

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 10 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590525

研究課題名（和文） 宿主防御因子 APOBEC3 の生化学的特性と抗レトロエレメント作用の機序の解明

研究課題名（英文） Determination of biochemical characteristics for the host-defense factors, APOBEC3, to reveal the mechanisms of anti-retroelement activities

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

研究成果の概要（和文）：

HIV などレトロウイルスの増殖を阻害する細胞防御因子 APOBEC3 ファミリー（ヒトでは7種ある）の抗ウイルス作用機序およびウイルスによる逃避機序を解明するために、研究を行った。その結果、7種の APOBEC3 の生化学的特性を決定し、作用機序の一端を明らかにした。さらに、HIV による APOBEC3 の分解メカニズム解明についても取り組み、分解における重要な部位（ユビキチン化部位）を見出した。本研究成果は、細胞がもつ防御因子 APOBEC3 の抗ウイルス作用メカニズムの理解とその応用（創薬など）につながる重要な情報であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The human APOBEC3 family (A, B, C, DE, F, G, and H) proteins are cellular defense factors that potently inhibit the replication of retroviruses, including HIV. In order to clarify the anti-viral mechanism, we determined the biochemical characteristics of the enzymes. Furthermore, we identified four ubiquitination sites of APOBEC3G that are critical for HIV Vif-mediated degradation. Our findings will provide important information to further understand the molecular mechanisms of Anti-viral activities as well as to develop attractive strategies utilizing potential endogenous inhibitors against HIV.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス・生体分子・酵素・蛋白質・生体防御因子

1. 研究開始当初の背景

APOBEC3G (A3G) が、Vif (HIV がコードする遺伝子産物) を欠損した HIV-1 の複製を阻害するという発見以来、欧米を中心に多くの研究がなされており、レトロウイルスの研究分野では最も注目されているトピックとして

競争が激しい。その理由は2つ。1) Vif と A3G の結合を阻害する新規なメカニズム（細胞が本来もつ A3G 宿主防御機構を保持するしくみ）をもつ抗 HIV 薬を開発することができる可能性が高いこと、2) RNA-editing 酵素であり Cytidine Deaminase でもある

APOBEC3 (A3)ファミリーに関する研究が当初全くなく、多くの研究者が生物学的な興味を抱いたことである。国内外を問わず、精力的な研究が行われているにも拘らず、細胞ベースの研究が先行しており、A3ファミリータンパクの生化学的および構造学的な研究がほとんど行われていないのが現状であった。そのため、分子レベルで抗レトロエレメント作用のメカニズムなどを解明するためにも、A3ファミリータンパクの生化学的かつ構造学的な研究は極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

HIV が属するレトロウイルスやレトロトランスポゾン（以下、まとめてレトロエレメント）の複製は、細胞内で発現している宿主防御因子 A3ファミリー（ヒトでは AとB、C、DE、F、G、H の7種ある）によって抑制される。本研究は、A3によるレトロエレメントの複製の抑制メカニズムとその特異性を決定する要因を解明することを目的とし、A3ファミリータンパクの生化学的特性および HIV-1 Vif による A3 タンパクの分解機構を明らかにする研究を行った。

3. 研究の方法

A3ファミリータンパクは、大腸菌の発現系では酵素活性をもつタンパクとして発現・精製することが非常に困難であることが知られている。バキュロウイルス発現系を用いて酵素活性をもつ A3 の発現を行わなければならない。そこで、A3G の発現・精製と同じバキュロウイルス発現系を用いて、A3A と B、C、DE、F、G、H タンパクを大量発現/精製を行った。

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。

タンパクの立体構造予測は、A3G CTD (PDB # 3IR2) と A2 (PDB #2NYT) を鋳型にホモロジーモデル構造を構築した。これらの情報を基に、Structure-guided mutagenesis を網羅的に行った。

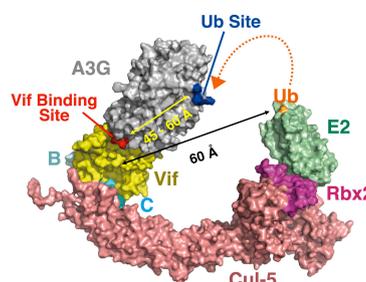
4. 研究成果

バキュロウイルス発現系を利用して7種の A3 タンパクを発現・精製した。これらの

生化学的特性について解析した。まず、酵素反応における基質特異性として、1) A3G と Aは、塩基配列 CCC を、それ以外は T(or C)TC をモチーフにし、2) 脱アミノ化される塩基は dC のみで、5位にメチル化された C は基質にならない、などが明らかになった。核酸結合は、7種共通して一本鎖核酸に特異性があるが、その結合力（解離定数）に大きな違いがあることが明らかになった。これらの得られた生化学的結果を基に考察すると、抗レトロエレメント効果は核酸結合能力と大きく関連していることが示唆された。

さらに、A3 の Vif による分解機構に関する研究については、「HIV-1 がウイルスタンパク Vif を介して、どのような仕組みで A3G の生体防御機構を解除するのか？」という答えの一端を、構造生物学的な解析によって明らかにした。Vif タンパクが A3G に結合すると、ある構造学的な制約下で、一定の領域にユビキチン分子が付加される。そのため、A3G が細胞内からユビキチン・プロテアソーム系を介して分解・除去されてしまうことを見出した。さらに、Vif に結合するが、ユビキチン化されない人工的な A3G 変異体 (Super A3G) が、野生型の HIV-1 に対し強い感染抑制効果を示すことを見出した。A3G の Vif 依存的なユビキチン化部位は、ユビキチン化複合体における構造学的配位 (図) に規

Spatial Constraints Imposed By The E3 Ligase Complex May Be An Important Determinant In Vif-Dependent A3G Ubiquitination



Iwatani et al. PNAS (2009). 106. 19539-

定されることが考えられた。これらの成果は、他の A3 タンパクの抗レトロエレメント作用解除機構の解明に向けて重要な基礎的データを見出したと考えられる。細胞内において Vif と A3G の同時発現は、ユビキチン化・プロテアソーム分解系によって即座に分解されてしまうため、細胞内における Vif と A3G の結合の詳細な解析は困難であった。しかし、今回我々が見出した Super A3G を用いれば細胞内における Vif-A3G の結合様式が解析できるだけでなく、結合を阻害する化合物の探索にも応用できる。今後、これらの成果を、新規の抗 HIV 薬剤開発などにつなげていきたいと考えている

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 10 件)

- ① Kitamura, S., Ode, H., and Iwatani, Y. Structural features of antiviral APOBEC3 proteins are linked to their functional activities. *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 2, 2011, 258, DOI: 10.3389/fmicb.2011.00258
- ② Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W, Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 査読有, 49, 2011, 1017-1024, DOI: 10.1128/JCM.02149-10
- ③ Li, J., Hakata, Y., Takeda, E., Liu, Q., Iwatani, Y., Kozak, CA., and Miyazawa, M. Two genetic determinants acquired late in Mus evolution regulate the inclusion of exon5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathogens*, 査読有, 8, 2011, e1002478, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002478
- ④ 徳永 研三、足立 昭夫、高折 晃史、中山 英美、岩部 幸枝、岩谷 靖雅. HIV-1 感染阻害因子. *日本エイズ学会誌*, 査読無, 13, 2011, 56-62
- ⑤ 岩谷靖雅. 宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序. *ウイルス*, 査読無, 61, 2011, 61-72, DOI: 10.2222/jsv.61.67
- ⑥ Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J. AIDS*, 査読有, 54, 2010, 241-247, DOI: 10.1097/QAI.0b013e3181dc98c1
- ⑦ Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res.*, 査読有, 90, 2010, 33-41, DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.02.004
- ⑧ 松下修三、横山勝、宮内浩典、松田善衛、俣野哲朗、岩谷靖雅. HIV 細胞進入とそ

の防御機序. *日本エイズ学会誌*, 査読無, 12, 2010, 67-73
http://jaids.umin.ac.jp/journal/journal_voll12_no02_j.html

- ⑨ Iwatani Y., Chan D. S. B., Liu L., Yoshii H., Shibata J., Yamamoto N., Levin J. G., Gronenborn A. M., and Sugiura W.: HIV-1 Vif-mediated ubiquitination / degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 106, 2009, 19539-19544, DOI: 10.1073/pnas.0906652106
- ⑩ 岩谷靖雅. 宿主防御因子 APOBEC3G の抗 HIV 作用メカニズムに関する研究. *日本エイズ学会誌*, 査読無, 11, 2009, 218-222
http://jaids.umin.ac.jp/journal/journal_voll11_no03_j.html

[学会発表] (計 35 件)

- ① Iwatani Y, Constitutive JAK-Stat activation is correlated to spontaneous APOBEC3G expression, which determines permissive phenotype against vif-deficient HIV-1 replication in T-cell lines, 19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2012 年 3 月, Seattle, WA. USA
- ② Iwatani Y, HIV-1 NC Facilitates Formation of Efficient Initiation Complex for Reverse Transcription, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011 年 9 月, Sapporo, Japan
- ③ Kitamura S (Iwatani Y), Identification of Critical Residues in APOBEC3C/F for HIV-1 Vif-mediated degradation, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011 年 9 月, Sapporo, Japan
- ④ 岩谷靖雅, HIV-1 NC は逆転写開始反応を促進する。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年 11 月、東京
- ⑤ 北村紳悟 (岩谷靖雅)、HIV-1 Vif 感受性に関する APOBEC3C/F のアミノ酸残基の同定、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年 11 月、東京
- ⑥ 北村紳悟 (岩谷靖雅)、Structure-Guided Mutagenesis を用いた HIV-1 Vif 感受性に関する APOBEC3C/F のアミノ酸残基の同定、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜

- ⑦ Iwatani Y, Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination / degradation near the C-terminal end. The 5th JAPAN-GERMANY HIV/AIDS Symposium, 2010 年 5 月, Tokyo, Japan
- ⑧ Iwatani Y, Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination / degradation, Cold Spring Harbor Laboratory 2010 Annual Meeting on Retroviruses, 2010 年 5 月, New York, NY. USA
- ⑨ Yoshii H (Iwatani Y), Constitutive activation of Stat1 causes spontaneous APOBEC3G expression, which determines permissive phenotype against *vif*-deficient HIV-1 replication in T-cell lines, Cold Spring Harbor Laboratory 2010 Annual Meeting on Retroviruses, 2010 年 5 月, New York, NY. USA
- ⑩ 岩谷靖雅、HIV-1 Vif 感受性及びウイルス粒子への取り込みに関する APOBEC3C の機能ドメインの探索、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、2010 年 11 月、東京
- ⑪ 吉居廣朗 (岩谷靖雅)、抗 HIV 宿主因子 APOBEC3 ファミリーの細胞依存的な発現調節機構の解明、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、2010 年 11 月、東京
- ⑫ 岩谷靖雅、宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月、徳島
- ⑬ 吉居廣朗 (岩谷靖雅)、リンパ球由来細胞株における *vif* 欠損 HIV に対する異なる感受性は Stat1 活性化状態に相関する、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月、徳島
- ⑭ 北村紳悟 (岩谷靖雅)、APOBEC3C における HIV-1 Vif に対する感受性を決定する領域の探索、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月、徳島
- ⑮ Iwatani Y, Structure-Guided Mutagenesis of APOBEC3G Reveals Critical Lysine Residues for HIV-1 Vif-Mediated Ubiquitination / Degradation, 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2010 年 2 月, San Francisco, CA. USA
- ⑯ 岩谷靖雅、Vif 依存的な APOBEC3G のユビキチン化部位と抗ウイルス作用、第

23 回日本エイズ学会学術集会・総会、2009 年 11 月、愛知

- ⑰ 岩谷靖雅、APOBEC3G のユビキチン化部位と抗レトロウイルス作用、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京

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