



第13回ウイルス学キャンプ in 湯河原  
主催:ウイルス学キャンプ実行委員会

# APOBECファミリーとその抗ウイルス活性

平成28年8月30日

ニューウェルシティー湯河原

村松 正道

金沢大学 医 分子遺伝

1. **APOBEC**とは

2. **HBV**とAPOBEC

3. **HPV16**とAPOBEC

総論的

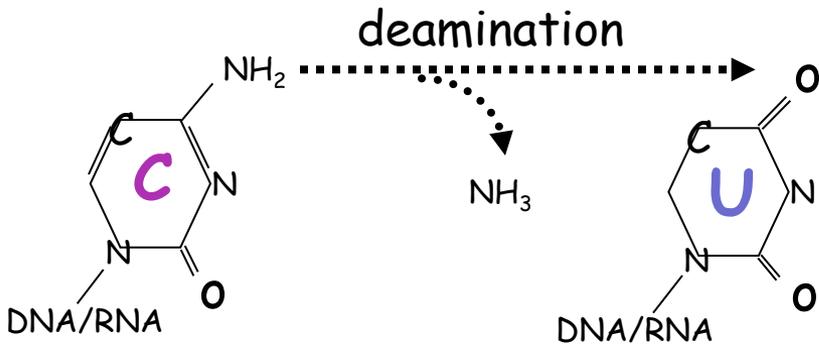
これまでにわかった事

未解決事象や問題点

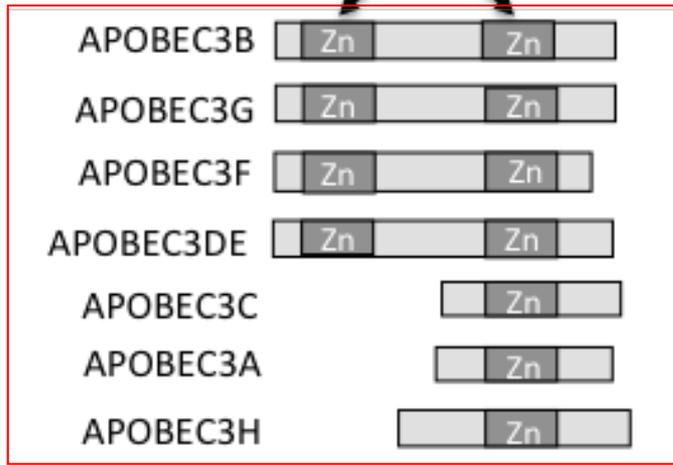
---

4. 失敗や経験から学んだこと

# APOBEC family



H-X-E-X(23-28)-P-C-X(2-4)-C



Anti viral factor  
(HIV-1)

AID

APOBEC1

APOBEC2

APOBEC4

viral DNA

GCATATCCTCCGCCAACCGCACTCCA

APOBEC3

Hypermethylation

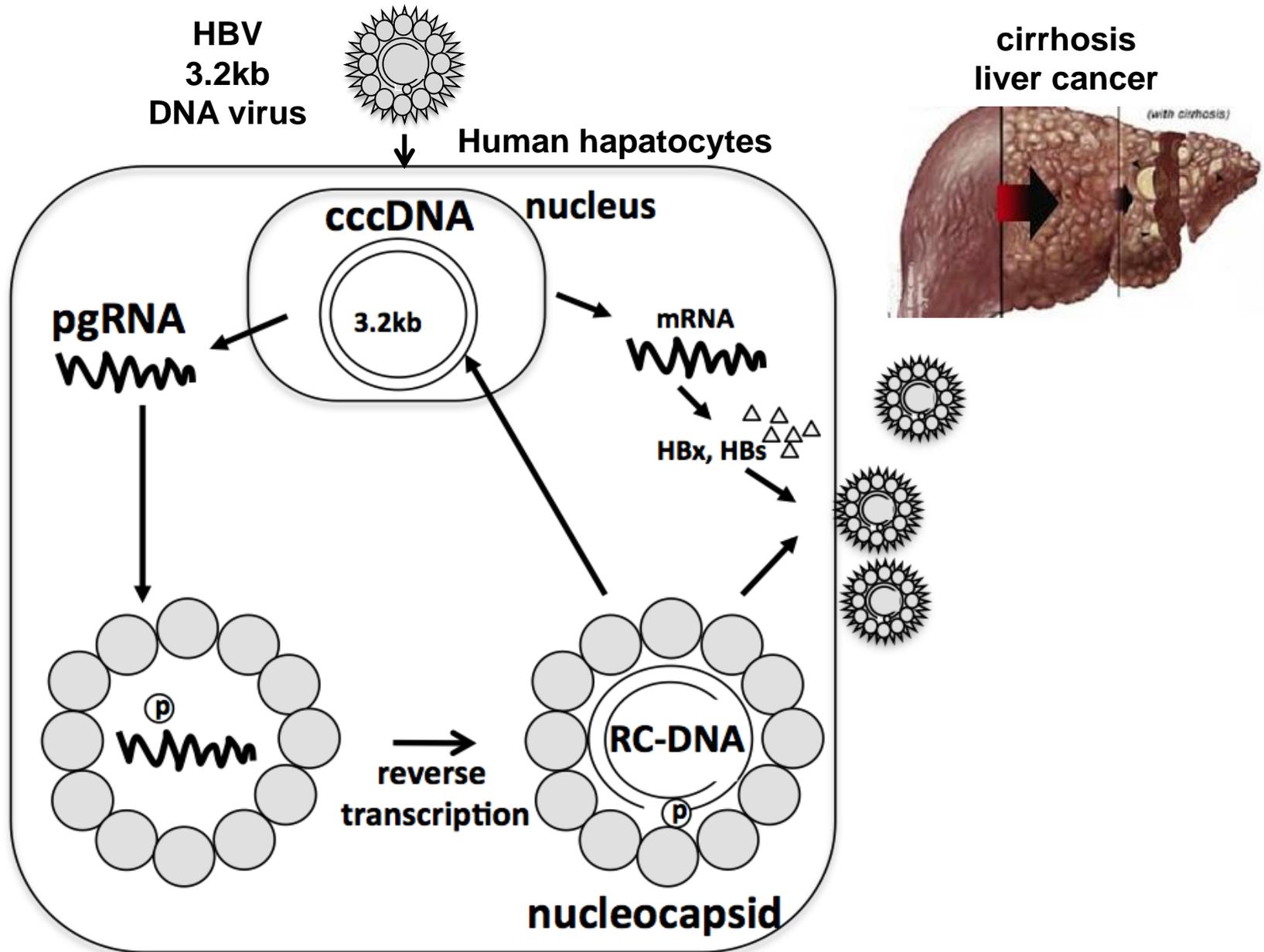
GUATATCUTUUGUUAACUGUACTCUA

replication block

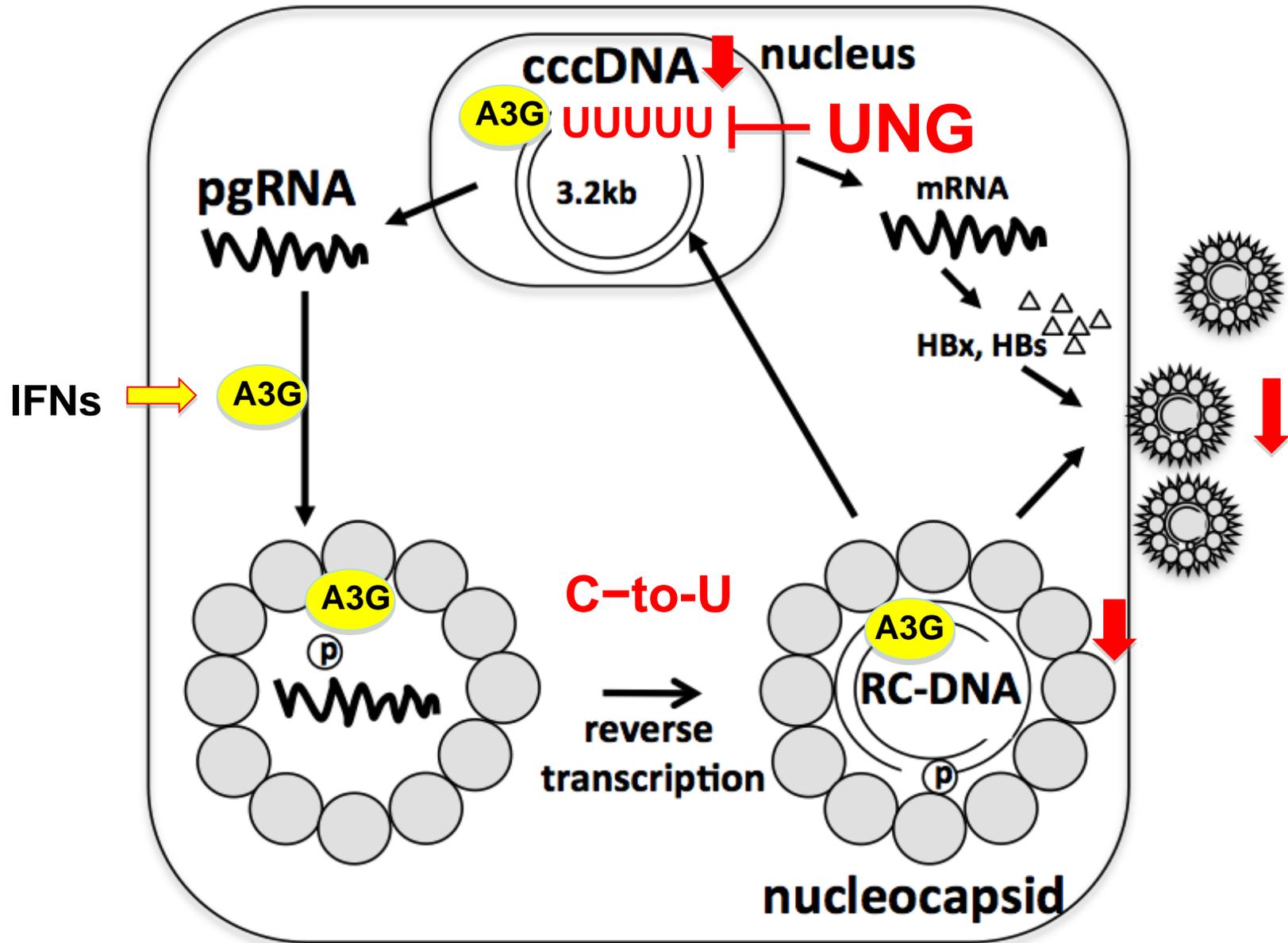
APOBEC

HBV & HPV16

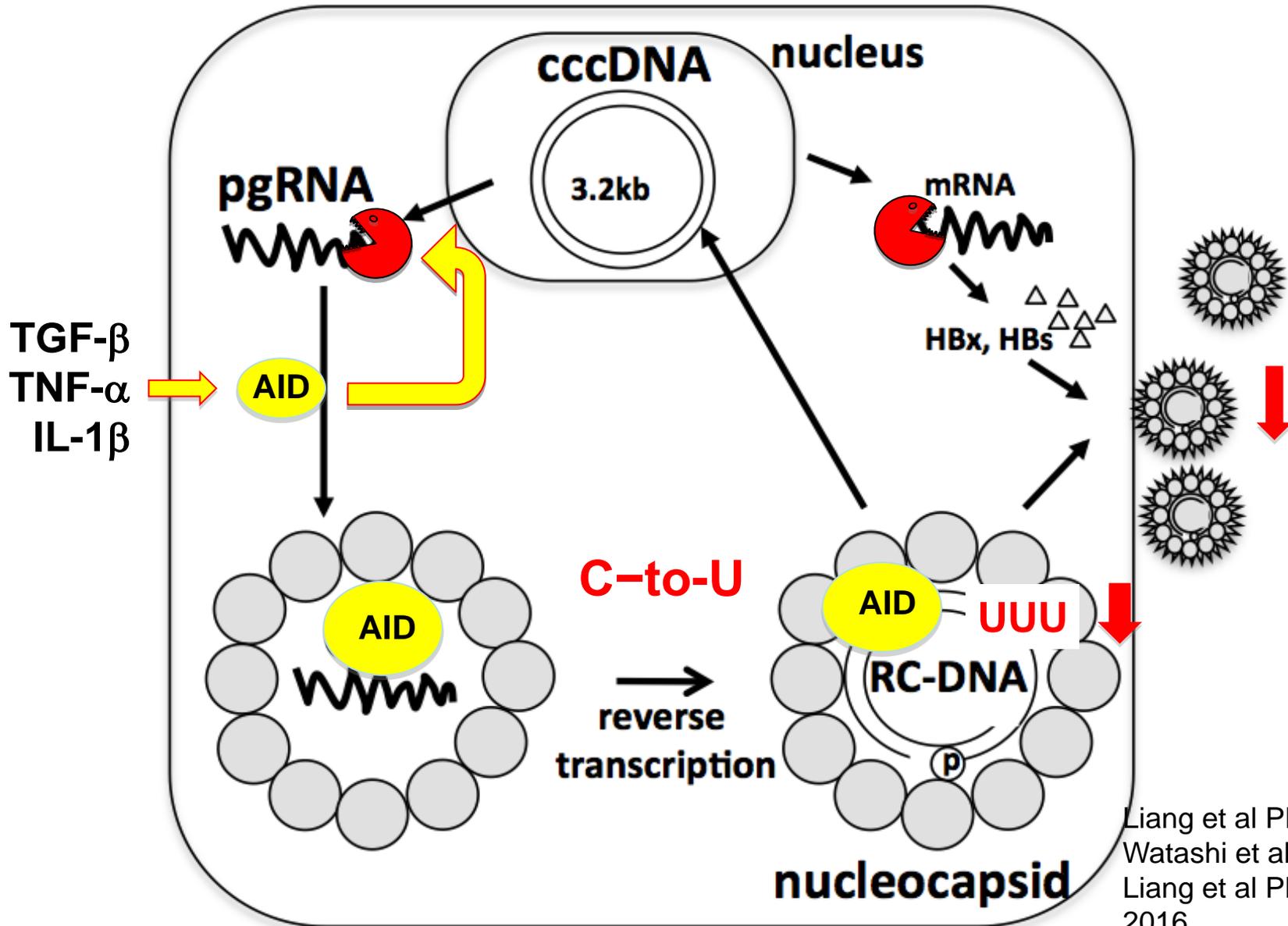
# Hepatitis B virus (HBV)



# A3GのHBVへの抗ウイルス作用

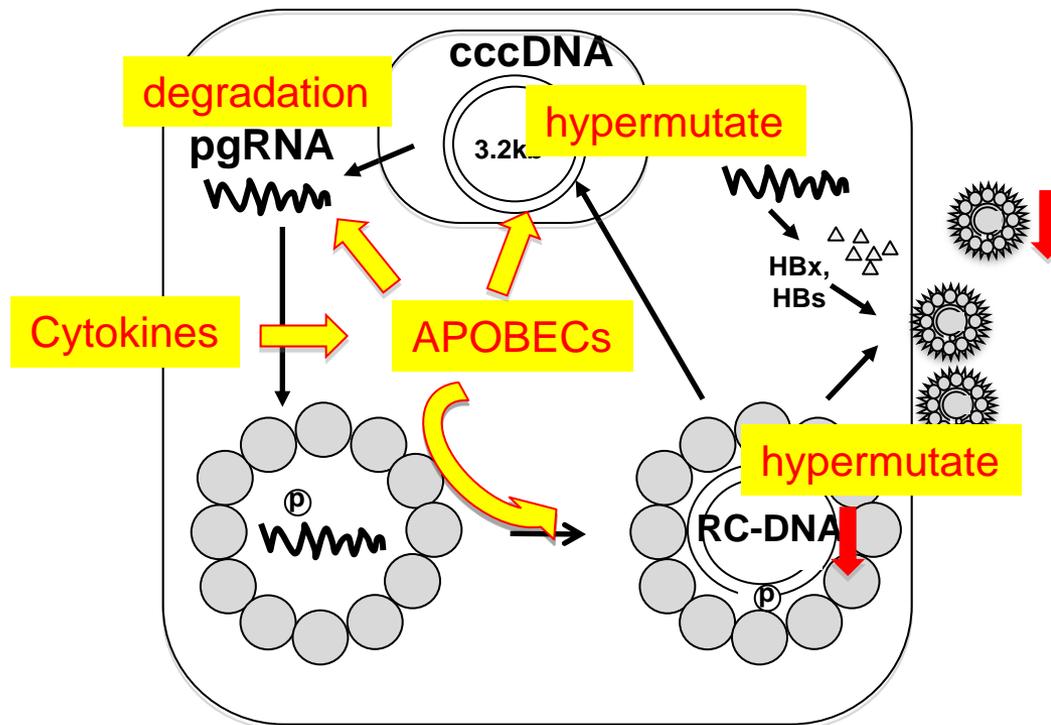


# AIDの抗HBV作用(モデル)



Liang et al PNAS 2013  
Watashi et al JBC 2013  
Liang et al Plos Pathogens 2016

# HBV感染におけるAPOBEC未解決事象



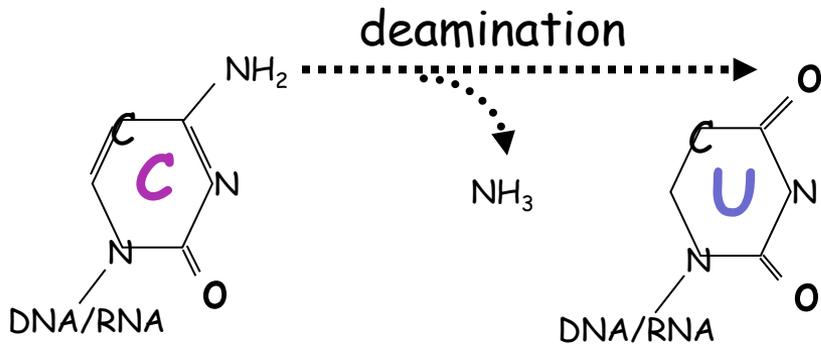
☆患者病態では、どうなっている？

☆実際のウイルス排除にどの程度貢献しているか？

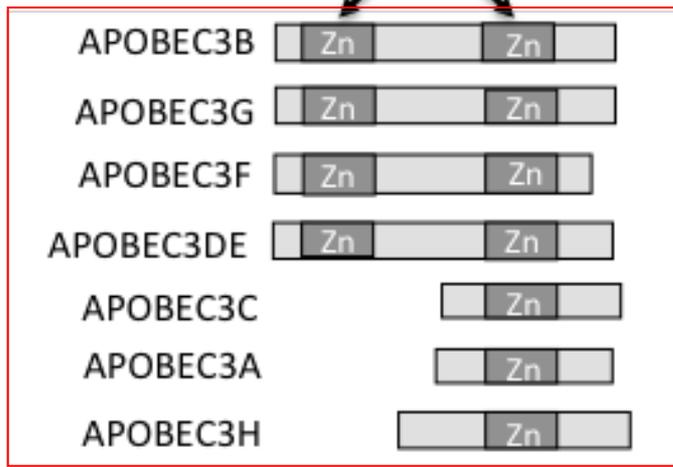
☆肝癌との関連性？

☆エスケープ変異体、薬剤耐性変異体との因果関係？

# APOBEC family



H-X-E-X(23-28)-P-C-X(2-4)-C



Anti viral factor  
(HIV-1)

viral DNA  
GCATATCCTCCGCCAACCGCACTCCA

**APOBEC3**

**Hypermutation**

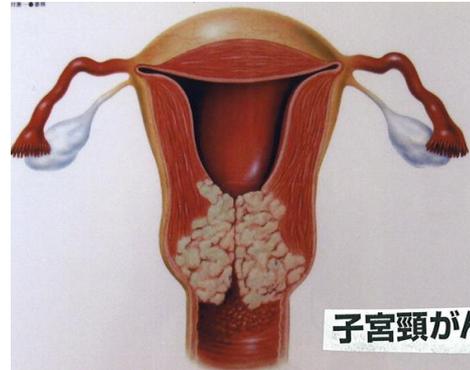
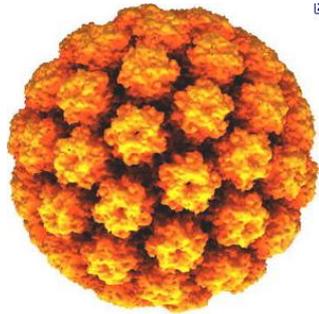
GUATATCUTUUGUUAACUGUACTCUA

**replication block**

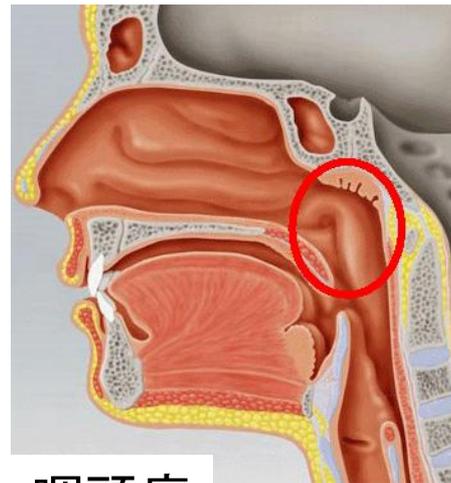
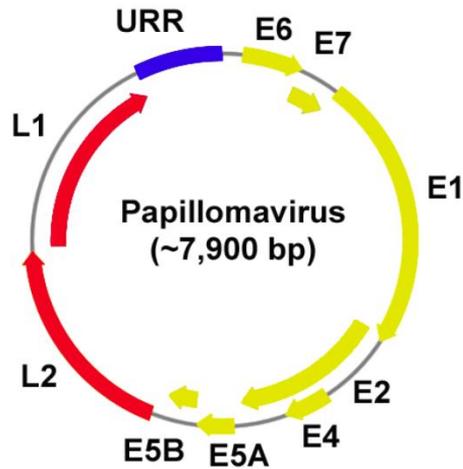
**APOBEC**

**HBV & HPV16**

# Human Papillomavirus type 16 (HPV16)



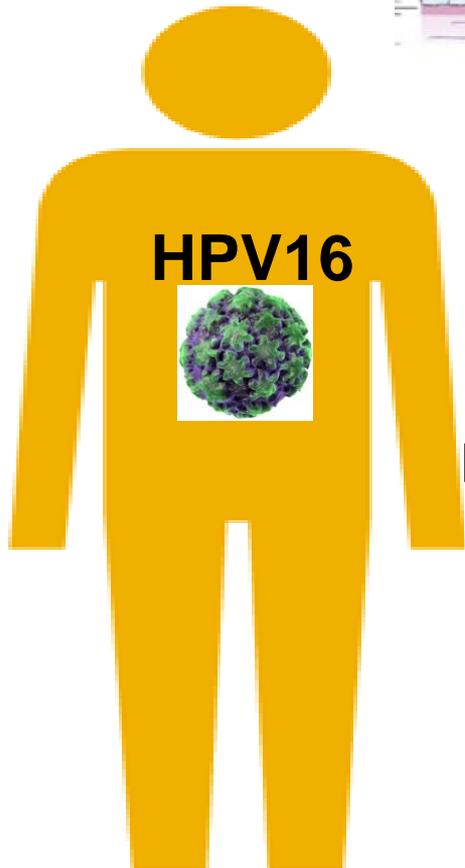
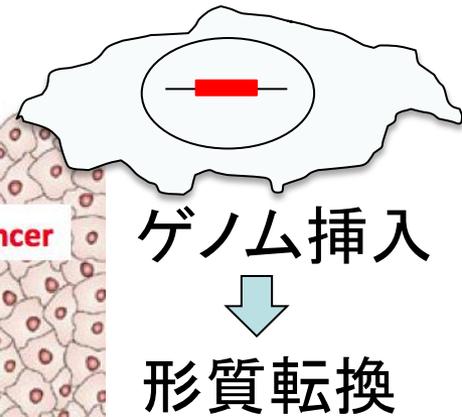
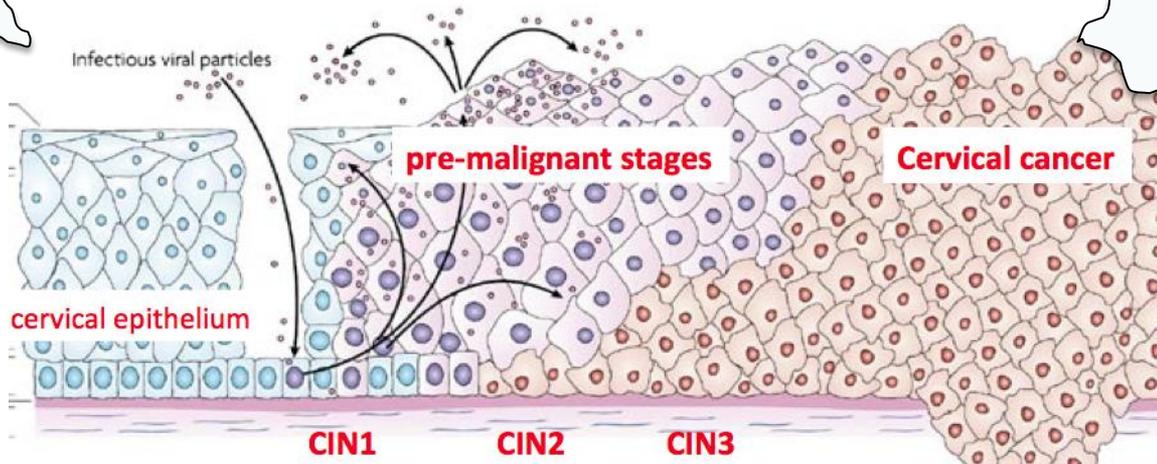
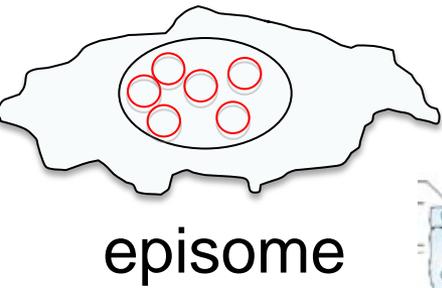
年間3500人の  
日本人女性が死亡。



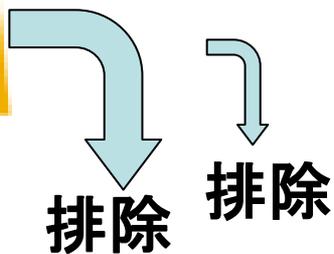
タバコとともに  
中咽頭癌の  
主要原因

咽頭癌

# HPVによる発ガン機構



自然排除



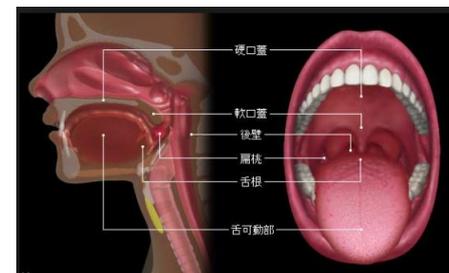
ウイルス  
持続感染

(10-30年の経過)

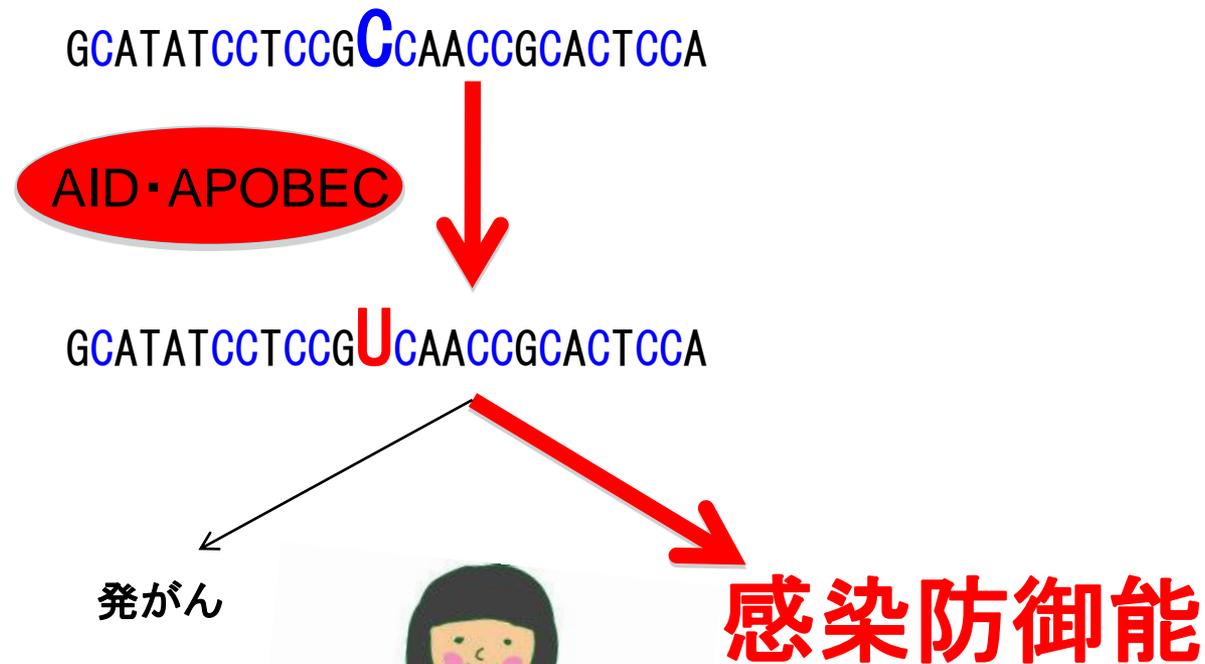
①ウイルスゲノム挿入

②ウイルス癌遺伝子  
E6, E7の持続的発現  
とp53, Rb抑制

③宿主ゲノム変異

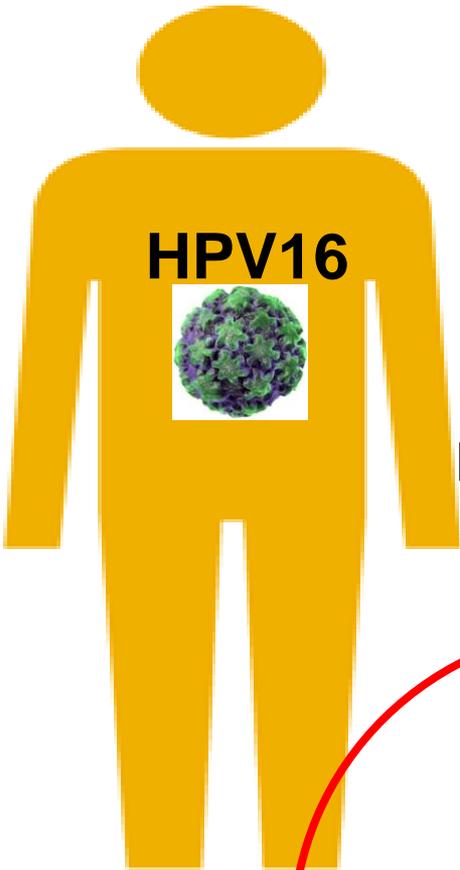


# 仮説: APOBEC = 諸刃の剣



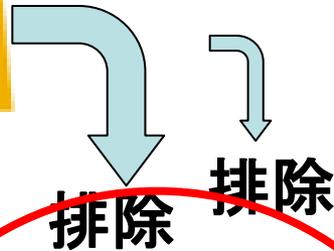
病原体の多い環境では、  
発がんリスクに目をつぶっても  
あまりある**メリット**を提供している。

# APOBECが関わるとしたら？

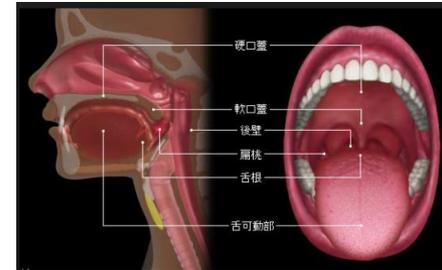


自然排除

ウイルス  
持続感染  
(10-30年の経過)



- ①ウイルスゲノム挿入
- ②ウイルス癌遺伝子 E6, E7の持続的発現とp53, RB抑制
- ③宿主ゲノム変異



抗ウイルス因子  
としての  
APOBECの役割

慢性期

変異源としての  
APOBECの役割

現時点では  
この仮説は、  
部分的知見がある  
のみ。

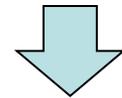
## HPV16研究の現状

Pseudovirion系はあるものの

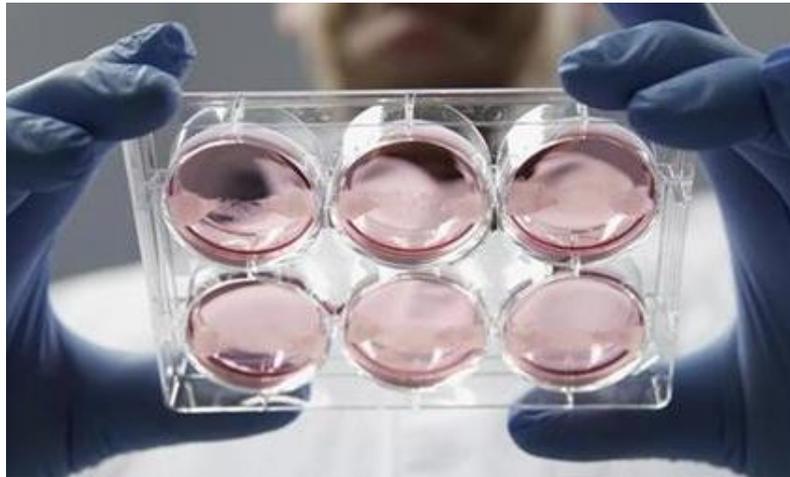
動物モデル

in vitro自然感染モデル

not available

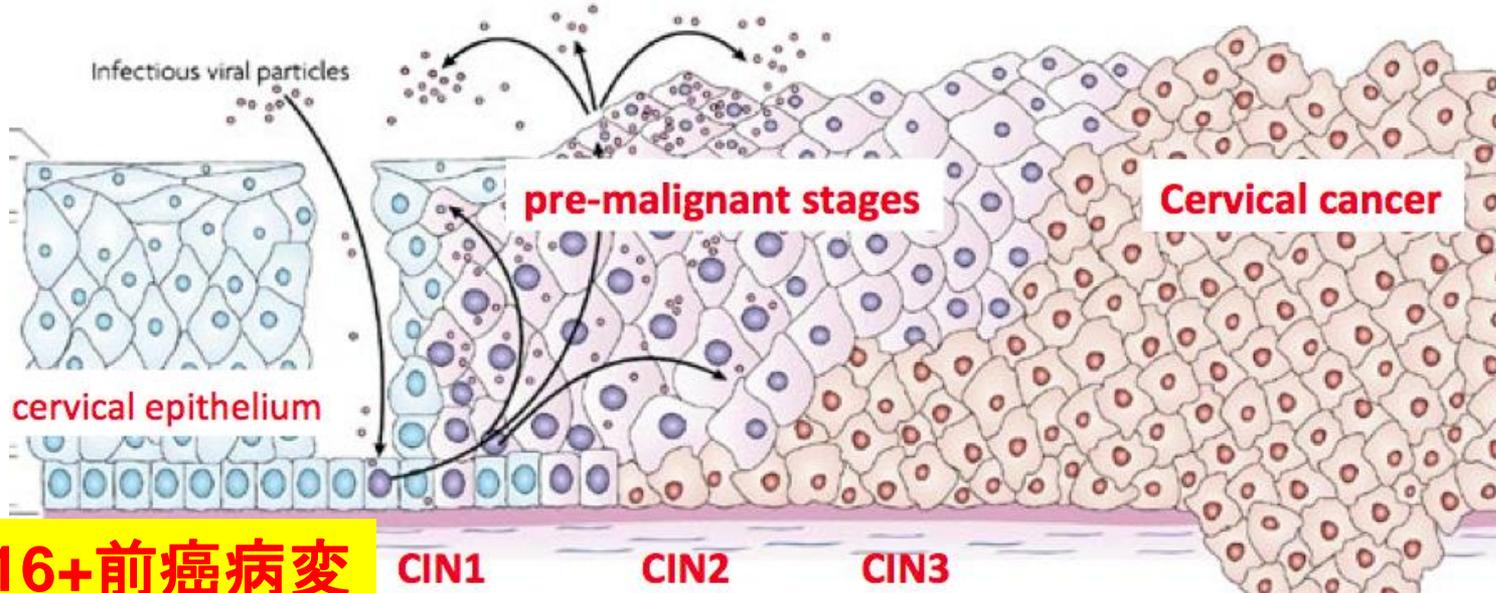


感染初期  
の研究は  
難しい。

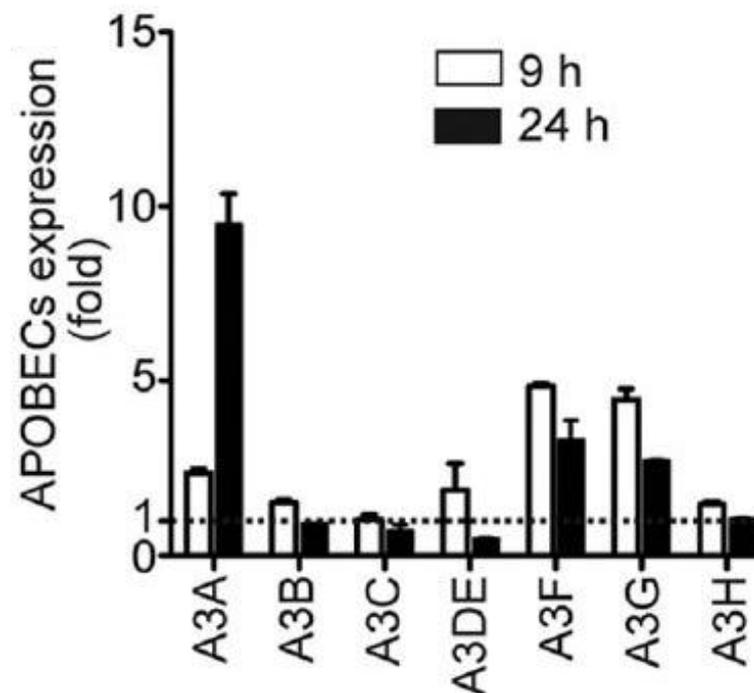
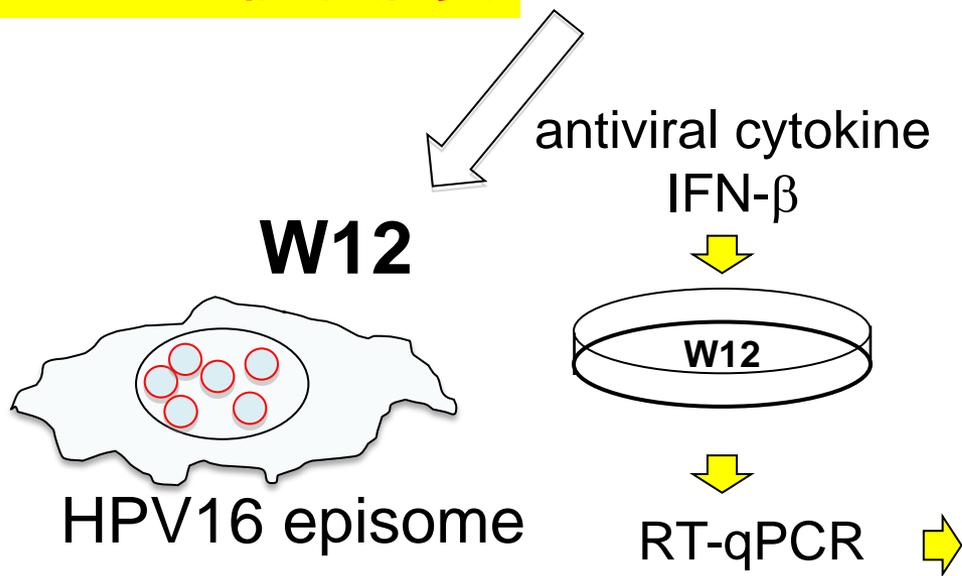


発ガン初期 event の研究にW12が用いられている。

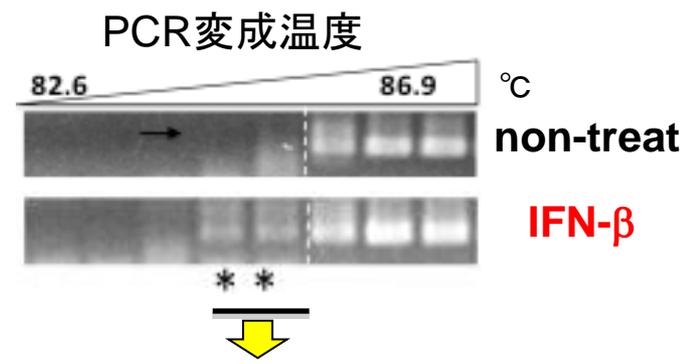
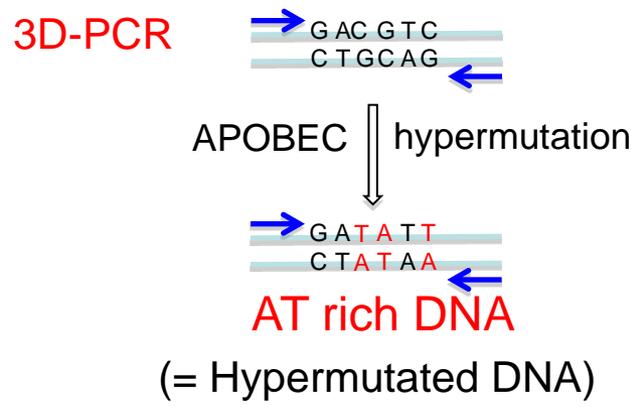
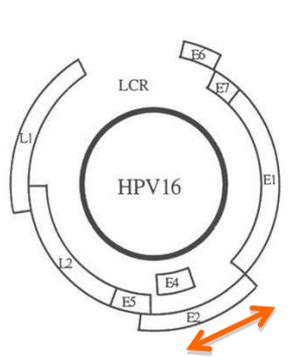
# HPV16前癌病变由来:W12



**HPV16+前癌病变**



# IFN-dependent hypermutation in W12 cells



AF125673: GGCCAACCACTCCGCCGCGACCCATACCAAAGCCGTCGCTTGGGCACCGAAGAAACACAGACGACTATCCAGCG

Clone1 ..... T ..... TT ..... T.T ..... T.....

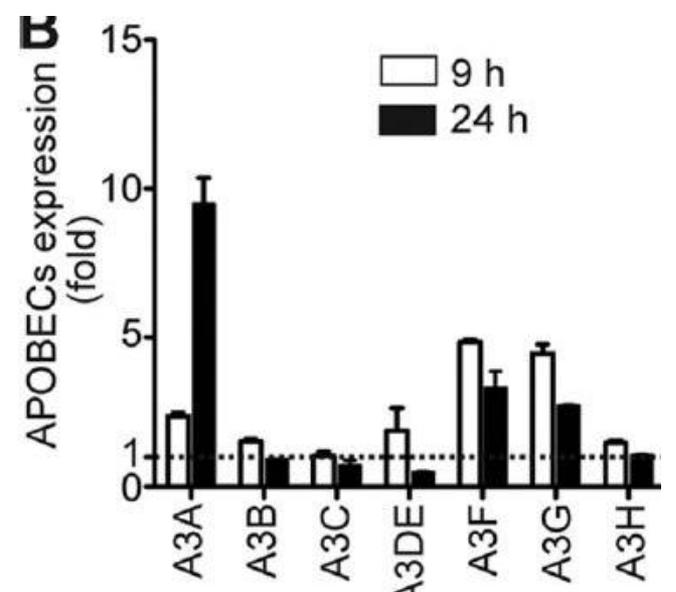
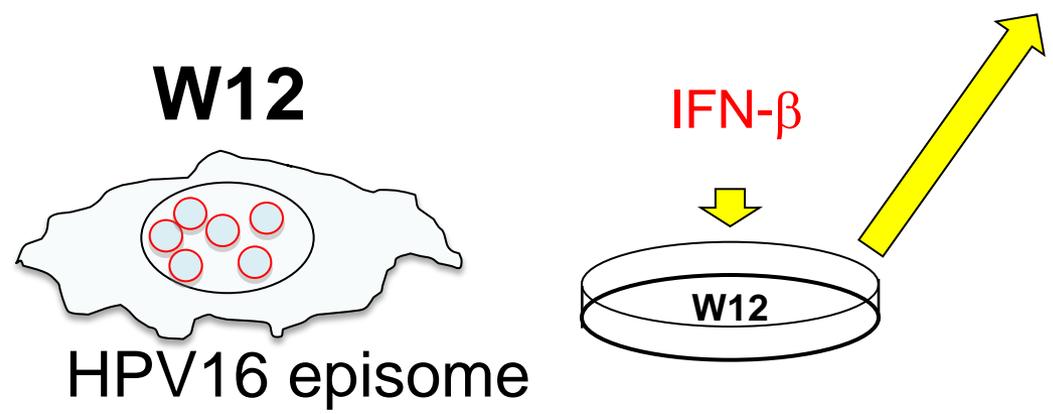
Clone2 ..... T ..... T ..... T.T ..... T.....

Clone3 ..... TA ..... T ..... T.T ..... T.....

Clone4 ..... T ..... TT ..... T ..... T ..... T ..... T.....

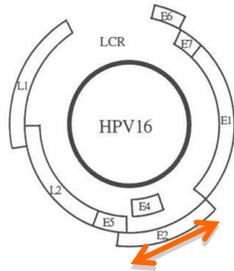
Clone5 ..... T ..... TT ..... T ..... T ..... T ..... T.....

Clone6 ..... T.T ..... T ..... T ..... T ..... TT..T.....

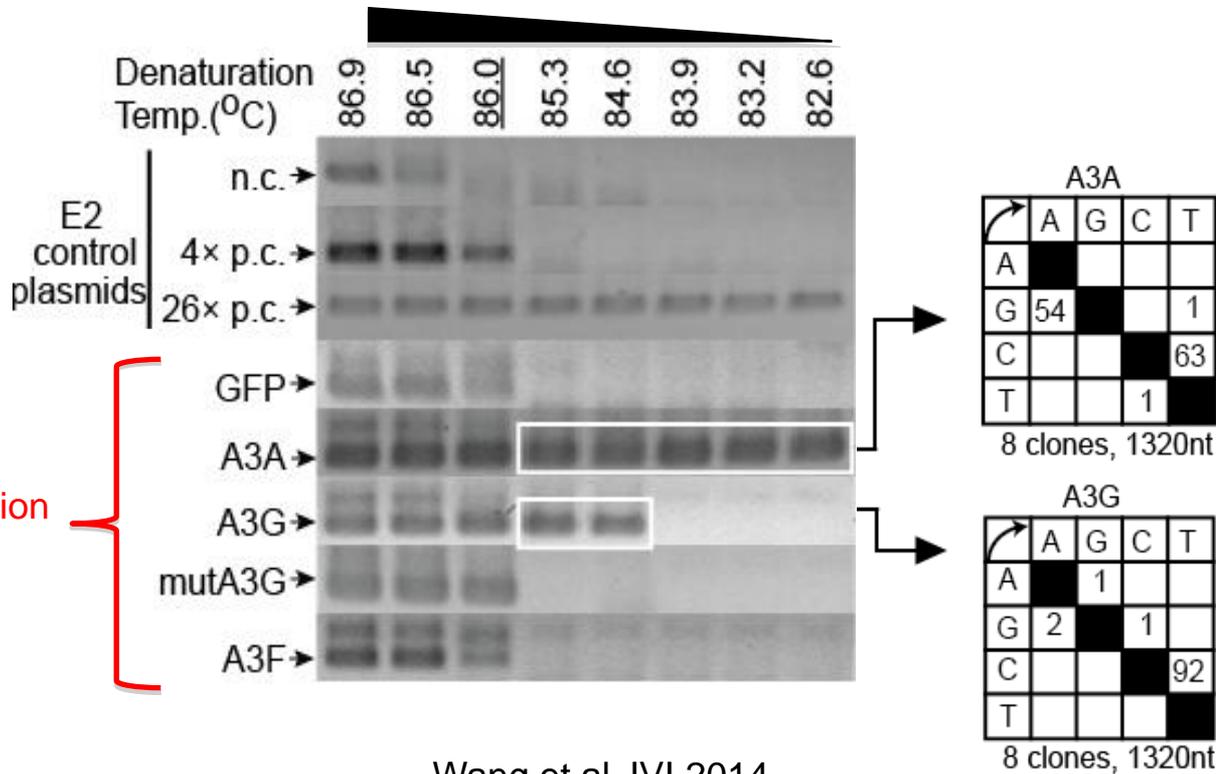
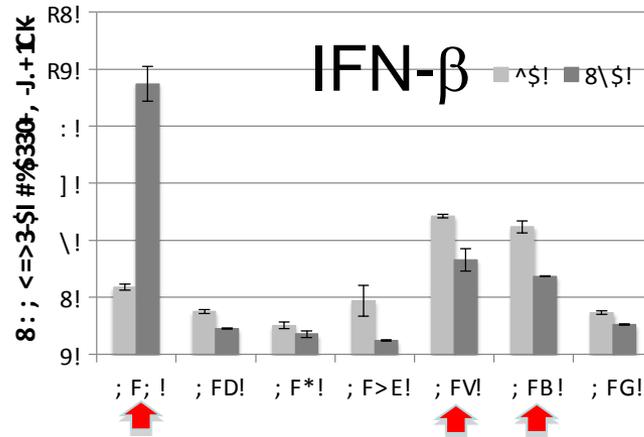


IFN処理でhypermuation観察可能。

# Overexpression of APOBECs induces hypermutation on HPV16 E2 gene

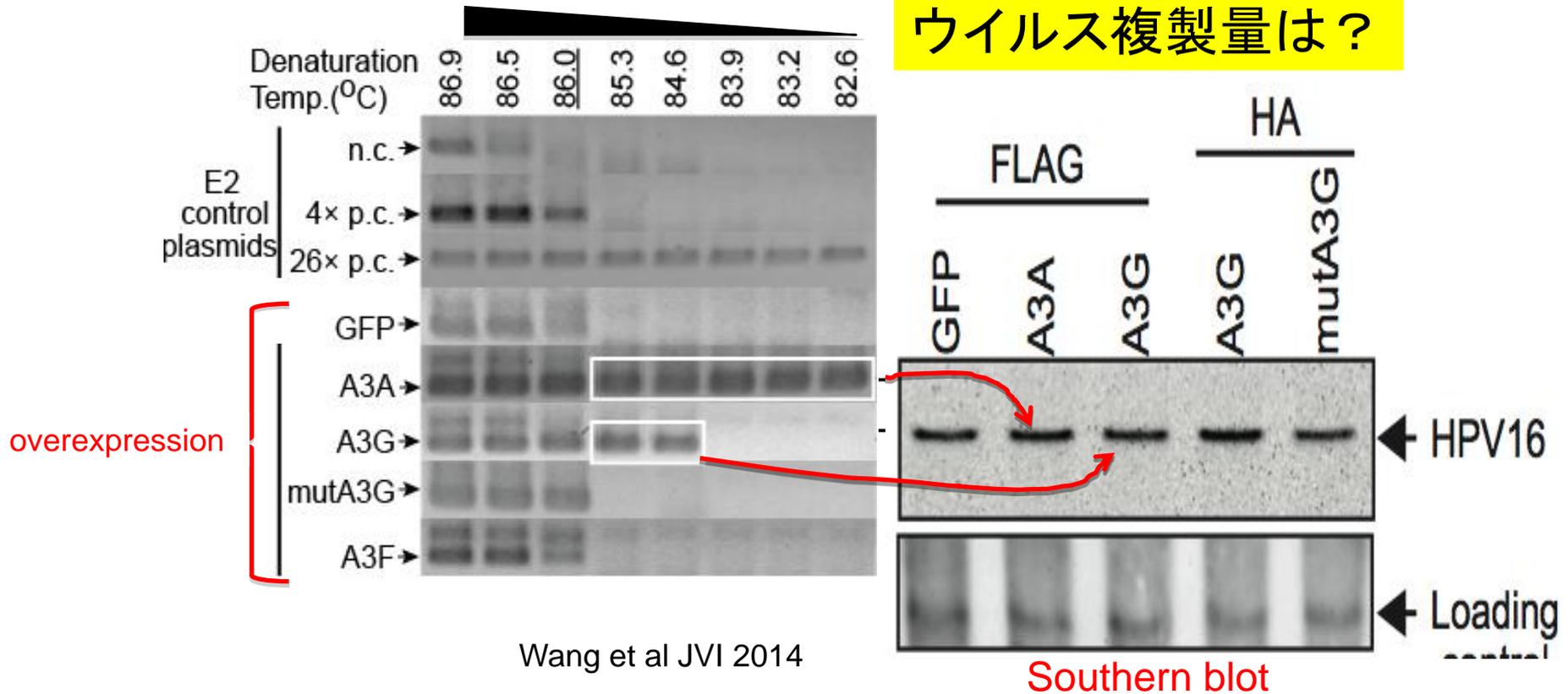


E2 3D-PCR



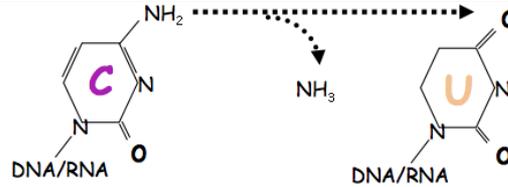
**HIV**の時と比較すると  
Mutationの頻度も、  
2桁以上、低い事が判明。

ウイルス複製量は？

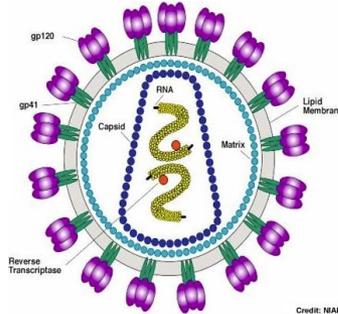


# HIV-1での研究では、

**Hypermutation依存性**



**Hypermutation**



**HIV-1**

**APOBEC3**

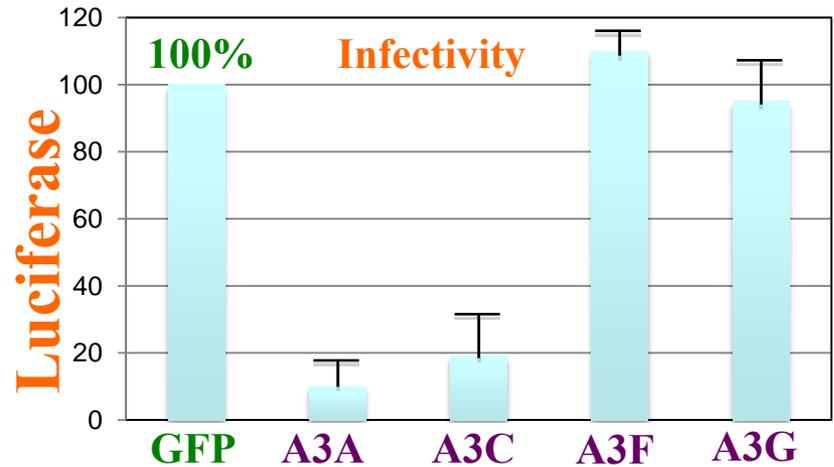
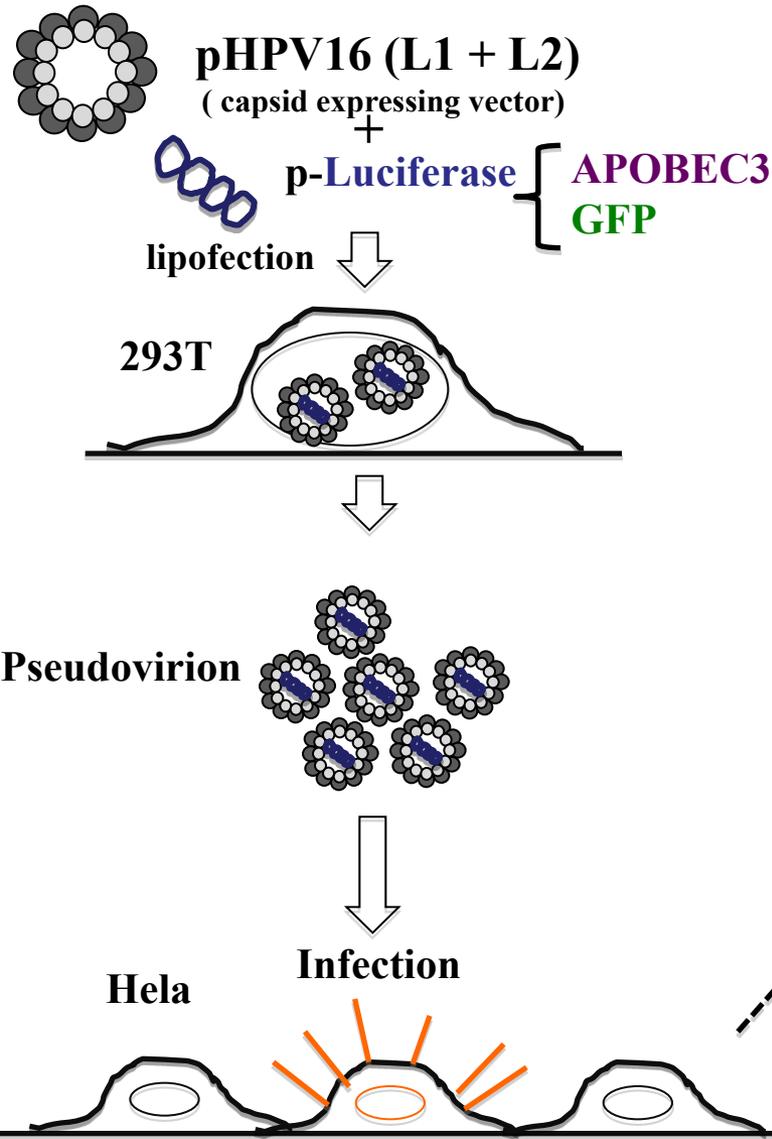
**抗ウイルス活性**

**Hypermutation非依存性**

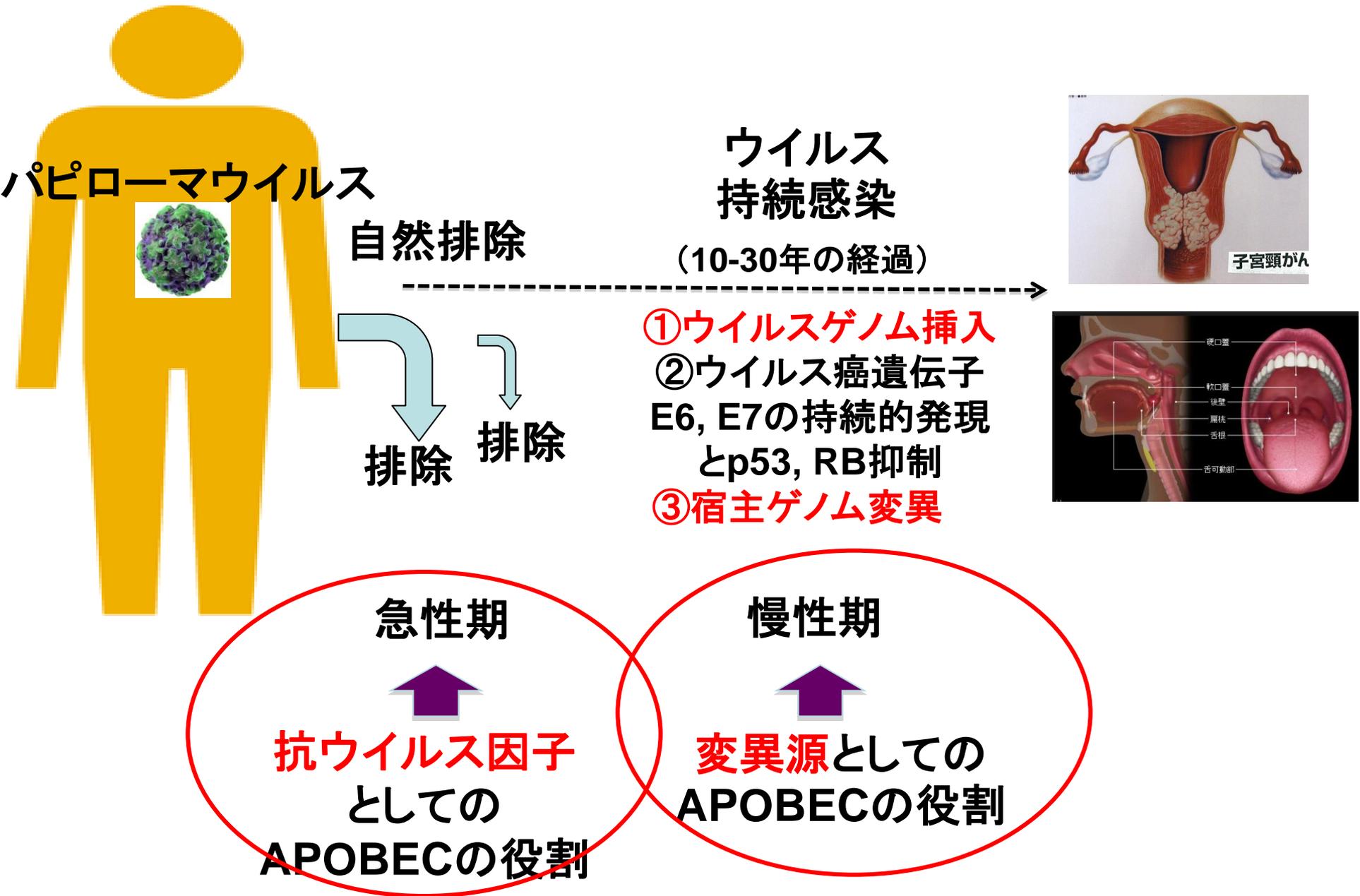
**ウイルス成分に結合して複製阻害する。**

# ウイルス粒子集合 エンター

# Pseudovirion



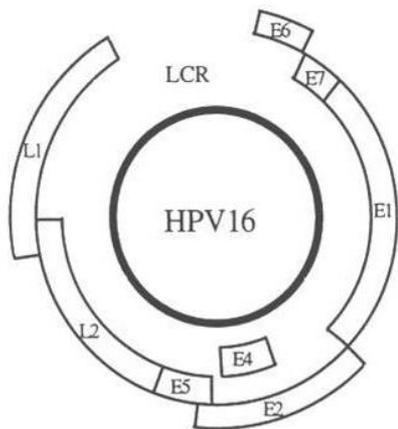
# APOBECが関わるとしたら？



# HPV16 viral DNA Hypermutation

HPV16+ CIN1 臨床検体

3D-PCR



APOBEC hypermutation

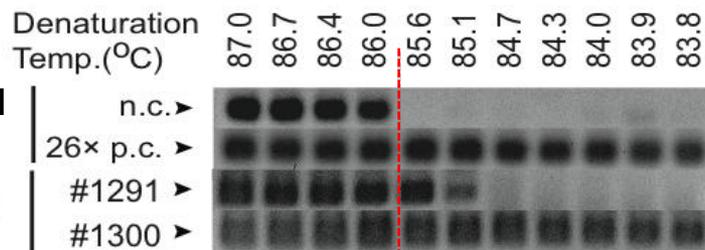


AT rich DNA

(= Hypermuted DNA)

Hypermution  
||  
amplification at lower Tm

control DNA  
CIN1



hypermuted

	A	G	C	T
A	9			
G				
C				28
T				

8 clones, 1320nt

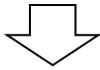
	A	G	C	T
A				
G	1			
C				107
T	1			

8 clones, 1320nt

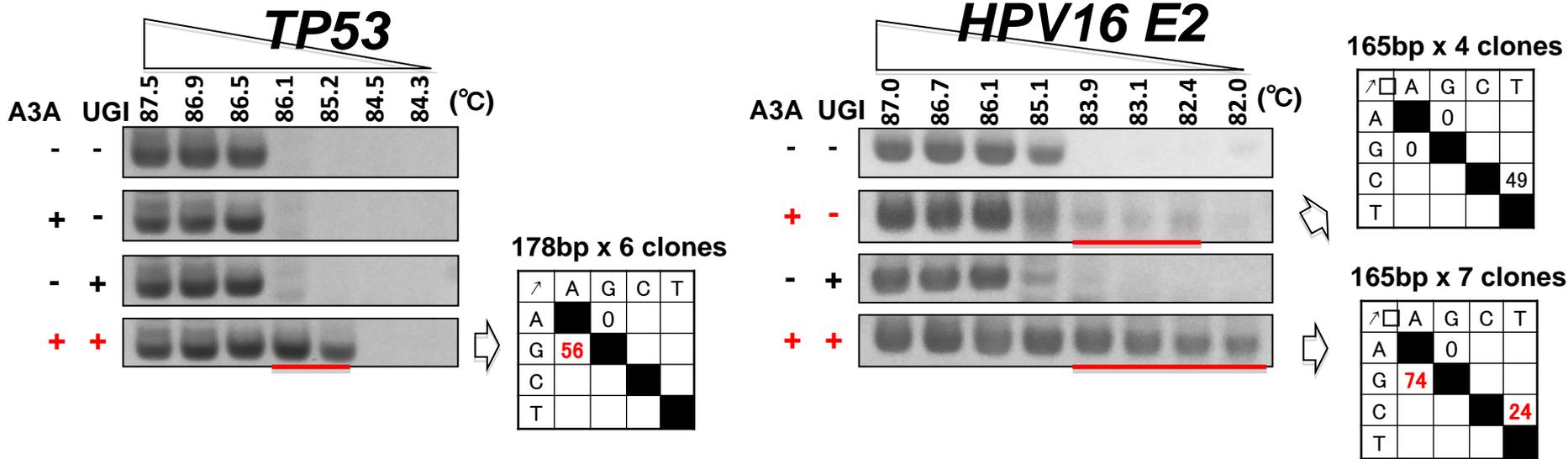
臨床検体でも  
ウイルスDNAにAPOBEC活性  
産物を検出できる。

# 宿主ゲノムDNAにはhypermutationは起こりうるか？

293T細胞

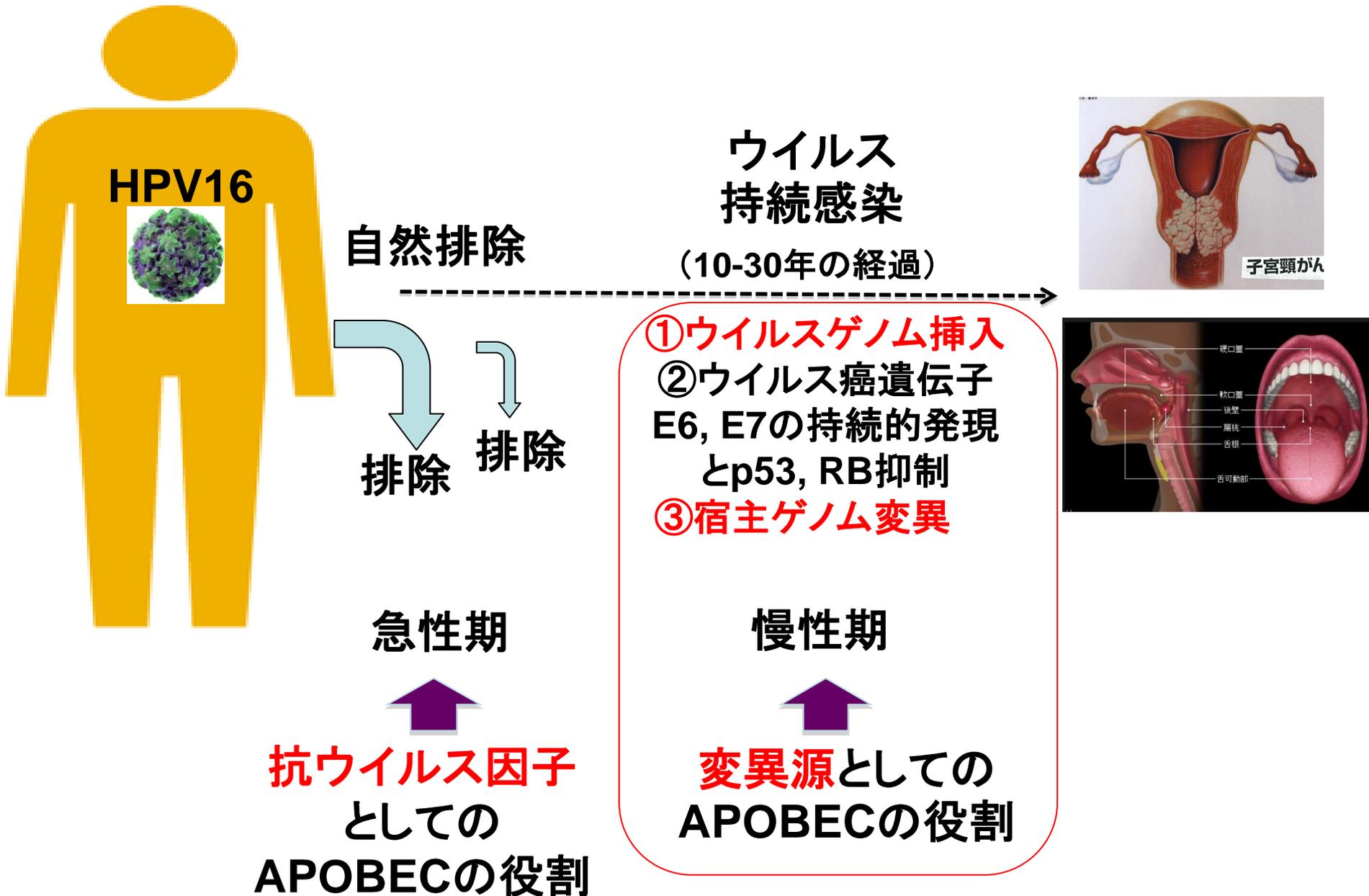


3D-PCR



**APOBEC3Aは、宿主ゲノムにもhypermutationを入れうる。**

# 現在、作業仮説の妥当性を検証中



# APOBECのプロジェクト紹介

は

ここまで。

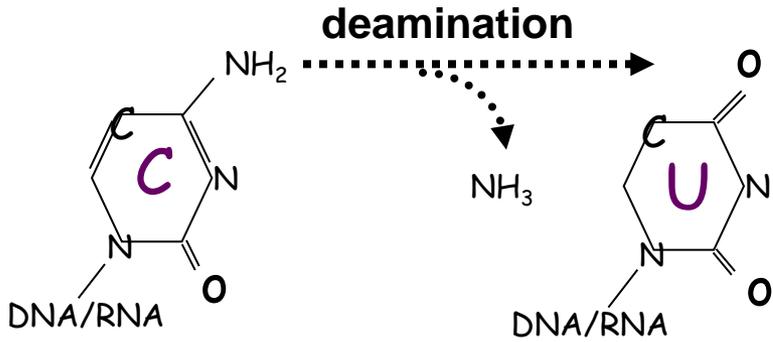
以後は、失敗談へ

# これまでに失敗や経験から学んだ事

経験 1

経験 2

2 がた... さんでください。

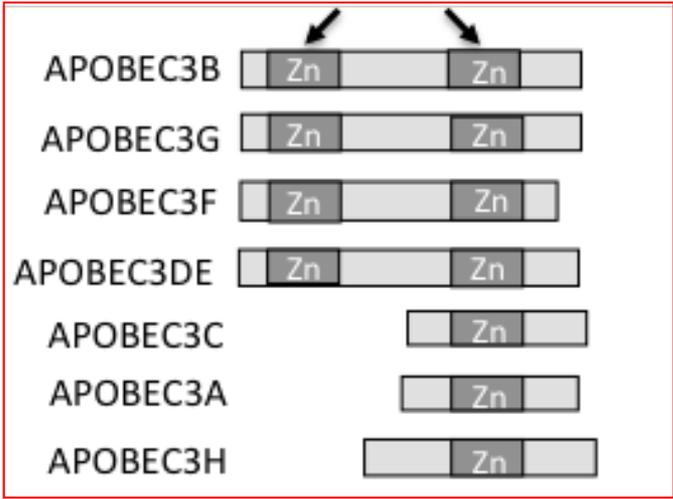


**episode 1**

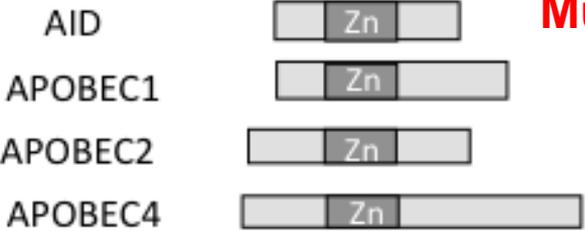
**AID単離時の判断ミス**

**cytidine deaminase motif**

H-X-E-X(23-28)-P-C-X(2-4)-C

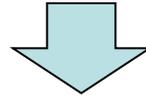


**Anti viral factor  
(HIV-1)**

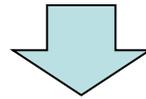


Muramatsu et al, *JBC* (1999), *Cell* (2000)

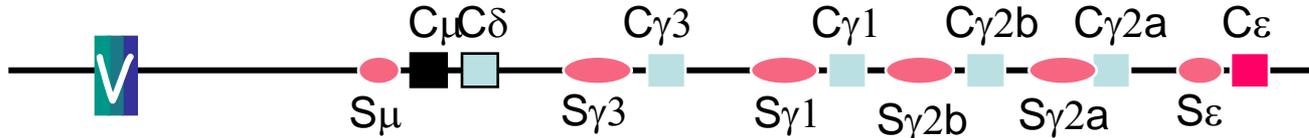
抗原刺激



?



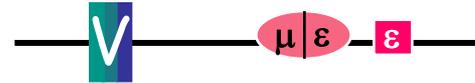
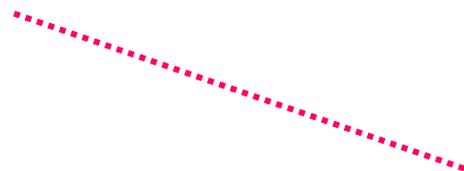
抗体重鎖  
遺伝子



Somatic hypermutation



抗体親和性成熟

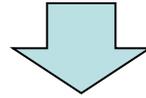


クラススイッチ組換え

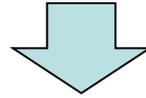


IgG, IgA, IgE産生

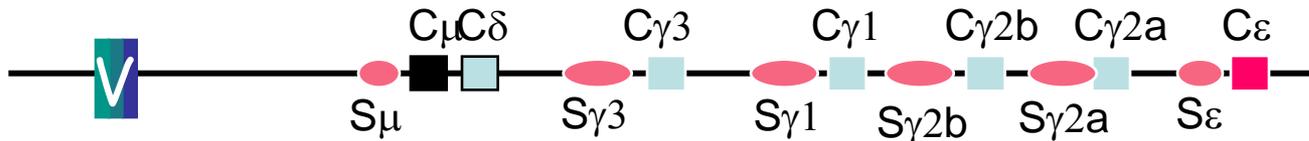
抗原刺激



AID



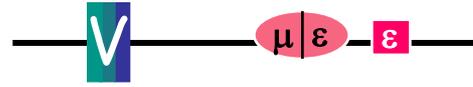
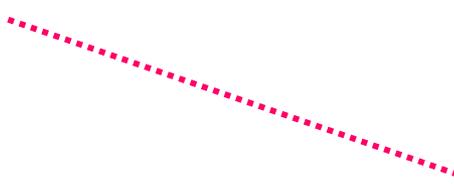
抗体重鎖  
遺伝子



Somatic hypermutation



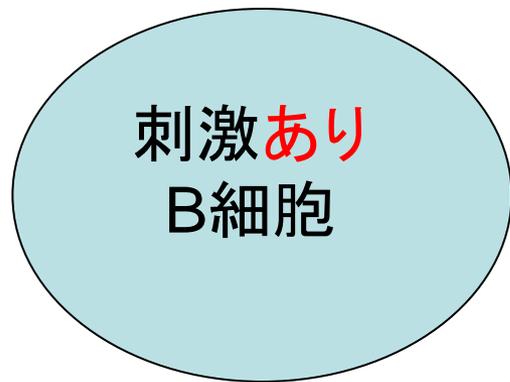
抗体親和性成熟



クラススイッチ組換え



IgG, IgA, IgE産生

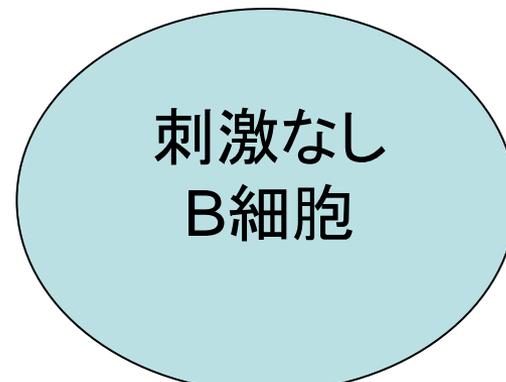


cDNA



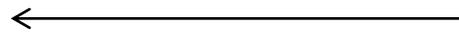
クラススイッチは  
刺激誘導性現象  
なので

リコンビナーゼも  
刺激誘導性であ  
るはず。



cDNA

**cDNA subtraction法**



ハイブリ

初回実験でAIDが強力に発現誘導される未知遺伝子として単離できていた。しかし発現が変動しないハウスキーピング遺伝子も同時に多数とれてしまっていることが判明した。

サブトラクションの切れ味が悪いと判断。

バックグラウンドを下げる最適化を2年近く続けた。

結果、バックグラウンドは下がったが、  
発現誘導される遺伝子はたいして増えなかった。

2年前にとれていたAIDを解析することになった。



# これまでに失敗や経験から学んだ事

1, 方法論に凝りだすと目指すものを忘れがち！  
何が最終目標か常に意識すべし！

2, がむしゃらにサイエンスする姿勢は  
必ず評価される。

# Acknowledgements

金沢大学

分子遺伝研究室のみなさん

産婦人科の共同研究者

M. Nakamura, S. Kyo, and H. Fujiwara

耳鼻咽喉、頭頸部外科の共同研究者

S. Kondo, T. Yoshizaki

