

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：83904

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14685

研究課題名(和文) ヒトプロテインアレイを用いた新規抗HIV宿主防御因子の網羅的な探索と解析

研究課題名(英文) Biochemical and functional analysis of anti-HIV host factor

研究代表者

松岡 和弘 (Matsuoka, Kazuhiro)

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・研究員(移行)

研究者番号：60617140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)がコードするVifタンパク質は、宿主のE3ユビキチンリガーゼであるCUL5複合体をハイジャックして、細胞防御因子であるAPOBEC3ファミリー(A3)をユビキチン・プロテアソーム系により分解誘導する。本研究では、Vifを介したA3のユビキチン化の分子機序や基質タンパク質を認識するしくみを理解するために、Vif依存的なA3の*in vitro*ユビキチン化再構成系を構築した。そして、1) Vifを介したA3のユビキチン化にはARIH2が重要な役割を果たすこと、2) A3の分解におけるVifのC末端領域の役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、Vif複合体を介したAPOBEC3の*in vitro*ユビキチン化再構成系が確立できた。さらに、ARIH2は、高効率なAPOBEC3のモノユビキチン化に関与することが本研究結果により明らかになってきたので、ヒトプロテインアレイを利用した基質探索が行える基盤技術が構築できた。また、高度に保存された領域を含むVifのC末端領域の役割は不明であったが、本研究結果により、APOBEC3GおよびAPOBEC3Hの分解にはVifの『PPLPモチーフ領域』が必要であることが明らかになった。本研究結果は、Vifを標的とした治療薬開発においても重要な知見につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The HIV-1 Vif is an accessory protein, that antagonizes the antiviral effects of host restriction factor APOBEC3 proteins for viral replication in its corresponding host. Vif hijacks the cellular CUL5 complex to form a virus-specific E3 ubiquitin ligase complex that targets APOBEC3 proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. In this study, we are successful to develop *in vitro* reconstituted ubiquitination assay for functional analysis of Vif-mediated ubiquitination of APOBEC3. We clarified the molecular mechanisms for efficient and specific antagonism of APOBEC3 through HIV-1 Vif-mediated ubiquitination machinery.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：ウイルス HIV ARIH2 ユビキチン化 宿主防御因子 Vif APOBEC3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

宿主細胞は、ウイルス感染に対して防御的に働く『宿主防御因子』を有している。逆に、ウイルスは自身のタンパク質を用いて、それら宿主防御因子の働きを回避する機構を保有し、対抗していると考えられている。HIV が持つアクセサリタンパク質は、宿主の Cullin RING 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体 (CUL 複合体) をハイジャックして、ウイルス感染に対して防御的に働く『宿主防御因子』をユビキチン・プロテアソーム系による分解を誘導することで、ウイルスの増殖や生存に有利な細胞環境を構築している。しかし、研究が進んでいるアクセサリタンパク質の一つである Vif でさえ既知の APOBEC3 ファミリー (A3) 以外の Vif 依存的にユビキチン化される宿主タンパク質の全容は未解明なままである。そこで申請者は、プロテインアレイを用いたユビキチン化タンパク質解析法の基盤技術を構築し、Vif 依存的にユビキチン化されるタンパク質の同定・解析を行い、Vif を介した HIV 感染機構の分子基盤を明らかにすることを最終目標として一連の研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Vif 依存的なユビキチン化タンパク質の解析を行うことができる *in vitro* ユビキチン化再構成系の構築を行い、Vif を介した HIV 感染機構の分子基盤を明らかにすることである。具体的には、Vif 依存的な A3 の *in vitro* ユビキチン化再構成系を利用して、Vif を介した A3 のユビキチン化の分子機序や基質タンパク質の認識機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Vif 複合体とユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、CUL5 複合体の発現・精製および *in vitro* ユビキチン化再構成系の構築

Vif 複合体 (Vif/CBF- $\beta$ /ELOB/ELOC の 4 者複合体) の発現・精製の基本スキームは、4 者複合体を大腸菌で共発現させたタンパク質試料を抽出・回収し、液体クロマトグラフィーシステムにより精製した。精製には、アフィニティーカラム、ゲルろ過カラム (Superdex 200 および Superdex 75)、陽イオン交換カラム (HiTrap Q HP) を用いた。E1, E2, CUL5 複合体の発現・精製も大腸菌で発現させたタンパク質試料を抽出・回収し、液体クロマトグラフィーシステムにより精製した。精製には、アフィニティーカラム、ゲルろ過カラム (Superdex 75 または Superdex 200) を使用した。*in vitro* ユビキチン化再構成系は、CUL5 複合体、Vif 複合体、各 A3 タンパク質、ユビキチン、E1 (UBA1)、E2 (UBCH3) を混合して、*in vitro* ユビキチン化の至適化を行った。

(2) ARIH2 の発現・精製および ARIH2 を介した Vif 依存的な A3 のユビキチン化

ARIH2 の発現・精製は、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させたタンパク質試料を抽出・回収し、液体クロマトグラフィーシステムにより精製した。精製には、アフィニティーカラム、Thrombin による切断、ゲルろ過カラム (Superdex 200 および Superdex 75) を用いた。E2 (UBCH3、UBCH7) から A3 へのユビキチン転移の詳細を解析するために、N-Terminal Fluorescein Ubiquitin と N-Terminal Rhodamine Ubiquitin を *in vitro* ユビキチン化再構成系に使用し、A3 のユビキチン化を Typhoon7400 で検出した。

(3) HIV-1 感染における HIV-1 Vif PPLP モチーフ領域の機能的な役割

Vif の C 末端欠損変異を哺乳細胞発現プラスミドおよび HIV-1 実験室分子クローン (pNL4-3) に導入した。Vif の機能解析では、Vif および A3 発現プラスミドを HEK293T 細胞に共発現し、Vif 依存的な A3 タンパク質の分解を解析した。ウイルス感染価は、TZM-bl 細胞により測定した。Vif 複合体の特性については、大腸菌発現系から共発現・精製した組換えタンパク質を用いて、複合体の特性についてサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200 Increase) と *in vitro* ユビキチン化再構成系を用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) Vif 依存的な A3 の *in vitro* ユビキチン化再構成系の確立

Vif/CBF-β/ELOB/ELOC 複合体は、大腸菌発現系で 4 者複合体として共発現を行い、粗精製・イオン交換/ゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで、これまで技術的に困難であった高純度の Vif 複合体の精製に成功した。さらに、精製した CUL5 複合体、E1、E2、Vif 複合体および A3G、cpzA3H を混合し至適化させた *in vitro* 再構成系を用いることで Vif 依存的な A3G、cpzA3H のユビキチン化を検出することができた。

### (2) Vif 依存的な A3 のユビキチン化における ARIH2 の役割

近年、新しい E3 ユビキチンリガーゼである ARIH ファミリーが CUL 複合体ベースのユビキチン化を促進することが報告された (Scott *et. al Cell* 2016)。そこで、Vif 依存的な A3 のユビキチン化に ARIH2 が関与するかどうかについて、*in vitro* ユビキチン化再構成系で検証を行った。その結果、ARIH2 は Vif-CUL5 複合体と協調的に働くことで、効率的な A3G、cpzA3H、A3C、A3F CTD のモノユビキチン化に関与することが明らかにした。さらに、A3G、cpzA3H、A3C、A3F CTD のポリユビキチン化には、ARIH2/UBCH7 を介したモノユビキチン化と UBCH3 を介したユビキチン鎖の伸長が重要な役割を果たすことが明らかになった (図 1)。以上のことから、Vif 依存的なユビキチン化の解析を行うことができる *in vitro* ユビキチン化再構成系の確立に成功し、ヒトプロテインアレイを利用した基質探索が行える基盤技術を構築することができた。

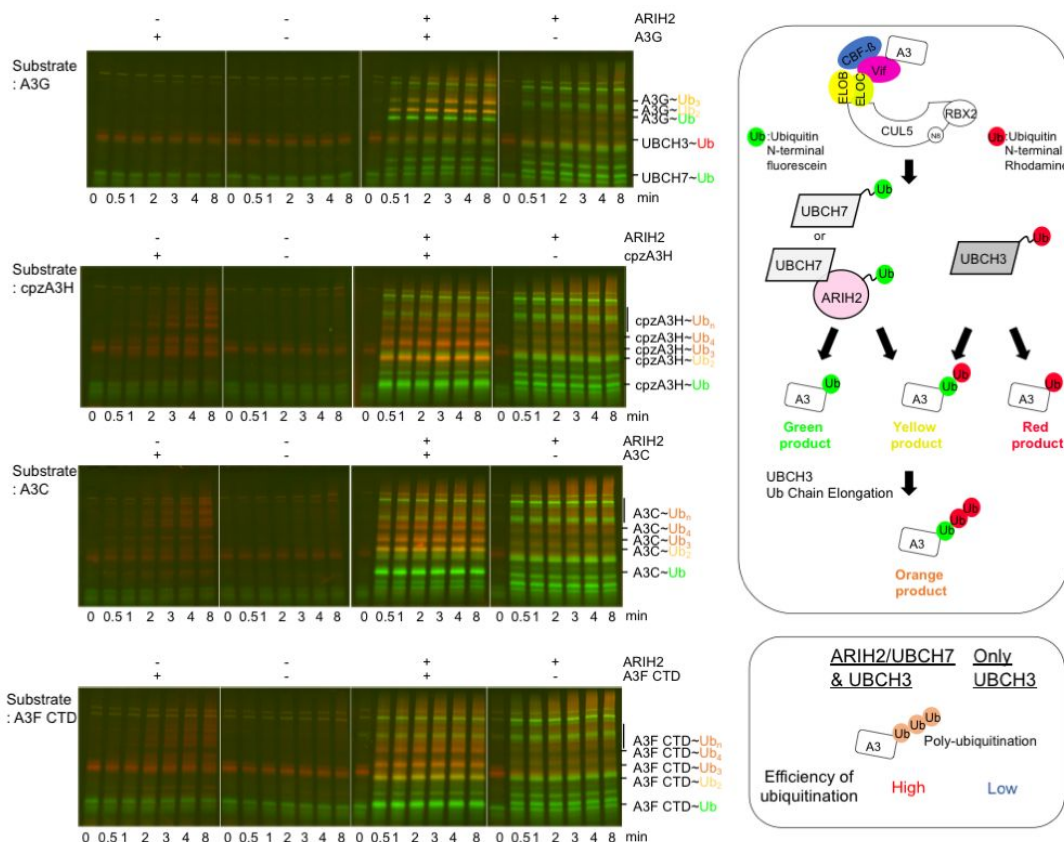


図1 ARIH2はVif依存的なA3のユビキチン化を促進する

### (3) HIV-1 感染における HIV-1 Vif PPLP モチーフ領域の機能的な役割

Vif の N 末端領域が A3 結合において重要な役割を担うことが知られている。一方で、高度に保存された領域を含む C 末端領域の役割は不明である。Vif の一連の C 末端欠損変異体を用いた A3 の中和機能解析では、A3G および cpzA3H の分解には Vif の『PPLP モチーフ領域』が必

要であることが明らかになった。また、A3G 発現細胞から産生される Vif 完全欠失型 HIV-1 の感染価は、野生型 HIV-1 に比べて大きく低下したが、Vif の『PPLP モチーフ領域』までコードする HIV-1<sub>1-171</sub> の感染価はわずかな影響を受けるのみであった。そして、*in vitro* ユビキチン化再構成系を用いて Vif 依存的な A3 のユビキチン化について解析を行った結果、Vif<sub>wt</sub> および『PPLP モチーフ領域』を含む Vif<sub>1-171</sub> 複合体は A3 タンパク質の Vif 依存的なポリユビキチン化を検出できた。これに対して、『PPLP モチーフ領域』を含まない Vif<sub>1-169</sub> 複合体は A3 をユビキチン化できなかつた。さらに、Vif 複合体の特性に関してサイズ排除クロマトグラフィー解析を行なった結果、Vif<sub>wt</sub> および『PPLP モチーフ領域』を含む Vif<sub>1-171</sub> 複合体は、単分子の複合体として可溶性画分で溶出された (Vif<sub>WT</sub> 複合体 : 72.4kDa、Vif<sub>1-171</sub> 複合体 : 70.0kDa)。一方で、『PPLP モチーフ領域』を含まない Vif<sub>1-169</sub> 複合体は凝集分画で溶出され、単分子の複合体ではなかつた。これらの結果から、Vif の PPLP モチーフ領域が、A3 タンパク質のポリユビキチン化による分解と安定的な Vif 複合体形成を維持する上で重要な役割を果たすと考えられた。本研究から得られた Vif の PPLP モチーフ領域の知見は、Vif を標的とした新たな治療戦略の創製につながる学術的な研究基盤につながることを期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shiroishi-Wakatsuki Tomomi, Maejima-Kitagawa Masami, Hamano Akiko, Murata Daigo, Sukegawa Sayaka, Matsuoka Kazuhiro, Ode Hiroataka, Hachiya Atsuko, Imahashi Mayumi, Yokomaku Yoshiyuki, Nomura Nobuhiko, Sugiura Wataru, Iwatani Yasumasa	4. 巻 162
2. 論文標題 Discovery of 4-oxoquinolines, a new chemical class of anti-HIV-1 compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 101 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2018.12.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka Tatsuya, Nagae Takayuki, Ode Hiroataka, Awazu Hiroaki, Kurosawa Teppei, Hamano Akiko, Matsuoka Kazuhiro, Hachiya Atsuko, Imahashi Mayumi, Yokomaku Yoshiyuki, Watanabe Nobuhisa, Iwatani Yasumasa	4. 巻 46
2. 論文標題 Structural basis of chimpanzee APOBEC3H dimerization stabilized by double-stranded RNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 10368 ~ 10379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1093/nar/gky676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto Hirokazu, Takeo Satoru, Takashima Eizo, Miura Kazutoyo, Kanoi Bernard N., Kaneko Takamasa, Han Eun-Taek, Tachibana Mayumi, Matsuoka Kazuhiro, Sattabongkot Jetsumon, Udomsangpetch Rachanee, Ishino Tomoko, Tsuboi Takafumi	4. 巻 67
2. 論文標題 Identification of target proteins of clinical immunity to Plasmodium falciparum in a region of low malaria transmission	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 203 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2017.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tokunaga Naohito, Nozaki Mamoru, Tachibana Mayumi, Baba Minami, Matsuoka Kazuhiro, Tsuboi Takafumi, Torii Motomi, Ishino Tomoko	4. 巻 9
2. 論文標題 Expression and Localization Profiles of Rhoptry Proteins in Plasmodium berghei Sporozoites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2019.00316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Bantuchai Sirasate, Nozaki Mamoru, Thongkukiatkul Amporn, Lorsuwannarat Natcha, Tachibana Mayumi, Baba Minami, Matsuoka Kazuhiro, Tsuboi Takafumi, Torii Motomi, Ishino Tomoko	4. 巻 49
2. 論文標題 Rhoptry neck protein 11 has crucial roles during malaria parasite sporozoite invasion of salivary glands and hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal for Parasitology	6. 最初と最後の頁 725 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpara.2019.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kazuhiro Matsuoka, Hirotaka Ode, Akiko Hamano, Tatsuya Matsuoka, Sayaka Sukegawa, Atsuko Hachiya, Mayumi Imahashi, Yoshiyuki Yokomaku, and Yasumasa Iwatani
2. 発表標題 Biochemical characteristics of the HIV-1 Vif PPLP motif region
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡和弘、濱野章子、大出裕高、松岡達矢、助川明香、蜂谷敦子、今橋真弓、横幕能行、岩谷靖雅
2. 発表標題 HIV-1感染におけるHIV-1 Vif PPLPモチーフ領域の役割
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotaka Ode, Tatsuya Matsuoka, Takayuki Nagae, Akiko Hamano, Kazuhiro Matsuoka, Atsuko Hachiya, Mayumi Imahashi, Yoshiyuki Yokomaku, Nobuhisa Watanabe, Yasumasa Iwatani
2. 発表標題 Computational simulations to understand APOBEC3H interaction with double-stranded RNA
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡達矢、永江峰幸、大出裕高、濱野章子、松岡和弘、蜂谷敦子、今橋真弓、渡邊信久、岩谷靖雅
2. 発表標題 抗HIV因子APOBEC3Hタンパク質の構造解析
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuya Matsuoka, Takayuki Nagae, Hirotaka Ode, Akiko Hamano, Kazuhiro Matsuoka, Mayumi Imahashi, Atsuko Hachiya, Yoshiyuki Yokomaku, Nobuhisa Watanabe, Yasumasa Iwatani
2. 発表標題 STRUCTURAL INSIGHTS OF CHIMPANZEE APOBEC3H-RNA DUPLEX COMPLEX INTO VIF INTERACTION
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory -Annual Retrovirus- Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro Matsuoka, Akiko Hamano, Hirotaka Ode, Yoshihiro Nakata, Sayaka Sukegawa, Atsuko Hachiya, Mayumi Imahashi, Yoshiyuki Yokomaku, and Yasumasa Iwatani
2. 発表標題 HIV-1 VIF PPLP REGION PLAYS A CRITICAL ROLE IN THE VIF-MEDIATED APOBEC3 UBIQUITINATION/DEGRADATION
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory -Annual Retrovirus- Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Matsuoka, Hirotaka Ode, Yoshihiro Nakata, Atsuko Hachiya, Mayumi Imahashi, Yoshiyuki Yokomaku, and Yasumasa Iwatani
2. 発表標題 Biochemical characteristics of ARIH2 in HIV-1 Vif mediated APOBEC3-ubiquitination
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡和弘、中田佳宏、鷲崎彩夏、芳田剛、齊藤暁、関洋平、大出裕高、蜂谷敦子、保富康宏、原田恵嘉、石井洋、俣野哲朗、三浦智行、佐藤賢文、明里宏文、岩谷靖雅
2. 発表標題 in vivo passageで獲得したサル馴化HIV-1のvif遺伝子領域における欠損変異の役割
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡和弘、平野淳、中田佳宏、大出裕高、蜂谷敦子、今橋真弓、中井正彦、横幕能行、岩谷靖雅
2. 発表標題 HPLC/蛍光検出機を用いた第二世代インテグラーゼ阻害剤の血中濃度の測定法の開発
3. 学会等名 第73回国立病院総合医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaaki Nakashima, Hirotaka Ode, Akiko Hamano, Yoshihiro Nakata, Kazuhiro Matsuoka, Sayaka Sukegawa, Atsuko Hachiya, Mayumi Imahashi, Nobuhisa Watanabe, Yoshiyuki Yokomaku, Yasumasa Iwatani
2. 発表標題 Comparative analyses of primate antiviral APOBEC3C
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory -Annual Retrovirus- Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasumasa Iwatani, Kazuhiro Matsuoka, Akiko Hamano, Hirotaka Ode, Yoshihiro Nakata, Sayaka Sukegawa, Atsuko Hachiya, Mayumi Imahashi, and Yoshiyuki Yokomaku
2. 発表標題 HIV-1 VIF PPLP REGION PLAYS A CRITICAL ROLE IN THE VIF-MEDIATED APOBEC3 UBIQUITINATION/DEGRADATION
3. 学会等名 American Society for Virology (ASV) 38th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Hiroataka Ode, Yoshihiro Nakata, Kazuhiro Matsuoka, Mayumi Imahashi, Atsuko Hachiya, Yoshiyuki Yokomaku, Yasumasa Iwatani
2. 発表標題 Structural Interference of Polymorphic R105G in Antiviral APOBEC3H
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大出裕高、中田佳宏、松岡和弘、今橋真弓、蜂谷敦子、横幕能行、岩谷靖雅
2. 発表標題 抗HIV-1因子APOBEC3Hにおける多型変異R105Gの分子構造への影響
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部 <a href="https://www.nnh.go.jp/crc/departments/infectious_diseases/">https://www.nnh.go.jp/crc/departments/infectious_diseases/</a>
--

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