

# Anti-Hepatitis B Virus activities of AID/APOBEC protein family

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/45343">http://hdl.handle.net/2297/45343</a>

## 【総説】

## B型肝炎ウイルスに対するAID/APOBECタンパク質ファミリーの作用

## Anti-Hepatitis B Virus activities of AID/APOBEC protein family

金沢大学医薬保健研究域医学系 分子遺伝学  
(第一生化学)

喜多村 晃 一

## はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染者は国内で130～150万人と推定されており、感染を放置すれば慢性肝炎、肝硬変、肝がんへと進行するおそれがある。HBVはコア、エンベロープ、ポリメラーゼ及びX遺伝子が一部重複してコードされる約3.2kbとコンパクトなDNAウイルスである。ウイルス粒子内では部分的二本鎖環状DNAのゲノム構造をとっているが、肝細胞に感染後は宿主DNA修復機構を利用してcccDNAと呼ばれる閉環状ウイルスDNAとなり、核内でエピゾーマルに維持されて新たなウイルス複製の鋳型となる。cccDNAからはエンベロープ、キャプシド、ポリメラーゼ、Xタンパク質を作るmRNAの他に、ウイルスゲノムそのものがpregenome RNA (pgRNA) として転写され、ウイルス粒子内で逆転写されてゲノムDNAが合成されるというレトロウイルスに似た特徴を持つ (図1)。

現在、HBVには効果的なワクチンがあるものの、すでに感染が成立している患者においてはcccDNAを除去する有効な治療法が無いために、持続感染の根治が難しいとされている。

近年、筆者らのグループなどによるいくつかの報告により、AID/APOBECタンパク質ファミリーのメンバーがHBVに対してcccDNAレベルで作用し、ウイルス複製を抑制することが明らかになってきたので本稿で概説したい。

## AID/APOBEC ファミリー

AID/APOBEC蛋白質ファミリーはDNA/RNA上のシトシン (C) をウラシル (U) へ変換する脱アミノ化活性を持つ遺伝子編集酵素群である (図2)。ヒトではAID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A～3F, APOBEC4の11種類がコードされている。このうちAPOBEC3サブファミリーは22番染色体に遺伝子座のクラスターを

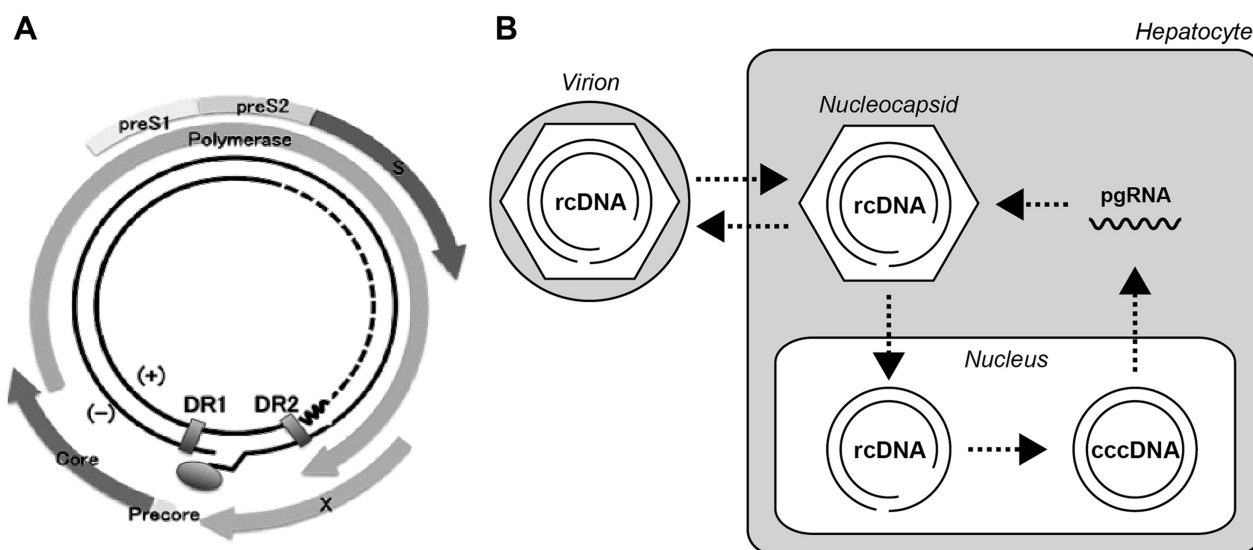


図1. HBV生活環の模式図

(A) HBVは全長約3.2kbのゲノムを持つDNAウイルスで、コア、エンベロープ、ポリメラーゼ及びX遺伝子が一部重複してコードされている。(B) HBVは肝細胞へ感染後、ウイルスゲノムは部分的二本鎖環状DNA (rcDNA) として核内に移行し、宿主DNA修復因子によって閉環状DNA (cccDNA) が形成される。cccDNAはウイルス複製の鋳型となりプレゲノムRNA (pgRNA) やウイルスタンパク質のmRNAが転写される。pgRNAはウイルス粒子内で逆転写され再びrcDNAが作られる。

形成しており、メンバーの抗ウイルス因子としての機能が明らかにされてきている<sup>1)</sup>。最もよく研究されているのがAPOBEC3Gで、脱アミノ化活性によってVifを欠損したHIV-1やレトロウイルスの複製を阻害する作用を持つことが知られている。その機構としては、逆転写で合成されたウイルスDNAへ高頻度にC-to-U変換を導入する変異蓄積が考えられている。マイナス鎖で生じるC-to-U変換は、修復されなければTとして働きプラス鎖の高頻度G-to-A変異として固定される。また、DNA上で生じたU塩基は、これを認識する修復因子ウラシルDNAグリコシダーゼ (UNG) によって取り除かれウイルスDNAの分解を引き起こすという機構も提唱されている (図3)。

HBVはレトロウイルスに似た生活環から2005年頃よりAPOBEC3Gの作用が研究され始め、強制発現によってウイルス粒子内DNAへのG-to-A変異の蓄積を引き起こすことが示されたが、その頻度は低く脱アミノ化活性

によるウイルス複製阻害効果は明らかにされていなかった<sup>2)~4)</sup>。

#### 肝細胞におけるAID/APOBEC遺伝子の発現誘導

APOBEC3ファミリーのメンバーは自然免疫系のシグナル伝達によって発現誘導することが知られている。マクロファージではIFN $\alpha$ によってAPOBEC3Aや3Gが、IFN $\gamma$ 及びIFN $\beta$ によってAPOBEC3Gが発現誘導される。また樹状細胞の研究でTLR-3や-4の刺激によるAPOBEC3G誘導が報告されている。肝細胞においてもIFN $\alpha$ によってAPOBEC3B, 3F, 3Gが、IFN $\gamma$ によってAPOBEC3Gが強く誘導されるとの報告がある<sup>1),5)</sup>。AIDも肝細胞へのTGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ によって発現誘導される<sup>6),7)</sup>。これらのサイトカインは肝細胞でHBV複製を抑制することから、AID/APOBECの抗ウイルス効果への寄与が期待され、HBVに作用する分子メカニズムの解明が進められた。

#### APOBEC3GのHBV cccDNAへの作用

先に述べたようにHBV cccDNAはウイルス複製の鋳型となる極めて重要な中間体である。しかしこれまでcccDNAに作用する宿主因子の研究は殆どなされてこなかった。その大きな要因には、ウイルス複製細胞内でのcccDNAのコピー数が少なく、また他のHBV DNAフォームとの区別がしにくいいため解析が難しいことが挙げられる。そこで筆者らは、cccDNAの産生量が高く、比較的解析が容易なDuck HBV (DHBV) を用いた研究を行った<sup>5)</sup>。

APOBEC3G強制発現とUNG活性阻害によって、DHBVウイルス粒子内のDNAでもHBVと同様の変異導入が確認された。さらにcccDNAの配列解析をしたところ、驚くべきことにウイルス粒子内に比べて極めて高頻度の変異導入が観察された (図4)。すなわちこれまで調べられていたウイルス粒子内DNAではなく、cccDNAがAPOBEC3Gの真のターゲットであると考えられる。APOBEC3GによるC-to-U変換はほとんどがマイナス鎖で起こっており、高頻度G-to-A変異として検出された。

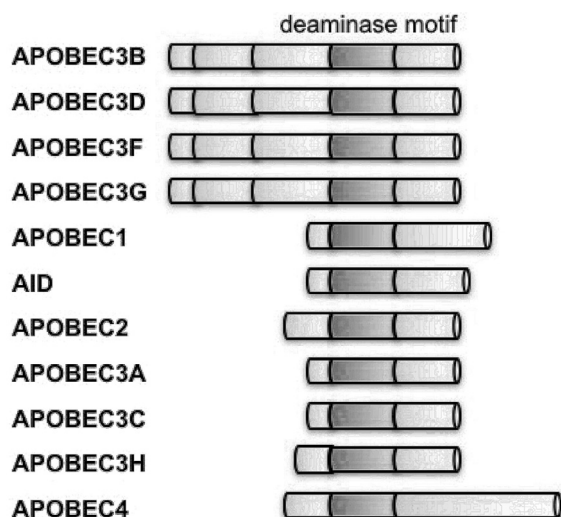


図2. AID/APOBECファミリーの模式図  
AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A-G, APOBEC4の11のメンバーで構成されている。deaminase motifを持ち、DNA/RNAへC-to-U変換を引き起こす。

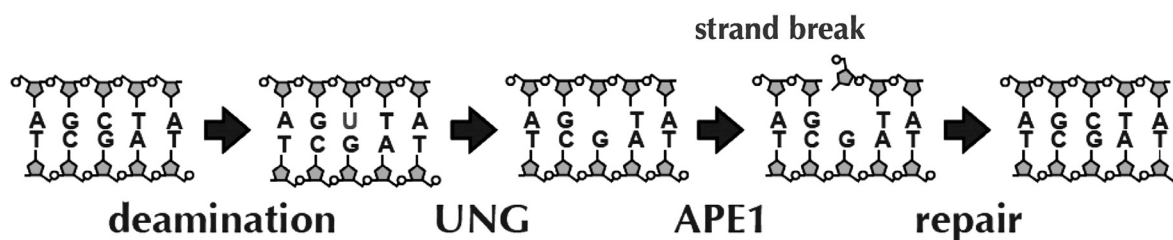


図3. AID/APOBECによるC-to-U変換とDNA上のUを除去する塩基除去修復機構  
DNA上に生じたU塩基はウラシルDNAグリコシダーゼ (UNG) によって認識・除去され、塩基を失ったapurinic/aprimidinic (AP) siteはエンドヌクレアーゼAPE-1によって切断される。通常の塩基除去修復経路では反対鎖の塩基を参照して修復されるが、AID/APOBEC脱アミノ化活性による抗ウイルス効果については塩基除去を介したDNA切断が提唱されている。また、UNGが作用しなければウイルスゲノムへ変異が蓄積すると考えられる。

これによりウイルスポリメラーゼ遺伝子の配列では複数のトリプトファンコドンTGGがストップコドンとなり、cccDNAの多くのクローンが複製能を失っていると考えられた。実際にcccDNAをrolling circle amplification法で増幅し、クローニングしたのち細胞内にトランスフェクションすると、ウイルス複製能が元のゲノムによるものより有意に減少していた。この高頻度G-to-A変異はUNG活性を抑制した細胞でのみ見られたので、通常はこの修復因子が作用してUを取り除いていると考えられる。そしてUNG活性の有無ではcccDNA量に変化が見られないことからUNGはcccDNAの分解ではなく、変異修復というウイルスを利する方向に働いていることが示唆された<sup>5)</sup>。

cccDNA形成過程では部分的二本鎖環状DNAから閉環状DNAになるために1) 共有結合するウイルスポリメラーゼの除去、2) 重複するflap構造をとるDNAの除去、3) 一本鎖部分のフィルインとライゲーションといったステップが必要で、これには宿主の様々なDNA修復因子を利用していると考えられている。上述の研究でUNGが初めてcccDNAに作用する修復因子として報告されたが、今後もcccDNA形成維持に関わるDNA修復因子群の作用についてさらなる研究が必要である。

#### AIDのHBV cccDNA への作用

AIDはB細胞で強く発現し抗体遺伝子座のクラススイッチ組換えとsomatic hypermutationに必須で、抗体の

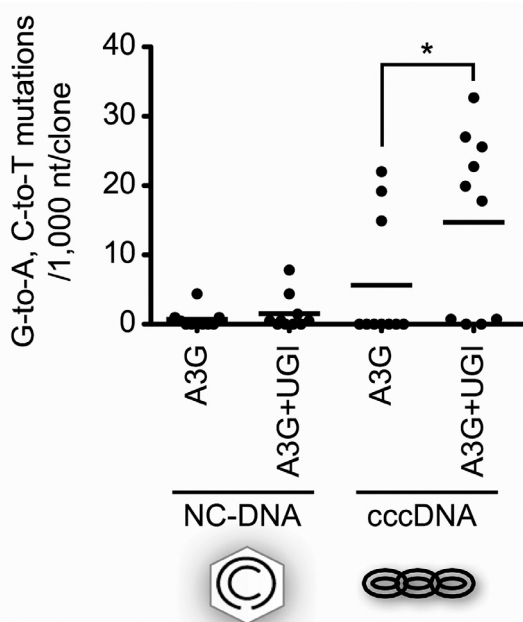


図4. APOBEC3G(A3G)とUNG阻害タンパク質(UGI)によるcccDNA高頻度変異導入  
これまで知られていたウイルス粒子内DNA(NC-DNA)より極めて高い頻度でcccDNAにG-to-A変異が導入されており、これはUNG阻害でさらに増強される。

遺伝的多様性を司る獲得免疫に重要な因子として同定された。そしてさらにAPOBEC3Gとの類似性や、肝細胞でサイトカインによって発現が誘導されることから、ウイルスゲノムに直接作用する自然免疫のプレイヤーとしての働きが調べられている。APOBEC3Gと同様にAIDのDHBV cccDNAへの作用を調べると、APOBEC3Gほど高頻度ではないがやはりG-to-A/C-to-Tの変異導入が検出され、さらにUNG活性の上下によりcccDNA量が変化した<sup>8)</sup>。このことからAIDによって生じたUをUNGが塩基除去した後、DNA分解の経路へ進んでいると考えられる(図5)。

作用がマイナス鎖に偏っていたAPOBEC3Gと異なり、脱アミノ化はプラス鎖にも一定の頻度で起きていることから、二本鎖両方に対するDNA脱アミノ化がcccDNAの分解を引き起こしている可能性がある。また、AIDは核移行シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)の両方を持ち、核内外をシャトルするタンパク質であるが、NESを欠損したAIDを強制発現したところcccDNA量の減少が強化されたことから、やはりAIDはAPOBEC3Gと同様にcccDNAもしくはその核内前駆体を直接のターゲットにしていると考えられる<sup>9)</sup>。

#### AIDのHBV pgRNA への作用

AIDはDNAのみならずRNAにも結合することが実験的に確かめられている。筆者らはウイルス粒子内でAIDがHBV RNAに対して頻度は低いながらC-to-UのRNA編集を行っていることを見出し、HBV RNAへの作用を明らかにしたが<sup>9)</sup>、そのウイルス抑制効果における役割は不明であった。そのような中で、2011年にB細胞抗体遺伝子座の研究から、クラススイッチ組換えにおいてAIDがRNA exosomeというタンパク質複合体と結合して働いている

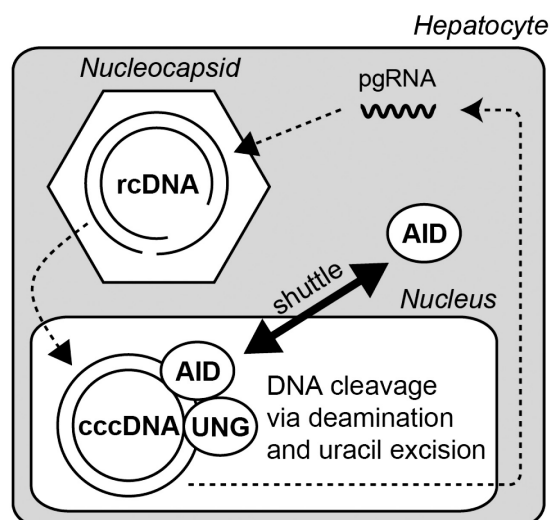


図5. AIDによるcccDNA分解機構の模式図  
AIDは細胞質と核をシャトルしており、核内でUNGと共にウイルスDNAの切断に作用している。

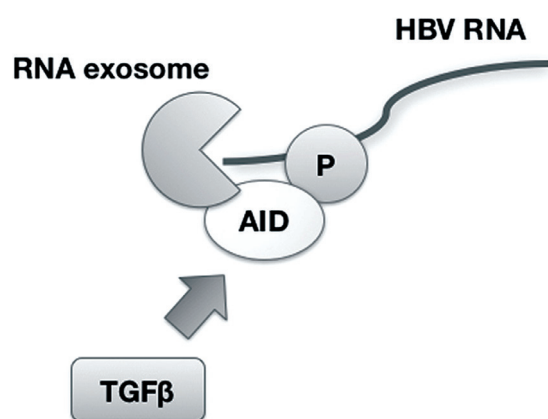


図6 AIDによるHBV RNA分解機構の模式図

AIDはHBVポリメラーゼタンパク質及び、RNA分解複合体であるRNA exosomeと結合する。HBVポリメラーゼはpgRNAなどのHBV RNAが持つε構造に結合するので、AIDを介してRNA exosomeがHBV RNAを分解するものと考えられる。

ことが示された<sup>10)</sup>。RNA exosomeは進化的に広く保存されているRNA分解複合体で、mRNAをはじめとする様々なRNA分子の品質管理に関わっている。HBVポリメラーゼはHBV RNAのεと呼ばれる特徴的な構造に結合するが、AIDはこのHBVポリメラーゼとRNA exosomeの両方に結合し、このRNA分解複合体をpgRNAへとリクルートすることが示された(図6)<sup>7)</sup>。

#### おわりに

以上のように、AID/APOBEC3はHBVに対してcccDNAやpgRNAといった様々なステップに作用し、ウイルス複製を抑制することがわかってきた。現行の慢性感染治療法として核酸アナログによるpgRNA逆転写阻害があるが、それとは異なる作用点を持つ治療法が見つければ相乗効果が見込まれる。

本稿ではDHBVというcccDNA解析モデルでの研究を中心に紹介してきたが、筆者らの最近の研究では、ヒト肝細胞とHBVでも同様の結果が得られている(未発表データ)。例えばHBV複製ヒト肝細胞培養株へのIFN $\gamma$ の添加によりcccDNAにG-to-A変異が導入され、これはIFN $\gamma$ で強く発現誘導されるAPOBEC3GをRNA干渉で抑えることにより打ち消される。さらにUNGを阻害すると変異頻度が上昇することも確認している。また、Protzerらのグループは、リンフォトキシンβレセプター(LTβR)アゴニスト及びIFN $\alpha$ によって肝細胞でAPOBEC3A及びAPOBEC3Bの発現誘導が起こり、cccDNAを分解すると報告している<sup>11)</sup>。これらLTβRシグナルやサイトカインのほとんどは強力な副作用を示すことが分かっておりすぐに治療に用いることはできないが、これまで全く分かっていなかったHBV cccDNAに関連するウイルス抑制の分子機構について解明が進めば、新たな治療への道が拓けると期待される。

#### 謝 辞

本総説執筆にあたり研究のご指導を賜りました金沢大学医薬保健研究域医学系分子遺伝学 村松正道教授に深謝いたします。また、執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会編集委員長の井関尚一教授並びに関係の方々に厚く御礼申し上げます。

#### 参 考 文 献

- 1) Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. *Virology*. 479-480: 131-145, 2015.
- 2) Suspene R, Guetard D, Henry M, Sommer P, Wain-Hobson S, Vartanian JP. Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8321-8326, 2005.
- 3) Vartanian JP, Henry M, Marchio A, Suspène R, Aynaud MM, Guétard D, Cervantes-Gonzalez M, Battiston C, Mazzaferro V, Pineau P, Dejean A, Wain-Hobson S. Massive APOBEC3 editing of hepatitis B viral DNA in cirrhosis *PLoS Pathog* 6: e1000928, 2010.
- 4) Jost S, Turelli P, Mangeat B, Protzer U, Trono D. Induction of antiviral cytidine deaminases does not explain the inhibition of hepatitis B virus replication by interferons. *J Virol* 81: 10588-10596, 2007.
- 5) Kitamura K, Wang Z, Chowdhury S, Simadu M, Koura M, Muramatsu M. Uracil DNA glycosylase counteracts APOBEC3G-induced hypermutation of hepatitis B viral genomes: excision repair of covalently closed circular DNA. *PLoS Pathog* 9: e1003361, 2013.
- 6) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). *J Biol Chem* 288: 31715-31727, 2013.
- 7) Liang G, Liu G, Kitamura K, Wang Z, Chowdhury S, Monjurul AM, Wakae K, Koura M, Shimadu M, Kinoshita K, Muramatsu M. TGF- $\beta$  suppression of HBV RNA through AID-dependent recruitment of an RNA exosome complex. *PLoS Pathog* 11: e1004780, 2015.
- 8) Chowdhury S, Kitamura K, Simadu M, Koura M, Muramatsu M. Concerted action of activation-induced cytidine deaminase and uracil-DNA glycosylase reduces covalently closed circular DNA of duck hepatitis B virus. *FEBS Lett* 587: 3148-3152, 2013.
- 9) Liang G, Kitamura K, Wang Z, Liu G, Chowdhury S, Fu W, Koura M, Wakae K, Honjo T, Muramatsu M. RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 2246-2251, 2013.
- 10) Basu U, Meng FL, Keim C, Grinstein V, Pefanis E, Eccleston J, Zhang T, Myers D, Wasserman CR, Wesemann DR, Januszky K, Gregory RI, Deng H, Lima CD, Alt FW. The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates *Cell* 144: 353-363, 2011.
- 11) Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 343: 1221-1228, 2014