche. Thus, chronic infection is a vicious circle of ongoing CD8⁺ T cell dysfunction and ineffective antigen clearance. Despite such detrimental effects, however, recent studies shed light on a beneficial role of persistent antigens on the functionalities of memory CD8⁺ T cells. Naïve CD8⁺ T cells are continuously provided from the thymus even during the chronic phase of infection, and this continual thymic output can result in the priming of new antigen-specific CD8⁺ T

Author Summary

During thymocyte development, cells that recognize self-antigens are specifically deleted by the process known as negative selection. However, some pathogens disseminate to the thymus, and can induce foreign antigen presentation within this organ, resulting in potentially harmful clonal deletion of pathogen-specific T-lymphocyte precursors. In chronic infections, pathogen-specific T cells in the periphery progressively lose their functionality due to continual stimulation with the persisting antigen, a phenomenon known as T cell exhaustion. However, pathogen-reactive naïve T cells freshly primed during the chronic phase of infection can nevertheless replenish the functional pool of memory T cells. Therefore, a lack of their generation in the face of peripheral exhaustion may ultimately cause the loss of functional memory T cells and the resultant lack of pathogen control. In this study, we demonstrate that Friend murine retrovirus can utilize the above immune evasion strategy, a combination of ongoing peripheral exhaustion and virus-induced central tolerance. Our data suggest that, along with the reinvigoration of exhausted T cells in the periphery, preservation of the thymic function in supplying pathogen-specific naïve T cells may be important when considering immunological control of chronic infection with thymotropic pathogens.

cells [5]. Unlike exhausted CD8⁺ T cells that were primed in the early phase of infection, CD8⁺ T cells primed during the chronic phase of infection in low-antigen and less intensive inflammatory settings give rise to functional memory CD8⁺ T cells capable of mounting authentic recall responses [6]. Similar memory-dominated differentiation of CD8⁺ T cells can also be found when CD8⁺ T cells are primed after the peak of an acute infection, by the time that the majority of antigens have been cleared out [7]. Thus, persistent antigens play an important role in generating functional memory CD8⁺ T cells in the presence of continual thymic output.

Friend virus (FV) is a murine retrovirus complex comprising two gammaretroviruses: replication-competent Friend murine leukemia virus (F-MuLV) and replication-defective spleen focus-forming virus (SFFV) [8]. Although FV particles can bind onto the surfaces of a wide variety of cells via cationic amino acid transporter as an entry receptor [9,10], viral replication occurs preferentially in actively dividing hematopoietic cells, especially in erythroid progenitor cells in the bone marrow (BM) and spleen [8]. In the susceptible strains of mice [e.g. (C57BL/6×A/WySn)F₁ (B6AF₁) mice], SFFV gp55 envelope glycoprotein stimulates erythropoietin receptor in conjunction with its binding to the short form of hematopoietic cell-specific receptor tyrosine kinase Stk/Ron, resulting in massive expansion of virus-infected erythroblasts [11,12]. As a result, FV-infected mice develop severe splenomegaly associated with polycythemia and high-level viremia [8]. This acute pathogenesis ultimately causes leukemia development in some cases, but most B6AF₁ mice recover from the above initial splenomegaly and survive. Following recovery, however, FV establishes a lifelong chronic infection and mice are never able to completely eradicate this virus [13]. Although antigen levels are low during the chronic phase of infection, it is sufficient to prime antigen-specific CD8⁺ T cells, as adoptively transferred FV-specific CD8⁺ T cells can be activated and acquire effector functions in chronically infected animals [14]. However, the precise effect of persistent antigens on the functionalities of FV-specific memory CD8⁺ T cells remains unclear.

It has been proposed that FV-specific CD8⁺ T cells progressively lose their effector functions during the chronic phase of infection due to suppression by virus-induced regulatory T cells (Tregs) [14–20]. In B6AF₁ mice, however, we found that severe dysfunction of FV-specific CD8⁺ T cells appeared even during the acute phase of infection in the absence of an apparent increase in Treg functions, and this was critically related with the FV-induced acute pathogenesis [21]. At the peak of infection, numbers of virus-infected erythroblasts in the spleen reached more than 10⁸, comprising approximately 75% of total splenocytes. These virus-infected erythroblasts intensively expressed programmed death ligand 1 (PD-L1) and MHC class I, thereby creating a highly tolerogenic environment. Consequently, FV-specific effector CD8⁺ T cells suffered rapid exhaustion, and most of these cells were incapable of responding to restimulation with FV-encoded antigens [21]. Since effector CD8⁺ T cells generated in the absence of the splenomegaly in mice inoculated with F-MuLV alone showed less exhausted phenotypes as compared to those generated in the presence of splenomegaly, SFFV-induced pathogenesis was shown to be mainly responsible for the severe and rapid exhaustion of antigen-specific effector CD8⁺ T cells [21]. In the current study, we further extended our previous study, and found that functional memory CD8⁺ T cells were rarely detected in FV-infected mice even during the chronic phase of infection. This severe dysfunction was apparently exclusive to FV-specific CD8⁺ T cells but not found in FV-unrelated CD8⁺ T cells. As a basis for this antigen-specific memory T cell dysfunction, FV is shown to disseminate to the thymus and induce virus-specific central tolerance, thereby preventing the generation of virus-specific naïve CD8⁺ T cells. Thus, the severe dysfunction of FV-specific memory CD8⁺ T cells is likely due to a combination of ongoing peripheral exhaustion and the deletion of virus-reactive thymocytes.

Results

FV disseminates to and persists in the thymus following infection

Infection of B6AF₁ mice with FV results in the expansion of virus-infected erythroblasts that causes severe exhaustion of antigen-specific CD8⁺ T cells even during the acute phase of infection [21]. During the chronic phase of FV infection where the progressive expansion of virus-infected erythroblasts has resolved, FV-specific naïve CD8⁺ T cells must be continuously provided from the thymus. If this is the case, newly recruited FV-specific naïve CD8⁺ T cells should be primed with persistent FV antigens in the absence of expanded virus-infected erythroblasts. These newly primed CD8⁺ T cells may then participate in the FV-specific CD8⁺ T cell responses with better functionalities than the above exhausted cells [5]. However, most of the virus-specific memory CD8⁺ T cells in the BM and spleen still retained highly exhausted phenotypes even more than 6 weeks after infection, as determined by the expression of multiple inhibitory receptors, PD-1, LAG-3, and Tim-3 on their surfaces (Figure S1A, B). Levels of expression of these inhibitory receptors were much higher on virus-specific CD8⁺ T cells in the BM than on those in the spleen, indicating that during the chronic phase of infection, memory CD8⁺ T cells received more abundant antigenic stimulation in the former tissue (Figure S1B). As most virus-specific CD8⁺ T cells succumb to irreversible exhaustion even during the early phase of infection [21], the above phenotypically exhausted memory CD8⁺ T cells in chronically infected mice were no longer reinvigorated by the administration of PD-1-blocking antibody (data not shown). In support of this, almost no FV antigen-reactive IFN-γ

production from CD8⁺ T cells was detected when FV-infected mice were later challenged with FBL3 tumor cells, a potent inducer of FV-specific CD8⁺ T cell responses, and the cells were restimulated with the MHC class I-restricted viral antigenic peptide (Figure S1C, D). These virus-infected mice also failed to control FBL3 tumor progression, similar to those that received syngenic tumor cells, EL-4, while uninfected mice rapidly rejected the tumor (Figure S1E, F). Based on these observations, we started to ask if FV infection influences the continuous recruitment of virus-specific naïve CD8⁺ T cells from the thymus.

It has been reported that the BM and spleen are the major organs where massive replication of FV takes place [8]. Large numbers of virus-producing cells were already found in the BM at as early as 1 week post infection, and their numbers in the spleen reached a peak by 2 weeks post infection (Figure 1A). Despite a gradual decline after the peak of infection, significant numbers of virus-producing cells could still be detected until at least 10 weeks post infection, indicating that FV established persistent infection in these organs (Figure 1A). Surprisingly, significant numbers of virus-producing cells were also detected in the thymus at 2 weeks post infection, followed by the establishment of persistent infection in this organ (Figure 1A). At 2 weeks post FV infection, both F-MuLV and SFFV mRNA were detected from the thymus, but the levels of SFFV mRNA expression were much lower than those of F-MuLV mRNA in this organ (Figure 1B). Using the monoclonal antibody specific for F-MuLV envelope glycoprotein gp70 we found that it is mainly double positive (DP) and double negative (DN) thymocytes that harbor F-MuLV in the thymus, as up to 50% of cells in these populations were expressing gp70 on their surfaces at the peak of infection (Figure 2A and Figure 3A).

Surface expression of F-MuLV gag p15 antigen was also detected on gp70-expressing DN and DP thymocytes (Figure 3B), indicating the presence of glycosylated gag protein (gPr75^{gag}). Further, when thymocytes were fixed and permeabilized, F-MuLV capsid p30 antigen was also detected in gp70⁺ DN and DP thymocytes (data not shown). These results indicate that F-MuLV gene products were actively synthesized in DN and DP thymocytes. Immunohistochemical analyses also revealed viral gag antigen expression throughout the cortex where the DN and DP thymocytes were distributed (Figure 3C). Interestingly, the spread of the virus into the thymus appeared to be delayed a week as compared to that in the BM and spleen (Figure 1), suggesting that the dissemination of the virus to the thymus occurred following massive viral replication in the BM and spleen. In support of this, only marginal increases in proportions of gp70⁺ cells in the thymus were observed when *Fcγ2^c* C57BL/6 (B6) mice lacking the expression of the short form of STK (sf-Stk) were infected with FV or B6AF₁ mice were inoculated with F-MuLV alone (Figure S2). Thus SFFV-induced proliferation of FV-infected erythroid cells is required for effective dissemination of FV into the thymus.

Notably, CD44^{hi} DN thymocytes virtually lacked the expression of gp70, indicating that T cell progenitors migrated from the BM were not an initial source of virus dissemination to the thymus (Figure 2A). Since FV proviruses are known to be preferentially integrated into proliferating cells, and a large proportion of CD44⁻ DN thymocytes were gp70⁺, it is likely that FV initially infects DN thymocytes within this organ, and then replicates vigorously in DN thymocytes that proliferate and differentiate into DP thymocytes. The highest number of virus-producing cells in

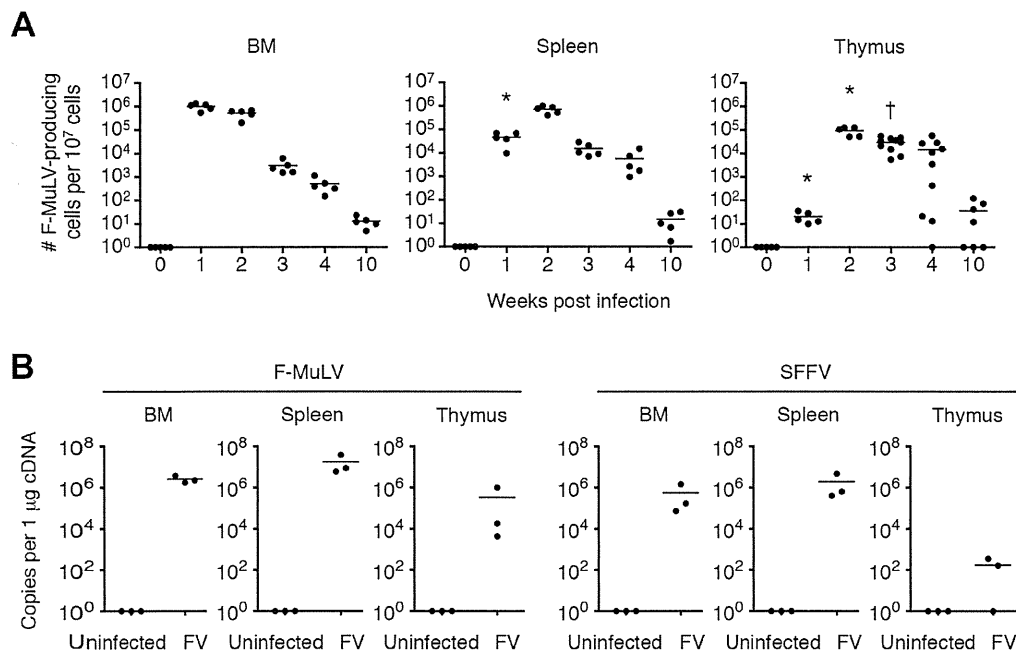


Figure 1. FV disseminates to and persists in the thymus following infection. Mice were infected with 1,000 SFFU of FV. (A) Cells in the BM, spleen and thymus were isolated at indicated time-points, and were cocultured with *M. dunnii* cells to enumerate F-MuLV infectious centers. Each symbol represents an individual mouse. Data are representative of two independent experiments with essentially equivalent results. *, $p < 0.0001$ in comparison with the numbers of FV-producing cells in the BM at the same time-point; †, $p < 0.0001$ in comparison with those in the spleen, by two-way ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons. (B) Total RNA was purified from the BM, spleen and thymus of FV-infected mice at day 14. Expression levels of F-MuLV and SFFV mRNA were analyzed by quantitative real-time PCR assays. Shown are copy numbers of viral DNA fragments amplified from 1 μg of total cDNA. doi:10.1371/journal.ppat.1003937.g001