

マウス APOBEC3 機能性多型の分子基盤解析

研究分担者 宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）

研究要旨 APOBEC3 は一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼであり、細胞内でレトロウイルス複製制限因子として機能する。我々はマウスの APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対して強い複製制限効果を示しうること、マウス APOBEC3 遺伝子には多型があり、感染抵抗性の系統で発現する対立遺伝子は転写レベルでも翻訳レベルでも高発現であること、遺伝的多型に起因する第5エキソンの有無が、タンパク質翻訳効率を決定することを報告してきた。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。今年度は、マウス APOBEC3 の示すデアミナーゼ非依存的な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た。

A. 研究目的

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

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。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、デアミナーゼ活性に依存しない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。

我々は、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について重要な発見を行ってきた。これに関連して、マウス APOBEC3 とウイルスタンパク質間の相互作用についても明確な証拠を得ているが、現時点で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。

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

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

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) ウイルスタンパク質断片化による *APOBEC3* 結合領域の解析

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 アミノ酸残基ずつの欠失を加え、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。

【倫理面への配慮】

本研究計画にはヒト検体を用いた解析を含まないが、遺伝子組換え実験を含む。遺伝子組換え実験については、近畿大学遺伝子組換え実験安全管理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* 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 *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。

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。

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。

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.

2. 学会発表

- 1) 本園 千尋, J. J. Miles, Z. Hasan, 瀧永 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.

H. 知的所有権の出願・取得状況

出願準備中

