

# APOBEC ファミリーによる

## ウイルスゲノムへの変異蓄積とウイルス感染防御メカニズムの解明

大矢和正(医学部医学科4年)

指導教員

村松正道(医薬保健研究域 医学系 分子遺伝学 教授)

### 1. 研究目的

Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide (APOBEC) like proteinsあるいはAPOBECファミリーと呼ばれる一群の酵素群は、DNA や RNA の塩基であるシトシンからアミノ基を取る事でウラシルを作る酵素活性を持つ。これまでヒトでは 11 種類の APOBEC タンパクが知られている一方、RNA 上のアデノシンのアミノ基を取りイノシンを作る A-to-I RNA 編集酵素群(ADAR や ADAT)も APOBEC タンパクの近縁のファミリーで、両者でデアミナーゼスーパーファミリーを形成している。

その中でも、2002年にマウス APOBEC3 に相当する遺伝子は、ヒトでは染色体22番にクラスターを形成している事が判明した(1)。マウスは APOBEC3 を1つ持つが、ヒトではマウス APOBEC3 に対応するシンテニー領域に、7つの APOBEC3 が同じ向きに並んでいる。これらはデアミナーゼモチーフを1つないし2つ持ち、APOBEC3A, B, C, DE, F, G, H と名付けられている。

これらはその酵素活性からウイルスゲノムに直接作用し、変異を蓄積させる事が知られてきた。特に APOBEC3G は HIV-1 の感染性を下げるファクターとして単離され、抗ウイルス作用を示す代表的な APOBEC である(2)。そして、興味深い事に最近 A-to-I RNA 編集酵素群でもウイルスに対する様々な活性が報告されている(3)。また、多くのがんには遺伝子の変異が見つかっているが、その原因の一つに APOBEC ファミリーが関与している事が報告されている(4)。しかし APOBEC3 によるゲノムの変異蓄積とウイルス感染防御やウイルス薬剤耐性獲得の関連は未だにわかっていない。

これらの APOBEC ファミリーとウイルスゲノムの変異、癌との関係を見るにあたって重要となるのが、細胞内での APOBEC ファミリーの局在である。また APOBEC ファミリーが核内に移行して、自己のゲノムに作用する可能性はウイルス発がんのメカニズムを考えれば魅力的である。そのため、本研究では細胞内における APOBEC ファミリーの局在を検討した。その後、APOBEC による抗ウイルス作用を検討する為に必要となる shRNA による目的遺伝子の knock down system を評価した。

又、近年では in vitro の系において Human Papillomavirus (HPV) のゲノムに APOBEC ファミリーが変異を蓄積させる事が報告されている(5)。その中でも HPV E6 タンパクや E7 タンパクはプロテオソームを介して p53 や Rb を分解している事がわかっており(6)、その為 HPV と APOBEC ファミリーの関係を検討した。

### 2. 実験方法

#### 細胞培養条件と細胞内局在確認方法

HuH7T7-8、HEK293T 細胞は 10%牛胎児血清とペニシリン、ストレプトマイシンを添加した D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いて培養した。HuH7T7-8 を用いて形質導入実験を行う場合では、6 穴プレートに 40%の集密性で細胞を撒いた後に実験群にテトラサイクリンを 1  $\mu$ g/ml の濃度になるように添加した。翌日に 10%牛胎児血清を含む D-MEM と培養液を交換し FUGENE6 を用いてプラスミドを細胞内へ移入させた。その後72時間後に蛍光顕微鏡を用いて観察した。

HEK293T 細胞を用いて形質導入実験を行う場合では、6 穴プレートに 40%の集密性で細胞を撒いた翌日に 10%牛胎児血清を含む D-MEM と培養液を交換し FUGENE6 を用いてプラスミドを細胞内へ移入させた。その後 24 時間後に蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### siRNA、shRNA を用いた knock down system

HEK293T 細胞を 6 穴プレートに 1.0 x 10<sup>6</sup>細胞/穴と 3.0 x 10<sup>6</sup>細胞/穴の濃度で 10%牛胎児血清を含む D-MEM を用いて撒いた。翌日、プラスミドと siRNA を Lipofectamin2000 を用いて形質導入し51時間後に蛍光を観察した。

HEK293T 細胞を 6 穴プレートに 13.0 x 10<sup>6</sup>細胞/穴の濃度で 10%牛胎児血清を含む D-MEM を用いて撒いた。翌日、プラスミドと shRNA を発現するプラスミドを Lipofectamin2000 を用いて形質導入し 48 時間後に蛍光を観察した。

### ウェスタンブロット法

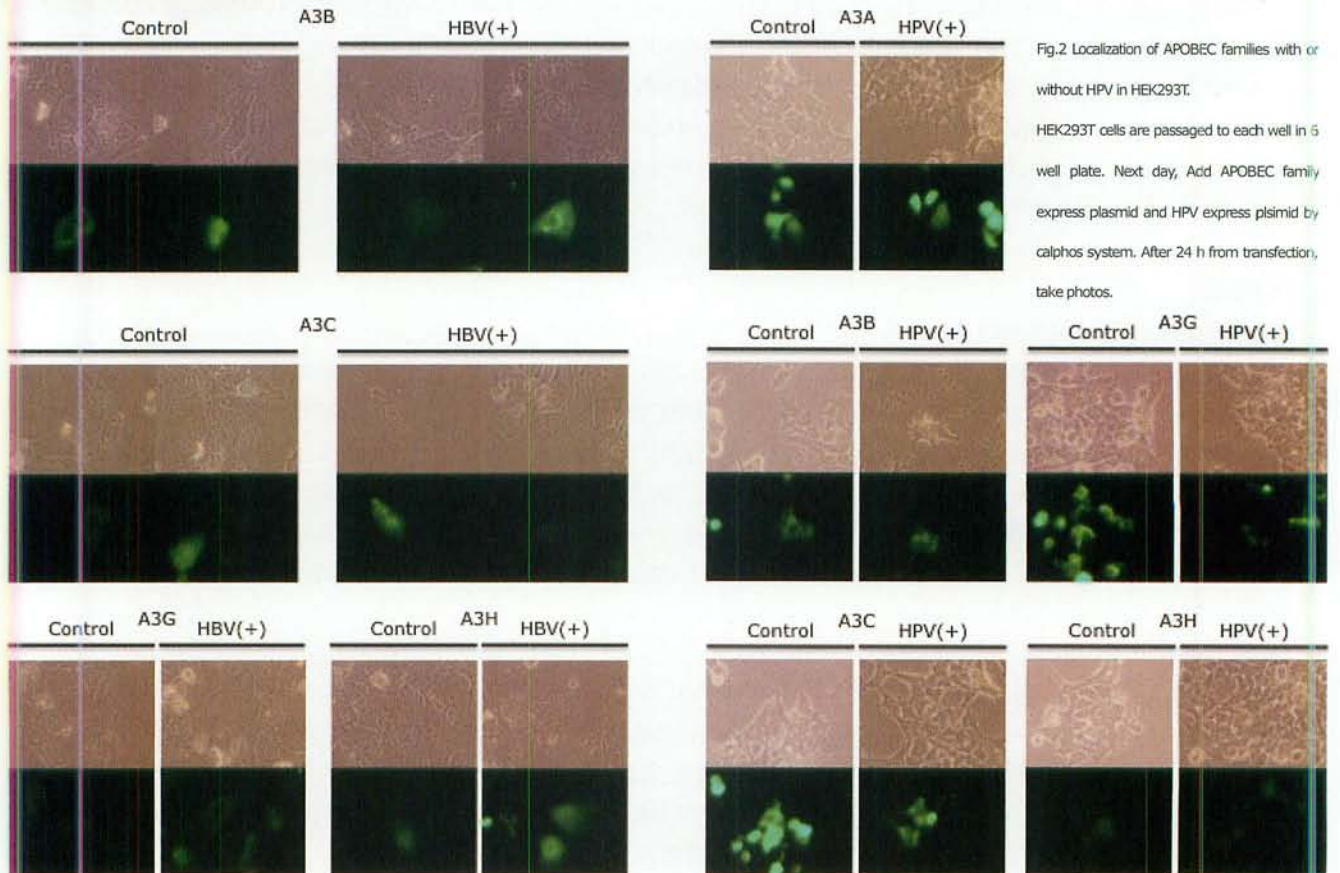
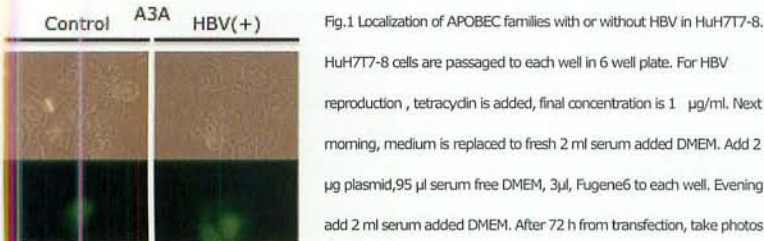
回収した細胞量と同等のLading bufferを加えた後にソニケーションを行い、95度で10分間加熱し泳動サンプルとした。5% stacking gel、12% resolution gelを用いて泳動後、転写装置にてECLフィルターに転写した。5%スキムミルク溶液で1時間、室温条件でブロッキングを行った後、一次抗体のハイブリダイゼーションを行った。次にPBSTにて5分間の洗浄を三回を行い、二次抗体のハイブリダイゼーションを行った。その後、PBSTにて5分間の洗浄を四回を行いwestern blotting detection reagent に浸して蛍光を確認した。

### 3. 結果

まず、HuH7T7-8細胞を用いてHepatitis B Virus(HBV)が存在する条件下でのAPOBECファミリーの局在を調べた(Fig.1)。HuH7T7-8細胞はB型肝炎ウイルスが細胞内で複製されているヒト肝細胞株である。又、Cos-7細胞を用いてHBV発現プラスミドとAPOBECファミリーを発現するプラスミドを共発現させて局在を調べた(Date not shown)。細胞内局在は各APOBECファミリーのGFP融合タンパクを細胞に発現させ、その蛍光をモニターする事で局在を判断した。

次に、Human Papillomavirus(HPV)を発現するプラスミドと、APOBEC-GFP融合タンパクを発現するプラスミドを共発現させ、局在の変化を調べた(Fig.2)。

これらの結果から、APOBEC3A(A3A)、APOBEC3H(A3H)は核と細胞質、APOBEC3B(A3B)、APOBEC3C(A3C)は核に局在する場合が少数だが観察できたが、大部分は細胞質に局在する場合の2パターン、APOBEC3G(A3G)は細胞質に局在する事がわかった。それらに加えAPOBECファミリーはHBV、HPVの存在下でもこれらのウイルスが存在しない場合と同様の分布を示す事が明らかになった。



A3Gは抗HIV作用を有しているが、ウイルス作用の効果が得られにくいHIV種がいる事が報告されている。その抵抗性を示す原因は、HIVゲノムにコードされているvifタンパク質であり、これはA3Gにユビキチン化をもたらしプロテアソームを介してA3Gを分解する事がわかっている(7)。HPVにおいてもプロテアソームを介してタンパク質を分解する遺伝子E6、E7をコードしている。E6はp53を分解するタンパク質として働き細胞のアポトーシスを防ぐ役割があると言われている。そのメカニズムとしては宿主細胞の持つE6APと複合体を作ることユビキチンライゲースとして働くことがわかっている(8)。一方、E7はウイルス自身が持つユビキチンライゲースでありrbなどを分解すると言われている(9)。これらの事からE6、7がプロテアソームを介しAPOBECを壊す可能性を考えた。HPV E6,E7が存在する場合にAPOBECファミリーがどのような影響を受けるかを評価した。HEK293T細胞を用いて、APOBEC融合タンパクを発現するプラスミドとE6を発現するプラスミド共発現させ蛍光量の変化によってその発現量を検討した。その結果、E6と共発現を行ってもAPOBECファミリーの発現量の減少は見られなかった(Fig.3)。一方、E7を発現させるプラスミドの存在下では、APOBEC3A由来の蛍光の減少が確認された(Fig.4)。

Fig.3 Cotransfection pEGFP-A3A, pEGFP-A3B, pEGFP-A3C, pEGFP-A3H, pGFPflag-hADAR1 and p1322-HPV16-E6 in HEK293T by Fugene 6. HEK293T cells are passaged to each well in 12 well plate. Next morning, medium is replaced to fresh 2 ml serum added DMEM. Mix and add plasmid, serum free DMEM, Fugene6 to each well. Evening, add 2 ml serum added DMEM. After 48 h from

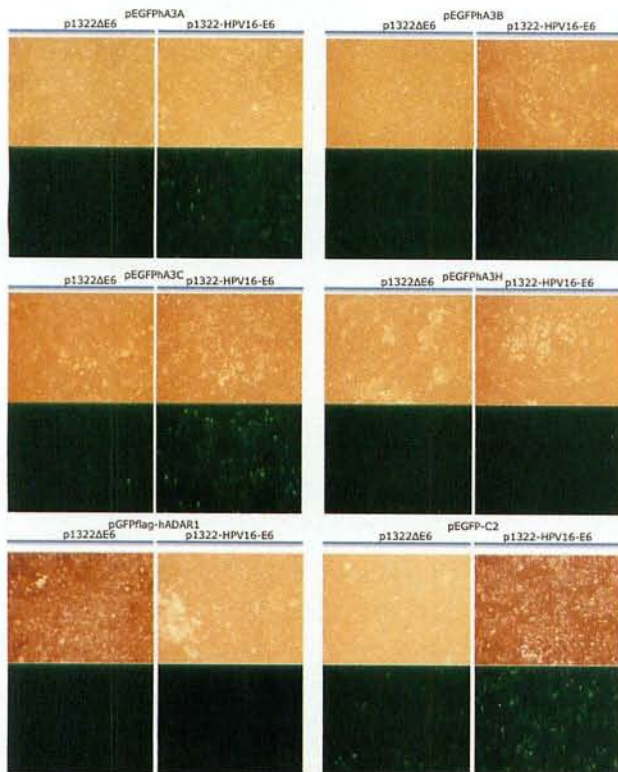
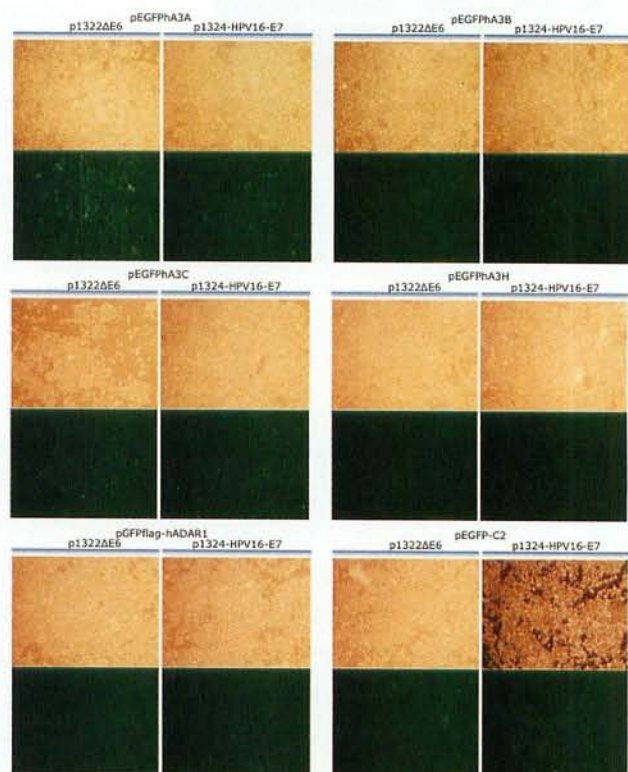


Fig.4 Cotransfection pEGFP-A3A, pEGFP-A3B, pEGFP-A3C, pEGFP-A3H, pGFPflag-hADAR1 and p1324-HPV16-E7 in HEK293T by Fugene 6. HEK293T cells are passaged to each well in 12 well plate. Next morning, medium is replaced to fresh 2 ml serum added DMEM. Mix and add plasmid, serum free DMEM, Fugene6 to each well. Evening, add 2 ml serum added DMEM. After 48 h from transfection, take photos.



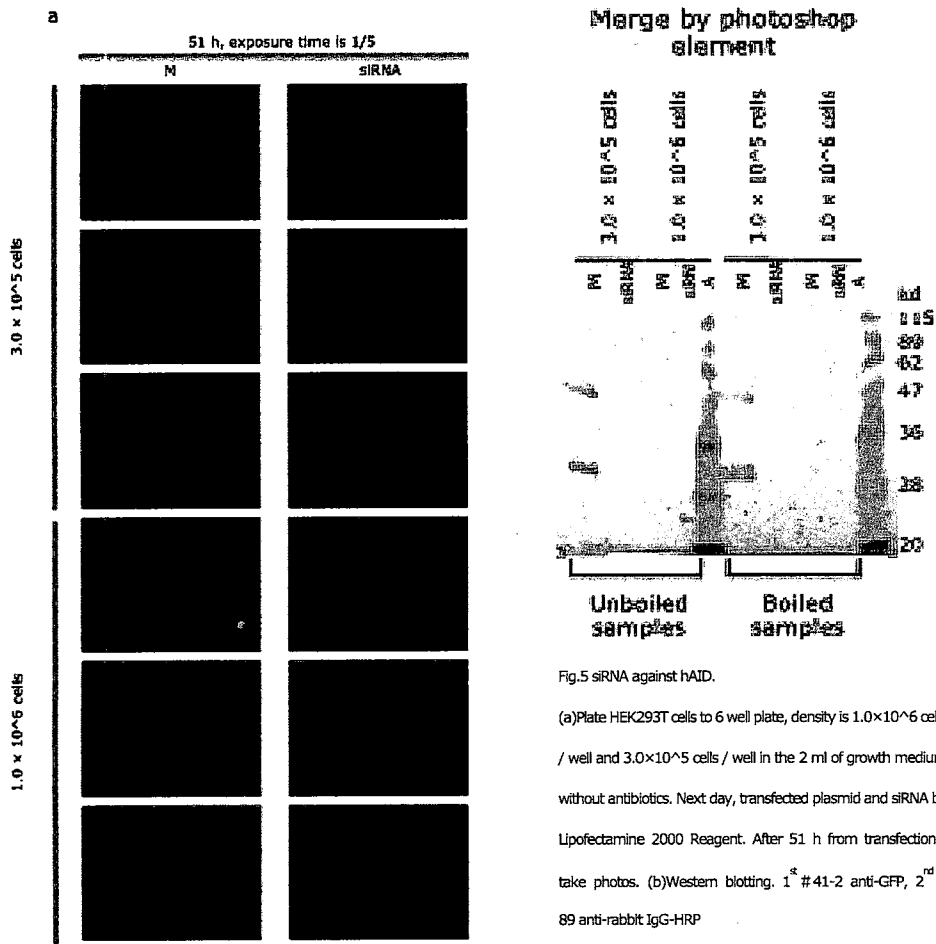


Fig.5 siRNA against hAID.  
 (a) Plate HEK293T cells to 6 well plate, density is  $1.0 \times 10^6$  cells / well and  $3.0 \times 10^5$  cells / well in the 2 ml of growth medium without antibiotics. Next day, transfected plasmid and siRNA by Lipofedamine 2000 Reagent. After 51 h from transfection, take photos. (b) Western blotting. 1<sup>st</sup> # 41-2 anti-GFP, 2<sup>nd</sup> # 89 anti-rabbit IgG-HRP

目的遺伝子がどのような働きをしているかを調べる方法の一つに、遺伝子もしくは遺伝子産物を減少させて影響を検討する方法がある。その目的遺伝子産物の減少を起こさせるのにRNAiというメカニズムが知られている。RNAiは、二本鎖RNAと相補的な塩基配列を持つmRNAが分解される現象であり、RNAi法は、この現象を利用して人工的に二本鎖RNAを導入することにより、任意の遺伝子の発現を抑制する手法である(10)。そのメカニズムを応用したsiRNAsやmiRNAsを模倣した合成hairpin RNAsは、mRNAを分解することにより効果的に標的遺伝子のサイレンシングを行うことが知られている(11)。本研究ではsiRNAによるknock downにより候補となる配列を決定し、shRNAを発現するベクターの構築を行った。siRNA、shRNAによるhAID、APOBEC3Gのknock downはHEK293T細胞を用いて行った。方

法としては、GFPを結合させた各々のタンパク質を発現させるプラスミドと、候補となるshRNAを共に細胞内に移入し蛍光の減少を確認する事でその効果を検討した。その結果、siRNAで効果のあった配列を含むshRNA発現プラスミドを共発現した場合、hAIDの蛍光は減少し、ウェスタンブロットでもその減少は確認されshRNAはknock downを起こす事がわかった(Fig.5,6)。APOBEC3Gに対するsiRNAでも同様にknock downを起こす事がわかった(Fig.7)。

4. 考察

本研究によってAPOBECファミリーの局在が示された。A3Aには核局在シグナル、細胞質局在シグナルの両方を認める事ができずこの事は実験結果と一致した。A3Bは核局在シグナルを206から212番目のアミノ酸配列に認めたが実験結果は細胞質への局在が大部分を占めるものとなった。また、A3Bが細胞核へ優先的に局在するという報告もあるがこれはGFP融合の有無によって局在に影響が及ぼされたと考えられる(12)。同様にA3CもA3Aには核局在シグナル、細胞質局在シグナルの両方を認める事ができなかったが、細胞質へ優先的に局在するという結果を見ると新しい細胞質局在シグナルの存在もしくは、GFP融合による影響が考えられる。A3Gでも核局在シグナル、細胞質局在シグナルの両方を認める事ができなかったが、近年では核局在シグナルが存在するという報告もあり実験結果とは矛盾しない。A3Hには核局在シグナル、細胞質局在シグナルの両方を認める事ができずこの事は実験結果と一致した。

HPVE6ではAPOBECファミリーの減少を確認する事はできなかった。E6はE6-APという細胞由来のコピキチンライゲースと複合体を作ることが報告されており、複合体形成によりE6-APの本来とは異なる基質との結合を起こさせると言われている(13)。HEK293T内に単独でE6を発現させた場合とE6-APを強制発現させた条件下でE6を発現させた場合ではその半減期が異なり細胞内のE6濃度が大きく異なる(14)。今回の実験ではE6をAPOBECと共発現させたのでE6が十分に働く事ができなかった可能性が考えられ、コントロールとなるp53でE6が機能しているかをモニターする必要があった。

HPVE7によるA3Aの減少を確認する事ができた。しかし、コントロール群でも発現量が下がるといった現象が見られ、これがE7によるapoptosisの結果なのか、それともE7による発現量低下を示すのか議論の余地が残る結果となり、判断するにはさらに精査を必要とする。

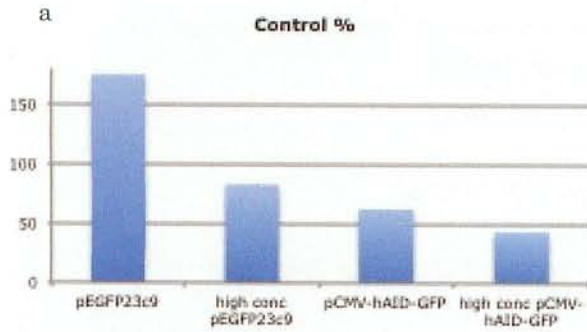
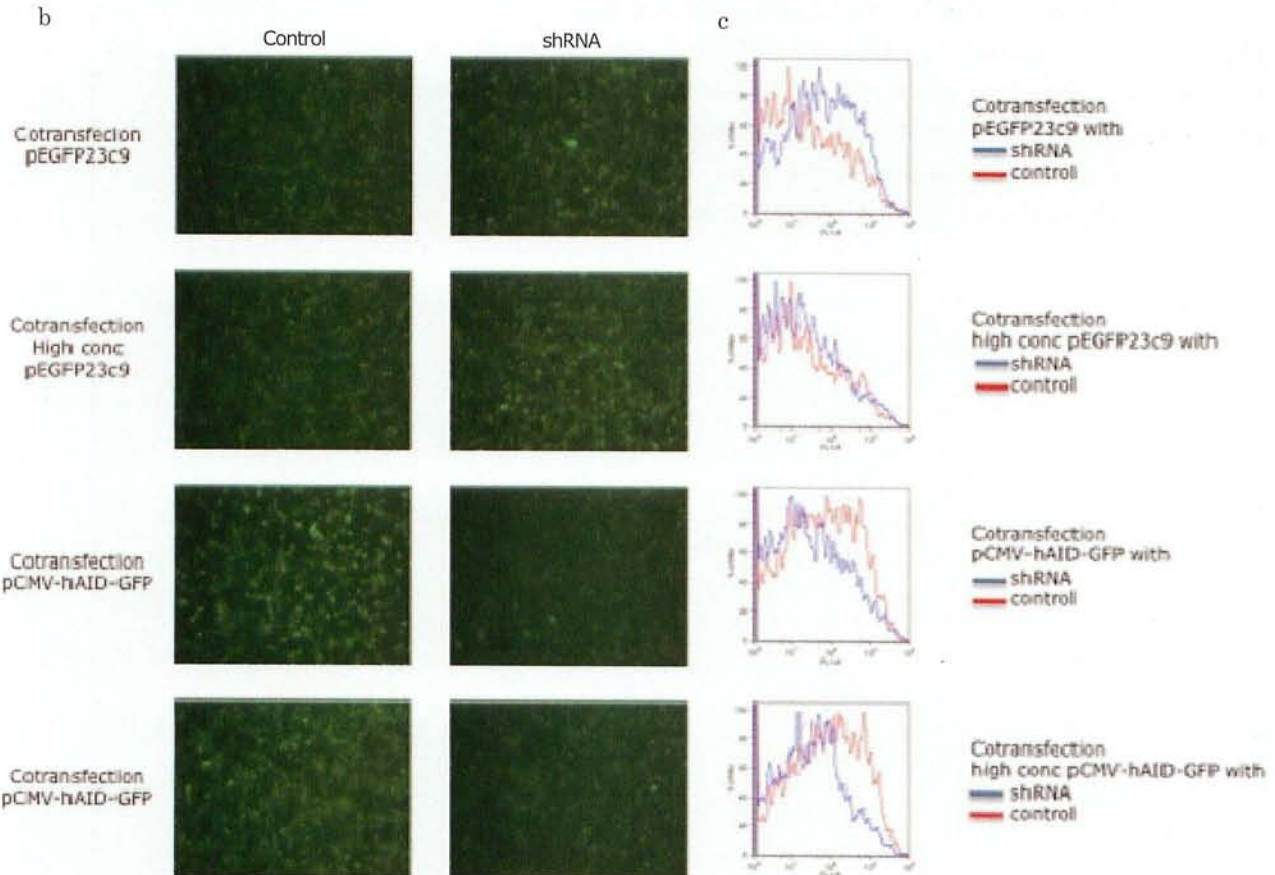


Fig.6 shRNA against hAID with pSIREN plasmid.

Plate HEK293T cells to 6 well plate, density is  $3.0 \times 10^5$  cells / well in the 2 ml of growth medium without antibiotics. Next day, transfected plasmids by Lipofectamine 2000 Reagent. After 48 h from transfection, take photos. (a) Fluorescence intensity compared with control transfection measured by FACS. (b) Observed by microscopy. (c) Histogram compared with control.



## 5. 結論

各 APOBEC ファミリーの局在を確認した。それにより、A3A や A3H は細胞内にユビキタスに、A3B と A3C は核に存在する場合もあるが大多数は主に細胞質に局在する事がわかった。A3G は細胞質へ局在する事がわかった。これらは HBV や HPV がいる条件でも同様の分布となった。

HPV E6 や E7 との APOBEC ファミリーの関係を検討した結果、E6 との共発現では APOBEC の発現量は変化しなかったが、E7 との共発現では A3A の発現量が蛍光レベルで減少している事がわかった。

標的遺伝子に特異的な siRNA を蛍光レベル、ウェスタンブロットの結果から同定し、それを shRNA を発現するプラスミドに搭載した。そして、shRNA を発現するプラスミドの効果を蛍光レベル、フローサイトメトリーにより検定し、抑制効果がある事を確認した。

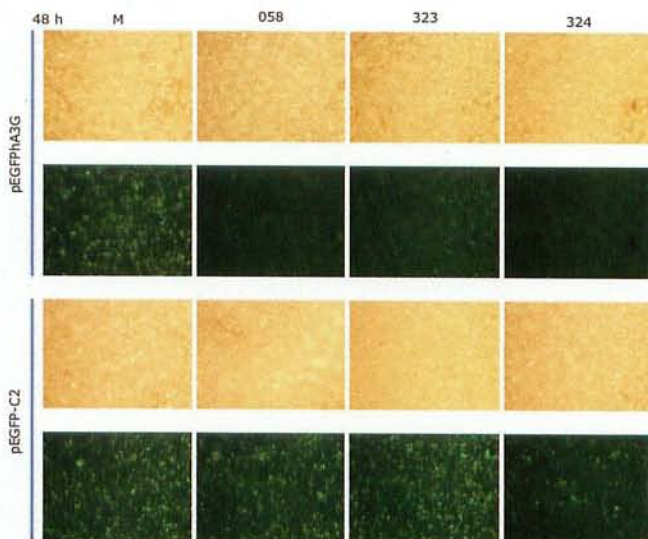


Fig.7 siRNA against APOBEC3G.

Plate HEK293T cells to 6 well plate, density is  $3.0 \times 10^5$  cells / well in the 2 ml of growth medium without antibiotics. Next day, transfected plasmids by Lipofectamine 2000 Reagent. After 48 h from transfection, take photos.

## 6. 参考文献

1. Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J., and Navaratnam, N. (2002) *Genomics* 79, 285–296
2. Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., and Malim, M. H. (2002) *Nature* 418, 646–650
3. Hamilton, C. E., Papavasiliou, F. N., and Rosenberg, B. R. (2010) *RNA Biol* 7, 220–228
4. Conticello, S. G. (2008) *Genome Biol* 9, 229
5. Vartanian, J. P., Guetard, D., Henry, M., and Wain-Hobson, S. (2008) *Science* 320, 230–233
6. Lagunas, M. A., Madrid, M. V., and Gariglio, P. (2010) *Biochim Biophys Acta* 1805, 6–16
7. Mehle, A., Strack, B., Ancuta, P., Zhang, C., McPike, M., and Gabuzda, D. (2004) *J. Biol. Chem* 279, 7792–7798.
8. Martin, S., Jon, M. H., Pichard, D. V., and Peter, M. H. (1993) *Cell* 75, 495–505.
9. Sarah, N. B., David, E. W., and Vimla, B. (1996) *Cancer res* 56, 4620–4624
10. Mahmood, U. R., Ali, I., Husnain, T., and Riazuddin, S. (2008) *Biotechnol Adv* 26, 202–209
11. Sui, G., Soohoo, C., Affar, E. B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W. C., and Shi, Y. (2002) *PNAS* 99, 5515–5520
12. Mark, D., Hiroshi, M., and Reuben S, H (2008) *J viol* 82, 9591–9599
13. Mako, S., and Tohru, K. (2007) *Cancer Sci* 98, 1505–1511
14. Tomaić, V., Pim, D., and Banks, L. (2009) *Virology* 393, 7–10