

第9回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

宿主防御因子 APOBEC3G の抗 HIV 作用メカニズムに関する研究

Study on Molecular Mechanism of Host Defense Factor,
APOBEC3G, against HIV

岩谷 靖雅

Yasumasa IWATANI

(独)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

Department of Microbiology and Immunology, Clinical Research Center,
National Hospital Organization Nagoya Medical Center

はじめに

今回、第9回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞の背景となった研究について、概説する。

研究の背景

宿主防御因子 APOBEC3G (A3G) は細胞内に発現する Cytidine Deaminase (ssDNA 中の Cytidine を脱アミノ化し、dU に変換する酵素) で、レトロウイルスに対する宿主防御因子である。A3G は、Vif を欠損した HIV-1 (以下、HIV-1vif (-)) の複製を強く阻害する。HIV-1vif (-) は、ウイルス産生細胞内で発現する A3G を粒子内に取込む。そのため、新たな細胞に感染する時に、逆転写の過程が A3G によって強く阻害される。一方、野生型の HIV-1 (以下、HIV-1 WT) は、ウイルス産生細胞内で Vif を発現し、ユビキチン/プロテアソーム系を介して選択的に A3G を破壊し枯渇させてしまう。このため、HIV-1 WT は A3G をウイルス粒子に取込まず、A3G の防御システムから逃れることができる (図1)。A3G の抗レトロウイルス作用の分子メカニズムについては、諸説あるが、Cytidine Deaminase としての酵素活性に依存的な機構と非依存的なメカニズムがあることまでは一致した見解である。その根拠は2つある。1) 酵素活性を欠失した A3G は、野生型より低い発現量依存的に抗 HIV 作用を示す。特に、過剰発現させた場合には、野生型の効果に匹敵する。2) A3G は、B 型肝炎ウイルスやパルボウイルス、いくつかのレトロトランスポゾンに対しても強い抗ウイルス作用 (DNA 合成阻害) を示すが、いずれも Deaminase 非依存的に抑制する。

実は、「細胞が HIV-1vif (-) の増殖を許容するか否かを決定する因子が A3G である」という発見以前から、非許容細胞 (A3G を発現する細胞) から産生される HIV-1vif (-) の感染では、感染細胞内における逆転写反応が抑制され、逆転写初期から後期にかけて逆転写産物が段階的に減少することが分かっていた。さらに、この抑制効果はターゲット細胞がどんな細胞種であれ同様に認められることが分かっていた。A3G が広範な抗ウイルス作用スペクトルを示すことを考慮すると、A3G の抗 HIV 作用機序は、A3G がもつ何らかの分子生化学的特性が、細胞質で DNA 合成をするウイルス (HBV やパルボウイルス、いくつかのレトロエレメント) に共通した分子機序に帰結することがもともとらしいと考えられる。

多くの研究者が感染細胞を用いた研究により、抗 HIV 作用機構の解明に取り組んでいる。しかし、図2に示したような HIV の複雑な逆転写過程について各ステップを、感染細胞を用いて評価することは非常に困難である。そのため、逆転写がどのように抑制されるのかという分子レベルでの詳細な機序は明らかになっていなかった。そこで、筆者は A3G タンパクを精製し、A3G の生化学的、分子生物学的な性質を明らかにし¹⁾、*in vitro* 再構築系を用いて逆転写の各過程に対する影響を解析し、抗 HIV 作用機序を分子レベルで明らかにする研究を行った。その結果、A3G の抗 HIV 作用メカニズムの1つである酵素活性非依存的な分子機序を明らかにすることができた²⁾。以下、その結果について概説する。

A3G による酵素活性非依存的な HIV-1 逆転写阻害メカニズム

最初に、酵素活性をもつ A3G を、バキュロウイルスを用いた発現系を利用して発現・精製した¹⁾。筆者らが開発した *in vitro* の逆転写再構築系³⁾を用いて、HIV-1 の一連の

著者連絡先: 〒460-0001 名古屋市中区三の丸4-1-1 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

2009年7月13日受付

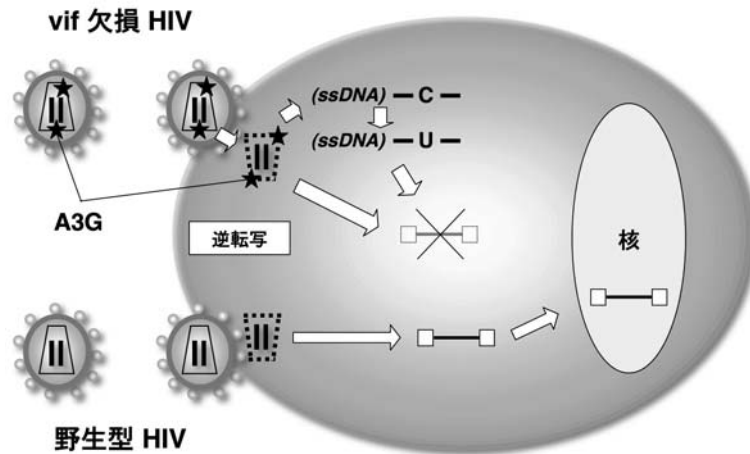


図 1 A3G による抗 HIV 作用

vif を欠損した HIV では、ウイルス産生細胞由来の A3G がウイルス粒子 (コア) に取込まれ、新たに感染した細胞において逆転写産物が減少する。A3G による Cytidine Deaminase (酵素) 活性依存のあるいは非依存に阻害されるメカニズムがある。一方、野生型 HIV では、産生細胞内で Vif により A3G が枯渇させられるため、ウイルスは A3G を取込まず、A3G の抗ウイルス防御システムから逃れることができる。

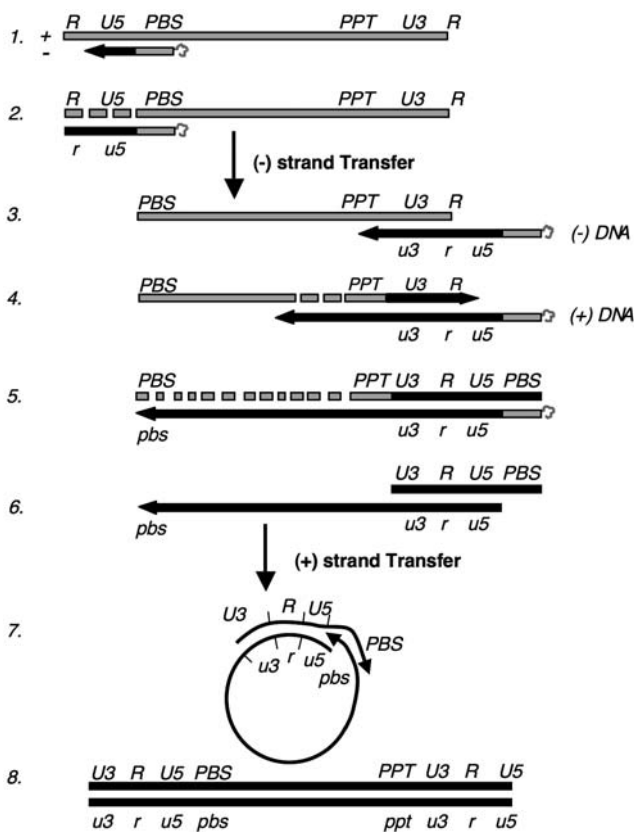


図 2 HIV の一連の逆転写複製過程

1 ; RTにより、ゲノム RNA にアニーリングした tRNA から DNA 合成がスタートする ((-) SSDNA 合成)。2 ; RNaseH により、(-) SSDNA の鋳型 RNA が消化される (RNaseH Cleavage)。3 ; NC の Chaperone 活性により (-) SSDNA が下流の再アニーリングする ((-) Strand Transfer)。4 ; RNaseH による PPT 領域 RNA 以外の消化と、PPT をプライマーとした DNA 伸長反応が始まる (PPT Processing と PPT Initiation)。5 ; (-) と (+) 鎖合成ともに PBS 末端まで到達し、鋳型 RNA は消化される。さらに、tRNA が RNaseH により取り除かれ PBS 領域の DNA が一本鎖となる (tRNA removal)。6 & 7 ; PBS 領域がアニーリングし ((+) Strand Transfer), DNA 伸長反応が両方向に進む。8 ; RT の伸長反応が進み、完全長の 2 本鎖 DNA (プロウイルス DNA) がつくられる。

逆転写反応 (図 2) において、A3G がどの過程に影響を与えるのか解析した。

まず、逆転写のプライマーである tRNA^{Lys} と鋳型 RNA

とのアニーリング反応に対する影響を検討した。ウイルス粒子内では、このアニーリングはウイルスタンパク NC (Nucleocapsid) の chaperone 機能によって行われる。図 3A

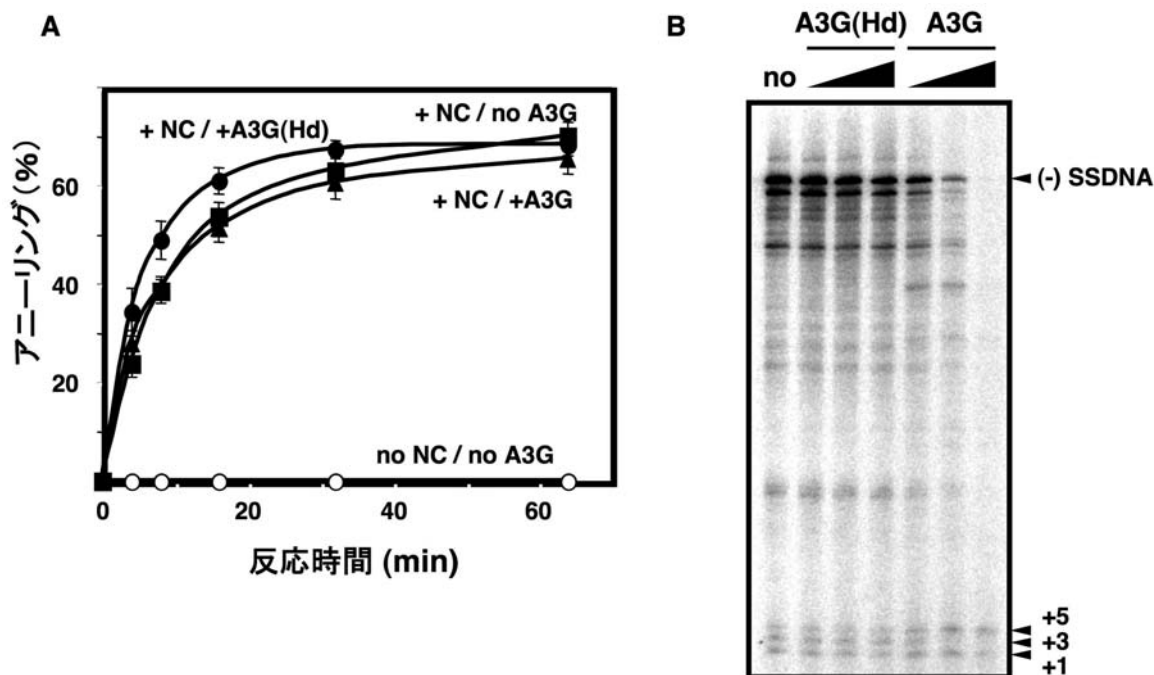


図 3 *in vitro* における A3G による tRNA アニーリングおよび tRNA からの (-) SSDNA 合成開始反応に対する影響
 A ; NC による tRNA アニーリング反応速度に対する A3G の影響を解析した。NC (核酸 7base あたり 1 分子) 量を, A3G (80 nM) を加えた。B ; 熱変性させた A3G と未変性 A3G を加え, (-) SSDNA 合成を比較した。1 (0 nM), 2 & 5 (20 nM), 3 & 6 (40 nM), 4 & 7 (80 nM)。

に示したように, NC 非存在下 (noNC/noA3G) では, 60 分後でもアニーリングしない。NC 添加によってアニーリングが促進されるが (+NC/noA3G), そこに A3G (+NC/+A3G) あるいは熱変性した A3G (+NC/+A3G (Hd)) を加えても, アニーリング速度は変化しなかった。つまり, A3G は tRNA の Primer Placement の過程には影響を与えないことが示された。それに反して, tRNA^{Lys} からはじまる逆転写伸長反応 ((-) SSDNA 合成) ((-) SSDNA : minus-strong stop DNA) は, A3G の濃度依存的に強く抑制された (図 3B)。ちなみに, A3G を添加しない場合あるいは熱変性した A3G では, その抑制効果は認められなかった。さらに, (-) SSDNA 合成速度を調べた結果, RNA 鋳型 1 分子あたり 13 分子の A3G 存在比の場合では, 約 1/24 に低下した。さらに, 興味深いことに, A3G により, (-) SSDNA 合成の Pausing Products (停止した中間産物) が多く認められた。それらの Pausing Products を解析し鋳型 RNA の二次構造と照らし合わせた結果, A3G による (-) SSDNA 伸長停止が鋳型 RNA 二次構造上のループやバルジで起こっていることが分かった。このことは, 一本鎖核酸 (ssDNA と ssRNA) に特異的に結合する A3G が, RNA の一本鎖領域に結合することによるものであると考えられた。

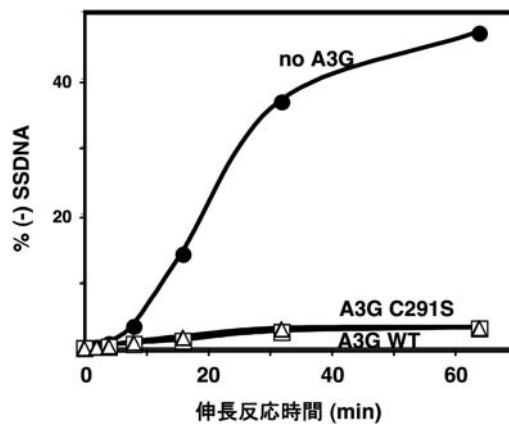


図 4 (-) SSDNA 合成阻害効果に対する A3G 酵素活性の影響
 野生型 A3G (0 nM) (●), 野生型 A3G (80 nM) (□), 酵素活性欠損型 A3G C291S (80 nM) (△) 存在下で, (-) SSDNA 合成量を経時的に測定した。

次に, A3G による (-) SSDNA 合成阻害が A3G の酵素活性に依存するのかが調べてみた。酵素活性中心に変異を導入した A3G C291S タンパクを発現・精製し, (-) SSDNA

合成に対する抑制効果を解析した(図4)。その結果、A3G C291Sも野生型と同等の抑制効果があることが分かった。これらの結果から、A3Gの(-)SSDNA合成抑制効果は、酵素活性非依存的におこることが明らかになった。さらに、RNaseHの切断反応に対するA3Gの影響を調べた。その結果、RNaseHの切断速度かつ切断パターンは、A3G添加によって影響を受けなかった。

(-)および(+)Strand Transfer反応においても、NCによるTransferアニーリング反応および伸長反応を含む全反応(Transfer反応)に対するA3Gの影響を解析した。これらの結果、A3Gは、NCが介在するアニーリング反応自身には影響を与えずに、逆転写酵素(RT)が関わる伸長反応を含んだTransfer反応を阻害した。以上のことから、A3Gは一連の逆転写の過程で、RTが関与するすべての伸長反応だけに抑制的に働くことが分かった。プルダウン法などによってA3GとRTの安定した直接的な結合は認められないことから、鋳型の核酸を介していると考えられた。

では、なぜA3GはRT伸長反応を阻害するが、同じく核酸結合タンパクであるNCは抑制効果を示さないのか?この問いに答えるために、A3GとNCの核酸への結合特性の違いについて比較してみた。まず、蛍光ラベルしたssDNA(20mer)を用いた蛍光偏光解消法により、HIV-1NCとRT、A3Gの解離定数(Kd)を測定した。その結果から、A3G(Kd:238nM)とNC(84.1nM)は、RT(Kd:1840nM)を核酸から効率よく競合的に除外することがで

きるが、A3GはNCを核酸から容易には排除できない可能性が示唆された。さらに、一分子DNAの光学機械的伸展測定(Single Molecule DNA Stretching解析)を行い、NCとA3Gの核酸への結合解離(On/Off Rate)状態および核酸のアニーリングへの影響を検討した(図5)。NCはS曲線が低く、R曲線との違いが少ない。つまり、二本鎖DNAを簡単に解す反面、アニーリングの際(R曲線)NCは早く一本鎖領域から解離する。一方、A3GではSとR曲線の違いが大きく、A3Gは一本鎖領域に長時間結合し続け解離しないことが示された。以上のことから、A3GはNCに比べ、核酸へのOn/Off Rateが非常に遅いことが明らかになった。

これらの一連の研究から、A3Gによる酵素活性非依存的な抗HIV作用メカニズムは、A3Gが鋳型である核酸の一本鎖領域に結合し、物理的にRTの伸長反応を阻害してしまうことによると考えられた(図6)。この阻害メカニズムは、RTとNC、A3Gの核酸への結合特性によって決定されることが示された。

おわりに

本研究では、A3Gの酵素活性非依存的な分子メカニズムについて明らかにした。最近、筆者が提唱した分子モデルを支持する*in vivo*の報告がなされている^{4,5)}。しかし、酵素活性依存的な機序に関しては依然として不明である。筆者が用いた*in vitro*再構築系では足りない他の因子が関与している可能性がある。細胞内には、本来DNA中に存

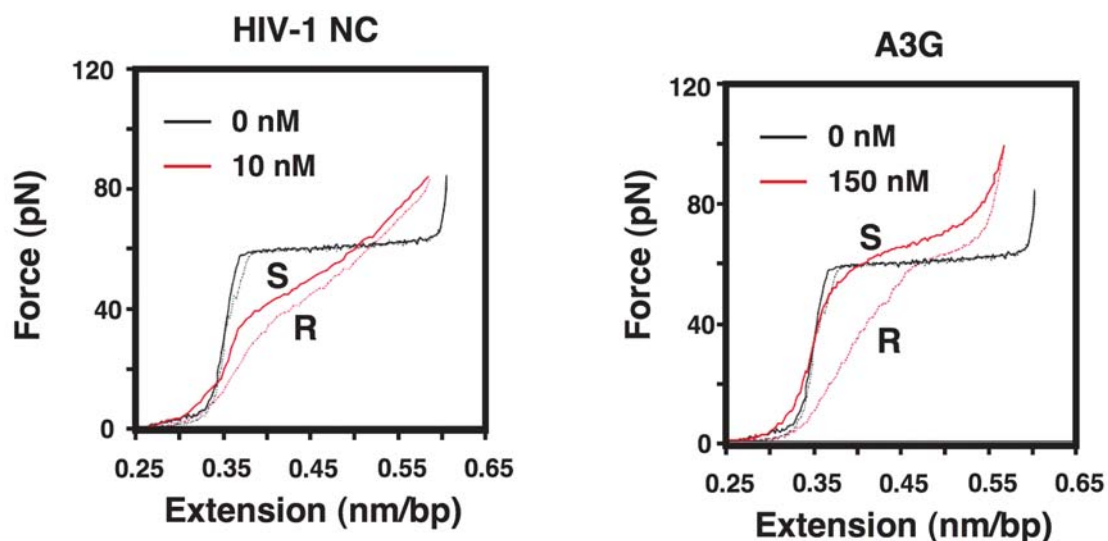


図5 1分子DNAストレッチング法を用いたA3Gの核酸結合特性の解析
λDNA(二本鎖)1分子を光学機械的に伸展させ、HIV-1NC(10nM)あるいはA3G(150nM)存在下(赤)で、伸長(Extension)対付加(Force)を計測した。伸展(S: Stretched)を実線、回復(R: Relaxed)を点線で示す。

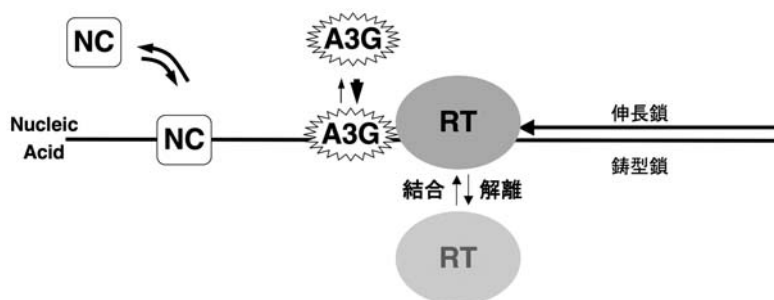


図 6 A3G による RT 伸長反応阻害機序のモデル図

A3G は、一本鎖核酸に対し結合親和性が高く解離速度が遅いため、見かけ上、逆転写の鋳型（一本鎖領域）にとどまり RT の伸長を物理的に止める。さらに、RT のプライマー部への再結合も抑制されてしまう。そのため、A3G は、酵素活性非依存的に逆転写伸長反応を抑制すると考えられる。一方、核酸結合タンパクである NC は、核酸に対して、結合・解離速度が速いため、RT の伸長には抑制的な影響を与えないと考えられる。

在すべきではない dU を除去する Uracil DNA Glycosylase (UDG) などの修復酵素が存在する。UDG などの関与も示唆されていたが、現在では直接的な関与はないと考えられている。今後、酵素活性依存的な阻害機序に関する研究も進み、A3G の抗 HIV 作用メカニズムの全容を分子レベルで解明されるであろう。

謝辞

この度、第 9 回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞することになりましたことを深く感謝致します。これまで、ご指導いただきました杉浦互先生をはじめとした先生方、受賞選考に関係された先生方に、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Iwatani Y, Takeuchi H, Strebel K, Levin JG : Biochemical activities of highly purified, catalytically active human APOBEC3G : correlation with antiviral effect. *J Virol* 80 : 5992-6002, 2006.
- 2) Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, Rouzina I, Williams MC, Musier-Forsyth K, Levin JG : Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res* 35 : 7096-7108, 2007.
- 3) Iwatani Y, Rosen AE, Guo J, Musier-Forsyth K, Levin JG : Efficient initiation of HIV-1 reverse transcription in vitro. Requirement for RNA sequences downstream of the primer binding site abrogated by nucleocapsid protein-dependent primer-template interactions. *J Biol Chem* 278 : 14185-14195, 2003.
- 4) Bishop KN, Verma M, Kim EY, Wolinsky SM, Malim MH : APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 4 : e1000231, 2008.
- 5) Narvaiza I, Linfesty DC, Greener BN, Hakata Y, Pintel DJ, Logue E, Landau NR, Weitzman MD : Deaminase-independent inhibition of parvoviruses by the APOBEC3A cytidine deaminase. *PLoS Pathog* 5 : e1000439, 2009.