

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590568

研究課題名(和文)APOBEC3によるレトロウイルス感染制御の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Study on molecular and structural basis of anti-retroviral activity by APOBEC3

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・その他

研究者番号：90303403

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文):APOBEC3ファミリーは、HIVやレトロトランスポゾンを含むレトロウイルスに対して強い増殖抑制効果を示す細胞内防御因子である。一方、HIVなどはVifを発現することにより、APOBEC3を分解し増殖する。本研究では、1)一本鎖核酸に対する高い親和性(解離定数)と相関する多量体形成能の有無が重要な役割を果たしていることを見出した。2)VifによるAPOBEC3C/F/Dの認識領域は、疎水性を示す浅いくぼみ構造と辺縁の負電荷領域が重要な特徴であることが分かった。これらの研究成果は、APOBEC3の抗ウイルス作用の分子メカニズムに関する新たな知見につながると考えられる。

研究成果の概要(英文):Human APOBEC3 family proteins are powerful cellular defense factors that potently inhibit replication of retroviruses, including HIV and retrotransposons. However, some retroviruses such as HIV replicate by expressing Vif protein, which specifically eliminates the APOBEC3s' antiviral functions. In this research project, we obtained two major findings: 1) the antiviral molecular mechanisms are fundamentally linked to their homo-oligomerization capacity, which is directly correlated with affinity (dissociation constants) to single-stranded nucleic acids; 2) the Vif-binding conformations on APOBEC3C/F/D are characterized as shallow hydrophobic cavities surrounded with negatively-charged area. These data provide important and novel information to further understand the molecular mechanisms of APOBEC3s' antiviral functions.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ウイルス 生体分子 酵素 タンパク質 生体防御因子

1. 研究開始当初の背景

宿主防御因子 APOBEC3 (以下、A3) ファミリー (ヒトでは、A、B、C、D、F、G、H の 7 種) は細胞内に発現するシチジンデアミナーゼである。レトロウイルスの複製を強力に抑制し、7 種は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。一方、HIV のようなレンチウイルスは Vif を発現し、A3 を分解することにより抗ウイルス機能を消失させる。これまで、我々は、A3 には特徴ある核酸結合能があり、これが抗ウイルス作用機序の一助であることを明らかにしてきた。さらに、酵素活性をもつ A3 ファミリータンパク質の精製に初めて成功した経験があり、A3 分子上の Vif 結合領域を決定するために構造学的アプローチが可能である。しかし、未だ、抗ウイルス作用機序の全容は明らかになっておらず、A3 の酵素活性と核酸結合能だけでは説明できない事象が多々あり、全容解明が必要であった。さらに、Vif による不活化機序については、Cullin5 をベースとしたポリユビキチン化プロテアソーム分解系を介する機序であることが分かっていたが、ひとつの Vif タンパク質がどのように特異的に A3 ファミリータンパク質を分解するのかその分子機序は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

A3 によるウイルス複製の抑制機序とその特異性を決定する新たな要因を見出すこと、さらに、Vif が特異的に分解する要因とその機序などを解明することを目的とし、本研究課題に取り組んだ。

3. 研究の方法

特に、繰り返しドメイン構造を有する A3 は、大腸菌を用いた発現系では酵素活性を有するタンパク質として発現・精製が困難なため、バキュロウイルス発現システムを利用した。野生型 A3 (7 種)、および酵素活性欠損型 (酵素活性中心 Glu の Gln への置換型) タンパク (17 種)、さらに、多量体形成能欠損型 A3G (F126A/W127A 変異型) タンパクを作製した。構造解析のための単ドメイン型 A3C は大腸菌を用いて、発現・精製を行った。酵素活性 (シチジンデアミナーゼ活性) と基質特異性については、ウラシル DNA グリコシダーゼ/アルカリ分解法を用いた。多量体形成能に関する解析では、動的光散乱法による分子径・分子量測定方法を、補助的に、ゲル濾過による分子量推定法を用いた。多量体形成によって核酸への結合特性 (結合の強さと速度) がどのように変化するのかについて、一分子の核酸を用いた結合解析技術 (Single Molecule DNA Stretching 法) (米国の共同研究先に依頼) により調べた。

4. 研究成果

まず、生化学的な解析により、A3 ファミリーの一本鎖核酸に対する高い親和性 (解離定数) は A3 タンパク質自身のホモ多量体形成の有無と相関していたことが分かった。さらに、その核酸核酸結合強度は、vif 欠失型 HIV-1 ウイルス粒子への取込みの効率とも相関しており、多量体形成 (おそらく二量体形成) が重要であるという新たな知見を見出した。さらに、抗 HIV-1 作用が最も強い A3G に関して、一分子の核酸を用いた結合解析技術 (Single Molecule DNA Stretching 法) により、タンパク質の結合状態を計測 (計測は、米国の研究者との共同研究により行われた) した。その結果、A3G には 2 つのステップ、核酸結合モード、早く弱い結合・解離と強く遅い解離モードが存在し、後者のモードでは核酸上における A3G の多量体形成 (F126/W127 残基が重要) が寄与している (図 1) ことが見出された。このことは、我々が以前報告した「A3G による逆転写伸長反応抑制効果には、A3G の未解明な核酸結合特性が関与する」(RT 伸長)現象は A3G の多量体形成能が深く関与していた。

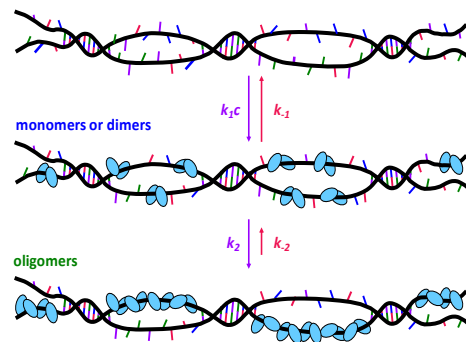


図 1 伸長反応の Roadblock モデル

核酸 (黒線) 上での多量体形成した A3G (水色) が逆転写酵素のスライディングを阻止する

一方、A3F の場合、その酵素活性は 2 つ目のドメインのみに起因し、抗 HIV-1 作用が最も強い A3G よりも高い酵素活性を保持していた。つまり、酵素活性の強さと抗ウイルス効果の強さは相関していないことが明らかになった。さらに、抗ウイルス活性が、必ずしも A3 の抗ウイルス作用と相関していない証拠を見出した。A3H (II 型) は多量体形成能をもち、強い抗 HIV 作用を示す。米国の研究者との共同研究により行われた研究によって、その分子機序として、酵素活性非依存的な逆転写伸長反応阻害が重要であることを見出した。酵素活性不活型 (E56A) でも野生型と同等の抗ウイルス効果を示すことを報告した (Retrovirology12:3, 2015)。以上のことから、核酸結合および結合に誘導される多量体形成能という A3 タンパク質の特異的な生化学的特性が強力な抗ウイルス

作用機序に深く関与することが明らかになった。

次に、A3C/D/F タンパク質上の Vif 結合領域を構造学的に解析した。その結果、Vif による A3C/F/D の認識領域は、疎水性を示す浅いくぼみ構造と辺縁の負電荷領域が重要な特徴であることが分かった。多量体形成能に関する解析では、A3C は多量体形成能が低く（検出限界以下）、長年議論されていた疑問に終止符を打った。

これらの研究成果は、A3 の抗ウイルス作用の分子メカニズムに関する新たな知見となり、A3C/F/D を活用した抗 HIV 化合物の開発にもつながると考えられる。今後、A3 を活用した抗ウイルス剤を開発する上で、多量体形成能を損なわない候補薬剤のスクリーニングが必要となるといえる。

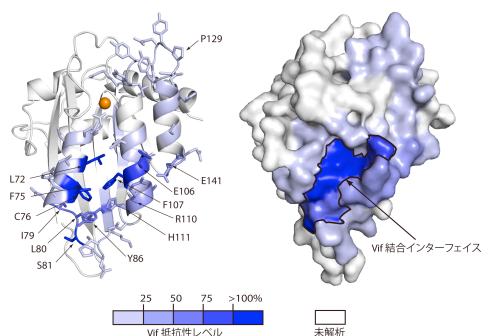


図2 A3C 上の Vif の結合領域と二量体を形成しない根拠

Vif の結合領域（濃青色）を示す。二量体形成に重要とされていた領域は N 末端側の領域で覆われているため二量体形成ができないと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Mitra M, Singer D, Mano Y, Hritz J, Nam, G, Gorelick RJ, Byeon IJ, Gronenborn AM, Iwatani Y, and Levin JG. Sequence and structural determinants of human APOBEC3H deaminase and anti-HIV-1 activities. *Retrovirology*, 査読有, 12, 2015, 3, DOI: 10.1186/s12977-014-0130-8
- ② Chaurasiya KR, McCauley MJ, Wang W, Qualley DF, Wu T, Kitamura S, Geertsema H, Chan DSB, Hertz A, Iwatani Y, Levin JG, Musier-Forsyth K, Rouzina I, and Williams MC. Oligomerization transforms human APOBEC3G from an efficient enzyme to a slowly dissociating nucleic acid binding protein. *Nature Chemistry*, 査読有, 6, 2014, DOI: 28-33, 10.1038/nchem.1795
- ③ Imahashi M, Izumi T, Watanabe D, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Kaneko N, Ichikawa S, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Utsumi M, Yokomaku Y, Shirasaka T, Sugiura W, Iwatani Y, and Naoe T. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk. *PLoS ONE*, 査読有, 9, 2014, e92861, DOI: 10.1371/journal.pone.0092861
- ④ Shiino T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, and Sugiura W. Japanese Drug Resistance HIVSN: Phylodynamic analysis reveals CRF01_AE dissemination between Japan and neighboring Asian countries and the role of intravenous drug use in transmission. *PLoS ONE*, 査読有, 9, 2014, e102633, DOI: 10.1371/journal.pone.0102633
- ⑤ Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, Ode H, Iwatani Y, Sakai Y, Doi N, Nomaguchi N, Adachi A, and Miyazaki Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology*, 査読有, 95, 2014, 179-189, DOI: 10.1099/vir.0.057364-0
- ⑥ 大出裕高, 岩谷靖雅. APOBEC3 の抗ウイルス作用および HIV-1 Vif による分解不活化の分子メカニズム. *日本エイズ学会誌*, 査読無, 16, 2014, 61-69, DOI: なし
- ⑦ Hergott CB, Mitra M, Guo J, Wu T, Miller JT, Iwatani Y, Gorelick RJ, and Levin JG. Zinc finger function of HIV-1 nucleocapsid protein is required for removal of 5'-terminal genomic RNA fragments: A paradigm for RNA removal reactions in HIV-1 reverse transcription. *Virus Research*, 査読有, 171, 2013, 346-355, DOI: 10.1016/j.virusres.2012.08.013
- ⑧ Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, and Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology*, 査読有, 87, 2013, 11447-11461, DOI: 10.1128/JVI.01549-13
- ⑨ Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano

- T, Adachi A, Nakayama EE, and Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology*, 査読有, 94, 2013, 1318-1324, DOI:10.1099/vir.0.050252-0
- ⑩ Jahanbakhsh F, Ibe S, Hattori J, Monavari SHR, Matsuda M, Maejima M, Iwatani Y, Memarnejadian A, Keyvani H, Azadmanesh K, and Sugiura W. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Iran: genomic evidence of CRF35_AD predominance and CRF01_AE infection among individuals associated with injection drug use. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 査読有, 29, 2013, 198-203, DOI: 10.1089/AID.2012.0186
- ⑪ Tu E, Swenson LC, Land S, Pett S, Emery S, Marks K, Kelleher AD, Kaye S, Kaiser R, Schuelter E, Harrigan R, and MARCH Laboratory Group and the MARCH Study Group. Results of external quality assessment for proviral DNA testing of HIV tropism in the Maraviroc Switch collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 査読有, 2013, 51, 2063-2071, DOI: 10.1128/JCM.00510-13
- ⑫ 北村紳悟、岩谷靖雅. HIV アクセサリータンパク質の機能. *日本ウイルス学会誌*, 査読無, 63, 2013, 187-198, DOI: <http://doi.org/10.2222/jsv.63.187>
- ⑬ Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, and Iwatani Y. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nature Structural & Molecular Biology*, 査読有, 19, 2012, 1005-1010, DOI: 10.1038/nsmb.2378
- ⑭ Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsinsin T, Matsuoka K, Iwatani Y, Puthanakit T, Ananworanich J, Sophonphan J, Mahanontharit A, Naoe T, Vonthanak S, Phanuphak P, and Sugiura W. Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency. *AIDS Research and Therapy*, 査読有, 9, 2012, 34, DOI: 10.1186/1742-6405-9-34
- ⑮ Imahashi M, Nakashima M, and Iwatani Y. Antiviral Mechanism and Biochemical Basis of the Human APOBEC3 Family. *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 3, 2012, 250, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00250
- ⑯ 北村紳悟, 岩谷靖雅. レトロウイルスに対する宿主防御タンパク質 APOBEC3C の X 線結晶構造の決定と HIV-1 のウイルス遺伝子産物 Vif との結合部位の同定. *ライフサイエンス新着論文レビュー* (<http://first.lifesciencedb.jp/archives/5889>) 2012
- [学会発表] (計 29 件)
- ① Iwatani Y. HIV-1 Invalidates Antiviral System of Cellular APOBEC3 Cytidine Deaminases. 7th APOCB Congress and ASCB workshop, 2014, Singapore (国際学会招待)
- ② Iwatani Y. Structure-based Analysis of APOBEC3 on Anti-HIV Function -The APOBEC3C Crystal Structure and the HIV-1 Vif Interaction Interface-. Gordon Research Conference, RNA Editing, 2013, Galveston, TX, USA (国際学会招待)
- ③ Iwatani Y. Structural features of HIV-1 Vif-binding Interface on antiviral APOBEC3 proteins. The 14th Kumamoto AIDS Seminar, 2013, Kumamoto, Japan (国際シンポジウム招待)
- [図書] (計 1 件)
- ① 岩谷靖雅、渡邊信久. 新規抗 HIV 薬の開発に向けて. *最先端メディカルエンジニアリング* 79-82, 2014

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・
 部長
 研究者番号 : 90303403