

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07142

研究課題名(和文)APOBEC3のデアミナーゼ活性非依存ウイルス抑制の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of viral suppression by APOBEC3

研究代表者

伊藤 暢聡 (Ito, Nobutoshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：40361703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：APOBEC3はレトロウイルスに対抗するための分子機構の一つであり、シチジンデアミナーゼ活性によりウイルスを抑制している。しかし近年マウスのAPOBEC3 (mA3)が、このシチジンデアミナーゼ活性に依存せず、ウイルスのgag-pol前駆体のプロセス阻害による抑制機構ももつことが報告された。本研究では、mA3のカルボキシ末端側Zドメインを発現・精製し、ウイルスプロテアーゼとの相互作用を測定した。その結果、両者の間に直接の相互作用は見られなかった。アミノ末端側Zドメインがプロテアーゼと弱く相互作用する点と合わせて、この相互作用にはmA3の全長が必要なことが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レトロウイルスには免疫不全症候群を引き起こすHIVなど様々な病原体が含まれており、人類にとって大きな健康リスクとなっている。これまで知られていなかったウイルス抑制機構の理解は、関連する疾患の新しい治療薬の開発につながる可能性があり、本研究はその研究の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：APOBEC3 is one of the molecular mechanisms against retroviruses and uses its cytidine-deaminase activity to suppress the virus. Recently mouse APOBEC3 (mA3) was reported to suppress viruses in a deaminase-independent way, by inhibiting the process of gag-pol precursor. In this study, we prepared the C-terminal Z domain of mA3 and measured its interaction with viral protease. No direct interactions were observed between them and, together with the fact that the N-terminal Z domain of mA3 interacts weakly with the protease, it is strongly the full-length mA3 is required for sufficient interaction with the protease.

研究分野：構造生物学

キーワード：蛋白質間相互作用 抗ウイルス蛋白質 レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

HIV (ヒト免疫不全ウイルス) をはじめとするレトロウイルスは宿主のゲノムを改変する脅威であり、哺乳類は進化の過程で複数のウイルス複製制限因子を獲得してきた。Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) はその一つで、ウイルスゲノムの逆転写過程で形成される一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼ活性を持ち、シトシンをウラシルに変換することによってウイルスの遺伝情報を書き換えてその複製を抑制している。

一方、哺乳類による APOBEC3 獲得後に霊長類に感染するようになったレンチウイルス群は、Vif 蛋白質によって APOBEC3 の細胞内分解を促進することで標的細胞での複製阻害を回避している。しかし、HIV の自然宿主でないマウスの APOBEC3 は、Vif の有無に関わらず HIV-1 複製を強く阻害できる。

宮澤ら (J. Virol. (2008)) と Greene ら (Science (2008)) は、マウス APOBEC3 がマウスのレトロウイルスに対する抵抗因子であることと、マウスの系統間に機能的遺伝子多型があり、それぞれ自然抵抗性が異なることを発見した。抵抗性対立遺伝子では発現量が高く、その産物が exon 5 を欠損するのに対し、感受性対立遺伝子では全長型主体であることが明らかになった。さらに、宮澤らこのマウス APOBEC3 のレトロウイルス複製抑制には、シチジンデアミナーゼ活性に依存しないものがあることを示した。

APOBEC3 のデアミナーゼ活性非依存性ウイルス複製抑制というのは全く新しい概念であったが、その分子機構の一端が最近発見された。レトロウイルスの複製過程では、gag 遺伝子産物はひとつながりの前駆体ポリペプチドとして合成されたのち、ウイルス自身のプロテアーゼによる切断により、複数の構造蛋白質が生成される。構造蛋白質の切り出しを行うウイルスプロテアーゼ自身は、それを含む Gag-Pol 前駆体から、cis に切断されて生成されると考えられている。宮澤らは、マウス APOBEC3 がマウスレトロウイルス Gag-Pol 前駆体からのプロテアーゼ切り出しを定量的に阻害することを証明した。これは、マウス APOBEC3 のデアミナーゼ非依存性レトロウイルス複製抑制効果の、少なくとも一部を説明する。また、マウス APOBEC3 は、ヒトのレトロウイルスである HIV の Gag-Pol 前駆体のプロセッシング過程も阻害し、これには APOBEC3 分子の C-末端部分が有効であると考えられている。

しかしながら、マウス APOBEC3 が前駆体プロセッシングを如何にして阻害しているかという、具体的な分子機構は未解明のままである。

2. 研究の目的

構造的には APOBEC ファミリーに属する蛋白質は、三種類の Z ドメイン (Z1, Z2, Z3) の組み合わせで構成されており、マウス APOBEC3 (mA3) はアミノ末端側 Z2 ドメイン (nZ) とカルボキシ末端側 Z3 ドメイン (cZ) とからなる。本研究では、cZ ドメインに着目し、まずその大量発現系と精製方法の確立をめざした。得られた試料を用いて、X 線結晶解析のための結晶化実験を行うとともに、マウス白血病ウイルスのプロテアーゼとの溶液中での相互作用を定量的に測定することを目指した。

これまで提唱されてきた APOBEC3 分子のウイルス抑制機構とは全く異なる分子機構を対象とし、その詳細を明らかにすることは、哺乳類の抗ウイルス機構の研究にとって、新しくかつ重要な知見を与えるものと思われ、生物学的に興味深く、また、全く新しい機序の抗レトロウイルス薬の基盤となる可能性がある。Vif による阻害を受けないマウス APOBEC3 の HIV 複製抑制機構の構造活性相関を解明することにより、ヒト細胞自体の正常構成成分である APOBEC3G への Vif 耐性の導入につながる知見を得ることができる可能性もある。

3. 研究の方法

cZ ドメインを遺伝子組み換えにより大腸菌に発現させ、その後アフィニティ、イオン交換、ゲルろ過等、複数の液体クロマトグラフィーを用いて精製した。調整された試料の品質や量は、SDS-PAGE、動的光散乱 (DLS)、紫外吸光度などで確認した。

得られた試料をもとに蒸気拡散法による結晶化実験を行った。得られた結晶 (様物質) は、放射光施設や研究室の解説装置により評価した。

一方、マウス白血病ウイルス (MLV) 由来のプロテアーゼは、既に研究室で確立されていた大腸菌を用いた系で発現し、同様に精製・評価した。プロテアーゼと cZ ドメインの相互作用は、表面プラズモン共鳴分光法で解析した。

なお、上述したように、マウスには HIV に対して感受性を示す系統と、抵抗性を示す系統があ

り、それらの cZ ドメインの配列も若干異なるため、両者の代表例として B6 と BALB/c 由来の二種類 mA3 の cZ ドメインについて、発現・精製と各種実験を行った。一方、ウイルスプロテアーゼについても、その活性が相互作用測定に悪影響を及ぼす可能性を考慮して、プロテアーゼ活性を失活させた変異体の試料も調製した。

4. 研究成果

cZ ドメインの大腸菌による発現は、当初可溶性に大きな問題があり、発現された cZ ドメインのほぼすべてが不溶性画分にあった。発現温度や誘導条件など種々の発現条件を検討した結果、可溶性画分にある程度 cZ ドメインが発現される条件を見出した。その後、His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、さらにイオン交換クロマトグラフィーにより高純度の cZ ドメインを得ることができた。

精製された cZ ドメインは比較的良好な可溶性を持ち、10mg/mL 程度の高濃度に濃縮することができた。溶液中での性状を調べるために、動的光散乱 (DLS) による粒子径とその分布の測定を行った (下図)。その結果、試料は単分散 (mono-disperse) 状態であり、結晶化実験などにも十分利用できるものであることが確かめられた。さらに粒子径から推定された分子量が 60kDa となり、cZ ドメインの分子量 (約 20kDa) の 3 倍であることから、cZ ドメインは溶液中で 3 量体を形成している可能性が示唆された。以前、我々は nZ ドメインが溶液中で 2 量体を形成していることを示唆するデータを得ており、全長の mA3 が溶液中で多量体化していること、さらに多量体であることが機能的に意味をもつことなどの可能性も考えられる。

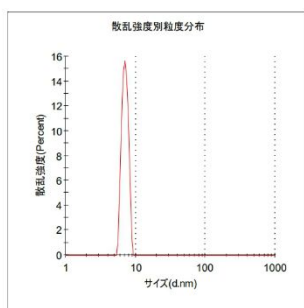


図 cZ ドメインの動的光散乱の結果

以上のようにして得られた試料をもとに結晶化実験を開始した。種々のスクリーニングキットを用いて、結晶化条件の探索を行ったが、解析に十分な質の結晶は得られていない。マウス APOBEC3 の結晶構造はいまだに報告がなく、本研究で得られた試料を用いて今後も結晶化条件の検討を続ける予定である。

cZ ドメインとウイルスプロテアーゼの相互作用を溶液中で直接観察するために、表面プラズモン共鳴分光法による測定を行った。cZ ドメインをアミンカップリング法でセンサーチップに固定し、GST 融合蛋白質として精製したウイルスプロテアーゼをアナライトとして測定を行った。その結果、野生型および変異体いずれのウイルスプロテアーゼにおいても、cZ ドメインとの間に直接の相互作用は検出されなかった。

我々は以前に、アミノ末端側 Z ドメインがウイルスプロテアーゼと弱く相互作用していることを見出しており、今回の結果と総合するとウイルスプロテアーゼとマウス APOBEC3 の十分な相互作用にはその二つの Z ドメイン両方が必要であることが示唆される結果となった。

なお、すべての実験において、ウイルス感受性系統由来の cZ ドメインと抵抗性系統由来の cZ ドメインに大きな差異は見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------