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

北村紳悟

目次

1.	Intr	oduc	tion	1
	1.1.	HIV	-1 感染症と治療薬の歴史	. 1
	1.2.	HIV	-1 の遺伝子とコードされるタンパク質	2
	1.3.	APC	DBEC3G と HIV-1 Vif タンパク質	3
	1.4.	ヒト	APOBEC3 ファミリーと Vif 結合ドメイン	4
	1.5.	本研	一究の目的	5
2.	Mat	erial	& Methods	6
	2.1.	APC	DBEC3C タンパク質の結晶構造解析	. 6
	2.1.1	1.	APOBEC3C タンパク質の発現と精製	. 6
	2.1.2	2.	APOBEC3C タンパク質の結晶化	. 7
	2.1.3	3.	X 線回折データ収集と構造決定	. 8
	2.2.	APC	DBEC3C の HIV-1 Vif 結合に関与するアミノ酸残基の探索	. 9
	2.2.1	1.	HIV-1 Vif 依存的な分解に関する変異体解析	. 9
	2.2.2	2.	共免疫沈降実験	. 9
	2.2.3	3.	ウイルス粒子への取り込みの解析	10
	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	.11
	2.3.1	1.	HIV-1 Vif 依存的な分解に関する変異体解析	.11
	2.3.2	2.	共免疫沈降実験	.11
	2.3.3	3.	ウイルス粒子への取り込みの解析	.11
	2.3.4	4.	HIV-1 感染価に対する影響についての解析	.11
	2.3.5	5.	ホモロジーモデル構造の構築	.11
3.	Resu	ults		12
	3.1.	APC	DBEC3C タンパク質の結晶構造解析	12
	3.1.1	1.	APOBEC3C タンパク質の発現と精製,結晶化,構造決定	12
	3.1.2	2.	APOBEC3G CTD との構造比較	12
	3.2.	APC	DBEC3C の HIV-1 Vif 結合領域に関する解析	14
	3.2.1	1.	Structure-guided mutagenesis による HIV-1 Vif 結合領域の探索	14
	3.2.2	2.	Vif 抵抗性 APOBEC3C 変異体のウイルス粒子への取り込みの解析	14
	3.2.3	3.	APOBEC3C の HIV-1 Vif 結合インターフェイスの構造特性	15
	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	16
	3.3.1	1.	APOBEC3F と APOBEC3DE の HIV-1 Vif 結合インターフェイスの保存	性
			16	

	3.3.2.	APOBEC3G における HIV-1 Vif 結合インターフェイスの違い	16
	3.3.3.	Vif 抵抗性 APOBEC3F の抗 HIV-1 活性	17
4.	Discussi	ion	18
Ack	mowledg	ement	21
Dαf	aroncos		93
IXCI	erences		20
Tal	ole and Fi	ironres	31

Abstract

ヒトの apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide—like 3(APOBEC3: A3)は細胞内で発現するシチジン脱アミノ化酵素である. ヒト APOBEC3 ファミリーには 7 種のメンバー(A と B, C, DE, F, G, H)が存在し、ヒト免疫不全ウイルス 1 型(human immunodeficiency virus type 1: HIV-1)などレトロウイルスの増殖を抑制する宿主防御因子である. 一方で、HIV-1 のコードするタンパク質 viral infectivity factor(Vif)は、宿主のユビキチン・プロテアソーム系を活用して APOBEC3 の分解を促進する. これらのことから、APOBEC3-Vif の結合阻害が、APOBEC3 の分解を抑制し本来の抗ウイルス効果を発揮させる新規抗 HIV-1 薬の作用点になりうると考えられている。しかし、APOBEC3-Vif の相互作用における機能的、かつ構造学的知見が乏しく、APOBEC3-Vif 結合阻害薬の開発が進んでいない.

本研究において、我々は Vif 結合性である APOBEC3C(A3C)タンパク質の結晶構造を決定し、さらに、構造情報を基とした網羅的な変異解析により HIV-1 Vif 結合領域を同定した.構造上、同定された結合インターフェイスは、分子内部に疎水性と芳香族アミノ酸を配し、負電荷表面を呈する浅い溝を形成していた. また、同様の Vif 結合インターフェイスの構造学的特性は APOBEC3F(A3F)および APOBEC3DE(A3DE)でも高度に保存され、APOBEC3G(A3G)では保存されていなかった. なお、A3C/F/DE に共通した Vif 結合領域は、A3G において HIV-1 Vif 相互作用に関与するモチーフから三次元構造上に離れて位置し、ヒト APOBEC3 タンパク質分子に異なる複数種の HIV-1 Vif 結合インターフェイスが存在することが示された.

これらの研究結果は、APOBEC3-Vif 相互作用の詳細な理解に新たな知見を与え、新規抗 HIV-1 薬開発にもつながる重要な情報であると考えられる.

1. Introduction

1.1. HIV-1 感染症と治療薬の歴史

ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus: HIV)は,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であ る. HIV は二種類存在し、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) は 1983 年に 1 、ヒト免疫不 全ウイルス 2型 (HIV-2) は 1986 年にそれぞれ初めて分離された 2 . HIV-2 の病原性は HIV-1 に比べ低いことが知られている. HIV-1 の発見以来, HIV/エイズ分野は世界的に精力的な 研究が行われ, 二年後の 1985 年には最初の抗 HIV-1 薬ジドブシン (別名 azidothymidine も しくは AZT) が見出され³, さらに翌二年後の1987年には米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) により承認された. その後も, 研究者の不断の努力により, ウイルス 複製のさまざまな段階を標的とした抗 HIV-1 薬が開発され ⁴, 2013年3月現在では 21 種 の治療薬が日本国内で用いられている⁵. また治療薬の選択肢が増えたことにより,三剤以 上の抗 HIV-1 薬を利用した多剤併用療法 (complementary anti-retroviral therapy: cART) が可 能となった 68. この治療法により患者血液中のウイルス量を検出限界以下まで抑えること に成功し, cART が始まった 1995年以降, HIV-1 感染症による死亡者数は大幅に減少した 9 . しかし一方で、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存在せず、HIV-1 感染者は生涯にわたり服薬し続けなければならない.そのため,長期服薬による副作用の 問題に加え, 既存薬剤の多くが易変異性である HIV-1 由来の酵素を標的としていることに 起因する薬剤耐性ウイルス出現などの問題に直面することが危惧されている. そこで, 既 存の治療薬と異なる新たな作用機序を持つ抗 HIV-1 薬の研究開発が必要不可欠だと考えら れている.

1.2. HIV-1 の遺伝子とコードされるタンパク質

HIV-1 はレトロウイルス科レンチウイルス亜科に分類され、約 9,000 base の 2 コピーの一本鎖 (+) RNA がウイルスゲノムとしてウイルス粒子内に存在する. その遺伝子には、すべてのレトロウイルスに共通した Gag と Pol, Env タンパク質に加え、遺伝子発現調節因子 (Tat と Rev) とウイルス増殖を補佐するアクセサリータンパク質群 (Vif と Vpr, Vpu, Nef) がコードされている ¹⁰. そのうち Pol タンパク質が、複製に必須の 3 種の酵素(逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、プロテアーゼ (PR))を含んでいる. RT は自身のRNA ゲノムから cDAN を合成し ¹¹、IN は合成された cDNA を宿主染色体に組み込む (インテグレーション) ¹². PR は前駆体として発現される Gag-Pol タンパク質の切断を行うことで、出芽後の子孫ウイルスを感染性をもつ粒子へと成熟させる役目を担う ¹³. 現在臨床で使用される抗 HIV-1 薬の多くが、これら 3 種のウイルス由来酵素を標的としている ^{4,14}.

Gag, Pol, Env, および Tat, Rev タンパク質はウイルスの増殖に必須である一方で、4種のアクセサリータンパク質は、細胞種によって必ずしも必須ではない.それに加えて、アクセサリータンパク質は HIV-1 と HIV-2 間において保存されていないものが存在することから、HIV/エイズ研究の初期には、その機能や必然性は断片的にしか明らかとなっていなかった.しかし、2002年になって宿主防御因子である APOBEC3 タンパク質と、その解除因子としての Vif の機能が新たに発見されて以来 ¹⁵、本来ヒトの細胞には外来ウイルスの増殖を阻止する細胞内システムが存在し、一方、ウイルスは抗ウイルスシステムを解除するためにアクセサリータンパク質を獲得したのではないか、という知見が次々と出されてきた ¹⁶.またそれと同時に、新たな作用機序の抗 HIV-1 薬の標的として Vif を始めとするアクセサリータンパク質が注目されることとなった.

1.3. APOBEC3G と HIV-1 Vif タンパク質

アクセサリータンパク質である HIV-1 Vif は約 190 アミノ酸からなり,分子量約 23 kDa のタンパク質である. HIV-1 の感染において, Vif はウイルス粒子が初代 CD4 陽性 T 細胞やマクロファージなど(非許容細胞)から産生される場合には必須であるが,293T や SupT1, CEM-SS など (許容細胞) においては非必須である $^{17-19}$. また,非許容細胞から産生される vif 欠損 HIV-1 の感染価は $^{1/100}$ ~ $^{1/1,000}$ に低下することが見出されており $^{20-22}$,この表現型は, Vif が標的細胞でなくウイルス産生細胞で発現されることが必須であった $^{17-19}$. また,非許容細胞から産生された vif 欠損 HIV-1 では,複製における逆転写反応効率が低下することが知られていた 19,23,24 . これらの論拠を基に,2002 年,cDNA subtraction 法によりその原因遺伝子として APOBEC3G (当時は CEM15 と呼ばれた) が同定され 15 ,非許容細胞には A3G タンパク質が発現しており,許容細胞には発現していないことが明らかになった. さらに, Vif は抗ウイルス因子である A3G をウイルス産生細胞内で分解誘導することが見出された $^{25-28}$.

A3G は細胞質に局在するシチジン脱アミノ化酵素であり、一本鎖 DNA の CC 配列中の 3'側のシチジンを脱アミノ化する ^{29,30}. 一本鎖 DNA のシチジン脱アミノ化反応によりデオキシウリジン (dU) が生じるため、相補鎖に G から A への過変異 (G-to-A Hypermutation) が誘導される. また、一本鎖 RNA に対しても、酵素活性は示さないものの結合能は示す ^{29,30}. A3G を始めとする APOBEC3 ファミリータンパク質の抗 HIV-1 メカニズムを Fig. 1 に概説する. なお、Fig. 1 および以下に記す知見は、おもに A3G の研究において得られたものであるが、他の APOBEC3 タンパク質においても多くが共通していると考えられている. ウイルス産生細胞で発現した A3G は、ウイルスのゲノム RNA に結合して出芽するウイルス粒子に取り込まれ、ウイルスの成熟とともに粒子内コアに集約される ³¹⁻³³. そして次の感染細胞において逆転写反応(あるいは、それ以降の過程も含む)を阻害する ^{16,34}. その分子機序として、酵素活性依存的なものと非依存的なものが混在し、1)脱アミノ化反応により生じた dU がきっかけとなり、逆転写産物が不安定化・分解される ^{25,27,29,35}、2)酵素活性非依存的に逆転写伸長反応を抑制する ³⁶⁻³⁸、3) G-to-A Hypermutation によって error catastrophe ³⁹ に陥る ⁴⁰、などが考えられている.

Vif による A3G の分解機構では、Vif と A3G の特異的な結合が重要である.次いで、A3G は ElonginB/C-Cullin5-Rbx2 および細胞内補助因子 CBF $\beta^{41,42}$ からなる E3 ユビキチンリガーゼ複合体へリクルートされる.その結果、A3G のポリユビキチン化、およびその後のプロテアソームによる分解が促される 43,44 (Fig. 1).これにより、子孫ウイルス粒子にA3G が取り込まれなくなり、HIV-1 は増殖が可能となる.これらの知見から、Vif-APOBEC3の結合を阻害する低分子化合物が、APOBEC3 の分解を抑制しヒトが本来持つ抗 HIV-1 機能を発揮させる新規治療薬になりうると考えられている.

1.4. ヒト APOBEC3 ファミリーと Vif 結合ドメイン

ヒトの22番染色体上には、APOBEC3G を含む 7 種(A と B, C, DE, F, G, H)の APOBEC3 遺伝子群がタンデムにコードされている(Fig. 2a). APOBEC3 タンパク質は、 $H-x_1-E-x_{25-31}-C-x_{2-4}-C$ モチーフにより特徴づけられる保存された Zn^{2+} 配位ドメイン(Z ドメイン)を一つもしくは二つ有している 45,46 . さらに、このドメインは系統学的に Z1、Z2、Z3 の 3 タイプに分類される 45,47 . A3A と A3B の C 末端ドメイン(C-terminal domain: CTD),A3G CTD が Z1 に、A3B の N 末端ドメイン(N-terminal domain: NTD)と A3C, A3DE と A3F の両ドメイン、A3G NTD が Z2 に、A3H のみが Z3 に分類される。 Z2 タイプに関してさらに詳細に比較すると、サブグループ(1) A3F NTD(A3B NTD と A3DE NTD を含む)、の 3 種に分類される A3E (Fig. 2b).

これまでの研究により、それぞれのメンバーが、HIV-1 以外にも B 型肝炎ウイル (hepatitis B virus: HBV) など様々なウイルスやレトロトランスポゾンに対して抑制効果を示すことが知られている ⁴⁹. その中でも、A3F と A3H haplotype II (A3H hapII) が A3G に次いで強い抗 HIV-1 活性を示すことが知られている ⁵⁰⁻⁵⁴. 一方で、HIV-1 Vif も A3G 以外のAPOBEC3 タンパク質(A3C と A3DE、A3F、A3H)の分解を誘導する ⁴⁸. ヒト APOBEC3ファミリーの Z ドメインのうち、Z3 タイプの A3H hapII と、Z2 タイプのサブグループ (2) A3G NTD、(3) A3F CTD、が HIV-1 Vif と特異的に結合することが知られている (Fig. 2b) ⁵⁵⁻⁵⁷.

A3G NTD に関して、A3G-Vif 結合のヒト-サル間の種特異性に関与するアミノ酸残基 (Asp128) が同定され $^{58-61}$, さらにこれを含む周辺のアミノ酸残基群、Asp128-Pro129-Asp130 (128 DPD 130) モチーフが HIV-1 Vif との相互作用に重要であることが報告されている 62 . 一方で、A3F CTD に関しては、二個の異なるグルタミン酸残基 (Glu289 と Glu324) が Vif 結合に関与することが報告されている 56,63 . 興味深いことに、アミノ酸配列比較や二次構造予測による考察から、A3G NTD において Vif との結合に重要な 128 DPD 130 モチーフと、A3F CTD における二つのグルタミン酸残基は、構造的に離れた位置に存在することが示唆されていた 48,56,63 . しかしながら、分子構造が決定されている APOBEC3 のドメインは、Vif に対して非結合性である A3G CTD (Z1 タイプ) のみであり $^{64-67}$ 、APOBEC3 タンパク質の Vif 結合インターフェイスの三次元構造情報はほぼ得られていなかった.このことが、APOBEC3-Vif 相互作用の詳細な理解および、その結合阻害を標的とした新規抗 HIV-1 薬探索の大きな障壁になっていた.

1.5. 本研究の目的

本研究の目的は、APOBEC3 と HIV-1 Vif の相互作用の構造学的特性を解明することである. 前述のとおり、Vif 結合インターフェイスを含む APOBEC3 全長もしくはドメインの分子構造は決定されていない. このことは、核酸結合タンパク質特有の性質である APOBEC3 の強い難溶性に起因する. そこで我々は、Vif に結合する APOBEC3 の中で、単純なシングルドメイン構造をとり、比較的可溶化が容易で構造解析に有利であると期待された"A3C"をおもな研究対象とした. さらに、A3C の分子構造情報を手掛かりに培養細胞を用いた変異解析を行うことで、A3C および相同性の高い A3F CTD と A3DE CTD 分子上の HIV-1 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

2.1.1. APOBEC3C タンパク質の発現と精製

大腸菌での A3C 発現用プラスミドは、 pET41a(+) (Novagen) に A3C の配列を組み込んだもの (pET41 GST-A3C) を使用した. そのため, A3C は GST タグと His タグ, enterokinase 認識配列を N 末端に有する融合タンパク質 (GST-A3C) の形で発現された.

GST-A3C の発現は、大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS Cells (Novagen) を用いて行った.まず、10 μ L の Rosetta2 (DE3) pLysS Competent Cells に 50 ng の pET41 GST-A3C を加えヒートショック法によりトランスフォーメーションした.トランスフォーメーションした菌体を、25 μ g mL-1 Kanamycin sulfate および 34 μ g mL-1 Chloramphenicol を含む Luria-Bertani (LB) 培地に植菌し、37°C で一晩振蘯培養した.その後、1 L の LB 培地(抗生物質濃度は同上)に対し 10 mL の一晩培養した培養液を加え、OD $_{600}$ の値を測定しながら 37°C で培養を行った. OD $_{600}$ の値が 0.6 になった時点でいったん培養を止め、20°C まで冷却した.冷却後、GST-A3C を発現誘導するため、終濃度 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) と 1 μ M ZnSO $_4$ を添加し、さらに 20°C で 20 h 振蘯培養した.

発現誘導した大腸菌を遠心分離によりペレットとして回収した. 回収した大腸菌ペレットに Lysis buffer (1,000 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 25 mM HEPES, pH 7.0) を加え懸濁した. 懸濁した菌体を超音波破砕とフレンチプレスにより完全に破砕した. 破砕した菌体溶液を遠心分離し,上清を MILLEX-HV 0.80 μm フィルター (Millipore) でろ過し, GST-A3C を含む可溶性画分として回収した.

エコノカラム (BIO-RAD) に 25 mL の Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) を充填し、Lysis buffer でレジンの平衡化を行った。GST-A3C を結合させるため、可溶性画分を流速約 0.5 mL min⁻¹ でレジンに滴下した後に、Lysis buffer、GST wash buffer(500 mM NaCl、10 mM CaCl₂、10% glycerol、5 mM 2-ME、50 mM Tris HCl、pH 8.0)の順でレジンを洗浄した。その後、GST elution buffer(GST wash buffer に 40 mM reduced L-glutathione を含む)で、レジンに結合した GST-A3C を溶出した.

Recombinant Enterokinase (rEK) (Novagen) を用いて、溶出した GST-A3C から GST タ グを切断除去した. 切断反応は cleavage buffer (350 mM NaCl, 12 mM CaCl₂, 2% glycerol, 1 mM 2-ME, 1% Triton X-100, 30 mM Tris HCl, pH 7.4) 中で 20°C で一晩行った.

タグ切断後のサンプルを Hitrap SPXL 5 mL(GE Healthcare)を 3 本用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した. 精製前に、サンプル を IEX start buffer(10% glycerol、5 mM 2-ME、50 mM Tris HCl、pH 8.0)で 3 倍希釈し、MILLEX-HV 0.22 μm フィルター(Millipore)でフィルタリングした. 溶出は、ÄKTAprime (GE Healthcare)を用いた IEX start buffer と IEX elution buffer(IEX start buffer に 1,000 mM NaCl と 200 mM L-arginine hydrochloride(L-Arg HCl)を含む)のリニアグラジエントにより行った.

最後に、HiLoad 26/60 superdex75(GE Healthcare)と ÄKTAprime を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行った.まず、陽イオン交換クロマトグラフィー後のサンプルをCentriprep 10kDa(Millipore)で約 10 mL まで濃縮し、MILLEX-HV 0.22 μm フィルターでフィルタリングした.Running buffer として、GF buffer(400 mM NaCl、1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride(TCEP)、10 mM Tris HCl、pH 8.0)もしくは Cr buffer(50 mM NaCl、300 mM L-Arg HCl、1 mM TCEP、10 mM HEPES、pH 8.0)を使用した.ゲルろ過カラムの検量には、Gel Filtration Calibration Kit LMW(GE Healthcare)を分子量マーカーとして使用し、検量線を作成した.検量データ(溶出体積(Ve)、排除限界体積(Vo)、カラム体積(Vc))から溶液中の A3C の分子量を計算した.

2.1.2. APOBEC3C タンパク質の結晶化

最初の結晶化実験では、GF buffer でゲルろ過精製した A3C に R buffer (800 mM L-Arg HCl, 20 mM Tris HCl, pH 8.0) を等量加えた後に、Amicon Ultra-0.5 mL 10K (Millipore) を用いて濃縮した 7 mg mL⁻¹ A3C (200 mM NaCl, 400 mM L-Arg HCl, 0.5 mM TCEP, 15 mM Tris HCl, pH 8.0) を結晶化用サンプルとして使用した.結晶化スクリーニングは、タンパク質:リザーバー溶液=1 μL: 1 μL のシッティングドロップ蒸気拡散法で 20℃ もしくは 4℃ で行った.結晶化スクリーニングキットとして、Crystal Screen と Crystal Screen 2、Index、PEG/ION(すべて Hampton Research)、Wizard I&II(Rigaku)、JCSG-plus Screen solution (Molecular Dimensions) を 100 μL リザーバー溶液として使用した.

初期結晶を得ることが難航したため、結晶核発生を促すためのレーザー照射を用いた結晶化実験も実施した. 濃縮 A3C の調製は最初の結晶化実験と同様に行った. レーザー照射および結晶化スクリーニングは株式会社創晶の結晶化受託サービスを利用した. 結晶化スクリーニングは、タンパク質: リザーバー溶液= $0.5~\mu$ L: $0.5~\mu$ L のシッティングドロップ蒸気拡散法で 20° C で行った. スクリーニングキットとして、SaltRx (Hampton Research) を $100~\mu$ L リザーバー溶液として使用した. 結晶化プレートを仕込んだ 3~日後と 7~日後の 2~回レーザーを照射した.

さらに、L-Arg HCl を用いた結晶化実験も行った。まず、Cr buffer でゲルろ過精製した A3C に終濃度 500 mM になるように L-Arg HCl を加え、 4° C で一晩静置した。その後、サンプルを Cr buffer に再び透析し、Amicon Ultra-0.5 mL 10K を用いて 10 mg mL $^{-1}$ まで濃縮した。結晶化スクリーニングは、タンパク質:リザーバー溶液=0.5 μL: 0.5 μL のハンギングドロップ蒸気拡散法で 20° C で行った。結晶化スクリーニングキットとして、300 mM L-Arg HCl を加えた 0.85x 濃度の JCSG-plus Screen solution を 300 μL リザーバー溶液として使用した。初期結晶は、No. 1-15(17% PEG6000、300 mM L-Arg HCl,85 mM bicine、pH 9.0)の条件で得られた。さらに結晶化条件の展開を行い、タンパク質:リザーバー溶液=1 μL: 2 μL のハンギングドロップ蒸気拡散法で 300 μL リザーバー溶液(14% PEG6000、300 mM L-Arg HCl,85 mM bicine、pH 9.0)、 20° C の条件から、良質な結晶が得られた。

2.1.3. X線回折データ収集と構造決定

得られた結晶を、抗凍結溶液(30% PEG6000、300 mM L-Arg HCl、85 mM bicine、pH 9.0) にソーキングし、95 K の窒素ガスで瞬間凍結した. X 線回折データセットは、高エネルギー加速器研究機構 Photon factory (PF) のビームライン BL-17A でシンクロトロン放射光 (0.98 Å) を利用し収集した。データセットのデータ処理とスケーリングには、HKL2000 program package 68 を使用した.

分子構造決定には、結晶構造 A3G 191–384-2K3A (PDB 3IR2) ⁶⁷ をサーチモデルとした、CCP4 suite ⁶⁹ の MOLREP⁷⁰ による分子置換法で行った。その後、COOT⁷¹ による手動精密 化と CCP4 suite の REFMAC5⁷² による自動精密化を交互に行い、構造を精密化した。原子座標と構造因子は、accession ID 3VOW として Protein Data Bank に登録した。構造精密化の統計値を Table 1 に示す。タンパク質構造の描画には、PyMOL⁷³ を使用した。クリスタルパッキングの解析には PDBePISA (PDB in Europe, protein interfaces, surfaces and assemblies) ⁷⁴を用いた。タンパク質表面電荷の解析には、PyMOL のプラグインとして APBS Tool⁷⁵ を用いた。

2.2. APOBEC3C の HIV-1 Vif 結合に関与するアミノ酸残基の探索

2.2.1. HIV-1 Vif 依存的な分解に関する変異体解析

哺乳類細胞で A3C を発現するため、pcDNA A3G (Myc-His)²⁶ の A3G 遺伝子部位を、国立感染症研究所の徳永研三先生から分与いただいた pCAGGS APOBEC3⁷⁶ 由来の A3C 遺伝子配列に置換することで A3C 発現プラスミドを作製した. 各種 A3C 変異体の発現プラスミドは、PCR-base の部位特異的変異導入法により作製し、DNA Sequencing 法により変異導入を確認した. Vif 発現プラスミド pcDNA-HVif^{26,77} は、米国 NIH の Dr. Klaus Strebel から分与頂いた.

継代したヒト胎児由来腎臓 293T 細胞を 12 well plate (Becton, Dickinson and Company) に播種した. 野生型もしくは変異型 A3C 発現プラスミド (2 μg) と pcDNA-HVif もしくは pcDNA 3.1 (一) control (4 μg) を, FuGENE HD Transfection Reagent (Roche) を用いたリポフェクション法により, 293T 細胞にコトランスフェクションした. トランスフェクション 48 h 後に, 細胞を PBS で懸濁し回収した. 回収した細胞に 2-ME を含む Laemmli buffer (BIO-RAD) を加えサンプル調製し, SDS PAGE で分離し, Western Blot 法により目的のタンパク質を検出した. A3C と Vif, β-tublin の検出には, それぞれ抗 His タグ mAb (1/3,000) (D291-3; Medical & Biological Laboratories Co.) と, 抗 Vif mAb (1/500) (ab66643; Abcam), 抗 β-tubulin ウサギポリクローナル抗体 (1/1,500) (ab6046; Abcam) を, 検出用の二次抗体には horseradish peroxidase—conjugated secondary antibodies (1/20,000) (Pierce) を使用した. 各タンパク質の可視化は、SuperSignal West Dura (Pierce) を用いた増強化学発光により行った. 検出したバンド強度を ImageQuant TL (GE Healthcare) により数値化し、Vif 非存在下における A3C のバンド強度を 100% とし、Vif 存在下における A3C 発現量 (バンドの強度) の割合 (A3C の残存率) を Vif 抵抗性レベルとして算出した

2.2.2. 共免疫沈降実験

293T 細胞内で発現した A3C-Vif 複合体の共免疫沈降実験に際し, ElonginC との結合能を欠損した Vif SLQ→AAA 変異体発現プラスミド (pcDNA-HVif SLQ→AAA) を, PCR-base の部位特異的変異導入法により pcDNA-HVif から作製し, DNA Sequencing 法により変異導入を確認した.

野生型もしくは変異型 A3C 発現プラスミドを pcDNA-HVif SLQ→AAA もしくは pcDNA 3.1 (¬) control とともに, FuGENE HD Transfection Reagent を用いたリポフェクション法により 293T 細胞にコトランスフェクションした. トランスフェクション 48 h 後に細胞を回収し, lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 μg mL⁻¹ of RNase A in PBS) に protease-inhibitor cocktail (Sigma) を加えたもので細胞を溶解した. A3C-Vif 複合体を 抗 His タグ ウサギ血清 (1/100) (PM032; Medical & Biological Laboratories Co.) に 4℃ で 2 h 結合させ, さらに Protein G-Dynabeads (磁気ビーズ) (Invitrogen) を加え 4℃, 30 min で免疫複合体を回収した. 免疫沈降ビーズを lysis buffer で洗浄した後, 結合したビー

ズ-複合体を 2-ME を含む Laemmli buffer で溶出した. 溶出したサンプルを, 前述と同様の 方法で Western blot 法により解析した.

2.2.3. ウイルス粒子への取り込みの解析

野生型および変異型 A3C について、ウイルス粒子への取り込み効率を比較するため、vif 欠損型 HIV-1 の分子クローンである pNL4-3 vif(-) を使用した。まずウイルス粒子を回収するために、4 μ g の pNL4-3vif(-) と 2 μ g の A3C 発現プラスミドもしくは pcDNA 3.1 (-)control を、FuGENE HD Transfection Reagent を用いたリポフェクション法により、HeLa 細胞にコトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 h で細胞上清を回収した。細胞上清は遠心(1,000 g、5 min、25°C)により debris を除去し、MILLEX-HV 0.45 μ m フィルターでフィルタリングした。さらに上清を 20% sucrose cushion を用い超遠心(15,000g、75 min、4°C)を行い、ウイルス粒子をペレットとして濃縮精製した。濃縮されたペレットを 2-MEを含む Laemmli buffer で溶解した。溶解したサンプルを、前述と同様の方法で Western blot 法により解析した。ウイルス粒子を形成する p24 (CA) の検出には、米国 NIH の the AIDS Research and Reference Reagent Program から分与された 抗 p24 (CA) ウサギ血清(1/10,000)(Cat# 4250)を用いて検出した。

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

2.3.1. HIV-1 Vif 依存的な分解に関する変異体解析

A3C と同様の手法で、A3F と A3DE、A3G の解析を行った.

2.3.2. 共免疫沈降実験

A3C と同様の手法で、A3F と A3DE、A3G の解析を行った.

2.3.3. ウイルス粒子への取り込みの解析

A3C と同様の手法で、A3F の解析を行った.

2.3.4. HIV-1 感染価に対する影響についての解析

LuSIV 細胞 ⁷⁸ を用いた single-round infectivity assay 法により,ウイルスの感染価を測定した。まず,HIV-1 分子クローン pNL4-3WT もしくは pNL4-3 vif(-) と A3F 発現プラスミドもしくは pcDNA 3.1 (-)control を HeLa 細胞にコトランスフェクションし,ウイルスを回収した。方法は,粒子への取り込み(3.2.3.章)と同様の手法を用い,上清のウイルスをフィルタリングし回収した。回収したウイルスを,米国 NIH の the AIDS Research and Reference Reagent Program から入手した LuSIV 細胞 に感染させた。ウイルス感染価は,感染 24 h 後に Luciferase 活性を指標に測定した。レポーター遺伝子産物である firefly luciferase の基質として,Bright-Glo(Promega)を加え,細胞が溶解した後に firefly luciferase による化学発光を測定した。ウイルス感染価は,感染したウイルス量あたりの相対的 Luciferase 活性値(RLU)として算出した。ウイルス量は,HIV-1 p24 antigen ELISA(ZeptoMetrix)により定量した.

2.3.5. ホモロジーモデル構造の構築

A3F および A3DE の CTD と A3G NTD に関するホモロジーモデル構造は、決定した A3C の結晶構造を鋳型に Discovery Studio 3.1^{79} (Accelrys) により構築した。 タンパク質構造の描画には、 $PyMOL^{73}$ を使用した.

3. Results

3.1. APOBEC3C タンパク質の結晶構造解析

3.1.1. APOBEC3C タンパク質の発現と精製, 結晶化, 構造決定

APOBEC3 は核酸結合タンパク質であり、凝集・難溶性を示すことが知られている. 野生 型全長の A3C タンパク質 (アミノ酸残基 1-190) は、大腸菌発現系を用い GST 融合タン パク質として低温(20℃)で発現誘導することで、可溶性画分に大量に発現することができ た. 次いで, NaCl や界面活性剤 TritonX-100, タンパク質凝集抑制剤として L-Arg HCl^{80,81} な どを用い pH や濃度条件を検討しながらタグ切断・精製を行うことで,高純度・高濃度の A3C タンパク質を得ることに成功した (Fig. 3a,b). 特に, A3C 可溶化に対する L-Arg HCl の効 果は大きく, L-Arg HCl を含まないバッファー条件では A3C 濃度が 0.6 mg mL⁻¹ 程度まで しか上昇しなかったのに対し、400 mM L-Arg HCl を含む条件では、A3C タンパク質は 45 mg mL⁻¹ 以上まで濃縮された. 次に、濃縮 A3C を用い通常の結晶化スクリーニングを 1,800 以上の条件で行ったが、結晶は得られなかった。そこで我々は、タンパク質結晶化溶液に 対してレーザーを照射して強制的な結晶核発生を行う手法 ⁸² を試みた. しかしながら, こ の手法でも結晶を得ることはできなかった. 次に, 結晶化ドロップ中での A3C タンパク質 の安定化を図り、L-Arg HCl をリザーバー溶液にも添加したところ初期結晶が得られた(Fig. 3c. 左). さらに、この手法で結晶化条件を展開することにより良質の結晶が得られた(Fig. 3c, 右). この結晶の X 線回折データを収集することにより, 分解能 2.15 Å で A3C の分子構 造を決定することに世界ではじめて成功した(Fig. 4a と Table 1).

3.1.2. APOBEC3G CTD との構造比較

A3C の分子構造は、6 本の α ヘリックス(α 1- α 6)と 5 本の β ストランド(β 1- β 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よく保存されている \mathbf{Zn}^{2+} イオンを配位していた $\mathbf{83}$ (**Fig. 4a**). 非対称単位中に二分子の A3C が存在したが(A 鎖と B 鎖),両者ともよく類似したコア構造を有していた.A3C の構造を既報の A3G CTD (PDB 3IR2) $\mathbf{67}$ の構造に重ね合わせたところ,全体の 86% にあたるコア構造を形成するアミノ酸残基の $\mathbf{C}\alpha$ RMSD は 1.36 Å であった.このことから,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,両者における生化学的特性の差異(酵素活性や核酸結合能、Vif 結合能など)は,コア構造以外の部分に起因することが示唆された.実際,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の loop 1 と 3,7,において違いが顕著であった(**Fig. 4b-e**).それにもかかわらず,酵素活性中心の底に位置するアミノ酸残基(**Fig. 4b, A3C**; Arg30 と Asn57,His66,Trp94,Arg122,Tyr124,**Fig. 4c**,A3G CTD;Arg215 と Asn244,His257,Trp285,Arg313,Tyr315)は構造的にもよく保存されていた.これらの残基は,酵素活性や核酸結合に関与すると報告されているものもあり $\mathbf{64}$ 6.5.84,APOBEC3 ファミリー間で保存された重要な機能を担っていると考えられる.他方で,A3C と A3G CTD の Vif 結合能の違いは,コンホメー

ション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違いに起因すると考えられた.

また興味深いことに、A3C の β 2 ストランドは、A3G CTD (PDB 3IR2) と異なり、一本で真っ直ぐなシートを形成していた(Fig. 4d,e). これは APOBEC2(A2)の結晶構造 (PBD 2NYT) 85 と同様のものであった。さらに A2 の構造においては、おそらく N 末側領域を欠失したタンパク質を用いたため、結晶構造内の隣接する二分子間でお互いの β 2 ストランドを介した相互作用が観察されていた。一方で A3C の結晶構造においては、二分子間の β 2- β 2 相互作用を介した分子間接触は、少なくとも主要な 20 の接触表面に関しては観察されなかった(Fig. 5). さらに A3C のゲルろ過においては、ほとんどの A3C タンパク質が単量体のフラクションとして回収された(Fig. 3b). 今回 A3C における β 2 を介したホモ多量体化は確認されなかったが、A3G の高次多量体化が広く知られていることから $^{86-88}$ 、A3C もタンパク質濃度依存的または核酸結合依存的な多量体を形成する可能性はあると考えられる.

3.2. APOBEC3C の HIV-1 Vif 結合領域に関する解析

3.2.1. Structure-guided mutagenesis による HIV-1 Vif 結合領域の探索

Vif に依存的な A3C の細胞内プロテアソーム分解は、A3C と Vif との結合が前提にな る. そこで、A3C 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. A3C は一個のグルタミン酸残基(Glu106)のリ シンへの変異(E106K)により 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 ⁵⁶. このことから我々は, Glu106 の近傍が A3C-Vif 結合責任領域であると考え, 決定し た分子構造上で Glu106 の周辺にある分子表面に露出したアミノ酸残基を網羅的に抽出し た. これら残基に点変異を導入し, 293T 細胞で A3C 変異体と Vif タンパク質を共発現さ せることにより、Vif 依存的な分解の表現型の変化を Western Blot 法で解析した(Fig. 6a). 野生型 A3C の場合, Vif 存在下において細胞内 A3C 量は低下した (Vif 感受性). 一方で E106K 変異体では、既に報告されたとおり、Vif 存在下においても A3C 量は低下せず、 Vif 依存的な分解に抵抗性となっていることが分かった (Vif 抵抗性). これらの実験を, 分子表面上で Vif 抵抗性を示す変異残基が Vif 感受性を示すものに囲われるまで繰り返し 行った. また、Western Blot 法によりバンドの強度を定量した. Vif 存在下での A3C の残存 率を"Vif 抵抗性レベル(Vif-resistance level)"として数値化し、各残基における変異導入に よる影響を定量的に評価した(Fig. 6b). まず,各アミノ酸残基に対する変異は,アラニン 置換もしくは Z2 タイプで Vif 非感受性である APOBEC3 (A3F NTD など)の配列へ置換 した. 最終的に 99 個の A3C 変異体を作製し解析した. その結果, 9 個のアミノ酸残基 (Leu72, Phe75, Cys76, Ile79, Leu80, Ser81, Tyr86, Glu106, Phe107) に対する点変異体 が 50% 以上の Vif 抵抗性レベルを, His111 に対する変異体が 45% の Vif 抵抗性レベル を示し, これら 10 残基が Vif 依存的な分解に関与することが示された. また興味深いこ とに、A3G において Vif との結合に重要である ¹²⁸DPD ¹³⁰ モチーフの Pro129 に相当する A3C の Pro129 への変異導入は, A3C の Vif 依存的な分解に影響しないことが明らかとな った.

さらに、これら 10 残基が実際に Vif の結合に関与するのかを調べるため、野生型もしくは Vif 抵抗性変異型 A3C (+MycHis tag) と Vif との共免疫沈降法による結合実験を行った. この際、A3C とは結合するが E3 リガーゼ複合体の構成成分である ElonginB/C とは結合せず、APOBEC3 の分解を誘導しない Vif SLQ→AAA 変異体 ^{44,89,90}を利用し実験を行った (Fig. 7). その結果、野生型 A3C においては Vif との結合が確認された一方、すべての Vif 抵抗性変異体において Vif との結合能が低下することが確認された. これらの結果より、Leu72 と Phe75、Cys76、Ile79、Leu80、Ser81、Tyr86、Glu106、Phe107、His111 の 10 残基は Vif との結合に関与することが示された.

3.2.2. Vif 抵抗性 APOBEC3C 変異体のウイルス粒子への取り込みの解析

A3C を含む APOBEC3 タンパク質は、ウイルスの RNA ゲノムに結合することで HIV-1 ウイルス粒子内に取り込まれることが知られている ^{32,91,92} (Fig. 1). また、A3G において Vif 結合に関与するアミノ酸残基は、ウイルス粒子への取り込みに重要な領域とアミノ酸配列レベルで隣接していることが知られている ⁶². そこで我々は、A3C に Vif 抵抗性を付与するアミノ酸変異がウイルス粒子への取り込みに影響するかどうかを解析した. 野生型もしくは Vif 抵抗性変異型 A3C 発現プラスミドを vif 欠損型 HIV-1 の分子クローン pNL4-3 vif(-) とコトランスフェクションし、産生したウイルス粒子内の A3C 量を Western Blot 法により解析した (Fig. 8). その結果、すべての A3C 変異体は、野生型と同様に、細胞内発現量(Fig. 8, Cell)に依存して正常にウイルス粒子へ取り込まれることが明らかとなった(Fig. 8, Virion). このことから、A3C に Vif 抵抗性を付与するアミノ酸変異がウイルス粒子への取り込み能、ひいては RNA 結合能に影響しないことが考えられた.

3.2.3. APOBEC3C の HIV-1 Vif 結合インターフェイスの構造特性

同定した 10 残基から形成される A3C の Vif 結合領域の構造学的特性を解明するため、変異体解析の結果から見出された残基を結晶構造上にマッピングし、Vif 抵抗性レベルにより色分けした(Fig. 9a,b). その結果、重要な 10 残基は α 2 と α 3 ヘリックスの周辺一ヶ所に集中し、Vif 結合インターフェイスを形成していた。また、この領域は A3G において Vif 結合に重要な Pro129 から離れた位置にあり、A3C と A3G の Vif 結合領域は三次元構造上異なることが明らかとなった。

さらに詳細に構造特性を解析したところ、結合インターフェイスは、分子内部の疎水性 (Leu72, Ile79, Leu80) および芳香族アミノ酸 (Phe75, Tyr86, Phe107, His111) を底部に, 分子表面の親水性アミノ酸(Cys76, Ser81, Glu106)を縁に配置した"浅い溝"を呈していた (**Fig. 9a-c**). この溝の内部には,Phe75-Tyr86 と Phe107-His111 の 2 対で形成される弱い π - π 相互作用 93 が確認され (**Fig. 9d**), これがインターフェイスの構造維持に関わっている ことが示唆された. さらに、疎水性や芳香族残基に対する変異が Vif の結合を阻害したこ とから, π-π 相互作用に加え, 適切なサイズの疎水性側鎖もインターフェイスの構造維持と A3C-Vif 相互作用に重要であると考えられる. また Cys76 や Ile79, Leu80, Ser81 を含む α2-β3 間のループ領域(loop 4)は,分子間接触が見られない A 鎖において高い温度因子 を示しており (Fig. 9e), 溶液中の単量体状態においてフレキシブルな領域であることが示 唆された. 一方で, 分子間接触表面に含まれている B 鎖の loop 4 領域は低い温度因子を示 していた(Fig. 5 Interface 1 と 9e). このことから, インターフェイスは部分的に構造の揺 らいだ領域を含み, Vif との結合により構造が安定する可能性が示された. さらに分子表面 の静電ポテンシャルを解析したところ, Vif 結合インターフェイスはおもに負に帯電してい ることが明らかとなった(Fig. 9c). これと一致して,分子表面に露呈したアミノ酸残基の 正電荷アミノ酸への置換 (C76K と E106K) が Vif 抵抗性を付与することから (Fig. 6), A3C の負電荷表面が Vif 結合に重要な特徴の一つであることが示唆された.

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 3.3.1. APOBEC3F と APOBEC3DE の HIV-1 Vif 結合インターフェイスの保存性

A3F と A3DE の CTD は A3C との配列相同性が高く, それぞれ 77.4% と 76.3% であ る (Fig. 10a). また, 多くの研究グループによる Vif 分子の変異解析結果から, A3C と F, DE の Vif 結合様式は類似していることが予測されていた 48,94,95. そこで我々は, A3C で同 定した 10 残基が A3F および A3DE においても Vif 結合に関与するかを検討するため, A3F CTD および A3DE CTD の相当する 10 残基について同様の変異解析を行った(Fig. 11 と 12). まず、10 残基に対する A3F 変異体はすべて Vif 依存的な分解に抵抗性を示した (Fig. 11a,b). さらに共免疫沈降実験により、Vif 抵抗性 A3F 変異体はすべて、野生型や 酵素活性欠損変異体 E251Q に比べ, Vif との結合能が低下していることも確認された (Fig. 11c). これらのことから、A3F の相当する 10 残基、Leu255 と Phe258、Cys259、 Ile262, Leu263, Ser264, Tyr269, Glu289, Phe290, His294 は, Vif との相互作用に重要で あることが示された.また、変異解析結果を A3F 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 A3C 同様に構造上一か所に集中し 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 (Fig. 11d). また, A3F に関して, Glu289 と Glu324 が Vif 相 互作用に関与することがすでに報告されており^{56,63}, E289K と E324K 変異体も高い Vif 抵 抗性レベル (84% と 87%) を示した (Fig. 11a,b). そのうち Glu324 は, 重要な 10 残基 により形成される Vif 結合インターフェイスの端に隣接していた (**Fig. 11d**). 一方で,こ れに相当する A3C E141K 変異体は 27% という低い Vif 抵抗性レベルしか示さなかった (**Fig. 6**). この差異の理由は明らかとなってはいないが, A3C Glu141 と A3F E324 周辺の アミノ酸残基の違いによる影響が起因している可能性が考えられる.

A3DE の 10 残基 (Leu268, Phe271, Cys272, Ile275, Leu276, Ser277, Tyr282, Glu302, Phe303, His307) に対する変異体も、Vif 抵抗性と結合能の低下を示した(**Fig. 12a,b**). しかしながら、S277D や E302K 変異体は A3F S264D、E289K に比べそれぞれ低い Vif 抵抗性レベルを示した。また、変異解析結果を A3DE CTD のモデル構造にマッピングしたところ、10 残基は構造上一か所に集中し、Vif 抵抗性に若干の差はあるが、同様の Vif 結合インターフェイスを形成した(**Fig. 12d**). 以上の結果から、微細な差異はあるものの、A3Cと A3F、A3DE において HIV-1 Vif 結合インターフェイスが保存されていることが示された。

3.3.2. APOBEC3G における HIV-1 Vif 結合インターフェイスの違い

次に我々は、A3C と A3F CTD、A3DE CTD と同じ Z2 タイプであり Vif 結合能をもつ A3G NTD (**Fig. 2**) において、同様の Vif 結合インターフェイスを有するかどうかを解析した。まず A3C と A3G NTD のアミノ酸配列を比較したところ、A3C で同定した 10 残基のうち 4 残基のみが A3G NTD において保存されていることが明らかとなった(**Fig. 10b**, A3C; Phe75、Leu80、Tyr86、Phe107、A3G; Phe74、Leu80、Tyr86、Phe107).そこで我々は、

これら 4 残基に対する A3G の点変異体を作製し、Vif に対する抵抗性を解析した(Fig. 13). その結果,4 種の A3G 変異体は,野生型と同様に Vif 感受性を示し、Vif との結合能も示した(Fig. 13a-c). 一方で,A3G D128K 変異体は既存の報告と一致して 62 、Vif 抵抗性の表現型を示した. さらに,変異体解析により見出した残基をモデル構造へマッピングしたところ,解析した 4 残基は Vif 結合に重要な Asp128 から三次元的に離れた領域に位置することが明らかとなった(Fig. 13d). 以上のことより,A3C/F/DE で保存された Vif 結合インターフェイスは,アミノ酸配列でも三次元構造的にも A3G のものとは異なることが確認された.

3.3.3. Vif 抵抗性 APOBEC3F の抗 HIV-1 活性

A3C/F/DE の中で、A3F が vif 欠損型 HIV-1 に対して強い抗ウイルス活性を示すことが知られている ⁵⁰⁻⁵². そこで我々は、各 Vif 抵抗性 A3F 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。APOBEC3 タンパク質が抗 HIV-1 機能を発揮するためには、ウイルス粒子へ取り込まれることが必須である ³¹⁻³³ (Fig. 1). そこで我々はまず、A3F 変異体のウイルス粒子への取り込み能を、A3C と同様の手法で解析した(Fig. 14a). その結果、H294D を除くすべての A3F 変異体は、細胞内発現量(Fig. 14a, Cell)に依存して正常にウイルス粒子へ取り込まれることが明らかとなった(Fig. 14a, Virion). H294D 変異体がウイルス粒子への取り込み能の低下を示した原因は不明だが、少なくともその他の Vif 結合に重要なアミノ酸残基はウイルス粒子への取り込みに影響しないことが示された.

次に、A3F 変異体存在下での HIV-1 の感染価を測定した (Fig. 13b). 実験には、HIV-1 の分子クローンである pNL4-3 と LuSIV 細胞 ⁷⁸ を用いた. LuSIV 細胞 は Simian Immunodeficiency virus (SIV) mac239 LTR プロモーターの下流にレポーター遺伝子として firefly luciferase を有しており、HIV-1 や HIV-2、SIV の感染が成立することで firefly luciferase による化学発光を呈する. この化学発光量は感染価に依存する. この実験系を用いて感染価を測定した結果、野生型 (WT) および酵素活性欠損型変異体 (E251Q) A3F は、Vif 非存在下でのみ HIV-1 の感染を抑制した. 一方、すべての Vif 抵抗性 A3F 変異体は、Vif の存在の有無に関わらず、ウイルス粒子への取り込み量に依存して、HIV-1 の感染を抑制した. これらの結果より、A3F-Vif の結合阻害が A3F 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ことが示された.

4. Discussion

抗 HIV-1 防御因子 APOBEC3 タンパク質の発見以来,約10年の間に,その抗ウイルス機序や Vif によるユビキチン・プロテアソーム系を利用した分解機構など,さまざまな分子メカニズムが明らかとなってきた ^{16,34}. しかしながら構造学的な研究はあまり進んでおらず,このことが APOBEC3-Vif を標的とした抗 HIV-1 薬の開発を妨げる一因となっていた.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 A3C を構造解析の標的とし,タンパク質凝集抑制剤として L-Arg HCl を用いたタンパク質調製法を結晶化まで応用することで,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.また,構造情報を手掛かりに網羅的な変異解析を行うことで,A3C 分子上の α2 と α3 ヘリックス周辺に位置する Vif 結合領域を同定した.さらに,A3C と相同性の高い A3F と A3DE において同様の Vif 結合インターフェイスが保存されている一方で, A3G では保存されていないことを明らかとした.

APOBEC3 タンパク質は非常に強い難溶性を示す. 比較的可溶性であった A3C においても、その精製・結晶化は難度の高いものであった. 通常、タンパク質結晶化には高濃度(10 mg mL⁻¹ 程度)のサンプルが必要であるが、初期濃縮条件においては、A3C 濃度が 0.6 mg mL^{-1} 程度までしか上昇しなかった. その後、pH 条件や金属イオン、アミノ酸類の添加などを検討した結果、最終的に L-Arg HCl が A3C の可溶性を大幅に改善することを見出した. これにより、A3C タンパク質を 45 mg mL^{-1} 以上まで濃縮することが可能となった. その後の濃縮 A3C を用いた結晶化では、通常の結晶化実験に加えレーザー照射を用いた実験など、1,800 以上の条件を探索したが、結晶は得られなかった. また、基質である ssDNA の添加やタンパク質工学的な A3C コンストラクトの改変なども試みたが、すべて精製段階で頓挫し、結晶化実験まで至らなかった.

A3C の精製・結晶化実験から、A3C の溶解度は L-Arg HCl 濃度に強く依存することが観察されていた。また偶然にも、A3C の L-Arg HCl による可溶化は可逆的であることが観察された。つまり、L-Arg HCl 存在下で濃縮した A3C サンプルを L-Arg HCl を含まないバッファーで希釈すると A3C の沈殿が生じ、この A3C 溶液に再び L-Arg HCl を高濃度で添加すると生じた沈殿が溶解する、という現象が観察された。これらのことから、これまでに行った結晶化実験では、濃縮 A3C サンプルと結晶化溶液を 1:1 の割合で混合していたために、系内の L-Arg HCl 濃度が 1/2 になり A3C の溶解度も急激に減少し沈殿してしまったものと考えられた。そこで、系内の L-Arg HCl 濃度を維持するために、一般的な結晶化スクリーニングキットに濃縮 A3C サンプルと同濃度の L-Arg HCl を加えたオリジナルのスクリーニングキットを作製し結晶化実験を行った。これにより、L-Arg HCl 濃度の減少による A3C の沈殿が抑えられ、結晶化溶液による純粋な A3C の析出力を評価することが可能となった。この手法により A3C の初期結晶化条件を見出すことに成功した。さらに、この手法で引き続き結晶化条件を展開することで良質な結晶が得られ、世界で初めて Vif 結合性である APOBEC3 の構造解析に成功した。

A3C の Vif 結合インターフェイスは、底部には疎水性/芳香族アミノ酸を,表面には負に帯電したアミノ酸残基を配した浅いくぼみを形成していた.一方で,Vif においては A3C/F/DE との特異的な相互作用に正電荷アミノ酸を含む Asp14-Arg15-Met16-Arg17(14 DRMR 17)モチーフが必須であることが報告されており $^{89.96}$,これらのことは,A3C-Vif 結合に静電相互作が重要であることを示唆している. さらに Vif は,A3C/F/DE および A3G との相互作用に共通して,疎水性(Leu64,Ile66,Leu72)や芳香族アミノ酸(Trp5,Tyr69,Trp70,Trp89)も必要としている $^{95.97.98}$.このことから,これら疎水性/芳香族アミノ酸残基は APOBEC3 との相互作用に必要な Vif 自身の構造/コンホメーション維持に関与する可能性が考えられるが,一方でいくつかの残基(Trp11,Leu24,Val25,Trp79)は A3C/F/DE との相互作用でのみ重要であることが報告されており $^{89.97.99}$,A3C-Vif 結合における疎水性相互作用や π - π 相互作用の寄与も存在すると考えられる. さらに,A3C の Vif 結合インターフェイスは部分的にフレキシブルな領域を含んでいた.このことから,Vif との結合により A3C の局所的な構造が変化・固定化することで,その相互作用が強固になる可能性も考えられる.

A3C は A3F CTD と A3DE CTD に対してそれぞれ 77.4% と 76.3% という高いアミノ酸配列相同性を示す一方で、同様の Z2 タイプに分類される A3G NTD との相同性は 42.8%であった (**Fig. 10**). 特に A3C/F/DE と A3G NTD では、 α 2- α 3 周辺の配列が大きく異なり、このことは周辺領域の局所的な構造が異なることを示唆している。また、我々が変異解析により同定した A3C において Vif 結合に重要であった α 2- α 3 領域は、A3G NTD で重要な位置に相当する loop 7 周辺領域から三次元構造的に離れていた。対照的に、A3G NTD の α 2- α 3 周辺領域は Vif との結合に関与しないことも変異解析により示された。注目すべきことに、APOBEC3 タンパク質において異なる二か所の Vif 結合インターフェイス (A3C/F/DEの α 2- α 3, A3G の loop 7) が存在することは、HIV-1 Vif において A3C/F/DE と A3G の分解に対する責任領域が異なることと一致している。 Vif は、A3G と A3C/F/DE との相互作用にそれぞれ異なった Tyr40-Arg41-His42-His43-Tyr44 (α 40 YRHHY α 40 + F + 一フと α 50 + 14 DRMR α 7 を 14 DRMR α 7 を 15 を 15 を 16 を 16 を 17 で 17 のように、異なる二種の APOBEC3 - Vif 結合様式が存在するにも関わらず、両種の結合様式には、静電相互作用や疎水性相互作用、可変的なループ領域などの共通の構造特性が含まれると考えられた。

本研究において我々が決定した,A3C の高分解能分子構造と A3C/F/DE に共通した Vif 結合インターフェイスの構造特性は,APOBEC3-Vif 相互作用を標的とした抗 HIV-1 薬開発を前進させると考えられる.これまでの研究から,APOBEC3 タンパク質の核酸との結合はウイルス粒子への取り込みに関与し,その抗 HIV-1 作用に必須であることが報告されている $^{31-33}$. APOBEC3 分子上の核酸が結合する溝は, \mathbf{Zn}^{2+} イオン周辺の loop 1 や 3,5,7により形成される.A3G においてウイルス粒子への取り込みに重要であると報告されている Tyr124-Tyr125-Phe126-Trp127 ($^{124}\mathbf{YYFW}^{127}$) モチーフは,Vif との結合に重要な $^{128}\mathbf{DPD}^{130}$ モチーフに loop 7 上で隣接しており 62 ,A3G-Vif 結合を阻害する低分子化合物をデザインする際には $^{124}\mathbf{YYFW}^{127}$ モチーフの担うウイルス粒子への取り込み能を干渉しないよう注意

を払う必要がある. 一方で A3C/F/DE では、Vif 結合領域($\alpha 2-\alpha 3$)は核酸結合の溝を形成 すると考えられる $loop\ 1$ や 3, 5, 7 から離れている. よって、A3F-Vif を標的とした阻害 剤は、A3G の場合と比べ核酸結合能へ干渉する可能性は低く、このことは A3F を治療薬 の標的とする利点になると考えられる.

以上のように、APBEC3-Vif 相互作用の構造特性に関する我々の発見は、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 薬開発に重要な情報を与えた. 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.

Acknowledgement

本研究は、著者が名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻在学中に、構造生物工学研究室にて行ったものです。本研究を遂行するにあたり、本学 シンクロトロン光研究センター渡邉信久教授に終始ご指導ご鞭撻を賜りました。数多くの貴重なご助言により、本研究は成し遂げられました。深く感謝いたします。

本学 工学研究科の鈴木淳巨准教授には、学位審査にあたり副査をご快諾頂きました。また、結晶構造解析においても数多くのご助言とディスカッションの機会を与えて頂きました。最後まで熱く粘り強く指導して頂いたために、本研究をなし得たといっても過言ではありません。心から感謝いたします。

本学 工学研究科の飯島信司教授には、学位審査にあたり副査をご快諾頂き、数多くのご助言を頂きました。研究発表の場においても示唆に富んだご指摘を頂きました。厚く御礼申し上げします。

本学 創薬科学研究科の廣明秀一教授には、学位審査にあたり副査をご快諾頂き、数多くのご助言を頂きました. 創薬の視点からのご指摘は大変参考になるものでした. 厚く御礼申し上げします.

本学 シンクロトロン光研究センターの杉本泰伸准教授には、学位審査にあたり副査をご快 諾頂きました.本研究に興味を持って下さり、数多くのご助言を頂きました厚く御礼申し 上げます.

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・免疫研究部の杉浦互部長、岩谷靖雅室長には共同研究の機会を与えて頂きました。恵まれた研究環境で多彩な分野の方々と研究を行えたことは何物にも代えがたい経験となりました。心から御礼申し上げます。特に、岩谷靖雅室長には、実験や論文作成、学会発表、海外研究所訪問など総括的な研究指導を賜りました。深く感謝いたします。

本学の山根隆名誉教授には、学士課程および博士前期課程在学中にご指導賜りました. ご退官された後も、本研究を気にかけて下さり、様々な場面でお声かけ頂きました.厚く 御礼申し上げます.

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・免疫研究部の長縄由里子研究補佐員には、培養細胞を用いた機能解析において多大なるご協力を頂きました. 心から御礼申し上げます.

本学 シンクロトロン光研究センターの河村高志博士には、放射光施設における実験において大変お世話になりました、深く感謝いたします.

本学 工学研究科の小祝孝太郎博士,ベンチャービジネスラボラトリーの永江峰幸博士,工学研究科の中島雅晶大学院生には,数多くのご助言を頂き,実験的な補佐もして頂きました.心から御礼申し上げます.

本研究の一部は、本学博士課程教育リーディングプログラム グリーン自然科学国際教育研究プログラムの平成 24 年度独創的研究費によります.

最後になりますが、本研究は、名古屋大学 大学院工学研究科 構造生物工学研究室と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・免疫研究部の皆様方のご指導・ご協力の下で成し遂げられました。心から御礼申し上げます。

References

- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)* **220**, 868-871,(1983).
- 2 Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A. *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (New York, N.Y.)* **233**, 343-346,(1986).
- Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrman, S. N. et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 7096-7100,(1985).
- 4 Arts, E. J. & Hazuda, D. J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a007161,(2012).
- 5 抗 HIV 治療ガイドライン (平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業) 「HIV 感染症及びその合併症の課題を克服する研究」班. (2013).
- Collier, A. C., Coombs, R. W., Schoenfeld, D. A., Bassett, R. L., Timpone, J. *et al.* Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 334, 1011-1017,(1996).
- Staszewski, S., Miller, V., Rehmet, S., Stark, T., De Cree, J. *et al.* Virological and immunological analysis of a triple combination pilot study with loviride, lamivudine and zidovudine in HIV-1-infected patients. *AIDS* **10**, F1-7,(1996).
- D'Aquila, R. T., Hughes, M. D., Johnson, V. A., Fischl, M. A., Sommadossi, J. P. *et al.*Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Intern Med* **124**, 1019-1030,(1996).
- 9 Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J. *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338, 853-860,(1998).
- Vogt, V. M. in *Retroviruses* (eds J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).
- Telesnitsky, A. & Goff, S. P. in *Retroviruses* (eds J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).
- Brown, P. O. in *Retroviruses* (eds J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).

- Swanstrom, R. & Wills, J. W. in *Retroviruses* (eds J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).
- Engelman, A. & Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews. Microbiology* **10**, 279-290,(2012).
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-650,(2002).
- Zheng, Y. H., Jeang, K. T. & Tokunaga, K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology* **9**, 112,(2012).
- Gabuzda, D. H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T. *et al.* Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *Journal of virology* **66**, 6489-6495,(1992).
- Sakai, H., Shibata, R., Sakuragi, J., Sakuragi, S., Kawamura, M. *et al.* Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *Journal of virology* **67**, 1663-1666,(1993).
- von Schwedler, U., Song, J., Aiken, C. & Trono, D. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *Journal of virology* **67**, 4945-4955,(1993).
- Fisher, A. G., Ensoli, B., Ivanoff, L., Chamberlain, M., Petteway, S. *et al.* The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science (New York, N.Y.)* **237**, 888-893,(1987).
- Fouchier, R. A., Simon, J. H., Jaffe, A. B. & Malim, M. H. Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. *Journal of virology* **70**, 8263-8269,(1996).
- Suspene, R., Sommer, P., Henry, M., Ferris, S., Guetard, D. *et al.* APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic acids research* **32**, 2421-2429,(2004).
- Goncalves, J., Korin, Y., Zack, J. & Gabuzda, D. Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *Journal of virology* **70**, 8701-8709,(1996).
- Sova, P. & Volsky, D. J. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* **67**, 6322-6326,(1993).
- Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K. et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113, 803-809,(2003).
- Kao, S., Khan, M. A., Miyagi, E., Plishka, R., Buckler-White, A. et al. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *Journal of virology* 77, 11398-11407,(2003).

- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L. et al. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103,(2003).
- Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L. & Kabat, D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nature medicine* **9**, 1398-1403,(2003).
- Yu, Q., Konig, R., Pillai, S., Chiles, K., Kearney, M. et al. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nature structural & molecular biology* 11, 435-442,(2004).
- Iwatani, Y., Takeuchi, H., Strebel, K. & Levin, J. G. Biochemical activities of highly purified, catalytically active human APOBEC3G: correlation with antiviral effect. *Journal of virology* **80**, 5992-6002,(2006).
- Goila-Gaur, R., Khan, M. A., Miyagi, E., Kao, S. & Strebel, K. Targeting APOBEC3A to the viral nucleoprotein complex confers antiviral activity. *Retrovirology* **4**, 61,(2007).
- Khan, M. A., Kao, S., Miyagi, E., Takeuchi, H., Goila-Gaur, R. *et al.* Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *Journal of virology* **79**, 5870-5874,(2005).
- 33 Strebel, K. & Khan, M. A. APOBEC3G encapsidation into HIV-1 virions: which RNA is it? *Retrovirology* **5**, 55,(2008).
- Harris, R. S., Hultquist, J. F. & Evans, D. T. The restriction factors of human immunodeficiency virus. *The Journal of biological chemistry* **287**, 40875-40883,(2012).
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F. & Hance, A. J. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science (New York, N.Y.)* **300**, 1112,(2003).
- 36 Iwatani, Y., Chan, D. S., Wang, F., Maynard, K. S., Sugiura, W. et al. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. Nucleic acids research 35, 7096-7108,(2007).
- Bishop, K. N., Verma, M., Kim, E. Y., Wolinsky, S. M. & Malim, M. H. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS pathogens* **4**, e1000231,(2008).
- Chaurasiya, K. R., McCauley, M. J., Wang, W., Qualley, D. F., Wu, T. *et al.* Oligomerization transforms human APOBEC3G from an efficient enzyme to a slowly dissociating nucleic acid-binding protein. *Nat Chem* **6**, 28-33,(2014).
- Graci, J. D. & Cameron, C. E. Quasispecies, error catastrophe, and the antiviral activity of ribavirin. *Virology* **298**, 175-180,(2002).
- Sadler, H. A., Stenglein, M. D., Harris, R. S. & Mansky, L. M. APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *Journal of virology* **84**, 7396-7404,(2010).
- Jager, S., Kim, D. Y., Hultquist, J. F., Shindo, K., LaRue, R. S. *et al.* Vif hijacks CBF-beta to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* **481**, 371-375,(2012).

- Zhang, W., Du, J., Evans, S. L., Yu, Y. & Yu, X. F. T-cell differentiation factor CBF-beta regulates HIV-1 Vif-mediated evasion of host restriction. *Nature* **481**, 376-379,(2012).
- Mehle, A., Goncalves, J., Santa-Marta, M., McPike, M. & Gabuzda, D. Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes & development* 18, 2861-2866,(2004).
- 44 Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W. *et al.* Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 1056-1060,(2003).
- 45 Conticello, S. G., Thomas, C. J., Petersen-Mahrt, S. K. & Neuberger, M. S. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Molecular biology and evolution* **22**, 367-377,(2005).
- 46 Harris, R. S. & Liddament, M. T. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nature reviews*. *Immunology* 4, 868-877,(2004).
- LaRue, R. S., Andresdottir, V., Blanchard, Y., Conticello, S. G., Derse, D. *et al.* Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *Journal of virology* **83**, 494-497,(2009).
- 48 Kitamura, S., Ode, H. & Iwatani, Y. Structural Features of Antiviral APOBEC3 Proteins are Linked to Their Functional Activities. *Front Microbiol* **2**, 258,(2011).
- 49 Goila-Gaur, R. & Strebel, K. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* **5**, 51,(2008).
- Zheng, Y. H., Irwin, D., Kurosu, T., Tokunaga, K., Sata, T. et al. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *Journal of virology* 78, 6073-6076,(2004).
- Liddament, M. T., Brown, W. L., Schumacher, A. J. & Harris, R. S. APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* 14, 1385-1391,(2004).
- Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Bogerd, H. P. & Cullen, B. R. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *The EMBO journal* 23, 2451-2458,(2004).
- Harari, A., Ooms, M., Mulder, L. C. & Simon, V. Polymorphisms and splice variants influence the antiretroviral activity of human APOBEC3H. *Journal of virology* **83**, 295-303,(2009).
- OhAinle, M., Kerns, J. A., Li, M. M., Malik, H. S. & Emerman, M. Antiretroelement activity of APOBEC3H was lost twice in recent human evolution. *Cell host & microbe* **4**, 249-259,(2008).
- Russell, R. A., Smith, J., Barr, R., Bhattacharyya, D. & Pathak, V. K. Distinct domains within APOBEC3G and APOBEC3F interact with separate regions of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *Journal of virology* **83**, 1992-2003,(2009).
- Smith, J. L. & Pathak, V. K. Identification of specific determinants of human APOBEC3F,

- APOBEC3C, and APOBEC3DE and African green monkey APOBEC3F that interact with HIV-1 Vif. *Journal of virology* **84**, 12599-12608,(2010).
- Zhen, A., Wang, T., Zhao, K., Xiong, Y. & Yu, X. F. A single amino acid difference in human APOBEC3H variants determines HIV-1 Vif sensitivity. *Journal of virology* **84**, 1902-1911,(2010).
- Bogerd, H. P., Doehle, B. P., Wiegand, H. L. & Cullen, B. R. A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate species specificity of HIV type 1 virion infectivity factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3770-3774,(2004).
- Mangeat, B., Turelli, P., Liao, S. & Trono, D. A single amino acid determinant governs the species-specific sensitivity of APOBEC3G to Vif action. *The Journal of biological chemistry* **279**, 14481-14483,(2004).
- Schrofelbauer, B., Chen, D. & Landau, N. R. A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3927-3932,(2004).
- Xu, H., Svarovskaia, E. S., Barr, R., Zhang, Y., Khan, M. A. *et al.* A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5652-5657,(2004).
- Huthoff, H. & Malim, M. H. Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and Virion encapsidation. *Journal of virology* **81**, 3807-3815,(2007).
- Albin, J. S., LaRue, R. S., Weaver, J. A., Brown, W. L., Shindo, K. *et al.* A single amino acid in human APOBEC3F alters susceptibility to HIV-1 Vif. *The Journal of biological chemistry* **285**, 40785-40792,(2010).
- 64 Chen, K. M., Harjes, E., Gross, P. J., Fahmy, A., Lu, Y. et al. Structure of the DNA deaminase domain of the HIV-1 restriction factor APOBEC3G. *Nature* 452, 116-119,(2008).
- Holden, L. G., Prochnow, C., Chang, Y. P., Bransteitter, R., Chelico, L. et al. Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications. *Nature* 456, 121-124,(2008).
- Furukawa, A., Nagata, T., Matsugami, A., Habu, Y., Sugiyama, R. *et al.* Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G. *The EMBO journal* **28**, 440-451,(2009).
- 67 Shandilya, S. M., Nalam, M. N., Nalivaika, E. A., Gross, P. J., Valesano, J. C. *et al.* Crystal structure of the APOBEC3G catalytic domain reveals potential oligomerization interfaces. *Structure* **18**, 28-38,(2010).

- Otwinowski, Z. & Minor, W. in *Methods in Enzymology* Vol. Volume 276 (ed Charles W. Carter, Jr.) 307-326 (Academic Press, 1997).
- 69 Collaborative Computational Project, N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography.

 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50, 760-763,(1994).
- Vagin, A. & Teplyakov, A. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *Journal of Applied Crystallography* **30**, 1022-1025,(1997).
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501,(2010).
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255,(1997).
- 73 Schrodinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1 (2010).
- Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of molecular biology* **372**, 774-797,(2007).
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10037-10041,(2001).
- Kinomoto, M., Kanno, T., Shimura, M., Ishizaka, Y., Kojima, A. et al. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic acids research* 35, 2955-2964,(2007).
- Nguyen, K. L., llano, M., Akari, H., Miyagi, E., Poeschla, E. M. *et al.* Codon optimization of the HIV-1 vpu and vif genes stabilizes their mRNA and allows for highly efficient Rev-independent expression. *Virology* **319**, 163-175,(2004).
- Roos, J. W., Maughan, M. F., Liao, Z., Hildreth, J. E. & Clements, J. E. LuSIV cells: a reporter cell line for the detection and quantitation of a single cycle of HIV and SIV replication. *Virology* **273**, 307-315,(2000).
- 79 Accelrys Software Inc. Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0 (2013).
- Shiraki, K., Kudou, M., Fujiwara, S., Imanaka, T. & Takagi, M. Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation. *J Biochem* **132**, 591-595,(2002).
- 81 Ito, L., Kobayashi, T., Shiraki, K. & Yamaguchi, H. Effect of amino acids and amino acid derivatives on crystallization of hemoglobin and ribonuclease A. *J Synchrotron Radiat* 15, 316-318,(2008).
- Yoshikawa, H. Y., Murai, R., Adachi, H., Sugiyama, S., Maruyama, M. *et al.* Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding. *Chemical Society reviews*, (2013).
- 83 Betts, L., Xiang, S., Short, S. A., Wolfenden, R. & Carter, C. W., Jr. Cytidine deaminase. The 2.3 A crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex. *Journal of molecular biology* **235**, 635-656,(1994).

- Chen, K. M., Martemyanova, N., Lu, Y., Shindo, K., Matsuo, H. *et al.* Extensive mutagenesis experiments corroborate a structural model for the DNA deaminase domain of APOBEC3G. *FEBS Lett* **581**, 4761-4766,(2007).
- Prochnow, C., Bransteitter, R., Klein, M. G., Goodman, M. F. & Chen, X. S. The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID. *Nature* **445**, 447-451,(2007).
- 86 Chelico, L., Prochnow, C., Erie, D. A., Chen, X. S. & Goodman, M. F. Structural model for deoxycytidine deamination mechanisms of the HIV-1 inactivation enzyme APOBEC3G. *The Journal of biological chemistry* 285, 16195-16205,(2010).
- 87 Shlyakhtenko, L. S., Lushnikov, A. Y., Li, M., Lackey, L., Harris, R. S. *et al.* Atomic force microscopy studies provide direct evidence for dimerization of the HIV restriction factor APOBEC3G. *The Journal of biological chemistry* **286**, 3387-3395,(2011).
- Salter, J. D., Krucinska, J., Raina, J., Smith, H. C. & Wedekind, J. E. A hydrodynamic analysis of APOBEC3G reveals a monomer-dimer-tetramer self-association that has implications for anti-HIV function. *Biochemistry* **48**, 10685-10687,(2009).
- Russell, R. A. & Pathak, V. K. Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. *Journal of virology* 81, 8201-8210,(2007).
- Larue, R. S., Lengyel, J., Jonsson, S. R., Andresdottir, V. & Harris, R. S. Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. *Journal of virology* 84, 8193-8201,(2010).
- 91 Stauch, B., Hofmann, H., Perkovic, M., Weisel, M., Kopietz, F. *et al.* Model structure of APOBEC3C reveals a binding pocket modulating ribonucleic acid interaction required for encapsidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 12079-12084,(2009).
- Hultquist, J. F., Lengyel, J. A., Refsland, E. W., LaRue, R. S., Lackey, L. *et al.* Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. *Journal of virology* **85**, 11220-11234,(2011).
- Tsuzuki, S., Honda, K., Uchimaru, T., Mikami, M. & Tanabe, K. Origin of attraction and directionality of the pi/pi interaction: model chemistry calculations of benzene dimer interaction. *J Am Chem Soc* **124**, 104-112,(2002).
- 24 Zhang, W., Chen, G., Niewiadomska, A. M., Xu, R. & Yu, X. F. Distinct determinants in HIV-1 Vif and human APOBEC3 proteins are required for the suppression of diverse host anti-viral proteins. *PLoS One* 3, e3963,(2008).
- 95 Pery, E., Rajendran, K. S., Brazier, A. J. & Gabuzda, D. Regulation of APOBEC3 proteins by a novel YXXL motif in human immunodeficiency virus type 1 Vif and simian immunodeficiency

- virus SIVagm Vif. Journal of virology 83, 2374-2381,(2009).
- Schrofelbauer, B., Senger, T., Manning, G. & Landau, N. R. Mutational alteration of human immunodeficiency virus type 1 Vif allows for functional interaction with nonhuman primate APOBEC3G. *Journal of virology* **80**, 5984-5991,(2006).
- Tian, C., Yu, X., Zhang, W., Wang, T., Xu, R. *et al.* Differential requirement for conserved tryptophans in human immunodeficiency virus type 1 Vif for the selective suppression of APOBEC3G and APOBEC3F. *Journal of virology* **80**, 3112-3115,(2006).
- 98 He, Z., Zhang, W., Chen, G., Xu, R. & Yu, X. F. Characterization of conserved motifs in HIV-1 Vif required for APOBEC3G and APOBEC3F interaction. *Journal of molecular biology* 381, 1000-1011,(2008).
- Chen, G., He, Z., Wang, T., Xu, R. & Yu, X. F. A patch of positively charged amino acids surrounding the human immunodeficiency virus type 1 Vif SLVx4Yx9Y motif influences its interaction with APOBEC3G. *Journal of virology* **83**, 8674-8682,(2009).

 Table 1
 Data collection and refinement statistics

	APOBEC3C
Data collection	
Space group	$P6_1$
Cell dimensions	
a,b,c (Å)	105.04, 105.04, 70.05
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Wavelength (Å)	0.9800
Resolution (Å)	105-2.15 (2.19-2.15)
$R_{ m merge}$	5.4 (33.8)
$I/\sigma I$	94.5 (13.3)
Completeness (%)	99.9 (100)
Redundancy	22.3 (22.6)
Refinement	
Resolution (Å)	91-2.15
No. reflections	22,783
$R_{ m work}$ / $R_{ m free}$	21.4 / 26.3
No. atoms	3,281
Protein	3,188
Zn^{2+}	2
Cl	1
Water	90
B-factors	45.56
Protein	45.69
Zn^{2+}	46.08
Cl	44.32
Water	40.90
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.012
Bond angles (°)	1.390

A single crystal was used for solving the structure. Values in parentheses are for highest-resolution shell.

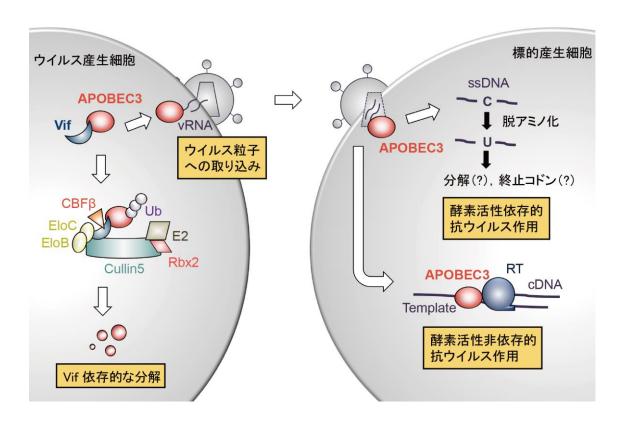


Figure 1 APOBEC3 の抗ウイルスメカニズムと Vif による解除メカニズムの概説. APOBEC3 はウイルス産生細胞内で発現し、ウイルス RNA(vRNA)依存的に子孫ウイルス粒子へ取り込まれる. 新たな標的細胞もしくはウイルスコア内で行われる逆転写・インテグレーション過程を酵素活性依存的/非依存的に抑制する. Vif はウイルス産生細胞内で APOBEC3 を ElonginB/C(EloB,EloC)や Cullin5,Rbx2,CBF β からなる E3 リガーゼ複合体にリクルートし、ポリユビキチン化を促進する. ユビキチン化された APOBEC3 は選択的にプロテアソームにより分解される.

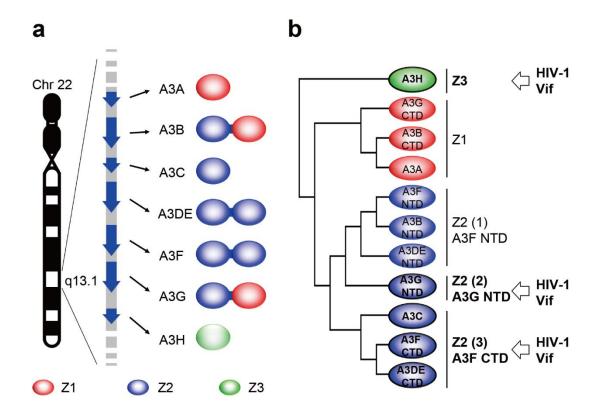


Figure 2 ヒト APOBEC3 ファミリー. (a) ヒトの 22 番染色体には A3A から H までの 7 種類の APOBEC3 遺伝子がコードされている. APOBEC3 ファミリーは, Z1 あるいは Z2, Z3 の 3 種の Z ドメインをそれぞれ一つもしくは二つ有する. (b) APOBEC3 の各 Z ドメイン配列の分子系統樹解析により, Z2 ドメインは 3 タイプに分類できる. HIV-1 Vif に 結合するドメインを矢印で示した.

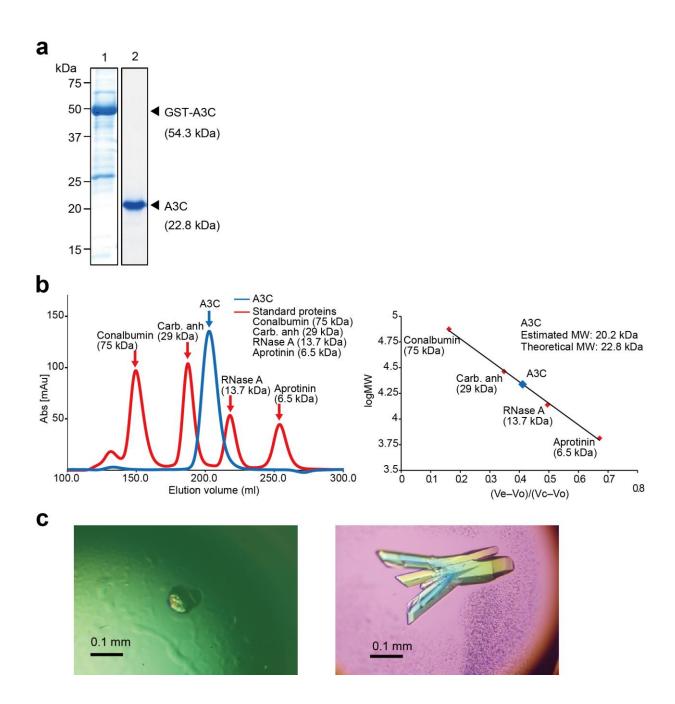


Figure 3 A3C タンパク質の精製と結晶化. (a) 精製した GST-A3C と A3C タンパク質を SDS PAGE により分離し、CBB 染色により検出した. Lane 1; GST アフィニティー精製後の GST-A3C. Lane 2; ゲルろ過精製後の A3C. (b) ゲルろ過クロマトグラフィーフィーの タンパク質分離チャート(左)とマーカータンパク質(赤)の分配係数から比較測定した A3C (青)の分子量(右). マーカータンパク質は、conalbumin (75kDa)、carbonic anhydrase (Carb. anh, 29kDa)、ribonuclease A (RNaseA, 13.7kDa)、aprotinin (6.5kDa) からなる. (c) L-Arg HCl を用いた初期スクリーニングにより得られた A3C の結晶 (左) と結晶化条件展開後に得られた結晶 (右). 偏光顕微鏡を用いて観察した.

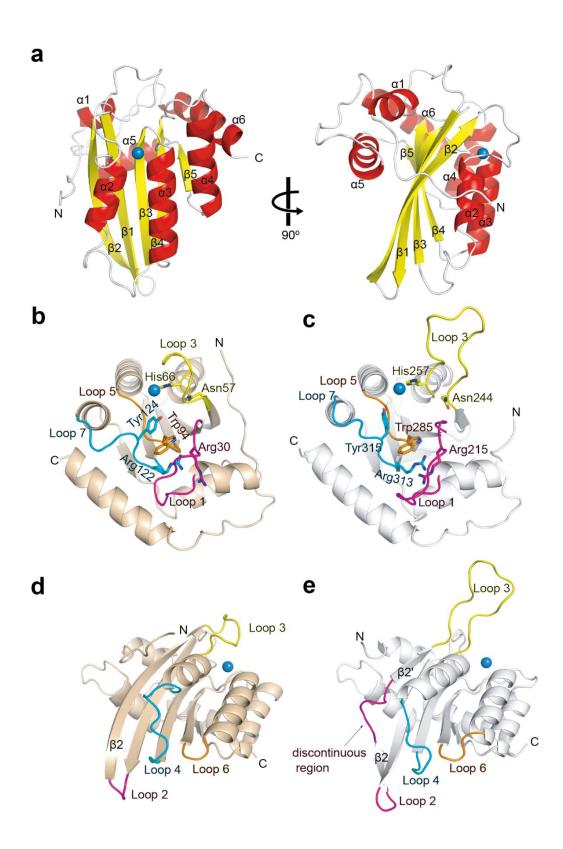


Figure 4 A3C の X 線結晶構造. (a) 90° 回転した二つの視点からの A3C のリボン表示構造. 6 本の α ヘリックス (α 1- α 6) を赤で, 5 本の β シート (β 1- β 5) を黄で, zn²⁺ イオンを青い球で示した. (b,c) A3C (b) と A3G CTD (c) の酵素活性中心付近の比較. Loop 1, 3, 5, 7 を, それぞれマゼンタ, 黄, オレンジ, シアンで色分け, 保存されている残基は側鎖を表示した. (d,e) A3C (d) と A3G CTD (e) の酵素活性中心と反対側に位置するループ領域の比較. Loop 2, 3, 4, 6 を, それぞれマゼンタ, 黄, シアン, オレンジで色分けた. A3G CTD における β 2 と β 2 間の非連続領域もマゼンタで示した.

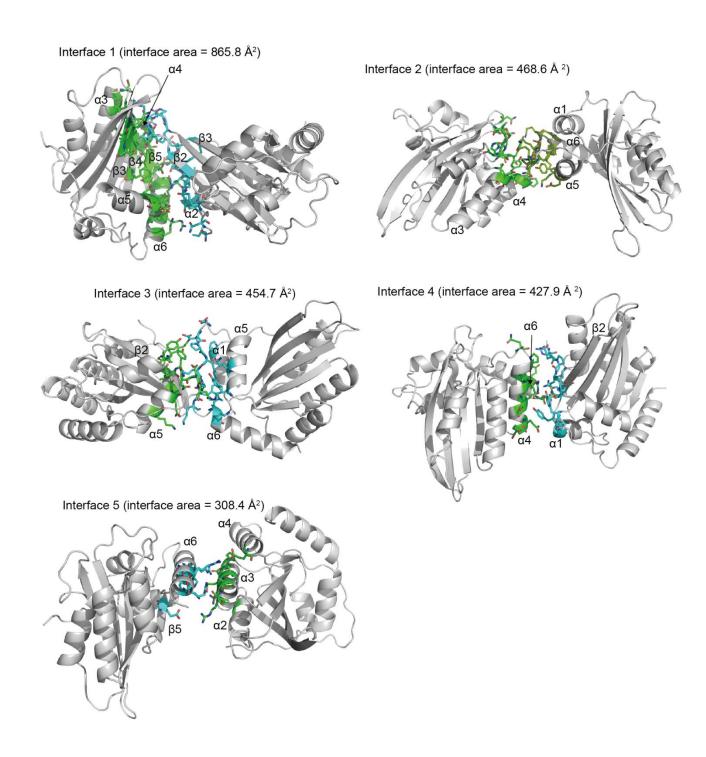
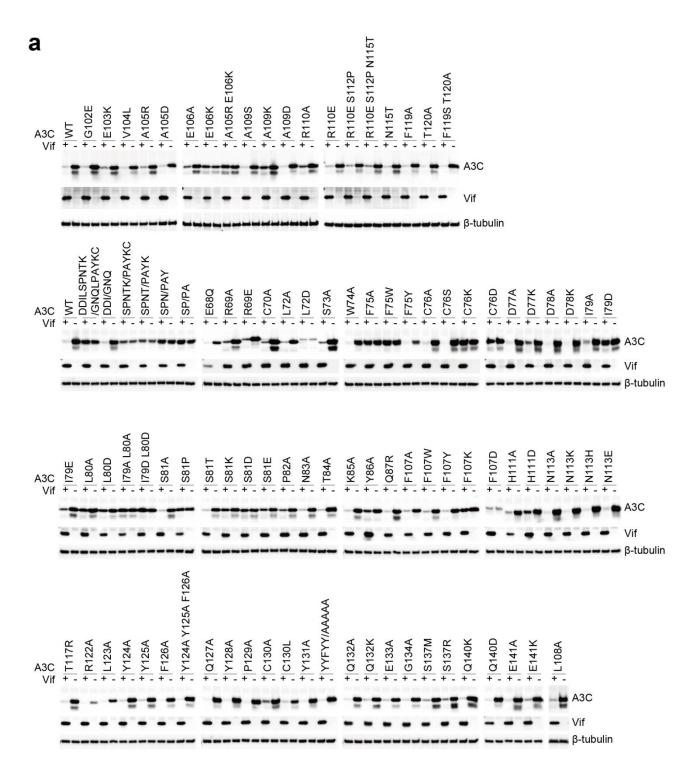


Figure 5 結晶格子内の A3C のパッキング. PDBePISA により検出された 20 の接触表面 のうち, 面積の大きなものから 5 部位を示した. A3C は非対称単位内に 2 分子が含まれ ており (A 鎖と B 鎖), 接触に関与する A 鎖の残基を緑で, B 鎖の残基をシアンで示した.



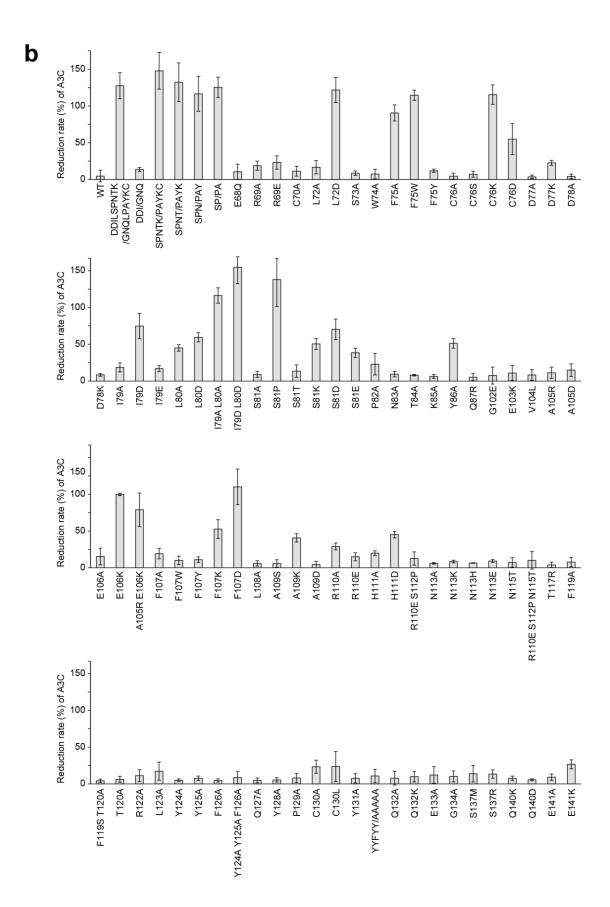


Figure 6 A3C の Vif 依存的な分解に重要なアミノ酸残基の探索. (a) HIV-1 Vif 存在下もしくは非存在下 (空ベクター) で、A3C の 293T 細胞内発現量を Western Blot 法により解析した. DDILSPNTK/GNQLPAYKC 変異体は、D77G と D78N, I79Q, S81P, P82A, N83Y, T84K, K85C の 8 個の変異を含む. 同様の変異体はこのシリーズの変異をいくつか含む. YYFYY/AAAAA 変異体は、Tyr124 と Tyr125、Phe126、Tyr128、Tyr131 に対する 5 個のアラニン変異を含む. (b) Vif 非存在下における各変異型 A3C の発現比率を 100% とし、Vif 存在下における A3C の発現量比を計算し、グラフ化した. 各変異体に対して、独立した三回以上の実験を行い、標準偏差を計算した.

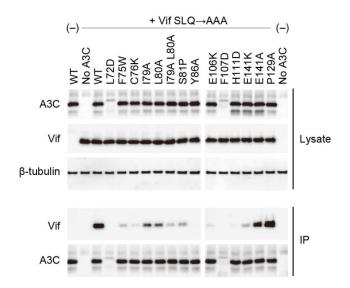


Figure 7 A3C と Vif の共免疫沈降実験. 293T 細胞において、野生型もしくは Vif 抵抗性変異型 A3C-Myc-His を Vif SLQ \rightarrow AAA と共発現させた. 細胞全体(Lysate)と抗 His タグポリクローナル抗体で免疫沈降した複合体(IP)を Western Blot 法により、各タンパク質量を解析した. A3C と Vif は、それぞれ抗 His タグと抗 Vif モノクローナル抗体で検出した. ローディングコントロールとして抗 β -tublin 抗体を用いた.

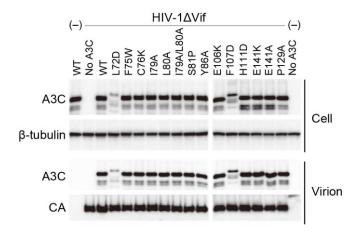


Figure 8 A3C のウイルス粒子への取り込み. 野生型もしくは変異型 A3C-Myc-His 発現プラスミドと pNL4-3 vif(-) を 293T 細胞にコトランスフェクションした. 細胞内 (Cell) あるいは上清ウイルス粒子内 (Virion) の A3C 量を Western Blot 法により解析した. ウイルス粒子の量は, 抗 p24 抗体を用いて HIV-1 キャプシド (CA) タンパク質の量で解析した.

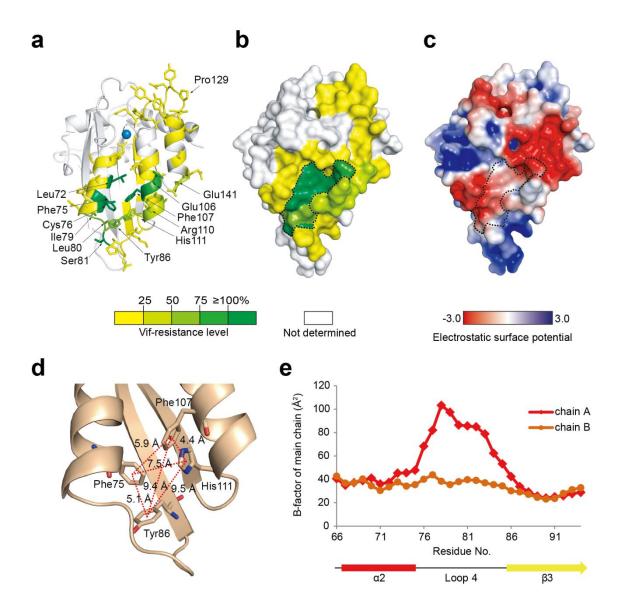


Figure 9 A3C の HIV-1 Vif 結合インターフェイス. (a,b) リボン表示 (a) と表面表示 (b) により、A3C 分子構造上に変異解析を行った残基をマッピングした. 下方に示したカラーバーに従い Vif 感受性レベルで色分けした. 各残基において複数異なるアミノ酸に置換した場合には、最も高い Vif 抵抗性を示した変異体の残存率を取り上げた.50% 以上の Vif 抵抗性レベルを示す残基を、表面表示上で黒破線で囲んだ. (c) A3C 分子表面の静電ポテンシャル. 計算された静電ポテンシャルを -3 kT/e (赤) から 3 kT/e (青) で示した. 分子構造の向きと破線の範囲は (b) と同様である. (d) Vif 結合インターフェイス内の潜在的な π - π 相互作用部位. 4 個の芳香族アミノ酸 (Phe75、Tyr86、Phe107、His111)間の距離が示されている. (e) 結晶構造中の loop 4 周辺の温度因子. B 鎖ではこの位置が結晶構造内で分子間接触表面となっている.

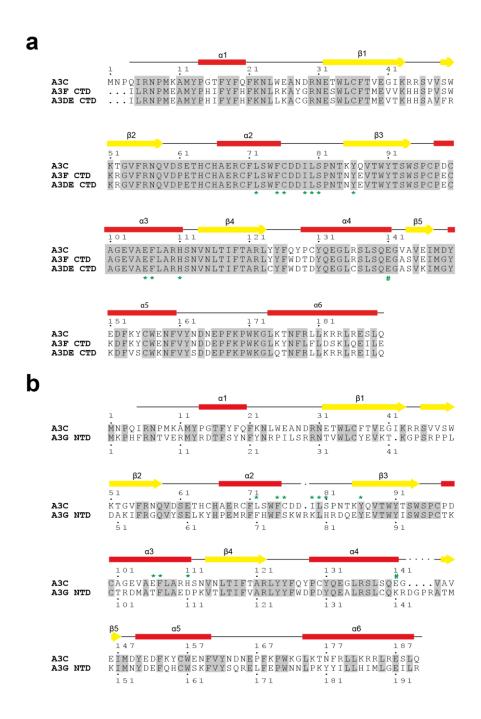


Figure 10 APOBEC3 ファミリーの配列比較. (a,b) A3C と A3F CTD, A3DE CTD (a) と A3C と A3G NTD (b) の配列を比較した. 一致した残基は影かけにした. A3C で同定した Vif 結合に重要な 10 残基は緑アスタリスク (*) で,Glu141 は緑シャープ (#) で示した. 配列上部には A3C の二次構造を, α ヘリックスを赤四角で, β シートを黄矢印で示した.

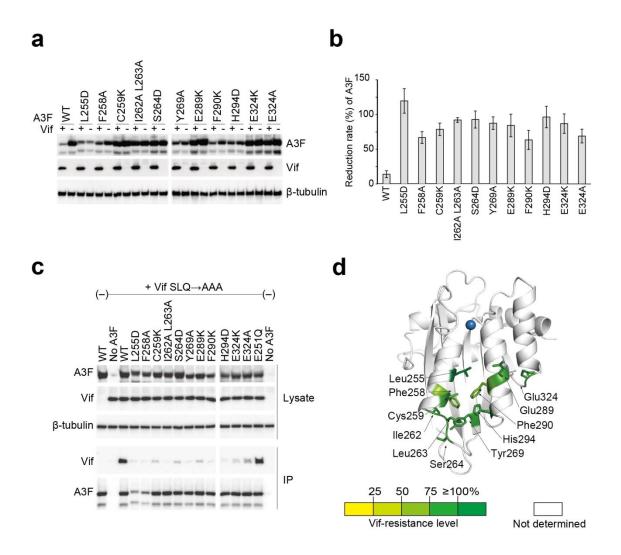


Figure 11 A3F の HIV-1 Vif 結合に関する変異解析. (a) 293T 細胞において, HIV-1 Vif 存在下もしくは非存在下 (空ベクター) での A3F の細胞内量を Western Blot 法により解析した. 各残基の変異は A3C と同様とした. (b) Vif 存在下での A3F の残存率 (%) を計算しグラフ化した. (c) 野生型もしくは変異型 A3F-Myc-His と Vif SLQ→AAA との複合体の共免疫沈降実験. (d) A3F CTD モデル構造上に, Vif 抵抗性を示す変異箇所をマッピングし, カラーバーに従い Vif 抵抗性レベルで色分けした.

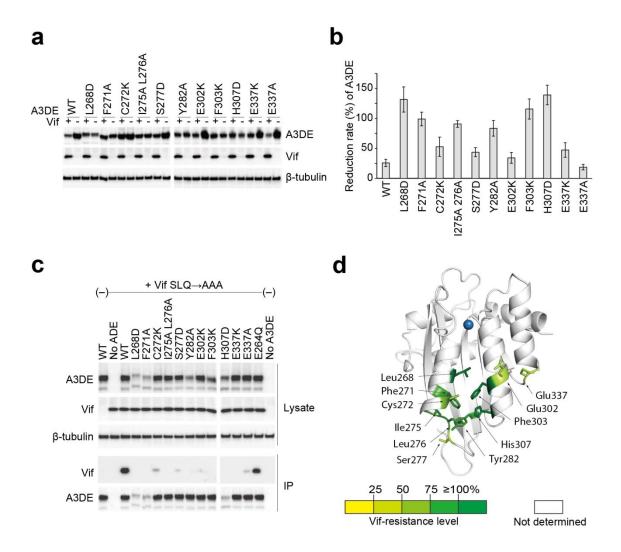


Figure 12 A3DE の HIV-1 Vif 結合に関する変異解析. (a) HIV-1 Vif 存在下もしくは非存在下 (空ベクター) における, A3DE の細胞内量を Western Blot 法により解析した. 各残基の変異は A3C と同様とした. (b) Vif 存在下での A3DE の残存率 (%) を計算しグラフ化した. (c) 野生型もしくは変異型 A3DE-Myc-His と Vif SLQ→AAA との複合体の共免疫沈降実験. (d) A3DE CTD モデル構造上に変異を導入し抵抗性となる残基をマッピングした. カラーバーに従い Vif 感受性レベルで色分けした.

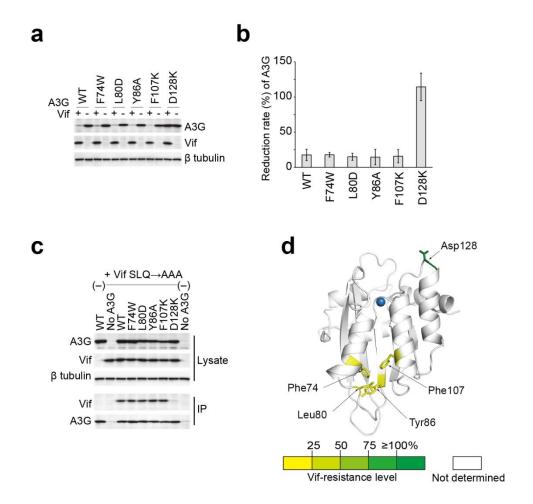


Figure 13 A3G の HIV-1 Vif 結合に関する変異解析. (a) HIV-1 Vif 存在下もしくは非存在下(空ベクター)における A3G の細胞内量を Western Blot 法により解析した. A3C と A3G NTD 間で保存された 4 残基について各変異体を作製した. 既報の Vif 抵抗性変異型 A3G D128K をポジティブコントロールとし解析した. (b) Vif 存在下における A3G の残存率(%)を計算しグラフ化した. (c) 野生型もしくは変異型 A3G-Myc-His と Vif SLQ \rightarrow AAA との複合体複合体を共免疫沈降した. (d) A3G NTD モデル構造上に変異解析を行った残基をマッピングし、Vif 感受性レベルで色分けした.

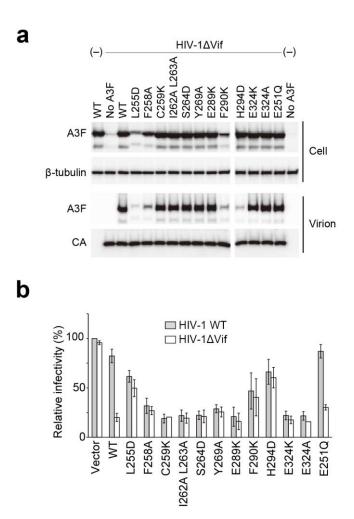


Figure 14 Vif 抵抗性 A3F 変異体の抗 HIV-1 活性の測定. (a) 野生型もしくは変異型 A3F-Myc-His 発現プラスミドと pNL4-3 vif(-) を 293T 細胞にコトランスフェクションした. 細胞内 (Cell) と上清ウイルス粒子内 (Virion) の A3F 量を Western Blot 法により解析した. (b) LuSIV cells を用いた HIV-1 野生型 (WT) と vif 欠損型 (Δ Vif) に対する A3F の抗ウイルス効果の測定. A3F 非存在下 (空ベクター) における HIV-1 WT の感染価を 100% とし,野生型もしくは変異型 A3F 存在下での HIV-1 の感染価を測定した. 各変異体に対して,独立した三回の実験を行い,標準偏差を計算した.