

平成26年度 学内研究助成金 研究報告書

研 究 種 目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 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

本研究は2年間の研究期間で実施中であり、平成26年度については中間報告として経過を記述する。なお、本研究の中間成果については、原著論文未発表で、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。

1) APOBEC3 によるマウスレトロウイルスプロテアーゼ抑制の分子機構解析

平成26年度は、試験管内タンパク質転写翻訳系を用いて、マウスレトロウイルスの gag-pol 前駆体タンパク質、及びマウス APOBEC3 の各対立遺伝子産物、またはそれらの N-末端側及び C-末端側ドメインを発現させ、試験管内でのプロテアーゼプロセッシングをウェスタンブロット法で解析した。実験系は順調にワークしており、抑制機能部位の絞り込みと、多型による効果の差を検出できるようになった。

2) 生理的に発現する APOBEC3 によるウイルスプロテアーゼ抑制の検出

これまでタンパク質転写翻訳系などを用い、試験管内で検出してきたレトロウイルスプロテアーゼ活性の抑制が、生体内の生理的条件でも機能していることを証明するため、平成26年度は APOBEC3 遺伝子ノックアウトマウス及び野生型マウスの脾細胞にマウスレトロウイルスを感染させる系を用い、gag-pol 前駆体タンパク質のプロセッシングを検出することを試みた。予備的な実験で所期のデータを得たが、プロセッシング検出に用いる抗ペプチド抗体について、バックグラウンドでの反応性が高いことがわかり、APOBEC3 遺伝子ノックアウトマウス細胞抽出物での吸収を行うとともに、この際ノックアウトマウスを野生型マウスの細胞で免疫することによりモノクローナル抗体を作製することを決め、免疫操作を繰り返している。また、脾細胞へのレトロウイルス感染効率を高めるため、刺激後に感染を行うなどの工夫を加えている。

3) 目的ペプチドを細胞質内に導入する新方法の確立（発表済み）

1) で絞り込んだ APOBEC3 分子機能部位ペプチドをウイルス感染細胞の細胞質に効率的に導入するため、新たな細胞内移行ペプチドの方法論を確立した。今回開発した方法はロイシンジッパーを応用したもので、細胞膜貫通部分と機能性ペプチド部分を、それぞれ陰性電荷と陽性電荷を持ったロイシンジッパーで非共有結合的に会合させ、細胞内導入後に pH の変化によって機能性ペプチド部分のみが膜貫通部から離れ、細胞質で目的の機能を発揮するように設計した。実際にこの系が機能することを証明し、英国化学会の国際誌に本研究共同研究者の連名で掲載した。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

平成26年度の研究により、マウス APOBEC3 分子中のウイルスプロテアーゼ抑制機能部位が絞り込めるようになったので、平成27年度は多型のある機能部位の合成ペプチドを用いた実験を予定通り完遂し、創薬シーズとしての機能性ペプチドを同定する。その際、機能性ペプチドが生体内でプロテアーゼ抑制効果を発揮するためには細胞質内への移行が必要であるため、平成26年度に完成したロイシンジッパー法を含め、機能性ペプチドの細胞内導入法を活用する。また、当初の計画通り、マウス APOBEC3 の多型間機能差に基づいたプロテアーゼ抑制機能残基の絞り込みを行うが、その際には合成ペプチドによる競合阻害の方法を併用する。

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)
Chemical Communications 51 巻 2 号: 413-416 頁	雑誌	2015 年 1 月 7 日
Journal of Virology 89 巻 2 号: 1468-1473 頁	雑誌	2015 年 1 月
Virology Journal 11 巻: 108 頁	雑誌	2014 年 6 月 9 日