

**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 25 年度 総括・分担研究報告書**

研究代表者 宮澤 正顯

(近畿大学医学部)

平成 26 年 3 月



# 目 次

## ・ 総括研究報告書

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

## ・ 分担研究報告書

### 1. 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

### 2. ヒト APOBEC3GZ2 ドメインの比較構造・機能解析

研究分担者： 高折 晃史

### 3. マウス APOBEC3 多型がタンパク質立体構造に与える影響の解析

研究分担者： 伊藤 暢聡

### 4. 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

### 5. ヒト APOBEC3 遺伝子の機能性多型の探索

研究分担者： 木村 彰方

## ・ 研究成果の刊行に関する一覧表



## 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。我々は昨年度までに、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って、翻訳に干渉する第5エキソンを含まないこと、N-末端側の機能性多型と第5エキソン獲得とは独立に起こり、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。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。一方、高折はヒト APOBEC3 の高発現がゲノム DNA の修飾に繋がることを明らかにしたが、APOBEC3 発現と乳癌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 遺伝子多型の HIV 感染/エイズ発症感受性・抵抗性への寄与は人種・民族で異なるが、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。また、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が明らかとなり、CD14 陽性単球における APOBEC3G 発現量と HIV-1 曝露感染状態とに有意な相関は見出せなかったものの、高発現個体に HIV-1 感染者がないことから、以前宮澤らが報告した単球における APOBEC3G 高発現と曝露非感染状態との相関が、タイ検体でも裏打ちされた。

### 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）

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-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転写レベルでもタンパク質レベルでも発現量が高く、その産物が第5エキ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

### 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

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エキソンの有無とが 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エキ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/エイズ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/エイズ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イルス複製制限機構の分子実体は、未だに明らかでない。

本年度は、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

用について明確な証拠を得たが、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。また、高折、木村、有吉は、引き続きヒト APOBEC3 遺伝子群の多型と HIV 感染/エイズ発症抵抗性、及び発症との関連を解明することを目指した。

## 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

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 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

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。

### 3) 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。

### 4) マウス APOBEC3 N-末端側 Z2 ドメインの精製と結晶化条件の探索

伊藤は昨年度までに、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たが、発現量や非特異的切断などの問題があった。そこで、今年度は発現条件や精製条件の見直しを行った。

また、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持つと考えられ (実際 mA3 Z2 は陽イオン交換樹脂に結合する)、これが結晶化に悪影響を与えている可能性を考え、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。

#### 5) 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。

#### 6) 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。

#### 7) 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 5) 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。

#### 8) ヒト APOBEC3B による細胞ゲノム DNA 変異誘導と発癌の関係の解析

高折は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。

#### 9) 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)、MXI (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。

#### 10) 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、バイサルファイト修飾法により分析した。

#### 11) 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

両機関で倫理審査委員会の承認を得た。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得た(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 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とを用いた 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

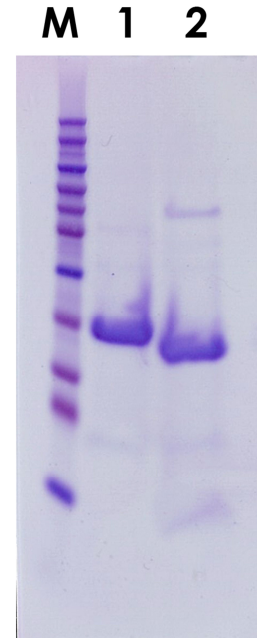


図 1. マウス APOBEC3 N-末端ドメイン (mA3 Z2) の精製 M: 分子量マーカー Lane 1: His-タグがついた状態 Lane 2: His-タグ切断後のイオン交換クロマトグラフィーにより精製された mA3 Z2.

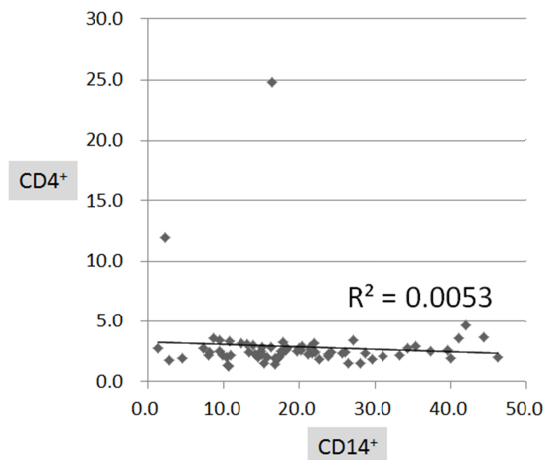
*APOBEC3* との結合は、C-末端側の 40 アミノ酸残基を除いても保たれるが、それ以上の欠失を加えると観察されなくなった。

#### 4) 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再検討を行った結果、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1)。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。



**図 2. 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。

### 5) 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。

### 6) 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

現状では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。

### 7) 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

両者を共発現した大腸菌を破碎し、遠心後の上清より mA3 Z2 とウイルス側因子をそれぞれのタグによりアフィニティ精製したものを SDS-PAGE で調べたところ、通常の CBB 染色では明確にもう一方のタンパク質の結合を示すバンドは見られなかった。そこで、抗体によるブロッキングを行った結果、mA3 Z2 とウイルス側因子が共精製されたことを示唆するバンドが見られた。

### 8) 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、健康人ドナーで 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。

### 9) 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

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 2)、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)。

### 10) 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 エキソン近傍に 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 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 陽性単球様の表現型を示すヒト白血病細胞株 THP-1 の DNA を用いた解析で、APOBEC3G 遺伝子の CpG アイランドがどの細胞種においてもシトシンメチル化を受けていないことに加え、CpG アイランドの上流側隣接領域に、細胞種によってシトシンメチル化レベルの異なる塩基が存在することが明らかとなった。

今後、北タイ集団を対象として *APOBEC3G* 遺伝子のシトシンメチル化レベルと組織特異的遺伝子発現とを関連付けられるかを検討する。

### 11) 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

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能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、患者集団と健康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

<i>APOBEC3H</i> 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康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	%健康対照 2n=462	%HIV患者 2n=382	OR	p
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	%健康対照 2n=674	%HIV患者 2n=472	OR	p
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に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	%健康対照 2n=462	%LTNP 2n=186	OR	p
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

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。

昨年度まで、我々は精製用の His-タグを持ったままの mA3 Z2 試料を用いて結晶化条件の検討を行ってきた。比較的分子量の低い mA3 Z2 において、His-タグの負の影響は大きいと考え、その除去を行ったが結晶を得ることはできなかった。mA3 Z2 の中にしっかりした立体構造を持たない部分がある可能性が考えられるほか、mA3 が核酸結合蛋白質であることから、表面電荷の分布特性などが結晶化の障害となっている可能性がある。今後、変異の導入や特異的抗体フラグメントなどの共結晶化などの検討が必要となる。その意味では、mA3 と相互作用する他の蛋白質との共結晶化も重要となる。

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。

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エクソン近傍に

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

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。APOBEC3H 多型は、生体における HIV/AIDS 制御に寄与する。

## 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) 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.

17) 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.

18) 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.

19) 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.

20) 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.

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.

## 2. 学会発表

1) 本園 千尋, J. J. Miles, Z. Hasan, 湯永 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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.

6) Matsui, Y., K. Shindo, K. Nagata, K. Io, M. Shinohara, R. S. Harris, and A. Takaori-Kondo. Identification of a novel region of HIV-1 Vif to

interact with CBF $\beta$ . **Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses**. May 20-25, 2013. Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

7) 吉永 則良, 松井 佑亮, 新堂 啓祐, 武田 俊一, 高折 晃史. HIV-1複製に関与するDNA修復系宿主因子の探索. **第27回日本エイズ学会学術集会**. 2013年11月20-22日, 熊本.

8) Ito, N. Structure Deposition at PDBj. **OIST/CCP4 Workshop**, November 4-9, 2013. Onna, Okinawa.

9) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. プロリン異性化反応がタウタンパク質の凝集を阻害する. **第13回日本蛋白質科学会年会**. 2013年6月12-14日, 鳥取.

10) 沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 伊藤 暢聡, 福森 義宏, 三木 邦夫. 巨大ヘモグロビン結晶中での酸素結合状態の操作. **日本結晶学会2013年度年会**, 2013年10月12-13日, 熊本.

11) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. タウタンパク質に対するPin1のプロリン異性化活性を測定するための新しい方法. **第51回日本生物物理学会年会**, 2013年10月28-30日, 京都.

12) 品川 健朗, 沼本 修孝, 鏑田 武志, 伊藤 暢聡. CD72の構造解析に向けて. **第51回日本生物物理学会年会**, 2013年10月28-30日, 京都.

13) 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.

14) 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.

15) 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.

16) 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.

17) 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.

18) 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.

19) 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

## 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。

#### 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。

### 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。

## 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.

### 2. 学会発表

- 1) 本園 千尋, J. J. Miles, Z. Hasan, 湯永 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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



# ヒト APOBEC3GZ2 ドメインの比較構造・機能解析

研究分担者 高折 晃史 (京都大学医学研究科 教授)

**研究要旨** 我々は昨年度に APOBEC3B がヒトゲノムに変異を導入しうる能力があることを報告したが、APOBEC3B が発癌に寄与しているかどうかは明らかでない。そこで、乳がん患者において APOBEC3B 遺伝子の欠損が見られるかどうかを末梢血から抽出したゲノムを用い、PCR 法により検討した。APOBEC3B 遺伝子ホモ欠損の割合は乳がん患者と健常人に有意な差は見られず、APOBEC3B は乳がん発症の必須因子ではないと考えられる。

## A. 研究目的

我々は APOBEC3B がヒトゲノムに変異を導入しうる能力があることを報告したが (Shinohara *et al.* Scientific Reports 2012)、APOBEC3B が発癌に寄与しているかどうかは明らかでない。一方、APOBEC3B 遺伝子を欠損している人が日本にも約 10% 存在することが知られている。そこで、乳がんの発症に APOBEC3B が関与しているかどうかを検討した。

## B. 研究方法

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、健常人ドナーから抽出したゲノム DNA を用いた。

### 【倫理面への配慮】

本研究では、ヒトの遺伝子を解析するため、施設の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遺伝解析を行った。

## C. 研究結果

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。この頻度は、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な差はなかった。

## D. 考察

我々のデータは APOBEC3B のホモ欠損患者においても乳がんは健常人同様の頻度で発症することを示唆しており、APOBEC3B が乳がん発症の必須因子ではないと考えられる。しかし、悪性リンパ腫など、他の悪性腫瘍の発症に関わっているかなど、さらなる研究が必要である。

## E. 結論

乳がん患者検体を用いた検討では、APOBEC3B は乳がんの発症には必須ではないことが示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

7) 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.

## 2. 学会発表

1) Matsui, Y., K. Shindo, K. Nagata, K. Io, M. Shinohara, R. S. Harris, and A. Takaori-Kondo. Identification of a novel region of HIV-1 Vif to

interact with CBF $\beta$ . **Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses.** May 20-May 25, 2013. Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

2) 吉永 則良、松井 佑亮、新堂 啓祐、武田 俊一、高折 晃史 HIV-1 複製に關与する DNA 修復系宿主因子の探索. **第27回日本エイズ学会 学術集会.** 2013 年 11 月 20-22 日, 熊本.

## G. 知的所有權の出願・取得状況(予定を含む) 該当なし。

# マウス APOBEC3 多型がタンパク質立体構造に与える影響の解析

伊藤 暢聡（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

**研究要旨** マウスのレトロウイルスに対する生理的抵抗因子である APOBEC3 分子には多型が存在し、レトロウイルス抵抗性に差異を生じている。この多型がタンパク質の立体構造に与える影響や、立体構造上の変化と抵抗性との関連など、この現象の分子構造からの理解はなされていない。これらの点を解明するために、X線結晶解析によるマウス APOBEC3 分子の構造解析をめざし、ウイルスの複製抑制活性に関与している N-末端側ドメインの立体構造解析を目的に、結晶化条件の探索を行った。また、APOBEC3 の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に関与する因子 X と APOBEC3 との相互作用の解析を目指して、因子 X の発現・精製の構築、表面プラズモン共鳴による相互作用の同定、大腸菌における共発現系の構築などに着手した。

## A. 研究目的

マウスはレトロウイルスに対する生理的抵抗因子として APOBEC3 (mA3)を持っているが、その遺伝子には多型が存在し、ウイルスに対する自然抵抗性と密接に関連している。

APOBEC3 ファミリーは Z1, Z2, Z3 の3種類の Z ドメインの組み合わせとして構成されているが、mA3 は N 末端側の Z2 ドメインと C 末端側の Z3 ドメインからなる。このうち N 末端側 Z2 ドメイン (mA3-N) がデアミナーゼ活性およびウイルス抵抗性に関与していることが明らかになっている。このドメインはヒトの APOBEC3G の N 末端側 Z2 ドメインと相同であるため、mA3-N のウイルス抑制機能に関する知見はヒト APOBEC3G と HIV-1 の関係にも重要な知見を与えうると考えられる。

一方、宮澤らは mA3 の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に関連して、mA3 と相互作用する蛋白質因子 X を同定したが、その相互作用の詳細は不明である。

本研究では、mA3-N の立体構造を X 線結晶解析により決定し、多型が立体構造に与える影響を明らかにすることを目指した。さらに、因子 X と mA3 の相互作用を溶液中で定量的に解析する系の確立にも着手した。

なお、因子 X とその周辺実験については、原著論文投稿および特許出願前であるので、詳細は記載しない。

## B. 研究方法

### 1) マウス APOBEC3 アミノ末端側 Z ドメインの精製と結晶化条件の探索

昨年度までに、アミノ末端に精製用の His-tag タグを持ち、かつこのタグをプロテアーゼで除去で

きる系を大腸菌で確立したが、発現量や非特異的切断などの問題があった。そこで、発現条件や精製条件の見直しを行った。

また、mA3 は核酸に結合するため表面に正電荷を多くと持つと考えられ(実際 mA3-N は陽イオン交換樹脂に結合する)、これが結晶化に悪影響を与えている可能性を考え、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。

得られた野生型またはメチル化された mA3-N 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。

### 2) 因子 X の発現と精製

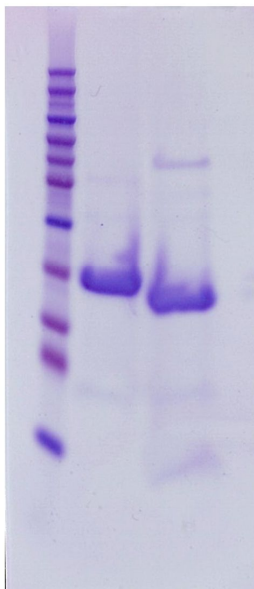
mA3 との相互作用の詳細かつ定量的な解析のためには、高純度の因子 X 試料が必要である。そこで、大腸菌による発現系を構築した。因子 X の cDNA を各種ベクターに挿入し、発現タグ、温度、誘導条件などを検討した。

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、精製タグの除去等の条件も検討した。

### 3) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との相互作用解析

mA3-N と因子 X 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。

M 1 2



**図1. マウス APOBEC3 N-末端ドメイン (mA3-N)の精製** M: 分子量マーカー Lane 1: His-tag がついた状態 Lane 2: His-tag 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-N.

#### 4) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との共発現系の構築

上記2)で得られた因子 X の発現系をもとに、大腸菌による因子 X と mA3-N の共発現を試みた。

複合体の形成を検知するために、因子 X と mA3-N 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因子 X のものを用い、それぞれの精製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。

#### 【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、東京医科歯科大学遺伝子組換え生物等実験安全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 アミノ端側 Z 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再検討を行った結果、精製用 His-tag を除去した mA3-N 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1)。発現量や精製における挙動などに関して、抵抗性型 B6 マウスと感受性型 BALB/c マウスの

mA3-N 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-N は、予想通り陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて野生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、結晶化においても、抵抗性型と感受性型の mA3-N のあいだに大きな差異は見られなかった。

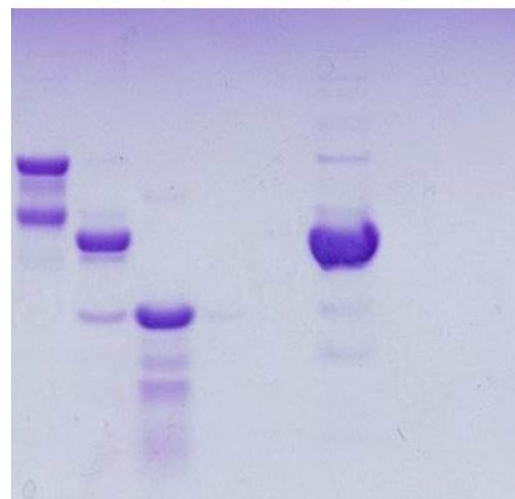
#### 2) 因子 X の発現と精製

因子 X は、大腸菌で融合蛋白質として可溶な形で発現することができた。その後、アフィニティークロマトグラフィー、精製タグの切断、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(図2)。

#### 3) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との相互作用解析

現状では暫定的な結果ではあるが、SPR により、mA3-N と因子 X 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。

1 2 3 4 5 6 7 8



**図2. 因子Xの発現と精製** Lane 1: 精製タグとの融合蛋白質 Lane 2: プロテアーゼによる精製タグの切断 Lane 3-8: 切断後のイオン交換クロマトグラフィーによる精製画分 (Lane 3 が因子Xに、Lane 6 が除去されたタグに相当)

#### 4) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との共発現系の構築

共発現した大腸菌を破碎し、遠心後の上清を mA3-N と因子 X、それぞれの精製タグによりアフィニティー精製したものを SDS-PAGE で調べたところ、通常の CBB 染色では、明確にもう一方のタンパク質の結合を示すバンドは見られなかった。そこで、抗体によるブロッティングを行った結果、mA3-N と因子 X が共精製されてきたことを示唆するバンドが見られた。

#### D. 考察

昨年度まで、我々は精製用の His-tag を持ったままの mA3-N 試料を用いて結晶化条件の検討を行ってきた。比較的分子量の低い mA3-N において、His-tag の負の影響は大きいと考え、その除去を行ったが結晶を得ることができなかった。mA3-N の中にしっかりした立体構造を持たない部分がある可能性が考えられるほか、mA3 が核酸結合蛋白質であることから、表面電荷の分布特性などが結晶化の障害となっている可能性がある。今後、変異の導入や特異的抗体フラグメントなどとの共結晶化などの検討が必要となろう。その意味では、mA3 と相互作用する他の蛋白質との共結晶化も重要となろう。

因子 X と mA3-N 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、そこから得られるであろうデータの詳細な解析を待つ必要がある。

#### E. 結論

本研究では、マウスの APOBEC3 の多型とウイルスに対する感受性との関係を分子構造の点から調べるために、X 線結晶解析による立体構造解析をめざした。その結果、高純度の試料を得る精製方法の確立には成功したものの、結晶は得られなかった。

マウスの APOBEC3 の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に関与すると思われる因子 X との直接的な相互作用を暫定的ながら示すことができた。マウスの APOBEC3 と因子 X との複合体が安定なものかなどの問題点も考えられるが、最終的には複合体の構造を結晶解析で明らかにしたい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

##### 2. 学会発表

- 1) Ito, N. Structure Deposition at PDBj. **OIST/CCP4 Workshop**, November 4–9, 2013. Onna, Okinawa.
- 2) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. プロリン異性化反応がタウタンパク質の凝集を阻害する. **第 13 回日本蛋白質科学会年会**, 2013 年 6 月 12–14 日, 鳥取.
- 3) 沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 伊藤 暢聡, 福森 義宏, 三木 邦夫. 巨大ヘモグロビン結晶中での酸素結合状態の操作. **日本結晶学会 2013 年度年会**, 2013 年 10 月 12–13 日, 熊本.
- 4) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. タウタンパク質に対する Pin1 のプロリン異性化活性を測定するための新しい方法. **第 51 回日本生物物理学会年会**, 2013 年 10 月 28–30 日, 京都.
- 5) 品川 健朗, 沼本 修孝, 鏑田 武志, 伊藤 暢聡. CD72 の構造解析に向けて. **第 51 回日本生物物理学会年会**, 2013 年 10 月 28–30 日, 京都.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し



## 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 メチル化状態をバ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)、MXI (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・個人差をバ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

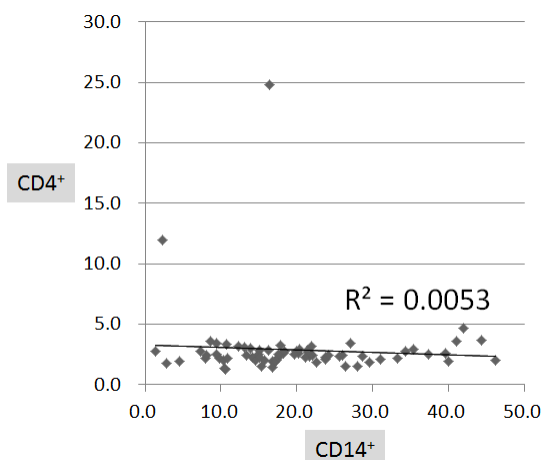


図 1. 北タイ集団における *APOBEC3G* 発現の I 型インターフェロン反応性の個人差

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

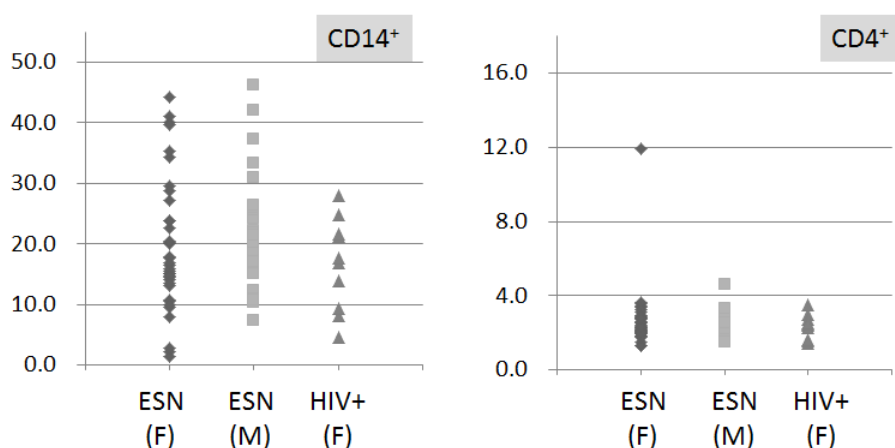
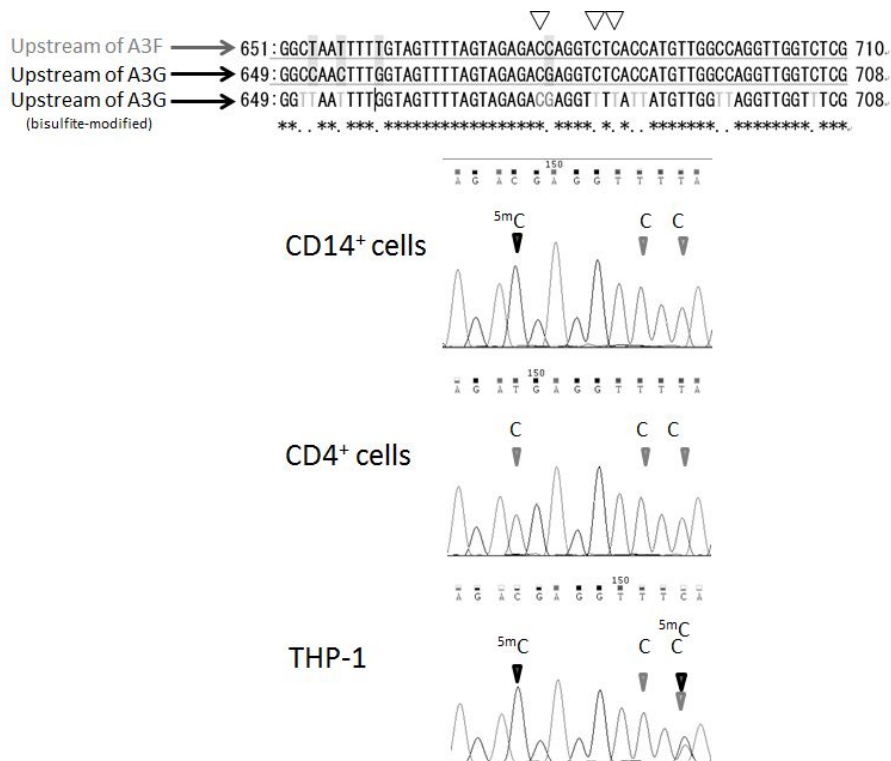


図 2. 細胞種特異的 *APOBEC3G* 発現の群間差

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。



**図 3. バイサルファイト修飾によるシトシンメチル化状態の探索例**

バイサルファイト処理後の DNA を鋳型として PCR により目的の配列を増幅すると、メチル化シトシンはシトシンのまま残るが、メチル化を受けていないシトシンはチミンに転換される。この領域の 3 か所のシトシン ( ) のうち、左端のものは CpG 配列を構成するメチル化の標的配列である。この塩基は CD14 陽性細胞および THP-1 細胞ではほぼ 100% メチル化されているが、CD4 陽性細胞では、ほとんどメチル化されていないことがわかった。(偶然な発見であるが、右端のシトシンは THP-1 細胞で非典型的なメチル化を受けている可能性がある。)

型を呈する白血病細胞由来の細胞株 THP-1 の DNA を用い、*APOBEC3G* 遺伝子の CpG アイランドが、どの細胞においてもシトシンメチル化を受けていないことに加え、CpG アイランドの上流側隣接領域に細胞種によってシトシンメチル化レベルの異なる塩基が存在することが明らかとなった (図 3)。今後、北タイ集団を対象として *APOBEC3G* 遺伝子のシトシンメチル化レベルと組織特異的遺伝子発現とを関連付けられるかを検討する。

#### D. 考察

Biasin ら (2007) がイタリアでの夫婦間曝露の 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が、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もの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、組織特異的なエピジェネティックな遺伝子発現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 エクソン近傍に 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判った。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予定である。

## 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

## 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 IkBL 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) IkBL 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静脈炎等の慢性炎症性疾患との関連が知られている IkBL 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	
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 2n=462	%HIV患者 2n=382	OR	p
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 2n=674	%HIV患者 2n=472	OR	p
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 2n=462	%LTNP 2n=186	OR	p
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

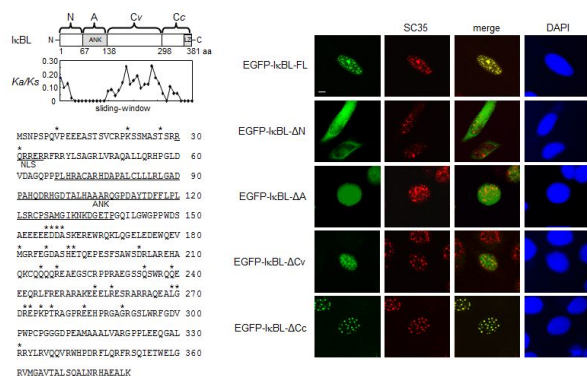


図1 IkBL 分子のドメイン構造と細胞内局在

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 hnRNPLL 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 との結合に必要とであることが判明した。さらに、siRNA を用いた実験から、

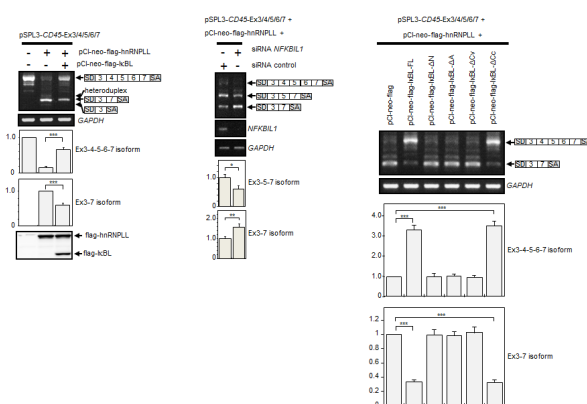


図2 IkBL による CD45 スプライシング制御

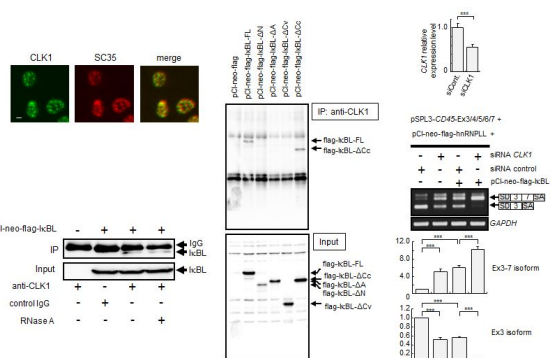


図3 IkBL は CLK1 に結合し、スプライシングを阻害する

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

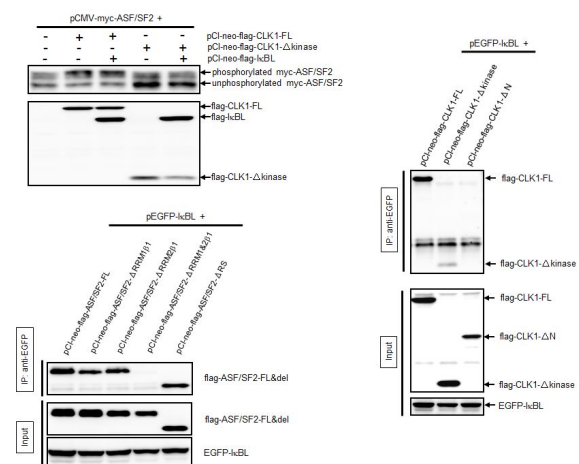
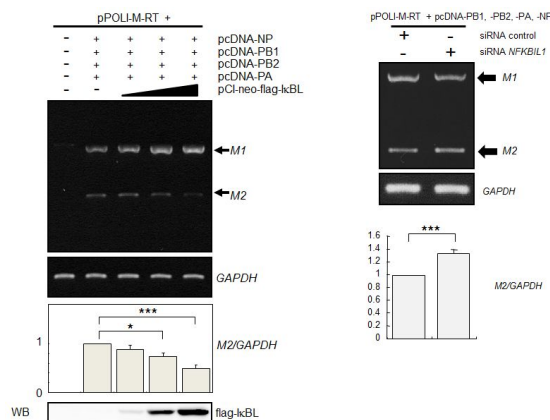


図4 IkBL によるスプライシング制御と CLK1



**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。従来の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

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takamura, S., E. Kajiwara, S. Tsuji-Kawahara, T. Masumoto, M. Fujisawa, M. Kato, T. Chikaishi, Y. Kawasaki, S. Kinoshita, M. Itoi, N. Sakaguchi, and <u>M. Miyazawa</u>	Infection of adult thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents functional memory CD8 <sup>+</sup> T cell differentiation.	<i>PLoS Pathog.</i>	<b>10</b>	e1003937	2014
Tsuji-Kawahara, S. and <u>M. Miyazawa</u>	Elimination of Friend retrovirus in the absence of CD8 <sup>+</sup> T cells.	<i>J. Virol.</i>	<b>88</b>	1854-1855	2014
Tsuji-Kawahara, S., H. Kawabata, H. Matsukuma, S. Kinoshita, T. Chikaishi, M. Sakamoto, Y. Kawasaki, and <u>M. Miyazawa</u>	Differential requirements of cellular and humoral immune responses for Fv2-associated resistance to erythroleukemia and for the regulation of retrovirus-induced myeloid leukemia development.	<i>J. Virol</i>	<b>87</b>	13760-13774	2013
Tsumiyama K, A. Hashiramoto, M. Takimoto, S. Tsuji-Kawahara, <u>M. Miyazawa</u> , and S. Shiozawa	IFN- $\gamma$ -producing effector CD8 T lymphocytes cause immune glomerular injury by recognizing antigen presented as immune complex on target tissue.	<i>J. Immunol.</i>	<b>191</b>	91-96	2013
Matsui, Y., K. Shindo, K. Nagata, K. Io, K. Tada, F. Iwai, M. Kobayashi, N. Kadowaki, R. Harris, and <u>A. Takaori-Kondo</u>	Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBF $\beta$ by site-directed mutagenesis.	<i>Virology</i>	<b>449</b>	82-87	2014

Yoshioka, S., Y. Miura, H. Yao, S. Satake, Y. Hayashi, A. Tamura, T. Hishita, T. Ichinohe, H. Hirai, <u>A. Takaori-Kondo</u> , and T. Maekawa	C/EBP $\beta$ expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells regulates early B-cell lymphopoiesis.	<i>Stem cells</i>	<b>32</b>	730-740	2014
Arai, Y., Y. Nishinaka, T. Arai, M. Morita, K. Mizugishi, S. Adachi, <u>A. Takaori-Kondo</u> , T. Watanabe, and K. Yamashita	Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	<b>443</b>	556-561	2014
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 <u>A. Takaori-Kondo</u>	CKIP-1 is an intrinsic negative regulator of T-cell activation through an interaction with CARMA1.	<i>PLoS One</i>	<b>9</b>	e85762	2014
Furukawa, A., K. Sugase, R. Morishita, T. Nagata, T. Kodaki, <u>A. Takaori-Kondo</u> , A. Ryo, and M. Katahira	Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy.	<i>Angew Chem. Int. Ed. Engl.</i>	<b>53</b>	2349-2352	2014
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, <u>A. Takaori-Kondo</u> , 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.	<i>Eur. J. Haematol.</i>	<b>92</b>	219-228	2014
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, <u>A. Takaori-Kondo</u> , and N. Kadowaki	Human CD1c <sup>+</sup> myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D <sub>3</sub> .	<i>J. Immunol.</i>	<b>191</b>	3152-3160	2013
Nakabayashi, M., Tsukahara, Y., Iwasaki-Miyamoto, Y., Mihori-Shimazaki, M., Yamada, S., Inaba, S., Oda, M., Shimizu, M., Makishima, M., Tokiwa, H., Ikura, T., and <u>Ito, N.</u>	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.	<i>J. Med. Chem.</i>	<b>56</b>	6745–6760	2013
Masuno, H., Ikura, T., Morizono, D., Orita, I., Yamada, S., Shimizu, M. and <u>Ito, N.</u>	Crystal structures of complexes of vitamin D receptor ligand-binding domain with lithocholic acid derivatives.	<i>J. Lipid Res.</i>	<b>54</b>	2206-2213	2013

Ikura, T., and <u>Ito, N.</u>	Peptidyl-prolyl isomerase activity of FK506 binding protein 12 prevents tau peptide from aggregating.	<b><i>Protein Engineering, Design and Selection</i></b>	<b>26</b>	539-546	2013
Higo, K., Ikura, T., Oda, M., Morii, H., Takahashi, J., Abe, R. and <u>Ito, N.</u>	High resolution crystal structure of the Grb2 SH2 domain with a phosphopeptide derived from CD28.	<b><i>PLoS One</i></b>	<b>8</b>	e74482	2013
Naruse, T. K., H. Akari, T. Matano, and <u>A. Kimura</u>	Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques.	<b><i>Immunogenetics</i></b>	<b>66</b>	161-170	2014
Nakayama, E. E., T. Nakajima, G. Kaur, J. Miyama, H. Terunuma, N. K. Mehra <u>A. Kimura</u> , 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	<b><i>AIDS Res. Hum. Retroviruses</i></b>	<b>29</b>	919-924	2013
An, J., T. Nakajima, H. Shibata, T. Arimura, M. Yasunami, and <u>A. Kimura</u>	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	<b><i>J. Autoimmun.</i></b>	<b>47</b>	25-33	2013
An, J., and <u>A. Kimura</u>	IkBL mapped within the HLA region is a novel regulator of alternative splicing involved in the pathogenesis of immune-related diseases.	<b><i>MHC</i></b>	<b>20</b>	191-197	2013
Mori, M., N. Wichukchinda, R. Miyahara, A. Rojanawiwat, P. Pathipvanich, T. Maekawa, T. Miura, P. Goulder, M. Yasunami, <u>K. Ariyoshi</u> , 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.	<b><i>AIDS</i></b>	<b>28</b>	959-967	2014
Pathipvanich, P., N. Tsuchiya, A. Rojanawiwat, W. P. Schmidt, W. Auwanit, P. Sawanpanyalert, and <u>K. Ariyoshi</u>	Changing burden of HIV/AIDS to clinical settings in Northern Thailand over 15 years.	<b><i>Jpn. J. Infect. Dis</i></b>	<b>66</b>	375-378	2013