

## 原 著

HIV-1 感染霊長類モデルの樹立に向けた, *Macaca* 属サルにおける  
*TRIM5* 遺伝子の多様性に関する研究

齊藤 暁<sup>1,2)</sup>, 河野 健<sup>3)</sup>, 川本 芳<sup>1)</sup>, 東濃 篤徳<sup>1)</sup>, 鈴木 紗織<sup>1)</sup>, 吉田 友教<sup>1)</sup>,  
鳥居 隆三<sup>4)</sup>, 保富 康宏<sup>5)</sup>, 塩田 達雄<sup>3)</sup>, 中山 英美<sup>3)</sup>, 明里 宏文<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 京都大学霊長類研究所, <sup>2)</sup> 公益財団法人エイズ予防財団, <sup>3)</sup> 大阪大学微生物病研究所,  
<sup>4)</sup> 滋賀医科大学動物生命科学センター, <sup>5)</sup> 独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医学研究センター

**目的と意義:** 現在, われわれはサル指向性 HIV-1 と *Macaca* 属サルを用いた実用的な HIV-1 感染霊長類モデルの樹立を進めている。しかし, ウイルス感染感受性に強く影響しうる *Macaca* 属サルの *TRIM5* 遺伝子についての遺伝学的な情報は一部のサル種のものに限定されている。そこで本研究では, より適切なエイズ研究の動物モデル構築にこれら遺伝学的情報を応用することを目的とし, *TRIM5* 遺伝子について広範に遺伝学的解析を行った。

**方法:** 複数種の *Macaca* 属サル *TRIM5* 遺伝子について, 野生型アレル *TRIM5a* と変異型アレル *TRIM5cyp* の頻度を評価した。さらに, *TRIM5cyp* に関して, ハプロタイプの解析を行った。

**結果:** アカゲザル, カニクイザルには *TRIM5cyp* アレルが存在し, また, *TRIM5a/TRIM5cyp* 頻度においては地理的偏りが認められた。一方で, ニホンザルなどのサル種では *TRIM5cyp* は存在しないことが示唆された。

**考察:** 本研究により, アジア広域に生息する *Macaca* 属サルの *TRIM5* 遺伝子に関する全体像が明らかとなった。なお, 本研究で明らかにされた, *TRIM5* 遺伝子における顕著な多様性の存在はウイルス感染感受性の違いにつながるが予測されるため, サルを用いた HIV-1 感染モデル構築に当たっては, *TRIM5* を含む内在性宿主因子による影響を考慮する必要があると考えられた。

**キーワード:** 動物モデル, *TRIM5* 遺伝子, 遺伝的多様性

日本エイズ学会誌 16: 28-36, 2014

## 緒 言

カニクイザル (*Macaca fascicularis*), アカゲザル (*Macaca mulatta*) などの実験用 *Macaca* 属サル (以下, マカクとする) は, 麻疹やポリオ, インフルエンザなど, ヒトウイルス感染症の研究領域においてきわめて重要なモデル動物である。他方, 後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の宿主域は非常に狭いことが知られており, HIV-1 が感染, 増殖できる動物種はチンパンジーなどの類人猿に限定され, マカク細胞および個体ではほとんど増殖できない。そのため, 代替モデルとして, サルに AIDS 様症状を引き起こすサル免疫不全ウイルス (SIV) もしくは, SIV に HIV-1 遺伝子の一部領域を挿入したキメラウイルス (SHIV) を用いたマカク感染モデルが汎用されてきた。それでは, なぜ HIV-1 はマカク細胞で増殖できないのだろうか? この疑問を解く鍵として, 近年, サル細胞で HIV-1 の増殖を抑制する宿主細胞性因子の存在が徐々に明らかになってきた。具体的なアプ

ローチとして, 種々のキメラウイルス (SHIV) を用いることで, HIV-1 と SIV のどの遺伝子領域が宿主域の違いに関与しているのか検討が進められた。その結果, マカク細胞における主要な抗 HIV-1 宿主因子として tripartite motif protein 5a (*TRIM5a*), apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3 (*APOBEC3*) ファミリー, bone marrow stromal antigen 2 (*BST-2*, Tetherin としても知られる) が同定された<sup>1-5)</sup>。その後, これら HIV-1 増殖抑制因子と相互作用するウイルス蛋白の機能領域やその分子機序の解明が進んでいる。それでは, これら宿主因子による抑制を回避することで, マカク細胞で増殖可能な HIV-1 を作出できるのだろうか? 2006 年, 2つの国内外の研究グループにより, マカク細胞で増殖可能な HIV-1 であるサル指向性 HIV-1 (*macaque-tropic HIV-1* (*HIV-1mt*)) が構築された<sup>5-8)</sup>。その後われわれは, カニクイザル個体で効率よく増殖する HIV-1mt を樹立し<sup>9)</sup>, また, より増殖能が向上した HIV-1mt (クローン名: MN4Rh-3) の獲得にも成功している。これらの結果より, マカク細胞におけるウイルス増殖抑制性宿主因子を回避することで, HIV-1 がマカクで増殖可能となることが明らかとなった<sup>10)</sup>。今後, ヒトでのウイルス増殖の動態をサルで再現することで, HIV-1 の病原性の解明や新規治療法

著者連絡先: 齊藤 暁, 明里宏文 (〒484-8506 犬山市官林 41-2 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター)

2013 年 8 月 30 日受付; 2013 年 12 月 16 日受理

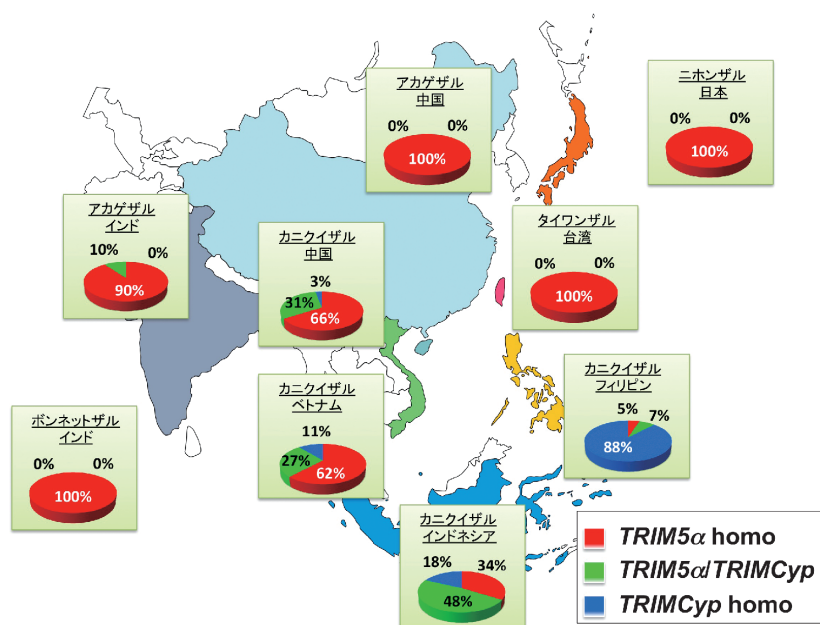


図 1 マカク *TRIM5* 遺伝子の地理的多様性

マカクにおける各 *TRIM5* 遺伝子型の割合をサル種および地域ごとに円グラフで示した。

の開発などへの応用が期待される。

ところでわれわれは、サル細胞での HIV-1mt 感染実験の過程において、効率よいウイルス増殖が認められるカニクイザル個体(感受性個体)と、ほとんどウイルス増殖の認められない個体(抵抗性個体)が存在することを見出した。この実験において解析に用いたカニクイザルは東南アジアの3カ国(フィリピン、インドネシア、マレーシア)を由来とするが、不思議なことに感受性個体群にはフィリピン由来の個体が多く、逆に、抵抗性個体群にはインドネシア、マレーシア由来の個体が多い傾向が見られた。また、性別、年齢、健康状態や繁殖施設などの違いによる HIV-1 感受性への影響は認められなかった。サルの由来によって HIV-1mt 感受性が異なるという現象から、われわれは HIV-1mt 感受性を規定する何らかの遺伝的背景が存在するのではないかと推測した。この作業仮説を検証すべく、HIV-1mt 感受性に関与する宿主因子の同定を試みた。ここでわれわれは、強力な抗 HIV-1 因子のひとつとして知られている宿主因子 *TRIM5α* をコードする *TRIM5* 遺伝子における多型に着目した。*TRIM5α* はその基本的な構造として、N 末端から C 末端の順に、RING, B-box2, coiled-coil, PRYSPRY ドメインから構成される<sup>11)</sup>。*TRIM5α* は感染標的細胞の細胞質内に局在し、侵入してきた HIV-1 のカプシド蛋白と PRYSPRY ドメインを介して結合する。*TRIM5α* は結合したカプシド蛋白をユビキチン-プロテアソーム系に誘導し、HIV-1 の生活環における脱殻から逆転写の間の過程を阻害すると考

えられている<sup>12)</sup>。重要なことに、アカゲザル *TRIM5α* は HIV-1 に対し強い増殖抑制作用を示すが、ヒト *TRIM5α* にはこの活性が見られず、霊長類 *TRIM5α* の抗レトロウイルス効果は種特異性を示す。この種特異性はカプシド蛋白との結合能を有する PRYSPRY ドメインにより決定される<sup>13)</sup>。また、同じ *Macaca* 属に分類されるサルであっても、そのサル種間の PRYSPRY ドメインのアミノ酸配列は多様性に富んでいる。さらに、その多様性は種内においても認められ、実際アカゲザル *TRIM5α* には複数のアレルの存在が知られ、アレルによって SIV や HIV-2 のウイルス増殖に対する抑制機能に差があることが報告されている<sup>14, 15)</sup>。ところで、ブタオザル (*Macaca nemestrina*)、アカゲザル、カニクイザルなどある特定のサル種の *TRIM5* 遺伝子には野生型アレル *TRIM5α* のみではなく、*TRIM5α* の一部領域に対して外来遺伝子 *Cyclophilin A* (*CypA*) の一部が挿入された変異型アレル *TRIMCyp* が存在すると報告されている<sup>16~19)</sup>。*TRIMCyp* からは、*CypA* 遺伝子の挿入とともに認められる 3'-スプライス部位における 1 塩基置換により、*TRIM5α* の C 末端側が *CypA* に置換された融合タンパク質 *TRIMCyp* が発現される。*TRIM5α* の PRYSPRY ドメイン同様、*TRIMCyp* の *CypA* 領域は HIV-1 のカプシド蛋白と結合する能力を持つ。これまでに、アカゲザルおよびブタオザルの *TRIMCyp* は HIV-1 の増殖を抑制しないが、一部のカニクイザルが保有する *TRIMCyp* は HIV-1 の増殖を抑制することが報告されている<sup>20)</sup>。そこで、カニクイザルにおける *TRIM5* 遺伝子

型と HIV-1mt 感受性との関連性を検討した結果、1) カニクイザルには *TRIMCyp* を保有する個体が高率に存在すること、2) カニクイザル *TRIMCyp* アリル頻度には顕著な地理的多様性が存在し、フィリピン産の個体群ではインドネシア、マレーシア由来の個体群と比較して *TRIMCyp* 頻度が高いこと、3) *TRIMCyp* homozygote では *TRIM5 $\alpha$*  homozygote と比較して HIV-1mt 接種後の血中ウイルス量が約 50 倍高いことを見出した<sup>21, 22)</sup>。これら一連の結果は、HIV-1mt 感受性個体群にはフィリピン由来個体が多く、抵抗性個体群にはインドネシア、マレーシア由来個体が多いという知見とも合致しており、*TRIM5* 遺伝子型がカニクイザルにおいて HIV-1mt 感受性を規定する重要な宿主因子であることを強く示唆するものであった。ところで、先述したように、カニクイザルやアカゲザルなど *Macaca* 属サルは抗 HIV-1 治療薬やワクチン等の評価モデルとしての応用が大いに期待されるが、ウイルス感染感受性に影響を与える *TRIM5* 遺伝子について、マカク全体に関しては基礎的情報の蓄積が十分ではない。そこで本研究では、1) これらの情報をより適切なエイズ研究の動物モデル構築に応用すること、2) *TRIM5* 遺伝子の多様性とマカクの進化との関連について考察を深めることを目的とし、マカク *TRIM5* 遺伝子について広範に遺伝学的解析を行った。

## 材料および方法

### 1. 血球サンプル

マカク *TRIM5* 遺伝子の解析に用いるゲノムサンプルを得るため、京都大学霊長類研究所 (KUPRI) で飼育されているニホンザル (*Macaca fuscata*)、アカゲザル、ボンネットザル (*Macaca radiata*)、タイワンザル (*Macaca cyclopis*) から、さらに滋賀医科大学動物生命科学研究センター (RCALS) で飼育されているカニクイザルより採血を行った。採血はサルの健康診断時にケタミン麻酔下で行った。本研究は、各動物実験委員会による動物実験計画の承認を得て実施された。

### 2. *TRIM5* 遺伝子型の解析

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いてサルの血球からゲノム DNA を回収した。PCR 反応には TaKaRa Ex Taq HS DNA ポリメラーゼ (TaKaRa) を用い、プライマーとして、*TRIMCyp* check5 (5'-TGACTCTGTGCTCAC-CAAGCTCTTG-3') および *TRIMCyp* check3 (5'-ACCCTA-CTATGCAATAAACATTAG-3') を用いた。PCR の反応条件は初期熱変性が 94°C、5 分間、サイクリングは熱変性が 94°C、30 秒間、アニーリングが 55°C、30 秒間、伸長反応が 72°C、90 秒間で、40 サイクルとした。PCR 反応後のサンプルを 1% アガロースにて電気泳動することで評価した。さらに、*TRIMCyp* を保有する個体については、PCR

産物を精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いて *Cyclophilin A* 領域の塩基配列を解析することで、ハプロタイプを判定した。

## 結 果

### 1. マカク *TRIM5* 遺伝子における *TRIMCyp* 頻度はサル種およびサルの由来によって大きく異なる

まず、複数種のマカクからゲノム DNA を回収し、各サル種における *TRIMCyp* 頻度を検討した。われわれは以前、医薬基盤研究所霊長類医学研究センター (TPRC) で飼育されているカニクイザルについて、1) *TRIMCyp* を保有する個体が多数存在すること、2) *TRIMCyp* 頻度がサルの由来国によって大きく異なることを明らかにしている<sup>21)</sup>。そこで、同様の傾向が他のサル繁殖施設においても認められるかを検討するため、RCALS にて飼育されているカニクイザル 161 頭について同様の手法で評価を行った。その結果、RCALS にて飼育されているカニクイザルも高率に *TRIMCyp* を保有しており、サルの由来国によって *TRIMCyp* 頻度が大きく異なることが明らかとなった (表 1)。具体的には、中国およびベトナム由来の個体群 29 頭および 45 頭では、それぞれ *TRIM5 $\alpha$*  homozygote (*TRIM5 $\alpha$*  ホモ個体) が 19 頭および 28 頭、*TRIM5 $\alpha$ /TRIMCyp* heterozygote (ヘテロ個体) が 9 頭および 12 頭、*TRIMCyp* homozygote (*TRIMCyp* ホモ個体) が 1 頭および 5 頭存在することが明らかとなり、*TRIMCyp* アリル頻度はそれぞれ 19.0% および 24.4% であった。対照的に、フィリピン由来の個体群 43 頭では *TRIM5 $\alpha$*  ホモ個体が 2 頭、ヘテロ個体が 3 頭、*TRIMCyp* ホモ個体が 38 頭存在し、*TRIMCyp* 頻度は 91.9% と非常に高率であった。インドネシア由来の個体群 44 頭はこれらの中間型を示し、*TRIM5 $\alpha$*  ホモ個体が 15 頭、ヘテロ個体が 21 頭、*TRIMCyp* ホモ個体が 8 頭存在し、*TRIMCyp* アリル頻度は 42.0% であった。今回の解析で得られた結果は、TPRC で以前得られた結果とほぼ同様であったことから、カニクイザル *TRIMCyp* 頻度における地理的多様性はある特定の繁殖施設に特有の傾向ではなく、カニクイザルに共通な傾向であることが示唆された。また、海外の研究グループからもカニクイザルには地理的な偏りが存在するとの同様の報告があり、やはりフィリピン由来の個体群ではインドネシアおよびインドネシア由来の個体群と比較して *TRIMCyp* 頻度が高いと報告されている<sup>23, 24)</sup>。さらに、われわれは以前、繁殖施設における *TRIMCyp* 頻度が野生ザルにおける頻度を反映しているかを明らかにするため、野生個体由来の検体を用いて *TRIMCyp* 頻度を解析している<sup>25)</sup>。そのさい、野生個体由来の検体でもフィリピン由来の個体群ではインドネシア由来の個体群と比較して *TRIMCyp* 頻度が高いことを明らかにしていることから、本研究で得ら

表 1 アジア産マカクにおける *TRIMCyp* 頻度

サル種	由来	個体数	遺伝子型 (個体数)			アリル頻度	
			<i>TRIM5a</i> homozygote	Heterozygote	<i>TRIMCyp</i> homozygote	<i>TRIM5a</i> (%)	<i>TRIMCyp</i> (%)
<i>Cynomolgus macaque</i> ( <i>Macaca fascicularis</i> )	中国	29	19	9	1	81.0	19.0
	ベトナム	45	28	12	5	75.6	24.4
	インドネシア	44	15	21	8	58.0	42.0
	フィリピン	43	2	3	38	8.1	91.9
<i>Rhesus macaque</i> ( <i>Macaca mulatta</i> )	中国	30	30	0	0	100	0
	インド	30	27	3	0	94.7	5.3
<i>Japanese macaque</i> ( <i>Macaca fuscata</i> )	日本	152	152	0	0	100	0
<i>Formosan macaque</i> ( <i>Macaca cyclopis</i> )	台湾	4	4	0	0	100	0
<i>Bonnet macaque</i> ( <i>Macaca radiata</i> )	インド	7	7	0	0	100	0

れた結果もまた野生ザルにおける *TRIMCyp* 頻度を反映していると考えられる。次に、KUPRI で繁殖育成されているアカゲザル 60 頭 (インド由来 30 頭, 中国由来 30 頭) について検討を行ったところ, 他の研究グループからの報告同様<sup>19, 26)</sup>, 中国由来の個体群からは *TRIMCyp* が検出されなかった。ところで, アカゲザル, タイワンザルおよびニホンザルは中国東部に生息していた共通祖先から約 100 万年から 120 万年前に分岐し, それぞれ別の進化の道を進んだと推測されている<sup>27)</sup>。そこで, 中国由来アカゲザルが *TRIMCyp* を保有していないという現象がタイワンザルおよびニホンザルにおいても認められるかどうかを調べるため, KUPRI で飼育されているニホンザル 152 頭およびタイワンザル 4 頭について *TRIMCyp* 保有の有無に関する検討を行った。なお, 上述したようにカニクイザルで *TRIMCyp* 頻度に地理的偏りが認められたことから, ニホンザルについても同様の傾向が存在する可能性を考慮して, 高浜 (福井県), 河口湖 (山梨県), 嵐山 (京都府), 箕面 (大阪府), 若桜 (鳥取県), 奄美 (鹿児島県) 由来の個体群について解析を行った。その結果, タイワンザルおよびニホンザルいずれのサル種においても *TRIMCyp* を保有する個体はまったく認められなかった。この結果は中国由来アカゲザルと同様の傾向であった (表 1)。一方で, インド由来の個体群では 30 頭中 3 頭の *TRIM5a/TRIMCyp* ヘテロ個体が認められたことから, 過去の報告同様, アカゲザルにも地理的な偏りが存在することが示唆された。さらに, インド南部が生息地でありインド由来アカゲザルと比較的生息域に近いボンネットザル 7 頭についても *TRIMCyp* の有無を

検討したが, *TRIMCyp* を保有する個体は見られなかった。これら一連の結果から, カニクイザル *TRIM5* 遺伝子型には地理的多様性が存在すること, そして, *TRIMCyp* を保有しない中国由来アカゲザルに近縁な 2 つのサル種 (ニホンザル, タイワンザル) は *TRIMCyp* を保有しないことが示され, サル種間およびサル種内における多様性の存在が強く示唆された。

## 2. カニクイザル *TRIMCyp* には異なるハプロタイプが存在する

次にわれわれは, カニクイザル *TRIMCyp* におけるハプロタイプに着目した。これまで, われわれを含む複数の研究グループにより, カニクイザル *TRIMCyp* には 336 番目および 469 番目のアミノ酸にアスパラギン酸 (D) およびリジン (K) を持つハプロタイプ (DK ハプロタイプ) に加えて, 同箇所にアスパラギン (N) とグルタミン酸 (E) を持つハプロタイプ (NE ハプロタイプ) が存在することが明らかにされている<sup>21, 23)</sup>。興味深いことに, アカゲザル *TRIMCyp* およびブタオザル *TRIMCyp* はいずれも NE 型であるとされることから, DK 型はカニクイザルに特異的に存在すると考えられている。このハプロタイプの違いは非常に重要であり, NE 型は HIV-1 の増殖を抑制しない一方で, HIV-2 の増殖を抑制する。逆に, DK 型は HIV-1 の増殖を抑制するが, HIV-2 の増殖を抑制しない。つまり, カニクイザルを HIV-1 もしくは HIV-2 の研究に用いるさいには, このハプロタイプの違いが重要になる。そこで, 本研究で検出された *TRIMCyp* ホモもしくはヘテロ個体について, DK および NE ハプロタイプの頻度を求めた (表 2)。

表 2 カニクイザル *TRIMCyp* における DK および NE ハプロタイプの頻度

由来	飼育施設*	個体数	遺伝子型 (染色体数)				頻度		引用文献
			<i>TRIM5a/TRIMCyp</i> heterozygote		<i>TRIMCyp</i> homozygote		DK (%)	NE (%)	
			DK	NE	DK	NE			
中国	RCALS	10	9	0	2	0	100	0	本研究
ベトナム	RCALS	17	12	0	9	1	95.5	4.5	本研究
インドネシア	RCALS	29	17	4	13	3	81.0	18.9	本研究
インドネシア	TPRC	15	12	0	4	2	88.9	11.1	21)
フィリピン	RCALS	41	2	1	76	0	98.7	1.3	本研究
フィリピン	TPRC	28	6	1	36	6	85.7	14.3	21)

\*RCALS および TPRC はそれぞれ滋賀医科大学動物生命科学研究センターと医薬基盤研究所霊長類医学研究センターの略称である。

その結果、中国およびベトナム由来の個体群では、NE ハプロタイプは5%以下であり、DK ハプロタイプがほとんどを占めた。フィリピン由来の個体群においてもNE ハプロタイプは1.3%と低頻度であった。興味深いことに、インドネシア由来の個体群の18.9%がNE ハプロタイプであることが判った。表2に示すように、この傾向はTPRCの個体群においても同様であった。地域による各ハプロタイプの頻度の差について、もともとの*TRIMCyp*頻度の差による影響も想定されるが、カニクイザルの進化の過程で何らかの選択圧が作用した可能性も考えられ、非常に興味深い。

## 考 察

本研究により、これまで不明な点が多かった、アジア広域に生息する *Macaca* 属サル の *TRIM5* 遺伝子の全体像が明らかとなった。各サル種における *TRIMCyp* 頻度の解析から、サル種および生息域によって *TRIMCyp* 頻度が大きく異なることが明らかとなった。特に興味深いのがカニクイザルで、高緯度 (中国, ベトナム) 由来の個体群では *TRIMCyp* 頻度が低く、逆に低緯度 (フィリピン, インドネシア) 由来の個体群では *TRIMCyp* 頻度が高いという傾向が認められた。高い *TRIMCyp* 頻度を示すフィリピン産カニクイザルについては、生息域拡大の過程でその祖先となる個体群がユーラシア大陸からマレー半島, ボルネオ島を経てフィリピンに到達したと考えられているが、この間に創始者効果 (Founder effect) が作用した可能性に加え、何らかの外的圧力がこのような偏った遺伝子分布を生み出した可能性がある。*TRIMCyp* 頻度と生息域の緯度との間に関連があると仮定すると、インドネシア, フィリピンなどの島嶼地域では *TRIMCyp* を保有することが有利に働く何らかの理由があるのかもしれない。

われわれは、*TRIMCyp* 保有カニクイザルは非保有カニクイザルと比較して格段に HIV-1mt 感受性が高いことを最近報告したが<sup>22)</sup>、今回明らかにされた *TRIMCyp* 頻度の偏りもウイルス感染感受性に大きな影響を与えることが予測される。また本研究では、インド由来アカゲザルでは *TRIMCyp* が見られるが、中国由来では見られないことを明らかにしたが、この結果は他の研究グループからの報告と一致している<sup>19, 26)</sup>。これまでの SIV とアカゲザルを用いた実験では、おもにインド由来アカゲザルを用いた感染実験が行われており、中国由来アカゲザルはインド由来アカゲザルと比較すると血中のセットポイントウイルス量が低く、ウイルス増殖をより効率よくコントロールする傾向が報告されている<sup>29)</sup>。MHC-I のハプロタイプはレトロウイルス感受性に影響を与えうる主要な遺伝的背景であることから、SIV 感受性についても MHC-I の多型による影響が考えられるが、上述したような *TRIM5* 遺伝子の多型についてもその影響をきちんと見極めたい。

本研究により、アカゲザルに近縁なニホンザルにおいて *TRIMCyp* アリルが存在しないことが示された。また、解析したサンプル規模が小さいものタイワンザルでも同様の結果が得られたことから、これら3つのサル種が分岐する前の共通祖先の段階で *TRIMCyp* よりも *TRIM5a* が有利になるような何らかの選択圧が作用した可能性が考えられる。一方、インド南部に生息するボンネットザルからは *TRIMCyp* アリルは認められなかった。したがって、ボンネットザルは進化の過程でアカゲザルとは異なる適合戦略をとり、*TRIMCyp* を保有しない状態で固定化した可能性が考えられる。ただし今回解析したボンネットザルが7頭と限られていたため、*TRIMCyp* が検出されなかった可能性も否定できない。なお、今回われわれが解析したサル種以外については、他の研究グループからいくつか報告がある。

興味深いことに、ブタオザルでは *TRIM5a* を保有する個体は認められず、すべての個体が *TRIMCyp* ホモである<sup>17,30)</sup>。この特徴的な遺伝子型は、ブタオザルが他のサル種と比較して高い HIV-1 感受性を持つことの主たる要因と考えられている<sup>17,18,31)</sup>。一方、アフリカ北部に生息するバーバリーマカク (*Macaca sylvanus*) や<sup>32)</sup>、チベットから中国の南部にかけての山岳に生息するチベットモンキー (*Macaca thibetana*) に関して *TRIMCyp* の有無を検討したとの報告があるが<sup>33)</sup>、いずれのサル種からも *TRIMCyp* は検出されていない。南アジアから東南アジアにかけて生息するアッサムモンキー (*Macaca assamensis*) にて *TRIMCyp* を保有するヘテロ個体が見出されたとの報告があり<sup>28)</sup>、今後のマカク *TRIM5* 遺伝子型に関するより詳細な解析が待たれるところである。他方、ヒトを含む類人猿には *TRIMCyp* が存在しないと考えられている。このようなマカク *TRIM5* 遺伝子における顕著な多様性の存在は、マカクが生息域を拡大していく過程で何らかの環境要因が選択圧として作用した可能性を示唆している。*TRIM5a* および *TRIMCyp* は特定のレトロウイルスのカプシド蛋白との結合能力を有し、種を超えたレトロウイルスの侵襲から宿主を防御していると考えられていることから、われわれはマカクの祖先に対するウイルス感染がマカク *TRIM5* 遺伝子の多様性を生み出したのではないかと推測している。今後は、マカクが自然感染している各種ウイルスに対する *TRIM5a* および *TRIMCyp* の抑制作用に関して比較検証を行い、マカクの抗ウイルス適合戦略について解明していきたい。なお、霊長類免疫不全ウイルスはアフリカに生息するサル類にのみ感染が見られ、マカク *TRIM5* 遺伝子の選択圧には成り得ないであろう。

本研究では、複数のサル種の *TRIM5* 遺伝子に着目して解析を行ったが、*BST-2* 遺伝子や *APOBEC3* 遺伝子における遺伝子多型もまたウイルス感受性に影響する可能性がある。一例として、アカゲザル *BST-2* 遺伝子には多型が存在するとの報告があり<sup>34)</sup>、他のサル種においてもこれら遺伝子に多型が存在する可能性は十分に考えられる。また、これまでに同定されていない、ウイルス増殖に促進的に働く宿主因子および抑制的に作用する宿主因子に関する研究も今後進展していく必要がある。ところで、現在われわれが用いている HIV-1mt は、*TRIMCyp* の DK ハプロタイプ、NE ハプロタイプいずれからの抑制も回避することができるが、*TRIM5a* からは回避できない。それゆえ、現状では、全頭が *TRIMCyp* を保有するとされるブタオザル、もしくは *TRIMCyp* を保有するカニクイザルもしくはアカゲザルが実験に用いる個体として有望であると考えられる。ところが、残念ながら国内にはブタオザルを実験動物として繁殖している施設はなく、国内でのブタオザルの研究利用は

事実上不可能である。また、*TRIMCyp* を保有するアカゲザルはインド由来の個体群でのみ認められ、またその頻度も低いことから、その使用はむずかしい。他方、*TRIMCyp* を高率に保有するカニクイザルは国内の複数の施設で大規模な繁殖・飼育が行われており、エイズ関連研究での積極的な応用が期待される。また現在、*TRIMCyp* のみならず、*TRIM5a* を回避できる HIV-1mt の作出に向けての検討も複数の研究グループにより進められている。そのようなウイルスが樹立されれば、最も遺伝学的背景の解析が進んでいるアカゲザルを感染実験に用いることができ、ワクチン等の研究の発展に重要なツールとなるであろう。

本研究により、マカク *TRIM5* 遺伝子における顕著な多様性が示されたことから、エイズ研究にサルを用いる際には *TRIM5* 遺伝子多型に十分留意した実験計画を立てる必要がある。このような宿主の遺伝的背景に基づいた動物実験を推進することは、より高い再現性および信頼性を示す動物モデル構築に寄与すると考えられ、これらプラットフォームを応用することで、実用的な抗 HIV-1 ワクチン、薬剤開発の一助となることを期待している。

## 謝辞

本研究にご協力いただいた京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医学研究センター、滋賀医科大学動物生命科学研究センターならびに一般社団法人予防衛生協会の各位に深謝する。本研究は、厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）の助成を受けて行われた。また、齊藤暁はエイズ予防財団のリサーチレジデントであり、当財団からの支援に感謝する。

## 文 献

- 1) Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH : Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418 : 646-650, 2002.
- 2) Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J : The cytoplasmic body component *TRIM5a* restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427 : 848-853, 2004.
- 3) Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD : Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451 : 425-430, 2008.
- 4) Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J : The interferon-induced protein *BST-2* restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu

- protein. *Cell Host Microbe* 3 : 245–252, 2008.
- 5) Kamada K, Igarashi T, Martin MA, Khamsri B, Hatcho K, Yamashita T, Fujita M, Uchiyama T, Adachi A : Generation of HIV-1 derivatives that productively infect macaque monkey lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 16959–16964, 2006.
  - 6) Hatzioannou T, Princiotta M, Piatak M, Jr., Yuan F, Zhang F, Lifson JD, Bieniasz PD : Generation of simian-tropic HIV-1 by restriction factor evasion. *Science* 314 : 95, 2006.
  - 7) Hatzioannou T, Ambrose Z, Chung NP, Piatak M, Jr., Yuan F, Trubey CM, Coalter V, Kiser R, Schneider D, Smedley J, Pung R, Gathuka M, Estes JD, Veazey RS, KewalRamani VN, Lifson JD, Bieniasz PD : A macaque model of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 : 4425–4429, 2009.
  - 8) Thippeshappa R, Polacino P, Yu Kimata MT, Siwak EB, Anderson D, Wang W, Sherwood L, Arora R, Wen M, Zhou P, Hu SL, Kimata JT : Vif Substitution Enables Persistent Infection of Pig-Tailed Macaques by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 85 : 3767–3779, 2011.
  - 9) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H : Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes Infect* 13 : 58–64, 2011.
  - 10) Saito A, Akari H : Macaque-tropic human immunodeficiency virus type 1 : breaking out of the host restriction factors. *Front Microbiol* 4 : 187, 2013.
  - 11) Grutter MG, Luban J : TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Curr Opin Virol* 2 : 142–150, 2012.
  - 12) Nakayama EE, Shioda T : Role of Human TRIM5 $\alpha$  in Intrinsic Immunity. *Front Microbiol* 397, 2012.
  - 13) Strelau M, Perron M, Welikala S, Sodroski J : Species-Specific Variation in the B30.2 (SPRY) Domain of TRIM5 Determines the Potency of Human Immunodeficiency Virus Restriction. *J Virol* 79 : 3139–3145, 2005.
  - 14) Kono K, Song H, Shingai Y, Shioda T, Nakayama EE : Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5 $\alpha$ s against human immunodeficiency virus type 2 infection. *Virology* 373 : 447–456, 2008.
  - 15) Kirmaier A, Wu F, Newman RM, Hall LR, Morgan JS, O'Connor S, Marx PA, Meythaler M, Goldstein S, Buckler-White A, Kaur A, Hirsch VM, Johnson WE : TRIM5 suppresses cross-species transmission of a primate immunodeficiency virus and selects for emergence of resistant variants in the new species. *PLoS Biol* 8, 2010.
  - 16) Brennan G, Kozyrev Y, Kodama T, Hu SL : Novel TRIM5 Isoforms Expressed by *Macaca nemestrina*. *J Virol* 81 : 12210–12217, 2007.
  - 17) Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT, Su B : A novel fusion gene, TRIM5-Cyclophilin A in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS* 21 (Suppl 8) : S19–26, 2007.
  - 18) Brennan G, Kozyrev Y, Hu SL : TRIMCyp expression in Old World primates *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 : 3569–3574, 2008.
  - 19) Wilson SJ, Webb BL, Ylinen LM, Verschoor E, Heeney JL, Towers GJ : Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 : 3557–3562, 2008.
  - 20) Ylinen LM, Price AJ, Rasaiyaah J, Hue S, Rose NJ, Marzetta F, James LC, Towers GJ : Conformational adaptation of Asian macaque TRIMCyp directs lineage specific antiviral activity. *PLoS Pathog* 6 : 2010.
  - 21) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE : Geographical, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J Gen Virol* 93 : 594–602, 2012.
  - 22) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H : TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 94 : 1318–1324, 2013.
  - 23) Dietrich EA, Brennan G, Ferguson B, Wiseman RW, O'Connor D, Hu SL : Variable Prevalence and Functional Diversity of the Antiretroviral Restriction Factor TRIMCyp in *Macaca fascicularis*. *J Virol* 85 : 9956–9963, 2011.
  - 24) Berry NJ, Marzetta F, Towers GJ, Rose NJ : Diversity of TRIM5 $\alpha$  and TRIMCyp sequences in cynomolgus macaques from different geographical origins. *Immunogenetics* 64 : 267–278, 2012.
  - 25) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H : Allele frequency of antiretroviral host factor TRIMCyp in wild-caught cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Front Microbiol* 3 : 314, 2012.

- 
- 26) de Groot NG, Heijmans CM, Koopman G, Verschoor EJ, Bogers WM, Bontrop RE : *TRIM5* allelic polymorphism in macaque species/populations of different geographic origins : its impact on SIV vaccine studies. *Tissue Antigens* 78 : 256–262, 2011.
- 27) Tosi AJ, Morales JC, Melnick DJ : Comparison of Y chromosome and mtDNA phylogenies leads to unique inferences of macaque evolutionary history. *Mol Phylogenet Evol* 17 : 133–144, 2000.
- 28) Cao G, Nie WH, Liu FL, Kuang YQ, Wang JH, Su WT, Zheng YT : Identification of the *TRIM5/TRIMCyp* heterozygous genotype in *Macaca assamensis*. *Zool Res* 32 : 40–49, 2011.
- 29) Trichel AM, Rajakumar PA, Murphey-Corb M : Species-specific variation in SIV disease progression between Chinese and Indian subspecies of rhesus macaque. *J Med Primatol* 31 : 171–178, 2002.
- 30) Newman RM, Hall L, Kirmaier A, Pozzi LA, Pery E, Farzan M, O'Neil SP, Johnson W : Evolution of a *TRIM5-CypA* splice isoform in old world monkeys. *PLoS Pathog* 4 : e1000003, 2008.
- 31) Virgen CA, Kratovac Z, Bieniasz PD, Hatzioannou T : Independent genesis of chimeric *TRIM5*-cyclophilin proteins in two primate species. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 : 3563–3568, 2008.
- 32) Dietrich EA, Jones-Engel L, Hu SL : Evolution of the anti-retroviral restriction factor *TRIMCyp* in Old World primates. *PLoS One* 5 : e14019, 2010.
- 33) Yu CQ, Na L, Lv XL, Liu JD, Liu XM, Ji F, Zheng YH, Du HL, Kong XG, Zhou JH : The *TRIMCyp* genotype in four species of macaques in China. *Immunogenetics* 65 : 185–193, 2013.
- 34) McNatt MW, Zang T, Hatzioannou T, Bartlett M, Fofana IB, Johnson WE, Neil SJ, Bieniasz PD : Species-specific activity of HIV-1 *Vpu* and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. *PLoS Pathog* 5 : e1000300, 2009.



## Diversity of Antiretroviral Host Factor *TRIM5* Gene in Macaque Monkeys

### — Genetic Information for Establishment of HIV-1 Primate Model —

Akatsuki SAITO<sup>1,2)</sup>, Ken KONO<sup>3)</sup>, Yoshi KAWAMOTO<sup>1)</sup>, Atsunori HIGASHINO<sup>1)</sup>, Saori SUZUKI<sup>1)</sup>,  
Tomoyuki YOSHIDA<sup>1)</sup>, Ryuzo TORII<sup>4)</sup>, Yasuhiro YASUTOMI<sup>5)</sup>, Tatsuo SHIODA<sup>3)</sup>,  
Emi E NAKAYAMA<sup>3)</sup> and Hirofumi AKARI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Primate Research Institute, Kyoto University, <sup>2)</sup> Japan Foundation for AIDS Prevention,

<sup>3)</sup> Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University,

<sup>4)</sup> Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science,

<sup>5)</sup> Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation

**Objective** : The antiretroviral host factor *TRIM5 $\alpha$*  of macaque monkeys strongly suppresses HIV-1 replication. A *TRIM5* gene-derived isoform, *TRIMCyp*, is also found in at least three species of macaques, rhesus macaque (*Macaca mulatta* ; hereafter denoted as RM), pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*), and cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis* ; CM). Although RMs and CMs are reported to have geographic deviation in the frequency of *TRIMCyp*, the precise distribution of *TRIMCyp* in other Asian macaques remains unclear. In this study, in order to understand further the frequency and prevalence of *TRIMCyp* in macaque monkeys, we studied the geographic and genetic diversity of *TRIM5 $\alpha$ /TRIMCyp* in several macaque species.

**Materials and Methods** : Genomic DNA was extracted from blood. To test for the *CypA* insertion, the 3' region of the *TRIM5* gene was amplified by PCR.

**Results** : We found that the frequencies of *TRIMCyp* in Philippine CMs and Indian RMs were higher as compared to those in Indochina CMs and Chinese RMs, respectively. It is reasonable to assume that the *TRIMCyp* distribution among the macaques may be influenced by environmental factor (s) on their habitats. In fact, we were not able to detect *TRIMCyp* allele in two macaque species, Japanese macaque (*Macaca fuscata*) and Formosan macaque (*Macaca cyclopis*). Since we have recently demonstrated the functional significance of the CM *TRIM5* genotypes in the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection, our results presented here strongly suggest the importance of the genetic background of macaques for the retrovirological study.

**Key words** : animal model, *TRIM5* gene, genetic diversity