

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 IκBL 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) IκBL 分子 (NFKB1I 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 (NFKB1I 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 IκBL 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	III

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	%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。

2) IkBL 分子 (NFKB1I 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

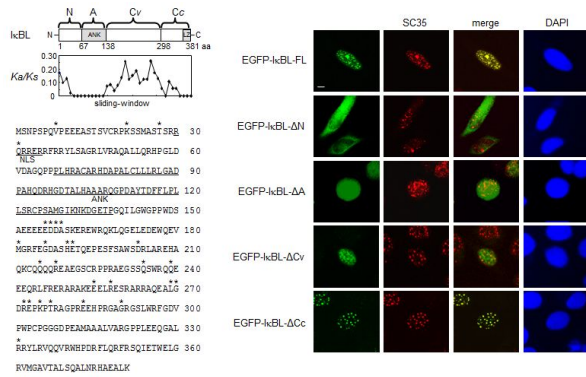


図1 IkBL 分子のドメイン構造と細胞内局在

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、IkBL は核スペ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 IkBL 分子の効果を検討したところ、IkBL 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、IkBL は CLK1 と結合することを見出していたため、IkBL 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、IkBL と CLK1 は核スペクルに共局在し、IkBL 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 との結合に必要とすることが判明した。さらに、siRNA を用いた実験から、

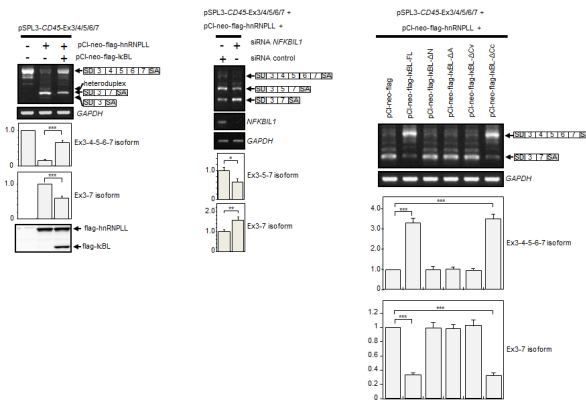


図2 IkBL による CD45 スプライシング制御

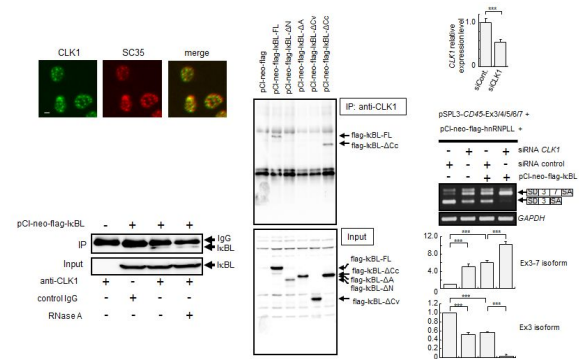


図3 IkBL は CLK1 に結合し、スプライシングを阻害する

IkBL 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、IkBL 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、IkBL 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 IkBL と結合することが明らかになった(図4)。

本研究において IkBL が CD45 のスプライシング抑制に関わることが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、IkBL 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、IkBL 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

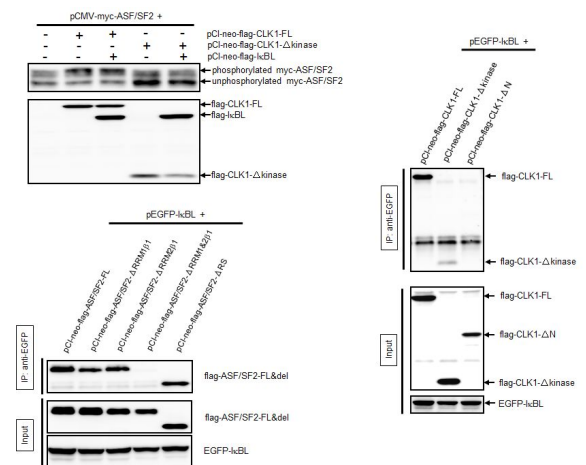


図4 IkBL によるスプライシング制御と CLK1

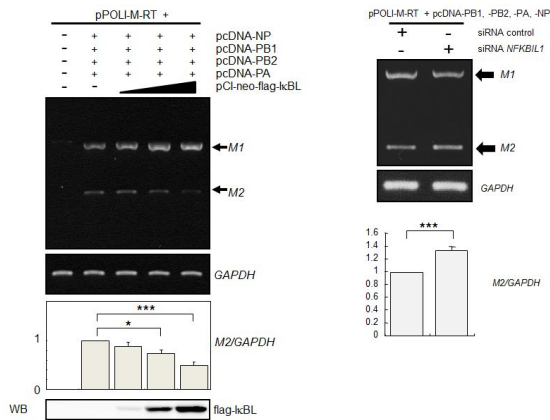


図5 IkBLによるM2遺伝子スプライシング制御

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