

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04740

研究課題名(和文) APOBEC3ファミリーの抗ウイルス作用スペクトルを規定する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis underlying different antiviral functions in the APOBEC3 family

研究代表者

岩谷 靖雅 (Iwatani, Yasumasa)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・部長

研究者番号：90303403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内酵素APOBEC3ファミリー(ヒトでは7種)はHIVなどのレトロウイルスに対して強力な増殖抑制効果を示す。しかし、HIVの場合には、ウイルスがもつVifタンパク質によってこれらの酵素が破壊される。APOBEC3の抗ウイルス作用機序やVifがAPOBEC3に結合するしくみを理解する上で、APOBEC3タンパク質の分子構造を明らかにする必要がある。本研究では、その分子構造(うち2種)を決定し、さらに上述の分子機序を明らかにした。特に、APOBEC3Hの分子構造決定と二本鎖RNAが介在する新機能の発見は予想外の展開となり、今後、癌あるいは遺伝子変異の研究分野においても重要な知見につながる。

研究成果の概要(英文)：Cellular enzymes of the APOBEC3 family (7 members encoded in human) exhibit potent antiviral activity against retroviruses including HIV. However, HIV expresses viral factor, Vif protein, in its infected cells and abrogates the APOBEC3-mediated defense system. Structural determinations of APOBEC3 family proteins are required to understand their antiviral functions and Vif-mediated antagonisms. In this study, we determined high-resolution crystal structures of APOBEC3 family proteins (2 of them) and clarified their structural/biochemical features underlying their molecular mechanisms. Especially, our determination of APOBEC3H crystal structure and unexpected findings of its biochemical properties provide important insights into the APOBEC3-mediated antiviral mechanisms as well as cancer and genetic mutations.

研究分野：ウイルス学

キーワード：レトロウイルス 宿主因子 APOBEC3 感染制御 核酸結合 構造解析 生化学 HIV

1. 研究開始当初の背景

APOBEC3 ファミリーは、細胞内に発現するポリヌクレオチドシチジン脱アミノ化酵素である。逆転写反応を介するレトロウイルスやレトロトランスポゾン、B 型肝炎ウイルスの感染・増殖を強く抑制する作用をもつ。ヒトでは 7 種コードされており、各々異なった抗ウイルス作用スペクトルを呈することが知られている。これまで、申請者は、生化学的な研究アプローチにより、その抗ウイルス作用機序の解明に取り組み、APOBEC3 の核酸結合能、酵素活性能、多量体形成能が深く関与していることを明らかにしてきた。しかし、その抗ウイルス作用スペクトルの違いを規定する分子機序は明らかになっておらず、これまでの生化学的データだけでは説明できない事象が多々ある。

2. 研究の目的

構造生物学的な解析を踏まえ APOBEC3 による抗ウイルス作用の分子機序の根底となる分子特性を明らかにすることを目的とし、各ファミリータンパク質を比較解析する。そして、APOBEC3 による生体防御機構の更なる理解、および APOBEC3 を活用した新たな治療戦略の創製につながる基礎を築くこととする。

3. 研究の方法

タンパク質の発現には大腸菌の系を用いて、酵素活性をもつタンパク質として高純度に精製した。精製では、GST-Glutathione アフィニティークロマト精製法（バッチ法）タグ切断後にゲル濾過法に利用した。沈殿・凝集抑制には適宜アルギニンを添加した。

立体構造解析には X 線結晶構造解析法で行なった。結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法により行なった。精密化・モデリングでは、A3C (PDB #3VOW) を鋳型にした。また、立体構造予測および分子動力的計算、docking simulation などの *in silico* 解析には、Amber や PyMOL2.0 などを活用した。

生化学的特性の解析に関して、まず、酵素活性（シチジン脱アミノ化活性）と基質特異性については、ウラシル DNA グリコシダーゼ/アルカリ分解法と ddNTP 終止法を用いた。核酸結合特性の解析には、蛍光ラベルした合成オリゴヌクレオチドや *in vitro* transcription により作成する RNA をプローブに用いた、ゲルシフトアッセイと蛍光偏光異方性分析 (Fluorescence Anisotropy 分析) を行った。

抗ウイルス効果、Vif に対する感受性試験、ウイルス粒子への取り込み効率については、培養細胞 (293T、TZM-bl、HeLa、CEM、MT-2 細胞) など用いて、解析した。

4. 研究成果

本研究課題では、APOBEC3 ファミリータンパク質の分子構造決定に成功し、これまでの不明であった生物学的な現象を分子・構造

学的レベルで解釈するための基盤情報を排出することができた。特に、抗ウイルス作用発揮に重要な RNA の結合親和性は各ドメインの遺伝型 (Z1~Z3) によって大きく異なり、酵素活性非依存的な分子機序（逆転写酵素伸長反応の物理的障害: RT Road-blocking 機序 (図 1)) と密接に相関していた。さらに、Z1~Z3 の遺伝型で分子構造の類似性も相関しており、核酸結合領域の局所構造 (Loop1、Loop7 および alpha6 領域) が異なる機能の決定要因となっていた。詳細な研究成果のうち、当該分野において重要な研究成果について、以下 3 項目について概説する。いずれの研究成果も当該分野における貴重な学術的な基盤情報として利用されると考えられる。

Blocking of RT extension

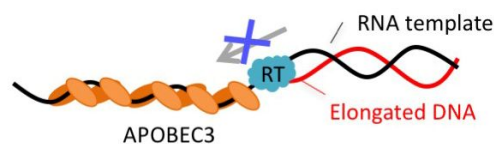


図 1. APOBEC3-mediated RT elongation

(1) APOBEC3F の分子構造と Vif 結合領域

X 線結晶構造解析法により APOBEC3F の C 末側ドメイン (CTD) の分子構造 (PDB #3WUS として登録) を高解像度で決定した (図 2)。さらに、HIV-1 Vif 結合領域および基質結合領域を同定し (図 1 の紫と緑色領域) その空間的な結合様式と特徴について明らかにした (発表論文 と総説)。APOBEC3C (図 2 の緑色領域) とは異なり広い結合面が重要である。

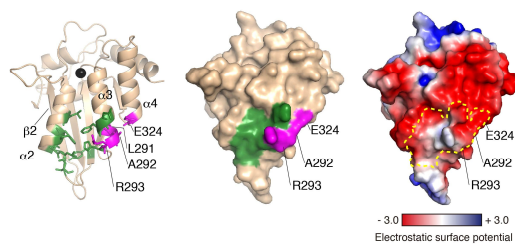


図 2. APOBEC3F CTD & Vif binding

(2) APOBEC3 の HIV-1 Vif 結合領域

霊長類の APOBEC3H の比較解析から、不明であった APOBEC3H の Vif 結合領域を同定した (発表論文)。この結果、APOBEC3H の Vif 結合領域は、C/F 型や G 型の Vif 結合領域と隣接しているが異なる部位に位置していた (図 3)。ファミリー (Z1~Z3 型間) 間ではインターフェイスの構造は全く異なっており、霊長類の Vif は 1 種類の分子で適応し、適応進化における高度な選択圧と適応が繰り返されてきたことが考えられた。興味深いことに、全く異なるインターフェイスではあるが、いずれも Vif 結合領域は負電荷

で囲われた疎水性の浅いくぼみを形成し、類似した構造学的特徴を有していたことが明らかになった。

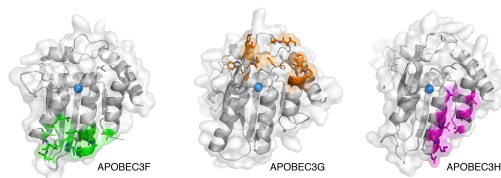


図 3. Vif-binding Regions in APOBEC3s

(3) *APOBEC3H* 分子構造と dsRNA の結合 X 線結晶構造解析により、*APOBEC3H* の分子構造を高分解能 (2.0 Å) で決定することに成功した (PDB #5Z98 として登録)。予想に反して、GC リッチな 7 塩基対の dsRNA を介した二量体であった (図 4)。dsRNA 結合領域の特徴として、A form である dsRNA の二重らせんが収納されるように塩基性アミノ酸が整列していた。また、*APOBEC3H* ループ領域 1 は dsRNA の主構の塩基を認識し、核酸配列の選択性に関与することも判明した。さらに、dsRNA との相互作用部位の変異型 *APOBEC3H* は細胞内で不安定であることが明らかになった。以上の結果から、1) *APOBEC3H* の細胞内安定性は dsRNA を介した二量体化によって制御されていること、2) dsRNA の結合が *APOBEC3H* のウイルス粒子への取込みおよび抗ウイルスメカニズムにも深く関与することが考えられる。本研究成果は、これまで未知であった霊長類 *APOBEC3H* の立体構造の決定に加え、核酸との相互作用ならびに細胞内の挙動に関する分子機序の全容解明にもつながると考えられる。さらに、抗ウイルス作用機序およびウイルス粒子への取り込み (HIV ゲノム RNA への結合) とも深く関与していることが示唆された (投稿中)。さらに、dsRNA 結合に重要な *APOBEC3H* の残基は Z3 間で高度に保存されているため、dsRNA を介した二量体形成およびその分子機序から派生する抗ウイルス作用機序や細胞内動態は、Z3 型 *APOBEC3* ファミリータンパク質の共通した特徴であり、他の *APOBEC3* タンパク質とは異なると考えられる。

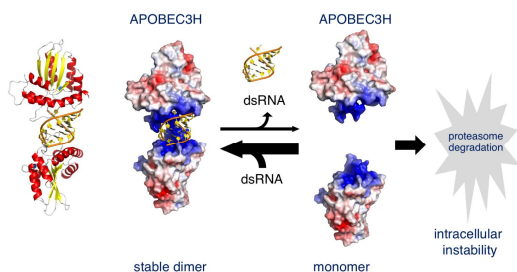


図 4. *APOBEC3H* Structure & Stability

では、なぜ *APOBEC3H* だけが dsRNA を介して二量体を形成するのか？それは大き

な疑問である。現時点で考えられることとして、細胞内における未同定の制御システムによって *APOBEC3H* の細胞内局在を制限している可能性がある。*APOBEC3H* は強力なシチジン脱アミノ化酵素活性を有しており、最近、遺伝学的に、乳がん、膀胱癌や頭頸部癌との関連性が報告されている。一仮説として、*APOBEC3H* が単量体(20kDa)として細胞内に存在する場合には、核内への移行も容易になり、ゲノム DNA の変異導入が促進される可能性がある。さらに、dsRNA 結合領域は ssDNA 結合領域と重なるため、dsRNA を介した二量体化により酵素活性が抑制 (蓋をする) しているというシナリオである。つまり、細胞は *APOBEC3H* の強力な抗ウイルスシステムを細胞質で待機させ、他方で核内における不要なゲノム変異誘導を防ぐために、dsRNA による二量体化の制御機構を使っている可能性がある。今後、結合している dsRNA の特定を進めることにより、詳細な制御機構の解明とその意義が明らかになる可能性があり、新たな研究分野の展開が期待されるといえる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 20 件)

Furukawa S, Uota S, Yamana T, Sahara R, Iihara K, Yokomaku Y, Iwatani Y, and Sugiura W. Distribution of Human Papillomavirus Genotype in Anal Condyloma Acuminatum Among Japanese Men: The Higher Prevalence of High Risk Human Papillomavirus in Men Who Have Sex with Men with HIV Infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, 査読有,34, 2018, 375-381, DOI: 10.1089/AID.2017.0197

Nemoto M, Hattori H, Maeda N, Akita N, Muramatsu H, Moritani S, Kawasaki T, Maejima M, Ode H, Hachiya A, Sugiura W, Yokomaku Y, Horibe K, and Iwatani Y. Compound heterozygous TYK2 mutations underlie primary immunodeficiency with T-cell lymphopenia. **Scientific Reports**, 査読有,8, 2018, 6956, DOI: 10.1038/s41598-018-25260-8

Baudi I, Iijima S, Chin'ombe N, Mtapuri-Zinyowera S, Murakami S, Isogawa M, Hachiya A, Iwatani Y, and Tanaka Y. Molecular epidemiology of co-infection with hepatitis B virus and human immunodeficiency virus (HIV) among adult patients in Harare, Zimbabwe. **J Med Virol**, 査読有,89, 2017, 257-266, DOI: 10.1002/jmv.24641

- Hachiya A, Kirby KA, Ido Y, Shigemi U, Matsuda M, Okazaki R, Imamura J, Sarafianos SG, Yokomaku Y, and Iwatani Y. Impact of HIV-1 Integrase L74F and V75I Mutations in a Clinical Isolate on Resistance to Second-Generation Integrase Strand Transfer Inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, 査読有,61, 2017, DOI: 10.1128/AAC.00315-17
- Nakashima M, Tsuzuki S, Awazu H, Hamano A, Okada A, Ode H, Maejima M, Hachiya A, Yokomaku Y, Watanabe N, Akari H, and Iwatani Y. Mapping Region of Human Restriction Factor APOBEC3H Critical for Interaction with HIV-1 Vif. **J Mol Biol**, 査読有,429, 2017, 1262-1276, DOI: 10.1016/j.jmb.2017.03.019
- Nomaguchi M, Doi N, Yoshida T, Koma T, Adachi S, Ode H, Iwatani Y, Yokoyama M, Sato H, and Adachi A. Production of HIV-1 vif mRNA Is Modulated by Natural Nucleotide Variations and SLSA1 RNA Structure in SA1D2prox Genomic Region. **Front Microbiol**, 査読有,8, 2017, 2542, DOI: 10.3389/fmicb.2017.02542
- Shigefuku R, Watanabe T, Kanno Y, Ikeda H, Nakano H, Hattori N, Matsunaga K, Matsumoto N, Kanno SI, Noshio K, Hachiya A, Iwatani Y, Matsumori T, Tsukikawa S, Makizumi R, Otsubo T, Yamamoto H, and Itoh F. Fusobacterium nucleatum detected simultaneously in a pyogenic liver abscess and advanced sigmoid colon cancer. **Anaerobe**, 査読有,48, 2017, 144-146, DOI: 10.1016/j.anaerobe.2017.08.010
- Baudi I, Iijima S, Chin'ombe N, Mtapuri-Zinyowera S, Murakami S, Isogawa M, Hachiya A, Iwatani Y, and Tanaka Y. Molecular epidemiology of co-infection with hepatitis B virus and human immunodeficiency virus (HIV) among adult patients in Harare, Zimbabwe. **Journal of Medical Virology**, 査読有,2016, DOI: 10.1002/jmv.24641
- Hosaka M, Fujisaki S, Masakane A, Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Shigemi U, Okazaki R, Hachiya A, Matsuda M, Ibe S, Iwatani Y, Yokomaku Y, Sugiura W, and Japanese Drug Resistance HIVSNT. HIV-1 CRF01_AE and Subtype B Transmission Networks Crossover: A New AE/B Recombinant Identified in Japan. **AIDS Research and Human Retroviruses**, 査読有,32, 2016, 412-419, DOI: 10.1089/aid.2015.0192
- Nakamura N, Kobayashi S, Minagawa H, Matsushita T, Sugiura W, and Iwatani Y. Molecular epidemiology of enteric viruses in patients with acute gastroenteritis in Aichi prefecture, Japan, 2008/09-2013/14. **Journal of Medical Virology**, 査読有,88, 2016, 1180-1186, DOI: 10.1002/jmv.24445
- Nakashima M, Ode H, Suzuki K, Fujino M, Maejima M, Kimura Y, Masaoka T, Hattori J, Matsuda M, Hachiya A, Yokomaku Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W, and Iwatani Y. Unique Flap Conformation in an HIV-1 Protease with High-Level Darunavir Resistance. **Frontiers in Microbiology**, 査読有,7, 2016, 61, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00061
- Nomaguchi M, Doi N, Sakai Y, Ode H, Iwatani Y, Ueno T, Matsumoto Y, Miyazaki Y, Masuda T, and Adachi A. Natural Single-Nucleotide Variations in the HIV-1 Genomic SA1prox Region Can Alter Viral Replication Ability by Regulating Vif Expression Levels. **Journal of Virology**, 査読有,90, 2016, 4563-4578, DOI: 10.1128/JVI.02939-15
- Ogawa S, Hachiya A, Hosaka M, Matsuda M, Ode H, Shigemi U, Okazaki R, Sadamasu K, Nagashima M, Toyokawa T, Tateyama M, Tanaka Y, Sugiura W, Yokomaku Y, and Iwatani Y. A Novel Drug-Resistant HIV-1 Circulating Recombinant Form CRF76_01B Identified by Near Full-Length Genome Analysis. **AIDS Research and Human Retroviruses**, 査読有,32, 2016, 284-289, DOI: 10.1089/AID.2015.0304
- Okada A, and Iwatani Y. APOBEC3G-mediated G-to-A hypermutation of the HIV-1 genome: the missing link in antiviral molecular mechanisms. **Frontiers in Microbiology**, 査読有,7, 2016, 2027, DOI: 10.3389/fmicb.2016.02027
- Tsuzuki Y, Watanabe T, Iio E, Fujisaki S, Ibe S, Kani S, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W, Okuse C, Okumura A, Sato Y, and Tanaka Y. Virological characteristics of hepatitis B genotype G/A2 recombination virus in Japan. **Hepatology Research**, 査読有,46, 2016, 775-783, DOI: 10.1111/hepr.12612
- Hachiya A, Ode H, Matsuda M, Kito Y, Shigemi U, Matsuoka K, Imamura J,

Yokomaku Y, Iwatani Y, and Sugiura W. Natural polymorphism S119R of HIV-1 integrase enhances primary INSTI resistance. **Antiviral Research**, 査読有, 119, 2015, 84-88, DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.04.014
Matsunaga S, Masaoka T, Sawasaki T, Morishita R, Iwatani Y, Tatsumi M, Endo Y, Yamamoto N, Sugiura W, and Ryo A. A cell-free enzymatic activity assay for the evaluation of HIV-1 drug resistance to protease inhibitors. **Frontiers in Microbiology**, 査読有, 6, 2015, 1220, DOI: 10.3389/fmicb.2015.01220
Ode H, Matsuda M, Matsuoka K, Hachiya A, Hattori J, Kito Y, Yokomaku Y, Iwatani Y, and Sugiura W. Quasispecies Analyses of the HIV-1 Near-full-length Genome With Illumina MiSeq. **Frontiers in Microbiology**, 査読有, 6, 2015, 1258, DOI: 10.3389/fmicb.2015.01258
Sakurai D, Iwatani Y, Ohtani H, Naruse TK, Terunuma H, Sugiura W, and Kimura A. APOBEC3H polymorphisms associated with the susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. **Immunogenetics**, 査読有, 67, 2015, 253-257, DOI: 10.1007/s00251-015-0829-2
都築伸弥, 岩谷靖雅. APOBEC3 と VIF の構造からみえてきたウイルス戦略. **生化学**, 査読無, 88, 2016, 88, DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880563

〔学会発表〕(計 20 件)

Iwatani Y, Analysis of structural and functional roles of the HIV-1 Vif PPLP motif region, 第 65 回日本ウイルス学会 学術集会、2017 年 10 月、大阪
Hachiya A (Iwatani Y), Visualization of viral DNA dynamics during INSTI-resistant HIV-1 replication, 第 31 回日本エイズ学会学術集会、2017 年 11 月、東京
Hachiya A (Iwatani Y), Impact of Clinically Observed Integrase Mutations, L74f/V75I, on Second-Generation Integrase Strand Transfer Inhibitor Resistance, Cold Spring Harbor Laboratory 2017 Annual Meeting on Retroviruses, 2017 年 5 月, New York, NY. USA
栗津宏昭(岩谷靖雅)、APOBEC3H の HIV-1 Vif 結合領域の構造学的研究、第 30 回日本エイズ学会学術集会、2016 年 11 月、鹿児島

都築伸弥 (岩谷靖雅)、HIV-1 Vif PPLP 領域の APOBEC3 の分解における役割、第 30 回日本エイズ学会学術集会、2016 年 11 月、鹿児島
Hachiya A (Iwatani Y), Novel mutation patterns in HIV-1 Integrase conferring high-level resistance to the first-generation Integrase strand transfer inhibitors, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月、札幌
Maejima M (Iwatani Y), A study on false-positive serological cases for HIV-2 in Japan, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月、札幌
Ode H (Iwatani Y), Comparative analysis of HIV-1 and HIV-2 integration sites, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月、札幌
Iwatani Y, Structural characterization of the APOBEC3H region important for HIV-1 Vif interaction, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月、札幌
Ode H (Iwatani Y), Comparative analysis of intergration sites between HIV-1 and HIV-2, Cold Spring Harbor Laboratory 2016 Annual Meeting on Retroviruses, 2016 年 5 月, New York, NY. USA
Nakashima M (Iwatani Y), Structural features of the APOBEC3H region critical for HIV-1 Vif interaction, Cold Spring Harbor Laboratory 2016 Annual Meeting on Retroviruses, 2016 年 5 月, New York, NY. USA
Iwatani Y, Nationwide surveillance of drug-resistant HIV-1 in newly diagnosed patients in Japan, 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), AIDS panel, 2016 年 1 月, North Bethesda, MD, USA
岩谷靖雅、細胞防御酵素を活用した抗 HIV 薬開発にむけて、第 6 回横幹連合コンファレンス、2015 年 12 月、名古屋
岩谷靖雅、HIV-1 が細胞因子 APOBEC3 による防御機構から逃れる分子機序、第 56 回日本熱帯医学会大会、2015 年 12 月、大阪
岩谷靖雅、HIV-1 Vif による APOBEC3 分解から考察されるウイルスの巧みな適応戦略、第 29 回日本エイズ学会学術集会、2015 年 11 月、東京
Nakashima M (Iwatani Y), Comparative analysis of the antiviral APOBEC3C enzymes in primates: implication for degeneration of their catalytic activities, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月、福岡
Iwatani Y, Structural insights into

HIV-1 Vif interactions with APOBEC3 cytidine deaminases, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月、福岡
Iwatani Y, HIV-1 Vif による APOBEC3 分解の分子機序, 第 17 回白馬シンポジウム 2015 年 6 月、米子

Nakashima M (Iwatani Y), Structure-based analysis of HIV-1 Vif-APOBEC3F interaction, Cold Spring Harbor Laboratory 2015 Annual Meeting on Retroviruses, 2015 年 5 月, New York, NY, USA

Ode H (Iwatani Y), Quasispecies evaluation across HIV-1 near-full-length genome via Illumina MiSeq, Cold Spring Harbor Laboratory 2015 Annual Meeting on Retroviruses, 2015 年 5 月, New York, NY, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩谷 靖雅 (IWATANI YASUMASA)

(独)国立病院機構 (名古屋医療センター臨床研究センター)・感染・免疫研究部・室長

研究者番号 : 90303403