

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

2015 年 5 月 26 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 エネルギー理工学研究所

職 名 研究員

氏 名 神庭 圭佑

助 成 の 種 類	令和元 年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	HIVのVifによる異なる2種類の「ヒト防御システム無力化手段」の同時阻害			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 8th Asia-Pacific NMR Symposium、第42回日本分子生物学会年会、第57回日本生物物理学会年 会、 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、 添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		物品費	812,955	
		旅費・物品費に使用予定※	187,045	
※ウイルスによる制限のため				
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 科研費が不採択となり困惑していたため、大変ありがたい助成でした。2019年度は新型コロナウイルス等の影 響もあり、予算が当初の予定通り執行できなかった部分がありますが、本助成金は当該年度で全て執行する 必要がなかったことから、柔軟な対応ができ、私自身のみならず研究グループとして大変助けられました。改 めて感謝いたします。			

成果の概要

神庭圭佑（京都大大学エネルギー理工学研究所）

【研究の背景と目的】

ヒトのAPOBEC3Gタンパク質（A3G）はHIVの逆転写反応中間産物のcDNAに作用し、シトシンを脱アミノ化してウラシルに変換する。その結果 HIV の遺伝情報は破壊され、A3Gは抗 HIV 活性を発揮する（図 1）。すなわち A3G は HIV に対する防御機構としての役割を担う¹。HIV が有する Vif タンパク質（Vif）は A3G を無力化する。このため、Vif 存在下では A3G は抗 HIV 活性を発揮できない（図 1）。

Vif は抗 HIV 開発における創薬ターゲットであり、これまでに Vif を標的とする抗 HIV 薬は報告されていない。Vif は単独で構造を有しない天然変性タンパク質であり、HIV に感染したヒト細胞内では、Vif はヒト CBF β タンパク質、E3 ユビキチンリガーゼ関連タンパク質（EloB、EloC、Culin5）と結合し、分子量 100 kDa 程度からなる五者複合体（Vif 複合体）を形成する。

従来は、Vif は主として A3G の N 端ドメインと結合し、A3G をユビキチン化することでプロテアソームを介して分解すると考えられてきた（図 2）。これまでに Vif 単独での可溶性、調整については成功例がないが、Vif 複合体の X 線結晶構造が決定され、構造を有する Vif 複合体の調製が可能となった²。一方で、Vif と A3G の N 端ドメイン間の結合や、A3G のユビキチン化を阻害しても、HIV 感染細胞中で A3G が本来の機能を発揮できたという報告はない^{3,4}。

申請者は長年 A3G によるシトシンの脱アミノ化機構について研究を行ってきた^{5,6,7}。この知見を活用し、Vif 複合体を調製し、その存在下で A3G の全長及び C 端ドメインの活性を定量したところ、Vif 複合体は A3G の C 端ドメイン（CTD）の活性を直接阻害することを見出した（図 2）。すなわち、Vif は複数の A3G 無力化手段を有していることが示唆された。これらを同時に無力化できれば、A3G が本来の機能を発揮でき、これまでになかった機構を有する新規抗 HIV 薬開発の手がかりになると期待される（図 2）。

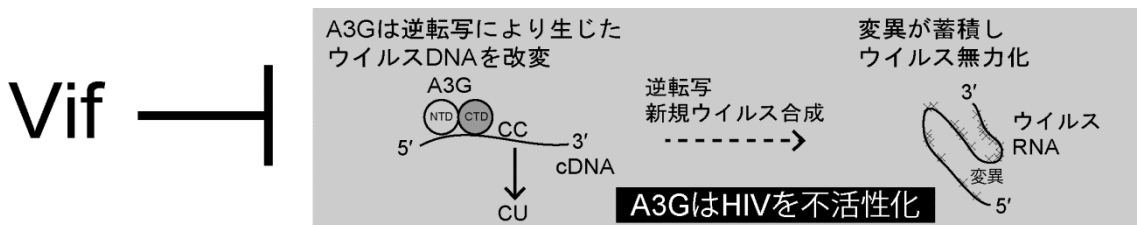


図 1. Vif は A3G を無力化するため、A3G は本来の機能を発揮できない。

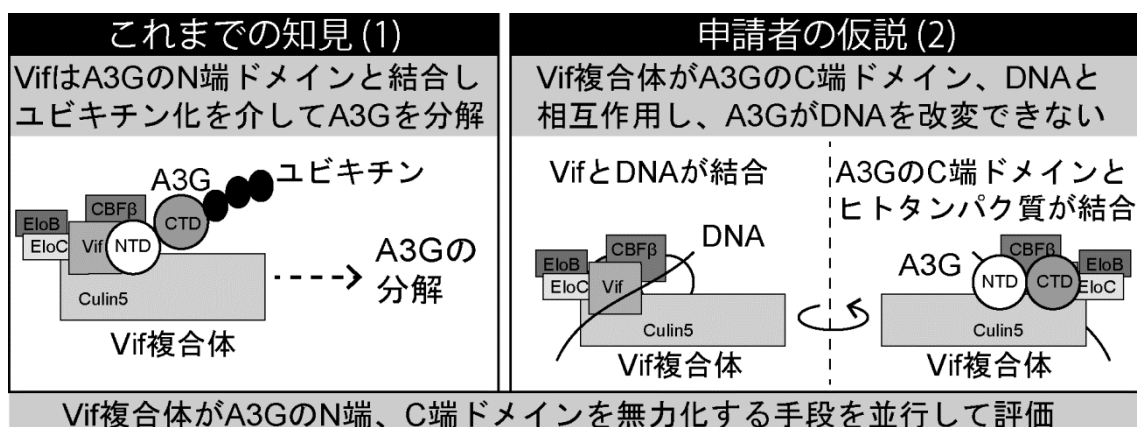


図 2. Vif の A3G 無力化機構、これまでの知見と申請者の仮説.

[Vif 複合体の選択的安定同位体標識]

大腸菌を用いた連続発現系を用いて、Vif 複合体中の Vif および CBFβ の選択的標識を行い、その NMR スペクトルを測定した。はじめに、Vif のみを標識した Vif 複合体を調整し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトル、¹H-¹⁵N TROSY スペクトル、¹H-¹³C Methyl TROSY スペクトルを測定した。いずれも標識自体には成功したが、Vif 複合体が高分子量であるため、解析可能な良好な NMR スペクトルを得ることはできなかった。そこで、高分子量のタンパク質に用いられる、¹H-¹⁵N CRIPT-TROSY スペクトルを測定したところ、上記より分離の良い、Vif の側鎖及び主鎖のアミドプロトンと思われる NMR シグナルを得ることができた。このスペクトルをさらに帰属するため、Culin5 等の重水素標識によりプロトン由来のシグナルを間引き、アミノ酸選択的標識法等の手法を用いて帰属を試みる予定である。次に、CBFβ のみを標識した Vif 複合体を調整し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定したところ、CBFβ 単独の場合と比べて、シグナル強度の減少と、一部のシグナルにシフトが見られた。このことは、Vif 複合体中の CBFβ が、想定通り複合体中に含まれ、単独の場合とは異なる構造を有していることを示唆している。より解析に適した分離の良いスペクトルを得るため、Culin5 等の重水素標識によりプロトン由来のシグナルを間引き、必要に応じてアミノ酸選択的標識法等の手法を用いる予定である。Vif の阻害剤の候補として、申請者が調整した Vif 複合体を提供した千葉工業大学の坂本研究室より、Vif に特異的に結合する RNA アプタマーを得た。今後は、このアプタマーが Vif と NTD の相互作用を阻害できるか検証する予定である。

[Vif による A3G の脱アミノ化阻害]

Vif 複合体及びその構成タンパク質存在下で、A3G の脱アミノ化反応を、実時間 NMR 法^{5,6,7}及び、ゲルを用いた生化学的手法を用いて定量した。Vif 複合体を CTD と等量加えると、CTD の脱アミノ化活性は 1%以下に低下する。Vif 複合体から Culin5 を除いた Vif 四者複合体 (Vif-CBFβ-EloB-EloC) で同様の実験を行うと、Culin5 を除くことにより、Vif 複合体の CTD に対する阻害効果は全ての構成要素が揃った Vif 複合体の 20%程度に低下した。

一方で、Vif、CBF β 、EloB-EloC 複合体、Culin5 は、CTD に対する阻害効果は、生化学的方法では検出できなかった。APOBEC ファミリーに属し、A3G と同様の構造と機能を持つ、A3F、A3B についても、その活性を Vif 複合体が阻害できるか検証したところ、Vif 結合部位を有する A3F、Vif 結合部位を有さない A3B の両方に対して、Vif 複合体は阻害効果を示した。

[Vif 複合体とその関連タンパク質と、DNA との相互作用]

タンパク質 (CTD、Vif 複合体、CBF β 、EloB-EloC 複合体、Culin5) と DNA の相互作用を分析用超遠心、サイズ排除クロマトグラフィー、蛍光異方性測定、ゲルシフトアッセイを用いて検証した。主として分析用超遠心で、Vif 複合体は高濃度では自己会合する傾向があり、1 分子の A3G の基質 DNA に対して、3 分子程度の Vif 複合体が結合することが示唆された。CTD と DNA の結合の強さは Vif 複合体と DNA 間の結合の 1% 以下であった。その他のヒトタンパク質と DNA 間の相互作用は検出できなかった。また、Vif と DNA の相互作用を蛍光異方性測定で検出したところ、Vif 複合体と同程度強さの結合が観測された。以上より、Vif 複合体と DNA 間の結合は、Vif が担っており、それ以外のタンパク質は関与しないことが示唆される。

[CTD と、Vif 複合体とその関連タンパク質との相互作用]

タンパク質間相互作用、すなわち、CTD と Vif 複合体、Culin5 を除いた Vif 複合体、CBF β 、EloB-EloC 複合体、Culin5 の相互作用を比較した。CTD を Vif 複合体で滴定し、CTD の NMR スペクトルを観測すると、Vif 五者複合体を加えるほど CTD のアミドプロトン由来のシグナルが減少した。CTD と Vif 五者複合体の混合比がおよそ 1:1 の時点では、ほとんど全ての CTD のアミノ酸のアミドプロトン由来のシグナルが消失したが、一方で側鎖のアスパラギン、グルタミンや末端のアミノ酸残基のシグナル強度は Vif 複合体添加前と変わらなかった。Culin5 を除いた Vif 複合体、Cul5 についても同様の測定を行うと、これらの添加に伴い CTD のアミドプロトン由来のシグナルは減少したが、その減少の程度は Vif 複合体のおよそ半分程度であった。更に、CBF β 、EloB-EloC 複合体についても、CTD の一部のアミノ酸残基由来のシグナル強度が減少した。これらの変化は溶液の塩濃度が増加すると消失した。以上のことから、CTD と Vif 複合体とその構成タンパク質との相互作用が静電相互作用に起因することが示唆された。次にこの結果を裏付けるため、分析用超遠心で分子間相互作用を評価したところ、CTD と Vif 複合体の相互作用は観測され、両者は高分子量の複合体を形成する可能性が示唆された。加えて、CBF β 、EloB-EloC 複合体、Culin5 についても、CTD との相互作用が観測され、分子量から、いずれも 1:1 の結合比で相互作用することが示唆された。

以上の知見から、Vif 複合体による CTD の阻害は、Vif 複合体中のヒトタンパク質 (CBF β 、EloB-EloC 複合体、Culin5) が担っている可能性が示唆された。今後、Vif の変異体を調整

し、Vif 部分が CTD の阻害に影響を及ぼすか評価した後、論文としてまとめる予定である。

[まとめ]

Vif が A3G を無力化する手段について、包括的に解析するために、それぞれのアッセイ系の確立に着手した。A3G の N 端ドメインと、Vif 複合体の相互作用については、構成分子を選択的に安定同位体標識した、Vif 複合体の NMR スペクトルがプローブとなるか検証した。その結果、¹H-¹⁵N CRIP-TROSY を用いた場合に、Vif のアミノ酸残機由来のシグナルを示唆する有望な結果が得られた。今後は、非標識分子の重水化等を駆使して、より精度の良い NMR スペクトルを得ることを目指す。加えて、Vif 複合体が CTD 活性を直接阻害するメカニズムについて検証した。阻害実験と、網羅的な分子間相互作用実験から、予想に反して、Vif による CTD の阻害は、Vif 複合体中のヒトタンパク質 (CBFβ、EloB-EloC 複合体、Culin5) が担っている可能性が示唆された。今後、Vif の変異体を調整し、Vif 部分が CTD の阻害に影響を及ぼすか評価した後、論文としてまとめる予定である。

[謝辞]

本研究は、京都大学・エネルギー理工学研究所の片平正人教授、永田崇准教授の協力を得て行った。本研究で行ったほとんどの実験はこの両名が属する研究室で行い、その設備を使用した。A3F、A3F の調製とこれらの Vif による阻害実験は、片平研究室の博士課程の学生であった万里氏の協力を得た。CBFβ を選択的に標識した Vif 複合体の調製に関しては、片平研究室の修士課程の学生であった、汪寧馨氏の協力を得た。Vif 関連タンパク質は、京都大学医学研究科の高折晃史教授から提供を受けた。分析用超遠心解析は、法政大学・生命科学部の雲財悟准教授に測定、解析を委託した。全長の A3G 作成においては、株式会社セルフリースサイエンスの森下博士の協力を得た。RNA アプタマーの取得には、千葉工業大学・先進工学部の坂本泰一教授の協力を得た。

[引用文献]

1. Harris and Liddament, *Nat. Rev. Immunol.*, 2004
2. Guo *et al.*, *Nature*, 2014
3. Wang *et al.*, *Retrovirology*, 2014
4. Binning *et al.*, *PLoS Pathog.*, 2018
5. Kamba *et al.*, *PLoS One*, 2015
6. Kamba *et al.*, *Front. Microbiol.*, 2016
7. Kamba *et al.*, *Phis. Chem Chem. Phys.*, 2018

[研究成果]

1. Kamba K., Wan L., Unzai S., Morishita R. Nagata T. and Katahira M. An insight into the target search and HIV Vif-dependent inactivation of APOBEC3F and APOBEC3G elucidated by tracking the deamination events. *8th Asia-Pacific NMR Symposium*, September 3–6 (2019), Singapore (pick upped oral).
2. Kumagai K., Suzuki T., Sekikawa Y., Kamba K., Wan L., Nagata K., Takaori-Kondo A., Katahira M., Nagata T. and Sakamoto T. Development of RNAs that bind to the Vif - CBF β - CUL 5 - ELOB - ELOC complex. *The 10th International Symposium of Advanced Energy Science*, September 4–6 (2019), Kyoto, Japan (poster).
3. 神庭圭佑、万里、雲財悟、森下了、永田崇、片平正人 HIV Vif-ヒト E3 ユビキチンリガーゼ複合体によるヒト抗ウイルス因子 APOBEC3G の脱アミノ化阻害の分子メカニズム 第 57 回日本生物物理学会年会、2019 年 9 月 24-26 日、宮崎県 (ポスター発表)
4. 神庭圭佑、万里、雲財悟、森下了、永田崇、片平正人 HIV Vif によるユビキチン化を介さないヒト AOBEC3G 活性の阻害 第 42 回日本分子生物学会年会、2019 年 12 月 3-6 日、福岡県 (ポスター発表)
5. 熊谷紀志、鈴木拓也、関川湧斗、神庭圭佑、万里、永田佳代子、高折晃史、片平正人、永田崇、坂本泰一 Vif - CBF β - CUL5 - ELOB - ELOC 複合体に結合するアプタマーの解析 第 42 回日本分子生物学会年会、2019 年 12 月 3-6 日、福岡県 (ポスター発表)
6. 2019 年度 京都大学 研究連携基盤 次世代研究者支援 (前期) 採択 (研究成果 1)
7. Travel Award for the 8th APNMR Singapore Conference (研究成果 1)
8. 第 57 回日本生物物理学会年会 トラベルグラント 採択 (研究成果 3)

*1, 2: 国際会議における発表

*3, 4, 5: 国内学会における発表

*6, 7, 8: 受賞等