

合体してレトロウイルスと戦う：TRIMCyp

TRIM5 α (tripartite motif 5 isoform α) は HIV-1 の Gag 蛋白質の分解を促進することで HIV-1 の増殖を抑制する (過去のウイルス防御の代償：TRIM5 α 参照)。逆に Cyclophilin A(CypA)は HIV-1 の capsid に結合してそのような宿主の機構から HIV-1 を保護する。この 2 つの相反する働きを持つ蛋白質が合体したら一体どのようなことが起こるのだろうか？実際にこの 2 つが合体した遺伝子を持っている生物がいる。ヨザル (owl monkey) である (Sayah et al. 2004)。

ヨザル *Aotus trivirgatus* は広鼻猿類、いわゆる新世界猿で唯一 HIV-1 の感染後に増殖を制限する能力を持つ。(新世界猿では、HIV-1 は細胞に感染できないが、人工的に細胞中に侵入させると増殖する。) しかし、SIV は抑制できない。この抑制は、CypA に結合する阻害剤 cyclosporin A(CsA)によって解除される。HIV-1 に変異を入れたり、他の類似の薬剤の投与をしたりして CypA と HIV-1 が結合できなくすると、同様に HIV-1 の増殖抑制ができなくなった。近縁種の *Aotus nancymae* の末梢単核球でも同様の結果が得られた。一方、狭鼻猿類、いわゆる旧世界猿では CypA と HIV-1 の capsid との相互作用は HIV-1 の効率的な増殖に必要で、CsA は HIV-1 の増殖を抑制する作用を持つ。つまり、旧世界猿とヨザルとでは CsA の効果が全く逆である。ただし、CsA や類似の薬物は CypA だけではなく他の Cyclophilin も阻害するため副次的な作用が排除できない。そこで、著者らは small hairpin RNA (shRNA) を用いてヨザルの肝細胞株で CypA だけを阻害する RNAi 系を確立した。この系では HIV-1 への抵抗性は失われた。そこに配列を変えて shRNA で阻害されない CypA を plasmid で導入したところ、予想では抵抗性が回復するはずだったのだが、それでも HIV-1 への抵抗性は失われていた。この予想外の結果が興味深い観察を生んだ。

より長い CypA の mRNA を取って来ようとして、1,700 から 2,500bp の cDNA ライブラリーを作成し、CypA のプローブでコロニーハイブリダイゼーションをしたところ、TRIM5 のエクソン 1 から 7 と CypA 全長が繋がった DNA が取れて来た。TRIM5 α は TRIM5 遺伝子のエクソン 1 から 8 ままで繋がってできる mRNA にコードされる蛋白質である。ちょうどフレームが合っているため、N 末側 299aa が TRIM5 の N 末側、C 末側 165aa が CypA 全長という蛋白質がコードされていた。2 つの間には CypA mRNA の 5'UTR に由来する 11aa がコードされていた。これは TRIMCyp と命名された。TRIMCyp の mRNA はヨザルで転写されており、先ほどの shRNA の実験では 10 分の 1 程度に抑制されている事がわかった。そこでさきほどの CypA の代わりに TRIMCyp を肝細胞に導入すると確かに HIV-1 の抑制が観察できた。TRIMCyp を発現するヒトの細胞株を作成すると、HIV-1 の抑制が観察され、CsA の存在にも影響を受けなかった。これは、上記のヨザ

ルでの HIV-1 の増殖抑制が、CypA ではなく、TRIMCyp によって担われている事を示している。

TRIMCyp の mRNA は、TRIM5 と同じ座位にコードされていた。すなわち、TRIM5 のエクソン 7 と 8 の間に CypA 全長の cDNA が挿入されており、エクソン 7 と CypA との間で splicing が起こる事で TRIMCyp の mRNA ができていた。CypA の配列は両側に 16bp の直列反復配列 AAGAATTTTATGTTCT を持ち、末端に polyA を持っている事から、L1 によって転移した CypA mRNA の retrocopy であることがわかった。これは L1 による転移で新しい機能遺伝子ができた初めての報告である。

Nisole らも TRIM-5 の 3'RACE から CypA の retrocopy の挿入を発見した (Nisole et al. 2004) 。彼らは RACE と RT-PCR を併用して、複数種の TRIMCyp mRNA が作られていることを明らかにしている。TRIM5 のエクソン 5 までは全てに共通するが、上述の TRIMCyp をコードするものの他に、エクソン 6 の無いもの、CypA の ORF の終わり付近でエクソン 8 に splicing されているものなどが見つかった。HIV-1 に対する抑制効果をヨザルの培養細胞で調べたところ、上記の TRIMCyp 以外の mRNA の産物は抑制効果のある蛋白質をコードしていない事がわかった。興味深い事に、CypA の最後の 17 アミノ酸が別の 16 アミノ酸に入れ替わっている蛋白質や、エクソン 7 から 8 へ splicing された mRNA にコードされている TRIM5 α は HIV-1 の増殖を抑制できなかった。これら 2 種類の蛋白質は HIV-1 の capsid 蛋白質に結合しないことも GST プルダウン実験により示された。

旧世界猿では、TRIM5 α も CypA もどちらも HIV-1 の capsid に結合する活性を持つ。しかし、ヨザルでは TRIM5 α 単独では HIV-1 と結合できない。代わりに CypA が HIV-1 の capsid と結合するため TRIM5 α の経路で HIV-1 の増殖を抑制する事ができる。

TRIM5 と CypA の融合蛋白質は実は一部の旧世界猿でも作られている。5 つのグループがほぼ同時にその事実を発見した (Liao et al. 2007; Brennan et al. 2008; Virgen et al. 2008; Wilson et al. 2008; Newman et al. 2008) 。Liao らの論文は手に入らなかった所以他の 4 本の論文を、その紹介記事 (Stoye and Yap 2008) と併せて紹介したい。

その融合蛋白質は 3 種類の旧世界猿から見つかった。すなわち、アカゲザル *Macaca mulatta*、ブタオザル *Macaca nemestrina*、そしてカニクイザル *Macaca fascicularis* である。アカゲザルはアジアの大陸部に幅広く生息し、ブタオザル、カニクイザルの両種は東南アジア一帯に生息する。全て *Macaca* 属のサルである。しかし、特にこの 3 種が近縁というわけではないので、他の *Macaca* 属のサルにも分布していると思われる。

ヨザルと同様にこれら3種のサルのTRIM5とCypAの融合蛋白質もCypAのretrocopyがTRIM5遺伝子に挿入されたことにより作られていた。これら3種では、TRIM5遺伝子の直後に通常のCypA遺伝子がコードされている。しかし配列から、retrocopyのCypAが融合蛋白質をコードしていることが明らかになった。このCypAのretrocopyはヨザルとは別の位置、TRIM5のエクソン8の下流に挿入されており、両側にAATAATTTTGTの直列反復配列があり、3'末端にpolyA tailを持っていた。しかし、このCypA retrocopyはゲノム配列が解読されたアカゲザルの個体では挿入されていない。すなわち、このretrocopyの挿入は種内で固定されていない。Wilsonらの解析した31個体のインドのアカゲザルと38個体の中国のアカゲザルの内、中国の個体はどれもretrocopyを持っておらず、インドでも15個体がヘテロで持ち、ホモで持つ個体は1個体、他15個体は持っていなかった。面白い事にアカゲザルの培養細胞の内、FRhK4はretrocopyを持たず、LLC-MK2はヘテロで持っていた。同じretrocopyの挿入がブタオザル、カニクイザルでも見つかった。この2種では種内多型は調べられていない。

ヨザルと同様にこれら3種でもsplicing variantが作られている。エクソン5だけ、及びエクソン5と6の欠けたmRNAからはフレームが違いためCypAに相当する蛋白質は翻訳されない。エクソン6からCypAへとsplicingされたものだけが、468aaの、TRIM5とCypAの融合蛋白質をコードしている。ヨザルではエクソン7の後ろにCypAが繋がっていたので、比較すると融合蛋白質はエクソン7のコードする9aaの分だけ短い。

アカゲザルの複数の個体を解析すると、retrocopyの挿入は、イントロン6の3'側splicing site（エクソン7の5'側のsplicing site）がAGからATに変化している個体でだけ見つかることがわかった。このGからTへの変異によりエクソン6からエクソン7への正常なsplicingができなくなっている。その代わりにエクソン6からCypA retrocopyへのsplicingが起こり、TRIMCypができていると考えられる。このGからTへの変異はアカゲザルだけではなく、ブタオザルとカニクイザルでも見つかった。しかもアカゲザルではGの個体とTの個体、そして両者がヘテロになった個体が見つかるのに対して、ブタオザルでは調べた16個体全てでTがホモで存在した。そしてTがホモの個体から抽出した末梢単核球はHIV-1への耐性が低下していた。

これらのサルのTRIMCypを細胞で発現させ、ウイルス感染実験を行なった結果、ヨザルのTRIMCypと異なり、このTRIMCypはHIV-1耐性を付与しないことが明らかとなった。同様に、アカゲザル由来のSIV（simian immunodeficiency virus）であるSIVmac（ただし、飼育下のアカゲザルから単離され、野生アカゲザルでは見つからない事から飼育下で種間感染したものと考えられている）、EIAV（equine infectious anemia virus）、MLV（murine leukemia virus）への耐性も

与えられない。しかし、TRIMCypにより HIV-2、アフリカミドリザル *Cercopithecus tantalus* 由来の SIV である SIV_{AGM}tan (SIV_{mac} とは遠縁) と FIV (feline immunodeficiency virus) に対する抑制が起こる。アカゲザルの TRIM5 α は HIV-1、HIV-2、FIV、EIAV を抑制できる。

ブタオザルの TRIMCyp とヨザルの TRIMCyp の間のウイルス耐性の違いの原因が Cyp 領域にあることを、Virgen らはキメラ TRIMCyp の解析から明らかにしている。この領域には 6 アミノ酸の違いがある。出芽酵母を使った two-hybrid 法により、ヨザルの TRIMCyp の Cyp 領域は HIV-1 の Gag 蛋白質 (capsid 蛋白質の前駆体) と結合するのに対して、ブタオザルの TRIMCyp の Cyp 領域は HIV-1 の Gag 蛋白質と結合しないことが示された。ヒトやブタオザルの CypA は HIV-1 の Gag 蛋白質と結合するので、ブタオザルの CypA と TRIMCyp とで異なる 2 つのアミノ酸が違いの原因になっている事がわかった。更に点変異を加える実験により、Cyp 領域の 69 番目のアルギニンがヒスチジンに変化したことで HIV-1 への耐性が失われた事がわかった。このアミノ酸がアルギニンだと HIV-1 の Gag 蛋白質に結合できるが、ヒスチジンだとできないことも two-hybrid 法で示された。

興味深い事に、アカゲザルとブタオザルの TRIMCyp による FIV への耐性は CsA を加えても影響を受けない。この CsA に影響を受けないという性質も 69 番目のアミノ酸がヒスチジンに変わった事によって獲得されたことがわかった。このアミノ酸は CypA と HIV-1 の Gag 蛋白質との結合表面にあり、結合の強度が様式かを変化させているらしい。

実は CypA は retrocopy が多い遺伝子の一つである。それにしても TRIM5 と CypA の融合遺伝子が独立に 2 回誕生したという事実は、この遺伝子がウイルス耐性を付与する事で正の選択を受けた可能性を想起させる。イントロン 6 の 3' 側 splicing site の変異が retrocopy の挿入の前に起きたか後に起きたかは定かではないが、もし前に起きたのならそれにより TRIM5 α のウイルス耐性は失われたはずであり、それを補う形で retrocopy が遺伝子に取り込まれたと考える事もできる。一方、TRIM5 α と TRIMCyp のウイルス耐性の相手が異なる事からは、平衡淘汰によって TRIM5 α と TRIMCyp が維持されて来たと考え事もできる。どちらが正しいかは *Macaca* 属のサルの集団遺伝学的解析から見てくるだろう。

Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J.

Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1.

Nature. 2004 Jul 29;430(6999):569-73. Epub 2004 Jul 7.

Nisole S, Lynch C, Stoye JP, Yap MW.

A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Sep 7;101(36):13324-8. Epub 2004 Aug 23.

Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT, Su B.

A novel fusion gene, TRIM5-Cyclophilin A in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to HIV-1 infection.
AIDS. 2007 Dec;21 Suppl 8:S19-26.

Wilson SJ, Webb BL, Ylinen LM, Verschoor E, Heeney JL, Towers GJ.

Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 4;105(9):3557-62. Epub 2008 Feb 19.

Virgen CA, Kratovac Z, Bieniasz PD, Hatzioannou T.

Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 4;105(9):3563-8. Epub 2008 Feb 19.

Brennan G, Kozyrev Y, Hu SL.

TRIMCyp expression in Old World primates *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 4;105(9):3569-74. Epub 2008 Feb 19.

Newman RM, Hall L, Kirmaier A, Pozzi LA, Pery E, Farzan M, O'Neil SP, Johnson W.

Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in old world monkeys.
PLoS Pathog. 2008 Feb 29;4(2):e1000003.

Stoye JP, Yap MW.

Chance favors a prepared genome.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 4;105(9):3177-8. Epub 2008 Feb 25.

2009/06/16

小島 健司 著
禁 無断複写転載