

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08872

研究課題名(和文) 宿主防御因子APOBEC3GとHIV-1 Vifの相互作用様式の解明

研究課題名(英文) Clarification of interaction machinery between antiviral factor APOBEC3G and HIV-1 Vif

研究代表者

大出 裕高(Ode, Hirotaka)

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

研究者番号：20754162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は自身の遺伝子産物Vifタンパク質を使って、抗HIV-1作用を持つヒトのAPOBEC3タンパク質を分解してしまう。報告者はこれらVifとAPOBEC3タンパク質の複合体構造を明らかにし、これらタンパク質間の相互作用をより深く理解することを本研究の目的とした。報告者は既知のこれらタンパク質の立体構造情報を使い、コンピューターシミュレーション技術を駆使し、これらの複合体構造を予測した。予測した構造は、これまでに報告されている結合に関する実験データを反映するものであり、その妥当性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV-1感染症には治癒させる薬がないため、新しい作用機序を持つ薬の開発が期待されている。これら研究成果は、抗HIV-1因子APOBEC3タンパク質あるいはHIV-1 Vifを標的とした新しい抗HIV-1薬開発の基盤となる構造情報であると言える。さらに、この構造情報は、HIV-1がサルからヒトへと伝播していく際に、どのように種の壁を乗り越えてきたか、または、HIV-1やほかのウイルスの進化を理解する手がかりにもなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) encodes vif gene, of which product counteracts human anti-HIV-1 factor, APOBEC3 proteins. The objective of the study is to clarify 3D complex structure between human APOBEC3 proteins and Vif and to understand interactions of them. The complex structure was predicted by several computational simulation techniques based on publically available structure information on APOBEC3 proteins and Vif. The previously reported experimental data for the binding was supported by the predicted complex structures, suggesting that the predicted structures are reasonable.

研究分野：生物物理学、ウイルス学、情報生物学

キーワード：APOBEC3G APOBEC3 Vif タンパク質複合体構造予測 HIV-1 タンパク質-タンパク質相互作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの宿主防御因子 APOBEC3 ファミリータンパク質(以下、APOBEC3)は、ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)などのレトロウイルスやレトロトランスポゾンに対して強い複製抑制能力を示す。APOBEC3 はヒトでは 7 種存在するが、特に APOBEC3G、APOBEC3F、APOBEC3H(ハプロタイプ II 型)が著しい抗 HIV-1 作用を示す。しかしながら、HIV-1 は、自身の遺伝子産物 Vif と APOBEC3 を結合させ、APOBEC3 をユビキチン・プロテアソーム系へと誘導し、APOBEC3 の抗 HIV-1 作用から逃れる。そのために、HIV-1 は感染細胞において、APOBEC3 の複製抑制作用から逃れて、複製、増殖ができる。

APOBEC3-Vif 間相互作用の阻害は、APOBEC3 の抗 HIV-1 作用を保持させる可能性があるため、APOBEC3 あるいは Vif は新たな抗 HIV-1 薬の標的として注目を集めている(Nathans, et al. Nat Biotechnol, 26, 1187, 2008)。これまでに、報告者の所属研究室ならびに他グループは、この APOBEC3 と Vif の相互作用様式を理解するため、変異導入解析あるいは NMR chemical shift perturbation 解析を行い、各 APOBEC3G、APOBEC3F、APOBEC3H 中の Vif との結合に重要な責任アミノ酸残基を同定してきた(Kitamura, et al., Nat Struct Mol Biol, 19, 1005, 2012, Nakashima, et al., J Virol, 90, 1034, 2015, Kouno, et al. Nat Struct Mol Biol, 22, 485, 2015, Nakashima, et al. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses, 2016)。APOBEC3G と APOBEC3F は N 末端側ドメイン (NTD) と C 末端側ドメイン (CTD) の 2 つのドメインを持つが、それぞれ NTD と CTD にのみ Vif 結合責任アミノ酸残基が存在する。同様に、Vif 中の各 APOBEC3G、APOBEC3F、APOBEC3H 結合責任アミノ酸残基も同定されてきた(Aydin, et al. Structure, 2014, 22, 668)。

さらに、報告者の所属研究室ならびに他グループは、Vif との結合ドメインである APOBEC3G NTD、APOBEC3F CTD の立体構造を単量体として NMR あるいは X 線結晶構造解析により決定してきた(Nakashima, et al., J Virol, 90, 1034, 2015, Kouno et al. Nat Struct Mol Biol 22, 485, 2015)。これら立体構造情報により、APOBEC3G NTD、APOBEC3F CTD の Vif 結合責任アミノ酸残基がタンパク質表面の一領域に局在し、それら Vif 結合領域が疎水的表面とそれを囲う負電荷を帯びた表面であることが明らかになった。さらに近年、ヒトの APOBEC3G NTD と配列相同性の高いアカゲザルの APOBEC3G NTD の X 線結晶構造が、核酸と結合し、かつ二量体化した構造として決定された(Xiao, et al. Nat Commun, 7, 12193, 2016)。APOBEC3G NTD の二量体化は、Vif との結合に重要な因子である。一方で、Vif の X 線結晶構造も Vif の構造安定化に寄与する CBF β との複合体構造として決定され、Vif 中の各 APOBEC3G、APOBEC3F、APOBEC3H 結合領域の構造学的特徴も明らかにされた(Guo, et al. Nature, 505, 229, 2014)。

しかしながら、Vif といずれの APOBEC3 (APOBEC3G、APOBEC3F、APOBEC3H)の複合体構造もいまだに決定されておらず、APOBEC3 と Vif の詳細な相互作用様式の解明には至っていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、最も強力な抗 HIV-1 作用を示す APOBEC3G に焦点をあて、その Vif 結合ドメインである APOBEC3G NTD と Vif/CBF β の複合体構造を決定し、APOBEC3G と Vif の相互作用様式を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

既知のアカゲザル APOBEC3G N 末端側ドメイン(NTD)の立体構造情報と、Vif とその構造安定化に寄与する CBF β の複合体(Vif/CBF β)の立体構造情報をもとに、コンピュータシミュレーション(*in silico*)にて APOBEC3G NTD-Vif/CBF β 複合体モデル構造を予測した。アカゲザル

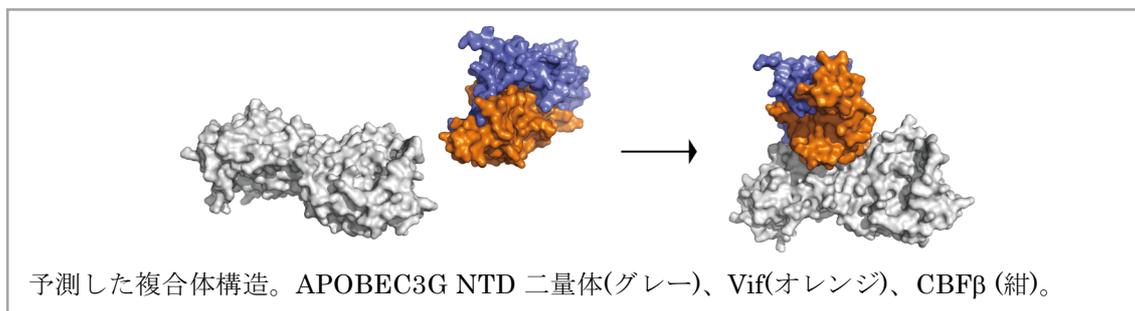
APOBEC3G NTD の立体構造から、ヒトの APOBEC3G NTD の立体構造を Modeller プログラムによるホモロジーモデリング法で予想した。また、APOBEC3G NTD と Vif の複合体構造予測には、ClusPro プログラムあるいは Rosetta プログラムを使った。予測したモデル構造は、AMBER ソフトウェアを利用し、分子動力学シミュレーションを行い、複合体構造の最適化を試みた。

4. 研究成果

APOBEC3G の NTD は二量体を形成し、その二量体化は Vif との結合においても重要であることが知られている。報告者は、まず、既知のアカゲザル APOBEC3G NTD 二量体構造から、ヒトの APOBEC3G NTD 二量体構造を予測した。アカゲザルとヒトの APOBEC3G の配列は相同性が高いため、それら二量体構造は、ほぼ同じであろうことが想定できる。次に、ヒト APOBEC3G NTD 二量体の構造と既知の Vif-CBF β 構造を利用して、それらの複合体構造を予想しようと試みた。さまざまな条件のもと検討し、予想複合体構造を、複数得ることに成功した。それらを既報の APOBEC3G NTD 中の Vif 結合責任アミノ酸残基ならびに Vif 中の APOBEC3G 結合責任残基と照らし合わせ、最ももっともらしいモデル構造を選択した。

得られたモデル構造について、コンピュータシミュレーションのひとつである分子動力学法にて、構造の最適化を検討した。この過程では、相互作用に関与すると予想されるアミノ酸残基について、側鎖の向きなどの条件を変えながら、この APOBEC3G NTD 二量体-Vif-CBF β の複合体の安定構造を探索した。まず、初期のモデル構造では、Vif の APOBEC3F 結合責任領域である F2 ドメインが、APOBEC3G との相互作用インターフェース近くに位置していた。そのため、APOBEC3G NTD の二量体構造が不安定化してしまった。そこで、Vif F2 ドメインを APOBEC3G と離れた構造をモデルとしたところ、APOBEC3G NTD の二量体構造の安定化が認められた。つまり、既報のとおり、Vif F2 ドメインと APOBEC3G との相互作用がないモデルが妥当であることが示唆された。

一方、アカゲザル APOBEC3G は、HIV-1 Vif とは結合できないものの、アカゲザル APOBEC3G と結合できる Vif 変異体が報告されている(Lekto et al., Cell Rep, 13, 1789, 2015)。この情報をもとに、変異の位置関係をモデル構造と照らし合わせた。その結果、変異によって、相互作用が増強されることが予想される位置関係であることが想像された。これらのことから、報告者が予想した複合体構造は、これまでに報告された *in vitro* 実験の結果と矛盾しないことが示唆された。



加えて、研究期間中に、APOBEC3G の全長の二量体構造が決定され、公開された(Yan, et al. Nat Commun, 11, 632, 2020)。この全長構造を利用し、CTD ドメインが NTD の Vif 結合領域に干渉しないか否かを分子動力学シミュレーションにて検証した。つまり、CTD が Vif 結合領域付近にアクセスできるかを調べた。その結果、CTD の配置は Vif 結合領域とは遠く離れた箇所に位置どおりしやすいことが示唆された。

以前、報告者は APOBEC3F CTD と Vif の複合体構造予測を実施した(Nakashima, et al., J Virol, 90, 1034, 2015)。さらに、報告者は Vif と結合能があるチンパンジー APOBEC3H との複合体構造

予測も実施し、これを国際誌に論文データの一部として報告している(Matsuoka, et al., *Nucleic Acids Research*, 46, 10368, 2018)。これら複合体構造は、それぞれの APOBEC3 タンパク質中の Vif 結合責任アミノ酸残基ならびに Vif 中の APOBEC3 結合責任アミノ酸残基を説明できるモデル構造であった。これら複合体構造は、APOBEC3G NTD-Vif 複合体と類似性があることを見出した。つまり、電気的な相互作用と疎水的な相互作用のインターフェースがそれぞれ協働的に作用している共通性が認められた。

これら予想した複合体構造情報は、APOBEC3 と Vif の相互作用の理解にとどまらず、どのようにサルからヒトにレトロウイルスが適応してきたかを知る手がかりとなると考える。さらに Vif と APOBEC3 の相互作用を阻害し、APOBEC3 の抗 HIV-1 作用を保持する新しい抗 HIV-1 薬開発の一助となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ode Hiroataka, Kobayashi Ayumi, Matsuda Masakazu, Hachiya Atsuko, Imahashi Mayumi, Yokomaku Yoshiyuki, Iwatani Yasumasa	4. 巻 267
2. 論文標題 Identifying integration sites of the HIV-1 genome with intact and aberrant ends through deep sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 59 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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) https://doi.org/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 Nakashima Masaaki, Tsuzuki Shinya, Awazu Hiroaki, Hamano Akiko, Okada Ayaka, Ode Hiroataka, Maejima Masami, Hachiya Atsuko, Yokomaku Yoshiyuki, Watanabe Nobuhisa, Akari Hirofumi, Iwatani Yasumasa	4. 巻 429
2. 論文標題 Mapping Region of Human Restriction Factor APOBEC3H Critical for Interaction with HIV-1 Vif	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1262 ~ 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2017.03.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

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 宿主抗ウイルス因子APOBEC3Hタンパク質の結晶構造解析
3. 学会等名 日本生化学会中部支部第82回例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuoka T., Nagae T., Ode H., Hamano A., Matsuoka K., Imahashi M., Hachiya A., Yokomaku Y., Watanabe N., Iwatani Y.
2. 発表標題 Structural insights of chimpanzee APOBEC3H-RNA duplex complex into Vif interaction
3. 学会等名 The 2018 Cold Spring Harbor Laboratory meeting on retroviruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ode H., Matsuda M., Imahashi M., Hachiya A., Yokomaku Y., Iwatani Y.
2. 発表標題 A novel detection approach of HIV-1 integration sites based on split read mapping
3. 学会等名 The 2018 Cold Spring Harbor Laboratory meeting on retroviruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuoka K., Ode H., Hamano A., Matsuoka T., Sukegawa S., Hachiya A., Imahashi M., Yokomaku Y., Iwatani Y.
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 Matsuoka T., Nagae T., Ode H., Hamano A., Matsuoka K., Imahashi M., Hachiya A., Yokomaku Y., Watanabe N., Iwatani Y.
2. 発表標題 The primate APOBEC3H crystal structure and insight into its interaction with HIV-1/SIVcpz Vif
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 Ode H., Matsuoka T., Nagae T., Hamano A., Matsuoka K., Hachiya A., Imahashi M., Yokomaku Y., Watanabe N., Iwatani Y.
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・総会
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、横幕能行、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・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ode H., Inoue A., Matsuda M., Hachiya A., Yokomaku Y., Iwatani, Y.
2. 発表標題 Comprehensive deep sequencing method for HIV-1 integration sites in human genome
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwatani Y., Hamano A., Ode H., Kubota M., Tsuzuki S., Matsuoka M., Yokomaku Y., Watanabe N., Hachiya A.
2. 発表標題 Analysis of structural and functional roles of the HIV-1 Vif PPLP motif region
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大出 裕高、井上 歩美、松田 昌和、蜂谷 敦子、横幕 能行、岩谷 靖雅
2. 発表標題 Deep Sequencing技術を利用したHIV-1 のゲノム組込部位の網羅的解析法の開発
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 感染・免疫研究部 https://www.cares-nagoya.jp/cares/crc.php

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