

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440026

研究課題名(和文) ウィルスによるヒト抗ウィルス酵素の作用阻止機構の解明と創薬に向けた分子基盤の構築

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism by which virus inhibits the function of human anti-virus enzymes and molecular basis of drug discovery

研究代表者

永田 崇 (Nagata, Takashi)

京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授

研究者番号：10415250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Vif複合体を構成する蛋白質のうち、Vif、または、CBFのみを安定同位体標識化するVif複合体調製法を開発した。Vif複合体の標的、抗HIV蛋白質(A3FやA3G等)や、開発が期待されるVif阻害剤について、Vif複合体上の結合部位を直接的に同定することが可能となった。また、Vif複合体に対するRNAアプタマーの取得に成功した。他方、A3Fの酵素活性について、DNAの配列、長さの依存性、pHの影響、各アミノ酸残基の役割について明らかにした。新たに、Vif複合体はA3GのC端ドメインの酵素活性を阻害することも見出した。本研究成果は、Vif阻害剤の開発に広く活用されることが期待出来る。

研究成果の概要(英文)：We have developed a stable-isotope labeling method of the Vif complex, which contains five proteins. Our method is capable of labeling either Vif or CBF, while the rest of the components are unlabeled. Obtained labeled Vif complex can be used to identify the binding sites of the anti-HIV proteins (A3F, A3G, etc.) and anti-Vif compounds on the Vif complex. We also obtained the RNA aptamers that bind to the Vif complex with high affinity. On the other hand, we investigated the influence of the DNA sequence/length and pH on deaminase activity, as well as the roles of the amino acid residues around the catalytic center of APOBEC3F. We newly found that the Vif complex inhibits the catalytic activity of the C-terminal domain of A3G. Our efforts will provide the tools for anti-Vif drug development.

研究分野：構造生命科学

キーワード：Vif APOBEC アプタマー NMR

1. 研究開始当初の背景

HIV は感染後、ゲノム情報をヒト染色体に組み込むために、(+)鎖ゲノム RNA から二本鎖 DNA を合成する。その過程で、(-)鎖 DNA が生成する。ヒト APOBEC3G (A3G) は、この(-)鎖 DNA に含まれるシトシン塩基を脱アミノ化し、ウラシル塩基へ改変することで、HIV ゲノム情報を破壊する(抗 HIV 活性)。一方、HIV は Vif で応戦する。Vif は、ヒトのコピキチンリガーゼ複合体と転写因子 CBF β を二重ハイジャックし、A3G を捕捉する。そして、コピキチン化を介してプロテアソームによる分解へと導く(抗 HIV 活性の阻止)。

Vif のはたらきを阻害することで、A3G の活性がレスキューされれば、HIV を無毒化出来ると考えられるようになった。

当初、Vif とコピキチンリガーゼ複合体及び転写因子 CBF β が形成する Vif 複合体の立体構造や、Vif 複合体が A3G を補足しコピキチン化する機構については、明らかになっていなかった。我々は、これらを明らかにできれば、創薬開発に向けた道筋をつけることが出来ると考えた。

2. 研究の目的

Vif とコピキチンリガーゼ複合体及び CBF β の結合様式を明らかにすること、また、Vif 複合体が A3G を阻害する機構を明らかにすることを目的とした。さらに、進化分子工学的的手法によりアプタマー分子を創製し、機能解析に向けたツールを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Vif 複合体を構成する Vif, CBF β , EloB, EloC 及び Cul5 のうち、Vif のみ、または、CBF β のみを安定同位体標識化し、それ以外は標識化しない、E. coli の共発現系を構築した。最初に安定同位体標識化するタンパク質を araBAD オペロンのもとで発現誘導し、標識化しないその他のタンパク質は lac オペロンで発現誘導した。得られたタンパク質はニッケル親和性、グルタチオン、イオン交換、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製した。

(2) Vif 複合体に結合する RNA アプタマー候補を、SELEX 法により取得した。ニッケル樹脂に固定化した Vif 複合体に RNA プールを加え、Vif 複合体に強く結合する RNA を回収した。8 ラウンドの選別後に、得られた RNA アプタマー候補の配列を解析した。RNA アプタマー候補と Vif 複合体との結合については、ゲルシフト法により検証し、SPR 法により結合定数を求めた。

(3) Vif 複合体が A3G の酵素活性に及ぼす影響を調べた。一本鎖 DNA 上のシトシン脱アミノ化反応は、NMR 実時間計測法を用いた。Vif 複合体、または、その構成タンパク質各々

と一本鎖 DNA との相互作用、または、それらと A3G との相互作用については、蛍光偏角解消法により検証した。

(4) ヒト APOBEC3F (A3F) について、野生型及び種々の点変異体の E. coli 発現系を構築し、精製した。A3F のシトシン脱アミノ化活性をウラシル DNA グリコシラーゼアッセイにより解析した。配列、長さの異なる DNA を用いた。また、種々の pH 条件で反応を行った。A3F と DNA との結合は、蛍光偏角解消法により解析した。

4. 研究成果

(1) Vif 複合体を構成する Vif, CBF β , EloB, EloC 及び Cul5 のうち、Vif のみ、または、CBF β のみを安定同位体標識化し、それ以外は標識化しない方法を開発するとともに、高い精製度で Vif 複合体を調製することに成功した。

研究開始当初、Vif 複合体の構造情報は存在しなかったが、2014 年に Vif 複合体の結晶構造が海外グループにより報告された。しかし、それから 2018 年現在に到るまでの間に、Vif 複合体と A3G、もしくは Vif 複合体とその阻害剤(我々の知る限りでは阻害剤の開発は発展途上)の複合体に関する直接的な構造情報は解明されていない。

今回我々が開発した方法を利用すれば、A3G、または、Vif 阻害剤について、Vif 複合体上の結合部位を直接的に同定することが出来る。構造解析を行わずとも、結合部位を知ることが出来る点が優れている。後述するように、我々は Vif 複合体に高い親和性をもつ RNA アプタマーを得ることに成功している。今後は、我々を含め、多くの研究者により、Vif 複合体のエピトープホットスポットの同定に活用されることが強く期待される。

(2) Vif 複合体に対して阻害活性をもつ化合物は開発途上であり、世界中で開発が望まれている。

本研究では、千葉工業大学・坂本泰一教授との共同研究により、配列の異なる 7 種類の RNA アプタマー候補を得ることに成功した。ゲルシフト法により、いずれの RNA アプタマー候補も Vif 複合体と結合することが確認された。さらに、SPR 法により、配列が最も収束した候補は、解離定数が約 50 nM であり、最も結合が強い候補は、解離定数がおよそ 10 nM であることを示された。

Vif 複合体に対する RNA アプタマーの開発は、我々の知る限りでは報告がなく、大変オリジナリティが高い。目下、得られた RNA アプタマー候補の抗 Vif 複合体活性について、アッセイする細胞実験の開発を行っている。また、上記した安定同位体化 Vif 複合体を用いて、結合部位の同定を行うための準備を進めているところである。

(3) Vif 複合体は、A3G の N 端ドメインに結合

し、A3G の C 端ドメインをユビキチン化することで、A3G をプロテアソーム分解へと導く。A3G の C 端ドメインは、一本鎖 DNA 特異的にシトシンを脱アミノ化する酵素活性を有する。Vif 複合体が A3G C 端ドメインに作用することが示唆されていたが、研究は進んでいなかった。

我々は今回、Vif 複合体の A3G C 端ドメインに対する効果を調べた。そして、Vif 複合体は、C 端ドメインの酵素活性を阻害することを明らかにした。種々の結合実験により、Vif 複合体は、一本鎖 DNA に非特異的に強く結合することが示された。また、Vif 複合体は A3G C 端ドメインと直接的もしくは間接的に結合することが示唆された。これらの知見については、現在論文作成に向けて検証を進めているところである。

(4) Vif 複合体は、ヒト A3F も標的とし、ユビキチン化を介したプロテアソーム分解へと導く。A3F は、A3G と同様に一本鎖 DNA 特異的なシトシン脱アミノ化酵素であり、HIV の(-)鎖 DNA に変異を導入する。A3G は CCC 配列を CCU に変換するが、A3F は TC を TU に変換する。

研究開始当初、A3F の酵素活性に関する知見は少なかった。そこで、我々は、A3F の酵素活性について、DNA の配列、長さの依存性、pH の影響、さらには各アミノ酸残基の役割 (DNA 結合、酵素活性) について明らかにした。この成果は、論文として報告した[項目 5 . [雑誌論文]]。

(5) 進化分子工学を用いた分子の創製、構造機能相関解析及び高機能化に関連する研究も行った。

癌を促進させる MDM2 タンパク質と、それに強く結合する MDM2 阻害ペプチド MIP との NMR 構造を決定した[項目 5 . [雑誌論文]]。MIP は、共同研究者の慶應大学・柳川弘志教授により、mRNA ディスプレイ法で創製された。我々の NMR 構造は MIP の強い結合の原理を説明するとともに、抗 MDM2 活性をもつ低分子化合物創製への指針を与えた。

カリウム濃度に応答して酵素活性をブースト出来る RNA 酵素を創製した[項目 5 [雑誌論文]]。RNA 酵素に、カリウム濃度が高くなると四重鎖を形成する RNA 配列を融合した。これにより、RNA 酵素はカリウム濃度依存的に活性を ON、OFF することが出来る。

また、上記四重鎖 RNA を RNA アプタマーに応用した。カリウム濃度に応答して標的ペプチドと結合し、さらに蛍光を発する RNA アプタマーを創製した[項目 5 . [雑誌論文]]。

将来的には、Vif 複合体に対する RNA アプタマーに上記四重鎖 RNA を融合することで、

細胞内でのみ活性を発揮する抗 Vif 複合体 RNA アプタマーの創製に結びつきたいと考えている。

Vif 複合体の構成タンパク質のうち、CBFβ は、急性白血病因子である AML1 と複合体を形成する。この AML1 に強く結合する RNA アプタマーを千葉工業大学・坂本泰一教授が創製した。我々は、AML1 と RNA アプタマーの結合解析をとともに行った。[項目 5 . [雑誌論文]]

我々は以前、抗プリオン RNA アプタマーを取得し、これとプリオンに含まれるペプチドとの NMR 構造を決定していた。今回は、京都大学・木下正弘教授との共同研究により、抗プリオン RNA アプタマーとプリオンペプチドの結合機構について、詳細に熱力学的パラメーターを算出して、結合の原動力を明らかにした。ここでの解析では、木下教授が開発した、統計力学と水分子のモデルを組み合わせた方法を用いた。雑誌 *Nucleic Acids Res.* として報告した結果、優れた論文として **Faculty of F1000** に選定された[項目 5 . [雑誌論文]]

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 27 件)

全て査読あり(以下 20 件のみ記載)

Hayashi, T., Nagata, T., Katahira, M., Kinoshita, M.他(5 人中 3 番目) (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20: 9167-9180, "Mechanism of protein-RNA recognition: analysis based on the statistical mechanics of hydration" doi: 10.1039/C8CP00155C.

Takada, K., Nagata, T., Katahira, M., Sakamoto, T.他(10 人中 6 番目) (2018) *FEBS Open Bio*, 8: 264-270, "Characterisation of an aptamer against the Runt domain of AML1 (RUNX1) by NMR and mutational analyses" doi: 10.1002/2211-5463.12368.

Kondo, K., Nagata, T., Katahira, M.他(8 人中 7 番目) (2018) *Sci. Rep.*, 8: 2864, "Plastic roles of phenylalanine and tyrosine residues of TLS/FUS in complex formation with the G-quadruplexes of telomeric DNA and TERRA" doi: 10.1038/s41598-018-21142-1.

Yamaoki, Y., Nagata, T., Katahira, M. (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20: 2982-2985, "The first successful observation of in-cell NMR signals of DNA and RNA in living human cells" doi: 10.1039/C7CP05188C.

Kamba, K., T., Nagata, T., Katahira, M. (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20: 2976-2981, "The C-terminal cytidine deaminase domain of APOBEC3G itself undergoes intersegmental transfer for a target search, as revealed by

real-time NMR monitoring" doi: 10.1039/c7cp05171a.

Wan, L., Nagata, T., Katahira, M. (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20: 3109-3117, "Influence of the DNA sequence/length and pH on deaminase activity, as well as the roles of the amino acid residues around the catalytic center of APOBEC3F" doi: 10.1039/c7cp04477a.

Obayashi, E., Luna, R.E., Nagata, T., Hinnebusch, A.G., Wagner, G., Asano, K.他(28人中3番目) (2017) *Cell Rep.*, 18: 2651-2663, "Molecular Landscape of the Ribosome Pre-initiation Complex during mRNA Scanning: Structural Role for eIF3c and Its Control by eIF5"doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.052.

Yamaoki, Y., Nagata, T., Mashima, T., Katahira, M. (2017) *Chem. Commun.*, 53: 7056-7059, "Development of an RNA aptamer that acquires binding capacity against HIV-1 Tat protein via G-quadruplex formation in response to potassium ions" doi: 10.1039/c7cc03312e.

Wan, L., Nagata, T., Takaori-Kondo, A., Katahira, M.他(5人中2番目) (2017) *ACS Chem. Biol.*, 12: 2704-2708, "Observation by Real-Time NMR and Interpretation of Length- and Location-Dependent Deamination Activity of APOBEC3B" doi: 10.1021/acscchembio.7b00662.

Iwaoka, R., Nagata, T., Tsuda, K., Imai, T., Okano, H., Kobayashi, N., Katahira, M. (2017) *Molecules*, 22: E1207, "Structural Insight into the Recognition of r(UAG) by Musashi-1 RBD2, and Construction of a Model of Musashi-1 RBD1-2 Bound to the Minimum Target RNA" doi: 10.3390/molecules22071207.

Nomura, Y., Nagata, T., Kobayashi, N., Katahira, M., Koze, T., Nakamura, Y., Sakamoto, T.他(14人中5番目) (2017) *J Biochem.*, 162: 431-436, "Conjugation of two RNA aptamers improves binding affinity to AML1 Runt domain" doi: 10.1093/jb/mvx049.

Duvignaud, J.B., Bédard, M., Nagata, T., Muto, Y., Yokoyama, S., Gagné, S.M., *Vincent, M. (2016) *Biochemistry*, 55: 2553-2566, "Structure, dynamics and interaction of p54nrb/NonO RRM1 with 5' Splice Site RNA sequence" doi: 10.1021/acs.biochem.5b01240.

Kamba, K., T., Nagata, T., Katahira, M. (2016) *Front. Microbiol.*, 7:587, "Characterization of the deamination coupled with sliding along DNA of anti-HIV factor APOBEC3G on the basis of the pH-dependence of deamination revealed by real-time NMR monitoring" doi: 10.3389/fmicb.2016.00587.

Yamaoki, Y., Nagata, T., Mashima, T., Katahira, M. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 468: 27-31, "K⁺-responsive off-to-on switching of hammerhead ribozyme through dual G-quadruplex formation requiring no heating and cooling treatment" doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.173.

Yamaoki, Y., Mashima, T., Nagata, T., Katahira, M. (2015) *Chem. Commun.*, 51: 5898-5901, "Boosting of activity enhancement of K(+)-responsive quadruplex hammerhead ribozyme" doi: 10.1039/c5cc00961h.

Kamba, K., T., Nagata, T., Katahira, M. (2015) *PLOS ONE*, 9: e0124142, "Catalytic Analysis of APOBEC3G Involving Real-Time NMR Spectroscopy Reveals Nucleic Acid Determinants for Deamination" doi: 10.1371/journal.pone.0124142.

Nagata, T., Kobayashi, N., Yanagawa, H.他(10人中1番目) (2014) *PLOS ONE*, 9: e109163, "Structural Basis for Inhibition of the MDM2:p53 Interaction by an Optimized MDM2-Binding Peptide Selected with mRNA Display" doi: 10.1371/journal.pone.0109163.

Tsuda, K., Nagata, T., Kobayashi, N., Muto, Y. 他(10人中3番目) (2014) *Proteins*, 82: 2879-2886, "Novel RNA recognition motif domain in the cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3" doi: 10.1002/prot.24651.

Hayashi, T., Nagata, T., Katahira, M., Kinoshita, M.他(6人中4番目) (2014) *Nucleic Acids Res.*, 42: 6861-6875, "Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: crucial importance of water entropy in molecular recognition" doi: 10.1093/nar/gku382. (同誌の優れた論文として Faculty of F1000 に選定)

Furukawa, A., Nagata, T., Takaori-Kondo, A., Katahira, M.他(8人中4番目) (2014) *Angew. Chem. Int.*, 53: 2349-2352 "Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy" doi: 10.1002/anie.201309940. (同誌の Very Important Paper (VIP)に選定)

〔学会発表〕(計116件)

国内学会72件、国際学会44件(以下、国外で開催された学会のうち3件と招待講演のうち2件のみを記載)

Kamba, K., Nagata, T., Katahira, M. (2017) *7th Asia-Pacific NMR Symposium, Indian Institute of Science*, "Sliding and intersegmental transfer along DNA enhance the enzymatic activity of APOBEC3G as revealed by real-time NMR monitoring methods" Bangalore (India) 2017年2月16日-19日

Wan, L., Nagata, T., Takaori-Kondo, A., Katahira, M.他(5人中2番目) (2017) *7th Asia-Pacific NMR Symposium, Indian Institute of Science*, "Characterization of the deamination activity of APOBEC3B by real-time NMR, which is distinct from that of APOBEC3G" Bangalore (India) 2017年2月16日-19日

Nagata, T., Katahira, M.他(8人中1番目) (2016) *Aptamer 2016*, "Tandem GGA repeat G-quadruplex as an anti-prion protein aptamer and a K⁺-responsive structural/functional

switching device” Oxford (United Kingdom)
2016年4月4日-5日

Nagata, T. (2016) *The 5th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR*, "Structural study of RNA aptamer and peptide that potently perturb the function of intrinsically disordered proteins related to disease" 理化学研究所(横浜)2016年8月29日(招待講演)

永田 崇 (2015) **第56回日本生化学会中国・四国支部例会** "タンパク質の構造、相互作用、酵素反応のNMRによる解析" 島根大学(島根)2015年5月29日(招待講演)

〔その他〕

ホームページ：京都大学エネルギー理工学研究所ホームページで「APOBEC3B活性のリアル時間NMR観測」が紹介された(2017年9月27日)。

<http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/new-iae/NewsRelease/JP/researchAct/>

プレスリリース：マイナビニュース、日本の研究.com、製薬業界の転職支援アンサーズ等に「NMR法を用いた実時間追跡で抗エイズウイルス酵素反応の定量解析に成功」の記事が掲載された(2014年1月29日)。

<https://news.mynavi.jp/article/20140131-a274/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 崇 (NAGATA, Takashi)
京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授
研究者番号：10415250

(2) 連携研究者

高折 晃史 (TAKAORI, Akifumi)
京都大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：20324626

(3) 連携研究者

片平 正人 (KATAHIRA, Masato)
京都大学・エネルギー理工学研究所・教授
研究者番号：60265717