

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890144

研究課題名（和文）HIV-1 感染小動物モデル開発の障壁となる宿主因子の解析

研究課題名（英文）Analysis of Cellular Factors Regulating HIV-1 Infection in Small Animals

研究代表者 池田 輝政（IKEDA TERUMASA）

熊本大学・大学院生命科学研究部・学術研究員

研究者番号：00588410

研究成果の概要（和文）：シチジン脱アミノ化酵素 APOBEC1 (A1) は、ヒトではコレステロール代謝に関与するタンパク質である。このタンパク質は、ヒトではなく、HIV-1 感染の小動物モデル候補であるウサギやげっ歯類において、HIV-1 を抑制するタンパク質として機能しており、このことが HIV-1 感染動物モデルの開発を阻害する要因の 1 つとなっている。そこで本研究では、ウサギ A1 の HIV-1 を抑制するために重要な領域を同定した。この解析から、この領域はウサギ A1 のウイルス粒子への取り込みや脱アミノ化活性に関わっており、HIV-1 の感染性を阻害するために重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：APOBEC1 (A1) is the catalytic component of a complex that mediates C-to-U deamination of mRNA for apolipoprotein B (apoB), and is involved in lipid transport in gastrointestinal tissues. However, various mammalian A1s are also potent DNA C-to-U deaminases, suggesting possible innate immune functions. We previously reported that A1s from rodents (mouse, rat and hamster) and lagomorphs (rabbit) are capable of inhibiting the infectivity of HIV-1. A rank order in anti-HIV-1 potency was seen with rabbit A1 showing greatest activity. In contrast, human A1 did not show any anti-HIV-1 activity. To determine the region responsible for rabbit A1 anti-HIV-1 activity, we constructed 14 chimeras of human and rabbit A1 using overlapping PCR and tested them against HIV-1 using single-round infectivity assays. Results showed that the C-terminal region containing a leucine-rich motif and two putative dimerization domains is important for anti-HIV-1 activity. A1 chimeras showing anti-HIV-1 activity tended to be incorporated into HIV-1 virions more efficiently and these chimeras induced higher G-to-A and C-to-T mutations in the viral DNA and RNA. Taken together, these findings suggest that the C-terminal region containing a leucine-rich motif and dimerization domains are involved in both packaging into the HIV-1 virion and deamination activity. These findings may be applicable to understanding the roles of the broader APOBEC family in virus restriction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

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：APOBEC1, HIV-1, 脱アミノ化, leucine-rich motif, dimerization

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) は宿主域の狭いウイルスである。これまでに、HIV-1 複製を規定する様々な宿主因子が同定されてきたが、霊長類以外の哺乳動物において、HIV-1 の複製効率を著しく減少させる明確な理由はまだ分かっていない。これは、霊長類以外の HIV-1 感染動物モデル開発の大きな妨げとなっている。我々は、HIV-1 感染の小動物モデル候補であるウサギやげっ歯類において、シチジン脱アミノ化酵素 APOBEC1 (A1) が、HIV-1 を含むレトロウイルスに対して、主に脱アミノ化依存的に抗ウイルス活性を示すことを世界で初めて明らかにした。この結果は、げっ歯類あるいはウサギなどの小動物では、A1 がレトロウイルスの複製を抑制する自然免疫機構として機能しており、このことが HIV-1 感染動物モデルの開発を阻害する要因の 1 つである可能性を示している。

2. 研究の目的

ヒトとげっ歯類、あるいはウサギでは、A1 タンパク質はアミノ酸レベルで約 70% 保存されているが、どの部位が抗 HIV-1 活性を規定しているかは今のところ分かっていない。そこで本研究では、ウサギやげっ歯類 A1 タンパク質の抗 HIV-1 活性における責任部位を明らかにし、その部位が抗 HIV-1 活性において、どのような役割を果たしているかを明らかにした。

3. 研究の方法

本研究は、上記の研究目的を達成するために、以下の方法を行って研究を行った。

- (1) ヒト・ウサギ A1 遺伝子の作製と single-cycle infection assay を用いた A1 キメラタンパク質の抗 HIV-1 活性の検証。
- (2) 蛍光顕微鏡を用いた A1 キメラタンパク質の細胞内局在の検証。
- (3) 免疫沈降法による A1 キメラタンパク質の二量体化能の検証。
- (4) HIV-1 産生細胞における A1 キメラタンパク質の発現レベルの確認と、ウイルス粒子への A1 キメラタンパク質の取り込み効率の検証。
- (5) 大腸菌の系を用いた、A1 キメラタンパク質の DNA 脱アミノ化活性の検証。
- (6) 3D-PCR を用いた、HIV-1 感染細胞における、A1 キメラタンパク質存在下でのプロウイルス DNA への G-to-A および C-to-T

変異の検証。

- (7) 3D-PCR を用いた、HIV-1 genome RNA における、A1 キメラタンパク質存在下での C-to-T 変異の検証。

4. 研究成果

- (1) 14 種類のウサギ・ヒト A1 キメラ遺伝子の作製 (図 1)、それぞれの抗 HIV-1 活性を測定することにより、A1 の抗 HIV-1 活性が、leucine-rich motif および dimerization domain を含む C 末の領域

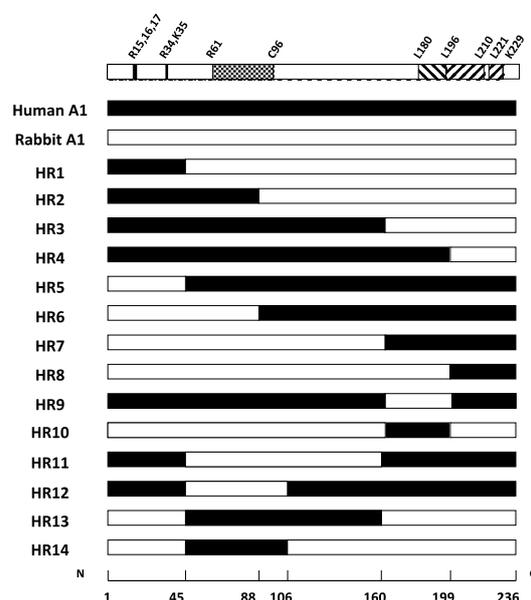


図 1：キメラタンパク質の構造

- にあることが明らかとなった (表 1)。
- (2) A1 の C 末領域が、その抗 HIV-1 活性においてどのように寄与しているか検証した結果、HIV-1 粒子中への取り込み、および脱アミノ化活性に影響していることが明らかとなった (表 1)。
- (3) A1 の C 末領域は、HIV-1 cDNA と RNA の両方の脱アミノ化の制御に関与するが、その役割はそれぞれの基質に対して異なることが明らかとなった。
- (4) A1 の抗 HIV-1 活性における責任部位を明らかにした研究はこれまでになく、ウサギ A1 と抗 HIV-1 活性をもたないヒト A1 のキメラ分子を作製し、その抗 HIV-1 活性と作用機序を明確にしたことは、A1 タンパク質による抗ウイルス活性制御という観点から重要な知見になると考え

Table 1. Summary of assay results.

	Anti-HIV-1 activity ¹		Subcellular localization	Dimerization ²	Incorporation efficiency ³		Intrinsic DNA editing activity ⁴	3D-PCR		
	WT	Avif			WT	Avif		Proviral DNA		Genomic RNA
								WT	Avif	
Human A1	+++	+	Nucleus	+	+++	++++	+++	+	+	+
Rabbit A1	+++	+++	Cytoplasm	+	++++	++++	+++	+	+	+
HR1	++	++	Nucleus	+	++++	++++	+	+	+	+
HR2	-	+	Nucleus	+	++	++	++	-	-	-
HR3	-	-	Nucleus	+	+++	++++	++	+	+	+
HR4	-	-	Nucleus	+	+	++	+	-	-	-
HR5	-	-	Nucleus	+	++	+++	+	-	-	-
HR6	-	-	Nucleus	+	++	++	+	-	-	-
HR7	-	-	Nucleus	+	++	++	+	-	-	-
HR8	-	+	Nucleus	+	+++	+++	++	+	+	+
HR9	-	-	Nucleus	+	++	++	++	+	+	+
HR10	+	+	Nucleus	+	++	+++	++	+	+	+
HR11	-	-	Nucleus	+	+	+	+	-	-	-
HR12	-	-	Nucleus	+	+	+	+	-	-	-
HR13	+	+	Nucleus	+	++	++	+++	+	+	+
HR14	+	++	Nucleus	+	+	+	++++	+	+	+

¹The anti-HIV-1 activity, subcellular localization, dimerization ability, incorporation efficiency into HIV-1 virus, intrinsic DNA editing assay, and dimerization activity against the proviral DNA and viral genomic are shown for human and rabbit A1s and each chimera.
²Anti-HIV-1 activities were shown as relative value to mock infection using single-round luciferase assay. < -0.5, +; 0.5-0.1, ++; 0.1-0.01, +++; 0.01-0.001, ++++.
³Dimerization ability of each chimera was evaluated by immunoprecipitation.
⁴Incorporation efficiency was determined by measuring the band intensity in western blot. The value shown is the relative intensity to that of human A1. < 1, +; 1-2, ++; 2-4, +++; 4-8, ++++.
⁵Intrinsic DNA editing activity was measured by E. coli-based system. The activity was shown as retransposon resistant colonies per 10⁶ viable cells. < 1-10, +; 10-50, ++; 50-100, +++; >100, ++++.

表1：キメラタンパク質の抗 HIV-1 活性における作用機序の検証

られ、その活性を自在に調節することができれば、HIV-1 感染動物モデルを開発する上で重要な知見を与えることが可能となる。今後の展望としては、この領域が抗 HIV-1 活性とどのように関係しているのか、制御タンパク質あるいは立体構造の観点から詳細に解析することにより、A1 タンパク質による抗ウイルス活性制御に関してさらに大きなインパクトを与えることが出来る。

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 3 件)

1. Koito A, and Ikeda T. APOBEC cytidine deaminases and retroviral restriction. Wiley Interdisciplinary Reviews (WIREs) RNA. 2012. *In press*. 査読有り.
2. Koito A, and Ikeda T. Intrinsic restriction activity by AID/APOBEC family of enzymes against the mobility of retroelements. Mobile Genetic Elements 1, 197-202, 2011. 査読有り.
3. 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, 5538-54. 2011. 査読有り.

[学会発表] (計 14 件)

1. Koito A, and Ikeda T. Intrinsic restriction activity by APOBEC enzymes against HIV and retroelement. 4th International Conference on Drug Discovery & Therapy (ICDDT) 2012.

United Arab Emirate, Dubai, UAE. Feb., 12-15, 2012. (Invited Lecture).

2. 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総会. ハイアットリージェンシー東京, 東京. 2011 年 11 月 30-12 月 2 日
3. Koito A and Ikeda T. Intrinsic restriction activity by apoB mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of retroelements. Frontiers of Retrovirology Conference. Mövenpick Hotel Amsterdam City Centre, Amsterdam, Netherlands. Oct. 3-5, 2011. (Poster prize Winner).
4. Ikeda T and Koito A. Identification of the functional region required for anti-HIV-1 activity of APOBEC1. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, international Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan. Sep., 11-16, 2011.
5. Koito A and 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) 2011. Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China. Aug., 6-8, 2011. (Invited Speaker).
6. 池田輝政, 小糸厚. APOBEC1 の抗 HIV-1 活性に関する責任部位の機能解析. 日本レトロウイルス研究会 2011 年度夏季セミナー (SRC2011). 大木山, 河口湖, 山梨県. 2011 年 7 月 28-30 日.
7. Ikeda T and Koito A. Identification of the functional region required for anti-HIV-1 activity of APOBEC1. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. May 23-28, 2011.
8. Ikeda T, Abd El Galil KH, Tokunaga K, Maeda K, Sata T, Sakaguchi N, Heidmann T, and Koito A. Intrinsic Restriction Activity by APOBEC1 against the Mobility of Autonomous Retrotransposons. Keystone Symposia. Whistler Conference Centre, Whistler, Canada. Mar., 20-25, 2011.
9. 池田輝政, 小糸厚. APOBEC1 キメラタンパク質の抗 HIV-1 活性における解析. 第 24 回日本エイズ学会学術集会, グランドプリンスホテル高輪, ザ・プリンス さ

- くらタワー東京，東京，2010年11月24-26日。
10. **池田輝政**、Abd El Galil Khaled Hussein、徳永研三、前田和彦、佐多徹太郎、阪口薫雄、Heidman Thierry、小糸厚。哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント制御機構の解析。第 58 回日本ウイルス学会学術集会，徳島県郷土文化会館，徳島，2010年11月7-9日。
 11. **Ikeda T.**, and Koito A. Identification of the functional region required for anti-HIV-1 activity of APOBEC1. 11th Kumamoto AIDS seminar GCOE joint international symposium. Aso Resort GRANDVRIOHOTEL, Kumamoto, Japan. Oct., 6-8, 2010.
 12. Koito A, Abd El Galil Khaled Hussein, and **Ikeda T.** ApoB mRNA editing enzyme APOBEC1-mediated intrinsic restriction activity against HIV-1 and retrotransposons in small species. 11th Kumamoto AIDS seminar GCOE joint international symposium. Aso Resort GRANDVRIOHOTEL, Kumamoto, Japan. Oct., 6-8, 2010.
 13. **池田輝政**。哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント制御機構の解析。日本レトロウイルス研究会 2010 年度夏季セミナー (SRC2010)。犬山温泉 犬山館，愛知県 2010 年 8 月 31-9 月 2 日。
 14. **Ikeda T.**, Abd El Galil KH, Tokunaga K, Maeda K, Sata T, Sakaguchi N, Heidmann T, and Koito A. Intrinsic Restriction Activity by APOBEC1 against the Mobility of Autonomous Retrotransposons. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. May 24-29, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 輝政 (IKEDA TERUMASA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・学術研究員

研究者番号：00588410