

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293103

研究課題名(和文) 遺伝子改変酵素群APOBECの発ガンウイルス感染における役割

研究課題名(英文) Role of APOBEC deaminases in human tumor virus infection

研究代表者

村松 正道 (Muramatsu, Masamichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20359813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫系の効果分子APOBECとヒト腫瘍ウイルスの代表であるパピローマウイルス(HPV)やB型肝炎ウイルス(HBV)との関係性を調べた。その結果、APOBECはHPVの粒子形成プロセスに干渉し、感染性を低下させ、あるいはウイルスDNAに変異を作る事が明らかになった。またAPOBECがHBVのウイルスRNAを破壊する活性を持つ事がわかった。これらの研究により、免疫系の持つHBVやHPVに対する感染防御力の一つにAPOBECという宿主酵素群が関与する可能性が浮上し、その機構の一旦が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We investigated antiviral role of immune effector molecules APOBEC in viral infection of papillomavirus (HPV) and hepatitis B virus (HBV). Experimental results suggest that APOBECs reduce infectivity of HPV16 pseudovirion by interfering viral assemble in vitro. DNA sequencing of clinical samples derived from precancerous cervixs revealed that APOBECs introduce hypermutation in HPV16 viral DNA. Mapping of mutation identifies viral promoter and replication origin as a hot spot of hypermutation mechanism. We also found that AID is induced in hepatocytes by TGFb stimulation and AID forms an RNP complex of viral P protein and host RNA exosome, resulting in degradation of HBV RNA. These studies demonstrate significant role of APOBEC protein in HPV and HBV infection.

研究分野：virus

キーワード：APOBEC3 AID virus hypermutation Hepatitis B virus Papillomavirus

1. 研究開始当初の背景

遺伝子改変酵素群 APOBEC ファミリー (以下 APOBECs と記載) は、核酸中のシトシン(C)をウラシル(U)に変換する 11 種類の酵素群である。これまでの研究により、我々は APOBEC ファミリータンパクが B 型肝炎ウイルス(HBV)DNA に高頻度変異を起こしウイルス複製を阻害することを示した。APOBEC タンパクの HBV や同じ癌ウイルスであるパピローマウイルス(HPV)に対する抗ウイルス活性の分子機構は未知の部分が多く、また発癌との関係はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

APOBEC タンパクが、HBV や HPV の抗ウイルス因子となるか、あるいは、発癌因子となるかを検討する。

3. 研究の方法

HBV や HPV の培養細胞複製系、マウスモデル、ヒト臨床検体の 3 つの実験系を用いて、感染諸相の APOBEC のウイルス複製阻害能と宿主ゲノム変異活性を測定する。

4. 研究成果

(1) APOBEC タンパクの HPV16 粒子感染性に与える影響についての研究。

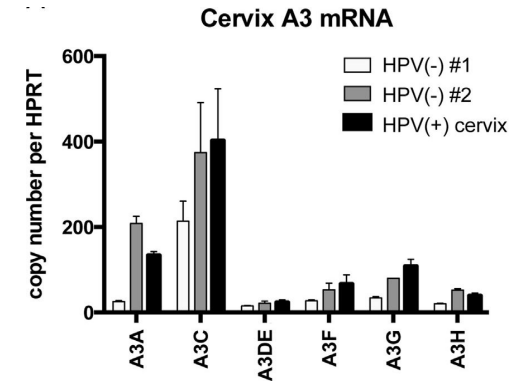
APOBEC タンパクのうち APOBEC3 はヒトでは 7 種類が知られている。これは多くの場合感染細胞に発現誘導され、抗ウイルス活性を顕す可能性がある。一方、HPV16 は、キャップシドタンパク L1 と L2 を、レポーター遺伝子 (今回はルシフェラーゼを使用した) と共に細胞に発現させると、L1 と L2 が自動集合しこの際、レポータープラスミドを取り込みウイルス粒子様構造 (Pseudovirion と呼ぶ) を形成する。本研究では、HPV16 Pseudovirion 形成時に、7 つの APOBEC3 をそれぞれ発現させ、Pseudovirion の形成に与える影響を調べた。その結果、APOBEC3A と 3C が、Pseudovirion の感染性を低下させることを見いだした。

また APOBEC3 とキャップシドタンパク L1 との結合性を調べたところ、APOBEC3C が L1 と結合する事が免疫沈降実験より明らかとなった。これらの結果は、培養細胞のレベルではあるが、APOBEC3C が HPV16 の抗ウイルス因子として働く可能性を示唆した。

(2) 次世代シーケンスによる HPV16 の高頻度突然変異の解析

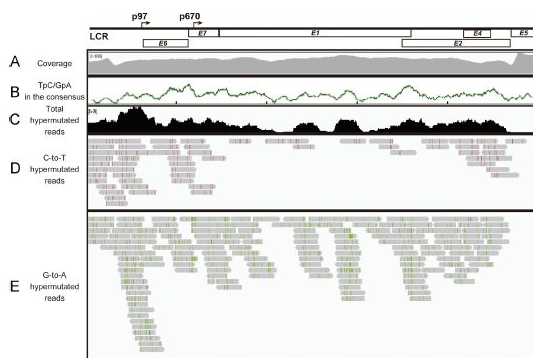
実際の感染病態で HPV16 と APOBEC3 の関係性を見る事は極めて重要であるが、これまでそのような研究はない。そこで本研究では、まず子宮頸部の臨床検体を用いて、APOBEC3 の発現を RT-qPCR 法で検討した。

その結果、子宮頸部では APOBEC3A と APOBEC3C の発現が比較的高く、HPV16 陽性の子宮頸部サンプルでは、陰性のものより APOBEC3 の発現が、比較的高めになる事がわかった。



次に、HPV16 陽性子宮頸部前癌病変 (CIN1) を用いて、HPV16 への APOBEC3 の作用の一つである高頻度変異の蓄積を測定した。これまでの研究より、APOBEC3 が DNA に作用しその酵素活性を発揮したならば、その標的 DNA に C→T (反対鎖側の場合 G→A と記載) の変異が起こる事がわかっている。どの程度 C→T 変異が起こったかわ3D-PCR 法という特殊 PCR で測定できる事を示してきた。C→T 変異を多数持つ DNA は AT リッチ DNA となり、より低い温度で変成する性質があるが、3D-PCR は変成温度を低下させる事で C→T 変異を検出する PCR 法である。この 3D-PCR 法で HPV16 陽性子宮頸部前癌病変中に含まれる HPV16 DNA を検討したところ、3 検体中 2 検体で、C→T 高頻度変異を検出した。

さらに低温で増幅した DNA をシーケンスすると実際 C→T 高頻度変異が起こっている事が確認された。また変異パターンは、APOBEC3 の酵素額的特性に合致するものであった。



そこで次にこれらの検体を用いて、次世代イシューシーケンス法で、変異の解析を行った。その結果 CIN1 サンプルでは、1 リードあたり 3 つ異常の C→T 変異を持つクローンの出現頻度は、極めて低頻度であったが、それでも 242 クローンの C→T 高頻度変異を持つクローンを同定した。それらのクローンをマッピングしたところ、ウイルスプロモーター部分に変異の集積をみた。

これらの結果、世界で初めて臨床検体で高頻度変異を持つ HPV16 を次世代シーケンスで捉えたもので、APOBEC3 がプロモーター部分を標的にしていることを明らかにしたものである。

(3)HBV の RNA に対する AID の作用の検討。  
AID は TGF $\beta$  刺激で肝細胞に発現誘導される事が知られていた。そこでこの研究では TGF $\beta$  下で発現誘導される AID の機能的役割を培養細胞系にて検討した。その結果、AID はウイルスの P タンパクに結合し、P タンパクはウイルスの RNA に結合するので、AID は P タンパクを介して、ウイルス RNA と結合する事がわかった。さらに AID は RNA 分解機構である RNA exosome 複合体にも結合する事を見いだした。すなわち TGF $\beta$  刺激があると AID が発現誘導され、AID/P タンパク/RNA exosome が、複合体を形成する事により、ウイルス RNA を壊す事がわかった。この研究により AID および RNA exosome が HBV の抗ウイルス活性の一旦を担っている事が明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Satoru Kondo, Kousho Wakae, Naohiro Wakisaka, Yosuke Nakanishi, Kazuya Ishikawa, Takeshi Komori, Makiko Moriyama-Kita, Kazuhira Endo, Shigeyuki Murono, Zhe Wang, Kouichi Kitamura, Tomoaki Nishiyama, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Masamichi Muramatsu, and Tomokazu Yoshizaki, APOBEC3A Associates with Human Papillomavirus Genome Integration in Oropharyngeal Cancers, *Oncogene*、査読有、36 巻、2017、1687-1697  
DOI: 10.1038/ncr.2016.335.
2. Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Naka K, Hirao A, Muramatsu M, Takehara K, Fujimoto M, A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses an allergic disease via PI3K-Akt pathway activation, *J Allergy Clin Immunol*、査読有、6749 巻、2016、00130-00135  
DOI: 10.1016/j.jaci
3. Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Naka K, Hirao A, Muramatsu M, Takehara K, Fujimoto M, A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses an allergic disease via PI3K-Akt pathway activation, *J Allergy Clin Immunol*、査読有、In press、2016、In press
4. Yamamoto N, Kerfoot SM, Hutchinson AT, Dela Cruz CS, Nakazawa N, Szczepanik M, Majewska-Szczepanik M, Nazimek K, Ohana N, Bryniarski K, Mori T, Muramatsu M, Kanemitsu K, Askenase PW, Expression of activation-induced cytidine deaminase enhances the clearance of pneumococcal pneumonia: evidence of a subpopulation of protective anti-pneumococcal b1a cells, *Immunology*、査読有、147 巻、2016、97-113  
DOI:10.1111/imm.12544
5. Wakae K, Aoyama S, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Monjurul AM, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I, Yamaguchi K, Shigenobu S, Nishiyama T, Muramatsu M, Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by Next-Generation Sequencing, *Virology*、査読有、485 巻、2015、460-466  
DOI:10.1016
6. Kukimoto I, Muramatsu M, Genetic variations of human papillomavirus type 16: implications for cervical carcinogenesis. (総説), *Jpn J Infect Dis*、査読有、68 (3) 巻、2015、169-175  
DOI:10.7883
7. Kukimoto I, Mori S, Aoyama S, Wakae K, Muramatsu M, Kondo K, Hypermutation in the E2 gene of human papillomavirus type 16 in cervical intraepithelial neoplasia, *J Med Virol*、査読有、87 巻、2015、1754-1760  
DOI:10.1002/jmv.24215.
8. Guoxin Liang, Guangyan Liu, Kouichi Kitamura, Zhe Wang, Sajeda Chowdhury, Ahasan Md Monjurul, Kousho Wakae, Miki Koura, Miyuki Shimadu, Kazuo Kinoshita, and Masamichi Muramatsu, TGF-Suppression of HBV RNA through AID-dependent Recruitment of an RNA Exosome Complex, *PLoS Pathog.*/journal.ppat.1004780.eCollection 2015、査読有、11 (4) 巻、2015、e1004780  
DOI:10.1371
9. Ahasan MM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Mori S, Kukimoto I, Muramatsu M, APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity, *Biochem Biophys Res Commun*、査読有、457 巻、2015、295-199  
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.12.103
10. Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S, Kita M, Endo K, Tsuji A, Murono S, Muramatsu M, Yoshizaki T, HPV Status Determines the

Efficacy of Adjuvant Chemotherapy With S-1, an Oral Fluorouracil Prodrug, in Oropharyngeal Cancer, *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 査読有、124 (5) 巻、2015、400-406

DOI: 10.1177/0003489414560434

11. Aga M, Kondo S, Yamada K, Wakisaka N, Yagi-Nakanishi S, Tsuji A, Endo K, Muroso S, Ito M, Muramatsu M, Kawano M, Yoshizaki T, Immunoglobulin class switching to IgG4 in Warthin tumor and analysis of serum IgG4 levels and IgG4-positive plasma cells in the tumor, *Hum Pathol*, 査読有、45(4)巻、2014、793-801  
DOI: 10.1016/j.humpath.2013.11.012

[学会発表](計 23 件)

1. 村松正道, Role of APOBEC proteins in HBV and HPV16 infections、International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe2017 (招待講演)(国際学会)、2017年1月27日、神戸ポートピアホテル
2. 村松正道, 『免疫分子遺伝学からがん制圧への道』AID/APOBECファミリーとその抗ウイルス活性、第32回(2016) 11月12日 京都賞記念ワークショップ 基礎科学部門(招待講演)、2016年11月12日、京都大学 百周年時計台記念館
3. Kouichi Kitamura, Kousho Wakae, Lusheng Que, Md Mohiuddin, and Masamichi Muramatsu, Flap endonuclease 1 is involved in the formation of HBV cccDNA, 2016 International HBV Meeting, Hepatitis B foundation (Poster presentation)(国際学会)、2016年9月21日-2016年9月24日、Yonsei University, Soul Korea
4. 村松正道, APOBECファミリーとその抗ウイルス活性、第13回ウイルス学キャンプ in 湯河原(招待講演)、2016年8月30日、ニューウェルシティー湯河原
5. 喜多村晃一, 若江亨祥, 村松正道, B型肝炎ウイルスのcccDNA形成機序の研究、平成28年度 北陸腸内細菌研究会、2016年7月9日、ホテル日航金沢
6. 村松正道, APOBEC Deaminases: A new type of Antiviral Factor Masamichi Muramatsu, BIT's 7<sup>th</sup> Annual World DNA and Genome Day 2016(招待講演)(国際学会)、2016年4月27日、中国大連国際会議センター
7. 喜多村晃一, Guoxin Liang, Guangyan Liu, 村松正道, AIDによるRNA exosomeを介したHBV RNA分解、日本生化学会北陸支部 第33回大会、2015年5月23日、富山大学杉谷キャンパス
8. 村松正道(オーガナイザー 竹内 理(京都大学)/久場 敬司(秋田大学))、Activation-induced cytidine deaminase down-regulates hepatitis B virus RNA through the RNA exosome, BMB2015(招待講演)、2015年12月4日、神戸商工会議所 3F 神商ホールB
9. Que Lusheng, Wakae Kosho, Kitamura Koichi, Muramatsu Masamichi, Epsilon RNA is required for AID-mediated reduction of HBV transcripts, BMB2015、2015年12月1日、神戸国際展示場 3号館 1階
10. Liu Guangyan, Wakae Kosho, Kitamura Koichi, Muramatsu Masamichi, Epsilon RNA plays an important role in AID-dependent down-regulation of HBV transcripts、第63回日本ウイルス学会 学術集会、2015年11月24日、福岡国際会議場
11. 坂本直也, Wakae Kosho, Kitamura Koichi, Muramatsu Masamichi, APOBEC3Hの多型とB型肝炎ウイルス複製阻害活性の検討、第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月24日、福岡国際会議場
12. 村松正道, APOBECs: antiviral or oncogenic?、Dalian CancerSymposium from basic research to clinical application、2015年9月24日、大連大学(大連市、中国)
13. 村松正道, APOBECとウイルス感染、ウイルス研セミナー「ウイルス研究の潮流」(共同利用・共同研究拠点事業)(招待講演)、2015年9月2日、京都大学ウイルス研究所本館 1階セミナー
14. Kosho Wakae, Mitsuhiro Nakamura, Satoru Kondo, Hiroshi Fujiwara, Tomokazu Yoshizaki, Iwao Kukimoto, Tomoaki Nishiyama, and Masamichi Muramatsu, Next Generation Sequencing detects APOBEC3 mediated Hypermutation in Human Papillomavirus Type 16 Genome in vivo、2015 DNA tumor virus Meeting, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), An IUBMB symposium (国際学会)、2015年7月24日、イタリア Congress Centre of the Stazione Marittima
15. 村松正道, パピローマウイルス16型感染におけるAPOBEC3タンパクの役割、北陸腸内細菌研究会 総会・研究発表会、2015年7月11日、富山第一ホテル
16. Ahasan Monjurul, Kosho Wakae and Masamichi Muramatsu, Role of APOBEC3 in HPV expressing cell、Japan Cancer Society Symposium、2015年1月21日-2015年1月22日、ANA クラウンプラザ(金沢)
17. Ahasan Monjurul, Kosho Wakae and Masamichi Muramatsu、APOBEC3

suppresses infectivity of HPV pseudovirion, The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014年12月10日-2014年12月12日、京都国際会議場

18. 喜多村晃一、島津美幸、小浦美樹、村松正道、Role of host DNA repair factor in the maintenance of hepatitis B virus cccDNA, 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日
19. 村松正道、AID inhibits multiple steps of the HBV replication, 第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月12日、横浜パシフィコ
20. 若江亨祥、Ahasan Monjurul、王哲、喜多村晃一、森清一郎、柗元巖、中村充弘、藤原浩、村松正道、APOBEC3はHPV16 Pseudovirionの感染を低下させる、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月12日、横浜パシフィコ
21. 喜多村晃一、島津美幸、小浦美樹、村松正道、B型肝炎ウイルスcccDNAに対するAPOBECタンパク質の作用、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月12日、横浜パシフィコ
22. Guangyan Liu, Guoxin Liang, Kouichi Kitamura, Zhe Wang, Sajeda Chowdhury, Miki Koura, Kousho Wakae and Masamichi Muramatsu, A novel antiviral function of activation-induced cytidine deaminase downregulates hepatitis B viral RNA through recruitment of the RNA exosome complex, 第87回日本生化学会大会、2014年10月17日-2014年10月18日、京都国際会議場
23. 村松正道、APOBECデアミナーゼの新規抗ウイルス活性、北陸腸内細菌研究会総会・研究発表会、2014年7月19日、ホテル日航金沢

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村松 正道 (MURAMATSU Masamichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20359813

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

喜多村 晃一 (KITAMURA Kouichi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70378892

若江 亨祥 (WAKAE Kousho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70638303

### (4) 研究協力者

小浦 美樹 (KOURA Miki)、島津 美幸

(SIMADU Miyuki)、Lusheng Que、

Yingfang Li、Md Mohiuddin Guangyan

Liu、Ahasan Monjurul、Zhe Wang