

マウス APOBEC3 多型がタンパク質立体構造に与える影響の解析

伊藤 暢聡（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

研究要旨 マウスのレトロウイルスに対する生理的抵抗因子である APOBEC3 分子には多型が存在し、レトロウイルス抵抗性に差異を生じている。この多型がタンパク質の立体構造に与える影響や、立体構造上の変化と抵抗性との関連など、この現象の分子構造からの理解はなされていない。これらの点を解明するために、X線結晶解析によるマウス APOBEC3 分子の構造解析をめざし、ウイルスの複製抑制活性に関与している N-末端側ドメインの立体構造解析を目的に、結晶化条件の探索を行った。また、APOBEC3 のデアミナーゼ活性非依存的なレトロウイルス複製抑制機構に関与する因子 X と APOBEC3 との相互作用の解析を目指して、因子 X の発現・精製の構築、表面プラズモン共鳴による相互作用の同定、大腸菌における共発現系の構築などに着手した。

A. 研究目的

マウスはレトロウイルスに対する生理的抵抗因子として APOBEC3 (mA3)を持っているが、その遺伝子には多型が存在し、ウイルスに対する自然抵抗性と密接に関連している。

APOBEC3 ファミリーは Z1, Z2, Z3 の3種類の Z ドメインの組み合わせとして構成されているが、mA3 は N 末端側の Z2 ドメインと C 末端側の Z3 ドメインからなる。このうち N 末端側 Z2 ドメイン (mA3-N) がデアミナーゼ活性およびウイルス抵抗性に関与していることが明らかになっている。このドメインはヒトの APOBEC3G の N 末端側 Z2 ドメインと相同であるため、mA3-N のウイルス抑制機能に関する知見はヒト APOBEC3G と HIV-1 の関係にも重要な知見を与えうると考えられる。

一方、宮澤らは mA3 のデアミナーゼ活性非依存的なレトロウイルス複製抑制機構に関連して、mA3 と相互作用する蛋白質因子 X を同定したが、その相互作用の詳細は不明である。

本研究では、mA3-N の立体構造を X 線結晶解析により決定し、多型が立体構造に与える影響を明らかにすることを目指した。さらに、因子 X と mA3 の相互作用を溶液中で定量的に解析する系の確立にも着手した。

なお、因子 X とその周辺実験については、原著論文投稿および特許出願前であるので、詳細は記載しない。

B. 研究方法

1) マウス APOBEC3 アミノ末端側 Z ドメインの精製と結晶化条件の探索

昨年度までに、アミノ末端に精製用の His-tag タグを持ち、かつこのタグをプロテアーゼで除去で

きる系を大腸菌で確立したが、発現量や非特異的切断などの問題があった。そこで、発現条件や精製条件の見直しを行った。

また、mA3 は核酸に結合するため表面に正電荷を多くと持つと考えられ(実際 mA3-N は陽イオン交換樹脂に結合する)、これが結晶化に悪影響を与えている可能性を考え、蛋白質の結晶化でしばしば行われるリジン残基のメチル化を試みた。具体的にはジメチルアミンボランとホルムアルデヒドを用いて選択的メチル化を行った。

得られた野生型またはメチル化された mA3-N 試料を用いて結晶化条件の探索を行った。ハンギングドロップによる蒸気拡散法により、各種スクリーニングキット等を利用した。また、低温での結晶化や界面活性剤などの添加等も試みた。得られた結晶様物質は実際に X 線を照射し、評価した。

2) 因子 X の発現と精製

mA3 との相互作用の詳細かつ定量的な解析のためには、高純度の因子 X 試料が必要である。そこで、大腸菌による発現系を構築した。因子 X の cDNA を各種ベクターに挿入し、発現タグ、温度、誘導条件などを検討した。

発現が確認された後は各種クロマトグラフィーによる精製を行い、精製タグの除去等の条件も検討した。

3) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との相互作用解析

mA3-N と因子 X との相互作用を定量的に解析するために、Biacore T100 を用い、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による測定を行った。

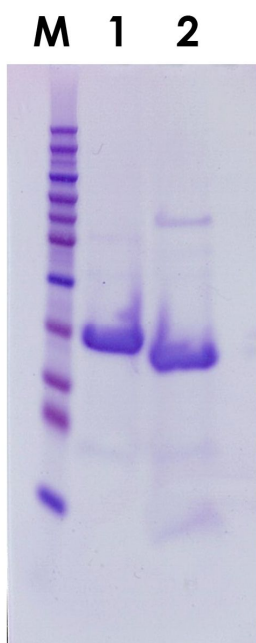


図1. マウス APOBEC3 N-末端ドメイン (mA3-N)の精製 M: 分子量マーカー Lane 1: His-tag がついた状態 Lane 2: His-tag 切断後のイオン交換クロマトグラフィーにより精製された mA3-N.

4) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との共発現系の構築

上記2)で得られた因子 X の発現系をもとに、大腸菌による因子 X と mA3-N の共発現を試みた。

複合体の形成を検知するために、因子 X と mA3-N には異なる精製用タグを付加した。発現条件は上流にある因子 X のものを用い、それぞれの精製タグで別個に精製し、精製試料に他方が含まれるかをみることで、複合体の形成を検知することにした。

【倫理面への配慮】

本研究計画にはヒト検体を用いた解析を含まないが、遺伝子組換え実験を含む。遺伝子組換え実験については、東京医科歯科大学遺伝子組換え生物等実験安全委員会による承認を得て、必要な拡散防止措置の下で実施した。

C. 研究結果

1) マウス APOBEC3 アミノ端側 Z ドメインの精製と結晶化条件の探索

発現および精製条件の再検討を行った結果、精製用 His-tag を除去した mA3-N をミリグラム単位で安定に精製することが可能になった(図1)。発現量や精製における挙動などに関して、抵抗性型 B6 マウスと感受性型 BALB/c マウスの

mA3-N 間に大きな差は見られなかった。

リジン残基のメチル化では、多くの沈殿を生じたものの、精製可能な程度の可溶蛋白質を回収できた。メチル化後の mA3-N は、予想通り陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて野生型とは異なるイオン強度で溶出された。

結晶化は数多くの条件で検討したが、一部で塩結晶の析出が見られた以外、結晶様のものを得ることはできなかった。メチル化した試料は野生型のものより溶解度が低くなり、沈殿が多くみられる傾向はあったものの、結晶化には至らなかった。また、結晶化においても、抵抗性型と感受性型の mA3-N のあいだに大きな差異は見られなかった。

2) 因子 X の発現と精製

因子 X は、大腸菌で融合蛋白質として可溶性形で発現することができた。その後、アフィニティークロマトグラフィー、精製タグの切断、イオン交換クロマトグラフィーなどを経て、高純度の試料を得ることができた(図2)。

3) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との相互作用解析

現状では暫定的な結果ではあるが、SPR により、mA3-N と因子 X の間に結合が見られた。結合に関する定量的な解析はできなかったが、解離に関しては早い解離と遅い解離の2つが混在すると仮定した場合、妥当なフィッティングが得られた。

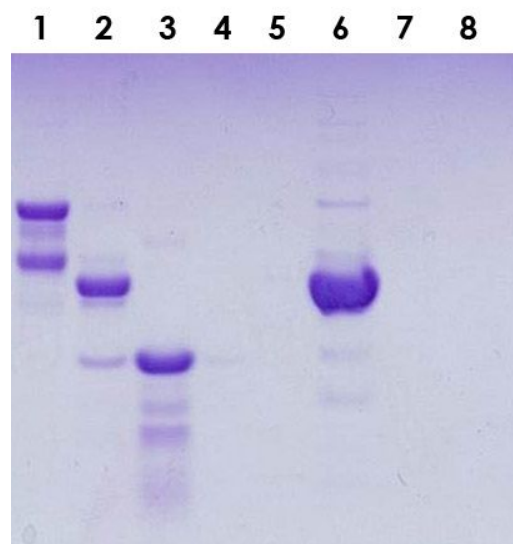


図2. 因子Xの発現と精製 Lane 1: 精製タグとの融合蛋白質 Lane 2: プロテアーゼによる精製タグの切断 Lane 3-8: 切断後のイオン交換クロマトグラフィーによる精製画分 (Lane 3 が因子Xに、Lane 6 が除去されたタグに相当)

4) マウス APOBEC3 N-末端ドメインと因子 X との共発現系の構築

共発現した大腸菌を破碎し、遠心後の上清を mA3-N と因子 X、それぞれの精製タグによりアフィニティー精製したものを SDS-PAGE で調べたところ、通常の CBB 染色では、明確にもう一方のタンパク質の結合を示すバンドは見られなかった。そこで、抗体によるブロッティングを行った結果、mA3-N と因子 X が共精製されてきたことを示唆するバンドが見られた。

D. 考察

昨年度まで、我々は精製用の His-tag を持ったままの mA3-N 試料を用いて結晶化条件の検討を行ってきた。比較的分子量の低い mA3-N において、His-tag の負の影響は大きいと考え、その除去を行ったが結晶を得ることができなかった。mA3-N の中にしっかりした立体構造を持たない部分がある可能性が考えられるほか、mA3 が核酸結合蛋白質であることから、表面電荷の分布特性などが結晶化の障害となっている可能性がある。今後、変異の導入や特異的抗体フラグメントなどとの共結晶化などの検討が必要となろう。その意味では、mA3 と相互作用する他の蛋白質との共結晶化も重要となろう。

因子 X と mA3-N の相互作用については、SRP 法と共発現の両方で両者の結合を示唆するデータが得られた。特に、SRP 法で両者の解離が 2 段階で進む可能性が示されたのは興味深い。静電相互作用のような静的な結合だけでなく、構造変化を含むような複合体の形成がなされているのかもしれない。ただし、二つの実験結果はまだ暫定的なものであり、明確な結論を得るためには、実験系の改善と、そこから得られるであろうデータの詳細な解析を待つ必要がある。

E. 結論

本研究では、マウスの APOBEC3 の多型とウイルスに対する感受性との関係を分子構造の点から調べるために、X線結晶解析による立体構造解析をめざした。その結果、高純度の試料を得る精製方法の確立には成功したものの、結晶は得られなかった。

マウスの APOBEC3 のデアミナーゼ活性非依存的なレトロウイルス複製抑制機構に関与すると思われる因子 X との直接的な相互作用を暫定的ながら示すことができた。マウスの APOBEC3 と因子 X との複合体が安定なものかなどの問題点も考えられるが、最終的には複合体の構造を結晶解析で明らかにしたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakabayashi, M., Y. Tsukahara, Y. Iwasaki-Miyamoto, M. Mihori-Shimazaki, S. Yamada, S. Inaba, M. Oda, M. Shimizu, M. Makishima, H. Tokiwa, T. Ikura, and N. Ito. Crystal structures of hereditary vitamin D-resistant rickets-associated vitamin D receptor mutants R270L and W282R bound to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and synthetic ligands. *J. Med. Chem.* **56**: 6745–6760, 2013.
- 2) Masuno, H., T. Ikura, D. Morizono, I. Orita, S. Yamada, M. Shimizu, and N. Ito. Crystal structures of complexes of vitamin D receptor ligand-binding domain with lithocholic acid derivatives. *J. Lipid Res.* **54**: 2206–2213, 2013.
- 3) Ikura, T., and N. Ito. Peptidyl-prolyl isomerase activity of FK506 binding protein 12 prevents tau peptide from aggregating. *Protein Engineering, Design and Selection* **26**: 539–546, 2013
- 4) Higo, K., T. Ikura, M. Oda, H. Morii, J. Takahashi, R. Abe, and N. Ito. High resolution crystal structure of the Grb2 SH2 domain with a phosphopeptide derived from CD28. *PLoS One* **8**: e74482, 2013.

2. 学会発表

- 1) Ito, N. Structure Deposition at PDBj. **OIST/CCP4 Workshop**, November 4–9, 2013. Onna, Okinawa.
- 2) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. プロリン異性化反応がタウタンパク質の凝集を阻害する. **第 13 回日本蛋白質科学会年会**. 2013 年 6 月 12–14 日, 鳥取.
- 3) 沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 伊藤 暢聡, 福森 義宏, 三木 邦夫. 巨大ヘモグロビン結晶中での酸素結合状態の操作. **日本結晶学会 2013 年度年会**, 2013 年 10 月 12–13 日, 熊本.
- 4) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. タウタンパク質に対する Pin1 のプロリン異性化活性を測定するための新しい方法. **第 51 回日本生物物理学会年会**, 2013 年 10 月 28–30 日, 京都.
- 5) 品川 健朗, 沼本 修孝, 鏑田 武志, 伊藤 暢聡. CD72 の構造解析に向けて. **第 51 回日本生物物理学会年会**, 2013 年 10 月 28–30 日, 京都.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し

