

特集：HIV 複製研究の最前線

APOBEC3 ファミリー蛋白

APOBEC3 Family Proteins

高折晃史

Akifumi TAKAORI-KONDO

京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学

Graduate School of Medicine, Kyoto University

APOBEC3G は、新規に同定された抗 HIV-1 宿主因子である。本分子は、シチジンデアミナーゼに保存された配列を有し、HIV-1 の 1 本鎖 DNA のシトシン (C) をウラシル (U) に変換することにより抗 HIV-1 活性を示す。一方、HIV-1 Vif は、Cullin5, ElonginB/C と E3 リガーゼ複合体を形成し、APOBEC3G をユビキチン-プロテアソーム依存的に分解する事で、APOBEC3G の抗 HIV-1 活性を中和し、標的細胞における HIV-1 の複製を助けている。本稿では、APOBEC3G を中心として APOBEC3 蛋白の抗ウイルス活性の詳細と、HIV-1 Vif を中心にウイルスのそれからの逃避について、我々のデータを交えて最新の知見を紹介する。

はじめに

HIV-1 は、その複製に多くの宿主因子を必要とするが、その一方で近年、HIV-1 の複製を抑制する重要な複数の宿主因子が明らかにされた。これらの宿主因子は、本来 HIV-1 の標的細胞中に存在し、HIV-1 の複製を抑制するのみならず、種間の伝播を阻止するバリアーとしても働いている。本稿では、それらの中で、APOBEC3 蛋白に焦点を当て、我々のデータを交えながら述べたいと思う。

1. Vif 蛋白による HIV-1 の感染性制御と APOBEC 3G の同定

まず APOBEC3G の発見にいたる経緯に関して述べるためには、Vif 蛋白に関する研究の歴史について述べなければならない。HIV-1 は、通常のレトロウイルス構成蛋白である Gag, Pol, Env 以外に 6 種類のアクセサリ蛋白 (Tat, Rev, Vpr, Vpu, Vif, Nef) を有するが、これらはいずれも HIV-1 の複製に重要な役割を果たしている。その中で Vif (viral infectivity factor) は、種々のレンチウイルスにおいて高度に保存されたアミノ酸配列を有し、1980 年台の後半には既に HIV-1 の感染性に必須であることが示されていた¹⁾。引き続き 1990 年台前半には、*in vitro* 実験系により、Vif はその機能の発現に細胞種特異性を有することが示さ

れた²⁾。つまり、Vif は HeLa 細胞等において作製されたウイルス複製に必須ではないが (従ってこれらの細胞を許容細胞と呼ぶ)、HIV-1 の本来の標的細胞である CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージ等においては、Vif の非存在下で作製されたウイルスには感染性がなく、感染性ウイルス粒子の生成に Vif が必須である (これらの細胞を非許容細胞と呼ぶ) ことが示された。これら Vif 欠失ウイルスには構成蛋白およびゲノム RNA に量的な違いは認められず、また、この細胞種特異性は、標的細胞ではなく、ウイルス産生細胞に依存しており、ウイルス産生細胞中の細胞性因子による可能性が示唆されていた。許容細胞が Vif の機能を補完する因子を有しているのか、あるいは非許容細胞が Vif によって中和される抑制性因子を有しているのか、という二つの可能性が考えられたが、1998 年、許容細胞と非許容細胞を融合させた実験により、融合細胞が非許容細胞の表現型を示した事で後者の可能性が強く示唆された^{3,4)} (図 1)。さらに同年、Desrosiers らは、各種のアクセサリ遺伝子を欠失した Simian Immunodeficiency Virus (SIV) 変異株をサルに接種した *in vivo* 実験系により、Vif 欠失変異株が野生型の 0.005% の複製効率しか認めず、また AIDS も発症しないことを示し、*in vivo* における HIV-1 の複製および AIDS 発症に Vif が極めて重要な役割を担っている事を証明した⁵⁾。以上のように、HIV-1 感染において Vif は極めて重要な役割を果たしており、その決定因子としてウイルス産生細胞中の抗 HIV-1 因子の存在が示唆されていたが、APOBEC3G の同定までにはさらに 4 年の

著者連絡先：〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54 京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学

2008 年 1 月 29 日受付

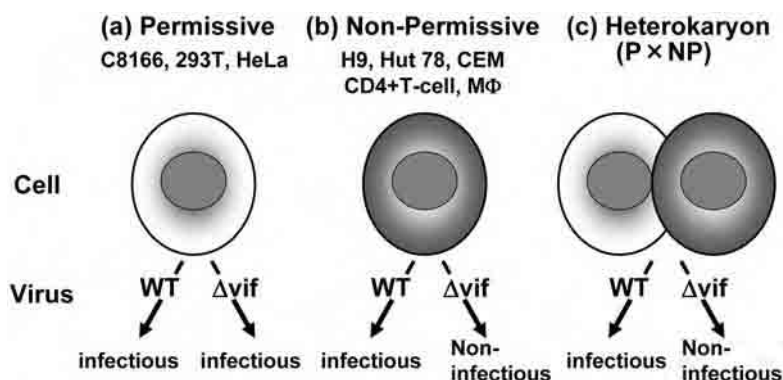


図 1 Vif 機能の細胞種特異性

歳月を待たねばならなかった。このような背景のもと、2002年、Malimらのグループは、非許容細胞であるCEM細胞とその重株で許容細胞であるCEM-SS細胞を用いたsubtraction cloningによりその宿主因子の同定に成功した。それが、Apolipoprotein B mRNA editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G)である。彼らはさらに、APOBEC3Gを許容細胞に導入することで非許容細胞の表現型を得られる事を示し、APOBEC3Gの発現が非許容性の表現型に十分な因子であることも証明した⁶⁾。

2. APOBEC3Gの抗HIV-1活性

1990年代よりHIV-1ウイルスゲノムにおいて、GからAへの変異頻度が他の変異に対して優位に高い事が知られていたが、これは単に逆転写時のエラーによるものと考えられていた。2003年、Hanceらのグループは、これらのGからAへの変異(G-to-A hypermutation)が、Vif欠失ウイルスに特異的であることを見いだした⁷⁾。APOBEC3Gは、APOBEC1やactivation-induced cytidine deaminase (AID)に代表されるシチジンデアミナーゼに保存されたアミノ酸配列を持つ蛋白質ファミリーに属し⁸⁾、当初よりそのシチジンデアミナーゼ活性が抗HIV-1活性に必要であろうと考えられたが、この仮説を実証するかたちでその抗HIV-1活性の機序が、我々を含む複数のグループにより明らかになった⁹⁻¹²⁾(図2a)。すなわち、APOBEC3Gは、逆転写の際にマイナス(一本)鎖DNAのdCをdUに変換し、この変異は、プラス鎖DNAに多数のGからAへの変異を導入し、その結果アミノ酸の変異をもたらすことで蛋白質の機能喪失や停止コドンの導入によりウイルス複製を阻害するのである。その他、マイナス鎖DNA中のUの存在は、プラス鎖DNAの合成を阻害したり、あるいはUracil DNA glycosylase (UNG)によって取り除かれウイルスDNAの切断、分解が起こるといった機序の存在が考えられている。また、本分子の生化学的解析により、本分子は、主に

一本鎖DNAを基質としていること¹³⁾、また、活性部位をN端C端二ヶ所に有しているが、N端の活性部位は核酸等への結合に必要であり、一方C端の活性部位は酵素活性および抗HIV-1活性に必須であること等が示された¹¹⁾。しかしながら、一方でシチジンデアミナーゼ活性に非依存性の抗HIV-1活性の存在も示唆されており¹⁴⁾、それはウイルスの逆転写過程を阻害しているという報告も複数存在する^{15,16)}。以上を総合すると、現時点においては、APOBEC3Gの抗HIV-1活性は、主にはシチジンデアミナーゼ活性に依存するが、非依存性の抗HIV-1活性も存在すると思われる。

3. APOBEC3Gのもう一つの抗HIV-1活性

2003年、Warner Greeneらのグループは、APOBEC3Gが細胞内でRNA依存的な蛋白複合体を形成する事を報告した¹⁷⁾。彼らの報告によれば、APOBEC3Gは細胞内において分子量約700 kDa以上の複合体(high molecular mass : HMM)と約46-100 kDaの複合体(low-molecular-mass : LMM)で存在し、LMM APOBEC3Gはデアミナーゼ活性を示すのに対し、HMM APOBEC3Gはその活性を消失しており、また、RNase処理によりHMMはLMMへと変化することより、HMMはRNA依存的に形成されている事が判明した。休止期CD4陽性T細胞や単球は、LMM APOBEC3Gのみを発現しており、HIV-1感染に対して耐性を示す。一方、IL-2やIL-15などのサイトカイン刺激は、LMM APOBEC3GをHMM APOBEC3Gに変化させるとともに、活性化T細胞はHIV-1感染に感受性になる。さらに、siRNAを使用して休止期CD4陽性T細胞中のLMM APOBEC3GをノックダウンするとHIV-1感染に対して感受性になることから、休止期CD4陽性T細胞が有するLMM APOBEC3Gは侵入してきたウイルスに対して(Vifの存在下であっても)抗HIV-1活性を発揮し、休止期のCD4陽性T細胞がHIV-1感染に抵抗性であるのはLMM

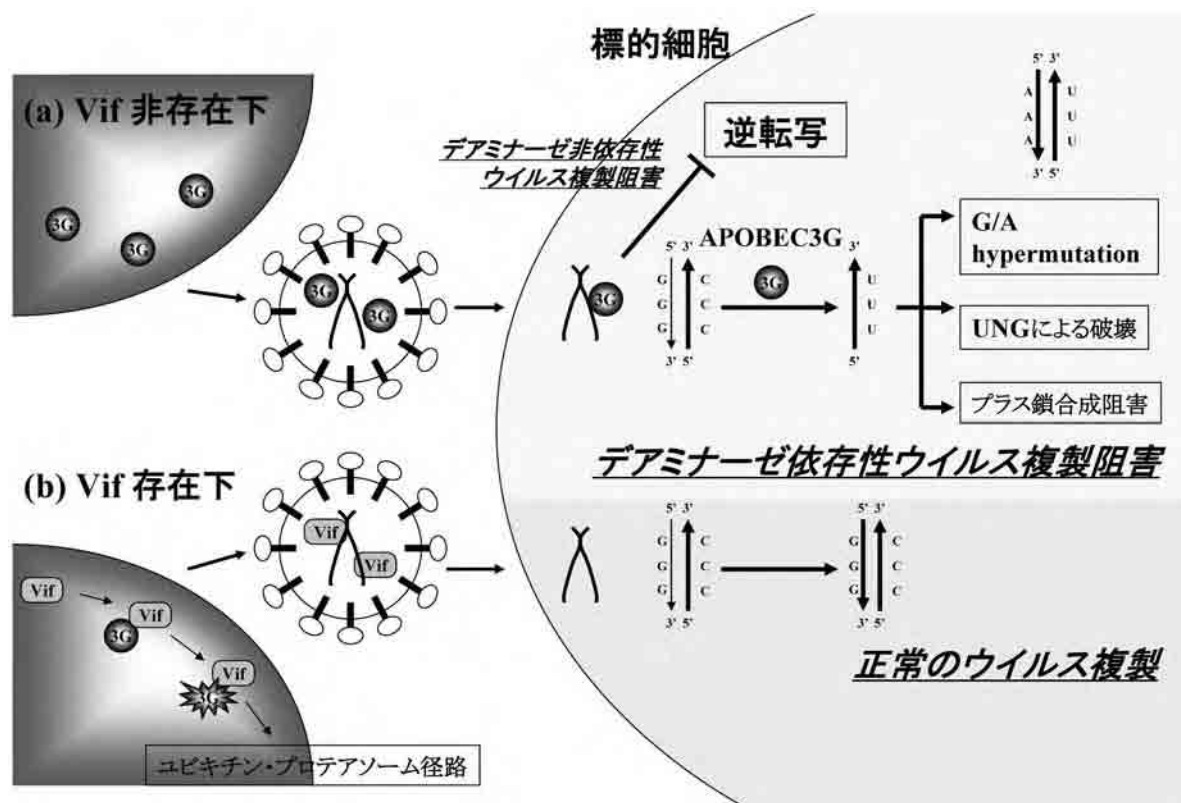


図 2 APOBEC3G の抗 HIV-1 活性

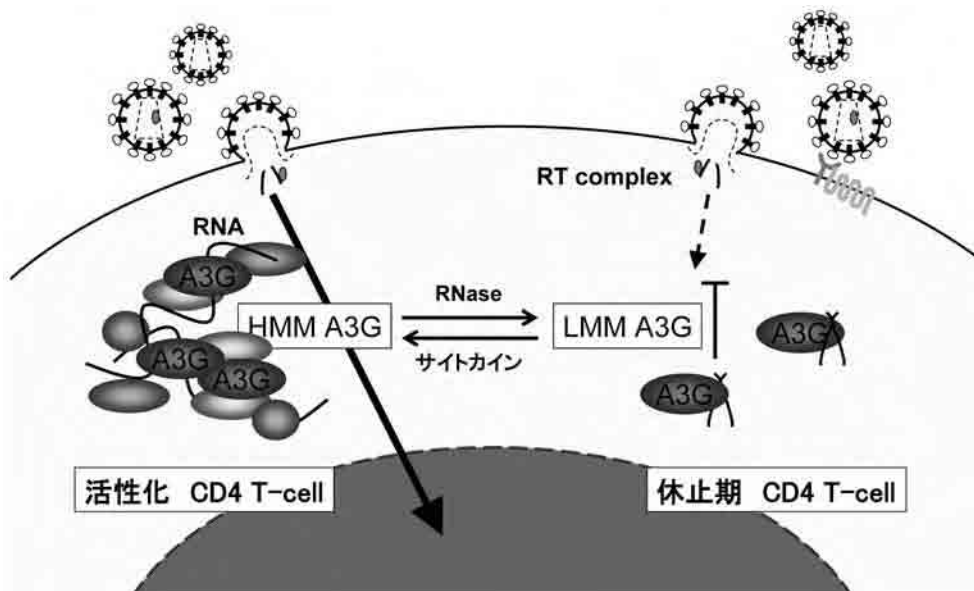


図 3 APOBEC3G のもう一つの抗 HIV-1 活性

APOBEC3G が原因分子であるという新たな概念を提唱したが、本抗 HIV-1 活性に関しては未だに議論が残っている (図3)。

またその後の HMM 中に含まれる蛋白, RNA の網羅的解析により, HMM 中には, レトロエレメントである Alu や hY, リボヌクレオ蛋白 (RNPs) である Staufen, Ro, Pre-

splicesomes 等が含まれることを報告した¹⁸⁾。

4. Vif 蛋白質による APOBEC3G の中和

APOBEC3G による抗 HIV-1 活性の機序が徐々に明らかにされる中、Vif がいかにして APOBEC3G を中和しているかに関しても、次々と明らかにされた。まず、Vif が APOBEC3G に結合することにより、ウイルス粒子中への APOBEC3G の取り込みが特異的に阻害されることが示された¹⁹⁾。次に、ウイルス産生細胞中において、Vif の共発現により APOBEC3G 蛋白質の発現量は減少するが、mRNA の発現量には変化がないことから、転写後調節の機序の存在が示唆された。さらに、プロテアソーム阻害薬を用いた実験により、Vif 存在下における APOBEC3G の発現量が Vif 非存在下と同等まで回復したことより、Vif による APOBEC3G の阻害は、ユビキチン・プロテアソーム系による分解反応であることが示唆された^{20,21)} (図 2b)。しかし一方では、Vif は APOBEC3G の翻訳を阻害するという報告²²⁾、または、ユビキチン・プロテアソーム系非依存的にこれを阻害するという報告²³⁾ も存在する。Vif は、その C 末端に SLQ (Y/F) LAFFFF という保存されたアミノ酸配列を持ち、それが SOCS 蛋白質の BC-box モチーフに酷似していることから、SOCS 蛋白質と同様に E3 ユビキチンリガーゼ複合体の一部として働く可能性が示唆された (図 4)。果たして、Vif に結合する蛋白質のマススペクトロメトリ解析により、Vif がユビキチンリガーゼ複合体である Cullin5, ElonginB/C (Cul5, EloB/C) と結合することが示された²⁴⁾。SLQ (Y/F) LAFFFF 部位の Vif 変異体およびこれらの蛋白質の dominant negative 変異体を用いた実験

より、Vif は Cul5, EloB/C と E3 複合体を形成し、基質認識サブユニットとして作用し、標的蛋白質である APOBEC3G と結合する事でこれをユビキチン化することが示された。最終的には、我々が樹立した本複合体の精製蛋白質を用いた *in vitro* ユビキチン化アッセイにより、Vif-BC-Cul5 複合体による APOBEC3G のユビキチン化が直接的に証明された²⁵⁾。さらに、その後の解析により、Vif が Vif-BC-Cul5 複合体を形成する際、BC Box モチーフを用いて EloB/C と^{26,27)}、HCCH という Zn 結合モチーフを用いて Cul5 と結合していることが示されている^{28,29)} (図 4)。

興味深いことに、HIV-1 Vif はヒト以外の種の APOBEC3G を中和することができないことが当初より示されていた。具体的には、HIV-1 Vif はアフリカモドリザル (African green monkey (AGM)) の APOBEC3G と結合できず、従ってこれを抑制できず、逆に SIV_{AGM} Vif はヒトの APOBEC3G を中和する事ができない。種間の APOBEC3G は相同性が高く、わずかなアミノ酸の相違しかなく、これら種間のキメラを用いた実験より、128 番目のアミノ酸残基をヒトのアスパラギン酸 (D) から AGM のリシン (K) に置換した APOBEC3G (D128K 変異型 APOBEC3G) は HIV-1 Vif の制御を受けない事が複数のグループにより同時に報告され、128 番目のアミノ酸がその種特異性を決定していることが判明した³⁰⁻³²⁾。この結果は、APOBEC3G が宿主特異的防御機構としてレンチウイルスの種族間における拡散を防いでいることを示唆しており興味深い。

しかしながら、D128 が Vif との結合に重要なアミノ酸であることが判明している一方で、正確な Vif との結合部位は現時点では未解明であり、また、Vif 側の APOBEC3G

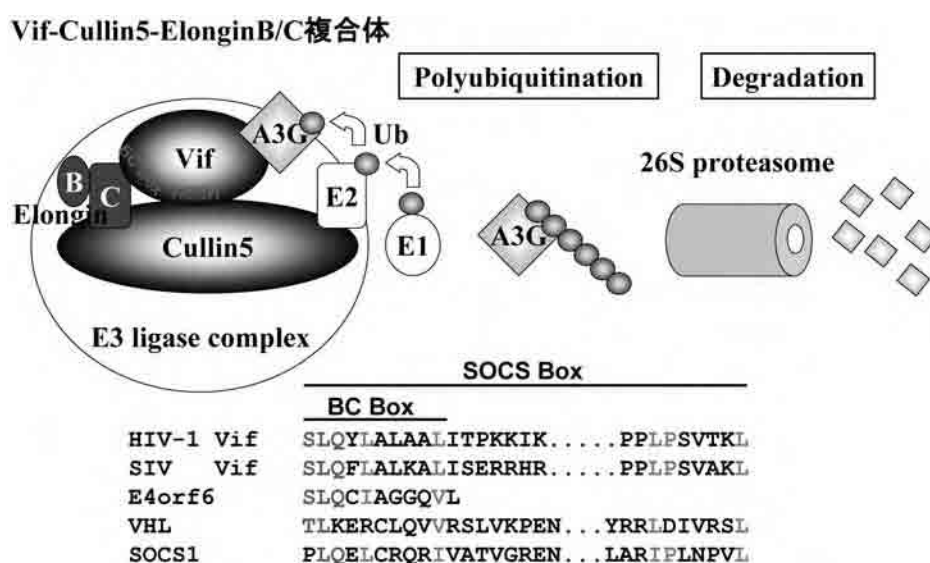


図 4 Vif 蛋白質による APOBEC3G のユビキチン化

との結合部位に関しても、一定の見解を得られていない。これは、APOBEC3G, Vifともにいまだその構造決定がなされていないことも一因であり、今後の創薬の観点からもその早期の構造決定が望まれる。

5. APOBEC3 ファミリー蛋白の広範な抗ウイルス活性

APOBEC3G 以外の APOBEC3 蛋白の抗 HIV-1 活性に関しても多くの報告がなされている。まず、APOBEC3B, APOBEC3DE, APOBEC3F は、ともに抗 HIV-1 活性を有するが、APOBEC3DE, APOBEC3F は Vif により阻害されるのに対し³³⁻³⁵、APOBEC3B は Vif に抵抗性である³⁶。さらに、これらの分子の Vif 感受性は、APOBEC3G と同様 Vif-Cul5-Elp1/C E3 複合体によるユビキチン化、プロテアソーム依存的分解反応に依存する³⁷。また、APOBEC3C は、抗 HIV-1 活性を持たないが、抗 SIV 活性を持つ³⁸。本 APOBEC ファミリーのプロトタイプである APOBEC1 は、ヒト APOBEC1 は抗 HIV-1 活性をもたないが、ラット APOBEC1 は抗 HIV-1 活性を持ち、その酵素活性は G-to-A hypermutation ではなく、C-to-T hypermutation である事から、DNA ではなく RNA をターゲットとしている可能性が示唆されている³⁹。また、マウスはヒトと異なり 1 種類の APOBEC3 (mAPOBEC3) 蛋白しか持たない。mAPOBEC3 も、抗 HIV-1 活性を有するが、Vif による阻害を受けないことが明らかになっている^{40,41}。

その後、APOBEC3 ファミリー蛋白は、さまざまなウイルスに対して抗ウイルス活性を有することが示された。それは、HTLV-1 等のレトロウイルスにとどまらず⁴²、B 型肝炎ウイルス⁴³、アデノ随伴ウイルス⁴⁴、さらにはレトロ

トランスポゾンにおよび⁴⁵、この分子ファミリーが抗ウイルス自然免疫として重要な役割を担っていることが明らかになったのである (図 5)。さらに、最近の研究は、HIV-1 以外のウイルスがいかにして、本分子による自然免疫を逃れているのかを明らかにしつつある。まず、foamy virus の Bet 蛋白は、Vif となら homology を持たない蛋白ではあるが、やはり、APOBEC3 と結合し、ウイルス粒子中からこれを排除する役割を示す。しかしながら、その機序はプロテアソームによる分解ではなく、未知のものである^{46,47}。また、最近の我々の研究により、Vif タンパク質を持たない単純レトロウイルスであるマウス白血病ウイルス (MLV) は、ウイルス RNA により mAPOBEC3 のウイルス中への mAPOBEC3 の侵入を阻害する一方、ウイルスプロテアーゼによりウイルス中に侵入した mAPOBEC3 を不活化させ、ウイルスの感染性を保持することが明らかになった⁴⁸。従って、MLV は、Vif のようなアクセサリ蛋白を持たずとも、そのウイルス構成要素である、ウイルス RNA およびウイルスプロテアーゼを用いて、mAPOBEC3 から逃避するのである。また HTLV-1 は、NC の構造が APOBEC3 のウイルス粒子中への進入を阻害する⁴⁹。これらの機序は、HIV-1 のそれとは大きく異なるが、同様にアクセサリ蛋白を持たない他のウイルスが使用している可能性が十分に考えられ、ウイルスが本宿主因子を逃れるため、独自の進化をとげてきた様が見て取れ非常に興味深い (図 5)。

おわりに

以上のように、新規の抗 HIV-1 宿主因子である APOBEC3 ファミリー、特に APOBEC3G が同定されてからわずか 5 年の間に、その抗ウイルス活性と、それに対抗する

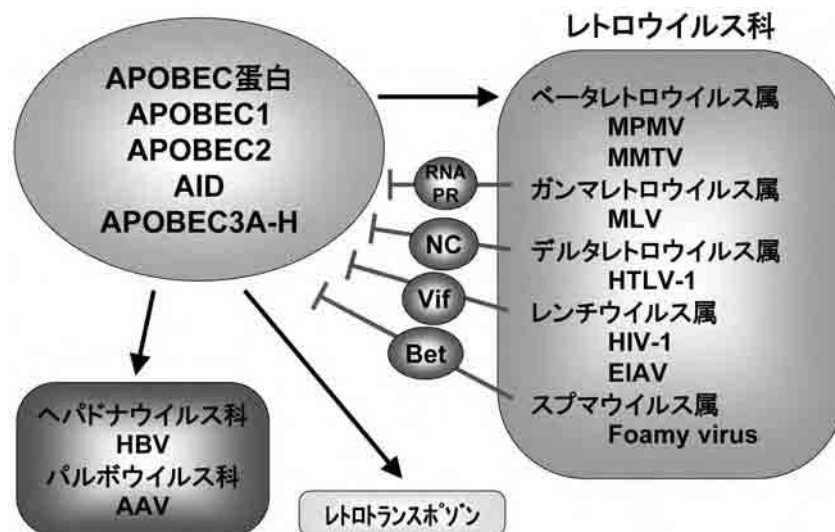


図 5 APOBEC3 ファミリー蛋白の広範な抗ウイルス活性

Vif 蛋白の機能の分子メカニズムの詳細が明らかにされた。これらの知見は、単に HIV-1 にとどまらず、APOBEC3 ファミリー蛋白が、レトロウイルスを含めた多くのウイルス感染さらにはレトロトランスポジションを抑制する抗ウイルス宿主因子として働いていることを示しており、新たな自然免疫の概念を創出するものであり科学的な意義が高いのみならず、新たな抗ウイルス薬開発の標的となりうる可能性を示した点で臨床的にもきわめて重要な成果であったといえよう。現在、我々を含めた複数のグループが本分子を標的とした新たな抗 HIV-1 薬の開発を目指しているが、その実現化を希求して本稿を締めくくりたい。

文 献

- 1) Strebel K *et al.* : Nature 328 : 728, Aug 20-26, 1987.
- 2) Sakai H *et al.* : J Virol 67 : 1663, Mar, 1993.
- 3) Simon JH, Gaddis NC, Fouchier RA, Malim MH : Nat Med : 4, 1397, Dec, 1998.
- 4) Madani N, Kabat D : J Virol 72 : 10251, Dec, 1998.
- 5) Desrosiers RC *et al.* : J Virol 72 : 1431, Feb, 1998.
- 6) Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH : Nature 418 : 646, Aug 8, 2002.
- 7) Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ : Science 300 : 1112, May 16, 2003.
- 8) Jarmuz A *et al.* : Genomics 79 : 285, Mar, 2002.
- 9) Harris RS *et al.* : Cell 113 : 803, Jun 13, 2003.
- 10) Mangeat B *et al.* : Nature 424 : 99, Jul 3, 2003.
- 11) Shindo K *et al.* : J Biol Chem 278 : 44412, Nov 7, 2003.
- 12) Zhang H *et al.* : Nature 424 : 94, Jul 3, 2003.
- 13) Yu Q *et al.* : Nat Struct Mol Biol 11 : 435, May, 2004.
- 14) Newman ENC *et al.* : Current Biology 15 : 166, 2005/1/26, 2005.
- 15) Guo F, Cen S, Niu M, Saadatmand J, Kleiman L : J Virol, 80 : 11710, 2006.
- 16) Iwatani Y *et al.* : Nucleic Acids Res 35 : 7096, 2007.
- 17) Chiu YL *et al.* : Nature 435 : 108, May 5, 2005.
- 18) Chiu YL *et al.* : Proc Natl Acad Sci U S A 103 : 15588, Oct 17, 2006.
- 19) Mariani R *et al.* : Cell 114 : 21, Jul 11, 2003.
- 20) Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH : Nat Med 9 : 1404, Nov, 2003.
- 21) Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D : Nat Med 9 : 1398, Nov, 2003.
- 22) Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene WC : Mol Cell 12 : 591, Sep, 2003.
- 23) Santa-Marta M, da Silva FA, Fonseca AM, Goncalves J : J Biol Chem 280 : 8765, March 11, 2005.
- 24) Yu X *et al.* : Science 302 : 1056, Nov 7, 2003.
- 25) Kobayashi M, Takaori-Kondo A, Miyauchi Y, Iwai K, Uchiyama T : J Biol Chem 280 : 18573, May 13, 2005.
- 26) Mehle A, Goncalves J, Santa-Marta M, McPike M, Gabuzda D : Genes Dev 18 : 2861, December 1, 2004.
- 27) Yu Y, Xiao Z, Ehrlich ES, Yu X, Yu X-F : Genes Dev 18 : 2867, December 1, 2004.
- 28) Luo K *et al.* : Proc Natl Acad Sci U S A 102 : 11444, Aug 9, 2005.
- 29) Xiao Z *et al.* : Virology 349 : 290, Jun 5, 2006.
- 30) Schrofelbauer B, Chen D, Landau NR : PNAS 101 : 3927, March 16, 2004.
- 31) Bogerd HP, Doehle BP, Wiegand HL, Cullen BR : PNAS 101 : 3770, March 16, 2004.
- 32) Xu H *et al.* : PNAS 101 : 5652, April 13, 2004.
- 33) Zheng Y-H *et al.* : J Virol 78 : 6073, June 1, 2004.
- 34) Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, Cullen BR : Embo J 23 : 2451, Jun 16, 2004.
- 35) Dang Y, Wang X, Esselman WJ, Zheng YH : J Virol 80 : 10522, Nov, 2006.
- 36) Doehle BP, Schafer A, Cullen BR : Virology 339 : 281, 2005/9/1, 2005.
- 37) Shirakawa K *et al.* : Virology 344 : 263, 2006/1/20, 2006.
- 38) Yu Q *et al.* : J Biol Chem 279 : 53379, December 17, 2004.
- 39) Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Malim MH : Science 305 : 645, Jul 30, 2004.
- 40) Kobayashi M *et al.* : J Virol 78 : 8238, August 1, 2004.
- 41) Bishop KN *et al.* : Current Biology 14 : 1392, 2004/8/10, 2004.
- 42) Sasada A *et al.* : Retrovirology 2 : 32, 2005.
- 43) Turelli P, Mangeat B, Jost S, Vianin S, Trono D : Science 303 : 1829, March 19, 2004.
- 44) Chen H *et al.* : Curr Biol 16 : 480, Mar 7, 2006.
- 45) Esnault C *et al.* : Nature 433 : 430, Jan 27, 2005.
- 46) Russell RA *et al.* : J Virol 79 : 8724, July 15, 2005.
- 47) Lochelt M *et al.* : Proc Natl Acad Sci U S A 102 : 7982, May 31, 2005.
- 48) Abudu A *et al.* : Curr Biol 16 : 1565, Aug 8, 2006.
- 49) Derse D, Hill SA, Princler G, Lloyd P, Heidecker G : Proc Natl Acad Sci U S A 104 : 2915, Feb 20, 2007.