

## 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 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 メチル化状態をパ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な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 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)、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 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・個人差をパ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 ( $p = 0.0522$ ,  $2 \times 3$  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

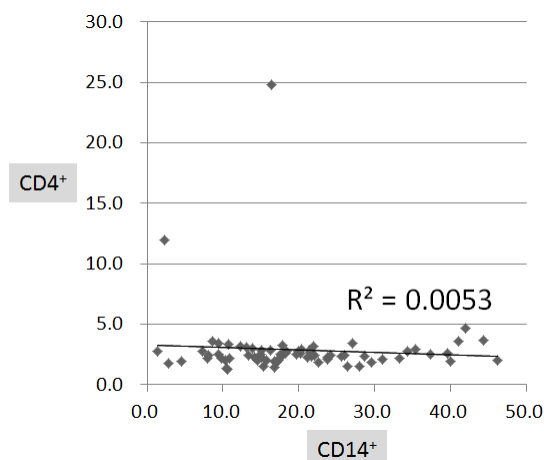


図 1. 北タイ集団における APOBEC3G 発現の I 型インターフェロン反応性の個人差

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 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。

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

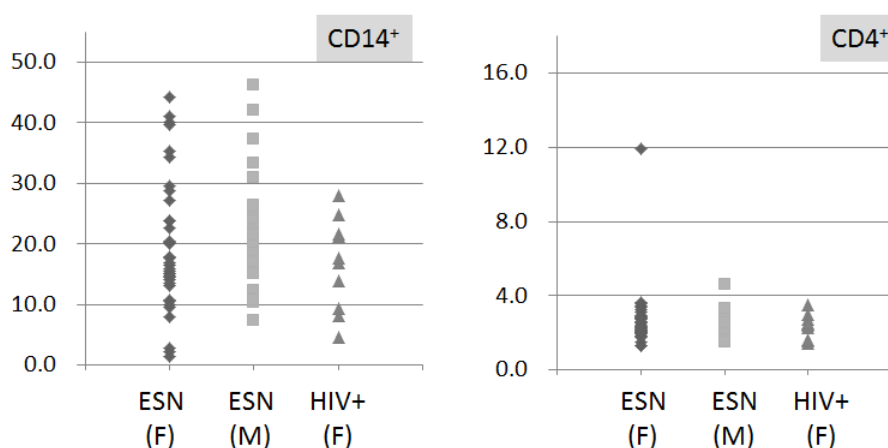


図 2. 細胞種特異的 APOBEC3G 発現の群間差

CD14 陽性細胞 (左) と CD4 陽性細胞 (右) での IFN 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。



## 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