

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770094

研究課題名（和文） 抗レトロウイルス作用のあるデアミナーゼの構造基盤

研究課題名（英文） Structural basis of antiviral deaminases

研究代表者

須藤 恭子 (SUTO KYOKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・研究員

研究者番号：90415696

研究成果の概要（和文）：ヒト由来 APOBEC3G、HIV-1 由来 Vif の各々について、タンパク質のタグを付けて、大腸菌で発現させた。この APOBEC3G は、細胞培養由来の同酵素と変わらないデアミネーション活性を示した。Vif は、*in vitro* の活性測定において、APOBEC3G の活性を、濃度依存的に阻害した。それぞれ結晶化条件のスクリーニングを行ったが、結晶は得られなかった。いずれも、結合に特異的な RNA および DNA の認識配列は見つからなかった。

研究成果の概要（英文）：Protein-tagged human APOBEC3G and HIV-1 Vif were prepared using an expression system of *E. coli*. The APOBEC3G had deamination activity and the Vif inhibited it in a dose-dependent manner *in vitro*. The proteins were purified and used for crystallization screening.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

代表的なレトロウイルスであるヒト免疫不全ウイルス-1 (HIV-1) において、Vif 欠損株 (HIV-1 ΔVif) は、(野生型 HIV-1 なら感染できる) 宿主細胞の数種に対しては感染能力が失われる一方、別の系統の細胞に対しては野生型同様の感染・増殖能力を維持することが知

られていた。この 2 系統の細胞の細胞融合させたものには、HIV-1 ΔVif は感染することができず、前者の細胞から抗ウイルス性を示す因子として、APOBEC3G が同定された。また、HIV-1 のゲノム RNA には G A の変異が多いことも知られていた。これは、細胞への感染時にゲノム RNA から逆転写された

cDNA に APOBEC3G が C U の置換を行うことによって、変異がプロウイルスに持ち込まれ、増殖の際に転写された最終的なゲノム RNA にも G A の変異が保存されたものであることがわかってきた。変異箇所によっては増殖に致命的なエラーとなり、次の細胞への感染ができなくなる、という仮説である。HIV-1 が Vif を持つ場合、Vif は APOBEC3G やユビキチンリガーゼ複合体と相互作用して、APOBEC3G のユビキチン化を促進し、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解、無効化する。また、ユビキチン-プロテアソーム系とは独立に、Vif がデアミナーゼ活性を阻害するという報告もある。

APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide) ファミリーは、このシチジンデアミナーゼをモチーフとして持つ、哺乳類に特徴的なタンパク質である。シチジンデアミナーゼは、シチジンをウリジンに変換する基本的な核酸代謝酵素として、広く生物に存在しているが、APOBEC の場合には単体のシチジンではなくポリ核酸中のシトシン残基をウラシルへと変換するため、結果的に DNA もしくは RNA に変異を導入する点がユニークである。APOBEC ファミリー

図1 APOBEC ファミリータンパク質のドメイン構造



の名前は APOBEC1 が apolipoprotein B の mRNA の特定の位置にストップコドンを導入し、翻訳後のアイソフォームを生じさせることに由来するが、APOBEC ファミリーが近年大きな注目を集めることになったのは、生体防御機構へ貢献が取り上げられるようになったことによる。APOBEC ファミリーは、AID、APOBEC1、2、3A-H、4 の 5 つに分類され(図1) た例えば、AID は B 細胞の抗体の体細胞超変異を起こして、抗体の多様性を持たせることに重要な役割を果たしている。また、本研究で注目する APOBEC3G は、前述のレトロウイルスに対する防御機構のほか、レトロトランスポゾンの抑制機構への関与が指摘されている。

## 2. 研究の目的

APOBEC3G は、それぞれシチジンデアミナーゼモチーフを含む、2つのドメインで構成されると予想されている。いずれもシチジンデアミナーゼとしての活性残基は保存されているにも関わらず、デアミナーゼ活性は C 末ドメインにしか見られない。一方、デアミナーゼ活性が、抗ウイルス作用の中心であると考えられているにも関わらず、ウイルス増殖阻害アッセイにおいては、N 末ドメインの有無が重要であることが確認されており、この矛盾は大きな謎となっている。また、Vif による影響の少ないホモログ、APOBEC3F とのアミノ酸配列の比較から、D128 が Vif の結合領域に存在すると予測され、D128K 変異体のウイルス増殖阻害アッセイや Vif との結合アッセイなどにおいて、一定のポジティブな結果を得ている。しかし一方で、Vif は APOBEC3G の(すなわち C 末ドメインの)デアミナーゼ活性を直接阻害するという報告もあり、D128 は N 末ドメインに有ることから考えると、200 アミノ酸残基に満たない Vif がどのような相互作用をしているのか、興味深い。本研究では、抗ウイルス活性を持つ APOBEC3G の結晶構造解析を行い、N 末ドメインの活性中心(相当)部位と C 末ドメインの活性部位の差を解明する。加えて、Vif による APOBEC3G の認識方法、デアミナーゼ活性に対する直接的阻害の有無に対して考察し、さらに生化学的手法によりその裏づけをとることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト APOBEC3G の X 線結晶構造解析とその結果に基づく生化学的実験を行う。そのために APOBEC3G の大腸菌を使用した効率の良い発現系の構築、精製、結晶化条件のスクリーニング、構造解析を行う。同様に HIV-1 由来 Vif についても、発現系の構築、精製、結晶化のスクリーニング、構造解析を行う。また、APOBEC3G と Vif の RNA に対する親和性に、配列特異性があるか、SELEX 法を用いて試験する。

## 4. 研究成果

N 末端にタンパク質の tag をつけた APOBEC3G を作製し、in vitro でのデアミナーゼ活性を測定したところ、十分な活性が確認された。それまでの文献では、大腸菌での発現系で調製した APOBEC3G では、デアミナーゼ活性が無いとされていたが、NIH AIDS Reserch & Reference Reagent Program から取り寄せた、培養細胞による発現・精製された APOBEC3G と比べて、活性に差は見られな

かった。しかしながら、このコンストラクトを発現、精製、市販の結晶化キットを用いて結晶化のスクリーニングを試みても、結晶は得られなかった。このコンストラクトは精製中にも、アグリゲーションしやすい性質が見られ、ゲルする過では大分子量領域での溶出が観察されたので、こういった性質のために結晶化しにくいと想像された。過去の文献では「APOBEC3Gは、培養細胞によっては、アグリゲーションしやすいが、RNaseAの添加により解消し、特定のRNAの存在により集合する」という報告があったが、今回の実験では、RNaseAの添加によるモノマー化は確認できなかった。また、吸光度やゲルする過では顕著な核酸の混入も確認できなかった。

APOBEC3Gのデアミナーゼ活性を阻害すると報告されている、HIV-1由来のVifの発現系も後述のように作製したので、APOBEC3GとVifの複合体を作成することによる性質の改善を試みたが、VifをAPOBEC3Gに混ぜても、溶解度の改善やゲルする過での見かけの分子量の移動は見られなかった。

同様にタグのついた、APOBEC3GのN末端ドメインのみ、C末端ドメインのみの発現系を構築した。N末端ドメインのみの場合、アグリゲーションのしやすさに改善は見られなかった。C末端ドメインのみの場合、アグリゲーションは著しく改善したが、*in vitro*のデアミネーション活性の測定において、既に報告があったとおり、全く活性が見られなかった。

HIV-1由来Vifとマルトースバインディングプロテイン(MBP)との融合タンパク質の発現系を作製して、精製した。この融合タンパク質は、95%以上の純度まで精製できたが、結晶は得られなかった。

Vifは、プロテアソーム依存的にヒトAPOBEC3Gを分解するのみならず、大腸菌内での共発現の実験でも、(プロテアソーム非依存的に)ヒトAPOBEC3Gのデアミネーション活性を阻害することが知られている。本実験で得られたVifが後者の阻害活性をもつことを確認するため、放射線同位体を使用した*in vivo*でのAPOBEC3Gによるデアミネーション活性の測定を行った。その結果、このMBP-Vif融合タンパク質が濃度依存的に活性を阻害することを確認した。

このような阻害は、少なくとも大腸菌での測定系においては、VifとAPOBEC3Gの結合を反映していると報告されており、*in vivo*でこれを再現できたことにより、VifとAPOBEC3Gの結合を阻害する薬剤、すなわち抗ウィルス薬のスクリーニングに転用できる可能性を示している。そこで大量に得られるこれら組み換えAP

O B E C 3 Gと組み換えV i fを利用した、V i fの阻害活性の測定系を構築した。

また、V i fおよびA P O B E C 3 Gに特異的に結合するRNA配列を特定するため、S E L E X法による特定を試みた。16merのランダム配列を含むRNAを合成し、各タンパク質と複合体を作り、複合体に含まれるRNAを抽出した。このRNAからcDNAを作製し、PCRで増幅後、これを鋳型にRNAを転写した。この繰り返しを5サイクル行い、得られたcDNAの配列を読んだが、特異的と思われる配列は検出できなかった。認識されるRNA側に、長いRNAで構成される特定の構造が必要なためにランダム配列が16merでは短すぎるか、もしくは期待されていたような特異性が無いのかのいずれかであると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計1件)

名称: APOBEC3Gの活性測定方法

発明者: 野田尚宏、関口勇地、須藤恭子、宮田亮、谷英典、常田聡

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所、学校法人早稲田大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-254354

出願年月日: 2009年11月5日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

須藤 恭子 (SUTO KYOKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機  
能工学研究部門・研究員

研究者番号：90415696