

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590546

研究課題名(和文)APOBEC1ノックアウトマウスを用いた抗レトロウイルス自然免疫機構の研究

研究課題名(英文)Research in anti-retroviral intrinsic immunity using APOBEC1 knock-out mice

研究代表者

小糸 厚(KOITO, ATSUSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・研究員

研究者番号：70231305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類APOBEC3が、HIVなどのレトロエレメントを制御する自然免疫機構として機能していることが明らかにされてきた。我々は、そのファミリーでコレステロール代謝に重要なアポリポタンパク質B mRNAのエディティングに関与することが知られてきた有袋類を含めた哺乳類のAPOBEC1が、広範なレトロエレメントに対する制御機構として機能していることを明らかにした。さらに、APOBEC1ノックアウトマウスにおける内在性レトロエレメントの細胞内複製の解析から、げっ歯類などの実験用小動物でHIVが十分に複製できない分子基盤がより明確になる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The ability of mammalian cytidine deaminases encoded by the APOBEC3 (A3) genes to restrict a broad range of endogenous retroelements as well as exogenous retroviruses such as HIV-1 is now well established. We observed that APOBEC1, which mediates C-to-U deamination of apo B mRNA and is involved in lipid transport, from rodents and non-placental mammals, such as opossum are also powerful inhibitors of retroelements including HIV-1. Accordingly, we will test the hypothesis that APOBEC1 knock-out to evade species-specific intrinsic restriction factors in mice will markedly increase their susceptibility to HIV-1 challenge.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：レトロウイルス シチジン脱アミノ化酵素 レトロエレメント HIV 小動物モデル ゲノム

1. 研究開始当初の背景

げっ歯類やウサギなどの実験用小動物にヒト型 CD4、コレセプター分子を導入後も、十分な HIV 複製が得られないことが示されてきたが、その分子基盤は依然として不明な点が多い。シチジン脱アミノ化酵素 APOBEC1 は、ヒトでは小腸でのみ発現がみられ、コレステロール代謝に重要なアポリポタンパク質(apo)B mRNA のエディティングに参与することが知られてきた。我々は、マウスやウサギでは小腸、肝臓のみならず脾臓、胸腺、卵巣、精巣など様々な組織で APOBEC1 mRNA が強く発現していることを見出した。MuLV を接種したマウスで複製した MuLV ゲノムには高頻度に脱アミノ化反応による変異がみられるが、それが APOBEC3 ではなく APOBEC1 による C から U へのエディティングであることが示された。この *in vivo* の実験結果に加え、我々がこれまでに明らかにした *in vitro* における APOBEC1 の抗 HIV、抗レトロエレメント活性、さらには APOBEC1 mRNA の発現パターンも、小動物において APOBEC1 は外来レトロウイルスや内在性レトロエレメントを標的とした強力な自然防御機構として機能していることを示唆している。

2. 研究の目的

APOBEC1 が、外来レトロウイルスや内在性レトロエレメントを標的とした広範な自然防御機構として機能している可能性を検証するため、これまで報告がない有袋類オポッサム APOBEC1 の機能解析をおこなった。ヒト・マウスゲノムには何百万年も昔にレトロエレメントがはいりこみ、ゲノム進化の原動力となってきた。LTR 型の内在性レトロウイルスだけでも、ヒト・マウスゲノムの 10% 近くを占める。その多くが不活性化変異の蓄積によって複製能力を失っているが、マウスの IAP や MusD 配列の一部は転移能力を残している。野生型と APOBEC1 ノックアウトマウスにおける IAP や MusD など内在性レトロウイルス・レトロエレメントの複製能を解析し、APOBEC1 の個体内での機能を明確にす

ることを目的とした。本研究により LTR 型の内在性レトロウイルスと起源を同じくし、その複製サイクルにも共通の点が多い HIV が、げっ歯類やウサギなどの実験用小動物で十分に複製できない分子基盤がより明確になると期待される。さらに種間のウイルス伝搬を阻止する自然免疫機構の理解に貢献できると考えた。

3. 研究の方法

種々の哺乳類および有袋類オポッサム APOBEC1 ならびに脱アミノ化変異体の発現ベクターを作製した。大腸菌を用いた系により、DNA ミューテーター活性を評価した。内在性レトロエレメントである LINE-1(L1)及びマウス内在性レトロウイルス MusD, IAP に対する抑制活性を検討し、その阻害機構を解析した。L1, MusD, IAP カセットを細胞に導入し、RNA に転写された情報がスプライシングを受けて逆転写されると、EGFP あるいは Neo 遺伝子が発現するシステムを用いた。HIV-1 に対する抑制活性も検討した。レトロエレメント・レトロウイルスのゲノムにおこる変異を通常の PCR ならびに 3D PCR を用いて解析した。また APOBEC1 の細胞内局在を蛍光顕微鏡により調べた。さらに、各組織における APOBEC1 mRNA の発現を検討した。APOBEC1 ノックアウトマウスは、熊本大学発生医学研究所・荒木喜美准教授らによりジーントラップ法により作製された B6(21-B120)マウスを用いた。

4. 研究成果

(1) ヒトなど霊長類において、APOBEC1 は apo B mRNA エディティングに特化して進化・機能していると考えられるが、これと一致して、その発現は小腸に限局している。これに対し、マウスやウサギなどの小動物では小腸以外の肝臓、脾臓をはじめ脳、卵巣、精巣などの組織において広範に発現していることが明らかとなった。また、そのゲノムに APOBEC1 遺伝子をもたない有袋類オポッサムにおいても広範な組織における APOBEC1 の発現がみられた。

(2) APOBEC1 のホモ変異マウスでは、その発現は完全に抑制されており、小腸における apo B mRNA エディティングは消失していた。しかしその発育、及び形態とも野生型マウスと全く変わりなかった。

(3) 野生型ならびに APOBEC1 ノックアウトマウスよりマウス胎仔由来繊維芽細胞(MEF)を複数、樹立した。レトロウイルス・レトロエレメントの複製能を解析した結果、APOBEC1 ノックアウトマウス MEF 細胞の複製の増強を示唆する結果が得られた。しかし HeLa や 293T 細胞を用いた場合に比較して、MEF 細胞内でのレトロエレメントの複製は、5%以下と極めて低く、今後、その原因解明を含め、より詳細な検討が必要である。

(4) 有袋類オポッサム APOBEC1 は、極めて強力な DNA ミューター活性を示した。また、L1 に対して脱アミノ化非依存的、MusD, IAP に対して脱アミノ化依存的な抑制活性を示した。抗 HIV-1 活性は、極めて弱いものであったが、HIV-1 粒子への取り込みが非効率であることがその原因として考えられた。

(5) まとめ

APOBEC1 は、ヒトなど霊長類以外、マウスなどの哺乳類及び有袋類などでは依然として強力な DNA ミューター活性を有し、内在性および外来レトロエレメントに対する広範な防御機構として機能している可能性が示唆された。APOBEC1 ノックアウトマウスと HIV レセプター発現マウスを掛け合わせるにより、強力な抗 HIV-1 阻害因子をノックダウンすることができ、HIV-1 感受性マウスの完成に一步近づくことが期待される。また、哺乳類ゲノムの実に 4 割以上を占めるにいたったレトロエレメントと、それに対する制御機構である APOBEC ファミリーが進化的に攻防を繰り返してきたことが伺われるが、APOBEC ファミリーのより詳細な機能解明は、レトロウイルス感染に対する制御のみならずゲノム進化のメカニズムを理解するうえで重要である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

Maeda K, Almofly SA, Singh SK, Eid MMA, Shimoda M, Ikeda T, Koito A, Pham P, Goodman MF, and Sakaguchi N.: GANP interacts with APOBEC3G and facilitates its encapsidation into the virions to reduce HIV-1 infectivity. **J. Immunol.** 191, 6030-6039 (2013), 査読有

doi: 10.4049/jimmunol.1302057

Koito A.: Intrinsic immunity by APOBEC family of cytidine deaminases against retrotransposons, *in* **Sequence and Genome Analysis II - Bacteria, Viruses and Metabolic Pathways** (ed. iConcept Press Ltd), ISBN: 978-1-480254-14-5, pp. 96-124 (2013), 査読有

Koito A, and Ishizaka Y.: Retroviruses, retroelements and their restrictions. **Front. Microbiol.** 4, 197 (2013), 査読有

doi: 10.3389/fmicb.2013.00197

Koito A, Ikeda T.: Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. **Front. Microbiol.** 4, 28 (2013), 査読有

doi: 10.3389/fmicb.2013.00028

Koito A, and Ikeda T.: "Apolipoprotein B mRNA-editing, catalytic polypeptide cytidine deaminases and retroviral restriction" **Wiley Interdisciplinary Reviews (WIREs) RNA** 3, 529-541 (2012), 査読有

doi: 10.1002/wrna.1117

Koito A, and Ikeda T.: "Intrinsic restriction activity by AID/APOBEC family of enzymes against the mobility of retroelements" **Mobile Genet. Elem.** 1, 197-202 (2011), 査読有

doi: 10.4161/mge.1.3.17430

Ong EBB, Watanabe N, Saito A, Futamura Y, Abd El Galil KH, Koito A, Najimudin N, and Osada H.: "Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of Vpr" **J. Biol. Chem.** 286, 14049-14056 (2011), 査読有

doi: 10.1074/jbc.M110.185397

Ikeda T, Abd El Galil KH, Tokunaga K, Maeda K, Sata T, Sakaguchi N, Heidmann T, and Koito A.: "Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons" **Nucleic Acids Res.** 39, 5538-5554 (2011), 査読有
doi: 10.1093/nar/gkr124

[学会発表](計 17 件)

前田和彦, Almofty SA, Singh SK, Eid MMA, 下田真唯子, 川畑輝哉, 池田輝政、小糸厚、坂口薫雄: "HIV 感染経路における宿主因子 GANP の役割". 第 27 回日本エイズ学会学術集会. (20131120-22). 市民会館崇城大学ホール (熊本)

Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Eid MMA, Shimoda M, Ikeda T, Shida H, Koito A, Pham P, Goodman MF, and Sakaguchi N.: "Role of mammalian TREX-2 component GANP in HIV-1 infection" 14th. Kumamoto AIDS Seminar. (20131029-31). Kumamoto, Japan.

前田和彦, Almofty SA, Singh SK, Eid MMA, 下田真唯子, 池田輝政、小糸厚、坂口薫雄: "GANP を介した APOBEC3G の抗 HIV 感染阻止機構の解析". 第 26 回日本エイズ学会学術集会. (20121124-26). 慶応義塾大学 日吉キャンパス (横浜)

池田輝政、小糸厚: "有袋類 APOBEC1 の抗レトロウイルス・レトロエレメント活性の解析" 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. (20121113-15). グランキューブ大阪 (大阪)

Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Eid MMA, Shimoda M, Ikeda T, Shida H, Koito A, Pham P, Goodman MF, and Sakaguchi N.: "Mammalian TREX-2 component GANP is involved in HIV-1 mRNA export" 13th. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. (20121024-26). Kumamoto, Japan.

Koito A, Ikeda T.: "APOBEC cytidine deaminase as a player of intrinsic immunity against HIV and retroelements" BIT's 2nd Annual World Congress of Molecular & Cell Biology (CMCB). (招待講演). (20120518-20). Beijing, China.

Koito A, Ikeda T.: "Intrinsic restriction activity by APOBEC enzymes against HIV and retroelement" 4th International Conference on Drug Discovery & Therapy, Hot Topics in HIV Research. (教育講演). (20120212-15). Dubai, UAE.

池田輝政、小糸厚: "キメラタンパク質を用いた APOBEC1 の抗 HIV-1 活性に関する責任部位の機能解析". 第 25 回日本エイズ学会学術集会. (20111130-1202). ハイアット リージェンシー東京 (東京)
前田和彦, Kumar SS, Ameen AS, Abbas EMM, 池田輝政、小糸厚、坂口薫雄: "APOBEC3G の HIV-1 粒子内への取り込みを制御する宿主因子 GANP". 第 25 回日本エイズ学会学術集会. (20111130-1202). ハイアット リージェンシー東京 (東京)

小糸厚: "シチジン脱アミノ化酵素によるレトロウイルス・レトロエレメントの制御". 同仁化学研究所 フォーラム・イン・ドージン, RNA の識別と管理 自己、異常な自己、そして非自己. (招待講演). (20111104) 熊本ホテルキャッスル (熊本)

Koito A, Ikeda T.: "Retrovirus, retroelement restrictions by APOBEC enzymes" 12th. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. (20111019-21). Kumamoto, Japan.

Maeda K, Singh SK, Ameen AS, Eid MMA, Ikeda T, Koito A, Pham P, Goodman MF, Sakaguchi N.: "GANP promotes APOBEC3G encapsidation in virions to reduce viral infectivity" 12th. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. (20111019-21). Kumamoto, Japan.

Koito A, Ikeda T.: "Intrinsic restriction activity by apoB mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of retroelements" Frontiers of Retrovirology Conference, Complex retroviruses, retroelements and their hosts. (20111003-05). Amsterdam, Netherlands.

Ikeda T, Koito A.: "Identification of the functional region required for anti-HIV-1 activity of APOBEC1" XV International

Congress of Virology. (20110911-16).
Sapporo, Japan.

Koito A, Ikeda T.: “ Intrinsic restriction activity by APOBEC cytidine deaminases against the mobility of retroelements ” BIT ' s 1st Annual World Congress of Molecular & Cell Biology (CMCB). (招待講演). (20110806-08). Beijing, China.

Maeda K, Singh SK, Sarah A, Eid MM, Ikeda T, Pham P, Goodman MF, Koito A, Sakaguchi N.: “ GANP associated with HIV-1 RNA export is encapsidated with Apobec3G into virion cores ” Cold Spring Harbor Laboratory, Meeting on Retroviruses. (20110523-28). Cold Spring Harbor, NY USA.

Ikeda T, Koito A.: “ Identification of the functional region required for anti-HIV-1 activity of APOBEC1 ” Cold Spring Harbor Laboratory, Meeting on Retroviruses. (20110523-28). Cold Spring Harbor, NY USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小糸 厚 (KOITO ATSUSHI)

熊本大学・生命科学研究部・研究員

研究者番号 : 70231305

様式 C - 19、F - 19、Z - 19、CK - 19 (共通)