

令和元年5月29日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08821

研究課題名(和文) APOBEC3によるGag-Pol前駆体プロセッシング阻害の機序解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of APOBEC3-mediated inhibition on Gag-Pol autoprocessing

研究代表者

博多 義之 (HAKATA, Yoshiyuki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30344500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：APOBEC3は自身の酵素活性を介する機構と介さない機構の両面からウイルス複製を阻害するが、その分子機構の全容は解明されていない。本研究ではAPOBEC3がどのようにHIV-1とMuLVの増殖を阻害するのか、機序解明に取り組んだ。その結果、APOBEC3はウイルス酵素群の前駆体に結合し、その多段階的な切断を経て生じるウイルスポテアーゼの産生を阻害することで、最終的にウイルス粒子の感染性を低下させると分かった。本活性はAPOBEC3のデアミナーゼ活性に非依存的であり、異常な前駆体切断を惹起するものであった。また、ウイルス粒子形成阻害を介してウイルスの放出量を低下させることも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APOBEC3がこれまでに報告されている知見とは全く異なる働き方(分子機序)をすることでウイルス複製を抑制していると明らかにした点、本研究の学術的意義がある。また、本研究により明らかになった分子機序が様々な病原微生物にも働く可能性があり、感染症分野に広く影響を及ぼす成果である。長期にわたり感染症制圧を達成するには薬剤耐性ウイルス等の脅威に備えなければならず、そのための新薬開発は社会的要求度が高い。本研究成果は「HIV-1などのレトロウイルスに対して新たな作用機序を持つ新規抗ウイルス薬の開発」に結びつく社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：APOBEC3 is a cytidine deaminase and inhibits the replication of various types of viruses through the deaminase-dependent and -independent ways. Understanding the entire mechanisms that underlie the anti-viral function of APOBEC3 remains incomplete. Here, we investigated how APOBEC3 interferes with the replication of human immunodeficiency virus (HIV-1) and murine leukemia viruses (MuLVs). We found that APOBEC3 binds Gag-Pol precursor polyprotein and interferes with the production of mature viral protease (PR) autoprocessed from the Gag-Pol precursor, leading to an increase in immature virus particles, which can not infect with cells. Our results suggest that this inhibitory effect of APOBEC3 is independent on its deaminase activity and probably mediated through the promotion of aberrant digestion of Gag-Pol. We also found that APOBEC3 may reduce virion production likely through the binding to Gag-Pol and subsequent inhibition of virion assembly.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Retrovirus MuLV HIV-1 APOBEC3 感染抵抗性因子 Gag-Pol autoprocessing Gag assembly

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) は、免疫グロブリン遺伝子の編集に働く activation-induced cytidine deaminase (AID) とともに脊椎動物の AID/APOBEC ファミリーに属している。ヒトには7種類の APOBEC3 遺伝子産物 (APOBEC3A、B、C、DE、F、G、H) が存在する一方で、マウスには第 15 染色体から発現する 1 種類の APOBEC3 (mA3) が存在する。mA3 には B6 系統など MuLV 感染抵抗性マウスが主に発現するエキソン 5 を欠損するタイプの d5 mA3、および Balb 系統など感染感受性マウスが主に発現する全長型の 5+ mA3 がある。全ての APOBEC3 はシチジン脱アミノ化酵素として共通のドメイン構造 (Z ドメイン) を 1 分子内に 1 つないし 2 つ有しており、Z ドメインの存在・機能を介して様々な外来性ウイルスやレトロトランスポゾンなど内在性転移因子の増殖を阻害している。APOBEC3 による抗ウイルス活性の分子メカニズムとして最初に報告された機序は、Z ドメインのシチジンデアミナーゼ機能を介したウイルス DNA の変異導入である。APOBEC3 にはウイルス DNA のシトシンを脱アミノ化してウラシルに変換する能力があり、その最終結果としてウイルス遺伝子上に停止コドンを出現させウイルスタンパク質の産生を抑制したり、アミノ酸変異を誘発して増殖可能なウイルスの産生を阻害している。一方、デアミナーゼ活性に非依存的な抗ウイルス活性も現在では多数報告されている。HIV-1 やマウス白血病ウイルス (MuLV) に対して発揮されるデアミナーゼ活性非依存的なウイルス複製阻害については、逆転写反応時に生じるウイルス一本鎖 DNA に APOBEC3 が強固に結合し、反応の進行を阻害している機序が知られている。

HIV-1 および MuLV の成熟ウイルスプロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT) およびインテグラーゼ (IN) はウイルス複製に必須の酵素群である。これらはまず Gag-Pol タンパク質の一部として翻訳され、その後前駆体中に埋め込まれている PR の活性により個々の成熟 PR、RT、IN に切り出される。この Gag-Pol 中の PR による前駆体切断には Gag-Pol 同士の 2 量体が必須であると知られ、また 2 量体化には Gag-Pol 中の PR 部分および RT 部分が関与していると推察されている。しかし、他の領域の関与など不明な点も多い。活性を持ったウイルス酵素群の正確な切り出しには切り出される順番も重要であり、多段階に反応が進む Gag-Pol 切断過程は厳密に制御されたものであると考えられている。切り出された成熟 PR はウイルス構造タンパク質である Gag を切断することで、子孫ウイルスの粒子形成に必要となる Gag 由来産物を産生する。

我々は MuLV 複製における mA3 の役割を解析する中で、mA3 存在下では Gag の切断に異常が認められること、Gag-Pol からの成熟 PR の切り出しが阻害を受けていること、およびその阻害が mA3 のデアミナーゼ活性に依存していないことを示す初期的なデータを得た。従って、デアミナーゼ活性非依存的な抗ウイルス活性について既知である逆転写反応抑制の阻害様式とは違う阻害機序の存在が推測される。我々は MuLV Gag-Pol、成熟 PR、および Gag-Pol 切断過程で産生される中間体の幾つかを同時に検出できる抗体を作成している。この抗体と Gag-Pol 切断過程を追跡できる *in vitro* 転写翻訳系とを組み合わせることで、mA3 は MuLV Gag-Pol 切断過程のうち、最初の切断を阻害していることを示す初期的なデータも得ている。さらに、HIV-1 に関して同様の解析を行った結果、mA3 は HIV-1 の成熟 PR の産生を阻害していること、mA3 により HIV Gag-Pol 切断過程がある段階でとまっていることを示唆する結果を得ている。しかし、いずれのウイルスにおいても mA3 による Gag-Pol 切断過程阻害の詳しい分子機序は不明のままである。

2. 研究の目的

本申請研究では mA3 による MuLV および HIV-1 Gag-Pol 切断阻害機序を明らかにする。

(1) MuLV についてこれまでの初期的なデータから下記 3 つの機序が推定される。Gag-Pol 内の 2 量体化に要する領域に mA3 が結合することで 2 量体化を阻害している。Gag-Pol 中に

埋め込まれている PR によって切断される領域に mA3 が結合し、切断部位を立体障害的に保護している。 mA3 が PR 領域に直接結合し、その活性を制御している。そこでまず、mA3 による MuLV Gag-Pol 切断阻害が最初の切断時に起こるのか更なる実験で確認し、mA3 が Gag-Pol 中のどこに結合するのか調べることで上記 ~ の可能性について評価、阻害機序を明らかにする。

(2) HIV-1 の場合、mA3 存在下で特定の間体まで検出できており Gag-Pol 切断の開始に必要なとされる 2 量体化は阻害されていないと予想されるため、上記 の可能性は除外できる。そこで、mA3 が HIV-1 Gag-Pol 中のどこに結合するのか検討することで上記 および について評価し、阻害機序を明らかにする。中間体まで産生される Gag-Pol 切断過程中、RT や IN の切り出しが完了しているのか明らかにし、さらにヒト APOBEC3 でも Gag-Pol 切断阻害が起こるのか、薬剤耐性 HIV-1 でも APOBEC3 による Gag-Pol 切断阻害が認められるのか明らかにする。

3 . 研究の方法

研究開始当初からヒト細胞破碎液をベースに作成された *in vitro* 転写/翻訳系で MuLV Gag-Pol 前駆体を発現させると Gag-Pol の多段階的な切断が反応液中で再現され、当該反応液中に生じる Gag-Pol、PR 部分を含む各種中間体、成熟 PR は独自作成した抗 MuLV PR 抗体によるウェスタンブロット (WB) で検出できることを認めていた。HIV-1 Gag-Pol 前駆体を同 *in vitro* 転写/翻訳系で発現させた場合、Gag-Pol、PR 部分を含む各種中間体が独自作成の抗 HIV-1 PR 抗体による WB で検出された一方、成熟 PR は検出されなかった。ただし、同反応液中で Gag 切断は実行されたことから成熟 PR は検出限界以下ながらも産生されていると考えられる。この *in vitro* 転写/翻訳系で mA3 を共発現した際の各種中間体等の量変動を正確に検出することで、多段階過程からなる Gag-Pol 切断のうちどの段階の切断に mA3 が干渉しているのか調査・確認した。また、*in vitro* 転写/翻訳反応液に対して IN や RT など PR 以外のウイルスタンパク質に対する特異的抗体を使用した WB を行うことで、それらの産生に mA3 が干渉するのか調べた。

mA3 を含有したウイルス粒子と含有しないウイルス粒子を回収/破碎後に PR、RT、または IN に特異的な抗体を使用した WB を行い中間体等を検出することで mA3 の Gag-Pol 前駆体切断干渉効果の評価を試みた。ウイルス粒子はウイルスをコードするプラスミドを APOBEC3 プラスミドまたは APOBEC3 を含まない親プラスミドとともに 293T 細胞に導入することで産生し、培養液中に産生されたウイルス粒子は 20% ショ糖溶液を用いた超遠心法により回収した。回収後、サンプルバッファーに溶解し各種抗体を使用した WB に供した。同様に、ヒト APOBEC3 を含有したウイルス粒子と含有しないウイルス粒子を回収/破碎し、抗 HIV-1 PR 抗体等を使用した WB に供することでヒト APOBEC3 に HIV-1 Gag-Pol 前駆体切断干渉活性があるのか調べた。

Gag-Pol 前駆体のどの領域に mA3 が結合するのか調べるために Pull-down 法および免疫沈降法を行った。pull-down 法の際、ベイトにはコムギ胚芽系を利用し合成/精製した GST-mA3 を使用し、結合候補となるウイルスタンパク質は *in vitro* 転写/翻訳系で調整した。グルタチオンセファロースビーズに結合した GST-mA3 と結合候補タンパク質を混合/洗浄後、結合したウイルスタンパク質は WB で検出した。免疫沈降法では Gag-Pol と Flag タグ融合 mA3 (Flag-mA3) を *in vitro* 転写/翻訳系で発現させた後、抗 Flag 抗体により Flag-mA3 を免疫沈降し、共沈するウイルスタンパク質を WB で検出した。別に、Flag-mA3 を含有したウイルス粒子を回収/破碎したものを免疫沈降法に用いた。

4 . 研究成果

(1) MuLV: Gag-Pol 切断に mA3 が与える影響について、感染性 Friend MuLV (p57 および FB29

strains)を使用し定量的にデータを解析した結果、以下のことが明らかとなった。複製能を有する Friend MuLV および PR 不活性型で複製能を有さない Friend MuLV はいずれも 5+ mA3 および d5 mA3 をウイルス粒子内に取り込むことが分かった。5+ mA3 はウイルス粒子内で PR により切断を受けていた。ただし、5+ mA3 の切断は p57 で効率よく検出される一方、FB29 では顕著に効率が減少していた。さらに、Moloney MuLV を使用し同様の解析をしたところ、ウイルス粒子内に取り込まれた 5+ mA3 は殆ど切断されないことが分かった。ウイルス粒子中に認められる Gag-Pol からの成熟 PR 産生は mA3 により半分以下に低下し、成熟 PR による Gag の切断効率も同程度減少した。野生型 B6 マウスと mA3 ノックアウトマウスから調整されたマウス胎児線維芽細胞に Friend MuLV (FB29 strain) を感染させたところ、産生されたウイルス粒子中に認められる成熟 PR 量および Gag 切断効率は生理的な mA3 発現量下でも低下していた。mA3 は N 末半分および C 末半分にそれぞれ Z ドメインをもっている。デアミナーゼ活性を失活させた mA3 変異体および C 末半分の mA3 (mA3 Ch) は mA3 と同程度に成熟 PR 量を低下させ、Gag 切断効率を低下させた。一方、N 末半分の mA3 (mA3 Nh) に効果はなかった。mA3 存在下で形成されたウイルス粒子を電子顕微鏡下で観察したところ形態的に未成熟なウイルス粒子が増えた。さらに、GST-mA3 リコンビナントタンパク質を精製して、それをベイトに使用した Pull Down 法を行ったところ mA3 と PR の結合を認め、PR 側の結合最小結合領域が PR 分子の 66-105 番目のアミノ酸残基から構成される領域であると分かった。次に、In vitro 転写/翻訳系で同時に発現させた mA3 と Gag-Pol の免疫沈降を行ったところ、mA3 と mA3 Ch は Gag-Pol と結合し、mA3 Nh は結合をほとんどしないことが分かった。また、免疫沈降に供した反応液を解析したところ、mA3 または mA3 Ch を共発現させた場合に成熟 PR 産生は検出されず、mA3 非存在下または mA3 Nh を共発現させた反応液中には成熟 PR が検出された。これらの結果から mA3 は MuLV Gag-Pol に結合してその切断を異常にすることで成熟 PR の産生を低下させウイルス複製を阻害していること、さらにそれがデアミナーゼ活性非依存的な mA3 の抗ウイルス活性を担う分子基盤であることが考えられた。デアミナーゼ活性非依存的な抗ウイルス作用のメカニズムとして現在国内外では mA3 が逆転写反応速度を低下させる機構が知られているが、本研究によりさらに上流過程に位置する成熟 PR、RT、IN 産生段階で mA3 は抗ウイルス活性を発揮していることが判明した。また、mA3 存在下で非効率的ではあるが切り出された成熟 PR は mA3 に結合し、それが 5+ mA3 の場合はエキソン 5 領域を切断してしまうと考えられる。

MuLV の PR に対する自作抗体と Gag-Pol 切断過程を追跡できる *in vitro* 転写翻訳系を利用した解析から、約 130kDa の中間体が成熟 PR および Gag-Pol とともに検出されており、その存在量は mA3 または mA3 Ch の発現量と逆相関した。一方、mA3 Nh には影響を受けなかった。この中間体は多段階からなる Gag-Pol 切断過程の初期に産生される中間体である。申請研究開始当初、成熟 PR の産生阻害について mA3 は Gag-Pol 切断過程中のどこかの素過程を阻害していると考えていた。しかし、mA3 による 130 kDa 中間体減少に Gag-Pol や他の中間体の量的な上昇が伴わないことが研究期間中の解析結果から明確に判明したことで、上記の阻害様式でなく、mA3 は Gag-Pol に結合して本来切断サイトでないところの切断などの異常切断を促進している可能性が強いと考えられる。また、これらの結果から mA3 は Gag-Pol の 2 量体化を阻害しないこと、および PR に直接結合してその活性異常を引き起こしている可能性が推察される。今後、抗ウイルス活性に關与する mA3 Ch 領域の同定、当該領域の構造学的特徴の解析から新規の抗ウイルス薬開発が期待できる。

(2) HIV-1 : MuLV と同様に mA3 と mA3 Ch はウイルス粒子中の成熟 PR 量を低下させることが分かった。一方、mA3 Nh に活性は認められなかった。さらに、mA3 Ch の Z ドメインを含む約

100 アミノ酸部分が切断異常を惹起する責任領域であると分かった。ヒト APOBEC3 のうち APOBEC3G と APOBEC3F に Gag-Pol 前駆体切断干渉能があり、特に APOBEC3F はその能力が強く、成熟 PR 量を最大で検出限界以下にまで低下させた。Gag-Pol 切断で生じる中間体について APOBEC3 に依存した蓄積は認められなかった。従って、研究開始当初は APOBEC3 による Gag-Pol 切断干渉の機序として切断過程のブロックを想定していたが、MuLV と同様に実際は異常切断を促進することで成熟 PR が減少する可能性が考えられた。ウイルス粒子を回収し免疫沈降に供したところ Gag-Pol、成熟 PR、RT、および IN と mA3 または mA3 Ch が結合することが分かった。In vitro 転写/翻訳で調整したタンパク質を使用した免疫沈降でも Gag - Pol と mA3 または mA3 Ch との結合が認められた。mA3 は IN 量を低下するもののその影響は限定的であった。

予期していなかった新たな知見として、mA3 は HIV-1 複製過程のうち集合または出芽過程に干渉してウイルス粒子産生を減少させることが判明した。上記した HIV-1 成熟 PR 量低下にはウイルス粒子産生低下の寄与も含まれているものと考えられる。その際、産生されたウイルス粒子のカプシド安定性に mA3 は影響していなかった。今後、この機序を詳細に解析することにより APOBEC3 分子の新たな役割の発見が期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yoshiyuki Hakata, Hiroyuki Michiue, Takashi Ohtsuki, Masaaki Miyazawa, and Mizuki Kitamatsu. A leucine zipper-based peptide hybrid delivers functional Nanog protein inside the cell. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 査読有 29 2019. 887-881. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.02.004.
2. Shiki Takamura, Hideki Yagi, Yoshiyuki Hakata 以下を省略(14名). Specific niches for lung-resident memory CD8+ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. *The Journal of Experimental Medicine* 査読有 213 2016. 3057-3073. DOI: 10.1084/jem.20160938.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Yoshiyuki Hakata, Jun Li, Takahiro Fujino, Yuki Tanaka, Rie Shimizu, and Masaaki Miyazawa. Mouse APOBEC3 interferes with proteolytic autoprocessing of Gag-Pol polyprotein and inhibits Gag processing. *Retropath 2018* 2018.

〔図書〕(計 1 件)

1. 宮澤 正顕、博多 義之、武田 英里、李 君、河原 佐智代 公益社団法人日本生化学会 生化学 2016. 558-592.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮澤 正顕

ローマ字氏名：(MIYAZAWA, Masaaki)

所属研究機関名：近畿大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60167757

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。