

4. 生理的に機能するレトロウイルス複製制限因子 APOBEC3 の分子進化

宮澤 正 顯

近畿大学医学部 免疫学教室

APOBEC3 は一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼであり、レトロウイルス複製制限因子として機能する。現存の感染性レトロウイルスは自然宿主の APOBEC3 に対抗する機能を獲得しており、一方で宿主側も遺伝子重複により APOBEC3 機能を進化させてきたと信じられていた。ところが最近、ヒトでもマウスでも APOBEC3 分子がタンパク質レベルで低発現となるような遺伝子多型が種の分岐後に獲得され、これが地理的に広範囲に分布している事実が明らかとなった。外来性の感染性レトロウイルスに対して APOBEC3 が示す生理的な防御効果と、感染性レトロウイルスの脅威が少ない場合に同じシチジンデアミナーゼが示す可能性のあるゲノム DNA の傷害作用との間に、微妙なバランスが存在するらしい。本稿では APOBEC3 の生理機能と分子進化について最近の知見を解説した。

はじめに

apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) は、免疫グロブリン遺伝子可変部の体細胞高頻度突然変異 (somatic hypermutation) と重鎖定常部のクラススイッチ (S-S 組換え) の両方に関与する activation-induced cytosine deaminase (AID) や、カイクロンを構成する低分子量 apolipoprotein B の mRNA 編集に特異的に関わる APOBEC1 とともに、脊椎動物の AID/APOBEC ファミリー酵素群に属するシチジンデアミナーゼである^{1,2)}。APOBEC3 酵素群は調べられた全ての哺乳動物に存在し、一本鎖 DNA 上のシチジンを構成するシトシン塩基を脱アミノ化してウラシルに変換する機能を持つ。

APOBEC 酵素群がウイルス学者の注目を集めたのは、ヒト APOBEC3 パラログの一つである APOBEC3G が、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の *vif* 遺伝子産物 (viral

infectivity factor: Vif) と相互作用する宿主細胞因子であることが同定されてからである³⁾。即ち、霊長類レンチウイルスの生体内複製には *vif* 遺伝子が必須であるが⁴⁾、試験管内では *vif* 欠損ウイルスの複製が可能な細胞とそうでない細胞があり、前者は APOBEC3G の発現を欠き、後者は APOBEC3G を発現していることが明らかとなって、APOBEC3 は Vif を欠くレトロウイルスの細胞レベルの複製制限因子であることが解明された (この間の経緯については、高折の総説⁵⁾ を参照されたい)。現在 APOBEC3 酵素群による細胞内レトロウイルス複製阻害の機構は次のように理解されている^{5,6)}。即ち、APOBEC3 を発現する細胞にレトロウイルスの感染が起こった場合、最初に細胞内に侵入したウイルスの複製は阻害されず、ウイルスゲノムの逆転写と染色体組込みが起こる。組込まれたプロウイルスが発現し、子孫粒子が産生される際、感染細胞中の APOBEC3 分子は出芽粒子中に取り込まれ、次に感染する標的細胞へと運ばれる。標的細胞へのウイルス粒子吸着・侵入に続いてウイルスゲノムの逆転写が開始されると、APOBEC3 は RNA ゲノムを鋳型として合成されたマイナス鎖 DNA 中のシチジン (C) をウリジン (U) に変換し、こうして生じたウリジン含有 DNA は、ウラシル DNA グリコシラーゼの働きによって塩基除去が起こり、ニックが入って分解される。一方、C から U への修飾が起こったマイナス鎖 DNA がそのまま鋳型になれば、プロウイルス

連絡先

〒 589-8511

大阪府大阪狭山市大野東 377-2

近畿大学医学部

TEL/FAX: 072-367-7660

E-mail: masaaki@med.kindai.ac.jp

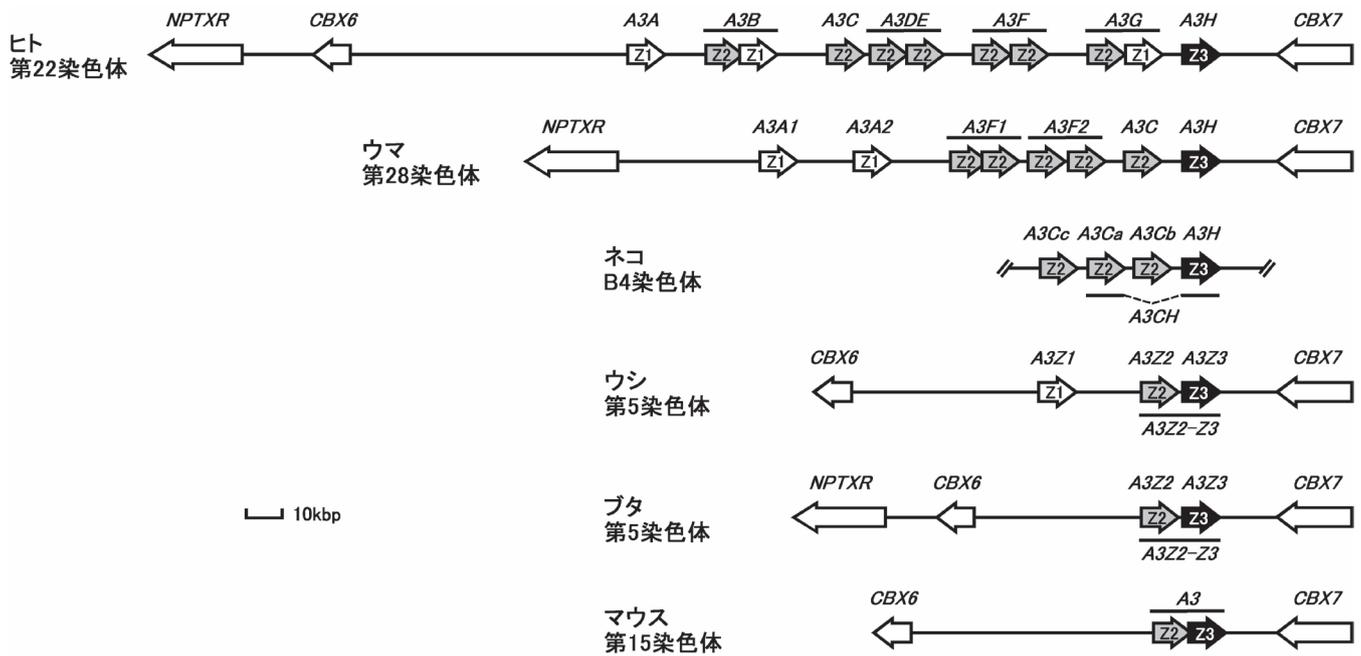


図1 哺乳類 *APOBEC3* 遺伝子の重複による進化

哺乳類に共通の単ドメイン *APOBEC3* (*A3*) 遺伝子は、そのコードする zinc coordination motif のアミノ酸配列から、*Z1*, *Z2*, *Z3* に分類される^{12, 13}。これら単ドメイン遺伝子がそれぞれ染色体上で重複するとともに、多くの種で read through により 2ドメイン型の *APOBEC3* 分子が発現するようになった (図中に2ドメインを横線で結んで示す)。この図では各種ゲノム上の *APOBEC3* 遺伝子の配列を、およその物理距離を反映させて描いているが、エキソン・イントロン構成は無視しており、各遺伝子のサイズ及び遺伝子間の距離も厳密な数値に対応するものではない。文献^{12, 13, 15, 17}のデータを基に、Ensemble ゲノムブラウザ (<http://asia.ensembl.org/index.html>) の情報を参考にして再構成・改変を行った。

DNA のプラス鎖には G から A への塩基置換が生じることとなり、こうして変異の加わったプロウイルスは、終止コドンの挿入やアミノ酸置換によって複製能が低下、または欠損する。但し、*APOBEC3* 分子によるレトロウイルス複製抑制機構が全てシチジンデアミナーゼ酵素活性に依存するかどうかは議論のあるところであり、HIV-1 複製抑制についてデアミナーゼ非依存性の機構を示した報告が複数あるほか⁷⁻¹⁰、我々は後述のマウスレトロウイルスに対する複製抑制活性が、大部分デアミナーゼ非依存性の機構に依ることを示している¹¹。

APOBEC3 遺伝子群の重複による進化

哺乳動物の *APOBEC3* 遺伝子群は、AID/*APOBEC* ファミリー祖先遺伝子の反復する重複により形成されたと考えられる^{1, 12, 13}。AID/*APOBEC* ファミリーのシチジンデアミナーゼは、 Zn^{++} を配位する zinc coordination motif を含んだ、よく保存されたドメイン構造 (Zドメイン) を一つまたは二つ持つ。哺乳類 *APOBEC3* の祖先遺伝子は一つの Zドメインをコードしていたと考えられ、これが重複することでドメイン内にアミノ酸配列多型を生じる余地が生れた。実際、哺乳類を通じて *APOBEC3* 遺伝子群は

CBX6 (chromobox homolog 6) と *CBX7* 遺伝子に挟まれたシンテニーのある領域に、同一のオリエンテーションで存在している (図1)。およそ100万年前に存在したサル目、ネズミ目、ネコ目、ウマ目、ウシ目の共通祖先では、一つの染色体上の狭い範囲に *Z1*, *Z2*, *Z3* の単ドメイン型遺伝子3つが重複していたと考えられ、現在でもヒツジやウシではこの構成が保存されている。ブタやマウスでは *Z1* 遺伝子が欠落し、*Z2*, *Z3* がタンデムに並んで存在しているが、マウスではこれが二つのドメインが繋がった単一の *APOBEC3* タンパク質 (*Z2-Z3*) として発現する。一方、ブタでは *Z2* と *Z3* がそれぞれ単ドメイン型として単独で発現するほかに、read through によって *Z2-Z3* の2ドメイン型タンパク質も発現する^{12, 14}。ネコでは染色体上で *Z1* が欠落する一方で、*Z2* が3つに重複しており、3種類の *Z2* と一つの *Z3* タンパク質がそれぞれ単ドメイン型として単独で発現するほか、2番目の *Z2* と *Z3* が繋がった2ドメイン型の分子も発現する^{15, 16}。ウマでは *Z1* が二つ、*Z2* が5つ重複しており、これらが単独でまたは2ドメイン型として繋がって発現することにより、単ドメインの *Z1* 型が2種類、*Z2* 型が1種類、*Z3* 型が1種類と、2ドメインの *Z2-Z2* 型が2種類発現する¹⁷。ヒトでは更に遺伝

子重複が進んでおり、Z1-Z2-Z1-(Z2) × 6-Z1-Z3 の単一ドメインコード領域が第 22 染色体上に並んでいる。その結果、ヒトでは A3A (Z1 単独), A3B (Z2-Z1), A3C (Z2 単独), A3DE (Z2-Z2), A3F (Z2-Z2), A3G (Z2-Z1), A3H (Z3 単独) の 7 種の APOBEC3 パラログが発現しうることとなる。

哺乳類がこのように多数の APOBEC3 遺伝子群を獲得して来た背景には、恐らくレトロトランスポソンの存在があると考えられる¹⁸⁾。mRNA の逆転写産物が核内に移動して染色体 DNA に組込まれ、細胞内でこの複製過程を繰り返すレトロトランスポソンは、ゲノム同一性の維持に対する最大の脅威であり、実際多数のヒト疾患がレトロトランスポソンの組込みによる構造遺伝子の破壊で生じている。APOBEC3 酵素群はレトロトランスポソンの転移を抑制する効果が示されており^{19, 20)}、レトロトランスポソンから進化して細胞間での伝播能力を獲得したと考えられる内在性レトロウイルス遺伝子群には、他の如何なる細胞内複製制限因子よりも、APOBEC3 による修飾の痕跡が多く残されている²¹⁻²³⁾。

しかしながら、現在哺乳動物に対する感染能を保ち、病原性を発揮しているレトロウイルスが多数存在しており、これらは自然宿主の持つ APOBEC3 群分子に対する対抗手段を獲得することで感染能を維持していると考えられる²⁴⁾。実際、霊長類やネコのレンチウイルス群は *vif* 遺伝子を、またスーパーマウウイルス群は *bet* 遺伝子を獲得することで、自然宿主の APOBEC3 分子機能に対抗している^{3, 6, 16, 25-27)}。これら APOBEC3 分子とウイルス側対抗因子との相互作用は極めて種特異性が高く、例えば同じ霊長類レンチウイルスでもアカゲザル由来 SIVmac の Vif はヒトの APOBEC3G, APOBEC3F の機能を抑制出来るが、HIV-1 Vif はアカゲザルやアフリカミドリザルの APOBEC3G 活性を抑制できない²⁸⁾。一方、マウスの APOBEC3 は Vif の有無に関わらず HIV-1 の複製を抑制出来るが^{28, 29)}、マウスレトロウイルスは自然宿主であるマウス細胞の APOBEC3 を粒子内に取り込まないよう対抗手段を獲得していると考えられている²⁹⁻³¹⁾。

APOBEC3 遺伝子の多型と機能差の発見

広く受け容れられつつあった APOBEC3 機能の種特異性（現存レトロウイルスの自然宿主 APOBEC3 に対する対抗手段獲得）と言う概念²⁴⁾ に対し、最初の疑問を投げ掛けたのはフィラデルフィアの Susan Ross らであった。彼女らはマウス乳癌ウイルス（mouse mammary tumor virus: MMTV）をモデルとして用い、宿主である C57BL/6 (B6) マウスから APOBEC3 遺伝子をノックアウトすると MMTV の複製が著しく促進され、病原性が高まることを示した³²⁾。従って、B6 マウスでは APOBEC3 が MMTV に対する生理的抵抗因子として機能していると考えられる。しかしながら、MMTV は LTR によってスーパー抗原がコードされ、

乳汁を介して垂直伝播するベータレトロウイルスであり、内在性ウイルスとしてのコピー数も限られることから、この発見がより一般的に見出され、内在性レトロウイルスとしてのコピー数もはるかに多いガンマレトロウイルス、マウス白血病ウイルス（murine leukemia virus: MuLV）群にも当てはまるかどうかは不明であった。

我々は以前から MuLV の一種であるフレンド白血病ウイルス (FV) の感染に対して宿主免疫応答を制御する遺伝子群をマッピングし、その作用機序を解明するとともに、MHC 分子によって提示されるウイルス抗原エピトープを同定し、ペプチドワクチンによる感染防御を実現してきた³³⁻³⁹⁾。その過程で、FV 感染時にウイルス中和抗体の産生を制御する MHC とは無関係な単一の常染色体遺伝子 (*Rfv3*) を第 15 染色体上にマップしていたが⁴⁰⁾、多数の退交配個体を用いた詳細な解析で絞り込んだ *Rfv3* 遺伝子の存在範囲の中央に、APOBEC3 遺伝子座が存在していた。また、中和抗体早期産性型の B6 マウスと中和抗体産生能を欠く A/WySn マウスについてマイクロアレイ解析を行った結果、A/WySn マウス脾臓の APOBEC3 遺伝子発現は B6 マウスに比べて極めて低いことが判り、2007 年にはこれを国際学会で発表、翌年初めに定量的 real-time PCR のデータを含めて論文に掲載した⁴¹⁾。実は、2007 年の学会発表時には既に B6 マウスと A/WySn マウスの間で APOBEC3 分子に機能的な多型があることを示しており、我々の発表を聞いた Susan Ross は筆者に対し、「B6 の APOBEC3 が高機能型であることを知らずにこれをノックアウトしたのは幸運だった。実は MMTV は普通 B6 マウスには感染せず、この実験のためにわざわざ B6 指向性の MMTV を入手していた」と述べた。確かに、BALB/c マウスで APOBEC3 をノックアウトしても、表現型の差は見られなかったであろう（我々の論文発表¹¹⁾ の後にも、マウス APOBEC3 による同種または異種レトロウイルス複製抑制が殆ど認められなかったとの報告がなされているが¹⁴⁾、そこでは低タンパク質発現・低機能型の BALB/c 型対立遺伝子産物を「マウス APOBEC3」として用いているので注意されたい。

我々¹¹⁾ は 2008 年に、ノックアウトマウスを用いた生体内実験のデータを加えて、マウス APOBEC3 遺伝子には系統間の多型があること、B6 マウスの持つ対立遺伝子は A/WySn マウスや BALB/c マウスの持つ対立遺伝子と比べて高発現型であり、その主要な転写産物が第 5 エキソンを欠く ($\Delta 5$) のに対し、A/WySn や BALB/c の転写産物は全長型が主体であること、B6 の $\Delta 5$ 発現産物は試験管内でフレンド MuLV の複製を抑制出来ること、両対立遺伝子産物にはアミノ酸配列に差異があり、N-末端側の残基が試験管内での MuLV 複製抑制活性を左右すること、B6 マウスから APOBEC3 遺伝子をノックアウトすると生体内の MuLV 複製が 100 倍近く促進され、FV 感染後の病態も有意に重症化することを発表した。一方、我々の論文

発表に僅かに先立って、The Gladstone Institutes の Warner Greene らが「*Rfv3* 遺伝子の実体は *APOBEC3* 遺伝子の多型である」とする論文を発表した⁴²⁾。そこで Greene らは、マウス *APOBEC3* 遺伝子座には多型があり、B6 マウスでは $\Delta 5$ が転写産物の主体であるのに対して BALB/c マウスでは第2エキソンを欠く $\Delta 2$ が転写産物の多くを占め、これが表現型としての *APOBEC3* 機能低下の原因となっていること、B6 マウスから *APOBEC3* をノックアウトするとウイルス中和抗体の産生が抑制され、FV 感染が促進されることを記述し、*APOBEC3* が (AID 同様に) B リンパ球抗原受容体の多様性形成に関わっている可能性を指摘した。

Greene らの報告と我々の報告は、マウス *APOBEC3* 遺伝子座の多型が FV 感染に対する感受性を支配している点では同じ結果を示していたが、多型の分子実体に関する記述には大きな違いがあった。BALB/c マウスで $\Delta 2$ 転写産物が主体を占めるという点は、我々の観察とは相容れず (cDNA クローニングで、ごく少数の $\Delta 2$ 相当クローンを得ていたが、生理的に意味があるとは考えなかった)、我々は Greene らの論文を見て直ちに追試を行ったが、RT-PCR で BALB/c マウスから検出された $\Delta 2$ 相当 cDNA は極微量であった。一方で、B6 マウスで転写産物の量が BALB/c の数倍多いことは、Northern blotting でも、RT-PCR でも、定量的 real-time PCR でも確認出来^{11, 41, 43)}、Greene らがこれを観察していないのは信じられなかった。Susan Ross らは直ちに追試を行い、1) Greene らの記述した $\Delta 2$ 転写産物は確かに存在するが、その量は極めて僅かであり、機能的に重要とは思えないこと、2) 宮澤らの記述した系統間の mRNA 発現量の差は確かに確認出来、実験室系統と複数の野生種を含むマウスの *APOBEC3* 対立遺伝子は、mRNA 高発現の B6 型と低発現の BALB/c 型に二分出来ること、3) 両者の記述の通り、B6 型対立遺伝子の転写産物は $\Delta 5$ が主体であることを発表した⁴⁴⁾。その後、Greene らも最初の論文で mRNA 発現の定量に誤りがあったことを認め、B6 マウスでは *APOBEC3* mRNA 発現量が BALB/c マウスの数倍高いことを確認した⁴⁵⁾。一方、Greene らがその重要性に全く触れていないアミノ酸一次配列の差については、NIH の Christine Kozak らが我々の記述を基礎に進化論的解析を行い、我々が機能差と結びつけた N-末端側の配列多型に正の選択圧が加わっていることを明らかにした⁴⁶⁾。

多型による機能差の分子基盤

マウス *APOBEC3* 遺伝子の多型による機能差について、複数グループの一致した記述を纏めると、1) 感染抵抗性の B6 マウスでは、感受性の A または BALB/c マウスに比べて mRNA 発現量が数倍高い^{11, 41, 43-45)}、2) 抵抗性系統では転写産物が $\Delta 5$ 主体であり、感受性系統では第5エ

キソンを含む全長型 mRNA が主体を占める^{11, 42-45)}、3) アミノ酸配列に多型があり、N-末端側が B6 型の配列であると複製抑制活性が高い^{11, 46)}、となる。しかし、これらは実験室系のマウス系統に見出される唯二つの対立遺伝子の示す、互いに連鎖した差異であるため、そのうちの違いがレトロウイルス感染防御能の違いを決定付けているのかは明確ではなかった。

我々の最初の報告¹¹⁾では、3) について cDNA キメラによる検討を行い、 $\Delta 5$ タンパク質をほぼ等量発現させた場合、その N-末端側半分 (第1~第4エキソンに相当する部分) が B6 由来のアミノ酸配列を有していれば、全長が B6 配列の $\Delta 5$ 分子と同様、試験管内で MuLV 複製を強く制限出来ることを示した。マウス *APOBEC3* タンパク質は、ヒトの *APOBEC3F* や *APOBEC3G* と同様二つの Z ドメインを持つ^{12, 13)}、何れの分子も二つの Z ドメインが両方デアミナーゼ活性を持つ訳ではない。実際、マウスの *APOBEC3* ではその N-末端側ドメイン (Z2) のみがデアミナーゼ活性を示し、ヒト *APOBEC3G* では逆に C-末端側ドメイン (Z1) のみがデアミナーゼ活性を示す⁴⁷⁾。従って、上記のキメラ実験の結果はデアミナーゼ活性のドメイン分布と一致しそうであるが、興味深いことにマウス *APOBEC3* がマウスレトロウイルスに対して示す複製抑制活性は、デアミナーゼ機能に依存しない可能性がある¹¹⁾。実際、site-directed mutagenesis によって、B6 由来 *APOBEC3* Z2 ドメイン中のデアミナーゼ活性中心を破壊しても、ウイルス複製抑制活性には影響しなかった¹¹⁾。また、B6 由来 $\Delta 5$ 分子を発現する細胞から出芽したフレンド MuLV が感染した標的細胞中のプロウイルスを調べても、G から A への塩基置換は有意に増加していなかった。一方、酵素活性中心よりもさらに N-末端側に近い、多型性のあるアミノ酸残基を B6 型から BALB/c 型に置換すると、ウイルス複製抑制活性が低下した⁴⁸⁾。これらの N-末端側アミノ酸残基は Kozak らが進化上正の選択圧が加わっていることを示した残基であり⁴⁶⁾、マウス *APOBEC3* の機能保持に必要であることがわかる。ヒト *APOBEC3G* C-末端側ドメイン (Z1) の X 線結晶構造解析データを基に作製された三次構造モデルでは、我々が site-directed mutagenesis で機能上の重要性を確定した上記のアミノ酸残基は、一本鎖 DNA 結合溝の内側に向かって露出していると予測されている⁴⁶⁾。

但し、AKR マウスで発現する内在性同種指向性ウイルス (AKV) を用い、マウス *APOBEC3* cDNA の cotransfection を行った実験では、マウス *APOBEC3* による AKV 複製抑制はデアミナーゼ依存性であると報告されている⁴⁹⁾。また、マウス染色体上の内在性レトロウイルスについて、*APOBEC3* による修飾の跡を調べた研究でも、内在性多指向性 (polytropic) 及び修飾型多指向性 (modified polytropic) ウイルスに G から A への塩基置換が蓄積していることが

示されている²³⁾。従って、マウス APOBEC3 がマウスの内在性レトロウイルス（の少なくとも一部）に対してデアミナーゼ活性を示すことは間違いなく、一方病原性のフレンド MuLV に対しては、デアミナーゼ非依存的な複製抑制活性を示すことも疑いがない¹¹⁾。Kozak らの進化論的解析⁴⁶⁾を参考にすると、外来性の感染性マウスレトロウイルスは、既に宿主細胞 APOBEC3 によるデアミナーゼ修飾に抵抗性を獲得しており、これに対抗するため、マウス APOBEC3 にはデアミナーゼ非依存的な複製抑制機能に対する正の選択圧が加わっていると言えるかも知れない（武装競争説）。G-to-A 塩基置換が内在性 polytropic 及び modified polytropic ウイルスゲノムにのみ認められ、異種指向性 (xenotopic) ウイルスには認められないという事実²³⁾は、マウスレトロウイルスに自然宿主のデアミナーゼ機能に抵抗性となったグループが生じ、これに対抗するため、デアミナーゼ非依存的な抗レトロウイルス作用が獲得されたと言う仮説を支持する。

一方、mRNA アイソフォームの機能差に与える影響については、最近我々が明確な答えを出した⁴³⁾。B6 型の APOBEC3 対立遺伝子で転写産物が $\Delta 5$ 主体となり、BALB/c 型対立遺伝子の転写産物では第 5 エキソンを含む全長型が主体となる理由については、以前から第 4 イントロンの下流末端付近に存在する塩基配列多型が、一次転写産物スプライシング過程における RNA 分岐部位の単一塩基多型 (SNP) を含むこと、及び分岐部位と下流エキソンの間に介在する投げ縄構造中の polypyrimidine tract の長さを変えることが指摘されていた⁴⁴⁾。この予測が正しいかどうかを検討するため、我々は B6 及び BALB/c 由来の APOBEC3 遺伝子ゲノムクローンをを用い、試験管内でのスプライシング実験を行った。その結果、分岐部位の T/C 多型は第 5 エキシソンの取り込みに影響を与えないこと、polypyrimidine tract を含む投げ縄構造中の TCCT 反復数はスプライシング効率に多少の影響を与えるが、第 5 エキソン取り込みの有無を決定的に変えるわけではないことが明らかとなった⁴³⁾。

マウス APOBEC3 mRNA への第 5 エキソン取り込みの有無が、予想に反して第 4 イントロン下流の多型では決まらないことがわかったので、機能的多型探索の範囲をさらに下流の第 5 エキソンから第 5 イントロンに拡大した。これは、主に $\Delta 5$ を発現する B6 マウスでも第 4 エキソンと第 6 エキソンの間でスプライシングが起こっていることから、第 4 エキシソンのドナー部位多型は重要でないと考えてのことである。deletion mutants と第 5 イントロン中央部での相互入れ替えキメラから、第 5 エキソンを含む第 5 イントロン上流部がスプライシング効率決定に重要なことがわかった。最終的に絞り込まれた最小範囲内に存在する 4 つの SNPs について、一つ一つ相互置換を行った結果、驚くべきことに第 5 エキソン内の G/C SNP が、このエキソンの mRNA への取り込みを決定的に制御していることが

明らかとなった。実際、第 5 エキソンから第 6 エキソンを含む B6 由来のゲノムクローンで第 5 エキソン中の上記 SNP を B6 型の G から BALB/c 型の C に置換すると、mRNA に第 5 エキソンが取り込まれた。さらに、第 4 エキソンから第 7 エキソンを含む B6 由来のゲノムクローンで、上記第 5 エキシソンの SNP を BALB/c 型の C に置換し、同時に第 4 イントロン末端部に TCCT 反復を追加すると、BALB/c 由来ゲノムクローンの場合と全く同じ効率で、mRNA への第 5 エキソン取り込みが起こった (図 2)。逆に、BALB/c 型ゲノムクローンで第 5 エキシソンの上記 SNP を C から G に置換すると、スプライシングが起こらなくなった。エキソン内のたった一つの SNP がスプライシングの有無を決定している機構は不明であるが、一つの可能性として、第 5 エキソンコード部分の RNA がステムループ構造を形成しており、その安定性がこの SNP によって影響されるのではないかと考えられる⁴³⁾。

APOBEC3 高発現は レトロウイルス感染抵抗性に結び付くか

興味深いことに、mRNA への第 5 エキソン取り込みの有無は、タンパク質の翻訳効率に大きな影響を与える⁴³⁾。以前から、同じ APOBEC3 対立遺伝子の産物である全長型の cDNA と $\Delta 5$ cDNA をそれぞれトランスフェクションし、ほぼ等量の mRNA 発現を得ても、細胞内のマウス APOBEC3 タンパク質発現量（そして出芽するウイルス粒子への取り込み量）は $\Delta 5$ の方が明らかに高く、全長型のタンパク質は大量に発現させることが困難であることが経験されていた¹¹⁾。我々は、トランスフェクション効率を厳密に検定出来る条件下で比較を行った結果、mRNA 発現量が同等であっても、全長型のマウス APOBEC3 は翻訳効率が低く、少量のタンパク質しか発現しないこと、これに対し $\Delta 5$ はより効率的に翻訳される結果大量のタンパク質が発現すること、両アイソフォームでタンパク質の安定性に差はないことを明らかにした⁴³⁾。また、生体内での内因性 APOBEC3 タンパク質発現量も比較し、 $\Delta 5$ が主体である B6 マウスでは、全長型が主体の BALB/c に比較して、タンパク質レベルでも APOBEC3 発現量が数倍高いことを示した。

従って、マウス APOBEC3 遺伝子の機能的多型解析から予想されることの一つは、タンパク質レベルで APOBEC3 発現が高くなれば、レトロウイルス感染に対する抵抗性を発揮するのではないかと言うことである。勿論、試験管内で $\Delta 5$ アイソフォームを同等量発現させた場合でも、N-末端側のアミノ酸配列多型が複製抑制効果に影響を与えるのは事実であるが、我々の試験管内実験でも BALB/c 型対立遺伝子由来の $\Delta 5$ （生理的には微量にしか発現していない）を強制発現させた細胞では、同じ BALB/c 由来の全長型を発現させた場合に比べて有意なフレンド MuLV 複

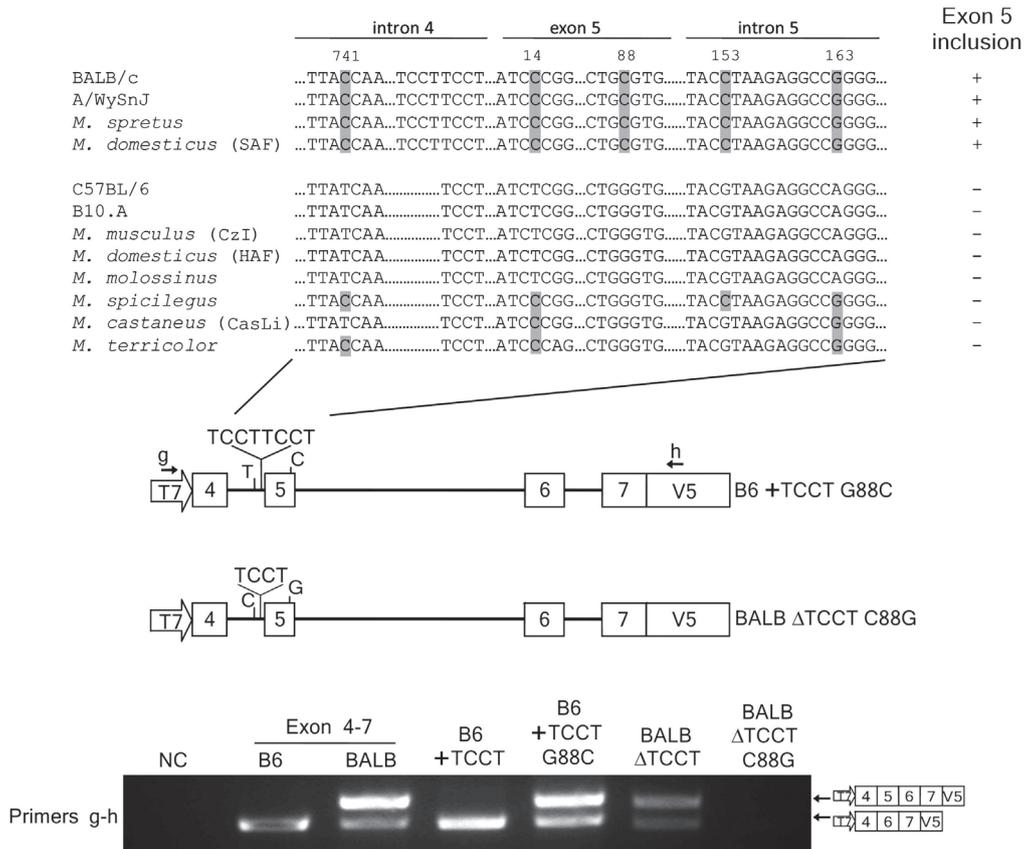


図2 マウス APOBEC3 第5エクソン周辺のゲノム塩基配列多型と mRNA への第5エクソン取り込み

上段は実験室系のマウスと複数種の野生マウスにおける第5エクソン周辺のゲノム塩基配列と、cDNA解析による第5エクソン発現の有無をまとめたもの。下段はゲノムDNAクローンを用いた試験管内でのスプライシング実験の結果、文献⁴³⁾に掲載した図を、一部改変して再構成した。野生種マウスの種名の後にある括弧内の名称は、それぞれの捕獲地を反映する。詳細は文献⁴³⁾を参照のこと。

第5エクソン取り込みの有無は互いに連鎖する第4イントロン末端部のTCCT反復の有無と第5エクソン内のG/C SNPにより決定され、観察されるそれ以外の多型とは相関しない。また、実験的にB6型遺伝子にBALB/c型のTCCT反復とG88C塩基置換を加えると、mRNAに第5エクソンが取り込まれる。

図中の塩基番号は、第4イントロンについては第4エクソンの最初の塩基から数えた値、第5エクソンと第5イントロンについては第5エクソンの最初の塩基から数えた値。なお、第5イントロンには対立遺伝子間で非常に多くの塩基置換や欠失が認められるが、それらはこの図には示していない。また、この図に示す以外の多型が機能的な意味を持たないことは、実験的に証明している⁴³⁾。

製抑制が観察された¹¹⁾。また、cotransfectionの実験系では、BALB/c型のマウスAPOBEC3がAKVの複製を(デアミナーゼ依存性に)抑制したと報告されている⁴⁹⁾。

マウスAPOBEC3の発現量とその抗ウイルス活性を左右することは、Susan Rossらが試験管内及び生体内の発現誘導実験によって証明した⁵⁰⁾。また、最近同様の報告がアカゲザルを用いてSIVに対してなされている⁵¹⁾。この場合、Vifを発現する野生型SIVの生体内複製に対して、APOBEC3G/Fの発現誘導が防御効果を示している点が注目される。我々も、イタリアコホートのHIV-1曝露非感染者(特定のHIV-1感染パートナーとの性的接触を介して、

HIV-1に頻繁に曝露されていながら、血清中に抗HIV抗体が検出されない、一群の「感染抵抗者」たち)におけるヒトAPOBEC3Gの発現をHIV-1感染者や未感染健常者と定量的に比較し、曝露非感染者では、特に試験管内でのI型インターフェロンによる刺激後に、CD14陽性単球でのAPOBEC3G発現が、mRNAレベルでもタンパク質レベルでもHIV-1感染者や対象健常人に比べ著しく高まることを報告している⁵²⁾。しかしながら、ヒトAPOBEC3の発現量に影響するような遺伝子多型の存在や、そのような多型のHIV-1感染抵抗性との相関は報告がなく⁵³⁾、イタリアコホートの曝露非感染者でAPOBEC3の発現量が高い

理由は現在のところ不明である。

マウス *APOBEC3* 遺伝子多型の進化から見た 哺乳動物とレトロウイルスの関わり

マウス *APOBEC3* 遺伝子に高機能の B6 型対立遺伝子と低機能の BALB/c 型対立遺伝子を見出した時、筆者が最初に考えたのは、B6 マウスの祖先は第 5 エキソンを失うような遺伝子多型を獲得することでマウスレトロウイルスに感染抵抗性となり、進化上の優位性を得たのでであろうと言うことであった。この仮説が正しければ、我々が第 5 エキソン中に同定した $\Delta 5$ アイソフォーム発現を規定する SNP が、齧歯類の進化の過程で遅れて出現し、正の選択を受けてきたことが確認出来るはずである。早速手近で入手可能な少数の野生マウス由来 DNA を解析してみたが、それだけでは何の結論も得られそうになかった。そこで、全世界から入手した野生マウスの内在性レトロウイルス分布を解析している旧知の Christine Kozak に、スプライシング部位多型に関する我々のデータを開示して相談すると、彼女は大いに興味を持ち、直ちに多数マウス種のゲノムシーケンスと cDNA アイソフォーム解析を進めてくれた。そうして得られた結果⁴³⁾ は、我々の何れにとっても全く予想外のものではあった。

現存野生種と実験室系統を含めて、調べたハツカネズミ属の全ての亜属が、原則として B6 マウスと同様に第 5 エキシンの取り込まれない遺伝子型を有していた。しかも、スプライシング制御に重要な二つの多型である第 5 エキソン内の G/C SNP が G であることと、第 4 イントロン末端部に TCCT 配列の反復がないこととは、必ず連鎖しており、機能的に無関係な多型、例えば最初 RNA 分岐部多型と目されていた TCCT 反復上流の T/C SNP については、連鎖は認められなかった (図 2)。このことは、ハツカネズミ属の祖先では第 5 エキソンが発現しないこと (即ち *APOBEC3* タンパク質が高い効率で翻訳されること) が重要な形質であり、それを保証する遺伝子型 (第 4 イントロンと第 5 エキシンの、特定の連鎖する機能性多型) に対して正の選択圧が加わっていたことを示唆する。逆に、ハツカネズミの祖先では、翻訳されない第 5 エキシンの塩基配列には選択圧が加わっていなかった筈であり、実際インド北部からベトナムに分布するクチバハツカネズミ (*Mus cervicolor*) やセネガル・エチオピア・ケニア西部に分布するアラゲハツカネズミ (*Mus setulosus*)、それにラットでは、第 5 エキソン中にフレームシフトが認められる (文献⁴³⁾ の Supporting Information を参照のこと)。

ハツカネズミ属がヒトと共生するようになって生じた "house mice" (これを「イエネズミ」とすると意味が変わるので、以下 "house mice" と記す) には、狭義のハツカネズミの亜種とされてきた *Mus musculus*, *Mus domesticus*, *Mus castaneus* があり、日本の愛玩マウスに由来する *Mus*

molossinus は *M. musculus* と *M. castaneus* の交配によって生じた雑系であると考えられている。これら "house mice" の 4 つの種のうち *M. molossinus* を除く 3 種と、アルジェリアハツカネズミ (*Mus spretus*) では、調べた一部の個体で *APOBEC3* 遺伝子転写産物に第 5 エキソンを取り込む型の多型 (BALB/c 型の対立遺伝子) が見出され、それらの個体のゲノムでは、例外なく第 4 イントロンの TCCT 反復と第 5 エキシンの G/C 多型が C であることが連鎖していた。一方、第 5 エキソンを発現しない B6 型の対立遺伝子を持つ個体も、*M. musculus*, *M. domesticus*, *M. castaneus* にそれぞれ複数認められ、*M. musculus* と *M. domesticus* では、これら第 5 エキソンに関する B6 ($\Delta 5$) 型多型を持つ個体では、その上流の第 2 イントロンに、B6 同様内在性レトロウイルス LTR の組込み⁴⁶⁾ が認められた。この第 2 イントロンの LTR は、*APOBEC3* mRNA の高発現をもたらす。一方、*M. castaneus* の一部と、調べた *M. molossinus* の全ての個体では、第 5 エキシンの取り込みも LTR 組込みもない、祖先型の遺伝子型が見られた。これを纏めると、ハツカネズミ属の祖先から *M. spretus* が分岐した段階で、第 5 エキソンを取り込む BALB/c 型の多型が獲得され、それが "house mice" にも伝えられた一方、"house mice" の種が分岐する前の段階で、一部の個体に *APOBEC3* 遺伝子座への内在性レトロウイルス組込みが生じ、*M. musculus* と *M. domesticus* の両種は、 $\Delta 5$ を祖先型よりも更に高く発現する LTR 組込み (B6) 型と、翻訳効率が低下する第 5 エキソン取り込み (BALB/c) 型の、何れかの遺伝子型を持つようになったということになる。*M. molossinus* は、祖先型の遺伝子を *M. castaneus* から受け継いだものであろう。

更に驚くべきことに、*M. musculus* と *M. domesticus* について、それらの持つ二つの対立遺伝子 (LTR 組込みのある $\Delta 5$ 型か、第 5 エキソン発現型か) の地理分布を纏めたところ、タンパク質発現量が著しく低下する筈の第 5 エキソン発現型対立遺伝子を持つ個体が、イタリア、スイス、スペインと大ブリテン島を含む西ヨーロッパ、及び北アフリカの広い範囲に分布していることがわかった⁴³⁾。これに対して、 $\Delta 5$ 高発現型の対立遺伝子を持つ個体の分布は、東ヨーロッパに限られていた。

APOBEC3 は両刃の剣か？

上記の結果は、最初の予想とは逆に、ハツカネズミの祖先の一部で *APOBEC3* 遺伝子座に第 5 エキソンを発現する遺伝子型の獲得が起こり、これを有する個体の子孫が、(恐らく進化上の優位性によって) 西ヨーロッパと北アフリカに広く分布するようになったことを示唆する (図 3)。一方で、 $\Delta 5$ を高発現する B6 型の対立遺伝子に正の選択圧が加わっていることも事実である⁴⁶⁾。従って、マウスの *APOBEC3* 遺伝子には、高機能・高発現型の B6 型対立

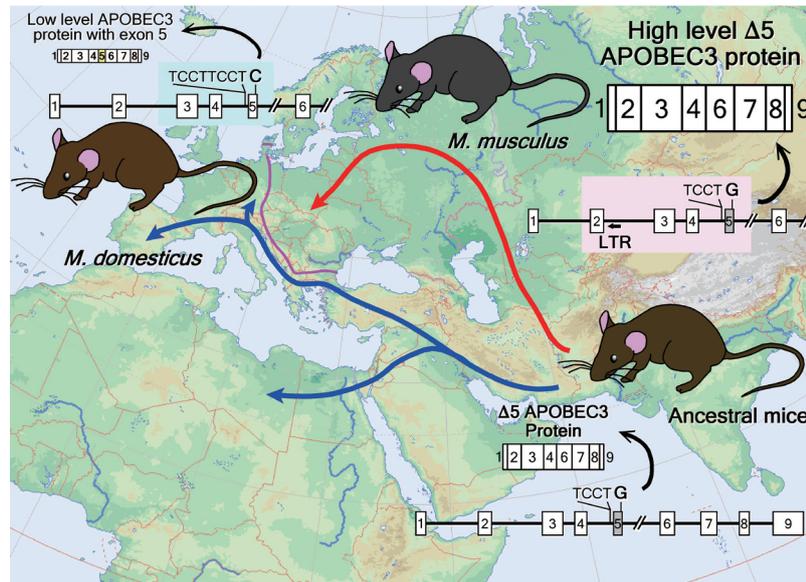


図3 ハツカネズミの祖先における *APOBEC3* 遺伝子多型の獲得と分布

現存 "house mice" の祖先は、第5エクソンを欠くタンパク質高発現型の *APOBEC3* 遺伝子を持っていた。"house mice" がインド亜大陸からユーラシア大陸へと分布していく際、カスピ海東岸を通して東ヨーロッパからロシアに分布した個体の子孫では、第2エクソンに内在性異種指向性ウイルス LTR の組込みが起こり、これにより第5エクソンを欠く翻訳効率の高い *APOBEC3* mRNA が、転写レベルで更に高発現となった。一方、地中海沿岸を通して西ヨーロッパと北アフリカに分布した個体の子孫では、第5エクソンを取り込む遺伝子型の獲得が起こり、*APOBEC3* タンパク質が低発現となった。現在、後者の子孫がヨーロッパ大陸に広く分布している。

文献⁴³⁾に発表したデータに基づく宮澤の原図。初出は近畿大学医学部免疫学教室のホームページ (<http://www.med.kindai.ac.jp/immuno/konnano.htm>)。

遺伝子への選択圧と、祖先型より低発現となる BALB/c 型対立遺伝子への選択圧という、互いに相反する自然選択の力が加わっていると解釈される。これは一体何を意味するのか？

現存ハツカネズミの祖先はインド亜大陸に生まれ、カスピ海東岸を北上する経路と、地中海沿いに北アフリカと南ヨーロッパに広がる経路とでユーラシア大陸西半に分布したものと考えられている⁵⁴⁾。このうち、カスピ海東岸を北上した個体群は、恐らく他種に由来する異種指向性レトロウイルスの感染に曝されたらしく、現在東ヨーロッパに分布する野生の "house mice" 種個体では、そのゲノムに複数の内在性異種指向性レトロウイルスが検出される⁵⁴⁾。従って、これら東ヨーロッパに分布する "house mice" では、外来性の感染性レトロウイルスの脅威から自らのゲノムを護るため、*APOBEC3* の発現量が高まるのが有利であったと想像される。一方、地中海沿岸に分布する "house mice" 種個体からは、内在性の異種指向性レトロウイルスは検出されない。感染性レトロウイルスによるゲノム修飾の脅威が無い条件下では、*APOBEC3* の発現量が低い方がむしろ進化的に有利であり、このため地中海沿岸に分布した "house mice" では第5エクソンを取り込むような遺伝子変

化が獲得され、正の選択を受けたのではないかと考えられる。

この点で注目されるのは、ヒトでも *APOBEC3H* の発現が低下するような遺伝子多型が複数回にわたって獲得され、選択的に維持されていると考えられることである⁵⁵⁾。即ち、霊長類 *APOBEC3H* は哺乳動物に共通に存在する単一ドメイン型 Z3 遺伝子の産物であるが(図1)、アカゲザルなど旧世界サルではタンパク質が高発現で、Vif の有無に関わらず HIV-1 に対しても SIV に対しても複製抑制活性を示す⁵⁶⁾。ところが、ヒトの *APOBEC3H* はタンパク質発現レベルが低く、HIV-1 に対する抑制活性を全く示さない。ヒトとチンパンジーの *APOBEC3H* について一次配列上差異のあるアミノ酸残基を相互置換する実験から、霊長類の祖先はタンパク質が安定に発現する *APOBEC3H* 遺伝子型を有しており、ヒトでは N-末端から15番目のアミノ酸残基が欠失する Del 15N 多型と、105番目のアミノ酸残基が G に置換する R105G 多型がそれぞれ独立に生じた結果、これらの多型の何れかを有する遺伝子産物は分解が亢進し、タンパク質レベルの発現が低下したことが示された⁵⁵⁾。実際、チンパンジーの *APOBEC3H* に R105G または Del 15N の変異を導入すると、タンパク質発現レベルが著

しく低下する。

興味深いことに、現存人類でも上記の多型を何れも欠く高発現型ハプロタイプを持つ個体があり、このハプロタイプの産物は霊長類祖先型遺伝子の産物やチンパンジー APOBEC3H と同様、Vif を欠く HIV-1 やレトロトランスポゾンに対して強い複製抑制活性を示す⁵⁵⁾。また、この高発現型 APOBEC3H ハプロタイプは、西アフリカやアフリカ系アメリカ人に高い頻度で見出され、ヨーロッパ人やアジア人の持つ APOBEC3H ハプロタイプは、タンパク質低発現型が大半を占める^{55, 57)}。このことは、アフリカ大陸ではヒトは APOBEC3H による複製抑制を受けるレトロウイルスの脅威に曝され続けており、一方アフリカを離れるとその脅威が低下していることを示しているかも知れない。

感染性レトロウイルスによる脅威の少ない条件で APOBEC3 の発現が低下することが進化上有利になるとしたら、それは何故だろうか？以前から、AID や APOBEC1 を異所性に高発現させると腫瘍の発生に結び付くことが示されていた^{58, 59)}。また、最近ヒト APOBEC3A の高発現がゲノム DNA の切断による細胞周期の停止に結び付くことが示され⁶⁰⁾、APOBEC3 はゲノム不安定性の原因にもなり得ることが指摘されている⁶¹⁾。生理的に発現するレベルの APOBEC3 がどの程度のゲノム DNA 修飾に結び付くのか、またこれが APOBEC3 酵素群の細胞内局在とどのような関係にあるのかは現時点で不明であるが、我々の見出したタンパク質低発現型マウス *APOBEC3* 対立遺伝子の広範な分布⁴³⁾ や、ヒト APOBEC3H の低発現型ハプロタイプの分布^{55, 57)} は、哺乳動物が何らかの危険性（ゲノム不安定性？）と引き替えの下、感染性レトロウイルスの脅威がその不利益を上回る時だけ、APOBEC3 の高発現を維持していることを示唆する。

謝 辞

原稿をチェックしてくれた近畿大学医学部免疫学教室の博多義之博士に感謝します。

参考文献

- Conticello SG, Thomas CJ, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol. Biol. Evol.* 22:367-377, 2005.
- Conticello SG. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.* 9:229, 2008.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, 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.
- Desrosiers RC, Lifson JD, Gibbs JS, Czajak SC, Howe AY, Arthur LO, Johnson RP. Identification of highly attenuated mutants of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 72: 1431-1437, 1998.
- 高折晃史. 3. APOBEC3 ファミリー蛋白. ウイルス 55:267-272, 2005.
- Chiu YL, Greene WC. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu. Rev. Immunol.* 26:317-353, 2008.
- Newman EN, Holmes RK, Craig HM, Klein KC, Lingappa JR, Malim MH, Sheehy AM. Antiviral function of APOBEC3G can be dissected from cytidine deaminase activity. *Curr. Biol.* 15:166-170, 2005.
- Bishop KN, Holmes RK, Malim MH. Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J. Virol.* 80:8450-8458, 2006.
- Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, Rouzina I, Williams MC, Musier-Forsyth K, Levin JG. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* 35:7096-7108, 2007.
- Bishop KN, Verma M, Kim EY, Wolinsky SM, Malim MH. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog.* 4:e1000231, 2008.
- Takeda E, Tsuji-Kawahara S, Sakamoto M, Langlois MA, Neuberger MS, Rada C, Miyazawa M. Mouse APOBEC3 restricts friend leukemia virus infection and pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 82:10998-1008, 2008.
- LaRue RS, Jonsson SR, Silverstein KA, Lajoie M, Bertrand D, El-Mabrouk N, Hotzel I, Andresdottir V, Smith TP, Harris RS. The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multifunctional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol. Biol.* 18:9:104, 2008.
- LaRue RS, Andresdottir V, Blanchard Y, Conticello SG, Derse D, Emerman M, Greene WC, Jonsson SR, Landau NR, Lochelt M, Malik HS, Malim MH, Munk C, O'Brien SJ, Pathak VK, Strebel K, Wain-Hobson S, Yu XF, Yuhki N, Harris RS. Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *J. Virol.* 83:494-497, 2009.
- Dorrschuck E, Fischer N, Bravo IG, Hanschmann KM, Kuiper H, Spotter A, Moller R, Cichutek K, Munk C, Tonjes RR. Restriction of porcine endogenous retrovirus by porcine APOBEC3 cytidine deaminases. *J. Virol.* 85:3842-3857, 2011.
- Munk C, Beck T, Zielonka J, Hotz-Wagenblatt A, Charzea S, Battenberg M, Thielebein J, Cichutek K, Bravo IG, O'Brien SJ, Lochelt M, Yuhki N. Functions, structure, and read-through alternative splicing of feline APOBEC3 genes. *Genome Biol.* 9:R48, 2008.
- Zielonka J, Marino D, Hofmann H, Yuhki N, Lochelt M, Munk C. Vif of feline immunodeficiency virus from domestic cats protects against APOBEC3 restriction factors from many felids. *J. Virol.* 84:7312-7324, 2010.
- Bogerd HP, Tallmadge RL, Oaks JL, Carpenter S, Cullen BR. Equine infectious anemia virus resists the antiretroviral activity of equine APOBEC3 proteins through a packaging-independent mechanism. *J. Virol.* 82:11889-11901, 2008.

- 18) Symer DE, Boeke JD. An everlasting war dance between retrotransposons and their metazoan host. In: Retroviruses. Molecular biology, genomics, and pathogenesis. (Kurth R, Bannert N, eds.) Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2010. pp 1-33.
- 19) Chiu YL, Witkowska HE, Hall SC, Santiago M, Soros VB, Esnault C, Heidmann T, Greene WC. High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 103:15588-15593, 2006.
- 20) Bogerd HP, Wiegand HL, Hulme AE, Garcia-Perez JL, O'Shea KS, Moran JV, Cullen BR. Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. Proc. Natl. Acad. Sci. US A. 103:8780-8785, 2006.
- 21) Perez-Caballero D, Soll SJ, Bieniasz PD. Evidence for restriction of ancient primate gammaretroviruses by APOBEC3 but not TRIM5alpha proteins. PLoS Pathog. 4:e1000181, 2008.
- 22) Lee YN, Malim MH, Bieniasz PD. Hypermutation of an ancient human retrovirus by APOBEC3G. J. Virol. 82:8762-8770, 2008.
- 23) Jern P, Stoye JP, Coffin JM. Role of APOBEC3 in genetic diversity among endogenous murine leukemia viruses. PLoS Genet. 3:2014-2022, 2007.
- 24) Ross SR. Are viruses inhibited by APOBEC3 molecules from their host species? PLoS Pathog. 5:e1000347, 2009.
- 25) Conticello SG, Harris RS, Neuberger MS. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. Curr. Biol. 13:2009-2013, 2003.
- 26) Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. Nat. Med. 9:1398-1403, 2003.
- 27) Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. Science 302:1056-1060, 2003.
- 28) Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, Landau NR. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. Cell 114:21-31, 2003.
- 29) Abudu A, Takaori-Kondo A, Izumi T, Shirakawa K, Kobayashi M, Sasada A, Fukunaga K, Uchiyama T. Murine retrovirus escapes from murine APOBEC3 via two distinct novel mechanisms. Curr. Biol. 16:1565-1570, 2006.
- 30) Browne EP, Littman DR. Species-specific restriction of APOBEC3-mediated hypermutation. J. Virol. 82:1305-1313, 2008.
- 31) Doehle BP, Schafer A, Wiegand HL, Bogerd HP, Cullen BR. Differential sensitivity of murine leukemia virus to APOBEC3-mediated inhibition is governed by virion exclusion. J. Virol. 79:8201-8207, 2005.
- 32) Okeoma CM, Lovsin N, Peterlin BM, Ross SR. APOBEC3 inhibits mouse mammary tumour virus replication in vivo. Nature 445:927-930, 2007.
- 33) Chesebro B, Wehrly K. Identification of a non-H-2 gene (*Rfv-3*) influencing recovery from viremia and leukemia induced by Friend virus complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:425-429, 1979.
- 34) Miyazawa M, Nishio J, Chesebro B. Genetic control of T cell responsiveness to the Friend murine leukemia virus envelope antigen. Identification of class II loci of the H-2 as immune response genes. J. Exp. Med. 168:1587-1605, 1988.
- 35) Miyazawa M, Nishio J, Wehrly K, Chesebro B. Influence of MHC genes on spontaneous recovery from Friend retrovirus-induced leukemia. J. Immunol. 148:644-647, 1992.
- 36) Iwashiro M, Kondo T, Shimizu T, Yamagishi H, Takahashi K, Matsubayashi Y, Masuda T, Otaka A, Fujii N, Ishimoto A, Miyazawa N, Robertson MN, Chesebro B, Kuribayashi K. Multiplicity of virus-encoded helper T-cell epitopes expressed on FBL-3 tumor cells. J. Virol. 67: 4533-4542, 1993.
- 37) Miyazawa M, Fujisawa R, Ishihara C, Takei YA, Shimizu T, Uenishi H, Yamagishi H, Kuribayashi K. Immunization with a single T helper cell epitope abrogates Friend virus-induced early erythroid proliferation and prevents late leukemia development. J. Immunol. 155:748-758, 1995.
- 38) Sugahara D, Tsuji-Kawahara S, Miyazawa M. Identification of a protective CD4+ T-cell epitope in p15^{gag} of Friend murine leukemia virus and role of the MA protein targeting the plasma membrane in immunogenicity. J. Virol. 78:6322-6334, 2004.
- 39) Kawabata H, Niwa A, Tsuji-Kawahara S, Uenishi H, Iwanami N, Matsukuma H, Abe H, Tabata N, Matsumura H, Miyazawa M. Peptide-induced immune protection of CD8+ T cell-deficient mice against Friend retrovirus-induced disease. Int. Immunol. 18:183-198, 2006.
- 40) Kanari Y, Clerici M, Abe H, Kawabata H, Trabattini D, Lo Caputo S, Mazzotta F, Fujisawa H, Niwa A, Ishihara C, Takei YA, Miyazawa M. Genotypes at chromosome 22q12-13 are associated with HIV-1-exposed but uninfected status in Italians. AIDS 19:1015-1024, 2005.
- 41) Miyazawa M, Tsuji-Kawahara S, Kanari Y. Host genetic factors that control immune responses to retrovirus infections. Vaccine 26:2981-2996, 2008.
- 42) Santiago ML, Montano M, Benitez R, Messer RJ, Yonemoto W, Chesebro B, Hasenkrug KJ, Greene WC. *ApoBec3* encodes *Rfv3*, a gene influencing neutralizing antibody control of retrovirus infection. Science 321: 1343-1346, 2008.
- 43) Li J, Hakata Y, Takeda E, Liu Q, Iwatani Y, Kozak CA, Miyazawa M. Two genetic determinants acquired late in *Mus* evolution regulate the inclusion of exon 5, which alters mouse *APOBEC3* translation efficiency. PLoS Pathogens 8: e1002478, 2012.
- 44) Okeoma CM, Petersen J, Ross SR. Expression of murine *APOBEC3* alleles in different mouse strains and their effect on mouse mammary tumor virus infection. J. Virol. 83:3029-3038, 2009.
- 45) Santiago ML, Smith DS, Barrett BS, Montano M, Benitez RL, Pelanda R, Hasenkrug KJ, Greene WC. Persistent Friend virus replication and disease in *ApoBec3*-

- deficient mice expressing functional B-cell-activating factor receptor. *J. Virol* 85: 189-199, 2011.
- 46) Sanville B, Dolan MA, Wollenberg K, Yan Y, Martin C, Yeung ML, Strebel K, Buckler-White A, Kozak CA. Adaptive evolution of *Mus* APOBEC3 includes retroviral insertion and positive selection at two clusters of residues flanking the substrate groove. *PLoS Pathog* 6:e1000974, 2010.
 - 47) Hakata Y, Landau NR. Reversed functional organization of mouse and human APOBEC3 cytidine deaminase domains. *J. Biol. Chem.* 281:36624-36631, 2006.
 - 48) Miyazawa M, Tsuji-Kawahara S, Hakata Y, Li J, Take-da E, Ishihara C. Functional consequences of mouse *APOBEC3* gene polymorphisms and multiple genetic factors that influence the production of virus-neutralizing antibodies in Friend virus-infected mice. *submitted for publication*, 2012.
 - 49) Langlois MA, Kemmerich K, Rada C, Neuberger MS. The AKV murine leukemia virus is restricted and hypermutated by mouse APOBEC3. *J. Virol* 83: 11550-11559, 2009.
 - 50) Okeoma CM, Low A, Bailis W, Fan HY, Peterlin BM, Ross SR. Induction of APOBEC3 *in vivo* causes increased restriction of retrovirus infection. *J. Virol* 83: 3486-3495, 2009.
 - 51) Musil B, Sauermann U, Motzkus D, Stahl-Henning C, Sopper S. Increased APOBEC3G and APOBEC3F expression is associated with low viral load and prolonged survival in simian immunodeficiency virus infected rhesus monkeys. *Retrovirology* 8: 77, 2011.
 - 52) Biasin M, Piacentini L, Lo Caputo S, Kanari Y, Magri G, Trabattoni D, Naddeo V, Lopalco L, Clivio A, Cesana E, Fasano F, Bergamaschi C, Mazzotta F, Miyazawa M, Clerici M. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J. Infect. Dis.* 195: 960-964, 2007.
 - 53) An P, Bleiber G, Duggal P, Nelson G, May M, Mangeat B, Alobwede I, Trono D, Vlahov D, Donfield S, Goedert JJ, Phair J, Buchbinder S, O'Brien SJ, Telenti A, Winkler CA. APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS. *J. Virol.* 78:11070-11076, 2004.
 - 54) Kozak CA. The mouse "xenotropic" gammaretroviruses and their XPR1 receptor. *Retrovirology* 7: 101, 2010.
 - 55) OhAinle M, Kerns JA, Li MM, Malik HS, Emerman M. Antiretroelement activity of APOBEC3H was lost twice in recent human evolution. *Cell Host Microbe.* 4:249-259, 2008.
 - 56) OhAinle M, Kerns JA, Malik HS, Emerman M. Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H. *J. Virol.* 80:3853-3862, 2006.
 - 57) Harari A, Ooms M, Mulder LC, Simon V. Polymorphisms and splice variants influence the antiretroviral activity of human APOBEC3H. *J. Virol.* 83:295-303, 2009.
 - 58) Yamanaka S, Balestra ME, Ferrell LD, Fan J, Arnold KS, Taylor S, Taylor JM, Innerarity TL. Apolipoprotein B mRNA-editing protein induced hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8483-8497, 1995.
 - 59) Okazaki IM, Hiai H, Kakazu N, Yamada S, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T. Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med* 197: 1173-1181, 2003.
 - 60) Landry S, Narvaiza I, Linfesty DC, Weitzman MD. APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. *EMBO Rep.* 12:444-450, 2011.
 - 61) Narvaiza I, Landry S, Weitzman MD. APOBEC3 proteins and genomic stability: the high cost of a good defense. *Cell Cycle* 11:33-38, 2012.

Molecular evolution of physiologically functioning anti-retroviral APOBEC3 deaminases.

Masaaki MIYAZAWA, M.D., Ph.D.

Professor and chairman, Department of Immunology
Kinki University School of Medicine
377-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama
Osaka 589-8511, Japan

Recent in vivo findings clearly indicate that mammalian cytidine deaminase APOBEC3 can function as a physiological restriction factor to retrotransposons and infectious retroviruses. However, some retroviruses, including primate lentiviruses, have evolved to counter their natural host's APOBEC3. To survive this arms race, primates seem to have acquired multiple copies of APOBEC3 genes. Surprisingly, however, during the process of the diversification of rodent species, as well as the human race, some ancestral individuals acquired genetic variants that reduced the protein levels of APOBEC3 expression, and these variants currently show unexpectedly wide geographic distributions. These data suggest that in the absence of a heavy burden of infectious retroviruses, high-level expression of APOBEC3 cytidine deaminase might be costly to the integrity of the host genome.