

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K15434
研究課題名(和文) HIVのVifタンパク質による宿主細胞を利用したヒト抗ウイルス因子排斥機構の解明

研究課題名(英文) Inactivation mechanism of HIV Vif protein using host cellular proteins against human anti-viral factor

研究代表者
神庭 圭佑 (Kamba, Keisuke)

京都大学・エネルギー理工学研究所・研究員

研究者番号：00795049
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのAPOBEC3Gタンパク質(A3G)は、ウイルスのマイナス鎖DNA中のシトシンをウラシルに脱アミノ化することで、HIV等のレトロウイルスに対する生体防御として機能する。HIVのVifタンパク質(Vif)はA3Gを無力化する。ヒト細胞内では、Vifは4種類のヒトタンパク質と結合し、分子量100 kDa程度からなる五者複合体(Vif複合体)を形成する。本研究では、Vif複合体中の単一のタンパク質のみを安定同位体標識し、そのNMRスペクトルを得た。次いで、Vif複合体とA3GのC端ドメインの相互作用することにより、Vif複合体は、A3Gによる脱アミノ化反応を阻害することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
複合体タンパク質の単独の分子を標識する手法を提供することで、NMRを用いて高分子量のタンパク質を標識することが可能になり、ドラッグスクリーニング等に応用できることが期待される。宿主分子を巧みに利用するウイルス分子の作用機序を明らかにすることで、創薬研究のみならず、生命の進化の本質にかかわる知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Human APOBEC3G (A3G) protein deaminates a cytosine within minus DNA of HIV, and thereby restricts the infectivity of viral-infectivity-factor (Vif)-deficient HIV strains. A3G comprises a catalytically inactive N-terminal domain (NTD) and an active C-terminal domain (CTD). HIV Virion infectivity factor (Vif) protein completely suppresses A3G. Vif is an intrinsically disordered protein, forming a five-membered complex (Vif complex) by hijacking the components of four human proteins. Vif reportedly binds to NTD of A3G, ubiquitinates CTD of A3G, then degrades A3G through ubiquitin-proteasome proteolysis
In this study one protein was selectively isotope labeled for NMR study. It was also found that Vif complex directly inhibit deamination activity of A3G. To understand the mechanism, the interaction between A3G, Vif complex, and ssDNA were investigated. The interaction between A3G CTD and Vif complex, including human proteins would be important for A3G inhibition.

研究分野：分子生物学・構造生物学・物理系薬学

キーワード：生体分子 NMR 相互作用 APOBEC3G HIV Vif 阻害 タンパク質複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの APOBEC3G タンパク質 (A3G) は HIV の逆転写反応中間産物の cDNA に作用し、シトシンを脱アミノ化してウラシルに変換する。その結果 HIV の遺伝情報は破壊され、A3G は抗 HIV 活性を発揮する (図 1)。すなわち A3G は HIV に対する防御機構としての役割を担う¹。A3G は 2 つのドメインからなるタンパク質で、強い核酸結合能をもつが活性を有しない N 端ドメインと、核酸結合能が弱い活性を有する C 端ドメインから成る。

HIV が有する Vif タンパク質 (Vif) は A3G を無力化する。このため、Vif 存在下では A3G は抗 HIV 活性を発揮できない (図 1)。Vif は抗 HIV 開発における創薬ターゲットであり、これまでに Vif を標的とする抗 HIV 薬は報告されていない。Vif は単独で構造を有しない天然変性タンパク質であり、HIV に感染したヒト細胞内では、Vif はヒト CBFβ タンパク質、E3 ユビキチンリガーゼ関連タンパク質 (EloB、EloC、Culin5) と結合し、分子量 100 kDa 程度からなる五者複合体 (Vif 複合体) を形成する。これまでに Vif 単独での可溶性、調整については成功例がないが、Vif 複合体の X 線結晶構造が決定され、構造を有する Vif 複合体の調製が可能となった²。

従来は、Vif は主として A3G の N 端ドメイン (NTD) と結合し、A3G をユビキチン化することでプロテアソームを介して分解すると考えられてきた (図 2)。一方で、Vif と A3G NTD 間の結合や、A3G のユビキチン化を阻害しても、HIV 感染細胞中で A3G が本来の機能を発揮できたという報告はない^{3,4}。

申請者は長年 A3G によるシトシンの脱アミノ化機構について研究を行ってきた^{5,6,7}。この知見を活用し、Vif 複合体を調製し、その存在下で A3G の活性を定量したところ、Vif 複合体は A3G の活性を直接阻害するという予備的な知見を得た (図 2)。すなわち、Vif は複数の A3G 無力化手段を有していることが示唆された。これらを同時に無力化できれば、A3G が本来の機能を発揮でき、これまでになかった機構を有する新規抗 HIV 薬開発の手がかりになると期待される (図 2)。

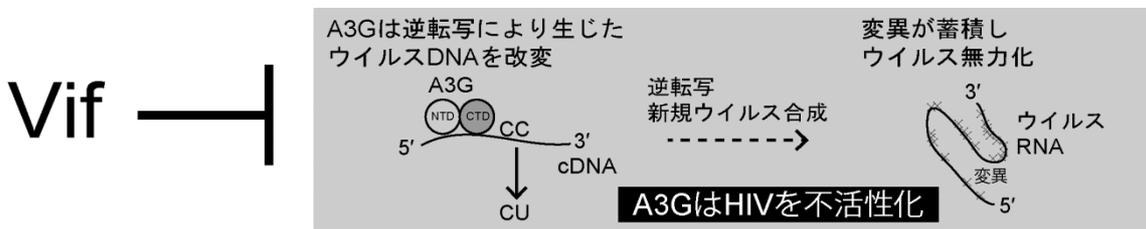


図 1. Vif は A3G を無力化するため、A3G は本来の機能を発揮できない。

2. 研究の目的

本研究は、下記 3 項目を目的とする。

- (1) Vif 複合体中の Vif のみを選択的に安定同位体ラベルし、A3G 及び DNA と Vif の相互作用をアミノ酸残基レベルで明らかにするためのプローブを確立する。
- (2) Vif 複合体とその関連タンパク質が A3G の活性にどのような阻害効果を及ぼすのか明らかにする。Vif による A3G の阻害に関連する分子間相互作用を網羅的に検証し、同定する。
- (3) Vif による A3G の阻害に拮抗する化合物を探索する。(1)、(2) の知見が、Vif を阻害する新規抗 HIV 薬候補のスクリーニングに用いることができるか検証する。

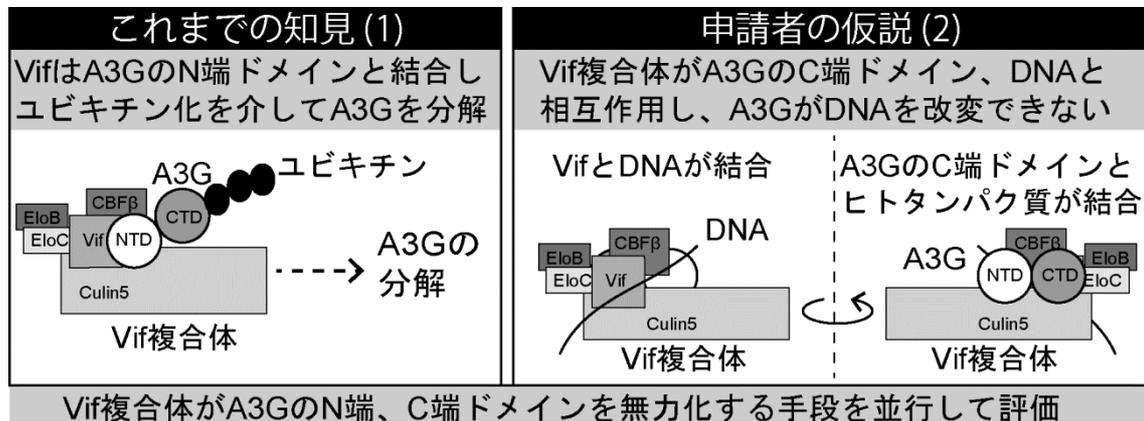


図 2. Vif の A3G 無力化機構、これまでの知見と申請者の仮説。

3. 研究の方法

(1) Vif 複合体は、100 kDa からなる高分子量のタンパク質複合体のため、通常の NMR 法による解析は困難である。そこで、Vif 複合体中の特定の分子のみに選択的な安定同位体標識を施す。Vif 複合体の調製時、CBF β 、EloB、EloC を L-アラビノースで誘導し、培地を交換し IPTG で Vif を発現誘導する。別途発現誘導した Culin5 と共精製し Vif 複合体を得る。この手法を用いて、Vif 複合体中の Vif、もしくは CBF β のみに選択的に安定同位体標識を施し、その NMR スペクトルを取得する。

(2) Vif 複合体及びその関連タンパク質存在下において、A3G の全長、および C 端ドメインの脱アミノ化反応を評価する。更に、A3G と類似の構造を有するタンパク質 A3F (Vif 結合部位を有する)、A3B (Vif 結合部位を有さない) について評価する。Vif 複合体とその関連タンパク質と、DNA との相互作用を評価する。A3G と、Vif 複合体とその関連タンパク質との相互作用を評価する。上記の知見を包括的に評価し、Vif による A3G の活性の阻害のメカニズムを明らかにする。

(3)

(1)(2)で得た手法を用いて、Vif の阻害剤の候補となりえる化合物が、Vif による A3G 無力化と拮抗できるか検証する。ここでは、ペプチドと RNA アプタマーに着目する。

4. 研究成果

(1) 大腸菌を用いた連続発現系を用いて、Vif 複合体中の Vif および CBF β の選択的標識を行い、その NMR スペクトルを測定した。はじめに、Vif のみを ^{15}N 、 ^{13}C で標識した Vif 複合体を調整し、 ^1H - ^{15}N HSQC、 ^1H - ^{15}N TROSY、 ^1H - ^{13}C Methyl TROSY を測定した。いずれも標識自体には成功し、シグナルを得ることはできた。一方で、Vif 複合体が高分子量であるため、アミノ酸残基レベルの分解能のシグナルを検出できる、良好な NMR スペクトルを得ることはできなかった。そこで、高分子量のタンパク質に用いられる、 ^1H - ^{15}N CRIPT-TROSY を測定したところ、Vif の側鎖及び主鎖のアミドプロトンと思われる NMR シグナルを得ることができた。

次に、CBF β のみを ^{15}N で標識した Vif 複合体を調整し、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ、CBF β 単独の場合と比べて、シグナル強度の減少と、一部のシグナルにシフトが見られた。このことは、Vif 複合体中の CBF β が、想定通り複合体中に含まれ、単独の場合とは異なる構造を有していることを示唆している。

更なる改善点として、Culin5 等の重水素標識を施し、必要に応じてアミノ酸選択的標識法等の手法を用いることにより、両者共にアミノ酸残基レベルのシグナルを与えるプローブとして活用できることが期待される。

(2)

Vif 複合体及びその構成タンパク質存在下で、A3G の脱アミノ化反応を、ゲルを用いた生化学的手法及び、実時間 NMR 法^{5,6,7}を用いて定量した。初めに全長 A3G、A3G CTD に Vif 複合体を添加し、そのシトシン脱アミノ化活性を測定したところ、予想に反して、Vif 結合部位を有さない A3G CTD のほうがより強く阻害を受けることが明らかとなった。A3G CTD と等量の Vif 複合体を加えると、A3G CTD の脱アミノ化活性は 1% 以下に低下した。次に Vif 複合体から Culin5 を除いた Vif 四者複合体 (Vif-CBF β -EloB-EloC) で同様の実験を行うと、Culin5 を除くことにより、Vif 複合体の A3G CTD に対する阻害効果は Vif 複合体の 20% 程度に低下した。一方で、Vif、CBF β 、EloB-EloC 複合体、Culin5 について、A3G CTD に対する阻害効果を、生化学的方法で評価すると、これらは全て単独では A3G CTD の活性を阻害しないことが明らかになった。A3G と同様の構造と機能を持つ、A3F、A3B についても、その活性を Vif 複合体が阻害できるか検証したところ、Vif 結合部位を有する A3F、Vif 結合部位を有さない A3B の両方に対して、Vif 複合体は阻害効果を示した。以上より、Vif 結合部位の有無に関わらず、Vif は複数の APOBEC タンパク質 (A3G、A3F、A3B) 全般の活性を直接阻害することが示唆された。

タンパク質 (A3G CTD、Vif 複合体、CBF β 、EloB-EloC 複合体、Culin5) と DNA の相互作用を分析用超遠心、サイズ排除クロマトグラフィー、蛍光異方性測定、ゲルシフトアッセイを用いて検証した。主として分析用超遠心で、Vif 複合体は高濃度では自己会合する傾向があり、1 分子の A3G の基質 DNA に対して、3 分子程度の Vif 複合体が結合することが示唆された。A3G CTD と DNA の結合の強さは Vif 複合体と DNA 間の結合の 1% 以下であった。その他のヒトタンパク質と DNA 間の相互作用は検出できなかった。また、Vif と DNA の相互作用を蛍光異方性測定で検出したところ、Vif 複合体と同程度強さの結合が観測された。以上より、Vif 複合体と DNA 間の結合は、Vif が担っており、それ以外のタンパク質は関与しないことが示唆される。

タンパク質間相互作用、すなわち、A3G CTD と Vif 複合体、Culin5 を除いた Vif 複合体、CBF β 、EloB-EloC 複合体、Culin5 の相互作用を比較した。A3G CTD を Vif 複合体で滴定し、A3G CTD の NMR スペクトルを観測すると、Vif 五者複合体の添加に伴い、A3G CTD のアミド

プロトン由来のシグナルが減少した。A3G CTD と Vif 五者複合体の混合比がおよそ 1:1 の時点では、ほとんど全ての A3G CTD のアミノ酸のアミドプロトン由来のシグナルが消失したが、一方で側鎖のアスパラギン、グルタミンや末端のアミノ酸残基のシグナル強度は、Vif 複合体添加前と変わらなかった。Culin5 を除いた Vif 複合体、Cul5 についても同様の測定を行うと、これらの添加に伴い A3G CTD のアミドプロトン由来のシグナルは減少したが、その減少の程度は Vif 複合体のおよそ半分程度であった。更に、CBF β 、EloB-EloC 複合体についても、A3G CTD のアミノ酸残基由来のシグナル強度が減少した。これらの変化は溶液の塩濃度が増加すると消失した。以上のことから、A3G CTD と Vif 複合体とその構成タンパク質との相互作用が静電相互作用に起因することが示唆された。次にこの結果を裏付けるため、分析用超遠心で分子間相互作用を評価したところ、A3G CTD と Vif 複合体は高分子量の複合体を形成する可能性が示唆された。加えて、CBF β 、EloB-EloC 複合体、Culin5 についても、A3G CTD との相互作用が観測され、分子量から、いずれも 1:1 の結合比で相互作用することが示唆された。

活性阻害実験と、相互作用実験の結果から、Vif 複合体による A3G の阻害は、A3G CTD と Vif 複合体の間の相互作用であることが明らかとなった。更に、Vif 複合体には含まれている人タンパク質が、A3G CTD と相互作用することにより活性を阻害している可能性が示唆された。この阻害効果が Vif によるものか調べるため、Vif の変異体を含む Vif 複合体で評価し Vif の効果を検証した後、(2)で得られた結果を論文として報告する予定である。

(3)

Heat Shock Protein 70 (HSP70) を過剰発現すると、Vif のユビキチン分解は阻害されることが報告されている⁸。そこで、HSP70 を調整し、(2)で確立したアッセイ系に、HSP70 を加え、HSP70 が Vif 複合体による A3G CTD の活性を阻害できるか検証したところ、Vif 複合体の 10 倍量の HSP70 を添加しても、Vif 複合体による阻害効果に拮抗しなかった。

申請者が調製した Vif 複合体を、千葉工業大学の坂本研究室に提供し、Vif に特異的に結合する RNA アプタマーを得た。今後は、このアプタマーが Vif と A3G NTD の相互作用を阻害できるか、Vif 複合体による A3G CTD の阻害に拮抗し得るかを検証する予定である。

引用文献

1. Harris and Liddament, *Nat. Rev. Immunol.*, 2004
2. Guo *et al.*, *Nature*, 2014
3. Wang *et al.*, *Retrovirology*, 2014
4. Binning *et al.*, *PLoS Pathog.*, 2018
5. Kamba *et al.*, *PLoS One*, 2015
6. Kamba *et al.*, *Front. Microbiol.*, 2016
7. Kamba *et al.*, *Phys. Chem Chem. Phys.*, 2018
8. Sugiyama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2011

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Li Wan, Keisuke Kamba, Takashi Nagata and Masato Katahira	4. 巻 1864
2. 論文標題 An insight into the dependence of the deamination rate of human APOBEC3F on the length of single-stranded DNA, which is affected by the concentrations of APOBEC3F and single-stranded DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.04.011	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 Keisuke Kamba, Takashi Nagata and Masato Katahira	4. 巻 20
2. 論文標題 The C-terminal cytidine deaminase domain of APOBEC3G itself undergoes intersegmental transfer for a target search, as revealed by real-time NMR monitoring	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 2976-2981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7CP05171A	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17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kamba K., Nagata T. and Katahira M.
2. 発表標題 Characteristics of the C-terminal domain of anti-viral factor APOBEC3G: mechanism behind a target search and inhibition by HIV-1 Vif protein
3. 学会等名 The XXVIIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 神庭圭佑
2. 発表標題 ヒト抗ウイルス因子APOBEC3Gの標的配列探索と、HIV-VifによるAPOBEC3G阻害メカニズムの研究
3. 学会等名 定量生物学の会・第九回年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 神庭 圭佑、汪 寧馨、雲財 悟、森下 了、永田 崇、片平 正人
2. 発表標題 HIV Vif-ヒトE3ユビキチンリガーゼ複合体はAPOBEC3Gの脱アミノ化を直接阻害する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 鈴木 拓也、万 里、関川 湧斗、田中 陽一郎、神庭 圭佑、片平 正人、永田 崇、坂本 泰一
2. 発表標題 Vif-CBF ⁻ -CUL5-ELOB-ELOC複合体に対するアプタマーの取得と解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 関川 湧斗、水澤 果那、神庭 圭佑、鈴木 拓也、万 里、片平 正人、永田 崇、坂本 泰一
2. 発表標題 Vif-CBF ⁻ -CUL5-ELOB-ELOC複合体に結合する2'F化したaptamerの取得
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 神庭 圭佑、万 里、雲財 悟、森下 了、高折 晃史、永田 崇、片平 正人
2. 発表標題 HIV Vif-ヒトE3ユビキチンリガーゼ複合体によるAPOBEC3タンパク質の脱アミノ化阻害と核酸を含む3者間の分子間相互作用の解析
3. 学会等名 核酸化学 若手フォーラム 2018
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 鈴木 拓也、万里、関川 湧斗、田中 陽一郎、神庭 圭佑、片平 正人、永田 崇、坂本 泰一
2. 発表標題 Vif-CBF -CUL5-EL0B-EL0C複合体に対するアプタマーの取得と解析
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 神庭 圭佑、永田 崇、片平 正人
2. 発表標題 HIV Vif-E3-ユピキチンリガーゼ複合体と核酸の相互作用
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年回
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 神庭圭佑、永田崇、片平正人
2. 発表標題 ストランド間移動に依存するヒト抗ウイルス因子APOBEC3Gの酵素活性の促進と阻害
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 神庭圭佑、永田崇、片平正人
2. 発表標題 脱アミノ化反応の実時間NMR解析で検出するヒト抗HIV因子APOBEC3Gと核酸及び阻害因子間の相互作用
3. 学会等名 第18回若手NMR研究会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 神庭圭佑、永田崇、片平正人
2. 発表標題 APOBEC3Gのストランド間移動の実時間NMR法検出
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Kumagai K., Suzuki T., Sekikawa Y., Kamba K., Wan L., Nagata K., Takaori-Kondo A., Katahira M., Nagata T. and Sakamoto T.
2. 発表標題 Development of RNAs that bind to the Vif - CBF - CUL 5 - ELOB - ELOC complex
3. 学会等名 The 10th International Symposium of Advanced Energy Science
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Kamba K., Wan L., Unzai S., Morishita R. Nagata T. and Katahira M
2. 発表標題 An insight into the target search and HIV Vif-dependent inactivation of APOBEC3F and APOBEC3G elucidated by tracking the deamination events
3. 学会等名 8th Asia-Pacific NMR Symposium
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 神庭 圭佑、万 里、雲財 悟、森下 了、永田 崇、片平 正人
2. 発表標題 HIV Vifによるユビキチン化を介さないヒトAPOBEC3G活性の阻害
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 神庭 圭佑、万 里、雲財 悟、森下 了、永田 崇、片平 正人
2. 発表標題 HIV Vif-ヒトE3ユビキチンリガーゼ複合体によるヒト抗ウイルス因子APOBEC3Gの脱アミノ化阻害の分子メカニズム
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 神庭 圭佑、万 里、永田 崇、片平 正人
2. 発表標題 APOBEC3Fと APOBEC3Gの脱アミノ化速度は、それら及びDNAの濃度、さらにDNAの長さに影響を受ける
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 熊谷紀志、鈴木拓也、関川湧斗、神庭圭佑、万里、永田佳代子、高折晃史、片平正人、永田崇、坂本泰一
2. 発表標題 Vif - CBF - CUL5 - ELOB - ELOC 複合体に結合するアプタマーの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Keisuke Kamba Personal Website/ Achievements https://sites.google.com/view/keisukekambapersonalwebsite2 片平研究室ホームページ/ Achievements/ 原著論文 http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/bio/papers.html</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----