

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。我々は昨年度までに、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も翻訳レベルでも高発現であって、翻訳に干渉する第5エキソンを含まないこと、N-末端側の機能性多型と第5エキソン獲得とは独立に起こり、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。一方、マウス APOBEC3 によるレトロウイルス複製制限はデアミナーゼ活性に依存しないことも報告したが、その実体は不明であった。今年度宮澤と伊藤は、マウス APOBEC3 の示すデアミナーゼ非依存性レトロウイルス複製制限機構の分子実体を解明することを目指し、ウイルスタンパク質との相互作用を明らかにした。一方、高折はヒト APOBEC3 の高発現がゲノム DNA の修飾に繋がることを明らかにしたが、APOBEC3 発現と乳癌の関係は見出せなかった。木村と有吉はそれぞれの HIV 感染者及び曝露非感染者コホートをを用い、ヒト APOBEC3 遺伝子群の発現と HIV-1 感染或いはエイズ発症感受性/抵抗性との関係を調べた。その結果、APOBEC3H 遺伝子多型の HIV 感染/エイズ発症感受性・抵抗性への寄与は人種・民族で異なるが、15del-105R デプロタイプが HIV 感染感受性と関連することが明らかになった。また、タイ・ランパンコホートの凍結細胞検体を用いた解析で、APOBEC3G 発現に細胞種で異なる調節機構が存在することが明らかとなり、CD14 陽性単球における APOBEC3G 発現量と HIV-1 曝露感染状態とに有意な相関は見出せなかったものの、高発現個体に HIV-1 感染者がないことから、以前宮澤らが報告した単球における APOBEC3G 高発現と曝露非感染状態との相関が、タイ検体でも裏打ちされた。

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）

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エキ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

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

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エキソンの有無とが 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 ドメインと、単一 Z2 ドメインの APOBEC3C 分子のみであり、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エキ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た。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/エイズ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/エイズ発症制御の方策を探ることを目指した。

APOBEC3 によるレトロウイルス複製制限の機構に、デアミナーゼ活性に依存しないものがあることは以前から報告されており、ヒト APOBEC3F や APOBEC3G による Vif 欠損 HIV-1 の複製制限にも、デアミナーゼ非依存性の機構があると言われてきた。前述の通り、我々はマウス APOBEC3 によるマウスレトロウイルス複製制限を最初に報告した論文において、抵抗性系統で発現する APOBEC3 によるマウスレトロウイルス複製阻害はデアミナーゼ活性中心を破壊しても殆ど影響を受けないこと、マウス APOBEC3 存在下で標的細胞に組込まれたプロウイルスゲノムに、G から A への塩基置換が有意に増加している事実はないことを報告した。しかしながら、マウス APOBEC3 が示す、デアミナーゼ活性非依存的なレトロウイルス複製制限機構の分子実体は、未だに明らかでない。

本年度は、マウスレトロウイルス分子クローンに偶然見出したタンパク質アミノ酸置換を足掛かりに、マウス APOBEC3 が示す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の実体解明を目指した。これに関連して、宮澤と伊藤はマウス APOBEC3 とウイルスタンパク質間の相互作用

用について明確な証拠を得たが、原著論文が未公開であり、特許出願も予定しているので、以下タンパク質名などの詳細な記述は控えて報告を行う。また、高折、木村、有吉は、引き続きヒト APOBEC3 遺伝子群の多型と HIV 感染/エイズ発症抵抗性、及び発症との関連を解明することを目指した。

B. 研究方法

1) マウス APOBEC3 との共発現によるマウスレトロウイルス分子クローン複製過程の解析

宮澤は、フレンドマウス白血病ウイルスの感染性分子クローン FB29 と 57、及びそれらの構造タンパク質に site-directed mutagenesis によりアミノ酸置換を加えた変異体を、レトロウイルス感染抵抗性の C57BL/6 マウス及び感受性の BALB/c マウス由来 APOBEC3 cDNA の発現ベクターと共に 293T 細胞に導入した。上清中に形成されたウイルス粒子を精製し、構造タンパク質の発現量とプロセッシングを、gag 及び env タンパク質特異的モノクローナル抗体により、Western blot 法で解析した。また、上清中のウイルス粒子を電子顕微鏡で観察し、成熟粒子の割合を算定した。同様の解析を、HIV-1 構造タンパク質を発現するレンチウイルスベクターを用いて行い、HIV-1 タンパク質に対して作製した抗ペプチド抗体を利用して、マウス APOBEC3 の共発現が HIV-1 タンパク質のプロセッシングに与える影響も解析した。

2) マウス APOBEC3 とレトロウイルスタンパク質の相互作用の解析

宮澤は、マウス APOBEC3 とマウスレトロウイルス構造タンパク質の直接相互作用を解析するため、GST 標識を加えたマウス APOBEC3 対立遺伝子産物を、コムギ胚芽系で大量に発現させて精製、試験管内転写翻訳系で発現させたレトロウイルスタンパク質と反応させた後、グルタチオンセファロースを用いた pull-down 法により、両者の相互作用を直接解析した。

3) ウイルスタンパク断片化による APOBEC3 結合領域の解析

宮澤は上記2)の実験系で、試験管内転写翻訳系により発現するウイルス側タンパク質に C-末端側から 20 アミノ酸残基ずつ欠失を加え、pull-down 法によるマウス APOBEC3 との相互作用解析により、両タンパク質間の結合領域を探った。

4) マウス APOBEC3 N-末端側 Z2 ドメインの精製と結晶化条件の探索

伊藤は昨年度までに、アミノ末端に精製用のポ

リヒスチジンタグ (His-タグ) を持ち、かつこのタグをプロテアーゼで除去できる APOBEC3 発現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、今年度は発現条件や精製条件の見直しを行った。

また、マウス APOBEC3 (mA3) は核酸に結合するためその表面に正電荷を多く持つと考えられ (実際 mA3 Z2 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。得られた非メチル化またはメチル化 mA3 Z2 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。

5) マウス APOBEC3 と結合するウイルス側因子の発現と精製

mA3 との相互作用の詳細かつ定量的な解析のためには、高純度のウイルス側因子試料が必要である。そこで、伊藤は大腸菌による発現系を構築した。目的のウイルス側因子の cDNA を各種ベクターに挿入し、精製用タグ、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、タグの除去等の条件も検討した。

6) マウス APOBEC3 N-末端ドメインとウイルス側因子との相互作用解析

伊藤は mA3 Z2 とウイルス側因子との相互作用を定量的に解析するために、Biacore T100 を用い、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による測定を行った。

7) マウス APOBEC3 N-末端ドメインとウイルス側因子との共発現系の構築

上記5) で得られたウイルス側因子の発現系をもとに、伊藤は大腸菌によるウイルス側因子と mA3 Z2 の共発現を試みた。複合体の形成を検知するために、ウイルス側因子と mA3 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ウイルス側因子のものを用い、それぞれの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。

8) ヒト APOBEC3B による細胞ゲノム DNA 変異誘導と発癌の関係の解析

高折は乳がんを発症した患者の末梢血よりゲノム DNA を抽出し、PCR 法により APOBEC3B 遺伝子の有無を検討した。対照として、健康人ドナーから抽出したゲノム DNA を用いた。

9) I 型インターフェロン反応性 APOBEC3G 遺伝子発現の解析

有吉は、HIV-1 曝露の密度・期間の情報が明らかでない 61 名の HIV-1 曝露未感染者 (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末梢血単核球検体から、抗体固相化磁気ビーズ (EasySep®) を用いて 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、タンパク質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 存在下に 4 時間培養後の RNA を調製した。IFN 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)、MXI (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 有無での APOBEC3G 相対発現量比を算出した。

10) APOBEC3G 遺伝子上流ゲノム領域の DNA メチル化分析

有吉らは、組織特異的な遺伝子発現のエピジェネティックな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。

11) ヒト APOBEC3H 多型と HIV 感染/エイズ発症との関連解析

木村は、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ヶ所の機能多型 (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。

【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 感染患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

両機関で倫理審査委員会の承認を得た。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得た(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 との共発現によるマウスレトロウイルス分子クローン複製過程の阻害

マウス APOBEC3 対立遺伝子産物とフレンド白血病ウイルス分子クローン FB29 または 57 を共発現させることで、上清中に形成されるウイルス粒子構造タンパク質のプロセシング阻害が起こることが観察された。同様のプロセシング阻害は、HIV-1 構造タンパク質を発現するレンチウイルスベクターとマウス APOBEC3 との共発現によっても観察された。ウイルスタンパク質への変異導入によりプロセシング阻害を起こしたマウスレトロウイルス、或いはレンチウイルスベクター系で同時発現させた VSV-G タンパク質を内部標準とすることで、マウス APOBEC3 発現によるウイルスタンパク質プロセシング阻害の程度を定量的に把握することが可能であった。

2) マウス APOBEC3 とレトロウイルスタンパク質の相互作用の解析

コムギ胚芽系で発現させた GST 標識 APOBEC3 タンパク質と、試験管内転写翻訳系で発現させたマウスレトロウイルスタンパク質とを用いた pull-down 法により、両者の相互作用を直接証明することに成功した。APOBEC3 の部分発現により、相互作用部位はマウス APOBEC3 分子の N-末端側にあると考えられた。

3) ウイルスタンパク質断片化による APOBEC3 結合領域の解析

上記2)の pull-down アッセイ系に加えるマウスレトロウイルスタンパク質に、C-末端側から 20 アミノ酸残基ずつの欠失を加えた。その結果、マウス

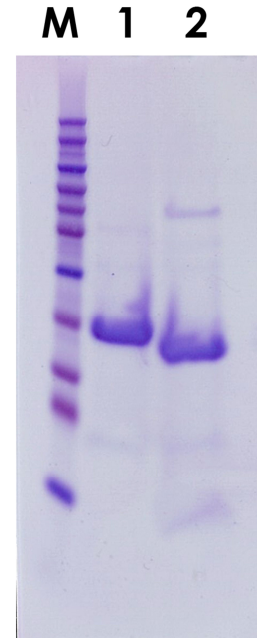


図 1. マウス APOBEC3 N-末端ドメイン (mA3 Z2) の精製 M: 分子量マーカー Lane 1: His-タグがついた状態 Lane 2: His-タグ切断後のイオン交換クロマトグラフィーにより精製された mA3 Z2.

APOBEC3 との結合は、C-末端側の 40 アミノ酸残基を除いても保たれるが、それ以上の欠失を加えると観察されなくなった。

4) マウス APOBEC3 アミノ末端側 Z2 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-タグを除去した mA3 Z2 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 B6 マウスと感受性 BALB/c マウス由来の mA3 Z2 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 Z2 は、予想通り陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて非メチル化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、結晶化における挙動の点でも、抵抗性型と感受性型の mA3 Z2 の間に大きな差異は見られなかった。

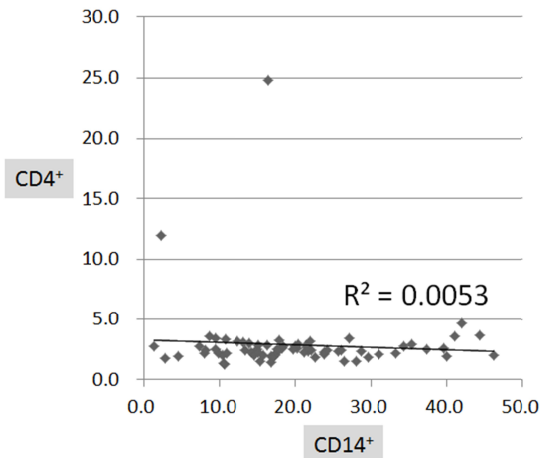


図 2. 北タイ集団における APOBEC3G 発現の I 型インターフェロン反応性の個人差

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 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、より大きい個人間差が観察された。

5) ウイルス側因子の発現と精製

マウス APOBEC3 と結合すると考えられるウイルス側因子は、大腸菌で融合タンパク質として可溶性形で発現することができ、アフィニティークロマトグラフィー、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。

6) マウス APOBEC3 N-末端ドメインとウイルス側因子との相互作用解析

現状では暫定的な結果ではあるが、SPR により、mA3 Z2 とウイルス側因子と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。

7) マウス APOBEC3 N-末端ドメインとウイルス側因子との共発現系の構築

両者を共発現した大腸菌を破碎し、遠心後の上清より mA3 Z2 とウイルス側因子をそれぞれの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、抗体によるプロットを行った結果、mA3 Z2 とウイルス側因子が共精製されたことを示唆するバンドが見られた。

8) ヒト APOBEC3 と発癌の関係

高折の解析では、30 人の乳がん患者のうち、5 人に APOBEC3B のホモ欠損が見られた。しかし、その頻度は、健康人ドナーで 36 人のうち 5 人にホモ欠損が見られたのと有意差はなかった。

9) 曝露非感染者由来 CD14 陽性細胞における I 型インターフェロン反応性 APOBEC3G 遺伝子の発現

夫婦間 HIV-1 曝露後の感染抵抗性に対する 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 2)、細胞種毎に別個の発現制御機構があって、特に CD14 陽性細胞での発現制御機構に大きな個人差が存在することを示すデータが得られた。

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) についても同様に測定し、ESN 群との相違を検討した。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、群間で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 感染者がいなかった。これは、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)。

10) 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 エキソン近傍に 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 APOBEC3G 遺伝子上流域は、隣接する APOBEC3F 遺伝子、APOBEC3H 遺伝子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 陽性単球様の表現型を示すヒト白血病細胞株 THP-1 の DNA を用いた解析で、APOBEC3G 遺伝子の CpG アイランドがどの細胞種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。

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の遺伝子発現とを関連付けられるかを検討する。

11) ヒト集団における *APOBEC3H* 多型と HIV 感染/エイズ発症との関連解析

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能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)をタイピングして、それらで構成される 15-105 ディプロタイプを推定、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

<i>APOBEC3H</i> 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 感染患者集団と対照健常者集団との比較では、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	%HIV患者	OR	p
	2n=462	2n=382		
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	%HIV患者	OR	p
	2n=674	2n=472		
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	%LTNP	OR	p
	2n=462	2n=186		
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。

D. 考察

マウス *APOBEC3* によるレトロウイルス複製抑制は主にデアミナーゼ活性非依存性機構によるものと考えられ、ヒト *APOBEC3G* による HIV-1 複製阻害にもデアミナーゼ活性に依存しない機構があるとされてきた。デアミナーゼ非依存性複製抑制機構として逆転写酵素の阻害が報告されているが、詳細な分子機構は不明のままである。

我々は昨年度までに、マウス *APOBEC3* 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、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にした。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。

今年度は、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分子レベルで解析を行い、マウス *APOBEC3* によるウイルスタンパク質プロセッシング阻害という、予想外の新機構を発

見した。マウス APOBEC3 は HIV-1 タンパク質のプロセッシングも阻害することから、今後両タンパク質間の結合部位を詳細に解析することにより、マウス APOBEC3 による HIV-1 複製阻害機構を治療薬へと発展させる研究の出発点が確立できると考える。

昨年度まで、我々は精製用の His-タグを持ったままの mA3 Z2 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 Z2 において、His-タグ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はできなかった。mA3 Z2 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の共結晶化などの検討が必要となる。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る。

ウイルス側タンパク質と mA3 Z2 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、そこから得られるデータの詳細な解析を待つ必要がある。

Biasin らと宮澤ら(2007)がイタリアの夫婦間曝露の 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。しかし、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者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 エキソン間の RT-PCR を適用したが、第 2 エキソンを含まず、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、組織特異的な遺伝子発現のエピジェネティックな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 エキソン近傍に

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わかった。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必要がある。

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、細胞レベルの研究によって APOBEC3H が HIV 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 の発現調節には DNA メチル化と性差が関わることを明らかにしているため、今後 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。

E. 結論

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の分子実体として、ウイルスタンパク質との直接結合によるプロセッシング阻害を明らかにした。今後マウス APOBEC3 とウイルスタンパク質の結合部位を解明することで、新たなウイルス複製阻害薬設計の基礎となる分子情報を提供することが出来ると期待される。

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は、特に CD14 陽性細胞において、大きな個人差が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や個人間差がある可能性を示した。APOBEC3H 多型は、生体における HIV/AIDS 制御に寄与する。

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) Takamura, S., E. Kajiwara, S. Tsuji-Kawahara, T. Masumoto, M. Fujisawa, M. Kato, T. Chikaishi, Y. Kawasaki, S. Kinoshita, M. Itoi, N. Sakaguchi, and M. Miyazawa. Infection of adult thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents functional memory CD8⁺ T cell differentiation. *PLoS Pathogens* 10: e1003937, 2014.

2) Tsuji-Kawahara, S. and M. Miyazawa.

- Elimination of Friend retrovirus in the absence of CD8⁺ T cells. *J. Virol.* **88**:1854-1855, 2014.
- 3) Tsuji-Kawahara, S., H. Kawabata, H. Matsukuma, S. Kinoshita, T. Chikaishi, M. Sakamoto, Y. Kawasaki, and M. Miyazawa. Differential requirements of cellular and humoral immune responses for Fv2-associated resistance to erythroleukemia and for the regulation of retrovirus-induced myeloid leukemia development. *J. Virol.* **87**:13760-13774, 2013.
- 4) Tsumiyama, K., A. Hashiramoto, M. Takimoto, S. Tsuji-Kawahara, M. Miyazawa, and S. Shiozawa. IFN- γ -producing effector CD8 T lymphocytes cause immune glomerular injury by recognizing antigen presented as immune complex on target tissue. *J. Immunol.* **191**: 91-96, 2013.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Matsui, Y., K. Shindo, K. Nagata, K. Io, K. Tada, F. Iwai, M. Kobayashi, N. Kadowaki, R. Harris, and A. Takaori-Kondo. Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBF β by site-directed mutagenesis. *Virology* **449**: 82-87, 2014.
- 10) Yoshioka, S., Y. Miura, H. Yao, S. Satake, Y. Hayashi, A. Tamura, T. Hishita, T. Ichinohe, H. Hirai, A. Takaori-Kondo, and T. Maekawa. C/EBP β expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells regulates early B-cell lymphopoiesis. *Stem Cells* **32**: 730-40, 2014.
- 11) Arai, Y., Y. Nishinaka, T. Arai, M. Morita, K. Mizugishi, S. Adachi, A. Takaori-Kondo, T. Watanabe, and K. Yamashita. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**: 556-561, 2014.
- 12) 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 A. Takaori-Kondo. CKIP-1 is an intrinsic negative regulator of T-cell activation through an interaction with CARMA1. *PLoS One* **9**: e85762, 2014.
- 13) Furukawa, A., K. Sugase, R. Morishita, T. Nagata, T. Kodaki, A. Takaori-Kondo, A. Ryo, and M. Katahira. Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **53**: 2349-2352, 2014.
- 14) 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, A. Takaori-Kondo, 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. *Eur. J. Haematol.* **92**: 219-228, 2014.
- 15) 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, A. Takaori-Kondo, and N. Kadowaki. Human CD1c⁺ myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D. *J. Immunol.* **191**: 3152-60, 2013.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.

19) 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.

20) 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.

21) 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) 本園 千尋, J. J. Miles, Z. Hasan, 湯永 博之, S. C. Meribe, D. A. Price, 岡 慎一, 宮澤 正顯, A. K. Sewell, 上野 貴将. T細胞の交差反応性とHIV逃避変異の解析. **白馬シンポジウム**. 2013年7月19-20日, 名古屋.

2) Motozono, C., N. Kuse, X. Sun, P. J. Rizkallah, A. Fuller, M. Miyazawa, S. Oka, D. K. Cole, A. K. Sewell and M. Takiguchi. Molecular basis of a dominant T cell response to an HIV reverse transcriptase epitope presented by the protective allele *HLA-B*51:01*. **14th Kumamoto AIDS Seminar**. Oct 29-31, 2013, Kumamoto, Japan.

3) Motozono, C., J. J. Miles, Z. Hasan, S. C. Meribe, D. A. Price, M. Miyazawa, A. K. Sewell, and T. Ueno. CD8 T cell cross-reactivity profiles and HIV-1 immune escape. **第42回日本免疫学会学術集会**. 2013年12月11-13日, 千葉.

4) Takamura, S., J. E. Kohlmeier, H. Yagi, T. Nakayama, M. Tomura, K. Matsushima, D. L. Woodland, and M. Miyazawa. Intravascular staining discloses molecular mechanisms of memory CD8⁺ T cell recruitment to the lung airways. **第42回日本免疫学会学術集会**. 2013年12月11-13日, 千葉.

5) Takamura, S., H. Yagi, T. Nakayama, T. Masumoto, and M. Miyazawa. CD69 enhances the recruitment of memory CD8⁺ T cells to the lung airways by inhibiting S1P-mediated lymphocyte egression from the lung parenchyma. **Keystone Symposium on Tissue-Resident Memory**. Jan. 12-16, 2014, Snowbird, UT, USA.

6) Matsui, Y., K. Shindo, K. Nagata, K. Io, M. Shinohara, R. S. Harris, and A. Takaori-Kondo. Identification of a novel region of HIV-1 Vif to

interact with CBF β . **Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses**. May 20-25, 2013. Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

7) 吉永 則良, 松井 佑亮, 新堂 啓祐, 武田 俊一, 高折 晃史. HIV-1複製に關与するDNA修復系宿主因子の探索. **第27回日本エイズ学会学術集会**. 2013年11月20-22日, 熊本.

8) Ito, N. Structure Deposition at PDBj. **OIST/CCP4 Workshop**, November 4-9, 2013. Onna, Okinawa.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 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.

14) 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.

15) 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.

16) 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.

17) 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.

18) 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.

19) 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