

慢性的免疫活性化制御因子の機能解析

研究分担者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
研究協力者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 助教
研究協力者 三沢 尚子 京都大学ウイルス研究所 技術補佐員

研究要旨：

抗ウイルス宿主因子である APOBEC3G(A3G) と APOBEC3F(A3F)に結合活性を消失させたそれぞれの部位特異的 Vif 変異 HIV-1 のヒト化マウスへの接種実験を行った。A3G と A3F の変異塩基隣接配列が異なるために、ウイルス抑制活性とウイルス遺伝子変異誘導によるウイルス機能変換活性それぞれは量的な差異があることがわかった。その結果、A3F は抗ウイルス因子であるとともにウイルス遺伝子変異誘導因子ともなることを実証した。慢性的な免疫活性化が生じ、その発現が誘導される A3F は両義的機能を発揮することが示唆される。

A. 研究目的

慢性疾患である HIV 感染症において、細胞の活性化やインターフェロン作用に伴って誘導され、そして、強力な抗 HIV-1 活性を示す APOBEC3 (A3) は、一方で遺伝子変異誘導蛋白質であり、それによって挿入される G A 変異が、ウイルス遺伝子の多様化 (diversification) を促進するという仮説がある。培養細胞を用いた研究から、特に A3F と A3G は、HIV-1 粒子に取り込まれ、ウイルスゲノムに G A 変異を挿入する。一方、HIV-1 アクセサリ蛋白質のひとつである Vif は、ユビキチン-プロテアソーム経路依存的に A3 を分解し、そのウイルス粒子への取り込みを阻害する。しかしながら、HIV-1 感染者における増殖過程において、(1) 内在的に発現する A3 が抗 HIV-1 活性を示すのか; (2) A3 による G A 変異は HIV-1 の多様化 (diversification) に影響を与えるのか、についてはこれまで不明であった。本研究では、内在性 A3 が個体内における HIV-1 感染に与える影響を解明し、細胞性因子がウイルスの増殖過程だけでなく、その多様化に対する影響を明らかにすることを目的として、

HIV-1 感染ヒト化マウスモデルを用いた実験を行った。

B. 研究方法

CCR5 指向性 HIV-1 (NLCSFV3 株) 野生型、A3G を分解できない変異体 Vif をコードする 4A HIV-1、A3F を分解できない変異体 Vif をコードする 5A HIV-1、両者を分解できない変異体 Vif をコードする 4A5A HIV-1 をそれぞれ作製し、そのウイルスをヒト化マウスに接種した。ヒト化マウスはヒト血液幹細胞を移植した NOG マウスである。血漿ウイルス RNA 量を real-time RT-PCR 法で、血中 CD4 陽性 T 細胞数を flow cytometry/hematometry 法で経時的に定量した。また、感染後 6 週齢のマウスを解剖し、脾臓におけるプロウイルス DNA 配列を PCR 法で、血漿中のウイルス RNA 配列を RT-PCR/single genome sequencing 法でそれぞれ解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の試料として提供者の同意のもとに採取を行い、その利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。京都大学の医の倫理委員会承認済みである。実験動物に対す

る動物愛護上の配慮を考慮した実験計画は京都大学動物委員会承認済みである。組換えDNA実験についても、P3レベルの物理的封じ込めの必要な大臣確認実験も含め承認済みである。

C. 研究結果

4A HIV-1 および 5A HIV-1 のヒト化マウスにおける増殖効率は、野生型 HIV-1 に比して有意に低く、5A HIV-1 の増殖効率は、4A HIV-1 に比して有意に低かった。また、プロウイルス DNA 配列を解析した結果、4A HIV-1 感染マウスでは GA AA 変異が顕著に観察されたのに対し、5A HIV-1 ならびに 4A5A HIV-1 感染マウスでは GG AG 変異が顕著に観察された。さらに興味深いことに、血漿中のウイルス RNA 配列は、脾臓のプロウイルス DNA で観察された変異パターンと異なっており、4A HIV-1 の多様性は、野生型 HIV-1 および 5A HIV-1 のそれに比べ、統計的に有意に高かった(図 2)。さらに、CXCR4 を補受容体とするウイルスが、4A HIV-1 感染マウス特異的に出現していることがわかった。

D. 考察

生体内 HIV-1 増殖過程において、CD4 陽性 T 細胞に内在的に発現する A3F と A3G が共に抗ウイルス活性を示すこと、A3G の抗ウイルス活性は A3F のそれよりも強力であることが示唆された。A3F 依存性 G A 変異は、ウイルスの多様化、そしてウイルスの機能的進化を促進しうるということが強く示唆された。

E. 結論

慢性的免疫活性化によって誘導される A3F がウイルス抑制作用以外に多様性促進というウイルスの変化を惹起することがわかった。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て京都大学ウイルス研究所で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、動物委員会、組換え

DNA 委員会の規定に基づき、すべて P3 実験施設で行われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato, K., Takeuchi, J.S., Misawa, N., Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo A., Hu, W.-S., Aihara, K., Ito, M., An, D.S., Pathak, V.K., Koyanagi, Y. APOBEC3D and APOBEC3F potently promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. *PLOS Pathog.* 10:e1004453, 2014.
- 2) Ebina, H., Kanemura, Y., Misawa, N., Sakuma, T., Kobayashi, T., Yamamoto, T., Koyanagi, Y. A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. *PLoS One*, *in press*.

2. 学会発表

- 1) Sato, K., Shibata, J., Izumi, T., Misawa, N., Kobayashi, T., Kimura, Y., Ito, M., Pathak, V. K., Koyanagi, Y. APOBEC3F potently promotes HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, May, 2014.
- 2) 蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫。ゲノム編集法のエイズ治療への展望。第 16 回白馬シンポジウム、熊本、2014 年 6 月。
- 3) Koyanagi Y., Misawa N., Sato K., Ebina H., HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA. 9th International Symposium of the Institute Network, Osaka. June, 2014.
- 4) Koyanagi, Y., Sato, K., Conflicts and benefits between primate lentiviruses and host restriction factors, 15th Kumamoto AIDS Seminar (invited), Kumamoto, Japan, October, 2014.
- 5) 佐藤佳, 竹内(柴田)潤子, 小林朋子, 三沢尚子, 山田英里, 中野雄介, 吉川祿助, 小柳義夫。ヒト化マウスモデルを用いたエイズウイルス適応進化メカニズムの解明, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

なし

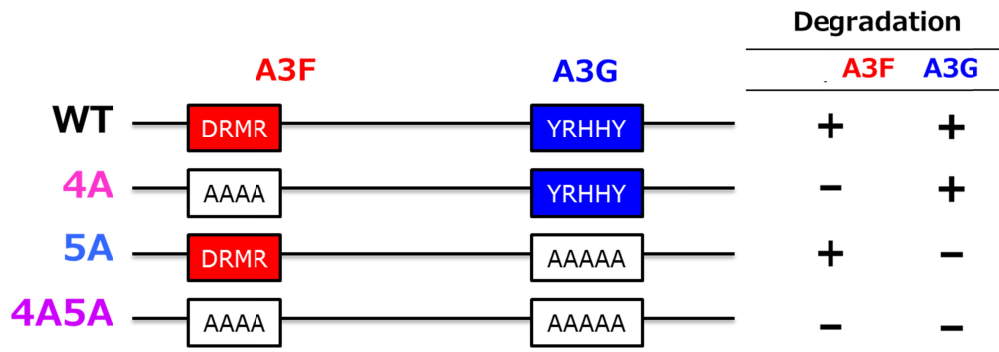


図1. 部位特異的 Vif 変異 HIV-1

A3Gを分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 4A、A3Fを分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 5A、A3F と A3G 両者を分解できない変異体 Vif をコードする 4A5A HIV-1 を作製した。

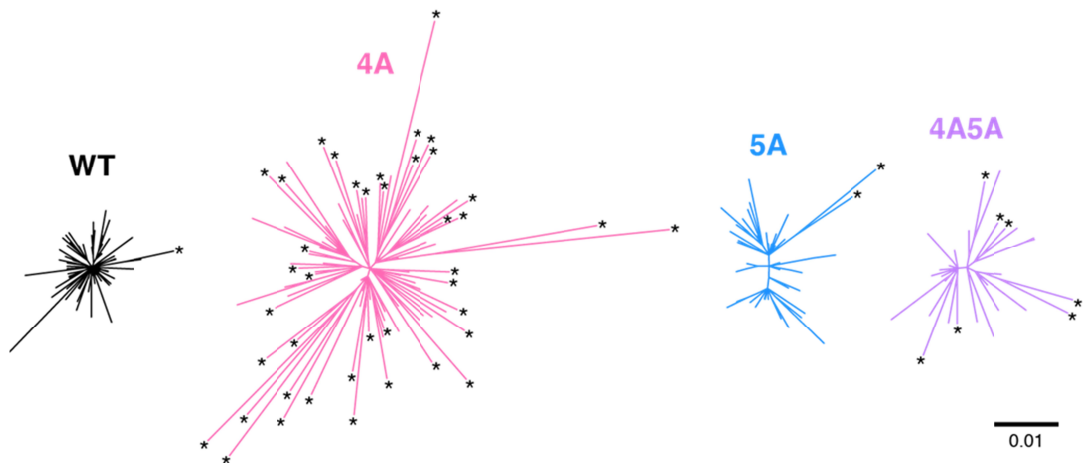


図2. ヒト化マウスで増殖するウイルス遺伝子配列の多様性比較.

A3F の影響を受けるウイルス(4A, 図中ピンク)は、野生型のウイルス(WT, 図中黒)や A3G の影響を受けるウイルス(5A, 図中青)に比べて顕著に多様化していた。