

2. 宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序

岩谷 靖雅

(独)国立病院機構 名古屋医療センター 臨床研究センター

宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーは、細胞内に発現するシチジンデアミナーゼである。ヒトでは、7種 (A, B, C, DE, F, G, H) コードされ、血球系を中心とした細胞で恒常的に発現されている。APOBEC3 は各々異なった抗ウイルス作用スペクトルを呈するが、レトロトランスポゾンやレトロウイルスなどのレトロエレメントだけでなく B 型肝炎ウイルスやパルボウイルスなどの複製を阻害することが知られている。A3G の場合には、Vif を欠損した HIV (*vif* (-) HIV) の複製を強力に阻害する。*vif* (-) HIV は、ウイルス産生細胞内で発現する A3G を粒子内に取込む。そのため、新たな細胞に感染する時に、逆転写の過程が A3G によって強く阻害される。一方、野生型の HIV (WT HIV) は、ウイルス産生細胞内で Vif を発現し、ユビキチン・プロテアソーム系を介して選択的に A3G を破壊し枯渇させてしまう。このため、WT HIV は A3G をウイルス粒子に取込まず、A3G の防御システムから逃れることができる。タンパクとしての生化学的特性を基に、A3G の分子メカニズムを中心に、抗レトロウイルス作用機序を考察する。

はじめに

宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーは、細胞内に発現するシチジンデアミナーゼである。とりわけ APOBEC3 ファミリーは、一本鎖 DNA (ssDNA) の C を脱アミノ化し dU に変換する酵素であり、結果的に二本鎖 DNA (dsDNA) の相補鎖に G から A への Hypermutation を誘導する (図 1)¹⁾。ヒトでは、7種 (A, B, C, DE, F, G, H) コードされ (図 1)、血球系を中心とした細胞で恒常的に発現され、マクロファージなどでは 1 型インターフェロン刺激によって発現量が上昇する²⁾。それぞれの APOBEC3 は各々異なった抗ウイルス作用スペクトルを呈するが、レトロトランスポゾンやレトロウイルスなどのレトロエレ

メントだけでなく B 型肝炎ウイルス³⁾ やパルボウイルス⁴⁾ などの複製を抑制することが知られている。

APOBEC3G (A3G) の場合には、*vif* を欠損した HIV (*vif* (-) HIV) の複製を強力に阻害する。*vif* (-) HIV は、ウイルス産生細胞内で発現する A3G を粒子内に取込む。そのため、新たな細胞に感染する時に、逆転写過程などが A3G によって強く阻害される。一方、野生型の HIV (WT HIV) は、ウイルス産生細胞内において Vif を発現し、ユビキチン・プロテアソーム系を介して選択的に A3G を破壊し、感染細胞内の A3G を枯渇させてしまう。このため、WT HIV は A3G をウイルス粒子に取込まず、A3G の防御システムから逃れることができる (図 2)¹⁾。A3G が抗 HIV 作用を発揮するためには、ウイルス粒子内に取込まれ、コア内の前逆転写複合体に存在することが前提となっている。A3G の抗レトロウイルス作用の分子メカニズムについては、シチジンデアミナーゼとしての酵素活性依存性あるいは非依存性な 2 つの機序があることが分かっているが、未だ不明な点が多い。本稿では、A3G の酵素学的、生化学的視点から、A3G の抗レトロウイルス作用機序を概説したい。

連絡先

〒460-0001

愛知県名古屋市中区三の丸四丁目1番1号

(独)国立病院機構 名古屋医療センター 臨床研究センター

TEL: 052-951-1111 (内線 6220)

FAX: 052-963-3970

E-mail: iwataniy@nnh.hosp.go.jp

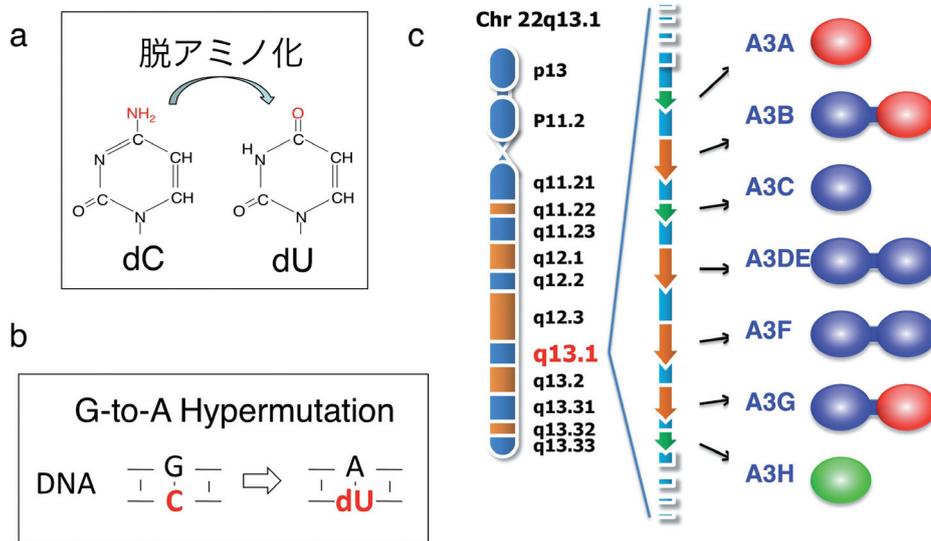


図1 (a)APOBEC3 ファミリーはシチジンデアミナーゼ (b) G-to-A Hypermutation を誘導する (c) ヒトでは、22 番染色体に7種 (A, B, C, DE, F, G, H) がコードされている。単一ドメインあるいはダブルドメイン構造をもち、分子遺伝学的に3タイプ Z1 (赤), Z2 (青), Z3 (緑) に分類され、Z1 タイプは酵素活性が高い傾向が強い。

酵素あるいは核酸結合タンパクとしての APOBEC3G の生化学的特性

A3G のシチジンデアミナーゼとしての基質特異性は、ssDNA 中の YCC 配列の3番目のシチジン (YはCかTで、特異性はC>T) であり、5'-メチルシチジンやリボキシシチジンは脱アミノ化されない^{5, 6)}。他の APOBEC3 ファミリーは共通して TC 配列 (特異性は低いが CC 配列) の2番目シチジンをデオキシウリジン (dU) に変換する⁷⁾。レトロウイルスの複製における APOBEC3 によるシチジン脱アミノ化反応がマイナス鎖に集中するため、A3G は相補鎖 GG 配列が AG に、他の APOBEC3 では GA 配列が AA に変換される。A3G の ssDNA に対する厳密な基質特異性は、構造解析の結果から、明らかになった。酵素活性中心近傍にある核酸が結合する溝のサイズによって規定されている (図3)⁸⁻¹⁰⁾。つまり、この溝は一本鎖の核酸だけが結合できる空間であり、APOBEC3 ファミリーに共通した特徴である。興味深いことに、A3G の酵素反応は、基質 ssDNA 上の3'側から5'側に向けた方向性があり、3'末端近傍のモチーフは脱アミノ化されないデッドゾーンとなる¹¹⁾。この特徴から、HIV の逆転写複製過程における A3G の作用点を想定した場合、脱アミノ化反応によって Strand-Transfer が抑制されるという機序を考えがたい。

APOBEC3 ファミリーは、核酸結合タンパクでもある。特に、A3G は ssDNA と ssRNA に高い親和性 (ssDNA に対して、Kd = 50-250 nM)^{5, 12, 13)} を有し、二本鎖の核酸

(dsDNA, dsRNA, や DNA/RNA Duplex) への結合親和性はなく、A3G N-terminal Domain (NTD) が結合に寄与する⁵⁾。A3G の安定した結合には、少なくとも 10-14 塩基の一本鎖核酸が必要である^{5, 12)}。A3G の核酸結合能力は A3G のウイルス粒子への取込み効率と相関しているため、A3G の粒子への取込みは、粒子にパッケージングされる RNA (ゲノム RNA, tRNA, 7SL RNA など) への結合に依存していると考えられている^{1, 5)}。

さらに、A3G は二量体あるいは多量体形成する。二量体形成には、NTD の芳香族アミノ酸 (Y124, F126, W128) 側鎖がインターフェイスとなり Head-Head 型の比較的強い結合をする^{11, 14, 15)}。一方、多量体形成には CTD (H248, H250 が関与すると報告されている) 同士の Tail-Tail 型結合も関与する^{10, 16)}。多量体形成は A3G の核酸結合によって促進され、細胞内分布 (P-Body へ局在) あるいは細胞内高分子複合体形成とも密接に関連すると考えられている。

A3G の抗ウイルス作用機序

「細胞が *vif* (-) HIV-1 の増殖を許容するか否かを決定する因子が A3G である」という発見¹⁷⁾ 以前から、非許容細胞 (A3G を発現する細胞) から産生される *vif* (-) HIV-1 の感染では、感染細胞内における逆転写反応が抑制され、逆転写初期から後期にかけて逆転写産物が段階的に減少することが報告されていた¹⁸⁻²⁰⁾。さらに、この抑制効果はターゲット細胞がどんな細胞種であれ同様に認められる。

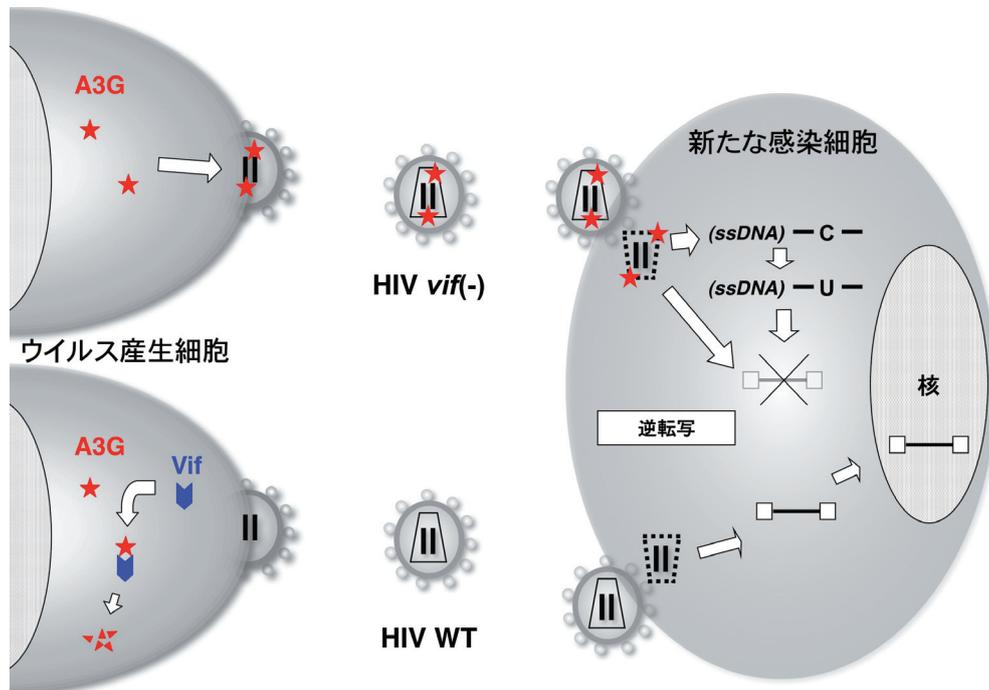


図2 ウイルス産生細胞内に発現するA3Gは、*vif*欠損HIV (*vif*⁻HIV)粒子内(コア内)に取込まれ、新たに感染した細胞中で始まる逆転写あるいはそれ以降の過程を抑制する。一方、野生型HIV (WT HIV)では、Vifが発現され、ユビキチン・プロテアソーム系を介して特異的に分解される。

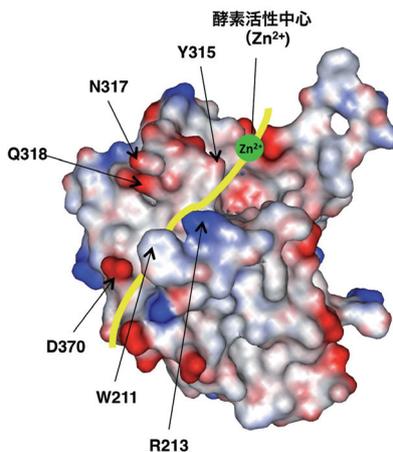


図3 A3G(C-terminal domain)の立体構造(PDB ID# 3IR2)を示す。酵素活性中心(Zn Finger)(緑)近傍にある核酸が結合する“溝”(黄)は一本鎖の核酸が入るサイズ(約10Å)である。基質特異性を決定するアミノ酸残基を示す。

A3Gが広範な抗ウイルス作用スペクトルを示すことを考慮すると、A3Gの抗HIV作用機序は、A3Gがもつ何らかの分子生化学的特性が、細胞質でDNA合成をするウイルス(HBVやパルボウイルス、いくつかのレトロエレメント)に共通した分子機序に帰結することが最もらしいと考えられる。A3Gの抗HIV作用メカニズムには諸説あり、未だに決着がついていない。しかし、大きく図4に示す3つの

機序があると考えられており、3つの機序が複合的に寄与している可能性も高い。

酵素活性非依存的なメカニズム

非依存的なメカニズムの根拠は3つある。1) 酵素活性を欠失したA3Gは、野生型より低いが発現量依存的に抗HIV作用を示す。特に、過剰発現した場合には、野生

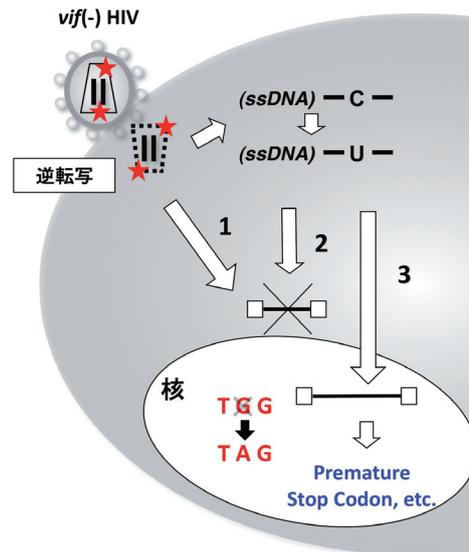


図4 A3Gの抗HIV作用機序として、1) 酵素活性非依存的な機序(逆転写伸長反応の抑制)、2) 酵素活性依存的に逆転写中間産物を不安定化する機序、3) 酵素活性依存的にウイルス遺伝子配列に変異(G-to-A Hypermutation)により子孫ウイルス産生が不活化される機序(例えば、TrpコドンTGGがTGAに変換され、ウイルスorf中にpremature stopコドンが生ずる)を示す。

型の効果に匹敵する⁵⁾。2) A3Gは、B型肝炎ウイルスやパルボウイルス、いくつかのレトロトランスポゾンに対しても強い抗ウイルス作用(DNA合成阻害)を示すが、いずれも酵素活性非依存的に抑制する^{3, 4, 21)}。3) 酵素活性を欠失した変異型A3Fは、野生型と同等の抗HIV抑制効果を示す²²⁾。筆者らは、バキュロウイルスを用いた発現系を利用して酵素活性をもつA3Gを発現・精製し、精製A3Gタンパクと*in vitro*の逆転写再構築系を用いて、HIV-1の一連の逆転写反応の各過程に対するA3Gの効果を解析した。その結果、一連の逆転写の過程においてA3Gは逆転写酵素伸長だけが抑制されることが明らかになった。この効果は、酵素活性を欠失した変異型A3G C291Sによっても認められ、A3Gの鋳型核酸への特徴的な結合・解離特性(解離速度が遅い)に起因していることが報告された²³⁾。さらに、感染細胞やウイルス内逆転写反応系を用いた実験によっても、A3Gによって酵素活性非依存的に逆転写酵素の伸長反応が阻害されることが証明された²⁴⁾。逆転写酵素のスライディングをブロックするという機序は、単にA3Gが一本鎖の鋳型核酸に結合するという単純な現象ではなく、鋳型核酸上におけるA3Gの多量体形成と関与している可能性も考えられる。

酵素活性依存的に働き、 逆転写産物を不安定化させる機序

*vif(-)*HIV感染ではA3Gにより逆転写中間産物が減少し、その減少は逆転写初期から後期過程に段階的に起こっており、一連の過程において特異的なステップで抑制されてい

ない^{18-20, 25-27)}。そこで、A3Gにより生じたdUを含む逆転写産物が、何らかの修復酵素群によって分解誘導されるために低下するのではないかと当初考えられていた。細胞内では、dUTPのDNAへの取込みミス、あるいはシチジン残基の自発的な酸化などによってdUが生じてしまうことがある。そのため、本来存在すべきでないdUを修復する酵素群(UDG: Uracil DNA GlycosidaseやSMUGなど)が存在する。また、ウイルスにとってもdUは変異誘発や遺伝子の不安定さの一因となることから致命的であると考えられている。そのため、例えば、非霊長類のレンチウイルスではウイルス自身がdUTPaseをコードし感染細胞内のdUTP量を低下したり、HIVではUDGを積極的に粒子に取込むことが知られている²⁸⁾。このような細胞環境において、A3Gによって生じたdUを含む逆転写産物がUDGやSMUGなどにより分解が促されるのではないかとこの疑問が提起された。しかし、siRNAによるUDGノックダウンやUDGの阻害因子UGIを用いても、A3Gによる逆転写産物低下現象はレスキューされなかった²⁹⁾。UDGやSMUG以外の修復酵素群がdUを含む逆転写産物の分解・不安定化に寄与している可能性があるが、細胞質に最も豊富に存在するUDGなどが逆転写産物の不安定化とは関係ないとされている。いずれにしてもdUを含む逆転写産物がどれだけ安定性があるのかという知見が無いために、今後の詳細な解析が待たれる。

G to A Hypermutationによる子孫ウイルスの発現抑制

HIVの逆転写複製過程では、鋳型であるゲノムRNA(+)

鎖) から DNA (- 鎖) が伸長し、鋳型 RNA の RNaseH による分解した後が、A3G のターゲットである ssDNA となる過程となる。そのため、A3G による脱アミノ化反応は - 鎖に集中する。そして、逆転写最終産物の + 鎖には G to A hypermutation が生じる。A3G による子孫ウイルスを産生するゲノム情報の変異が、不機能性ウイルスタンパクの産生や、Trp コドン (TGG) が TAG (アンバー) や TGA (オパール) の premature 終止コドンに、あるいは開始コドン (ATG) が Ile (ATA) に変換されたりする複合的変異により、子孫ウイルス産生に必要な機能性タンパクの発現が阻止されることに繋がる。このような G to A Hypermutation が A3G の抗ウイルス効果の一因であると報告されている^{7, 30, 31)}。しかし、この機序だけでは、A3G による逆転写産物の減少などが説明できず、副次的な機序である可能性も否めない。

おわりに

HIV が生体宿主で増殖するためには *vif* 遺伝子は必須であり、臨床分離株では高度に保存されている。つまり、宿主における A3G の防御機構は絶え間なく働いており、生体内における A3G の抗レトロウイルス効果は潜在的には高いことが推測される。HIV 感染症治療開発を考える上でも、A3G の本来の防御機構を利用した方法 (例えば、Vif による分解を抑制するなど)、あるいは A3G の抗ウイルス作用機序を疑似するような方法など、発展性が高い。そのためにも、今後、詳細な A3G あるいは APOBEC3 ファミリーの抗レトロウイルス作用メカニズムを解明する必要がある。

文 献

- Goila-Gaur R, and Strebel K: HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 5: 51, 2008.
- Refsland EW, Stenglein MD, Shindo K, Albin JS, Brown WL, and Harris RS: Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res* 38: 4274-4284
- Turelli P, Mangeat B, Jost S, Vianin S, and Trono D: Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 303: 1829, 2004.
- Narvaiza I, Linfesty DC, Greener BN, Hakata Y, Pintel DJ, Logue E, Landau NR, and Weitzman MD: Deaminase-independent inhibition of parvoviruses by the APOBEC3A cytidine deaminase. *PLoS Pathog* 5: e1000439, 2009.
- Iwatani Y, Takeuchi H, Strebel K, and Levin JG: Biochemical activities of highly purified, catalytically active human APOBEC3G: correlation with antiviral effect. *J Virol* 80: 5992-6002, 2006.
- Rausch JW, Chelico L, Goodman MF, and Le Grice SF: Dissecting APOBEC3G substrate specificity by nucleoside analog interference. *J Biol Chem* 284: 7047-7058, 2009.
- Albin JS, and Harris RS: Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics. *Expert Rev Mol Med* 12: e4
- Chen KM, Harjes E, Gross PJ, Fahmy A, Lu Y, Shindo K, Harris RS, and Matsuo H: Structure of the DNA deaminase domain of the HIV-1 restriction factor APOBEC3G. *Nature* 452: 116-119, 2008.
- Holden LG, Prochnow C, Chang YP, Bransteitter R, Chelico L, Sen U, Stevens RC, Goodman MF, and Chen XS: Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications. *Nature* 456: 121-124, 2008.
- Shandilya SM, Nalam MN, Nalivaika EA, Gross PJ, Valesano JC, Shindo K, Li M, Munson M, Royer WE, Harjes E, Kono T, Matsuo H, Harris RS, Somasundaran M, and Schiffer CA: Crystal structure of the APOBEC3G catalytic domain reveals potential oligomerization interfaces. *Structure* 18: 28-38
- Chelico L, Prochnow C, Erie DA, Chen XS, and Goodman MF: Structural model for deoxycytidine deamination mechanisms of the HIV-1 inactivation enzyme APOBEC3G. *J Biol Chem* 285: 16195-16205
- Chelico L, Pham P, Calabrese P, and Goodman MF: APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' → 5' on single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 13: 392-399, 2006.
- Yu Q, Konig R, Pillai S, Chiles K, Kearney M, Palmer S, Richman D, Coffin JM, and Landau NR: Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* 11: 435-442, 2004.
- Huthoff H, Autore F, Gallois-Montbrun S, Fraternali F, and Malim MH: RNA-dependent oligomerization of APOBEC3G is required for restriction of HIV-1. *PLoS Pathog* 5: e1000330, 2009.
- Huthoff H, and Malim MH: Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and Virion encapsidation. *J Virol* 81: 3807-3815, 2007.
- Shlyakhtenko LS, Lushnikov AY, Li M, Lackey L, Harris RS, and Lyubchenko YL: Atomic force microscopy studies provide direct evidence for dimerization of the HIV restriction factor APOBEC3G. *J Biol Chem* 286: 3387-3395
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, and 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.
- Goncalves J, Korin Y, Zack J, and Gabuzda D: Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol* 70: 8701-8709, 1996.
- Sova P, and Volsky DJ: Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67: 6322-6326, 1993.
- von Schwedler U, Song J, Aiken C, and Trono D: Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1

- proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* 67: 4945-4955, 1993.
- 21) Okeoma CM, Lovsin N, Peterlin BM, and Ross SR: APOBEC3 inhibits mouse mammary tumour virus replication in vivo. *Nature* 445: 927-930, 2007.
 - 22) Miyagi E, Brown CR, Opi S, Khan M, Goila-Gaur R, Kao S, Walker RC, Jr., Hirsch V, and Strebel K: Stably expressed APOBEC3F has negligible antiviral activity. *J Virol* 84: 11067-11075
 - 23) Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, Rouzina I, Williams MC, Musier-Forsyth K, and Levin JG: Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res* 35: 7096-7108, 2007.
 - 24) Bishop KN, Verma M, Kim EY, Wolinsky SM, and Malim MH: APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 4: e1000231, 2008.
 - 25) Dettenhofer M, Cen S, Carlson BA, Kleiman L, and Yu XF: Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol* 74: 8938-8945, 2000.
 - 26) Dornadula G, Yang S, Pomerantz RJ, and Zhang H: Partial rescue of the Vif-negative phenotype of mutant human immunodeficiency virus type 1 strains from nonpermissive cells by intravirion reverse transcription. *J Virol* 74: 2594-2602, 2000.
 - 27) Simon JH, and Malim MH: The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes. *J Virol* 70: 5297-5305, 1996.
 - 28) Priet S, Sire J, and Querat G: Uracils as a cellular weapon against viruses and mechanisms of viral escape. *Curr HIV Res* 4: 31-42, 2006.
 - 29) Kaiser SM, and Emerman M: Uracil DNA glycosylase is dispensable for human immunodeficiency virus type 1 replication and does not contribute to the antiviral effects of the cytidine deaminase Apobec3G. *J Virol* 80: 875-882, 2006.
 - 30) Sadler HA, Stenglein MD, Harris RS, and Mansky LM: APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *J Virol* 84: 7396-7404
 - 31) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, Ito M, Takaori-Kondo A, and Koyanagi Y: Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J Virol* 84: 9546-9556

Mechanisms for Inhibition of Retrovirus Replication by APOBEC3 Family

Yasumasa IWATANI

National Hospital Organization Nagoya Medical Center
4-1-1 San-no-Maru, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001, JAPAN
E-mail: iwatanii@nnh.hosp.go.jp

Human cells developed the defense systems against retrovirus infections during the evolutions. These systems include retroviral restrictions by DNA cytidine deaminases of APOBEC3 family (A, B, C, DE, F, G, and H), which are potent factors to block the viral replication by blocking reverse transcription and/or integration and by hypermutating viral cDNA. In case of HIV-1, the viral protein, Vif abrogates the APOBEC3F/G function through specific machinery of ubiquitination and proteasomal degradation. Without Vif, APOBEC3F/G are incorporated into virus particles and block reverse transcription and/or integration in a newly infected cell. Recent advances in our understanding about biochemical and structure-biological characteristics of the enzymes provide new insights to reveal more detailed molecular mechanisms for anti-retroviral activity by APOBEC3 family. Here I briefly review how APOBEC3 proteins block retrovirus replications, focusing on APOBEC3G.