

201319004B

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 23～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 宮澤 正顯

(近畿大学医学部)

平成 26 年 3 月

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 23～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 宮澤 正顯

(近畿大学医学部)

平成 26 年 3 月

# 目 次

## I. 総合研究報告書

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

3

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

27

## II. 研究成果の刊行物別刷

37

# I. 総合研究報告書

## 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。宮澤らは以前に、マウスの APOBEC3 (mA3) 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高発現であって、第5エクソンを含まないことを見出していた。本研究を通じて宮澤らは、mA3 N-末端側のアミノ酸配列多型がウイルス複製抑制機能に与える影響を明らかにし、伊藤らと共同して N-末端ドメインの立体構造上で上記の機能的多型残基が占める位置を解析した。また、進化論的考察から、N-末端側の機能性多型と、タンパク質翻訳に干渉する第5エクソンの獲得とが独立に起こり、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。伊藤らはさらに、mA3 分子の二量体化に、N-末端側のアミノ酸残基が影響する可能性を示した。一方、宮澤らはマウス APOBEC3 によるレトロウイルス複製制限がデアミナーゼ活性に依存しないことも報告していたが、その実体は不明であった。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。高折らは、主に核内に存在するヒト APOBEC3B が、宿主ゲノムに変異を導入することを見出した。APOBEC3B は一部のリンパ腫で発現が亢進しており、cMYC などのがん遺伝子の変異に関与している可能性があるが、乳癌と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 遺伝子の 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。また、APOBEC3H 遺伝子上流および下流のメチル化に有意な性差が認められ、上流のメチル化と遺伝子発現には正の相関があった。さらに、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、高発現群には HIV-1 感染者がいないことが明らかとなった。

### 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）

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 の細胞内分解を促進し、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

### 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

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発現量が高く、その産物が第5エク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エクソンの有無とが 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エク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/AIDS 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/AIDS 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

ルス複製制限機構の分子実体は、未だに明らかでない。

本研究で我々は、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について明確な証拠を得たが、この報告の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ため、以下タンパク質名などの詳細な記述は控えて記述を行う。

## B. 研究方法

### 1) ゲノム塩基配列多型と APOBEC3 タンパク質発現との関係の解析

ヒトでは、HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者或いは未感染健常人との間で、CD14 陽性単球における APOBEC3G タンパク質の発現量に有意な差があることが報告されているが、マウスの系で APOBEC3 遺伝子型の系統差がタンパク質発現量の差に結びつくかどうか、また感染抵抗性と APOBEC3 タンパク質発現量、或いは細胞特異的発現との間に関係があるかどうかは明かでない。そこで宮澤は、同種由来レトロウイルス感染に自然抵抗性を示す C57BL/6 (B6)マウスと、感受性の BALB/c マウスとの間で、内因性 APOBEC3 タンパク質発現量に差があるか否かを Western blot 法で解析した。また、その場合転写産物発現量の差がそのままタンパク質発現量の差に結びつくのか否かを、試験管内の転写翻訳系によって解析した。

### 2) マウス APOBEC3 スプライズバリエーション発現調節機構の解析

B6 マウスでは第 5 エクソンを欠く  $\Delta 5$  が APOBEC3 遺伝子転写産物の主要なスプライズバリエーションとして発現し、BALB/c マウスでは第 5 エクソンを含む全長型が APOBEC3 mRNA の主体であることが、複数の研究グループによって繰り返し記載されている。しかし、対立遺伝子間の多型がこのようなスプライズ多型に結びつく分子レベルの機構は、これまで明かでなかった。そこで宮澤は、APOBEC3 転写産物スプライズバリエーション形成のしくみを、第4イントロンに存在する RNA 分岐部位多型、及びそのすぐ下流の投げ縄配列多型の機能的意義、及びそれ以外のゲノム多型の機能解析から解析した。

具体的には、プラスミドベクターを用いたミニ遺伝子スプライズアッセイ系を用い、挿入するゲノム DNA 上で B6 マウス由来及び BALB/c マウス

由来 APOBEC3 第 4 イントロンの配列を相互に置換して、RT-PCR 法によりスプライシングの有無を解析した。BALB/c 型の分岐部位配列を持つ場合にスプライシングが促進されると予想されたので、QuickChange 法を用いた site-directed mutagenesis でこれら多型がスプライシング効率の決定に関与しているか否かを直接検定した。

実際はスプライシング制御が第 4 イントロンの多型のみには依存しないことがわかったので、ゲノム塩基配列多型が存在する第 4 エキソンから第 6 エキシソンの範囲について、B6 マウスと BALB/c マウスのゲノムクローンのキメラを作製し、調節部位の絞り込みを行った。その後、絞り込んだ調節部位存在範囲について欠失変異の導入及び B6 と BALB/c 配列間の相互置換を行い、B6 マウスで  $\Delta 5$  が主要な転写産物となる原因を、特定の塩基配列多型として同定した。

### 3) マウス APOBEC3 転写調製配列の多型が持つ生理的意義の解析

上記2)によりマウス APOBEC3 遺伝子上のスプライシング調節部位が決定されたので、宮澤はこの配列が齧歯類の進化上どの時点で獲得されたものであるかを、複数の野生種のゲノム塩基配列を比較することで進化論的に解析し、レトロウイルス感染抵抗性の B6 型対立遺伝子がどの時点で獲得されたかを明らかにした。

### 4) マウス APOBEC3 各対立遺伝子産物間の相互残基置換

宮澤は、マウスレトロウイルス感染抵抗性で、高機能型の APOBEC3 を高く発現する B6 マウスと、感染感受性で低機能型の APOBEC3 を低く発現する BALB/c マウスから、それぞれ APOBEC3 cDNA を発現ベクターにクローニングし、site-directed mutagenesis により、多型の認められるアミノ酸残基を相互に入れ替えた変異クローンを作製した。得られた変異クローンを BALB 3T3 細胞に導入して安定発現細胞株を樹立、各細胞株における APOBEC3 分子発現は、RT-PCR による mRNA 検出と、発現産物末端に挿入したタグによる Western blot 法で確認した。

### 5) 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 B6 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。

### 6) 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。

### 7) 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6)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。

### 8) ホモロジーモデリングによるマウス APOBEC3 N-末端ドメインの立体構造の解析

岩谷らは、単一 Z2 ドメインのヒト APOBEC3 パラログ、APOBEC3C の結晶化と X 線構造解析に成功し、そのデータを発表した (Kimura *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* 19:1005-1010, 2012)。そこで、伊藤は上記岩谷らのデータ (PDB ID: 3vow) を参考に、MODELLER (Marti-Renom *et al. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:291-325, 2000) を用いてマウス APOBEC3 の立体構造シミュレーションを行い、多型のある残基の位置をプロットして、それらの側鎖のオリエンテーションを解析した。また、動的散乱実験の結果から、マウス APOBEC3 N-末端ドメインが二量体を形成している可能性が示唆されていたため、ヒトの APOBEC2 の構造 (Prochnow *et al. Nature* 445: 447-451, 2007. PDB ID: 2NYT) を基礎に、同様のモデリングを行った。

#### 9) マウス APOBEC3 N-端側 Z2ドメインの発現・精製と結晶化条件の探索

伊藤は、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、結晶化に必要な発現条件や精製条件の検討を行った。

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と持つと考えられ (実際 mA3 Z2 は陽イオン交換樹脂に結合した)、これが結晶化に悪影響を与える可能性が考えられたので、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。

#### 10) 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。

#### 11) 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。

#### 12) 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10) 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。

#### 13) ヒト APOBEC3 による細胞ゲノム DNA 変異誘導と発癌との関わり解析

高折は HEK293 細胞のゲノムに EGFP 遺伝子を導入し、この細胞に APOBEC3 を過剰発現させたとき、EGFP に変異が導入されるかを検討した。さらに、リンパ腫の細胞株である KIS1 や SUDHL-6 を用い、APOBEC3 の発現と cMYC や PAX5 などのがん遺伝子の変異との関連を検討した。また、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。

#### 14) 霊長類 APOBEC3G 遺伝子における進化選択圧の解析

木村はヒト、チンパンジー、アカゲザル、マーモセットの APOBEC3G 遺伝子配列の個々のペアについて、300bp 幅の Ka/Ks 比を 30bp ずつのスライディングで算出した。

#### 15) ヒト APOBEC3G 遺伝子多型の HIV 感染との相関解析と、プロモーター領域多型探索

木村は黒人集団で HIV 感染後のウイルス量との関連が報告されている APOBEC3G 遺伝子第4エキソン内の H186R 多型について、日本人 HIV 感染長期未発症患者 89 名、日本人一般健常者 282 名、インド人 HIV 感染患者 249 名、インド人一般健常者 386 名のゲノム DNA を PCR-RFLP 法でタイピングした。また、日本人健常者 10 名、インド人健常者 9 名を対象として、APOBEC3G 遺伝子のプロモーター領域 (-2838 ~ +1) について、PCR ダイレクトシーケンス法で遺伝的多型を探索した。

#### 16) APOBEC3 遺伝子領域の連鎖不平衡およびメチル化の検討

木村は日本人一般健常者由来の B 細胞株 93 件について、APOBEC3 遺伝子領域 (約 140.5 kb) の 43 個の SNP (rs2142833 ~ 139390) をタイピングし、これらの間の連鎖不平衡を検討した。また、この領域内の5か所のメチル化サイト (cg10555000, cg25883868, cg00399895, cg17972162 および cg13306870) について、93 のヒト細胞株におけるメチル化の程度を評価した。

#### 17) 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な 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晩培地に馴化したのちに、IFN $\alpha$ 存在下に4時間培養後のRNAを調製した。IFN $\alpha$ 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 $\alpha$ 有無での*APOBEC3G*相対発現量比を算出した。

#### 18) *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、パイサルファイト修飾法により分析した。

#### 19) 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解析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。なお、今回はコホート研究開始当初の検体収集から、かなりの時間が経過していたため、タイ国での承認に際していくつかの問題を解決する必要があった。また、検体の持ち出しに関して制限規則があるため、実験をタイ国立公衆衛生研究所内で行なう必要があった。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受けた(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員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* N-末端ドメイン多型残基の構造-機能相関

C57BL/6 (B6)マウスで発現する高機能型のマウス *APOBEC3* 対立遺伝子産物と、BALB/c マウスで発現する低機能型対立遺伝子産物とで、そのN-末端側ドメインには8ヶ所のアミノ酸残基置換が認められる。このうち、デアミナーゼ共通モチーフ内に認められるアミノ酸配列多型は5残基であり、残り3残基は、共通モチーフよりもN-末端側に位置している。そこで、宮澤らはこれらの多型残基を相互置換し、変異遺伝子産物のマウスレトロウイルス複製抑制活性を、野生型遺伝子産物のそれと比較した。同じ第5エクソン欠損型の *APOBEC3* を、持続発現細胞株ではほぼ等量発現させた場合、高機能型である B6 マウス由来アレル産物は、強いフレンド白血病レトロウイルス(F-MuLV)複製抑制活性を示した。一方、BALB/c マウス由来アレル産物の複製抑制効果は、第5エクソン欠損型であっても弱かった。高機能型アレル産物を基礎に、そのN-末端側G34残基を低機能アレル型(R)に置換した場合、或いはK37及びG38残基を同時に低機能アレル型に置換した場合(K37I, G38D)は、何れもF-MuLV複製抑制活性が低機能型アレル産物と同じ程度にまで低下した。これに対して、デアミナーゼモチーフ内のV134及びQ135残基、或いはT139残基をdアレル型に置換した場合には、高機能型アレル産物の高いウイルス複製抑制活性が保たれた。

このことから、系統間で多型のあるアミノ酸残基のうち、デアミナーゼモチーフより遥かにN-末端側の、G/R34, K/I37, G/D38の3残基が、ウイルス複製抑制活性に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

##### 2) 機能性残基が *APOBEC3* 分子三次構造上で占める位置の解析

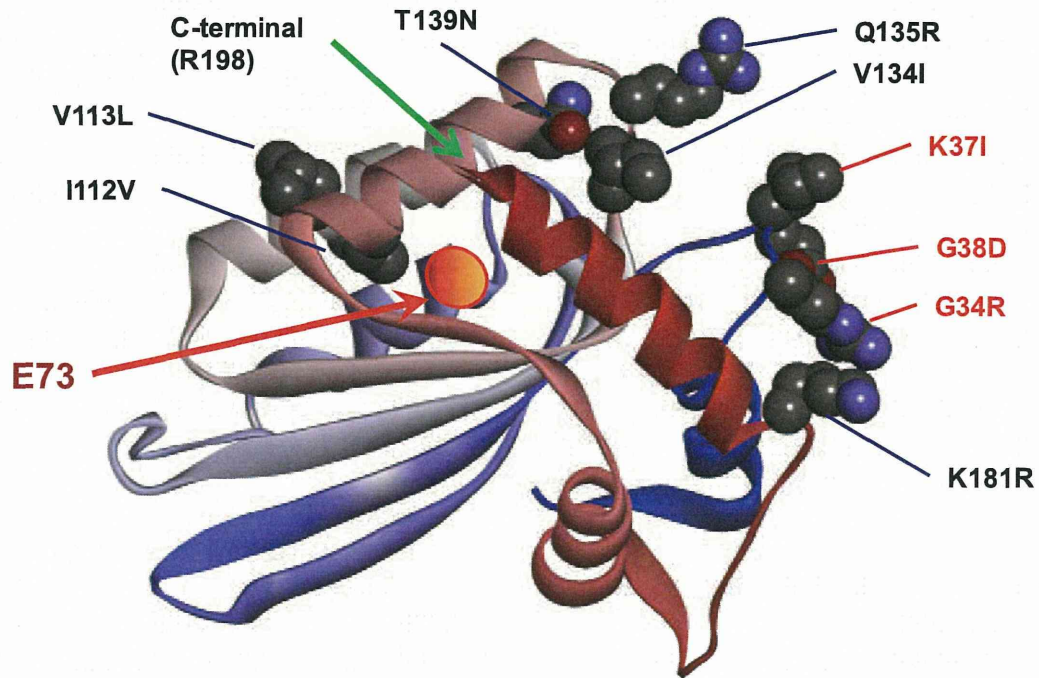


図 1. マウス APOBEC3 分子 N-末端側ドメインの立体構造における多型残基の存在部位 ヒト APOBEC3C の X 線結晶構造解析データを基礎に、Discovery Studio 3.5 を用いてシミュレーションを行った。図2で解析した多型残基の側鎖がどちらを向くかを、それらだけ空間充填モデルで示してある。赤で示したのが site-directed mutagenesis により機能的な重要性が示された残基である。多型残基が、疎水性残基間の多型である I112V と V113L を除き、全て同一表面に集まっていることがわかる。ポリペプチドの N-末端側を青で、C-末端側を赤で示し、二次構造はリボンモデルで表示した。

1) で解明した機能上重要な多型残基が、APOBEC3 分子の立体構造上でどのような位置を占めるかを明らかにするため、最近解明されたヒト APOBEC3C 分子の X 線結晶構造解析データを基礎に、伊藤がコンピュータによるシミュレーションを行った。ヒト APOBEC3C とマウス APOBEC3 の N-末端ドメインは、その一次構造の特徴から、何れも Z2 ドメインに属することが知られている。

図1に示す通り、アリル間で多型の認められるアミノ酸残基は、全て N-末端ドメインの同一面に集まっており、機能的な多型残基の側鎖は互いに近接していることがわかった。また、これら機能的な残基は、デアミナーゼ活性中心の E73 残基(図1にオレンジの球で示す)からは離れた位置にあり、マウスレトロウイルスに対する APOBEC3 の複製抑制効果がデアミナーゼ活性に非依存性であることを良く反映していると考えられた。

また、ヒト APOBEC2 の二量体を基礎としたモデルでは、mA3-N もその  $\beta$  シートを介して二量体を形成することが可能であることが判った。

### 3) ゲノム塩基配列多型と APOBEC3 タンパク質発現との関係の解明

マウス APOBEC3 の遺伝子多型がタンパク質発現量に影響を与えるか否かを解析するため、APOBEC3 mRNA が高発現でマウスレトロウイルスに感染抵抗性である B6 マウスと、mRNA 低発現で感染感受性の BALB/c マウスの脾細胞を用い、Western blot 法で内因性 APOBEC3 タンパク質の発現量を比較した。その結果、B6 マウスの脾臓から大量の  $\Delta 5$  型タンパク質が検出されたのに対し、BALB/c マウスにおける APOBEC3 タンパク質発現は微量であることが明らかとなった(図2)。

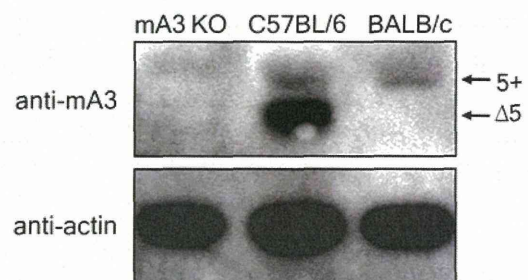


図 2. 脾細胞における内因性マウス APOBEC3 (mA3) タンパク質の発現 APOBEC3 ノックアウトマウス(mA3KO)を陰性対照として用いた。

そこで、遺伝子多型に伴う転写産物発現量の差が、そのままタンパク質発現量の差に結び付くか否かを解明するため、試験管内転写翻訳系を用いた実験を行った。同じB6由来、またはBALB/c由来 *APOBEC3* 対立遺伝子の産物である全長型と第5エクソン欠損型のcDNAを、それぞれトランスフェクションし、ほぼ等量のmRNA発現を得た条件下でも、細胞内の*APOBEC3*タンパク質発現量は第5エクソン欠損型の方が明らかに高く、全長型のタンパク質は大量に発現させることが困難であった。そこで、ルシフェラーゼ発現ベクターをcotransfectすることでトランスフェクション効率を厳密に検定出来る条件下で、更にreal-time PCRによる*APOBEC3* mRNA発現の定量も行って、転写産物量が一定の条件下でタンパク質翻訳効率を比較した。その結果、対立遺伝子間のゲノム塩基配列多型に関わらず、全長型のマウス*APOBEC3* mRNAは翻訳効率が低く、少量のタンパク質しか発現しないこと、これに対しΔ5型のmRNAはより効率的に翻訳される結果大量のタンパク質が発現すること、両アイソフォーム間でタンパク質の安定性に差はないことが明らかになった。

#### 4) マウス *APOBEC3* スプライスバリエーション発現調節機構の解明

マウス *APOBEC3* 遺伝子には系統間の多型があり、レトロウイルス感染抵抗性の系統は第5エクソンを欠損するΔ5トランスクリプトを高発現するが、感受性系統は第5エクソンを含む全長型mRNAを低レベルで発現する。本研究開始以前にマウス *APOBEC3* 遺伝子の第4エクソンから第5エクソンのゲノム塩基配列をB6マウスとBALB/cマウスで比較し、第4エクソン3'-末端のドナー配列には多型が無いこと、一方第5エクソン上流については、アクセプターサイトそのものに多型はないものの、その約30塩基対上流までの範囲に4塩基対の挿入/欠失多型と一塩基置換が存在することを見出していた。当該アクセプター配列上流部は、一次転写産物の分岐部、及び投げ縄配列として報告されているものと一致しており、その多型がスプライシング効率を左右している可能性があった。

この予測が正しいかどうかを検討するため、B6及びBALB/c由来 *APOBEC3* 遺伝子ゲノムクローンをを用い、試験管内スプライシング実験を行った。その結果、RNA分岐部位のT/C多型は第5エクソンの取り込みに全く影響を与えないこと、polypyrimidine tractを含む投げ縄構造中のTCCT反復数は、スプライシング効率に多少の影響を与えるが、第5エクソン取り込みの有無を決

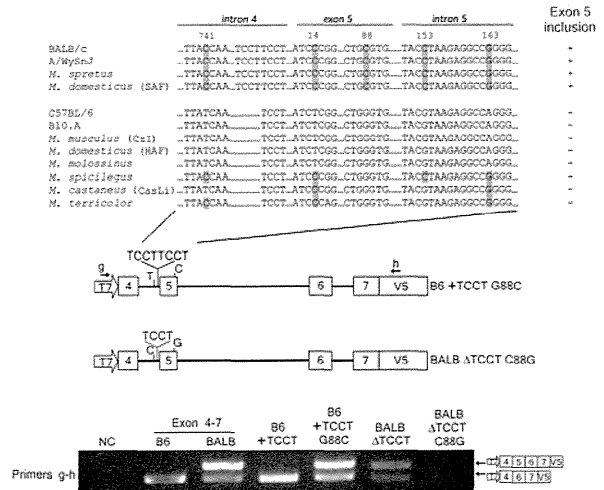


図3. マウス *APOBEC3* 第5エクソン周辺のゲノム塩基配列多型とmRNAへの第5エクソン取り込み。上段は実験室系のマウスと複数種の野生マウスにおける第5エクソン周辺のゲノム塩基配列と、cDNA解析による第5エクソン発現の有無をまとめたもの。野生種マウスの種名の後にある括弧内の名称は、それぞれの捕獲地を反映する。下段はゲノムDNAクローンをを用いた試験管内でのスプライシング実験の結果。

定的に変えるわけではないことが明らかとなった。

マウス *APOBEC3* mRNAへの第5エクソン取り込みの有無が、第4イントロン下流の分岐部位多型では決まらないことがわかったので、スプライシング制御部位探索の範囲をさらに下流の第5エクソンから第5イントロンに拡大した。第5イントロンのdeletion mutantsと相互入れ替えキメラから、第5エクソンを含む第5イントロン上流部がスプライシング効率決定に重要なことがわかった。そこで、絞り込まれた最小範囲内に存在する4つの単一塩基多型(SNPs)について、B6由来およびBALB/c由来対立遺伝子クローン間で相互置換を行った結果、驚くべきことに第5エクソン内のG/C SNPが、単独でこのエクソンのmRNAへの取り込みを制御していることが明らかとなった。実際、第5エクソンから第6エクソンを含むB6由来のゲノムクローンで、第5エクソン中の上記SNPをB6型のGからBALB/c型のCに置換すると、mRNAに第5エクソンが取り込まれた。さらに、第4エクソンから第7エクソンを含むB6由来のゲノムクローンで、上記第5エクソンのSNPをBALB/c型のCに置換し、同時に第4イントロン末端部にTCCT反復を追加すると、BALB/c由来ゲノムクローンの場合と全く同じ効率で、mRNAへの第5エクソン取り込みが起こった(図3)。

#### 5) 齧歯類進化過程における *APOBEC3* 多型

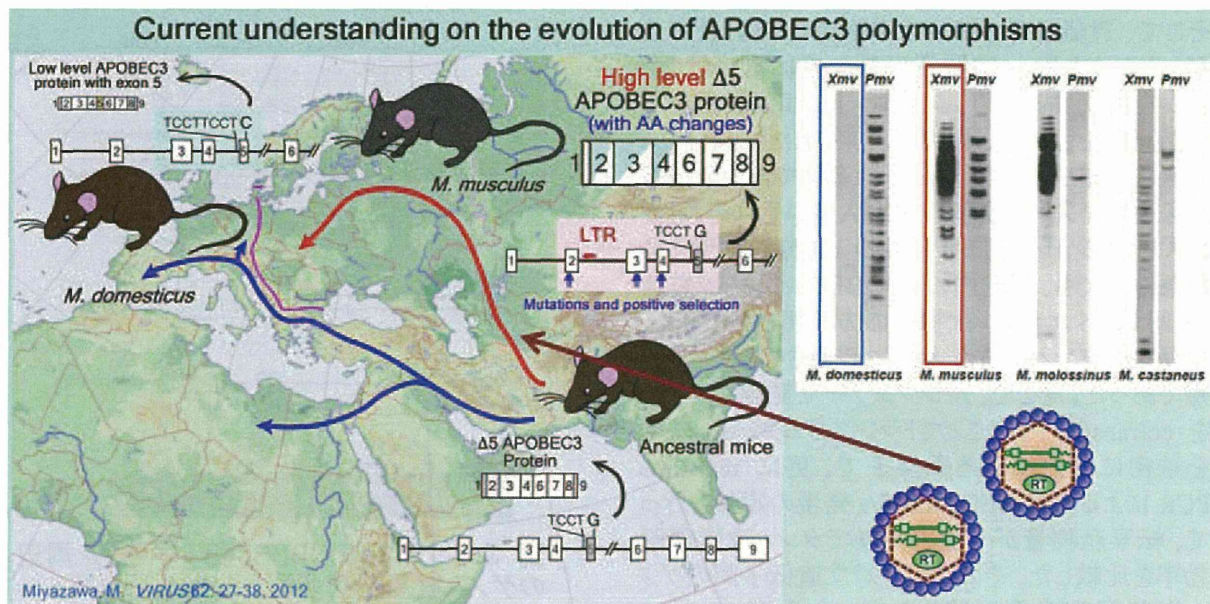


図 4. マウス *APOBEC3* 遺伝子多型の獲得と選択の過程 インド亜大陸に出現したマウスの祖先是、現在の低機能型 *d* アリル産物と同じ N-末端側アミノ酸配列を持ち、第5エクソンを欠く、祖先型 *APOBEC3* を発現していた。インド亜大陸からカスピ海東岸を経てシベリアへと拡散した集団(赤矢印)では、N-末端側ドメインにアミノ酸置換を伴う変異が繰り返し独立して起こり(小さな縦の矢印)、高機能なアミノ酸配列(水色)が選択された。また、これとは独立に第2イントロンへのレトロウイルス LTR 組込みが起こり、第5エクソンを欠く mRNA が高発現となった。一方、地中海沿岸を西進した集団では第4イントロンと第5エクソンに遺伝子変異が生じ(TCCT の反復と G/C 置換)、転写産物への第5エクソン取り込みが起こった。その結果、この集団では *APOBEC3* タンパク質の発現量が激減した。右半には、これら *M. musculus* と *M. domesticus* に代表される集団のゲノム DNA における、内在性異種指向性 (*Xmv*) 及び多指向性 (*Pmv*) レトロウイルス組み込みの違いを示す。(Kozak, C.A. *Retrovirology* 7:101, 2010)

#### の選択

4)で見出した、*APOBEC3* 遺伝子転写産物のスプライシング制御部位多型と、1)の N-末端側機能性アミノ酸配列多型が、マウスの進化の過程でどのように選択されて来たかを、宮澤らがゲノム DNA 及び cDNA の塩基配列解析により検討した。

インド亜大陸に出現したマウスの祖先は第5エクソンを発現しない祖先型遺伝子を持っていた。この祖先型 *APOBEC3* の N-末端側アミノ酸配列は、現在の低機能型アリル産物と同じであった(図4)。マウスの祖先がユーラシア大陸西部に分布を拡大していく際、カスピ海東岸を経てシベリアに分布していった一群は、図4に青い縦の小矢印で示す、N-末端側ドメインのアミノ酸配列多型をそれぞれ独立に獲得し、そのうち高機能型のアミノ酸配列に対して正の選択圧が加わった。また、これとは独立に、カスピ海沿岸を北上した集団の一部に第2イントロンへの異種指向性レトロウイルス LTR の組込みが起こり(図4に赤い水平の小矢印で示す)、これを獲得した群では、LTR のエンハンサー機能により、第5エクソンを欠く *APOBEC3* の発現が上昇した。

一方、地中海沿岸を西進して西ヨーロッパや北アフリカに分布した一群では、N-末端側のアミノ酸配列は祖先型のままに保たれ、第4イントロンと第5エクソンに遺伝子変異が生じて、発現産物に第5エクソンが取り込まれるようになった。その結果、昨年度示したように *APOBEC3* mRNA の翻訳効率が低下し、タンパク質発現量が著しく低下したと考えられた。

#### 6) 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5)。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

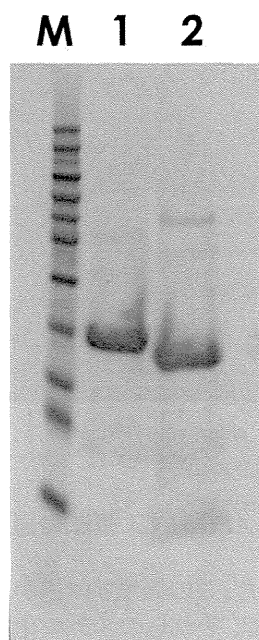


図 5. マウス APOBEC3 N-末端ドメイン (mA3 Z2) の精製 M: 分子量マーカー Lane 1: His-タグがついた状態 Lane 2: His-タグ切断後のイオン交換クロマトグラフィーにより精製された mA3 Z2.

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。

#### 7) 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ッシング阻害が起こることが観察された。同様のプロセッシング阻害は、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ッ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ッ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。

#### 8) 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。

#### 9) 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。

#### 10) 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。また、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。

#### 11) ヒト APOBEC3 によるゲノム DNA の修飾

高折は、ヒト APOBEC3A や APOBEC3B が AID と同様に、ヒト細胞でゲノムに変異を導入することを見出した。高折が現在までに検討したリンパ腫細胞株のなかでは、KIS1 細胞で APOBEC3B の発現が高く、APOBEC3B の発現が低い SUDHL-6 細胞より多くの変異が *cMYC* や *PAX5* に蓄積していることが判明した。さらに、SUDHL-6 細胞に APOBEC3B を過剰発現させることにより、新たな *cMYC* の変異が出現することを確認した。

#### 12) 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、健常人ドナーで 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。

#### 13) 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

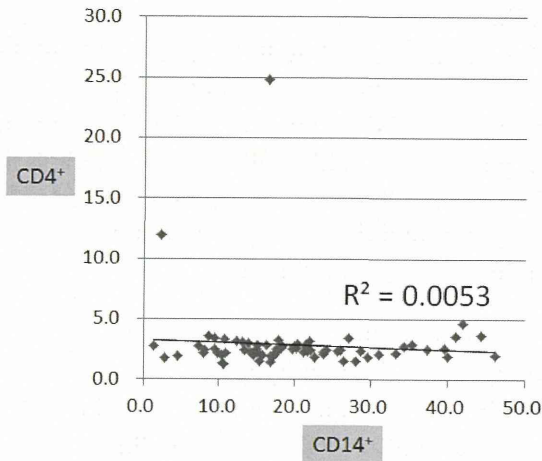


図 6. 北タイ集団における *APOBEC3G* 発現の I 型インターフェロン反応性の個人差

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  $\alpha$  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。

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6)、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 ( $p = 0.0522$ ,  $2 \times 3$  Kruskal-Wallis test)。

#### 14) *APOBEC3* 領域遺伝子発現における性差の検討

木村らは、92 種類のヒト B 細胞株を対象として *APOBEC3* 領域の遺伝子多型をタイピングし、これを参考にして、連鎖不平衡ブロック構造を決定

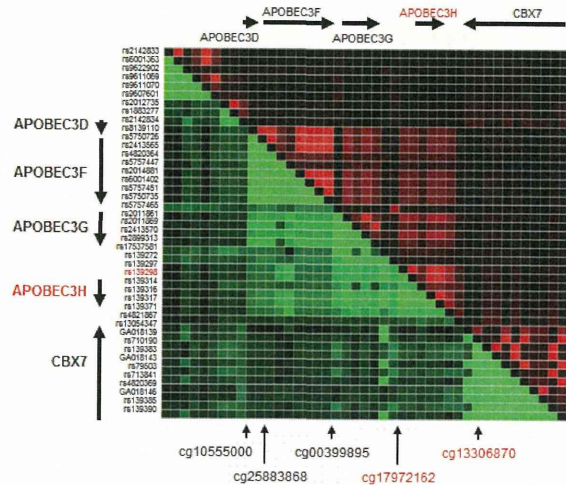


図 7. ヒト *APOBEC3* 領域の連鎖不平衡

した (図7)。また、この領域内の5か所の CpG アイランドについて、それらのメチル化の程度を検討するとともに、*APOBEC3D*, *-F*, *-G*, *-H* および *CBX7* の遺伝子発現量を検討した。その結果、個々の CpG サイトのメチル化とそれぞれの遺伝子の発現量との間には、明瞭な関連は認められなかった。そこで、これらの B 細胞株の XY 型を決定し、遺伝子発現量やメチル化における性差を検討した。

その結果、*APOBEC3H* の発現量に有意な性差 (男性の方が高値) が存在した。また、*APOBEC3H* の 5' 側に存在する cg17972162、および 3' 側に存在する cg13306870 で、メチル化の程度に有意な性差 (男性の方が高メチル化) が存在した。そこで、これら CpG サイトのメチル化と *APOBEC3H* 遺伝子発現との関連を検討したところ、cg17972162 のメチル化は *APOBEC3H* 発現と正の相関を、cg13306870 のメチル化は負の相関を示した。

#### 15) 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

木村はヒト *APOBEC3* 遺伝子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

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

我々は、マウス APOBEC3 の第4イントロンと第5エクソンに存在する遺伝子多型が、転写産物への第5エクソン取り込みの有無を介してタンパク質翻訳効率に影響を与え、第5エクソン発現型と欠損型の対立遺伝子を持つ個体間で、細胞内での APOBEC3 タンパク質発現量が大きく異なることを明らかにした。同一の APOBEC3 対立遺伝子の産物である全長型の cDNA と Δ5 cDNA をそれぞれトランスフェクションし、ほぼ等量の mRNA 発現を得ても、細胞内のマウス APOBEC3 タンパク質発現量及び出芽するウイルス粒子への取り込み量は Δ5 の方が明らかに高く、全長型のタンパク質は大量に発現させることが困難であることが以前から経験されていた。本研究で、mRNA 発現量が同等であっても全長型のマウス APOBEC3 mRNA は翻訳効率が低く、少量のタンパク質しか発現しないこと、これに対し Δ5 mRNA はより効率的に翻訳される結果大量のタンパク質が発現することが明らかとなった。実際、生体内での内因性 APOBEC3 タンパク質発現量も、Δ5 が主体である B6 マウスでは、全長型が主体の BALB/c に比較して、数倍高かった。このことから、APOBEC3 発現がタンパク質レベルで高くなれば、レトロウイルス感染に対する抵抗性を発揮するのではないかと予想される。マウス APOBEC3 の発現量とその抗ウイルス活性を左右することは、Susan Ross らが試験管内及び生体内の発現誘導実験によって証明している。また、最近同様の報告がアカゲザルを用いて SIV に対してなされており、そこでは Vif を発現する野生型 SIV の生体内複製に対しても、APOBEC3G/F の発現誘導が防御効果を示している点が注目される。我々も以前に、イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者におけるヒト APOBEC3G の発現を HIV-1 感染者や未感染健常者と定量的に比較し、曝露非感染者では、特に試験管内での I 型インターフェロンによる刺激後に、CD14 陽性単球での APOBEC3G 発現が HIV-1 感染者や対照健常人に比べ著しく高まることを報告している。従って、本研究で見出した第5エクソン取り込みの有無によるタンパク質翻訳効率の違いは、APOBEC3 タンパク質の高発現による HIV-1 感染抵抗性誘導を考える上で重要な知見である。

第5エクソン内のたった一つの SNP が、APOBEC3 遺伝子転写産物のスプライシングの有無を決定している機構は現時点では不明であるが、一つの可能性として、第5エクソンコード部分

の RNA がステムループ構造を形成しており、その安定性がこの SNP によって大きく影響されるのではないかと考えられる。

本研究ではさらに、第5エクソンの有無以外に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た。その結果、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となった。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、分子内で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。

一方、N-末端側アミノ酸配列多型の出現と選択の過程について、祖先型の APOBEC3 は現存の低機能型アリルと同じアミノ酸配列をコードしていたこと、カスピ海東岸を北上した集団では、N-末端側に複数の塩基置換がそれぞれ独立して繰り返して起こり、そのうち高機能型のアミノ酸配列に対して正の選択が加わった結果、現在の感染抵抗性アリルが生じたと考えられることが明らかとなった。興味深いことに、カスピ海東岸を北上した個体群のゲノム DNA には、内在性異種指向性レトロウイルス (*Xmv*) の組込みが多数認められるが(図4右側の赤い四角)、APOBEC3 分子 N-末端側のアミノ酸配列が祖先型のままに留まっている、地中海沿岸を西進した個体群には、内在性異種指向性レトロウイルスの組込みが検出されないことが知られている(図4右側の青い四角)。このことから、マウス APOBEC3 分子 N-末端側のアミノ酸配列多型に対して加わった選択圧の少なくとも一部は、異種生物に由来すると考えられる、異種指向性レトロウイルスによる感染の脅威であったと推測される。

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った。

我々は、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。

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。

高折らは、広くヒトの組織に発現している APOBEC3B がゲノムに変異を導入することを見出したが、通常では、たとえ APOBEC3B による塩基修飾が生じて、ヒト細胞内の DNA 修復機構によりゲノムの恒常性が維持されていると考えられる。しかし、ひとたび APOBEC3B の過剰発現や DNA 修復系の抑制が起これば、APOBEC3B が発癌遺伝子に変異を導入することでリンパ腫などの発症に関わる可能性が示唆される。APOBEC3 は抗ウイルスタンパク質であり、その AIDS 治療への応用が期待されているが、APOBEC3 の過剰発現は、宿主ゲノムの修飾を介して発癌を引き起こす可能性もあり、慎重な検討が必要である。

高折らによるこの発見は、宮澤らが示した、外来性レトロウイルスの脅威が少ない条件下では、APOBEC3 発現量が低下するような遺伝子変異に正の選択圧が加わるという結論と良く符合する。

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

生理的な同種由来レトロウイルス複製制限因子であるマウス APOBEC3 の、機能的遺伝子多型について、第5エキソン取り込みの有無を決定する機構と、第5エキソンの機能的役割に続いて、N-末端側アミノ酸配列多型の機能的意味と、タンパク質立体構造上における多型残基存在部位の配置を明らかにした。得られた結果は、デアミナーゼ共通配列より遥かに N-末端寄りの3残基が、レトロウイルス複製抑制機能に決定的な影響を与えること、それら機能残基はデアミナーゼ活性中心から離れて、N-末端ドメインの一つの面に集まって存在することを示していた。また、これら機能的多型残基にはマウスの進化上正の選択圧が加わっており、この選択の要因は、恐らく異種生物に由来すると考えられる、異種指向性レトロウイルスの反復感染であると考えられた。また、外来性ウイルスの脅威が少ない条件下では、APOBEC3 の発現が低下するような遺伝子型が進化上有利になると考えられたが、実際ヒト APOBEC3 の高発現は、ゲノム DNA の変異を通じて発がんに関わることを明らかにした。

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。また、APOBEC3H 多型は、生体における HIV/AIDS 制御に寄与することを明らかにした。

#### 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<sup>+</sup> T cell differentiation. *PLoS Pathogens*10: e1003937, 2014.

2) Tsuji-Kawahara, S. and M. Miyazawa. Elimination of Friend retrovirus in the absence of CD8<sup>+</sup> 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- $\gamma$ -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 D<sub>3</sub> 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 $\beta$  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 $\beta$  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<sup>+</sup> myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D. *J. Immunol.* **191**: 3152-60, 2013.

16) Chonabayashi, K., M. Hishizawa, S. Kawamata, Y. Nagai, T. Ohno, T. Ishikawa, T. Uchiyama, and A. Takaori-Kondo. Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. *Leukemia* **27**: 1433-1436, 2013.

17) 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.

18) 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.

19) 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.

20) 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.

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.

22) Miyazawa, M., K. Okubo, K. Shiraki, M. Maruyama, J. Yamada, and H. Yamada. Immunological approaches for healthy longevity. *Anti-Aging Medicine* **9**: 43-50, 2012.

23) Yoshimoto, N., Y. Sakamaki, M. Haeta, A. Kato, Y. Inaba, T. Itoh, M. Nakabayashi, N. Ito, and K. Yamamoto. Butyl pocket formation in the vitamin D receptor strongly affects the agonistic or antagonistic behavior of ligands. *J. Med. Chem.* **55**: 4373-4381, 2012.

24) Shinohara, M., K. Io, K. Shindo, M. Matsui, T. Sakamoto, K. Tada, M. Kobayashi, N. Kadowaki, and A. Takaori-Kondo. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base

substitutions in genomic DNA in human cells. *Scientific Reports* **2**:806, 2012.

25) Matsunaga, S., T. Sawasaki, H. Ode, R. Morishita, A. Furukawa, R. Sakuma, W. Sugiura, H. Sato, M. Katahira, A. Takaori-Kondo, N. Yamamoto, and A. Ryo. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J. Proteomics* **75**: 4863-4873, 2012.

26) Furukawa, A., H. Okamura, R. Morishita, S. Matsunaga, N. Kobayashi, T. Ikegami, T. Kodaki, A. Takaori-Kondo, A. Ryo, T. Nagata, and M. Katahira. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**:284-289, 2012.

27) Ohtani, H., T. K. Naruse, Y. Iwasaki, T. Ishida, H. Akari, T. Matano, and A. Kimura. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenet.* **64**:669-678, 2012.

28) Nomura, T., K. Terahara, H. Yamamoto, T. Shiino, N. Takahashi, T. Nakane, N. Iwamoto, H. Ishii, T. Tsukamoto, M. Kawada, S. Matsuoka, A. Takeda, K. Terahara, Y. Tsunetsugu-Yokota, N. Iwata-Yoshikawa, H. Hasegawa, T. Sata, T. K. Naruse, A. Kimura, and T. Matano. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J. Virol.* **86**:6481-6490, 2012.

29) Takahashi, N., T. Nomura, Y. Takahara, H. Yamamoto, T. Shiino, A. Takeda, M. Inoue, A. Iida, H. Hara, T. Shu, M. Hasegawa, H. Sakawaki, T. Miura, T. Igarashi, Y. Koyanagi, T. K. Naruse, A. Kimura, and T. Matano. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS One* **8**:e54300, 2013.

30) Sharma, G., H. Ohtani, G. Kaur, T. K. Naruse, S. K. Sharma, M. Vajpayee, A. Kimura, and N. K. Mehra. Status of TIM-1 exon 4 haplotypes and CD4<sup>+</sup> T cell counts in HIV-1 seroprevalent north Indians. *Hum. Immunol.* **74**:163-165, 2013.

31) Sapsutthipas, S., N. Tsuchiya, P. Pathipavanich, K. Ariyoshi, P. Sawanpanyalert, N. Takeda, P. Isarangkura-na-ayuthaya, and M. Kameoka. CRF01\_AE-specific neutralizing activity observed in plasma derived from HIV-1-infected Thai patients residing in northern Thailand: comparison of neutralizing breadth and potency between plasma derived from rapid and slow progressors. *PLoS One*

**8**:e53920, 2013.

32) Mori, M., K. Matsuki, T. Maekawa, M. Tanaka, B. Sriwanthana, M. Yokoyama, and K. Ariyoshi. Development of a novel in silico docking simulation model for the fine HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitope mapping. *PLoS One* **7**:e41703, 2012.

33) Sriwanthana, B., M. Mori, M. Tanaka, S. Nishimura, T. Miura, P. Pathipvanich, P. Sawanpanyalert, and K. Ariyoshi. The effect of HLA polymorphisms on the recognition of Gag epitopes in HIV-1 CRF01\_AE infection. *PLoS One* **7**:e41696, 2012.

34) Tsuchiya, N., P. Pathipvanich, A. Rojanawiwat, N. Wichukchinda, I. Koga, M. Koga, W. Auwanit, P. E. Kilgore, K. Ariyoshi, and P. Sawanpanyalert. Chronic hepatitis B and C co-infection increased all-cause mortality in HAART-naive HIV patients in northern Thailand. *Epidemiol. Infect.* **1**:1-9, 2012.

35) Li, J., Y. Hakata, E. Takeda, Q. Liu, Y. Iwatani, C. A. Kozak, and M. Miyazawa. Two genetic determinants acquired late in *Mus* evolution regulate the inclusion of exon 5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathog.* **8**: e1002478, 2012.

36) Tamashiro, T., Y. Tanabe, T. Ikura, N. Ito, N., and M. Oda. Critical roles of Asp270 and Trp273 in the  $\alpha$ -repeat of the carbohydrate-binding module of endo-1,3- $\beta$ -glucanase for laminarin-binding avidity. *Glycoconj. J.* **29**: 77-85, 2012.

37) Nomura, W., A. Masuda, K. Ohba, A. Urabe, N. Ito, A. Ryo, N. Yamamoto, and H. Tamamura. Effects of DNA binding of zinc finger and linkers for domain fusion on catalytic activity of sequence-specific chimeric recombinases determined by a facile fluorescent system. *Biochemistry* **51**: 1510-1517, 2012.

38) Saito, Y., T. K. Naruse, H. Akari, T. Matano, and A. Kimura. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* **64**: 131-141, 2012.

39) Takaki, A., A. Yamazaki, T. Maekawa, H. Shibata, K. Hirayama, A. Kimura, H. Hirai, and M. Yasunami. Positive selection of Toll-like receptor 2 polymorphisms in two closely related old world monkey species, rhesus and Japanese macaques. *Immunogenetics* **64**: 15-29, 2012.

40) Ishii, H., M. Kawada, T. Tsukamoto, H. Yamamoto, S. Matsuoka, T. Shiino, A. Takeda, M. Inoue, A. Iida, H. Hara, T. Shu, M. Hasegawa, T. K. Naruse, A. Kimura, M. Takiguchi, and T. Matano. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J. Virol.* **86**:

738-745, 2012.

41) Sironi, M., F. R. Guerini, C. Agliardi, M. Biasin, R. Cagliani, M. Fumagalli, D. Caputo, A. Cassinotti, S. Ardizzone, M. Zanzottera, E. Bolognesi, S. Riva, Y. Kanari, M. Miyazawa, and M. Clerici. An evolutionary analysis of *RAC2* identifies haplotypes associated with human autoimmune diseases. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 3319-3329, 2011.

42) Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. Natural killer cells recognize Friend retrovirus-infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions in vivo. *J. Virol.* **85**: 5423-5435, 2011.

43) Hayasaka, N., K. Aoki, S. Kinoshita, S. Yamaguchi, J. K. Wakefield, S. Tsuji-Kawahara, K. Horikawa, H. Ikegami, S. Wakana, T. Murakami, R. Ramabhadran, M. Miyazawa, and S. Shibata. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in *Rgs16* knockdown mice. *PLoS ONE* **6**: e17655, 2011.

44) Fujita, H., T. Kitawaki, T. Sato, T. Maeda, S. Kamihira, A. Takaori-Kondo, and N. Kadowaki. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. *Eur. J. Immunol.* **43**:93-103, 2011.

45) Nomura, W., N. Ohashi, Y. Okuda, T. Narumi T. Ikura, N. Ito, H. and Tamamura. Fluorescence-quenching screening of protein kinase C ligands with an environmentally sensitive fluorophore *Bioconjugate Chem.* **22**: 923-930, 2011.

46) Fujii, S., H. Masuno, Y. Taoda, A. Kano, A. Wongmayura, M. Nakabayashi, N. Ito, M. Shimizu, E. Kawachi, T. Hirano, Y. Endo, A. Tanatani, and H. Kagechika. Boron cluster-based development of potent non-secosteroidal vitamin D receptor ligands: Direct observation of hydrophobic interaction between protein surface and carborane. *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 20933-20941, 2011.

47) Ohtani, H., T. Nakajima, H. Akari, T. Ishida, and A. Kimura. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* **63**: 417-428, 2011.

48) Chen, Z., T. Nakajima, Y. Inoue, T. Kudo, M. Jibiki, T. Iwai, and A. Kimura. A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of *MyD88* gene is associated with Buerger disease but not with Takayasu arteritis in Japanese. *J. Hum. Genet.* **56**: 545-547, 2011.

49) Takahara, Y., S. Matsuoka, T. Kuwano, T. Tsukamoto, H. Yamamoto, H. Ishii, T. Nakasone, A. Takeda, M. Inoue, A. Iida, H. Hara, T. Shu, M. Hasegawa, H. Sakawaki, M. Horiike, T. Miura, T. Igarashi, T. K. Naruse, A. Kimura, and T. Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**: 615-619, 2011.

50) Naruse, T. K., Y. Okuda, K. Mori, H. Akari, T. Matano, and A. Kimura. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* **63**: 501-509, 2011.

51) Nakamura, M., Y. Takahara, H. Ishii, H. Sakawaki, M. Horiike, T. Miura, T. Igarashi, T. K. Naruse, A. Kimura, T. Matano, and S. Matsuoka. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol. Immunol.* **55**: 768-773, 2011.

52) Takahashi, M., Z. Chen, K. Watanabe, H. Kobayashi, T. Nakajima, A. Kimura, and Y. Izumi. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms associated with aggressive periodontitis in Japanese. *Open Dent. J.* **5**: 190-194, 2011.

53) Mori, M., B. Sriwanthana, N. Wichukchinda, C. Boonthimat, N. Tsuchiya, T. Miura, P. Pathipvanich, K. Ariyoshi, and P. Sawanpanyalert. Unique CRF01\_AE Gag CTL Epitopes Associated with Lower HIV-Viral Load and Delayed Disease Progression in a Cohort of HIV-Infected Thais. *PLoS One* **6**: e22680, 2011.

54) Rojanawiwat, A., N. Tsuchiya, P. Pathipvanich, W. Pumpradit, W. P. Schmidt, S. Honda, W. Auwanit, P. Sawanpanyalert, and K. Ariyoshi. Impact of the National Access to Antiretroviral Program on the incidence of opportunistic infections in Thailand. *International Health* **3**: 101-107, 2011

## 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 正顕, 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,