

平成 27 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	□奨励研究助成金	□研究成果刊行助成金
	■21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	□21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	内因性レトロウイルス複製阻害因子 APOBEC3 による新規ウイルス粒子成熟阻害機構を基礎としたペプチド医薬の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者： 医学部 教授・宮澤 正顕 共同研究者： 理工学部応用化学科 講師・北松 瑞生 医学部 医学部講師・博多 義之	

1. 研究目的・内容

我々はマウスレトロウイルスに対する自然抵抗性を解析する中で、細胞内レトロウイルス複製制限因子であるシチジンデアミナーゼ APOBEC3 に遺伝的多型があり、抵抗性系統は APOBEC3 が高発現であること、N-末端側のアミノ酸配列の違いが機能差を規定することを世界で初めて報告した。さらに最近、マウス APOBEC3 がウイルスプロテアーゼによる構造タンパク質前駆体切断を阻害し、粒子成熟を抑制することを発見した。本研究は、我々が生理的機能を見出した細胞内ウイルス複製制限因子の、新たな作用機序を分子レベルで解明し、マウス APOBEC3 のウイルスプロテアーゼ抑制機能を基礎とした抗レトロウイルス薬開発の基盤を築くことを目的とした。

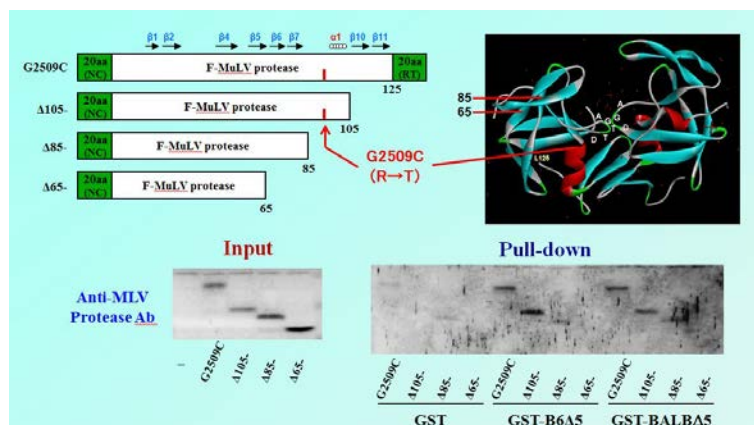
2. 研究経過及び成果

本研究の2年間の成果については、現在原著論文投稿準備中で、特許出願を計画中の部分もあるため、それらに関する詳細の記述は控える。

マウスレトロウイルスの複製過程に対する APOBEC3 の阻害効果を試験管内で解析する過程で、感染性モロニー白血病ウイルス分子クローンの塩基配列が、データベース上に公開されているものと異なることを見出した。実際の分子クローンのアミノ酸配列とデータベース上のそれとが異なる部分は、*gag-pol* 領域の6箇所集中しており、うち一つのアミノ酸置換はプロテアーゼ活性に関わると予想された。そこで、個々のアミノ酸残基を相互に置換した変異クローンを作製してウイルス構造タンパク質のプロセッシングを解析した結果、予想通り *pol* 領域プロテアーゼコード部分の1アミノ酸置換により、Gag タンパク質の分解が全く起こらなくなることが明らかとなった。

そこで、これら変異ウイルスのプロテアーゼ機能をマウス APOBEC3 共発現下で比較したところ、APOBEC3 存在下では Gag タンパク質のプロセッシングも、Env タンパク質の部分分解による成熟も抑制されることがわかった。また、これに伴い、APOBEC3 存在下では電子顕微鏡下で観察される粒子成熟が抑制された。マウス APOBEC3 によるレトロウイルスプロテアーゼ活性抑制は、第5エクソンの有無に関わらず観察された。また、APOBEC3 分子の N-末端ドメインと C-末端ドメインを独立に発現させたところ、何れもプロテアーゼ活性には影響を与えなくなったが、C-末端領域はウイルス粒子への取り込みに必須であるから、論理的に N-末端領域にプロテアーゼ抑制活性があるものと推論された。

そこで、GST 標識マウス APOBEC3 をコムギ胚芽系によって試験管内で翻訳産生させ、マウスレトロウイルスプロテアーゼ及びその部分断片の共沈降を、プロテアーゼ分子 N-末端部分に対する抗体で検出した。その結果、マウス APOBEC3 はマウスレトロウイルスプロテアーゼに直接結合し、それに関わる残基は N-末端側半分に局在することが明らかとなった (右図)。



3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究に関連し、マウス APOBEC3 はヒト免疫不全ウイルス (HIV) のプロテアーゼ活性も抑制すること、マウス APOBEC3 は HIV プロテアーゼの前駆体からの切り出しを抑制する活性を持つことを明らかにしている。既に、2. に述べたと同様の方法論により、マウス APOBEC3 と HIV プロテアーゼ前駆体との結合部位を明らかにしつつあり、今後マウス APOBEC3 の構造・機能相関に基づいた、新規の抗レトロウイルス薬開発シーズが提供できると期待して、詳細な解析を進めている。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
第 63 回日本ウイルス学会学術集会	口頭発表	2015 年 11 月 22~24 日
International Congress of Immunology 2016	口頭発表	2016 年 8 月 21~26 日
28th International Workshop on Retroviral Pathogenesis	口頭発表	2016 年 12 月 5~9 日
生化学	雑誌	2016 年 10 月刊行予定