

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390110

研究課題名(和文) APOBEC3の生体内における機能とHIV-1感染病態に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Study on in vivo function of APOBEC3 and its effect on pathophysiology of HIV-1 infection

研究代表者

高折 晃史 (TAKAORI, AKIFUMI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20324626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：1. APOBEC3B遺伝子のSNPsとHIV-1複製解析により、HIV-1感染におけるAPOBEC3Bの遺伝子多型の影響は見られなかった。  
2. 免疫不全マウスモデルを用いたin vivo感染系を用いて、HIV-1のin vivoでの複製プロファイル、および変異導入パターンを検討した。in vivoにおいてAPOBEC3Gはより強力な抗HIV活性を示すこと、一方APOBEC3Fは、ウイルスの適応進化に寄与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：1. Analysis on APOBEC3B SNPs and HIV-1 replication; we demonstrate that there is no significant correlation between APOBEC3B deletion phenotype and progression of HIV-1 infection.  
2. In vivo analysis on HIV replication in SCID-hu mouse model; we analyzed the replication of HIV-1 and the accumulation of mutations in vivo. We show that APOBEC3G has a potent anti-HIV-1 activity in vivo, where as APOBEC3F contribute to viral evolution.

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：個体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、HIV-1 感染を制御する様々な宿主因子が同定され、注目を集めている。これらの宿主因子は、ウイルス感染の標的細胞に内在することから、従来の自然、獲得免疫と異なる「**内因性免疫(Intrinsic Immunity)**」という新たな概念でとらえられる。一方、HIV-1 は、ウイルス蛋白によりこれら宿主因子を回避することで生体内での複製が可能であり、ウイルス複製は宿主因子/ウイルス蛋白間の相互作用により制御されている。

APOBEC3G は、それら宿主因子のなかで最初に同定された分子であり、その抗 HIV-1 作用、ウイルス蛋白である Vif による中和作用の分子機序が最も解明されている。その抗 HIV-1 作用機序は極めてユニークである。本分子は、シチジン脱アミノ化酵素であり、HIV 粒子中に取り込まれ、逆転写の際にウイルスのマイナス鎖 DNA の C を U に変換することにより、結果プラス鎖 DNA に G-to-A 変異を導入し、HIV-1 の複製を阻害する (Shindo, *J Biol Chem* 278:44412,2003)。一方、HIV-1 のアクセサリー蛋白のひとつである Vif は、細胞内の Cullin5-ElonginB/C と複合体を形成し、E3 リガーゼとして APOBEC3G をユビキチン化し分解することでその抗ウイルス活性を抑える (Kobayashi, *J Biol Chem* 280:18573,2005)。これら一連の研究成果は、HIV 複製を抑制する宿主因子に関する研究の先駆けとなるものであると同時に、長年不明であった HIV-1 複製における Vif の役割を明らかにした、HIV-1 研究において近年最も大きなブレイクスルーであった。従って、その後世界的に爆発的に研究が進み、多くの知見が集積された一方で、依然多くの重要な課題が未解明のままであった。すなわち、多くの *in vitro* 研究により、これらの分子機構が明らかになった一方で、その *in vivo* のにおける役割に関してはまったく未解明のままであった。

## 2. 研究の目的

HIV-1 は生体内で多くの変異を獲得し、それが薬剤耐性等のウイルス進化の原因となる。これらの変異は、逆転写の際のエラーによるものとされてきたが、G-to-A 変異が多数であることより本分子の関与が大きいと想像されるが、その詳細は未解明のままである。逆に言うと、APOBEC3G は、ウイルス抑制作用とは逆に、ウイルスに変異を導入して、その進化に寄与している可能性がある。一方で、APOBEC3 蛋白は、APOBEC3G 以外に A から H までのファミリーを形成しており、標的細胞 (CD4(+)T 細胞、マクロファージ) におけるこれら蛋白群の発現、および Vif 蛋白との相互作用の総和が生体内におけるウイルス複製、変異導入、病態の進行を規定しているのは明らかであるが、これらの包括的な検討は皆無である。

さらに、HIV-1 感染症の病態進行、エイズ発症に関して、APOBEC3G の発現、SNPs 等の検討はなされているが、一定の見解は得られていない。それは、これら蛋白群の総和としての表現型の解析がなされていないからである。

本研究においては、これら APOBEC3 蛋白群の生体内における役割と HIV-1 感染病態の進行・AIDS 発症に及ぼす影響に関して、健常成人および HIV-1 感染患者よりの初代培養細胞、さらには免疫不全マウスを用いたモデル系の解析を通して、総合的に検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 初代培養細胞を用いた APOBEC3 蛋白群の発現と HIV-1 複製解析:

健常成人からの初代培養標的細胞 (CD4(+)T 細胞、およびマクロファージ) における各 APOBEC3 発現とウイルス複製プロファイルの相関を明らかにする。

### (2) 初代培養細胞を用いた APOBEC3 遺伝子群の SNPs と HIV-1 複製解析:

同様に健常成人初代培養標的細胞における各 APOBEC3 遺伝子 SNPs とウイルス複製プロファイルの相関を明らかにする。特に、本邦における APOBEC3B の遺伝子欠失の HIV-1 感染症の病態進行への関与に関して検討し、これを明らかにする。

### (3) HIV-1 感染患者よりの初代培養細胞を用いた解析:

HIV-1 感染患者の初代培養細胞を用いて、前述の APOBEC3 発現プロファイル、SNPs 解析を行い、その臨床病態 (患者 CD4(+)T 細胞数、ウイルス RNA 量、および AIDS への進行期間等) との相関を明らかにする。

### (4) 免疫不全マウスモデルを用いた解析:

NOD/SCID/IL-2R- $\gamma^{\text{null}}$ (NOG) マウスへの臍帯血移植 HIV-1 感染モデルを用いて、*in vivo* における APOBEC3 蛋白の HIV-1 への変異導入の詳細を明らかにする。

### (5) 次世代シーケンサーを用いた HIV-1 への変異導入・蓄積過程の解析:

健常成人標的細胞における *in vitro* HIV-1 複製モデル、NOG マウスへの臍帯血移植 HIV-1 感染モデル、患者検体を材料として、次世代シーケンサー GS Junior Bench Top System (Roche Diagnostics) を用いて、変異導入・蓄積の過程を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 初代培養細胞を用いた APOBEC3 蛋白群の発現と HIV-1 複製解析:

### (2) 初代培養細胞を用いた APOBEC3 遺伝子群の SNPs と HIV-1 複製解析:

初代培養細胞における APOBEC3B の SNPs 解析を行い、欠失ヘテロ、ホモ接合体に各群における、各種 APOBEC3 の発現解析を行った。ホモ接合体においては、APOBEC3B の発現を認めなかったが、他の APOBEC3 の発現に有意差はなかった。ヘテロ接合体においては、全ての APOBEC3 の発現に有意差はなかった。さらに、これらの初代培養細胞を用いて感染実験を行い、APOBEC3B 欠損ホモ接合体の健常人の初代培養細胞においては、ウイルスの増殖に差がないことを示した。

(3) HIV-1 感染患者よりの初代培養細胞を用いた解析：

感染者コホートを用いて、APOBEC3B の SNPs 解析を行った。HIV 感染者と非感染健常人においては、欠損ヘテロ並びにホモ接合体の頻度に相違は認められず、HIV-1 感染における APOBEC3B の遺伝子多型の影響は見られなかった。

(4) 免疫不全マウスモデルを用いた解析：

(5) 次世代シーケンサーを用いた HIV-1 への変異導入・蓄積過程の解析：

臍帯血を移植した NOG マウスへの HIV-1 感染系を用いて、HIV-1 の in vivo での複製プロファイル、およびシーケンスによる変異導入パターンを検討した。Vif の変異体を用いることで、APOBEC3G、および APOBEC3F のみの影響を in vivo で検出可能な系を用いた解析を行い、in vivo において APOBEC3G はより強力な抗 HIV 活性を示すこと、一方 APOBEC3F は、ウイルスの適応進化に寄与していることを見出した。

## 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)

1. Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Nagata T, Katahira M. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. **Biochem Biophys Res Commun.**425(2):284-9, 2012.
2. Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. **J**

**Proteomics.**75(15):4863-73, 2012.

3. Shinohara M, Io K, Shindo K, Matsui M, Sakamoto T, Tada K, Kobayashi M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. **Sci Rep.**2:806, 2012.
4. Chonabayashi K, Hishizawa M, Kawamata S, Nagai Y, Ohno T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. **Leukemia.**27(6):1433-6, 2013.
5. Fujita H, Kitawaki T, Sato T, Maeda T, Kamihira S, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. **Eur J Immunol.**43(1):93-103, 2013.
6. Sato T, Kitawaki T, Fujita H, Iwata M, Iyoda T, Inaba K, Ohteki T, Hasegawa S, Kawada K, Sakai Y, Ikeuchi H, Nakase H, Niwa A, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Human CD1c+ Myeloid Dendritic Cells Acquire a High Level of Retinoic Acid-Producing Capacity in Response to Vitamin D3. **J Immunol.**191(6):3152-60, 2013.
7. Shimazu Y, Kondo T, Ishikawa T, Yamashita K, Takaori-Kondo A. Human herpesvirus-6 encephalitis during hematopoietic stem cell transplantation leads to poor prognosis. **Transpl Infect Dis.**15(2):195-201, 2013.
8. Takaori-Kondo A, Shindo K. HIV-1 Vif: a guardian of the virus that opens up a new era in the research field of restriction factors. **Front Microbiol.**4:34, 2013.
9. Arai Y, Nishinaka Y, Arai T, Morita M, Mizugishi K, Adachi S, Takaori-Kondo A, Watanabe T, Yamashita K. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. **Biochem Biophys Res**

- Commun.**443(2):556-61, 2014.
10. Furukawa A, Sugase K, Morishita R, Nagata T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Katahira M. Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy. **Angew Chem Int Ed Engl.**53(9):2349-52, 2014.
  11. Imahashi M, Izumi T, Watanabe D, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Kaneko N, Ichikawa S, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Utsumi M, Yokomaku Y, Shirasaka T, Sugiura W, Iwatani Y, Naoe T. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk. **PLOS ONE.**9(3):e92861, 2014.
  12. Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Io K, Tada K, Iwai F, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris RS, Takaori-Kondo A. Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBFbeta by site-directed mutagenesis. **Virology.**449:82-7, 2014.
  13. Mikawa T, Maruyama T, Okamoto K, Nakagama H, Lleonart ME, Tsusaka T, Hori K, Murakami I, Izumi T, Takaori-Kondo A, Yokode M, Peters G, Beach D, Kondoh H. Senescence-inducing stress promotes proteolysis of phosphoglycerate mutase via ubiquitin ligase Mdm2. **J Cell Biol.**204(5):729-45, 2014.
  14. Mori F, Ishida T, Ito A, Sato F, Masaki A, Narita T, Suzuki S, Yamada T, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Hishizawa M, Imada K, Takaori-Kondo A, Niimi A, Ueda R, Inagaki H, Iida S. Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. **Eur J Haematol.**92(3):219-28, 2014.
  15. Sakamoto T, Kobayashi M, Tada K, Shinohara M, Io K, Nagata K, Iwai F, Takiuchi Y, Arai Y, Yamashita K, Shindo K, Kadowaki N, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A. CKIP-1 is an intrinsic negative regulator of T-cell

activation through an interaction with CARMA1. **PLOS ONE.**9(1):e85762, 2014.

〔雑誌論文〕(計 44 件)

〔学会発表〕(計 148 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況

○取得状況

特になし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

高折 晃史 (京都大学・医学研究科)

研究者番号 : 20324626

### (2)連携研究者

小柳 義夫 (京都大学・ウイルス研究所)

研究者番号 : 80215417