

報告番号	※ 甲 第 10587 号
------	---------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 ヒト由来 HIV 防御タンパク質 APOBEC3 ファミリーの
HIV-1 Vif 結合インターフェイスに関する構造学的研究
氏 名 北村 紳悟

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト細胞には、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (Human Immunodeficiency Virus type 1: HIV-1) などのレトロウイルスに対する抗ウイルス因子 Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic Polypeptide-like 3 (APOBEC3) ファミリーが発現している。一方で HIV-1 は、自身のコードする Viral infectivity factor (Vif) タンパク質により APOBEC3 の分解を促進することで、その抗ウイルス活性から逃れることが知られている。APOBEC3-Vif の結合阻害は抗 HIV-1 薬の新規作用点につながる可能性が高いと考えられている。しかし、それら相互作用に関する分子生物学的および構造学的知見が乏しく、その阻害剤開発には至っていない。

本研究では、ヒト APOBEC3 ファミリーの一員である APOBEC3C タンパク質を研究対象とし、X 線結晶構造解析および構造情報に基づく網羅的な変異解析を行った。その結果、Vif に結合する APOBEC3 として、世界で初めて、APOBEC3C の結晶構造を決定することに成功した。さらに、APOBEC3C 分子上の負に帯電し浅い溝を形成する HIV-1 Vif 結合インターフェイスを見出した。さらに、Vif 結合インターフェイスの構造学的特性は、他のメンバーである APOBEC3F および APOBEC3DE においても高度に保存されていた。これらの研究結果は、APOBEC3-Vif の相互作用に関する新たな知見であり、新規抗 HIV-1 薬開発にもつながる貴重な情報であると考えられる。

1. Introduction

後天性免疫不全症候群 (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS, エイズ) を引き起こす主要原因ウイルスとして HIV-1 が分離された 1983 年以來、これまでに 20 種を超える抗 HIV-1 薬が開発されてきた。そして、これらの薬剤による組合せ治療法 (combination Antiretroviral Therapy: cART) により感染者の予後は大幅に改善された。しかし、患者体内からウイルスを完全に排除する治療戦略はいまだ確立しておらず、感染者は生涯にわたり服薬し続ける必要がある。そのため、長期治療による副作用や薬剤耐性ウイルスの出現が危惧され、既存の治療薬と異なる新たな作用機序をもつ抗 HIV-1 薬の研究開発が必要不可欠だと考えられている。

現在の cART における薬剤の多くは、HIV-1 由来の酵素を標的としている。そこで、新たな作用機序の抗 HIV-1 薬の標的として、ヒト APOBEC3 とその対抗因子である HIV-1 Vif が注目されている。

APOBEC3 ファミリーはシチジン脱アミノ化酵素群で、ヒトでは、A と B, C, DE, F, G, H の 7 種が存在する。APOBEC3 はリンパ球やマクロファージなどの感染細胞内で発現し、産生されるウイルス粒子に取り込まれることで、次の標的細胞におけるウイルス複製過

程を阻害する。一方で HIV-1 Vif は、感染細胞内で APOBEC3 と特異的に結合し、宿主のユビキチン・プロテアソーム系へリクルートすることで APOBEC3 の分解を促進する。その結果、APOBEC3 は HIV-1 感染細胞内で枯渇し、ウイルス粒子に取り込まれなくなる。

7 種存在するヒト APOBEC3 ファミリーは、 Zn^{2+} 配位ドメインを一つ（シングルドメイン）もしくは二つ繰り返した（ダブルドメイン）構造を持つ。これら 7 種のうち、Vif に特異的に結合するドメインを有し分解誘導されるものは、APOBEC3C と APOBEC3DE、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H の 5 種である。さらに、遺伝子系統樹解析から、これら 5 つは、1) A3C/F/DE、と 2) A3G、3) A3H の 3 タイプの Vif 結合様式に分類される。これまで、ヒト APOBEC3 ファミリーの中で分子構造が決定されているのは、Vif との結合能を示さない APOBEC3G の C 末端ドメイン (CTD) のみであり、Vif 結合インターフェイスをもつ APOBEC3 タンパク質の三次元構造情報は得られていなかった。この原因として、APOBEC3 と Vif タンパク質は非常に難溶性のタンパク質であり、可溶化が困難であることが考えられていた。

そこで本研究では、APOBEC3-Vif 相互作用の構造学的特性の解明を目指し、Vif 結合能を示す APOBEC3 タンパク質の分子構造決定を行った。Vif に結合する APOBEC3 のうちで、単純なシングルドメイン構造をとり可溶化が最も容易である APOBEC3C が構造解析に有利であると考え、構造解析の対象として選択した。さらに、APOBEC3C の分子構造情報を手掛かりに細胞を用いた変異解析を行うことで、APOBEC3C および相同性の高い APOBEC3F と APOBEC3DE 分子上の Vif 結合インターフェイスの同定を目指した。

2. Material & Methods

2.1. APOBEC3C タンパク質の結晶構造解析

APOBEC3C の発現には大腸菌発現系を用い、精製と結晶化にはタンパク質凝集抑制剤である L-arginine hydrochloride (L-Arg HCl) を利用した。シンクロトロン放射光を利用し X 線回折データを収集し、分子置換法により APOBEC3C の分子構造を分解能 2.15 Å で決定した。

2.2. APOBEC3C の HIV-1 Vif 結合領域に関する解析

APOBEC3C 分子上の HIV-1 Vif 結合領域を同定するため、ヒト胎児腎細胞株 293T 細胞を用いて変異解析を行った。変異型 APOBEC3C 発現プラスミドと HIV-1 Vif 発現プラスミドを 293T 細胞にコトランスフェクションし、48 時間後の細胞内 APOBEC3C 発現量をウェスタンブロット法により解析した。変異導入により Vif 依存的な分解に抵抗性となったアミノ酸残基部位を網羅的に検索する作業を行い、Vif 結合に重要な残基を同定した。さらに、Vif 抵抗性 APOBEC3C 変異体と Vif の共免疫沈降実験を行い、両者の結合能を評価した。

2.3. 他の APOBEC3 ファミリータンパク質の HIV-1 Vif 結合領域に関する解析

APOBEC3F と APOBEC3DE、APOBEC3G に対しても、APOBEC3C と同様の変異解析を行った。変異型 APOBEC3F に関しては、抗 HIV-1 効果についても評価した。また、決定した APOBEC3C の結晶構造を鋳型に、各 APOBEC3 タンパク質の Vif 結合ドメインのホモロジーモデル構造を作製した。

3. Results

3.1. APOBEC3C タンパク質の結晶構造解析

X 線結晶構造解析法により決定された APOBEC3C の分子構造は、6 本の α ヘリックス ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) と 5 本の β ストランド ($\beta 1$ - $\beta 5$) からなるコア構造を有し、酵素活性中心にはシチジン脱アミノ化酵素ファミリーで高度に保存されている Zn^{2+} イオンを配位していた。また APOBEC3C のコア構造は、既報の APOBEC3G CTD のものと比較してよく類似しており、APOBEC3 タンパク質の基本構造は非常によく保存されていることが示唆された。一方で、両者のループ領域の構造は大きく異なっており、とくに酵素活性中心付近で顕著に異なっていた。それにもかかわらず、酵素活性中心近傍にあり基質認識に重要なアミノ酸残基とその空間的配置は

保存されていた。さらに、これらの残基は配列上 APOBEC3 ファミリー間で高度に保存されていることから、基質認識や核酸結合に重要な機能的構造が保持されていると考えられる。他方で、APOBEC3C と APOBEC3G CTD の Vif 結合能などの機能的な違いは、構造の異なるループ領域や表面に露出したアミノ酸側鎖の特性の差異に起因すると考えられた。

3.2. APOBEC3C の HIV-1 Vif 結合領域に関する解析

Vif に依存的な APOBEC3C の細胞内分解は、APOBEC3C と Vif との結合が前提になる。そこで、APOBEC3C 分子上で Vif 結合に重要なアミノ酸残基を同定するため変異解析を行った。その際、アミノ酸の一次配列情報だけでなく、三次元構造情報を利用した変異解析法 (structure-guided mutagenesis) を用いた。APOBEC3C は、 $\alpha 3$ 領域を APOBEC3G CTD の配列に置換した場合、Vif による分解に抵抗性になることがすでに報告されていた。このことから我々は、決定した構造情報に基づき、 $\alpha 3$ 領域周辺に存在し分子表面に露出したアミノ酸残基を網羅的に抽出し、変異解析を行った。最終的に 99 種の APOBEC3C 変異体を作製・解析し、Vif 依存的な分解に関与する 10 残基 (Leu72 と Phe75, Cys76, Ile79, Leu80, Ser81, Tyr86, Glu106, Phe107, His111) を同定した。さらに、これら 10 残基の各残基における APOBEC3C 変異体と Vif の共免疫沈降実験を行い、すべての Vif 抵抗性となる変異体は Vif との結合能が低下することが確認された。以上の結果より、同定した 10 残基は Vif との結合に重要であることが示された。

また、変異解析の結果に基づき Vif の抵抗強度を数値化し、残基を分子構造にマッピングした。その結果、同定した 10 残基は構造上一ヶ所に集約し、Vif 結合インターフェイスを形成していた。さらに、その構造学的特性を詳細に解析したところ、インターフェイスは分子内部の疎水性、芳香族アミノ酸と分子表面の負電荷アミノ酸からなる浅いくぼみを形成していることが明らかとなった。

3.3. 他の APOBEC3 ファミリータンパク質の HIV-1 Vif 結合領域に関する解析

APOBEC3F と APOBEC3DE の CTD は、APOBEC3C と一次構造上高い相同性を示し、類似する Vif 結合様式を示すと予測されていた。そこで我々は、APOBEC3F CTD および APOBEC3DE CTD において相当する 10 残基について各変異体を作製し、Vif に対する抵抗性を解析した。その結果、APOBEC3F/DE の各変異体は Vif 抵抗性の表現型を示し、APOBEC3F/DE においても APOBEC3C と同様に、10 残基が Vif 結合に重要であることが示唆された。また、Vif に対する抵抗強度を APOBEC3F CTD と APOBEC3DE CTD のモデル構造にマッピングしたところ、重要な 10 残基は APOBEC3C 同様に構造上一ヶ所に集中し、Vif 結合インターフェイスを形成することが明らかとなった。

APOBEC3C と異なる Vif 結合様式を有すると考えられている APOBEC3G N 末端ドメイン (NTD) に関しても変異解析を行った。まず APOBEC3C と APOBEC3G NTD のアミノ酸配列を比較したところ、APOBEC3C で同定した 10 残基のうち 4 残基のみが APOBEC3G NTD において保存されていることが明らかとなった。これら 4 残基における各 APOBEC3G 変異体を作製し、Vif に対する抵抗性を解析した。その結果、4 種の APOBEC3G 変異体は、野生型と同様に、Vif 感受性を示し Vif との結合することが示唆された。これらのことから、APOBEC3C/F/DE で保存された Vif 結合インターフェイスは、APOBEC3G のものとは異なることが示された。

最後に、各 Vif 抵抗性 APOBEC3F 変異体について HIV-1 に対する抗ウイルス効果を解析した。野生型 APOBEC3F は、Vif 非存在下でのみ HIV-1 の感染を抑制する一方、すべての Vif 抵抗性 APOBEC3F 変異体は、Vif の存在に関わらず、HIV-1 の感染を抑制した。以上の結果より、APOBEC3F-Vif の結合阻害が APOBEC3F の分解抑制につながり、最終的には HIV-1 の感染阻害につながると考えられた。

4. Discussion

APOBEC3-Vif 相互作用は新規抗 HIV-1 薬の作用点になる可能性も高いことから、積極的に研究が進められている。しかし、APOBEC3 と Vif の両タンパク質が強い難溶性を示すため、その

構造学的知見は不足していた。本研究においては、比較的可溶性であり、かつ HIV-1 Vif 結合性である APOBEC3C を構造解析の標的とし、最終的に世界で初めて Vif 結合インターフェイスを含む APOBEC3 の結晶構造を決定することに成功した。難溶性である APOBEC3C タンパク質の凝集を抑止するために、様々な条件を検討し、結果的に L-Arg HCl を用いたタンパク質調製法および結晶化法を見出したことがブレイクスルーの契機であったことは間違いないと考えられる。また本研究では、構造を導き出すだけでなく、構造情報を利用して網羅的な変異解析を行うことで、APOBEC3C 分子上で負に帯電し浅い溝を形成する Vif 結合領域を同定することにも成功した。さらに、APOBEC3C と相同性の高い APOBEC3F と APOBEC3DE において Vif 結合インターフェイスが高度に保存されている一方で、APOBEC3G では保存されていないことが明らかとなった。これらの発見は、HIV-1 Vif において、APOBEC3C との相互作用に正電荷アミノ酸を含むモチーフが重要なことや、APOBEC3C/F/DE と APOBEC3G の分解に対する責任領域が異なることと一致していた。

本研究における、APOBEC3-Vif 相互作用の構造特性に関する発見は、従来の cART における既存の治療薬とは異なり、宿主本来の防御機構を利用した新規メカニズムの抗 HIV-1 薬開発に向けて貴重な突破口になったと考えられる。またそれだけでなく、宿主とウイルスの攻防の分子メカニズムを構造生物学的に紐解く新たな知見を与えたと考えられる。