

博士論文

亜鉛による蛋白質機能発現制御と
それを標的としたケミカルプローブの検討

古賀 涼子

アミノ酸略号

A	Alanine	Ala
C	Cysteine	Cys
D	Aspartic acid	Asp
E	Glutamic acid	Glu
F	Phenylalanine	Phe
G	Glycine	Gly
H	Histidine	His
I	Isoleucine	Ile
K	Lysine	Lys
L	Leucine	Leu
M	Methionine	Met
N	Asparagine	Asn
P	Proline	Pro
Q	Glutamine	Gln
R	Arginine	Arg
S	Serine	Ser
T	Threonine	Thr
V	Valine	Val
W	Tryptophan	Trp
Y	Tyrosine	Tyr

本論文では、以下の略語を用いた。

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APOBEC3G	Apoplipoprotein B mRNA-editing Enzyme-catalytic Polypeptide 3G
ATP	Adenosine Triphosphate
BPB	Bromophenol Blue
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid

CHX	Cycloheximide
Cy	Cytoplasmic Fraction
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
DMEM	Duldecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Deoxynucleoside Triphosphate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EC	Enzyme Commission Numbers
EDTA	Ethylenediamine- <i>N, N, N, N'</i> -tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
Env	Envelope
EtOH	Ethanol
FTase	Farnesyltransferase
FBS	Fetal Bovine Serum
Gag	Group Specific Antigen
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
HA	Hemagglutinin
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus type 1
HIV-2	Human Immunodeficiency Virus type 2
IB	Immunoblot
I κ B	Inhibitor of Nuclear Factor-kappa B
IKK	Inhibitor of Nuclear Factor-kappa B Kinase
IL-1	Interleukin-1
In	Insoluble Nucleus Fraction
IN	Integrase
IP	Immunoprecipitation
kDa	Kilo Dalton
kbp	Kilo base pair
LB	Luria-Bertani Broth
LTR	Long Terminal Repeat
Luc	Luciferase
MeOH	Methanol
MG132	N-(benzyloxycarbonyl) Leucinylleucinylleucinal
mRNA	messenger RNA

MTT	(3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaOAc	Sodium Acetate
NC	Nucleocapsid
Nef	Negative Factor
NEMO	NF- κ B Essential Modulator
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NP-40	Nonidet-40
NTP	Nucleoside Triphosphate
OD	Optical Density
PARP-1	Poly (ADP-ribose) Polymerase 1
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBS-T	Phosphate-Buffered Saline-Tween-20
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potential Hydrogen, Power of Hydrogen
PhOH	Phenol
pI κ B	Phospho-inhibitor of Nuclear Factor-kappa B
Pol	Polymerase
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuclease
rpm	Revolution per Minute
RT	Reverse Transcription
SAMHD1	SAM Domain and HD Domain-Containing Protein 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
Sn	Soluble Nucleus Fraction
TAK1	Transforming Growth Factor Beta-activated Kinase 1
Tat	Trans Activator
TFIIIA	Transcription Factor IIIA
TNE buffer	Tris-NaCl-EDTA Buffer
TRAF6	Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6

Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolet
Vif	Viral Infectivity Factor
Vpr	Viral Protein R
Vpu	Viral Protein U
Vpx	Viral Protein X
WT	Wild Type
Zn	Zinc
ZnF	Zinc Finger

目次

第 1 章 緒論.....	1
第 2 章 HIV-2 Vpx/Vpr の亜鉛結合モチーフと蛋白質発現量との関係.....	6
第 1 節 背景と目的	6
第 2 節 実験結果.....	9
第 1 項 亜鉛結合モチーフと HIV-2 Vpr 蛋白質発現量	9
第 2 項 発現量上昇のメカニズム	13
第 3 項 HIV-2 全長ゲノムクローンをを用いた Vpr 低発現量の意義の検討.....	19
第 3 節 考察.....	24
第 3 章 TRAF6 の亜鉛結合モチーフを標的としたケミカルプローブの検討	28
第 1 節 背景と目的	28
第 2 節 実験結果.....	30
第 1 項 SN-1 と TRAF6 の結合の確認	30
第 2 項 ケミカルプローブの選定.....	35
第 3 項 SN-1 を用いた TRAF6 の機能制御	37
第 3 節 考察.....	42
第 4 章 総括.....	45
第 5 章 実験の部.....	47
第 1 節 第 2 章に関する実験.....	47
第 1 項 細胞培養.....	47
第 2 項 プラスミド	47
第 3 項 トランスフェクション	58
第 4 項 ウェスタンブロット解析.....	59
第 5 項 1 次抗体および 2 次抗体.....	61
第 6 項 RNA 抽出および逆転写反応.....	61

第 7 項	定量的 PCR	62
第 8 項	試験管内転写/翻訳反応実験.....	63
第 9 項	試験管内転写反応実験.....	63
第 10 項	試験管内翻訳反応実験.....	65
第 11 項	シクロヘキシミドチェイス実験.....	66
第 12 項	MG132 を用いたプロテアソーム分解確認実験.....	66
第 13 項	免疫沈降実験.....	66
第 14 項	細胞分画実験.....	67
第 15 項	p27 ELISA 実験.....	67
第 16 項	ウイルス粒子の単離.....	67
第 17 項	ルシフェラーゼアッセイ	68
第 18 項	アミノ酸配列のアライメント	68
第 2 節	第 3 章に関する実験.....	69
第 1 項	細胞培養.....	69
第 2 項	プラスミド.....	69
第 3 項	トランスフェクション	70
第 4 項	化合物.....	70
第 5 項	ウエスタンブロット解析.....	70
第 6 項	1 次抗体および 2 次抗体.....	71
第 7 項	TRAF6 および TAK1 に対する免疫沈降実験.....	71
第 8 項	ビオチン-アビジン結合を用いたプルダウン実験.....	72
第 9 項	試験管内ユビキチン化実験.....	72
第 10 項	タイムコース実験.....	74
第 11 項	TRAF6-Ubc13 の相互作用に関する免疫沈降実験.....	74
第 12 項	ルシフェラーゼアッセイ	74
第 13 項	細胞毒性試験.....	75
第 14 項	ドッキングシュミレーション	75

参考文献.....	76
-----------	----

謝辭.....	84
---------	----

第1章 緒論

亜鉛は必須微量元素として鉄に次いで2番目に多く生体内に存在する金属元素であり、亜鉛イオンや亜鉛蛋白質として存在している¹⁾。亜鉛蛋白質では、亜鉛による種々の亜鉛結合モチーフが形成されて蛋白質の構造を保持し、その機能を担う。ヒトのゲノムを基にした試算では、全蛋白質の約10%に相当する約3000種類の蛋白質が亜鉛結合モチーフを有するとされる^{2), 3)}。さらにその約3割は酵素であり、EC番号で分類される酵素(酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、付加脱離酵素、異性化酵素、合成酵素)のほとんどに存在することから、亜鉛蛋白質が生体反応に重要であることが示唆される^{4), 5), 6)}。

蛋白質の構造を安定化する因子としての亜鉛の重要性が明らかとなったのは、1930年代のインスリン結晶に関する研究が最初である⁷⁾。インスリンは膵β細胞内において、2つの亜鉛分子と6つのインスリン分子からなる6量体の結晶として存在している^{8), 9), 10), 11)} (Fig.1-1)。当時のインスリン製剤は不純物の多さからアレルギーなどの副作用を起こしていたが、亜鉛によりインスリンが安定化することが発見されてその純度向上をもたらし、安定したインスリン製剤の供給とその後のインスリン製剤の発展につながる一歩となった。また、1985年にアフリカツメガエルの卵から得られた転写因子TFIIIAにおいて、亜鉛フィンガーが同定された¹²⁾。亜鉛フィンガーは4から6つのシステイン(Cys)あるいはヒスチジン(His)残基によって亜鉛を保持することで、蛋白質中の20から30アミノ酸からなる部位を安定化するモチーフである。最も典型的な亜鉛フィンガーはCys残基2つとHis残基2つからなるC2H2亜鉛フィンガーモチーフである。亜鉛がCysとHis残基と結合することによってFig.1-2に示すようなN末端側の逆平行βシートとそれに続くαヘリックスからなるコンパクトな構造が形成され、DNAあるいはRNA認識に適切な構造となる^{13), 14), 15), 16)}。この他にも亜鉛フィンガーは様々な蛋白質において見られ、構造的な違いから20以上に分類される。亜鉛によって形成された機能的なモチーフは、核酸のみならず種々の蛋白質や脂質と相互作用することも知られ

ている 17), 18), 19), 20)。

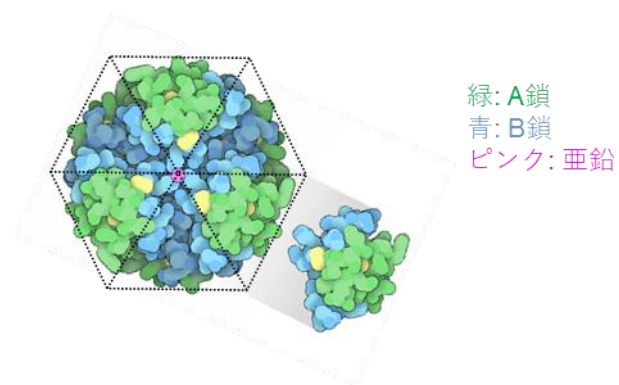


Fig. 1-1 インスリン 6 量体の結晶構造

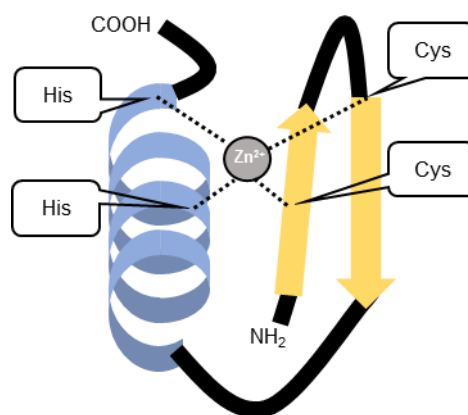


Fig. 1-2 C2H2 亜鉛フィンガーモチーフの模式図

酵素における亜鉛の存在は、1940 年に炭酸脱水素酵素において最初に発見された²¹⁾。その後の研究で様々な酵素に亜鉛が含まれ、酵素活性を担っていることが明らかとなった。酵素は生体反応に重要であると同時に、疾患のメカニズムにも強く関与している。酵素の活性中心である亜鉛の周辺には、基質となる蛋白質を収めるためのポケットが存在するため、亜鉛酵素は創薬標的となる。亜鉛酵素を標的とした治療薬では、血圧の制御に関わる酵素であるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) を標的として開発されたカプトプリルをはじめとする ACE 阻害薬がある (Fig. 1-3)。ACE がアンジオテンシン I に作用することでアンジオテンシン II が産生される。産生されたアンジオテンシン II が血管壁に存在するレセプターを介して血管収縮を引き起こすとともに、副腎からのアルドステロン分泌を促して腎臓からの Na^+ 排出を抑制することで血圧の上昇が生じる (Fig. 1-4)^{22), 23)}。高血圧は脳卒中・心疾患・腎不全・血管疾患などを引き起こす危険因子であるため、降圧薬による治療が行われる。降圧剤の標的はいくつか知られていたが²⁴⁾、カプトプリルの開発により亜鉛酵素 ACE が創薬の標的となることが初めて実証された²⁵⁾。ACE の活性部位仮説 (Fig. 1-5(A)) に基づき分子設計された²⁶⁾。後に開発された ACE 阻害薬リシノプリルと ACE の共結晶構造が解明され、ACE 活性中心の亜鉛と阻害薬が実際に結合していることが証明された (Fig. 1-5(B))。

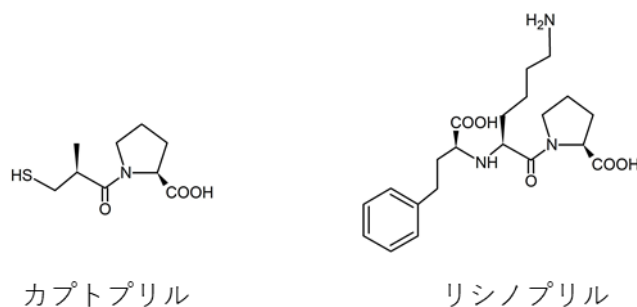


Fig. 1-3 亜鉛酵素 ACE 阻害薬カプトプリルとリシノプリル

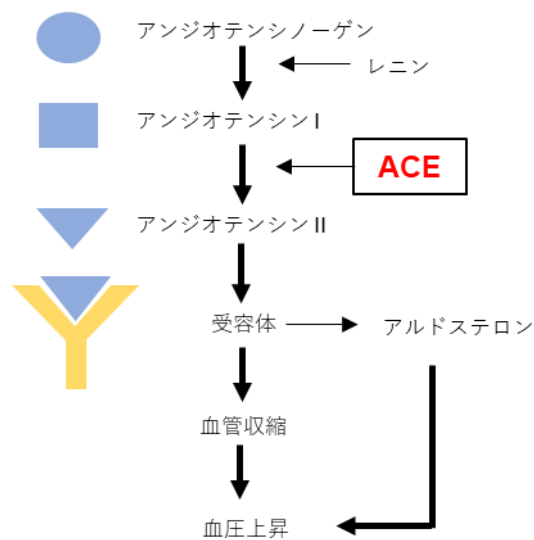
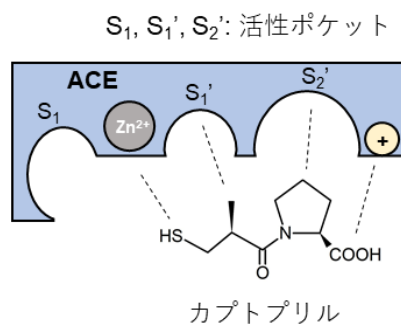


Fig. 1-4 レニン-アンジオテンシン系による血圧調節の概略図

(A)



(B)

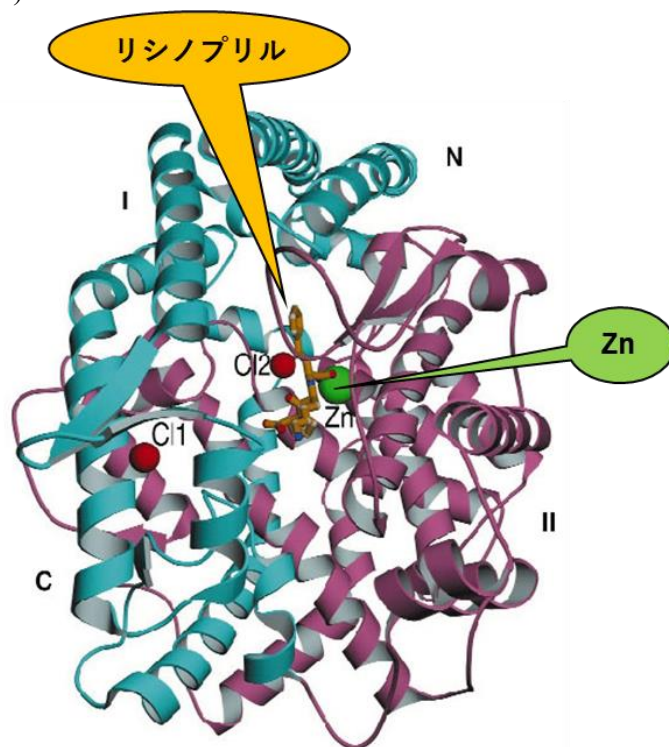


Fig. 1-5 ACE と ACE 阻害薬の結合

(A) ACE の活性部位モデルに基づくカプトプリルの設計

(B) リシノプリルと ACE の共結晶構造²⁷⁾

亜鉛蛋白質は、ヒトを含む真核生物においてだけでなく、原核生物や古細菌、またヒトを宿主とするウイルスにも存在する^{28), 29)}。後天性免疫不全症候群 (AIDS)を引き起こす原因であるヒト免疫不全ウイルス (HIV)も、いくつかの亜鉛蛋白質をもつ。その 1 例としては、亜鉛フィンガーモチーフをもつヌクレオカプシド (NC)蛋白質がある^{30), 31), 32)}。HIV 感染細胞内でウイルス粒子を構成する蛋白質が産生・集合し、細胞外に放出される時にウイルス粒子が形成される。この際にウイルス粒子中に鋳型となる自身の RNA を取り込む必要があるが、NC 蛋白質の亜鉛フィンガーモチーフとウイルス RNA が結合することによって適切に取り込みがなされ则认为られている³³⁾。このようにウイルスも亜鉛蛋白質を自身の生存戦略として利用していることが分かる。

これまでの様々な研究から、亜鉛に着目することは蛋白質や生体反応をより深く理解することに繋がり、創薬の一端ともなりうることを示唆している。蛋白質データベースに登録される亜鉛結合モチーフをもつ蛋白質は増え続けていることから⁴⁾、今後の研究で複雑な生命反応における亜鉛蛋白質の新しい役割が解明される可能性もある。本研究では 2 つの蛋白質を対象にして、蛋白質の構造保持と機能制御における亜鉛の役割について明らかにし、知見を得ることを目指した。亜鉛と蛋白質の機能との関係が未知である HIV-2 Vpx/Vpr について分子生物学的アプローチで、亜鉛フィンガーをもつ蛋白質である TRAF6 についてケミカルバイオロジー的アプローチで研究を行った。

第2章 HIV-2 Vpx/Vpr の亜鉛結合モチーフと蛋白質発現量との関係

第1節 背景と目的

HIV は HIV-1 と HIV-2 に分類され、そのゲノム構造および病原性が異なることが知られている。HIV-1 は日本を含む世界中で流行している型であり、一般的に病原性が高い。一方で HIV-2 は主に西アフリカに局限する型であり、病原性は低い、発症すると HIV-1 感染者と同様に AIDS の症状を示す³⁴⁾。HIV のゲノムには構造蛋白質である Gag、Pol、Env および調節蛋白質である Tat と Rev が共通にコードされている。これらの蛋白質に加えて、宿主の細胞メカニズムを制御することで HIV の複製や感染を最適化するなどのメカニズムでウイルスの存続や病原性発現に関わっているとされる因子であるアクセサリ蛋白質をもつ^{35), 36), 37)}。HIV-1/2 には共通するアクセサリ蛋白質 Vif・Vpr・Nef がコードされるが、この他に HIV-1 は Vpu を、HIV-2 は Vpx をそれぞれ特徴的な蛋白質としてもつ (Fig. 2-1)。

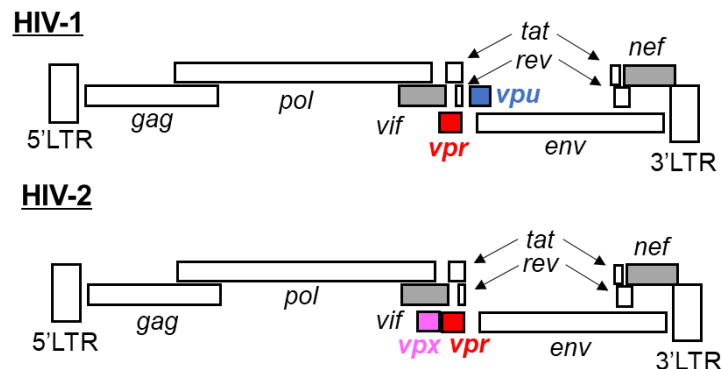


Fig. 2-1 HIV-1 および HIV-2 のゲノム構造

Vpx と Vpr のアミノ酸配列の相同性は 22~24%であることが報告されている³⁸⁾。HIV-1 Vpr は NMR や X 線による構造解析の結果から 3つの α ヘリックスをもつことが知られており^{39),40)}、アミノ酸配列の相同性から HIV-2 Vpx/Vpr も同様の二次構造をもつと予測された³⁸⁾(Fig. 2-2)。Vpx は、近年の結晶構造解析から亜鉛をもつことが明らかとなり、その亜鉛結合モチーフは H³⁹H⁸²C⁸⁷C⁸⁹で構成されていた⁴¹⁾。それらアミノ酸残基への変異導入により Vpx 発現量が減少することを我々のグループが報告した⁴²⁾(Fig. 2-3)。

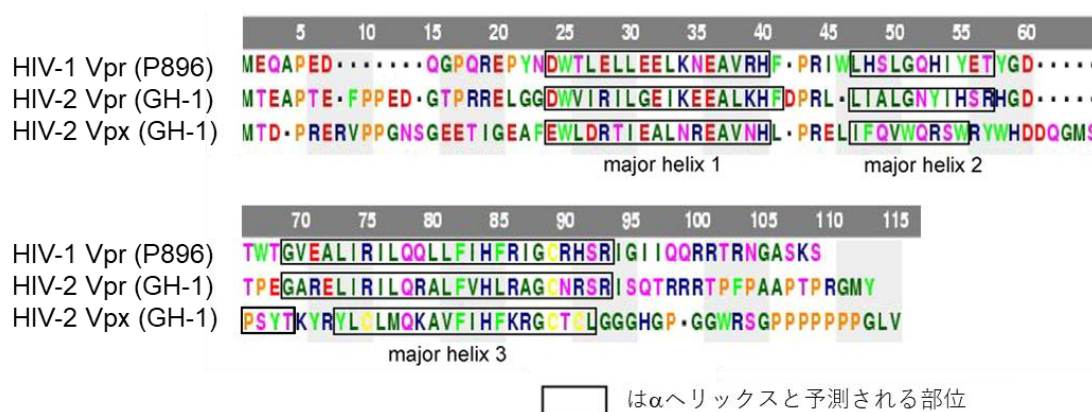


Fig. 2-2 HIV-1 (P896)の Vpr 、 HIV-2 (GH-1)の Vpr および Vpx のアミノ酸配列

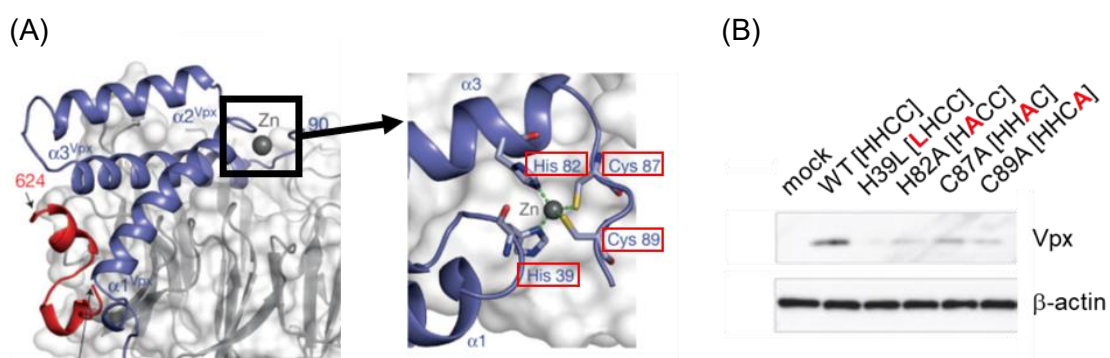


Fig. 2-3 HIV-2 Vpx の結晶構造 (SAMHD1 の一部と DCAF1 の一部との共結晶構造)および亜鉛結合モチーフ (A)とそのモチーフへの変異導入による発現量の減少 (B)

HIV-2 の Vpx と Vpr はホモロジーが高いにも関わらず、Vpr 発現量の方が Vpx 発現量よりも低く³⁸⁾ (Fig. 2-4)、Vpx と比較してウイルス粒子への取り込み量も少ないことが知られていたが⁴³⁾、その理由は不明であった。そこで、亜鉛結合モチーフと発現量の関係に着目し、Vpr 発現量が低いのは亜鉛に関係があるという仮説を立て、実験を行った。

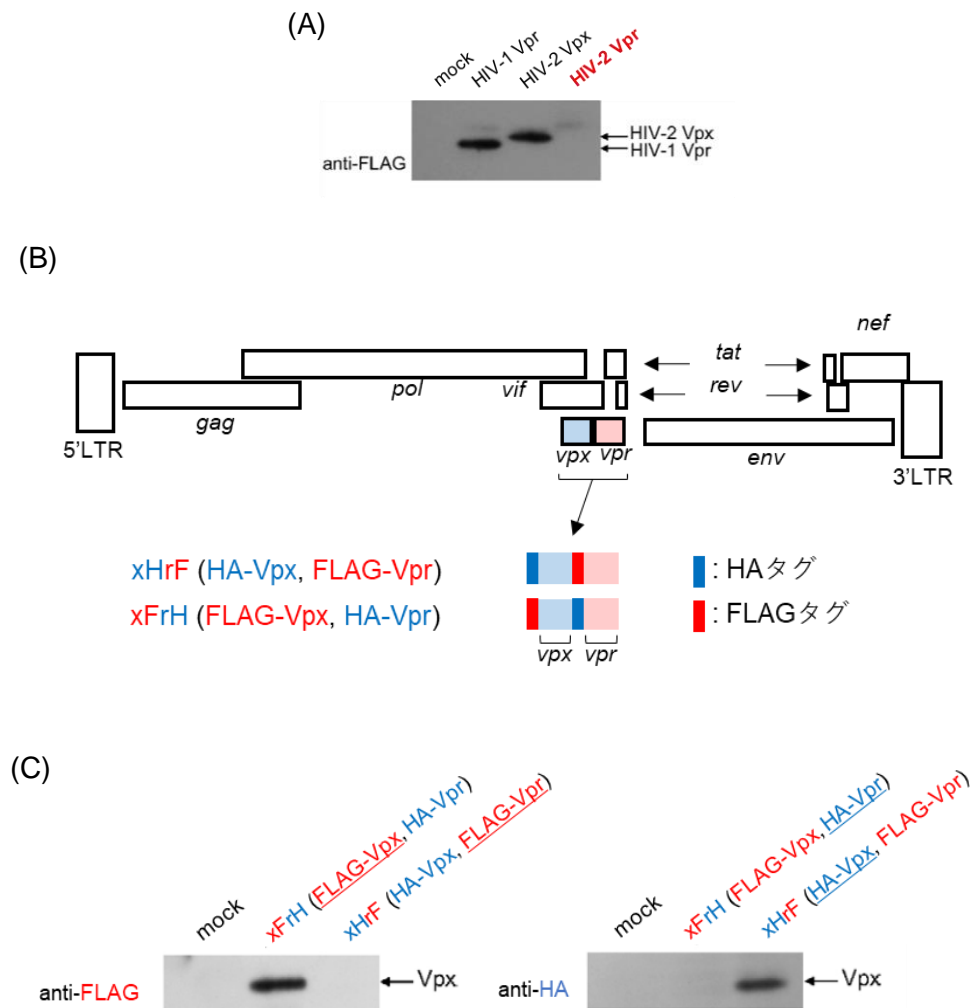


Fig. 2-4 HIV-1Vpr、HIV-2 Vpx/Vpr の発現量の比較

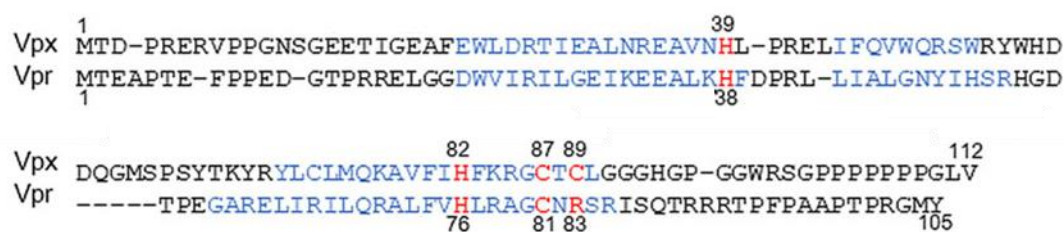
- (A) FLAG タグをもつ HIV-1 Vpr、HIV-2 Vpr および HIV-2 Vpx の発現ベクターからの発現量
- (B) 全長ゲノムクローンへのタグ導入部位
- (C) Vpx/Vpr に FLAG または HA タグを導入した全長ゲノムクローン (B)からの発現量

第2節 実験結果

第1項 亜鉛結合モチーフと HIV-2 Vpr 蛋白質発現量

HIV-2 の代表的な分離株の 1 つである GH-1 株⁴⁴⁾の Vpx と Vpr のアミノ酸配列アライメントを行うと、Vpx の亜鉛結合モチーフである HHCC に対応するアミノ酸は、HIV-2 Vpr では H³⁸H⁷⁶C⁸¹R⁸³ のアミノ酸パターンであった (Fig. 2-5(A))。そこで GH-1 分離株の Vpr の発現ベクターである pEF-Fvpr2⁴⁵⁾を基にして、83 番目の R を C に置換した R83C 変異体発現ベクターである pEF-FrR83C を構築した (Fig. 2-5(B))。これらの pEF-Fvpr2 と pEF-FrR83C を 293T 細胞へ導入し、得られた細胞破碎液をウエスタンブロット解析に供試した。その結果、亜鉛結合モチーフ様部位をもつ R83C 変異体における Vpr 蛋白質発現量上昇を見出した (Fig. 2-6)。

(A)



(B)

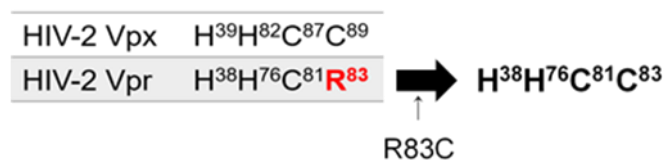


Fig. 2-5 HIV-2 Vpx/Vpr のアミノ酸アライメント (A)および変異導入部位 (B)

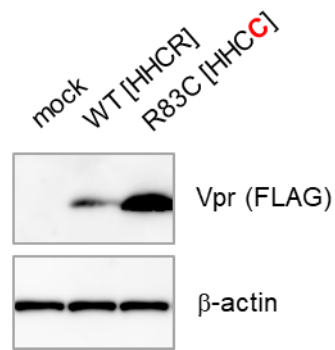


Fig. 2-6 HIV-2 Vpr の R83C 変異導入による発現量の変化

続いて、亜鉛結合モチーフの重要性を確認するために、R83C に加えてこの部位の他のアミノ酸に変異導入した変異体を構築した。これら変異体を用いて先述と同様の方法で発現量を検討すると、R83C 変異を有するにも関わらず、モチーフ様部位を構成する他のアミノ酸への変異導入により Vpr 発現量が減少した (Fig. 2-7)。従って亜鉛結合モチーフである HHCC が変異 Vpr 蛋白質の発現上昇に重要であることが示された。

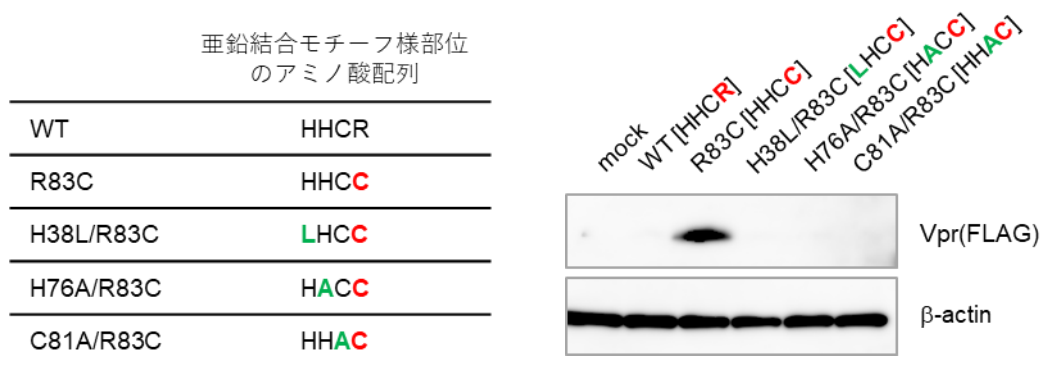


Fig. 2-7 HIV-2 Vpr の亜鉛結合モチーフ様部位に対する R83C 変異およびその他の変異導入による発現量の変化

HIV-2 分離株は、2016 年までに GH-1 分離株を含めて 41 分離株が Los Alamos HIV sequence database に登録されている。これら HIV-2 分離株のアミノ酸アライメントから、Vpx の亜鉛結合モチーフ HHCC に対応するアミノ酸パターンは約 90%が HHCH または HHCR であった (Fig. 2-8)。亜鉛結合モチーフ HHCC 導入による Vpr 発現量上昇が GH-1 分離株に特異的な現象でないことを確認するために、HHCH パターンである ROD10 ⁴⁶⁾および NMC842F-1G 分離株 ⁴⁷⁾の野生型および HHCC 変異体の Vpr 発現ベクターを先述と同様に構築した。また、サル免疫不全ウイルス (SIV) の数種は HIV-2 と分子系統学的グループを形成する。そのうち、マカクザルを宿主とする SIVmac に由来する SIVmac239 分離株 ^{48), 49)}の野生型および HHCC 変異体の Vpr 発現ベクターも先述と同様に構築した。先述した方法で発現量確認を行うと、GH-1 以外の分離株においても亜鉛結合モチーフ導入による Vpr 発現量上昇が確認された (Fig. 2-9(A))。加えて HIV-1 およびその他の SIV 分離株 (HIV-1; NL4-3 ⁵⁰⁾、SIVagm; agm9063 ⁵¹⁾、SIVdeb; CM40 ⁵²⁾、SIVlst; LHO7 ⁵³⁾)の野生型および HHCC 変異体の Vpr 発現ベクターも構築して検討したが、顕著な発現量上昇は見られなかった (Fig. 2-9(B))。これらの結果から、亜鉛結合モチーフの導入による Vpr 発現量上昇は、HIV-2 グループに属する分離株間でのみ共通の現象であることが明らかになった。

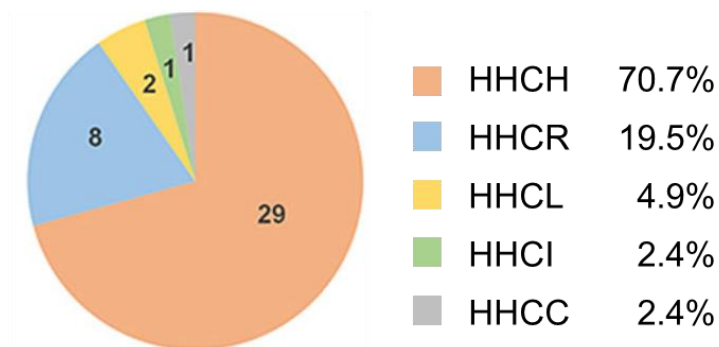


Fig. 2-8 Los Alamos HIV sequence database に登録されている HIV-2 分離株における亜鉛結合モチーフ様部位のアミノ酸パターン

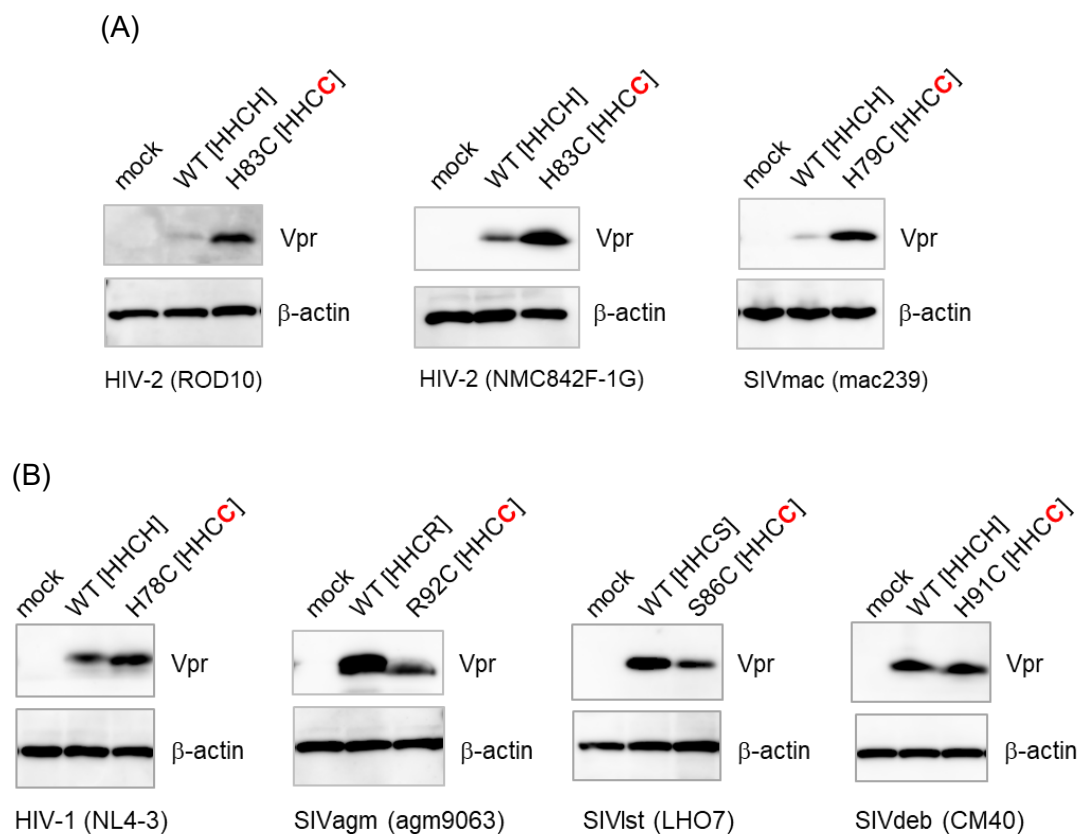


Fig. 2-9 HIV-2 グループの分離株 (A) およびその他のグループの分離株 (B)由来 Vpr 蛋白質における HHCC 変異導入による発現量の変化

第2項 発現量上昇のメカニズム

細胞内での蛋白質発現量は、その蛋白質に関する遺伝情報をコードしている DNA からの転写・翻訳過程および発現した蛋白質の分解によってコントロールされている。そこで Vpr 発現量上昇のメカニズム検討のために転写・翻訳段階と発現後の蛋白質安定性を調べた。

先に構築した pEF-Fvpr2 と pEF-FrR83C を 293T 細胞に導入した。RNA 抽出後に逆転写反応を行って相補的 DNA を得た後に、リアルタイム PCR にて mRNA 定量を行った。その結果、野生型と R83C 変異体の mRNA 量に大きな差は見られなかった (Fig. 2-10)。

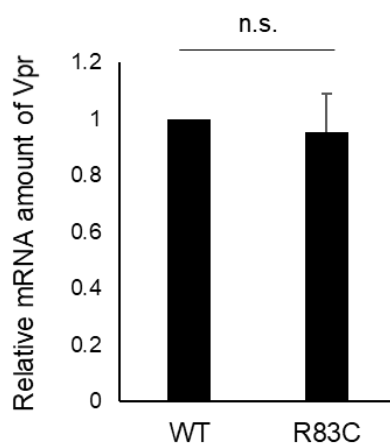


Fig. 2-10 野生型および R83C 変異体の mRNA 量

次に、試験管内転写・翻訳実験を、ウサギ網状赤血球細胞抽出液由来の試験管内転写・翻訳システムを用いて行った。これは T7 プロモーターを有する発現ベクターを用いて試験管内で転写と翻訳を一括して行うことができるシステムである。まず、Vpx 発現ベクターである pEF-Fvpx と pEF-Fvpr2 を用いて得られたサンプルをウェスタンブロットに供試して蛋白質量を比較し、既報の結果⁵⁴⁾および 293T 細胞へ発現ベクターを導入した場合と同様に Vpr 発現量は Vpx よりも少ないことを確認した (Fig. 2-11(A))。続いて pEF-Fvpr2 および pEF-FrR83C を用いて蛋白質量を比較したところ、R83C 変異体における蛋白質量は野生型よりも多かった (Fig. 2-11(A))。すなわち R83C 変異体では翻訳の促進が示唆された。なお、このウサギ網状赤血球細胞抽出液由来の溶液中にプロテアソームが存在するかどうかについて MG132 添加条件下で Vpr 蛋白質量を確認することで検討した。HIV-2 グループの Vpr はプロテアソーム分解を受けるという報告があるが⁵⁵⁾、MG132 (5 μ M) 添加条件下での蛋白量は非存在下と比較して同程度であったため、プロテアソームは機能していないと判断した (Fig. 2-11(B))。

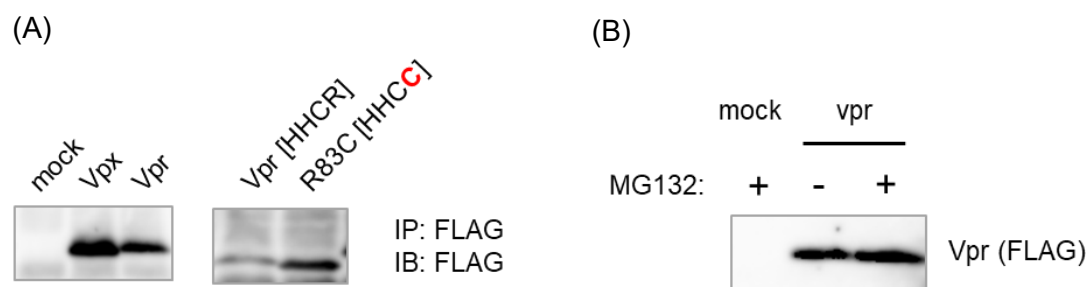


Fig. 2-11 野生型および R83C 変異体の試験管内転写/翻訳システムを用いた蛋白質発現量 (A)とそのシステムにおける MG132 存在下での HIV-2 Vpr 発現量の変化 (B)

先の試験管内転写/翻訳システムを用いた実験においては、転写と翻訳段階を試験管内で一括して行うため、わずかな転写効率の差を考慮できていないことが考えられた。そこで試験管内で mRNA を作製し、同量の mRNA を用いて試験管内での翻訳反応を行うことで翻訳効率について検討することにした。pEF-Fvpr2 および pEF-FrR83C を鋳型として T7 RNA ポリメラーゼを用いてそれぞれの mRNA を作製した。得られたサンプルをアガロース電気泳動にて確認すると両者に差はほとんど見られなかったが (Fig. 2-12(A))、mRNA 量を合わせるために定量した。同量の mRNA を用いてウサギ網状赤血球細胞抽出液由来の試験管内翻訳反応を行い、得られたサンプルをウェスタンブロットに供試して蛋白質量を比較した。なお、コントロールとしてキットに付属しているルシフェラーゼの mRNA を用いて同様の実験を行い、この蛋白質翻訳キットが機能することを確認した。野生型およびその変異体の実験では、先の転写・翻訳システムを用いた実験結果と同様に、R83C 変異体の蛋白質量が多かったことから (Fig. 2-12(B))、R83C 変異体では翻訳効率が上昇していることが示された。

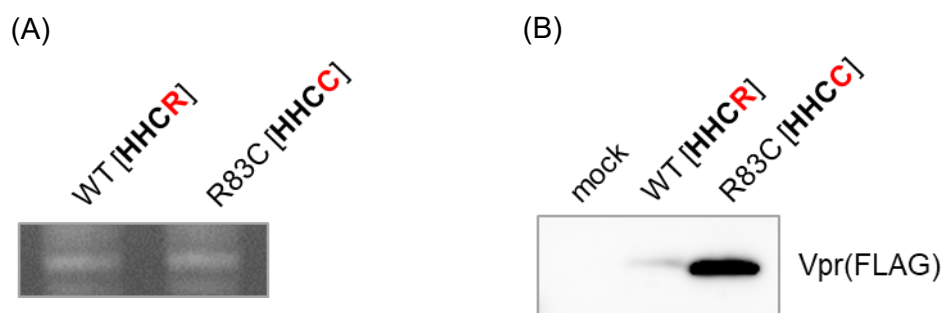


Fig. 2-12 野生型および R83C 変異体の試験管内での
転写 (A)および翻訳 (B)

翻訳されて発現した蛋白質の安定性を検討するために、次にシクロヘキシミド実験を行った。なお、タグ配列内のリジン残基による影響を除くために、タグ配列内にリジン残基を含まない HA タグをもつ野生型および R83C 変異体の Vpr 発現ベクター (pEF-Hvpr2、pEF-HrR83C) を FLAG タグをもつ発現ベクターと同様に構築して実験に用いた。pEF-Hvpr2 および pEF-HrR83C を 293T 細胞に導入し、シクロヘキシミドを加えて 0、1、2、4 時間後に細胞を回収した。得られた細胞破碎液をウェスタンブロット解析に供試し、各発現ベクターから産生された Vpr 蛋白質分解の経時変化を観察した。その結果、R83C 変異体は野生型より安定化していることが示された (Fig. 2-13)。

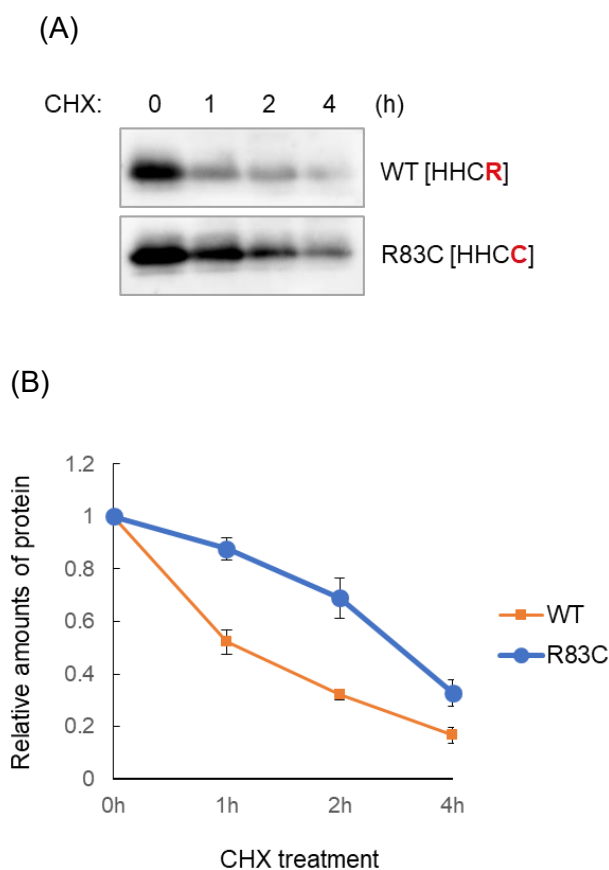


Fig. 2-13 野生型と R83C 変異体の蛋白質安定性
(A) ウェスタンブロット解析
(B) (A) を Image J にて定量化したグラフ

HIV-2 Vpr 蛋白質は R83C 変異体と比較して分解を受ける速度が速いことが示された。最も一般的な蛋白質分解機構としてはプロテアソーム分解が挙げられ、さらに HIV-2 グループの Vpr はプロテアソーム分解を受けるという報告がある⁵⁶⁾。そこで今回用いた GH-1 株においても確認を行った。pEF-Hvpr2 を 293T 細胞へ導入し、MG132 (5 μ M) 処理下での発現量変化を確認すると発現量が上昇したことから、GH-1 株由来の Vpr がプロテアソーム分解されることを確認した (Fig.2-14)。同様に pEF-HrR83C を用いて R83C 変異体についてプロテアソーム分解の有無を検討すると、R83C 変異体も MG132 (5 μ M) 処理下で発現量が上昇したため、これもプロテアソーム分解を受けることが明らかとなった。

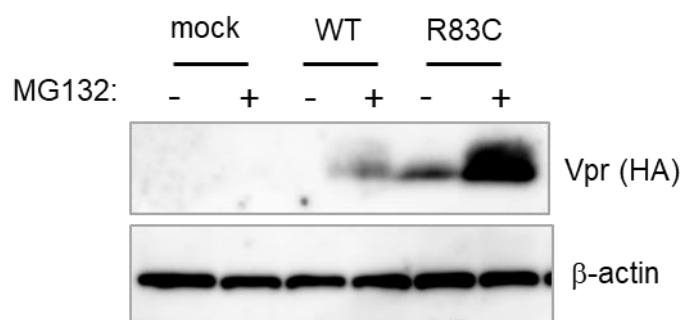


Fig. 2-14 野生型および R83C 変異体の MG132 存在下における発現量の変化

プロテアソーム分解は、一般的には蛋白質内に存在するリジン残基がユビキチン化されることで誘導されることが知られている。HIV-2 Vpr GH-1 分離株のアミノ酸配列内には 2 つのリジン残基が存在するので、これらを同じ正電荷をもつアルギニン残基に置換した変異体の発現ベクターである pEF-Hvpr2/2KR (2KR 変異体) を作製して蛋白質発現量の変化を調べた。Vpr 蛋白質のアミノ酸配列内に存在するリジン残基がユビキチン化されることによってプロテアソーム分解が生じているのであれば、先に示し

た 2KR 変異体における発現量の上昇が予測される。しかしながら 2KR 変異体は野生型とほぼ同等の発現量であった (Fig.2-15(A))。MG132 (5 μ M)処理下での 2KR 変異体の蛋白質発現量を先述と同様の方法で調べたところ、MG132 処理下において 2KR 変異体の発現量が上昇していた。したがってリジン残基が変異しているにも関わらず、2KR 変異体はプロテアソーム分解されていることが示唆された (Fig.2-15(B))。そこで、野生型および 2KR 変異体がユビキチン化されるのかどうかを確認することとした。

pEF-Hvpr2 または pEF-Hvpr2/2KR およびユビキチン発現ベクターを 293T 細胞へ共導入し、MG132 (5 μ M)を添加して 16 時間後に細胞を回収した。得られたサンプルは抗 HA 抗体を用いた免疫沈降を行い、ウエスタンブロット解析を行った。なお、細胞破碎液は Vpr に結合した他の蛋白質を除去するために、1% SDS を添加して加熱処理を行ったうえで免疫沈降実験に供試した。Fig.2-16 に示すように、野生型および 2KR 変異体のいずれにおいてもポリユビキチンの蓄積が認められたため、HIV-2 Vpr は Vpr 蛋白質内に存在するリジン残基以外でのユビキチン化を生じてプロテアソーム分解されることが示された。

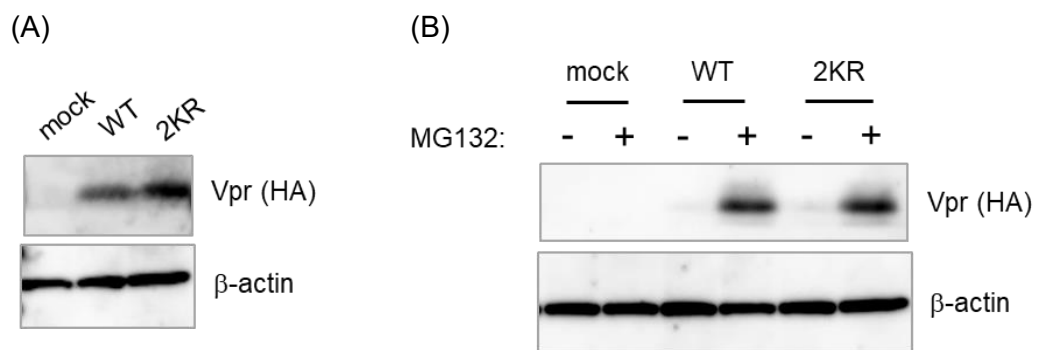


Fig. 2-15 野生型と 2KR 変異体の発現量 (A)および MG132 存在下における発現量の変化 (B)

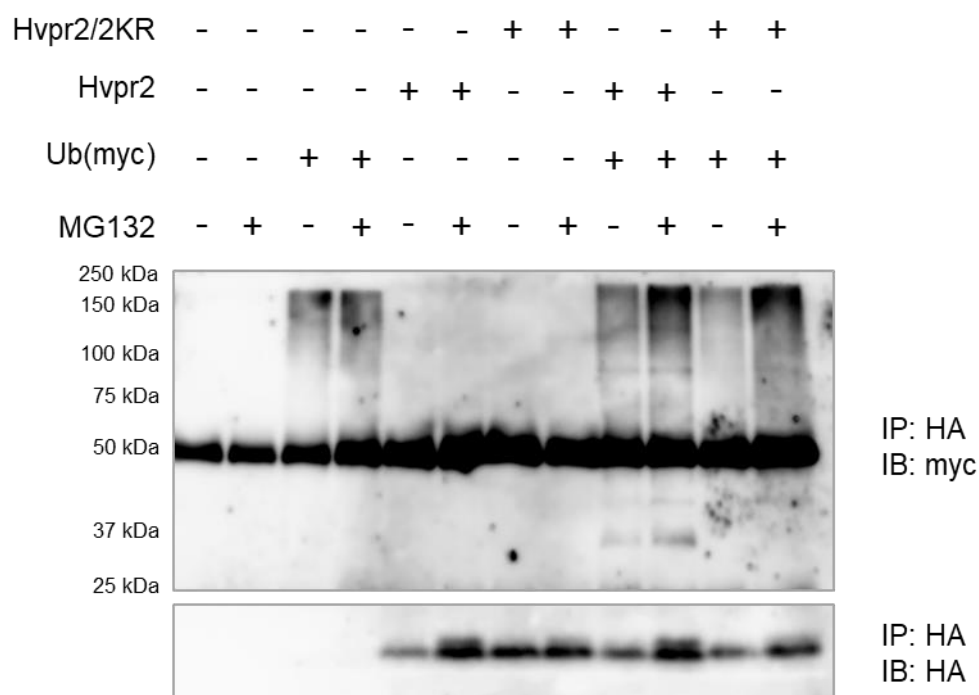


Fig. 2-16 野生型および 2KR 変異体におけるユビキチン化

第 3 項 HIV-2 全長ゲノムクローンを用いた Vpr 低発現量の意義の検討

通常の発現ベクターを用いた実験において見られた HHCC 導入による HIV-2 Vpr 発現量上昇を、HIV-2 全長ゲノムクローンにおいて確認した。全長ゲノムクローンは、HIV-2 全長ゲノムクローンである pGL-AN (pGH-1 に基づいたキメラクローンで、Vpx と Vpr の配列は pGH-1 に由来する)⁵⁰⁾を基に作製した。HIV-2 Vpr に対する抗体を所有していないため、*vpr* 遺伝子の 5'端側に HA タグ配列を導入した pGL-rH/xb と、その変異体 pGL-rH/R83C/xb を構築した。蛋白質発現量を比較するために、*vpx* 遺伝子の 5'端側に HA タグ配列を導入した pGL-xH/xb も同様に構築した (Fig.2-17(A))。なお、Vpx は Vif と読み枠が重なっているため、タグを挿入することで Vif 発現が変化すると考えられる。そこで Vif に変異を導入し、Vif が発現しないようにして Vpr と Vpx の蛋白質発現量を比較することにした。まず、構築した pGL-rH/xb と pGL-rH/R83C/xb を 293T

細胞へ導入し、先述の実験と同様にリアルタイム RT-PCR にて mRNA 量を測定した。野生型と R83C 変異体間の mRNA 量に統計学的な有意差は認められなかったが (Fig.2-17(B))、R83C 変異体では mRNA が増える傾向が見られた。pGL-rH/xb、pGL-rH/R83C/xb および pGL-xH/xb を 293T 細胞へ導入し、得られた細胞破碎液をウェスタンブロット解析に供試して発現量を確認した。R83C 変異体の発現量は大きく上昇していたが、Vpx の発現量より低いことが分かった (Fig.2-17(C)左)。以上の結果から、R83C 変異体では mRNA 量は増加傾向を示すが、それ以上に細胞内 Vpr 蛋白質発現量が増加していると考えられる。

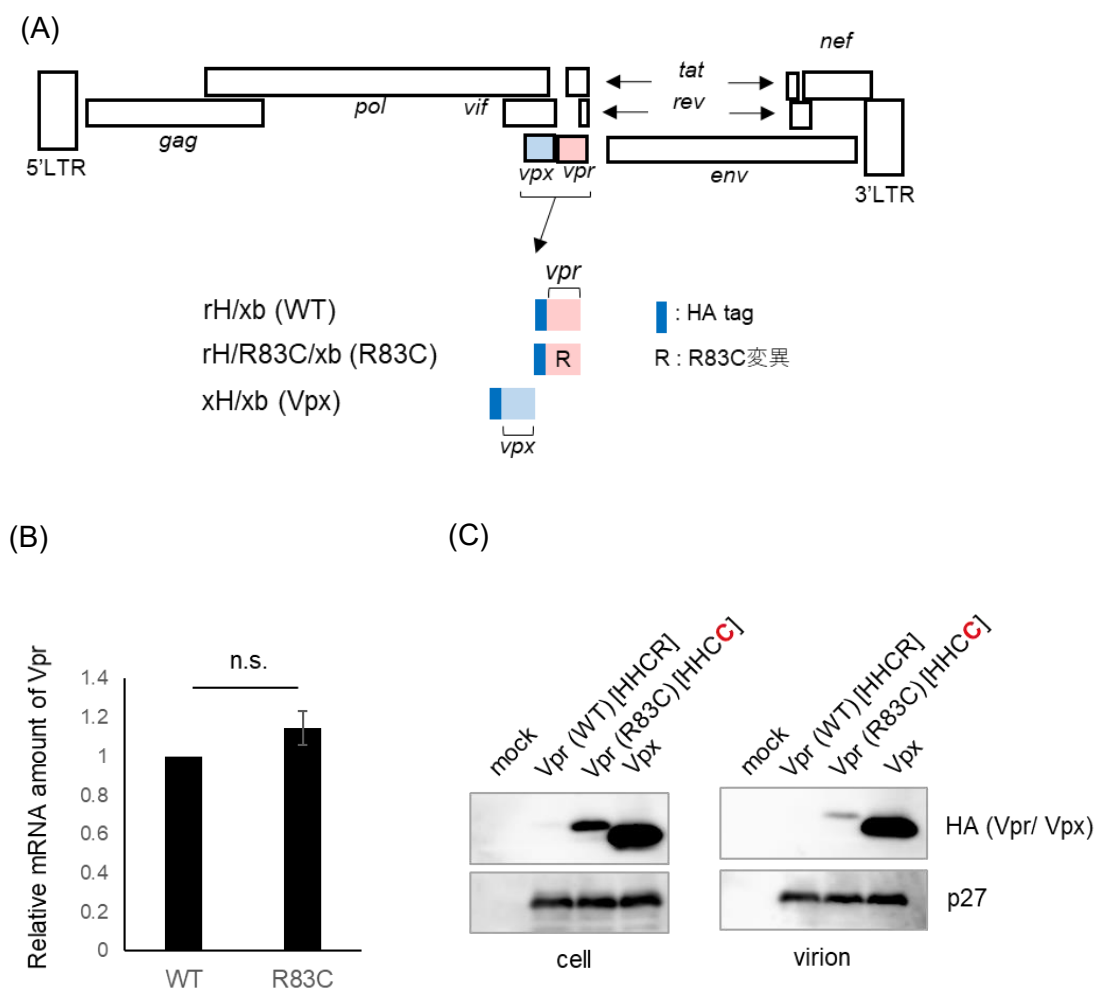


Fig. 2-17 全長ゲノムクローン (A)における野生型と R83C 変異体の mRNA 量 (B)、蛋白質発現量とウイルス粒子における取り込み量 (C)

Vpr 蛋白質はウイルス粒子が組み立てられながら細胞から放出される際に、新たに産生されるウイルス粒子に取り込まれる⁴³⁾。先の実験の際に回収していた上清を Viro-Adembeads を用いて処理し、上清中のウイルス粒子の単離を行った。ウイルス量調整のために、HIV-2 の構造蛋白質である p27 の ELISA を行い、同量の p27 を含むサンプルをウエスタンブロット解析に供試した。その結果、R83C 変異体では Vpx と比較すると少なかったが、野生型よりも多くの Vpr 蛋白質がウイルス粒子中に取り込まれていた (Fig. 2-17(C)右)。

全長ゲノムクローンにおいても R83C 変異体の Vpr 発現量上昇が確認できた。そこで、全長ゲノムクローン R83C 変異体からの Vpr 発現量に相当する蛋白質量を発現ベクターで再現して実験を行うために、発現ベクターと全長ゲノムクローンから発現する Vpr 蛋白質量を検討することにした。全長ゲノムクローンについては、野生型として pGL-rH を、R83C 変異体として pGL-rH/R83C を用いた。ΔVpr 変異体としては *vpr* 遺伝子内に存在する *Eco*RI サイトに変異を導入し、野生型 Vpr を発現しない pGL-rH/Ec を構築して実験に供試した。一方で、5 段階の濃度 (0、25、50、100、200 ng) の pEF-Hvpr2 を pGL-rH/Ec と共に 293T 細胞へ導入して前述の pGL-rH および pGL-rH/R83C (500 ng) との Vpr 発現量を比較した。その結果、発現ベクターを 50 ng 程度使用した場合において野生型である pGL-rH の Vpr 発現量と同程度であり、発現ベクターを 200 ng 程度使用した場合において R83C 変異体である pGL-rH/R83C からの Vpr 発現量と同程度であった (Fig. 2-18)。

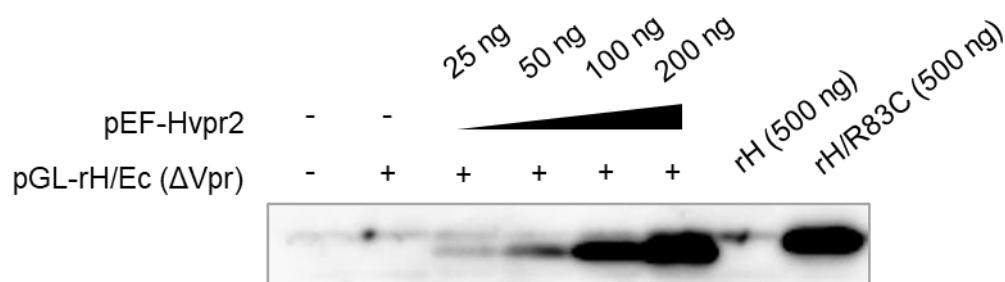


Fig. 2-18 全長ゲノムクローンと発現ベクターからの Vpr 発現量の比較

HIV-1 および HIV-2 は、プロウイルスの 5'端側に LTR をもち、この部位が転写制御に関わる領域であることが知られている。HIV-1 Vpr はトランスアクチベーターとして働くことで自身の複製を効率的に行うことができると言われている⁵⁷⁾。HIV-2 Vpr については知見が乏しいため、転写制御に関与しているかどうかということを検討するために、Vpr による NF- κ B 活性化について調べることにした。293T 細胞に κ B 配列の下流にホタルルシフェラーゼが結合した発現ベクターである 3 κ B-tk-luc⁵⁸⁾と β アクチンプロモーターの下流にウミシイタケルシフェラーゼが結合した発現ベクターである pRL-Luc⁵⁸⁾、および先に示した 5 段階の濃度の pEF-Hvpr2 を共導入した。1 日後に細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイに供試した。その結果、発現ベクターを 50 ng で導入した時に、 κ B 配列の下流からだけではなく、 β アクチンプロモーターの下流からのルシフェラーゼ活性のいずれも最も低い活性値を示した (Fig. 2-19)。発現ベクター 50 ng から発現する Vpr 量は、野生型である全長ゲノムクローン pGL-rH の Vpr 発現量と同程度であると考えられるので、HIV-2 Vpr は κ B 配列やアクチンプロモーターからの転写制御に働くことが示唆された。

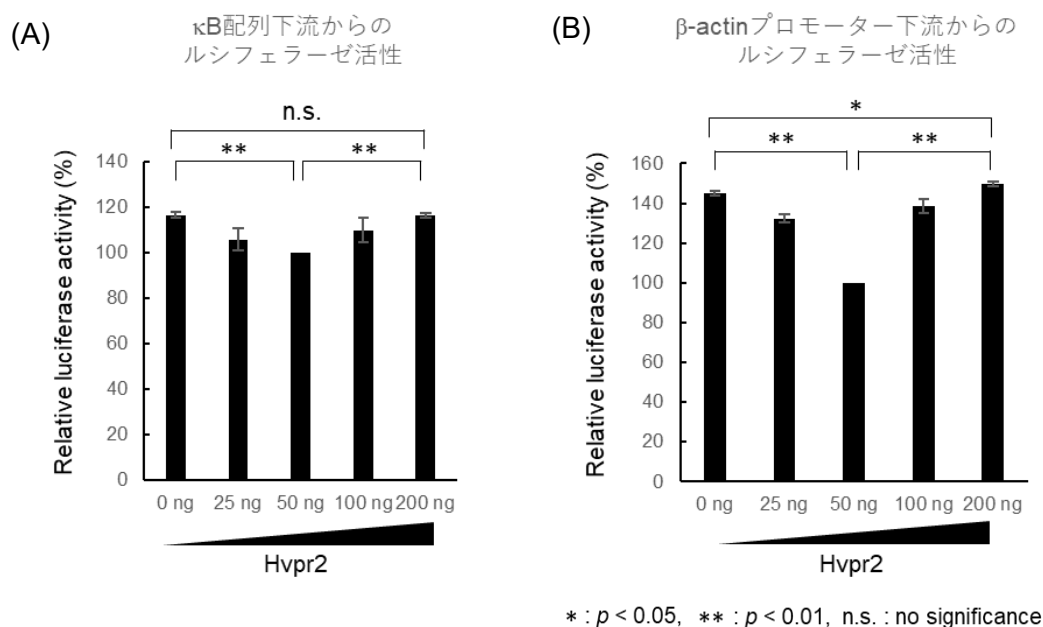


Fig. 2-19 様々な量の Vpr 蛋白質による κ B 配列 (A)または β アクチンプロモーター (B)からのルシフェラーゼ発現制御

HIV-2 Vpr が LTR 領域からの転写活性を制御しているとする、産生されるウイルス蛋白質量も変動していると考えられた。そこで、pGL-AN、pGL-rR83C および pGL-Ec⁵⁹⁾を 293T 細胞へ導入し、1 日後に細胞および上清を回収して細胞内外のウイルス蛋白質量を p27 ELISA によって測定した。いずれの場合においても野生型から産生・放出された Vpr 蛋白質量が最も低かった。細胞内では Δ Vpr 変異体と R83C 変異体は増加傾向が見られた。細胞外では両変異体ともにウイルス蛋白質量、すなわちウイルス放出量が増加していた (Fig. 2-20)。

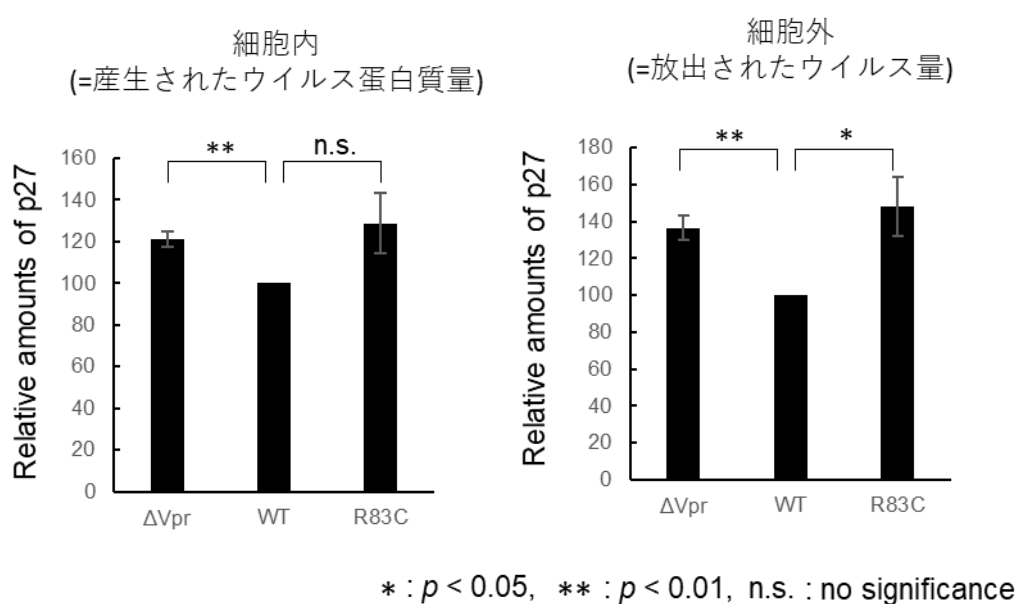


Fig. 2-20 野生型、 Δ Vpr および R83C 変異体の細胞内および細胞外のウイルス蛋白質量

第3節 考察

HIV-2 Vpr は、類似蛋白質である Vpx と比較して発現量が低いことが知られていた。本研究では、亜鉛結合モチーフ様部位 HHCC と発現量の関係を見出し、HIV-2 Vpr が低発現量である意義について検討を行った。

HIV-2 Vpr はほとんどの分離株で亜鉛結合モチーフ HHCC をもたないが、これを導入することによって発現量の上昇が生じた。すなわち、この部位をもたないように進化し、発現量を低く保つと考えられた。亜鉛結合モチーフをもつ Vpr 変異体の発現量上昇のメカニズムの1つとして翻訳効率の上昇が示された。蛋白質発現は転写・翻訳過程を経るが、試験管内転写実験や細胞実験の結果では産生される mRNA 量にほとんど差が見られなかったため、野生型 Vpr では翻訳過程が抑制されていると考えられる。HIV-2 Vpr 蛋白質は3つの α ヘリックスをもち、またその5'端側と3'端側に特定の構造をもたない領域が存在すると推測されており、全体として自由度の高い構造をしていると考えられる。また、HIV-1 Vpr 蛋白質は同様の構造をもち、さまざまな蛋白質との相互作用が報告されている^{60), 61), 62), 63), 64)}。これらの HIV-2 Vpr の特徴が翻訳のいずれかの段階に影響を及ぼすのではないかと推測しているが、詳細については今後の検討課題である。

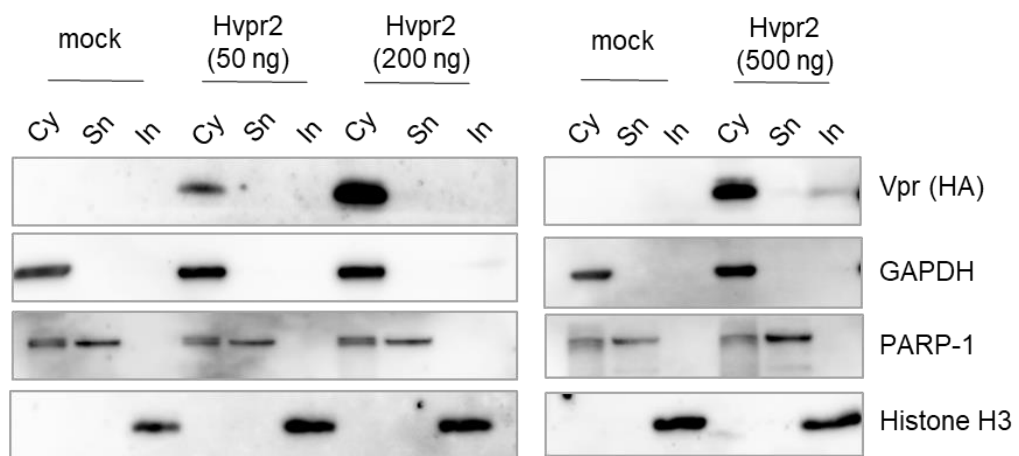
HIV-2 Vpr に亜鉛結合モチーフを導入することによって蛋白質安定性が上昇した。HIV-2 グループの Vpr はプロテアソーム分解を受けることが知られ、今回用いた GH-1 株においても確認された。また R83C 変異体の半減期は野生型よりも長くなったが、プロテアソーム分解は受けていることが分かった。プロテアソーム分解の際には、一般的にはリジン残基がユビキチン化されると言われるが、GH-1 株の Vpr のアミノ酸配列においては32番目と37番目の2つのリジン残基しか存在しない (Fig. 2-5)。これら2つのリジンをアルギニンに変異させた2KR 変異体においては、発現量は野生型とほぼ同程度であり、またユビキチン化されプロテアソーム分解されることが明らかとなった。なおこの際、

野生型でのみ Vpr にユビキチンが 2 つ結合していると考えられるバンドが認められた (Fig. 2-16)。したがって、リジン以外を介したユビキチン化がプロテアソーム分解に関与しているが、リジン残基でもユビキチン化が生じており、これら複数の部位のユビキチン化が HIV-2 Vpr の効率的な分解を引き起こしているのではないかと推察している。最近の研究で、プロテアソームによる標的蛋白質の認識にはユビキチン密度が重要であるという報告もある^{65), 66), 67), 68)}。R83C 変異体は亜鉛結合モチーフの導入によってフレキシブルな構造が変化し、プロテアソームによるターゲッティングがされにくくなった可能性が考えられる。

HIV や SIV は自らが産生する少ない蛋白質を用いて、自身の複製などに有利になるように宿主細胞の機能を制御している。今回の研究から、HIV-2 Vpr は適切な発現量で NF- κ B 抑制を行い、また転写活性を制御してウイルス蛋白質産生とウイルス放出量を制御していることが示された。転写活性制御に関与しているとする、HIV-2 Vpr は核に局在することが考えられる。そこで細胞分画実験を行った。pEF-Hvpr2 を 50 ng または 200 ng 用いた場合では、いずれも細胞質に局在していた。500 ng 用いた場合においても主に細胞質に局在していたが、可溶性および難溶性核画分にもわずかに確認された (Fig. 2-21)。50 ng または 200 ng の発現ベクターを用いた場合では核画分が確認できないが、これは HIV-2 Vpr の発現量が低いためではないかと考えられる。HIV-2 Vpr はわずかに核に局在し、核において機能していると推測することができる。

HIV-2 Vpr が転写抑制を行っているとする、Vpr 量が減少すれば転写は活性化され、増加すればより抑制されると考えられる。しかし、今回の研究から Vpr 量が増加しても転写活性は上昇していた。HIV-2 Vpr とホモロジーの高い蛋白質である HIV-2 Vpx は、細胞質と核のいずれにも局在する^{42), 69)}。HIV-2 Vpx の亜鉛結合モチーフ変異体では、全長ゲノムクローンからの発現量より高発現量となった場合に細胞内画分の変化が見られた。すなわち、変異導入により亜鉛を保持できない不安定な構造となることから凝集が生じ、難溶性核画分が増加するということが示唆されている⁴²⁾。また蛋白質が凝集すると、適

切な機能を果たすことができなくなる可能性がある。HIV-2 Vpr は亜鉛をもたない不安定な蛋白質と考えると、発現量の増加によって Vpx の亜鉛結合モチーフ変異体と同様に不溶性画分の変化が考えられた。ところが、画分に変化は見られず、ほとんどの蛋白質が細胞質画分に観察された。画分が変化しない 1 つの説明としては HIV-2 Vpr の多量体化が考えられる。HIV-2 Vpr とホモロジーが高い HIV-1 Vpr や HIV-2 Vpx は多量体化することが知られているため^{70), 71)}、HIV-2 Vpr も多量体化する可能性はあると考えられる。以上のことから、HIV-2 Vpr において細胞内で発現する蛋白質量が増えても転写活性が正に制御されない要因の 1 つとしては、細胞質での多量体化が起こり、細胞質画分に蓄積されている可能性が考えられる。



Cy: 細胞質画分, Sn: 可溶性核画分, In: 難溶性核画分

Fig. 2-21 HIV-2 Vpr の細胞内局在

ウイルスにとって子孫ウイルスを多く産生することは効率的な感染へと繋がるが、一方でインターフェロン誘導などにより免疫機構に感知されやすくなる。HIV-2 は HIV-1 と比較して複製効率が低く、潜伏しやすいということが知られているので³⁴⁾、宿主の免疫反応を回避するために HIV-2 Vpr が NF- κ B の抑制を介してインターフェロンの転写活性を制御しているのかもしれない。しかしながら、この転写活性制御は強力な制御ではな

く、Vpr が有する機能の 1 つではないかと考えている。Vpr/Vpx は共通の祖先から進化してきた蛋白質であり、宿主への適応・進化の過程でそれぞれが多様な機能を持つようになったと考えられる^{72), 73)}。蛋白質にはその機能に応じた適切な発現量があるため、Vpr/Vpx は亜鉛を用いるという簡便な方法で発現量調節を行う戦略をとったのではないかと推定している。

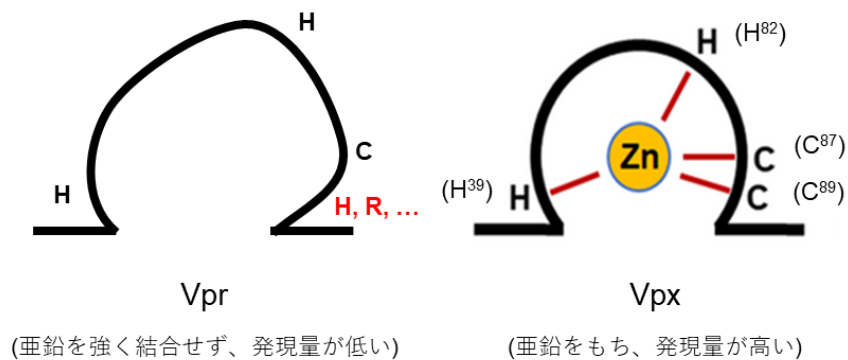


Fig. 2-22 HIV-2 Vpr/Vpx の発現量と亜鉛結合モチーフとの関係 (概略図)

第3章 TRAF6の亜鉛結合モチーフを標的としたケミカルプローブの検討

第2節 背景と目的

TRAF6は、インターロイキン1 (IL-1)誘導性 NF- κ B 活性化をはじめとするさまざまな細胞内シグナル伝達経路の上流に位置する蛋白質である^{74), 75)} (Fig. 3-1)。TRAF6はユビキチン化される基質蛋白質の認識に関わる E3 リガーゼ活性をもち、TRAF6 自身および基質蛋白質のポリユビキチン化を行う^{76), 77)}。ポリユビキチン化はユビキチンの7つのリジン残基 (K7、K11、K27、K29、K33、K48、K63)およびN末端のメチオニンを介して行われる⁷⁸⁾。TRAF6 のもつ E3 リガーゼ活性は K63 ポリユビキチン化に働き、形成された K63 ポリユビキチン鎖はシグナル伝達の足場となるため重要である^{79), 80), 81), 82)}。TRAF6 によって K63 ポリユビキチン化される基質蛋白質としては、TAK1 や NEMO などのシグナル伝達に参与するさまざまな蛋白質が知られている^{83), 84)}。

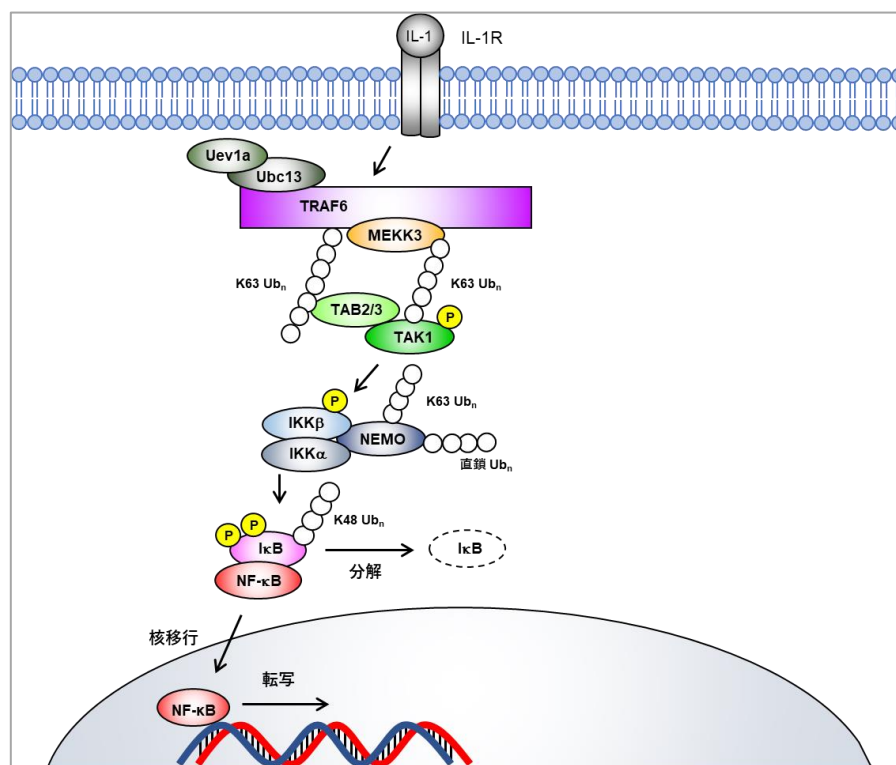


Fig. 3-1 IL-1 誘導性 NF- κ B 活性化経路の概略図

TRAF6 の蛋白質構造は N 端側から RING、亜鉛フィンガー、Coiled-coil および TRAF-C ドメインとなっており、RING ドメインに亜鉛を 2 つ、亜鉛フィンガードメインに少なくとも 4 つの亜鉛を含むとされる⁸⁵⁾(Fig. 3-2)。RING ドメインは E3 リガーゼ活性を担う部位であり、亜鉛は活性中心の役割を果たしている。一方で、亜鉛フィンガードメインの機能については詳細が明らかになっていない。

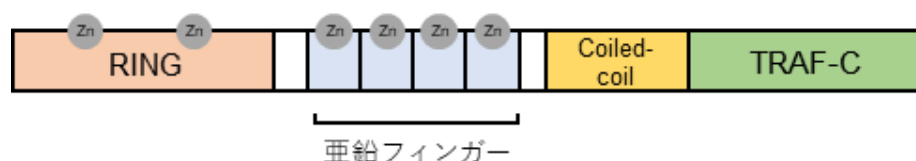


Fig. 3-2 TRAF6 のドメイン構造

これまでの分子生物学的研究から、RING ドメインに最も近い亜鉛フィンガーへの変異導入による TRAF6 ユビキチン化の阻害が示された⁸⁶⁾。また蛋白質結晶化実験から、TRAF6 は RING ドメインのみの変異体よりも RING ドメインと亜鉛フィンガーを含む変異体において、E2 である Ubc13/Uev1a とより強く相互作用するとの報告がある⁸⁷⁾。これは亜鉛フィンガードメインが E2 との相互作用において構造上重要であることを示している。ここでは亜鉛に結合するケミカルプローブを用いた TRAF6 亜鉛結合モチーフの機能解析を行った。

第2節 実験結果

第1項 SN-1 と TRAF6 結合の確認

TRAF6 亜鉛結合モチーフに対するケミカルプローブとして、SN-1 およびその類縁体を検討することとした。SN-1 (Fig. 3-3)は、亜鉛蛋白質への作用によりその機能を阻害することを目的として設計された化合物である⁸⁸⁾。亜鉛蛋白質である HIV EP-1⁸⁹⁾は HIV ゲノムの 5'末端に存在する LTR 領域の転写制御領域に結合し、ウイルスゲノムの転写促進に働く転写因子として機能することが知られている。SN-1 は HIV EP-1 に作用することで DNA 結合を阻害した⁹⁰⁾。癌化に関与する亜鉛酵素であるファルネシルトランスフェラーゼ (FTase)に対しては、SN-1 のもつ亜鉛へ作用する構造に FTase 認識部位を導入することにより、FTase 阻害活性が高まることを示した^{91),92)}。また、SN-1 類縁体である SN-2 および SN-3 (Fig. 3-3)を用いて亜鉛蛋白質である APOBEC3G (A3G)に対する影響を調べたところ、SN-2 は A3G の発現量を上昇させた。これは細胞内で還元されて SN-2 が SN-1 となり、A3G と結合することにより安定化させているためと考えられた^{93),94)}。以上は SN-1 および SN-1 類縁体の機能の一部であるが、これらを含めた多くの知見から SN-1 およびその類縁体は亜鉛蛋白質に作用することが期待される。

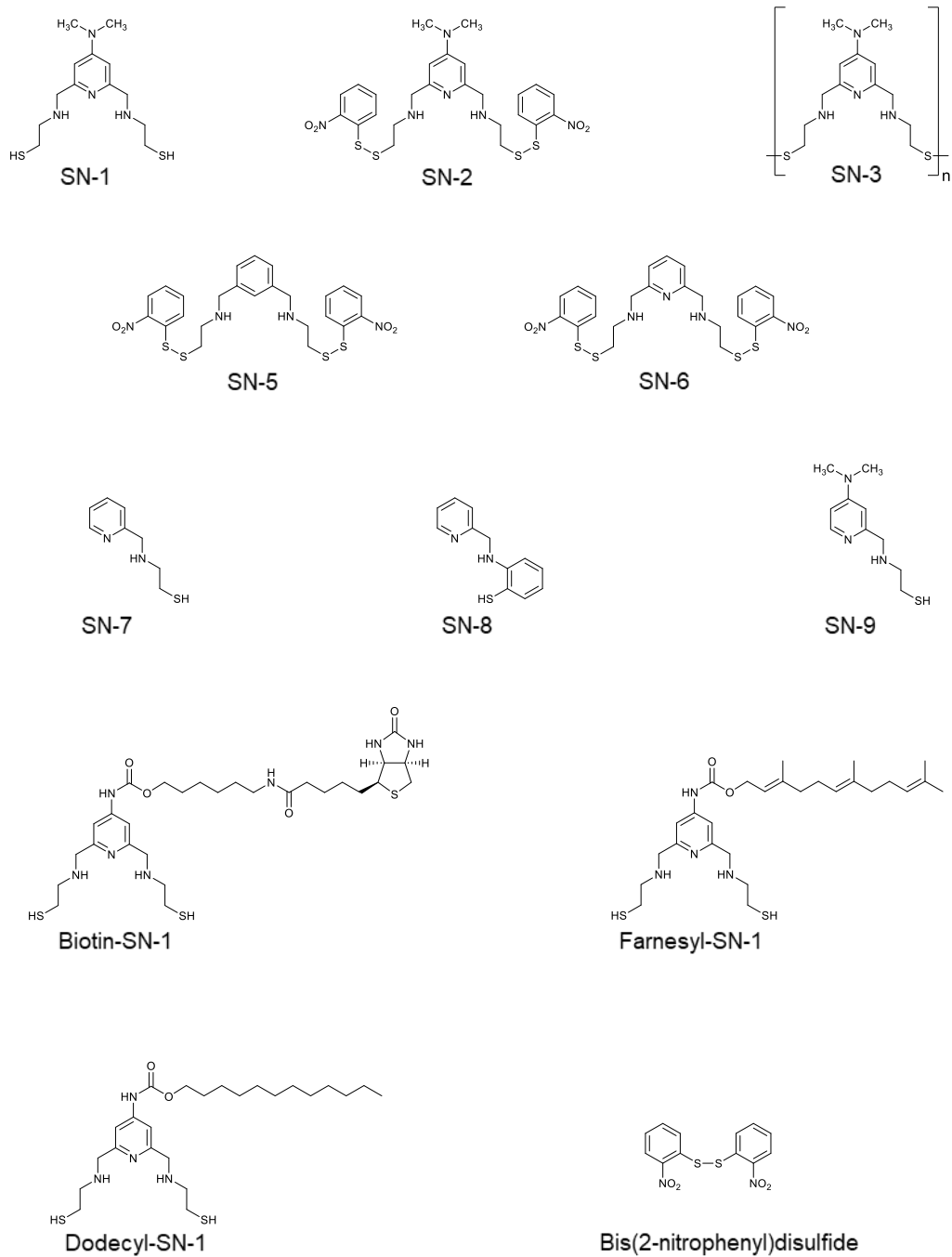
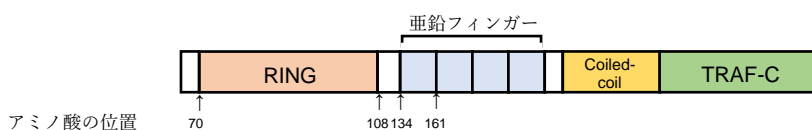


Fig. 3-3 SN-1 およびその類縁体の構造

まず、蛋白質データバンクに登録されている TRAF6 の部分結晶構造のデータ (PDB ID: 3HCS)を用いて、10 種類の化合物の基本となる SN-1 と TRAF6 の結合の有無を統合計算化学システム MOE (Molecular Operating Environment)によるドッキングシュミレーションで検討した。その結果、SN-1 は RING ドメインと結合しないことが示された。一方で、SN-1 は TRAF6 の 1 番目の亜鉛フィンガー (ZnF1)と結合することが示された (Fig. 3-4)。TRAF6 の ZnF1 では C¹³⁴ C¹³⁹ H¹⁵¹ H¹⁵⁵ の 4 つのアミノ酸で亜鉛を結合している。SN-1 が結合した場合には、SN-1 の一方の側鎖の S が ZnF1 に含まれる亜鉛イオンと、他方の側鎖の S が TRAF6 の H¹⁴¹ のアミノ基の NH と相互作用するという結果が得られた。加えて SN-1 のピリジン環の NH⁺および側鎖の NH₂⁺が TRAF6 の H¹⁵¹ のイミダゾール環の N と相互作用している結果となった。

(A)



(B)

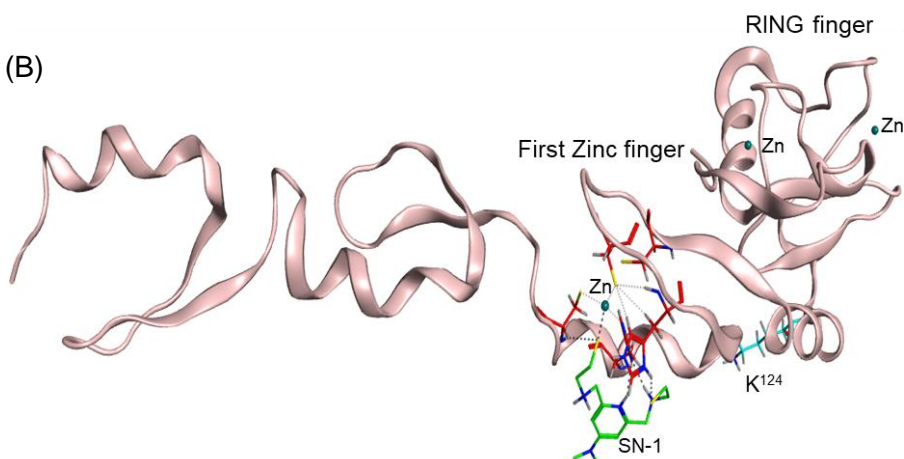
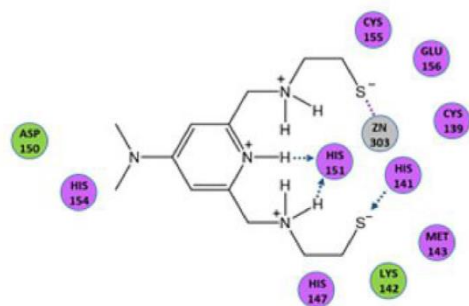


Fig. 3-4 SN-1 と TRAF6 部分結晶構造を用いた MOE によるドッキングシュミレーション

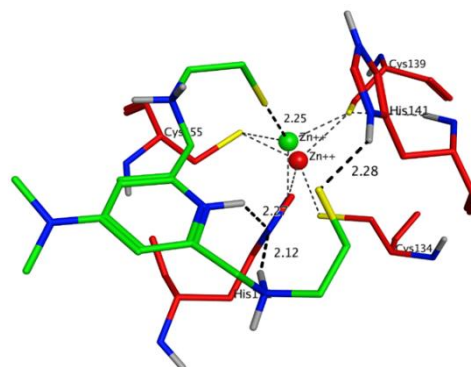
(A) TRAF6 のドメイン構造と N 末端ドメインのアミノ酸位置

(B) SN-1 と TRAF6 N 末端の結合の模式図

(C)



(D)



(E)

Atom of SN1	Residue of TRAF6	Interaction type	Distance (Å)
S ⁻	Zn ²⁺	ionic	2.25
S ⁻	NH of His141	H-bond	2.28
Pyridyl NH ⁺	N of His 151	H-bond	2.27
NH ₂ ⁺	N of His 151	H-bond	2.12

Fig. 3-4 SN-1 と TRAF6 部分結晶構造を用いた MOE によるドッキングシュミレーション (続き)

(C) 2次元画像。TRAF6 のアミノ酸残基または亜鉛を丸で示す。

(D) 3次元画像。緑色で SN-1 を、赤色で TRAF6 の ZnF1 の構造を示す。

本来の位置にある亜鉛を赤色で、SN-1 との結合により移動した亜鉛を緑色で示す。

(E) SN-1 と TRAF6 の ZnF1 との結合部位、結合様式および距離

次に試験管内で SN-1 と TRAF6 の結合を確認した。TRAF6 発現ベクターである pME-FLAG-TRAF6⁸³⁾を 293T 細胞に導入し、得られた細胞破碎液にビオチン化 SN-1⁹²⁾とアビジンビーズを加えてプルダウン実験を行った。その結果、ビオチン化 SN-1 添加時に TRAF6 との結合が見られることを確認した (Fig. 3-5)。なお、IL-1 誘導性 NF- κ B 活性化シグナル経路に關与する蛋白質のうち、蛋白質内に亜鉛をもたない TAK1 では結合が見られなかったが、亜鉛フィンガーをもつ NEMO では SN-1 との結合が見られた。

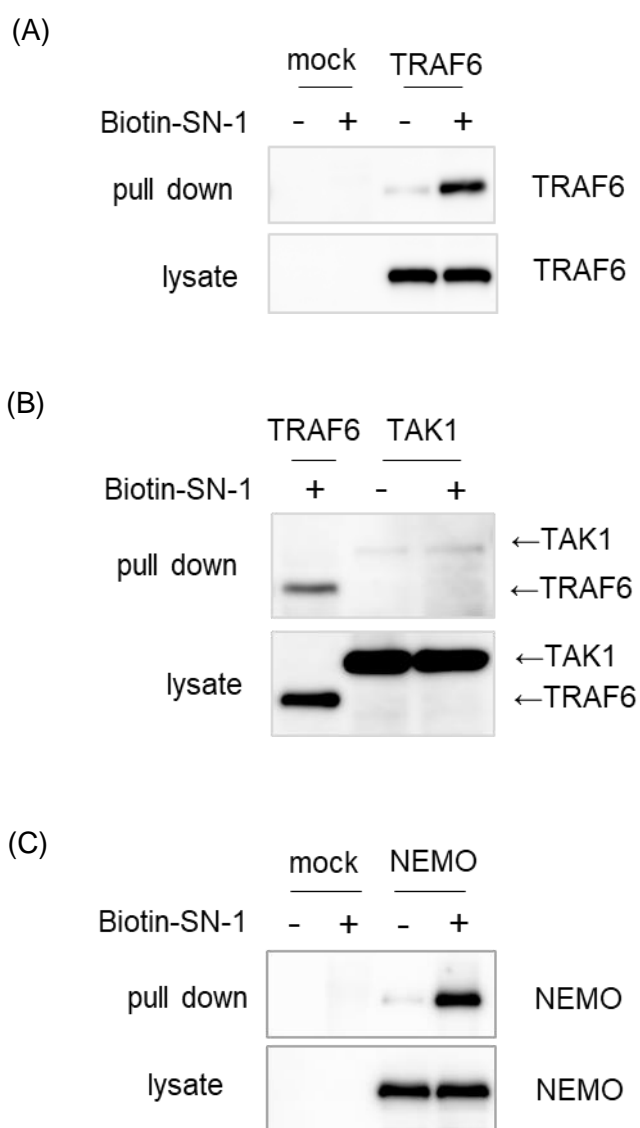


Fig. 3-5 SN-1 と TRAF6 (A)、TAK1 (B)および NEMO (C)の結合

第2項 ケミカルプローブの選定

次に、SN-1 類縁体を用いて実験を行った。SN-1 類縁体の構造については Fig.3-3 に示す。なお、SN-2 は細胞内で還元されて SN-1 となり、副生成物 bis (2-nitrophenyl)disulfide が生じると考えられる。また、SN-5 および SN-6 についても同様の副生成物が生じると予測される。そのため、副生成物の影響も検討するために bis (2-nitrophenyl)disulfide も実験に用いた。まず SN-1 類縁体の中で本実験にもっとも適したケミカルプローブを検討するために、レポーターアッセイを行った。κB 配列下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子をもつ発現ベクターである 3κB-tk-luc と、β-actin プロモーター下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子をもつ補正用の発現ベクターである pRL-Luc を、IL-1 受容体をもつ HeLa S3 細胞に導入した。化合物を添加後に IL-1 によりシグナルを誘導し、得られた細胞破碎液を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。活性値は 3κB-tk-luc より得られた値を pRL-Luc より得られた値で割ることにより算出した。その結果、10 種の化合物のうち 4 つの化合物を添加した場合に活性値が 50 %以下であったことから、これらが NF-κB 活性化阻害効果を示すと判断した (Fig. 3-6)。

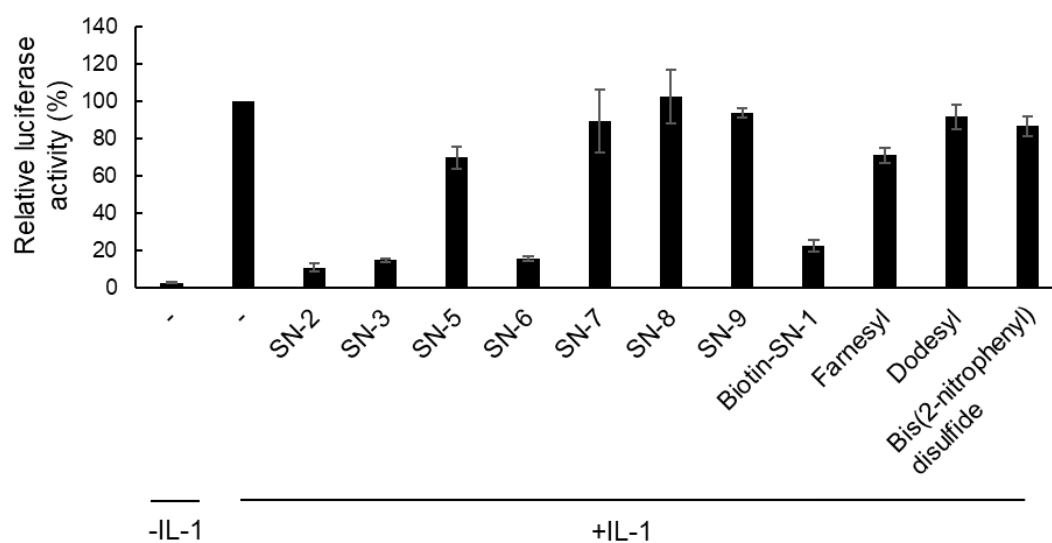


Fig. 3-6 SN-1 類縁体の NF-κB 活性化阻害活性

次に MTT 試薬を用いて、化合物添加から 4 時間後における HeLa S3 細胞に対する細胞毒性評価を行った。その結果、いずれの化合物も顕著な細胞毒性は示さなかったが (Fig. 3-7(A))、化合物の処理時間を 2 倍程度にした場合では、SN-2 以外の化合物は細胞毒性を示した (Fig. 3-7(B))。したがって強い NF- κ B 活性化阻害を示し、かつ細胞毒性が低い SN-2 を選択することとした。SN-2 は細胞内で還元されて SN-1 になると推測される。先のドッキングシュミレーションと試験管内での結合実験の結果から TRAF6 に結合すると考えられたため、TRAF6 亜鉛結合モチーフの機能解析に適すると思われた。

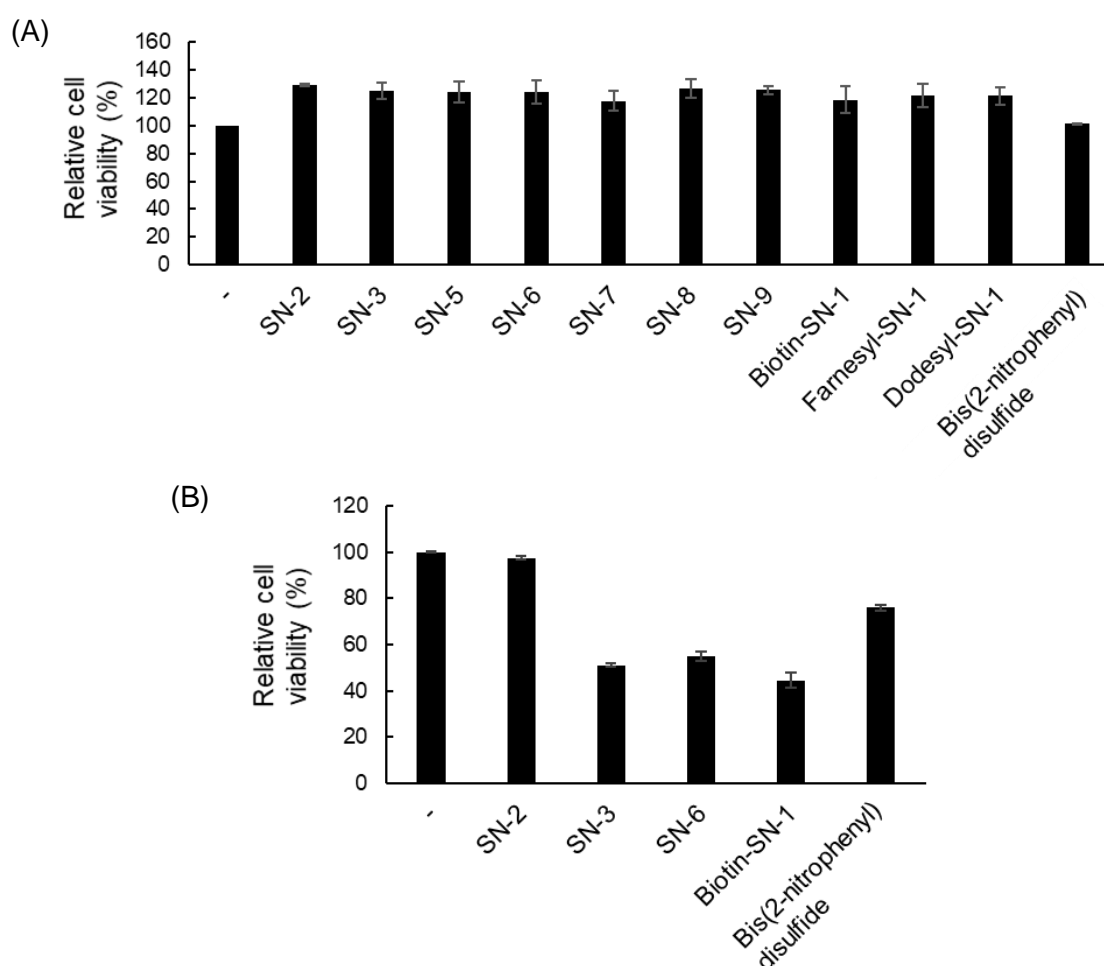


Fig. 3-7 SN-1 類縁体の HeLa S3 細胞における毒性評価

(A) 化合物添加から 4 時間後の結果

(B) 化合物添加から 8 時間後の結果

第3項 SN-1 を用いた TRAF6 の機能制御

SN-1 を用いて TRAF6 亜鉛結合モチーフの重要性を検討するために、TRAF6 自己ユビキチン化を観察した。まず、試験管内ユビキチン化実験を行った。前述の pME-FLAG-TRAF6 を 293T 細胞へ導入し、得られた細胞破碎液を免疫沈降して TRAF6 蛋白質を得た。これを E1、E2、ユビキチン、ATP を含む反応バッファーと混合し、SN-1 存在下または非存在下でユビキチン化反応を行った。その結果、SN-1 結合による TRAF6 ポリユビキチン化抑制を示した (Fig. 3-8 (A))。次に 293T 細胞を用いて実験を行った。なお、293T 細胞内で一般的に生成されるユビキチン鎖に対して SN-2 添加による影響がないことを確認した (Fig. 3-8 (B))。pME-FLAG-TRAF6 とユビキチン発現ベクターである Ub (WT) またはその変異体 Ub (K63/R63) を 293T 細胞へ共導入し、SN-2 で処理して細胞破碎液を得た。K63 とはユビキチン内のリジン残基 (K) のうち 63 番目のリジン残基以外をアルギニン残基 (R) に置換した変異体であり、R63 とは 63 番目のリジン残基のみをアルギニン残基に置換した変異体である。得られた細胞破碎液を免疫沈降し、ウエスタンブロット解析を行った。試験管内ユビキチン化実験の結果と同様に TRAF6 ポリユビキチン化抑制が観察された (Fig. 3-8 (C))。したがって、TRAF6 ポリユビキチン化に亜鉛結合モチーフが重要であることが示された。

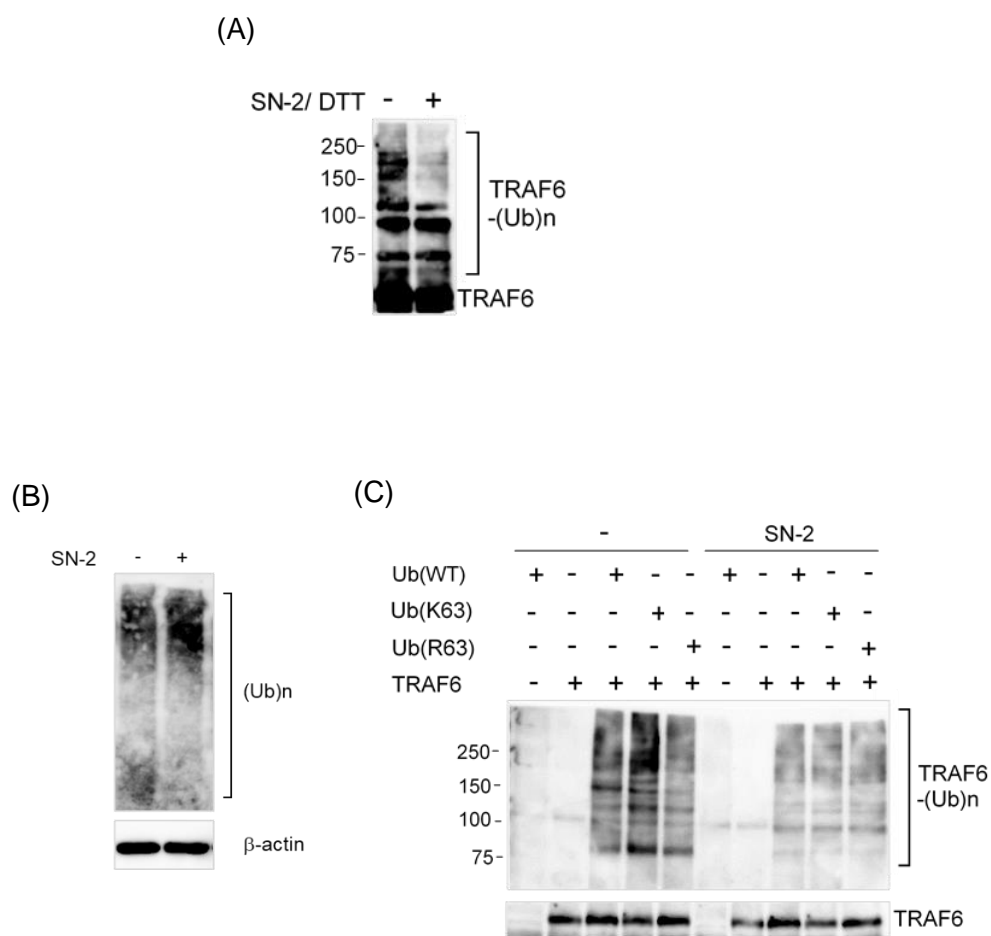


Fig. 3-8 SN-1 または SN-2 の TRAF6 自己ユビキチン化に対する影響
 (A) 試験管内 TRAF6 ユビキチン化に対する影響
 (B) 293T 細胞内で生成されるユビキチン鎖に対する影響
 (C) 293T 細胞における TRAF6 自己ユビキチン化に対する影響

TRAF6 の E3 リガーゼ活性への影響を検討するため、TRAF6 によって K63 ユビキチン化を受ける TAK1 のユビキチン化を観察した。pME-FLAG-TRAF6、TAK1 発現ベクターおよび前述のユビキチン発現ベクターまたはその変異体を用いて TRAF6 ユビキチン化の細胞実験と同様に行った。その結果、TAK1 ユビキチン化も TRAF6 同様に抑制されたことから、SN-1 結合による TRAF6 の E3 リガーゼ活性抑制を示した (Fig. 3-9)。

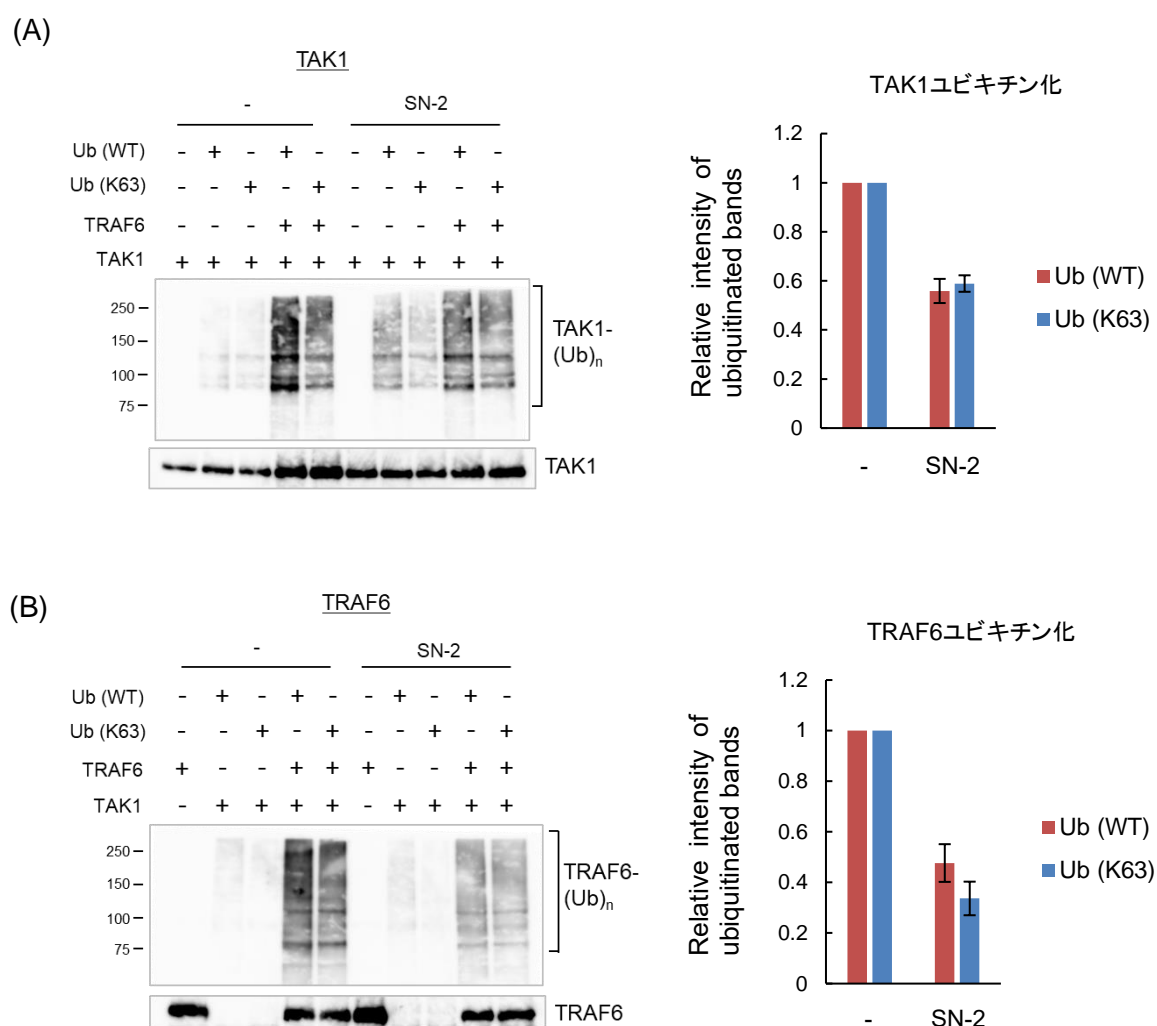


Fig. 3-9 SN-2 の TAK1 (A) と TRAF6 (B) のユビキチン化に対する影響
 左; ウェスタンブロット解析
 右; Image J を用いてバンドを定量化したグラフ

ユビキチン化反応は、ユビキチン、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) およびユビキチンリガーゼ (E3) の蛋白質が関与する反応である⁹⁵⁾。TRAF6 が介するユビキチン化では、E2 の 1 つである Ubc13/Uev1a ヘテロ二量体が、E3 である TRAF6 の酵素活性中心である RING ドメインで結合することが知られている⁹⁶⁾。そこで SN-1 添加時の Ubc13/Uev1a と TRAF6 の相互作用について検討した。293T 細胞へ pME-FLAG-TRAF6 を導入して細胞破碎液を得た。そこに SN-2 に DTT を添加して得た SN-1 溶液と His タグの結合した Ubc13/Uev1a 蛋白質を加えて、抗 His 抗体結合ビーズにて免疫沈降を行った。得られたサンプルをウエスタンブロット解析に供試し、抗 FLAG 抗体で検出することによって、SN-1 添加または非添加時に Ubc13/Uev1a に結合する TRAF6 の量を比較した。SN-1 存在下における Ubc13/Uev1a と TRAF6 との結合量は SN-1 非存在下での結合量とほぼ同程度であったため、SN-1 は E2 と TRAF6 との結合には影響しないものと考えられた (Fig. 3-10)。

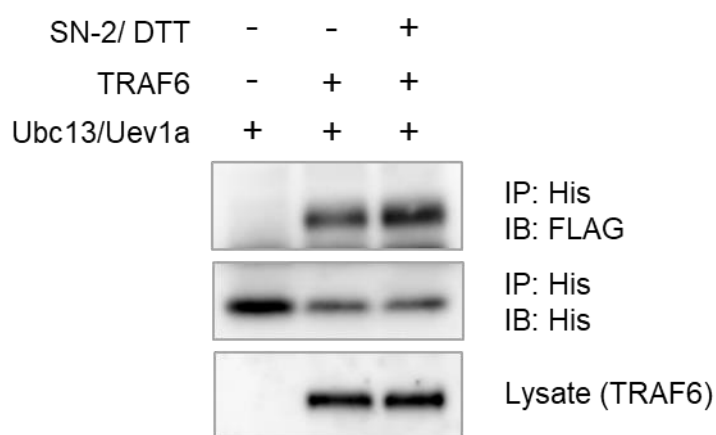


Fig. 3-10 SN-1 の TRAF6-Ubc13 相互作用に対する影響

SN-2 添加時の IL-1 誘導性 NF- κ B 活性化経路におけるシグナル蛋白質の経時変化を確認した。HeLa S3 細胞を SN-2 存在または非存在下で IL-1 刺激し、シグナル経路活性化を誘導した。刺激後、各時点で細胞を回収し、得られた細胞破碎液を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、SN-2 添加時に IKK 上流においてシグナル伝達が阻害されていた (Fig. 3-11)。また、その阻害活性はプロテアソーム阻害剤である MG132 と同程度であった (Fig. 3-12)。

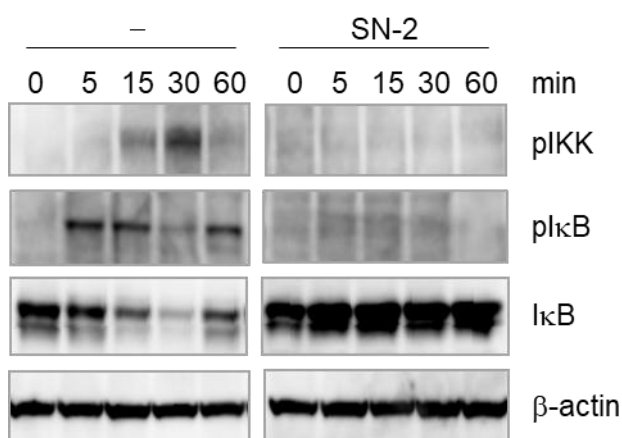


Fig. 3-11 SN-2 の IL-1 誘導性 NF- κ B 活性化経路に対する影響

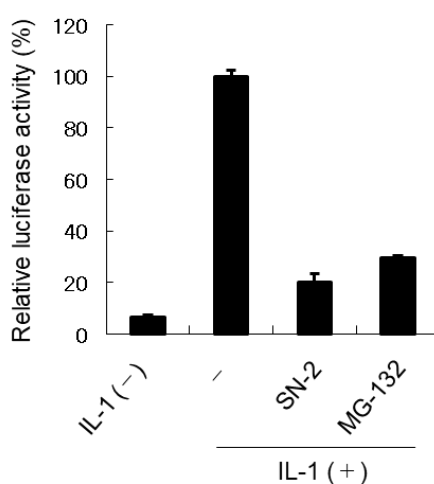


Fig. 3-12 SN-2 の IL-1 誘導性 NF- κ B 活性化阻害効果

第3節 考察

今回の研究によって、SN-1 をケミカルプローブとして用いて TRAF6 の E3 リガーゼ活性・ユビキチン化における亜鉛結合モチーフの重要性を示すことができた (Fig. 3-13)。

SN-2 は細胞内で還元されて SN-1 となると考えられるので、SN-1 のプロドラッグ体とみなすことができる。ケミカルプローブの候補として検討した 10 種類の SN-1 類縁体のうち、SN-2 が TRAF6 亜鉛結合モチーフの機能解析に最も適すると考えられた。NF- κ B 活性化阻害効果について SN-2 とそのほかのケミカルプローブの構造を比較すると、SN-5 および SN-6 との比較から、ピリジン環の窒素原子が重要であることが示された。また、SN-7、SN-8 および SN-9 との比較から、ピリジン環の両側の側鎖がいずれも必要であることが示された。Biotin-SN-1 は SN-2 と比較して低い阻害活性であったが、その要因としてはピリジン環にリンカーを介してビオチンを付加したためにこの部分が TRAF6 への結合に障害となった可能性が考えられる。以上の結果は、SN-1 と TRAF6 のドッキングシュミレーションの結果と一致している。よって、SN-2 は TRAF6 の機能解析を行うための基本的な構造を有するケミカルプローブであると考えられた。

SN-1 は、ドッキングシュミレーションの結果から TRAF6 の RING ドメインとは結合しないが、少なくとも 1 番目の亜鉛フィンガー (ZnF1) に結合すると予想され、試験管内での実験から TRAF6 ポリユビキチン化を抑制していた。Lamothe らは、ZnF1 を形成するアミノ酸に変異を導入した変異体を用いた場合に、IL-1 刺激による TRAF6 のユビキチン化の喪失を報告している。ZnF2 変異体を用いて先述と同様の実験を行った場合には、TRAF6 のユビキチン化抑制を示していた。これは亜鉛結合モチーフが TRAF6 ポリユビキチン化に関与していることを示している。本研究では、SN-1 結合によって TRAF6 の自己ユビキチン化および E3 リガーゼ活性が抑制された。これらの結果は Lamothe らの結果を支持し、亜鉛結合モチーフの重要性を示したものである。

Yin らは TRAF6 蛋白質結晶構造解析実験を行い、RING ドメインと ZnF1 を有する変異体が RING ドメインのみを有する変異体よりもより強く E2 である Ubc13/Uev1a と結合することを示した。本研究の結果では、SN-1 による E2 との相互作用に変化はないが、TRAF6 ユビキチン化は抑制されていた。SN-1 は TRAF6 に結合することでユビキチン化を阻害するが、E2 との相互作用を阻害するような構造の変化を引き起こさなかったのではないかと推測している。TRAF6 のポリユビキチン化には RING ドメイン部分での 2 量体化が必要であることが報告されていた⁸⁷⁾。さらに近年の研究では、TRAF6 は 2 量体となることで E2-ユビキチンと RING ドメインが効率的にユビキチンを受け渡しできる構造となることが示された^{97), 98)}。また、Coiled-coil ドメインが介する TRAF6 多量体化によって E2 を集積させ、より効率的なユビキチン鎖形成がなされているという報告がある⁹⁹⁾。SN-1 が TRAF6 の亜鉛フィンガー部位へ結合することによって TRAF6 多量体化の障害となり、ユビキチン化抑制が生じた可能性もある。

SN-1 は酵素のアミノ酸残基や亜鉛と相互作用するピリジン、2 つの NH、2 つの SH をメチレンで連結しただけの小さな化合物である。従って、種々の蛋白質のポケットに入り込み、柔軟に適合して相互作用しうる。実際に SN-1 は HIV-EP1、APOBEC3G、TRAF6、NEMO に結合し阻害する。この多能性は SN-1 の分子が小さすぎることに由来すると考えられる。SN-1 のピリジンまたはメチレンに置換基を導入すれば特定の標的蛋白質のポケットに相補的に収まるようになり、特異性が上昇すると考えられる。我々のグループは、以前に SN-1 を基盤としたファルネシルトランスフェラーゼ (FTase) 阻害剤を合成したが、これは SN-1 に FTase 特異的な置換基を導入することで特異性向上に成功した例である^{91), 92)}。以上のことから、近年報告されている TRAF6 と Ubc13 との相互作用を標的とした阻害剤^{100), 101)}の構造を SN-1 に導入することによって、より特異的な TRAF6 阻害効果を示すことができると期待される (Fig. 3-14)。

TRAF6 亜鉛フィンガーの重要性は分子生物学的手法により研究されていたが、本研究で用いたケミカルプローブ SN-1 によってケミカルバイオロジー的研究からも支持できるこ

とを明らかにした。また SN-1 を基盤とした TRAF6 認識部位の導入による特異的阻害剤創製も可能であると考えている。

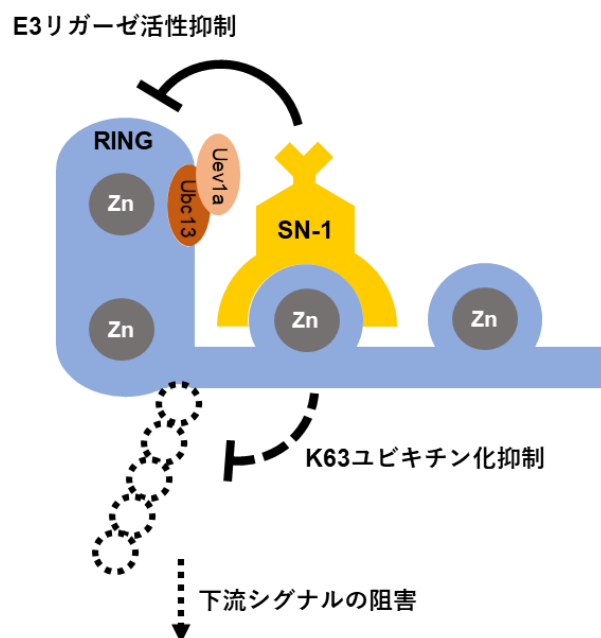


Fig. 3-13 SN-1 の TRAF6 機能制御の概略図

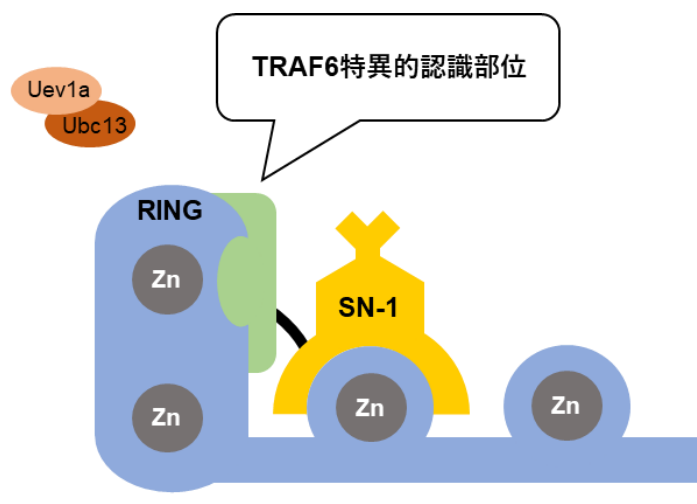


Fig. 3-14 SN-1 に基づいた TRAF6 特異的阻害剤の模式図

第4章 総括

本研究では、2つの異なる手法を用いて蛋白質の構造保持と機能制御における亜鉛の役割について検討した。実験結果とその意義を以下に述べる。

①亜鉛結合モチーフによるウイルス蛋白質の発現量制御

今回の研究により、亜鉛結合モチーフ導入により、翻訳効率の上昇・蛋白質の安定化が生じて HIV-2 Vpr の発現量が上昇することを示した。HIV-2 Vpr の蛋白質結晶構造は未だ解明されていないが、精製した HIV-2 Vpr 蛋白質の円二色性 (CD) スペクトル解析の結果から、Khamsri らが予測したようにその構造の約 40 %が α ヘリックスで構成されと考えられる¹⁰²⁾。他にも HIV-1/2 インテグラーゼの N 末端側には、Vpx と似た H2C2 亜鉛結合モチーフがあり、 α ヘリックスで構成される構造を安定化させていることが報告されている¹⁰³⁾。このように HIV は亜鉛を巧みに利用して、自身のもつ蛋白質を安定化させ、生存に必要な機能を獲得している。これまでの知見に加えて、今回の研究では、多様に進化してきた HIV-2 Vpx/Vpr の発現量を亜鉛によって制御するという新しい機能を明らかにすることができた。

②ケミカルプローブ結合による TRAF6 ユビキチン化抑制が示す亜鉛結合モチーフの重要性和その抑制メカニズムを応用した阻害剤の可能性

本研究では、亜鉛結合性ケミカルプローブを用いて亜鉛蛋白質 TRAF6 の機能解析を行い、基礎的知見を得た。ケミカルプローブである SN-1 は TRAF6 の亜鉛フィンガー部位に結合し、自己ユビキチン化および E3 リガーゼ活性を抑制した。先行の分子生物学的手法での研究結果から、これらの活性において亜鉛フィンガー部位が重要であることは示されていたが、ケミカルバイオロジー的手法でも支持できたと考えられる。加えて、SN-1 によるユビキチン化抑制メカニズムは TRAF6 阻害剤への応用も期待できる。創薬としては、基質

を収めるポケットがあるために亜鉛による酵素活性に注目されることがほとんどであった。一方で、亜鉛は構造保持に重要な役割を果たしていることから、亜鉛結合モチーフも創薬標的となる可能性がある。TRAF6 阻害剤は、天然物からの抽出物などが報告されているが^{104), 105)}、亜鉛フィンガー部位に着目した化合物は報告がない。TRAF6 は多くの細胞内シグナル経路に関与しており、炎症性疾患や癌の悪性化との関連が示されている^{73), 106), 107), 108)}。今回の研究から得られた知見は TRAF6 特異的阻害剤につながると期待され、TRAF6 の活性化やユビキチン化が関与する疾患に対して有効であると考えられる。

以上の 2 つの実験結果から得られた知見は亜鉛による蛋白質機能制御のメカニズム解明の一助となると考えられる。

第 5 章 実験の部

第 1 節 第 2 章に関する実験

第 1 項 細胞培養

ヒト胎児由来腎臓上皮細胞である 293T 細胞は、低グルコース含有 D-MEM 培地 (富士フィルム和光純薬) に 56 °C、30 分で非働化处理をしたウシ胎仔血清 (FBS) を 10 %、抗生物質としてストレプトマイシン (明治製菓ファルマ) を 89 µg/ml、抗真菌薬としてファンギゾン (ブリストル・マイヤーズ) を 0.89 µg/ml になるように加え、L-グルタミン (SIGMA-ALDRICH) を 2 mM 添加して使用した。9 cm 培養シャーレ (住友ベークライト) で 37 °C、CO₂ 5 % 条件下にてコンフルエントになるように培養した。0.25 % トリプシン (Gibco) に 0.537 mM の EDTA を添加した細胞剥離用溶液を用いて細胞を剥離し、24 ウェルプレート (IWAKI) または 3.5 cm 培養シャーレ (住友ベークライト) に播種して 2 日間培養したのちに、遺伝子導入実験に用いた。

第 2 項 プラスミド

第 2 章で用いた発現ベクターおよび全長ゲノムクローンについては以下の方法で構築した。構築に用いたベクター (細胞での発現のために必要なプロモーターやタグを含む骨格、あるいは全長ゲノムのもとになったプラスミドベクター)、インサート (挿入または置換部位のもとになったプラスミドベクター) および制限酵素部位を Table 1 および Table 2 に示す。

発現ベクター	ベクター	インサート	制限酵素サイト
pEF-FrR83C	pEF-Fvpx	pME18Neo-FrR83C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FrH38L/R83C	pEF-Fvpx	pME18Neo-FrH38L/R83C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FrH76A/R83C	pEF-Fvpx	pME18Neo-FrH76A/R83C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FrC81A/R83C	pEF-Fvpx	pME18Neo-FrC81A/R83C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FRvpr	pEF-Fvpx	PCR により増幅	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FRrH83C	pEF-Fvpx	pBlue-FRvpr/H83C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FNvpr	pEF-Fvpx	PCR により増幅	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FNrH83C	pEF-Fvpx	pBlue-FNvpr/H83C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FSmvpr	pEF-Fvpx	PCR により増幅	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FSmrH79C	pEF-Fvpx	pBlue-FSmvpr/H79C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-F1rH78C	pEF-Fvpx	pME18Neo-Fr1H78C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FSavpr	pEF-Fvpx	PCR により増幅	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FSarR92C	pEF-Fvpx	pBlue-FSavpr/R92C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FSdvpr	pEF-Fvpx	pUC57-SIVdeb vpr**	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FSdrH91C	pEF-Fvpx	pUC57-SIVdeb vpr/H91C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FS1vpr	pEF-Fvpx	pUC57-SIV1st vpr**	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-FS1rS86C	pEF-Fvpx	pUC57-SIV1st vpr/S86C*	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-Hvpr2	pEF-Hvpx	pEF-Fvpr2	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-HrR83C	pEF-Hvpx	pEF-FrR83C	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>
pEF-Hvpr2/2KR	pEF-Hvpx	pEF-Fvpr2/2KR	<i>EcoRV</i> , <i>XbaI</i>

*: QuikChange により変異を導入したサブクローニングベクター

**: 委託合成により作成したプラスミドベクター

Table 1. 構築した発現ベクター

全長ゲノムクローンおよび サブクローニングベクター	ベクター	インサート	制限酵素サイト
pGL-rR83C	pGL-AN	pUC-GL-AN(<i>XbaI</i> - <i>NsiI</i>)/rR83C*	<i>XbaI</i> , <i>NsiI</i>
pGL-Ec	pGL-AN	pBlue-GL-AN(<i>XbaI</i> - <i>NsiI</i>)/Ec	<i>XbaI</i> , <i>NsiI</i>
pBlue-rH	pBlue-xFrH	pGL-AN	<i>XbaI</i> , <i>EcoT14I</i>
pGL-rH	pGL-AN	pBlue-rH	<i>XbaI</i> , <i>NsiI</i>
pBlue-GL-rR83C	pBlue- <i>NsiI</i>	pGL-rR83C	<i>XbaI</i> , <i>NsiI</i>
pBlue-rH/R83C	pBlue-rH	pBlue-GL-rR83C	<i>EcoT14I</i> , <i>NsiI</i>
pGL-rH/R83C	pGL-AN	pBlue-rH/R83C	<i>XbaI</i> , <i>NsiI</i>
pBlue-rH/Ec	pBlue-rH	-***	<i>EcoRI</i> **
pGL-rH/Ec	pGL-AN	pBlue-rH/Ec	<i>XbaI</i> , <i>NsiI</i>
pGL-rH/xb	pGL-rH	-***	<i>XbaI</i> **
pGL-rH/R83C/xb	pGL-rR83C	pGL-rH/xb	<i>EcoRI</i>
pBlue-xH	pBlue-xHrF	pBlue-GL-AN(<i>XbaI</i> - <i>NsiI</i>)	<i>EcoT14I</i> , <i>NsiI</i>
pGL-xH	pGL-AN	pBlue-xH	<i>XbaI</i> , <i>NsiI</i>
pGL-xH/xb	pGL-xH	-***	<i>XbaI</i>

*: QuikChange により変異を導入したサブクローニングベクター

**: 制限酵素サイトで切断後に平滑末端化

***: セルフライゲーション

Table 2. 構築した全長ゲノムクローンおよびそのためのサブクローニングベクター

(1) インサート DNA への変異導入

サブクローニングベクターを基にして QuikChange により変異を導入した。すなわち目的のアミノ酸を変異させるために設計したプライマー (Table 3) と *Pfu Turbo* DNA polymerase (Agilent) を用いて増幅を行った。増幅した QuikChange 産物はエタノール沈殿を行った後、テンプレートのベクターを *Dpn* I (Takara) で切断した。再度反応溶液の交換のためにエタノール沈殿を行い、トランフォーメーションを行ってコロニーを得た。得られたコロニーをアンピシリン添加 LB 培地で培養し、GenElute™HP Plasmid Miniprep Kit (SIGMA-ALDRICH) を用いてプラスミド DNA 溶液を得た。目的とする変異導入の確認は、DNA シークエンシングを行った。試薬組成および手順を Fig. 5-1 に示す。

(2) インサート部位の増幅

ベクターDNA への導入に際して、使用する制限酵素部位がインサート DNA に存在しない場合には、制限酵素配列を付加したプライマーを設計して (Table 4)、PCR にて目的インサート部位を増幅した。PCR 後の反応液を用いてアガロースゲル電気泳動にて目的とする断片の増幅を確認し、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行った。*Pfu Turbo* DNA polymerase を用いた場合を Fig. 5-2 に、PrimeSTAR® Max DNA polymerase (Takara) を用いた場合を Fig. 5-3 に示す。

プライマー名	配列
vpr2-R83C-a	5'-CAGAGCAGGGTGTAAGTCTCAAGAATTAGCCAAAC-3'
vpr2-R83C-b	5'-GTTTGGCTAATTCTTGAGCAGTTACACCCTGCTCTG-3'
vpr2-H38L-a	5'-GAAGAAGCCTTAAAGCTTTTTGATCCCCGCTTG-3'
vpr2-H38L-b	5'-CAAGCGGGGATCAAAAAGCTTTAAGGCTTCTTC-3'
Vpr2-H76A-a	5'-CAACGAGCCCTCTTCGTGGCCCTCAGAGCAGGGTGTAAC-3'
Vpr2-H76A-b	5'-GTTACACCCTGCTCTGAGGGCCACGAAGAGGGCTCGTTG-3'
vpr2-C81A-R83C-a	5'-CACCTCAGAGCAGGGGCTAACTGCTCAAGAATTAGC-3'
vpr2-C81A-R83C-b	5'-GCTAATTCTTGAGCAGTTAGCCCCTGCTCTGAGGTG-3'
VprROD-H83C-a	5'-GCAGGATGTGGCTGCTCAAGAATTGG-3'
VprROD-H83C-b	5'-CCAATTCTTGAGCAGCCACATCCTGC-3'
VprJ2111-H83C-a	5'-GCGGTTGTCAATGCTCAAGGATTGG-3'
VprJ2111-H83C-b	5'-CCAATCCTTGAGCATTGACAACCGC-3'
Vpr-mac-H79C-a	5'-GCCGATTCTGGAGCAGATGCATCCGCC-3'
Vpr-mac-H79C-a	5'-GGCGGATGCATCTGCTCCAGAATCGGC-3'
vpr1-H78C-a	5'-CAGAATTGGGTGTGCGATGTAGCAGAATAGGCGTTAC-3'
vpr1-H78C-b	5'-GTAACGCCTATTCTGCTACATCGACACCCAATTCTG-3'
Vpragm-R92C-a	5'-GTGGTTGTCGTTGCAGACAGCCCTTC-3'
Vpragm-R92C-b	5'-GAAGGGCTGTCTGCAACGACAACCAC-3'
SIVdeb-H91C-a	5'-GAAGCTTGCTTTTGCAGGGAGAGAGAG-3'
SIVdeb-H91C-b	5'-CTCTCTCTCCCTGCAAAAGCAAGCTTC-3'
SIVlst-S86C-a	5'-CCAACTTGTCCTGCTATGCAGCAGCC-3'
SIVlst-S86C-b	5'-GGCTGCTGCATAGCAGGGACAAGTTGG-3'

Table 3. QiukChange に使用したプライマー

プライマー名	配列
vpr-ROD-5-Eco5	5'-CGGATATCCGCTGAAGCACCAACAGAGCTC-3'
vpr-ROD-3-Xba	5'-GCTCTAGATTATTGCATGTTTCTAGGGG-3'
vpr-agm-5-Eco5	5'-CGGATATCCGCATCAGGGAGAGGTCCCAGA-3'
vpr-agm-3-Xba	5'-GCTCTAGACTAATCAAGTCCTGGTGGAG-3'
vpr-J2111-5-Eco5	5'-CGGATATCCGCAGAAGCAGCCCCAGAGACT-3'
vpr-J2111-3-Xba	5'-GCTCTAGATTACACGCCCCCAGGGGG-3'
vpr-mac-5-Eco5	5'-CGGATATCCGAAGAAAGACCTCCAGAAAAATG-3'
vpr-mac-3-Xba	5'-GCTCTAGATTATAGCATGCTCCTAGAGGGCGG-3'

Table 4. インサート DNA の増幅に使用したプライマー

10×reaction buffer	5	μl
dNTPs (2.5 mM each)	1	μl
template (5~50 ng)	5	μl
Forward primer (100 ng/ml)	1.25	μl
Reverse primer (100 ng/ml)	1.25	μl
滅菌水	35.5	μl
<i>Pfu</i> Turbo DNA polymerase	1	μl
total	50	μl



PCR サイクル

95°C	30	s] 16 cycles
95°C	30	s	
55°C	1	min	
68°C	2	min/kbp	



エタノール沈殿*1



DNA	44.5	μl
10×T buffer	5	μl
<i>Dpn</i> I	0.5	μl
total	50	μl



37°C、1h インキュベート

エタノール沈殿*1



ライゲーション



トランスフォーメーション

*1 エタノール沈殿

PCR 産物または <i>Dpn</i> I 処理した		
DNA 断片	x	μl
3M NaOAc (pH 5.2)	0.1x	μl
100% EtOH	2x	μl
グリコーゲン	2	μl



-20°C、1h 静置



14,000 rpm、15min、4°Cで遠心



上清を除いて風乾



滅菌水に溶解

Fig. 5-1 QuikChange のプロトコール

10×Pfu buffer	10	μl
dNTPs (2.5 mM each)	8	μl
template (100 ng/ml)	1	μl
Forward primer (50 mM)	1	μl
Reverse primer (50 mM)	1	μl
滅菌水	78	μl
<i>Pfu Turbo</i> DNA polymerase	1	μl
total	100	μl



PCR サイクル

94°C	45	s	} 35 cycles
94°C	45	s	
55°C	45	s	
72°C	1	min/kbp	
72°C	10	min	



フェノール/クロロホルム抽出[#]



エタノール沈殿



制限酵素処理

[#]フェノール/クロロホルム抽出

PCR 産物と等量の PhOH:CHCl₃ (1:1)を加えて、vortex

↓ 12,000rpm、5 min、室温で遠心

上層^{*1}を新しい 1.5 ml チューブへ移す



^{*1}と等量の CHCl₃を加えて、vortex

↓ 12,000rpm、5 min、室温で遠心

上層^{*2}を新しい 1.5 ml チューブへ移す



エタノール沈殿

^{*2} の溶液	x	μl
3M NaOAc (pH 5.2)	0.1x	μl
100% EtOH	2x	μl
グリコーゲン	2	μl



-20°C、1h 静置



14,000 rpm、15min、4°Cで遠心



上清を除いて風乾

Fig. 5-2 *Pfu Turbo* DNA polymerase を用いたインサート DNA 増幅のプロトコール

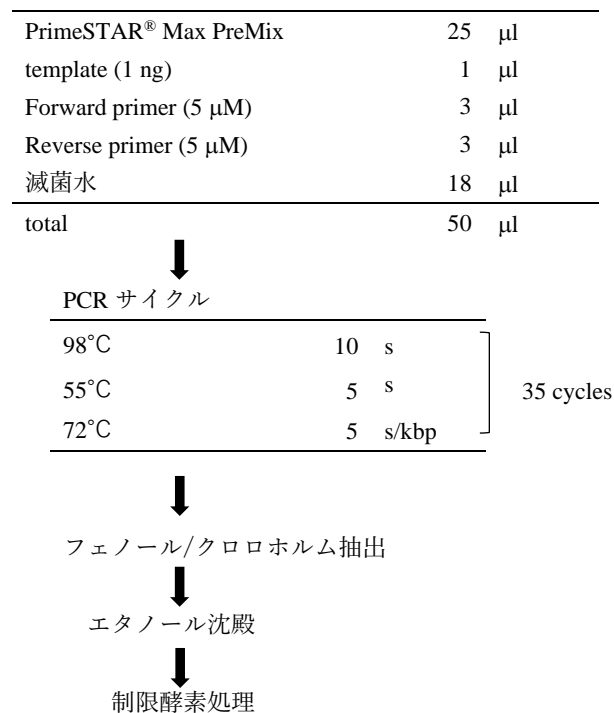


Fig. 5-3 PrimeSTAR® Max DNA polymerase を用いた
インサート DNA 増幅のプロトコール

(3) 制限酵素切断

使用するインサート DNA を、制限酵素を用いて 37°C で約 12 時間以上インキュベートして制限酵素部位で切断した。

(4) ベクター DNA の制限酵素処理

インサート DNA と同様に制限酵素部位で切断した。

(5) ベクターDNA の脱リン酸化処理

1 か所の制限酵素部位で切断した場合においては、ベクターDNA の自己連結を防ぐために Alkaline Phosphatase (Calf intestine) (Takara)を用いて 37°Cで 1 時間インキュベートし、脱リン酸化処理を行った。なお、脱リン酸化処理を行う前にはエタノール沈殿にて溶液の交換を行った。(Fig. 5-4)

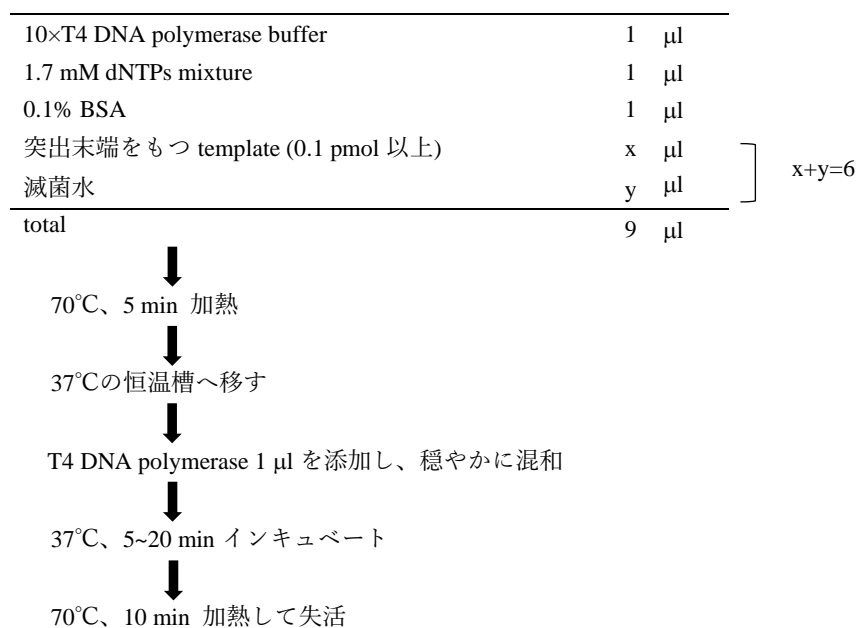


Fig. 5-4 T4 DNA ポリメラーゼによる突出末端平滑化のプロトコール

(6) DNA の精製

制限酵素部位で切断した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動に供試し、UV 照射下で目的バンドの切り出しを行った。その後 Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて DNA を精製した。

(7) ライゲーション

精製したインサート DNA およびベクターDNA を滅菌水に溶解した。アガロースゲル電気泳動にて DNA 量を確認し、DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara)を用いて 16°Cで 2 時間以上インキュベートした。なお、ライゲーションの際は、ベクターDNA:インサート DNA のモル比が 1:3~1:5 になるように DNA 溶液を混合した。

(8) トランスフォーメーション

コンピテントセル (*E. coli*, HB101)に 10×TF Buffer (100 mM CaCl₂、300 mM MgCl₂) とライゲーション溶液を加えて穏やかに混和し、氷上で 30 分インキュベートした。30 分後、ヒートショック法で 42°C、2 分間で形質転換を行い、抗生物質無添加の LB 溶液を加えて 37°Cで 1 時間、全長ゲノムクローンおよびその変異体では 30°Cで 1.5 時間インキュベートした。その後、アンピシリン添加 LB 培地に塗布して 37°Cで、または全長ゲノムクローンおよびその変異体では 30°Cで約 16~24 時間培養した。LB 培地については Fig. 5-5 に示す。

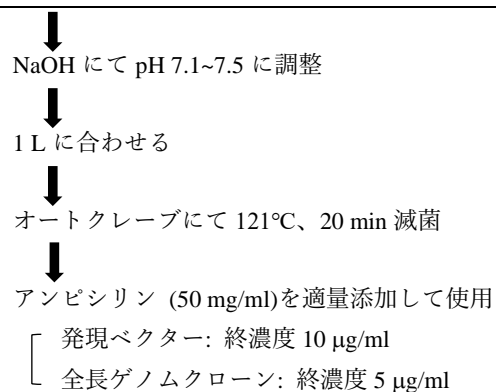
(9) プラスミド DNA の抽出・精製

アンピシリン添加 LB 培地上に形成されたコロニーを、アンピシリン添加 LB 培地で 37°C、または全長ゲノムクローンおよびその変異体では 30°Cで約 16 時間振盪培養し

た。GenElute™HP Plasmid Miniprep Kit (SIGMA-ALDRICH)を用いて、得られた培養液からプラスミド DNA 溶液を得た。

LB 培地

Bacto™ Tryptone (ペクトン・ディッキンソン)	10 g
Bacto™ Yeast Extract (ペクトン・ディッキンソン)	5 g
NaCl (富士フィルム和光)	10 g
MQ 水	900 ml



LB 寒天培地

LB 培地	500 ml
Bacto™ Ager (ペクトン・ベイツキンソン)	7.5 g

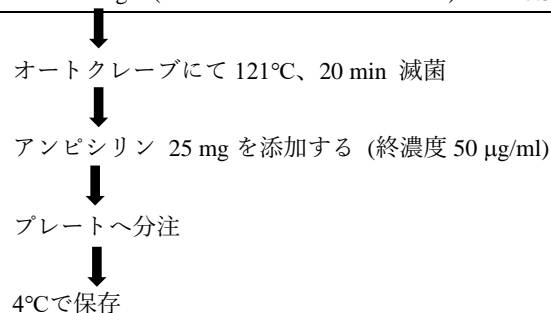


Fig. 5-5 LB 培地および LB 寒天培地の組成

(10) 塩基配列の確認

前項で得られたプラスミド DNA 溶液を切断に用いた制限酵素で切断し、目的とするインサートが挿入されているかどうかを確認した。インサート挿入が確認されたクローンについては Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行い (Fig. 5-6)、シーケンスにより塩基配列の確認を行った。

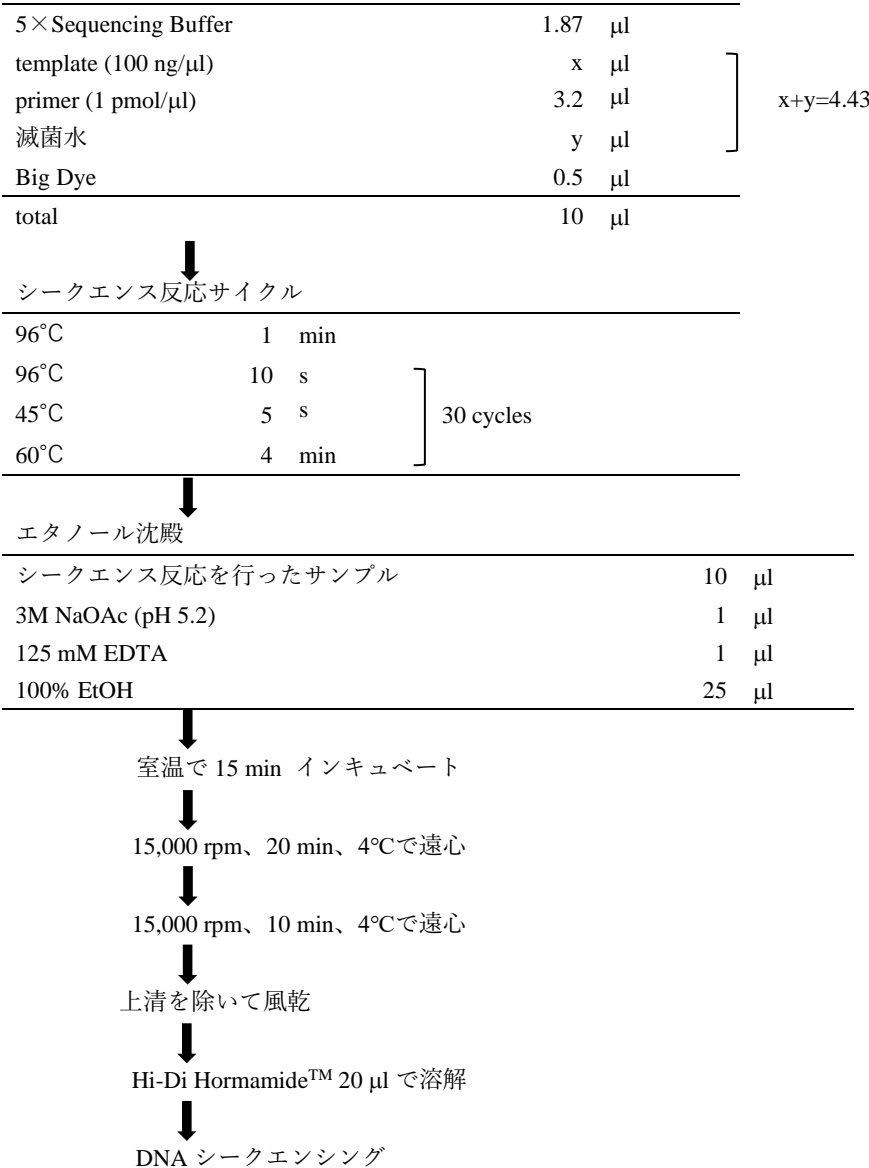


Fig. 5-6 塩基配列決定のためのシーケンス反応のプロトコール

(11) 大スケールでのプラスミド DNA の精製

目的とするインサートの挿入が確認されたクローンについて大スケールでの DNA 精製を行った。先述の培養液 1 ml をアンピシリン添加 LB 培地 150 ml に加えて 37°C または 30°C、約 16~24 時間振盪培養した。GenElute™HP Plasmid Maxiprep Kit (SIGMA-ALDRICH)を用いて、得られた培養液からプラスミド DNA 溶液を得た。ナノスケール分光光度計 (エア・ブラウン)を用いて OD₂₆₀ 値を測定し、実験に使用した。

第 3 項 トランスフェクション

細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine 3000® (Thermo Fisher Scientific)およびリン酸カルシウム法にて行った。なお、遺伝子導入に際しては、トランスフェクション効率を上げるためにグルコース含有 DMEM 培地 (SIGMA-ALDRICH)に非働化済 5% FBS を 25 ml、ストレプトマイシン (明治製菓ファルマ)を 89 µg/ml、ファンギゾン (ブリストル・マイヤーズ)を 0.89 µg/ml、L-グルタミン (SIGMA-ALDRICH) を 2 mM 添加したもの (トランスフェクション用培地)に置換したうえで実験に使用した。遺伝子導入後、約 1~2 日間培養した後に 1×PBS で洗浄して細胞を回収し、実験に供試した。1×PBS の組成を Fig.5-7 に示す。

(1) Lipofectamine 3000®を用いた遺伝子導入

293T 細胞を 24 ウェルプレート (IWAKI)に播種し、2 日後に Lipofectamine® 3000 を用いてプロトコールに準じてトランスフェクションを行った。

(2) リン酸カルシウム法による遺伝子導入

293T 細胞を 3.5 cm 培養シャーレ (住友ベークライト) に播種し、2 日後にリン酸カルシウム法を用いて常法に従ってトランスフェクションを行った。トランスフェクションから約 4 時間が経過したのちに、新鮮なメディウム 1 ml に置換した。

1×PBS		
10×PBS*	100	ml
MQ 水	900	ml
total	1000	ml

↓

オートクレーブにて 121°C、20 min 滅菌

*10×PBS		
NaCl (富士フィルム和光)	80	g
KCl (SIGMA-ALDRICH)	2	g
KH ₂ PO ₄ (SIGMA-ALDRICH)	2	g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (ナカライテスク)	28.9	g

↓

MQ 水で 1 L に合わせる

Fig. 5-7 1×PBS、10×PBS の組成

第 4 項 ウェスタンブロット解析

得られたサンプルは Sample buffer を添加して加熱処理を行い、12.5 %もしくは 15%ゲル (SuperSepTMAce、富士フィルム和光)を用いて常法に従って SDS-PAGE を行った。タンク式転写装置を用いて PVDF 膜 (Immobilon[®]-P Transfer Membrane、Merck)に転写 (100V、3 時間)した。転写した PVDF 膜は 5 %スキムミルクを含む 0.1 %Tween-20-PBS (PBST)中で 1 時間ブロッキングを行った。その後、膜を PBST で洗浄し、ブロッキング溶液で希釈した 1 次抗体を用いて室温または 4 °Cで 1 時間以上、1 次抗体反応を行った。1 次抗

体反応後、膜を PBST で洗浄し、ブロッキング溶液で希釈した 2 次抗体を用いて室温で 1 時間、2 次抗体反応を行った。2 次抗体反応終了後、PVDF 膜を PBST で洗浄し、イムノスターLD (富士フィルム和光)で抗体反応を検出した。なお、バックグラウンドが高い場合には軽減のためにイムノスターゼータ (富士フィルム和光)を用いた。概要および試薬組成を Fig.5-8 に示す。

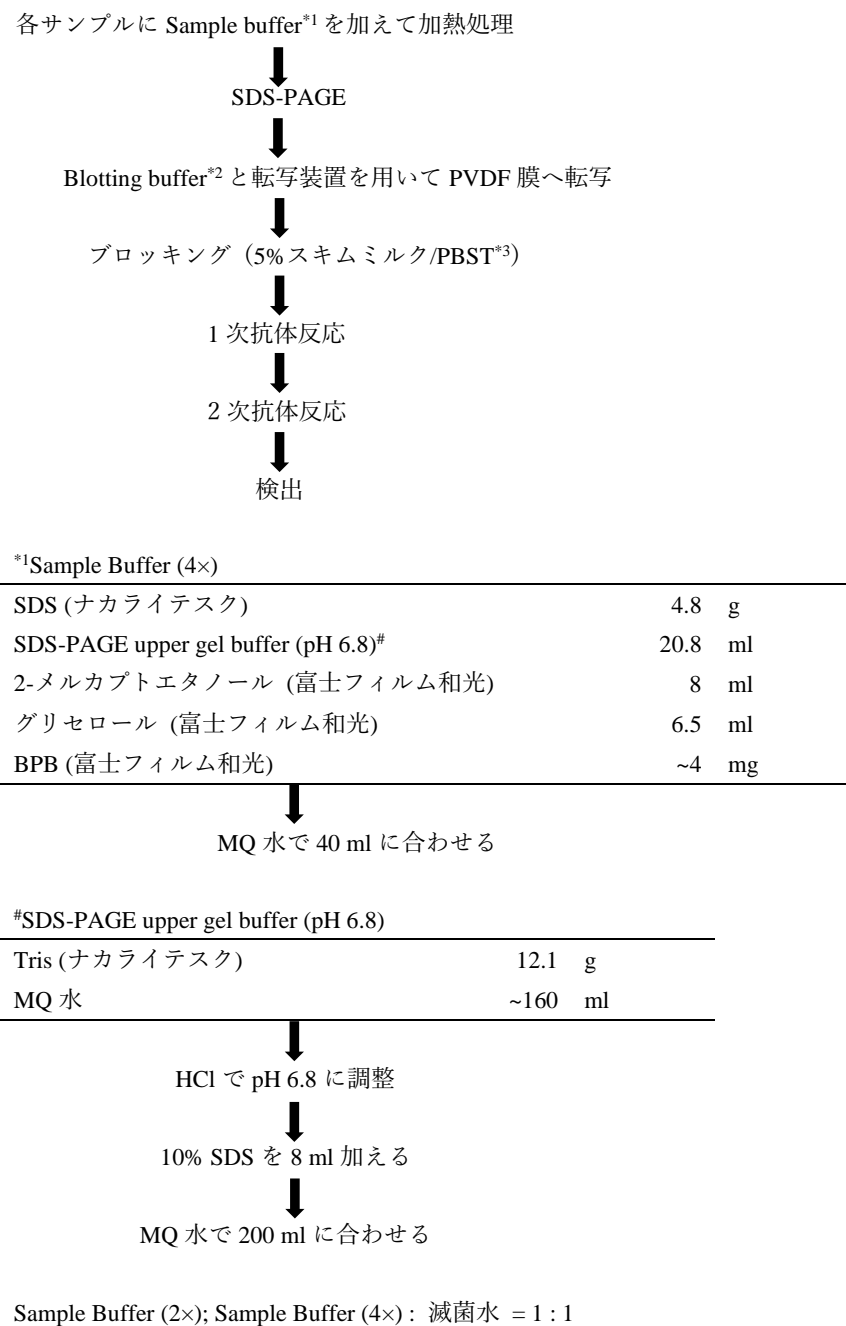


Fig. 5-8 Western blot 解析の概要および試薬組成

Blotting Buffer		
グリシン (AIGMA-ALDRICH)	14.4	g
Tris (ナカライテスク)	3	g
MeOH (富士フィルム和光)	200	ml
total	1000	ml
PBS-T		
10×PBS	100	ml
MQ 水	900	ml
total	1000	ml

↓

TWEEN-20 (SIGMA-ALDRICH) を 1 ml 加える

Fig. 5-8 Western blot 解析の概要および試薬組成 (続き)

第 5 項 1 次抗体および 2 次抗体

ウエスタンブロット解析に用いた 1 次抗体は、抗 FLAG M2 抗体 (SIGMA-ALDRICH)、抗 HA 抗体 (COVANCE)、抗 myc 抗体 (MBL)、抗 p27 抗体 (NIBSC Centralized Facility for AIDS reagent)、抗 β -actin 抗体 (SIGMA-ALDRICH)、抗 GAPDH 抗体 (Santa Cruz)、PARP-1 (Santa Cruz) および Histone H3 (富士フィルム和光) を用いた。2 次抗体は、1 次抗体に応じて抗 mouse 抗体 (GE ヘルスケア)、抗 rabbit 抗体 (GE ヘルスケア) または抗 sheep 抗体を用いた。

第 6 項 RNA 抽出および逆転写反応

回収した細胞から RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) にて細胞中に含まれる RNA を抽出した。RNA 濃度はナノスケール分光光度計 (エア・ブラウン) を用いて測定した。得られた RNA を 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調製し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いてプロトコールに従って逆転写反応を行った。2×RT マスターミックスを全量が 10 μl となるように調製し、前述の通りに濃度を調製した RNA 10 μl と混合して、25°C で 10 分、37°C で 120 分、85°C で 5 分、4°C にて反応を行った (Fig. 5-9)。

2×RT Mix	
10×RT buffer	2 μl
25×dNTP Mix (100 mM)	0.8 μl
RNase inhibitor (20 U/ml)	1 μl
10×RT Random primers	2 μl
滅菌水	3.2 μl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 μl
total	10 μl



cDNA 10 μl を添加し混合する



25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min
4°C	∞

Fig. 5-9 逆転写反応のプロトコール

第7項 定量的 PCR

逆転写反応によって得られた cDNA を鋳型として、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (東洋紡)を用いてプロトコールに従い、定量的 PCR を行った (Fig. 5-10)。なお、補正のためにハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用いて、標準化を行った。用いたプライマーを Table 5 に示す。

THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix	10 μl
template	2 μl
Forward primer (5 pmol/μl)	1.2 μl
Reverse primer (5 pmol/μl)	1.2 μl
滅菌水	5.6 μl
total	20 μl



PCR サイクル	
95°C	60 s
95°C	15 s
60°C	60 s
40 cycles	

Fig. 5-10 定量的 PCR のプロトコール

プライマー名	配列
qPCR-5-vpr	5'-AGAGTTTCCCCCAGAAGATG-3'
qPCR-3-vpr	5'-TTCAGGTGTGTCTCCATGTC-3'
GAPDH-5	5'-AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG-3'
GAPDH-3	5'-GGCAGAGATGATGACCCCTTTT-3'

Table 5. 定量的 PCR に使用したプライマー

第 8 項 試験管内転写/翻訳実験

試験管内転写/翻訳反応は、TNT T7 Quick Coupled transcription/translation kit (Promega) を用いてプロトコールに従って行った (Fig. 5-11)。

発現ベクター	x	μl	} x+y=9
1 mM Met	1	μl	
滅菌水	y	μl	
TNT T7 Quick Master Mix	40	μl	
total	50	μl	

↓

30°C、1.5 h インキュベート

↓

Sample Buffer を加えて、70°C、10 min インキュベート

↓

Western Blot 解析へ

Fig. 5-11 試験管内転写/翻訳実験のプロトコール

第 9 項 試験管内転写実験

試験管内転写反応は、T7 RNA ポリメラーゼ (New England Bio Labs) を用いて行った。pEF-Fvpr2 あるいは pEF-FrR83C のプラスミドは *vpr* 遺伝子の終止コドンの外側に存在する *Xba* I サイトで切断することにより環状から一本鎖状になるように処理をし、エタノ

ール沈殿にて溶液の交換を行った。これを鋳型としてプロトコールに従って試験管内で mRNA を作製した。得られた mRNA は RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)を用いてクリーンアップを行い、アガロースゲル電気泳動にて確認した (Fig. 5-12)。

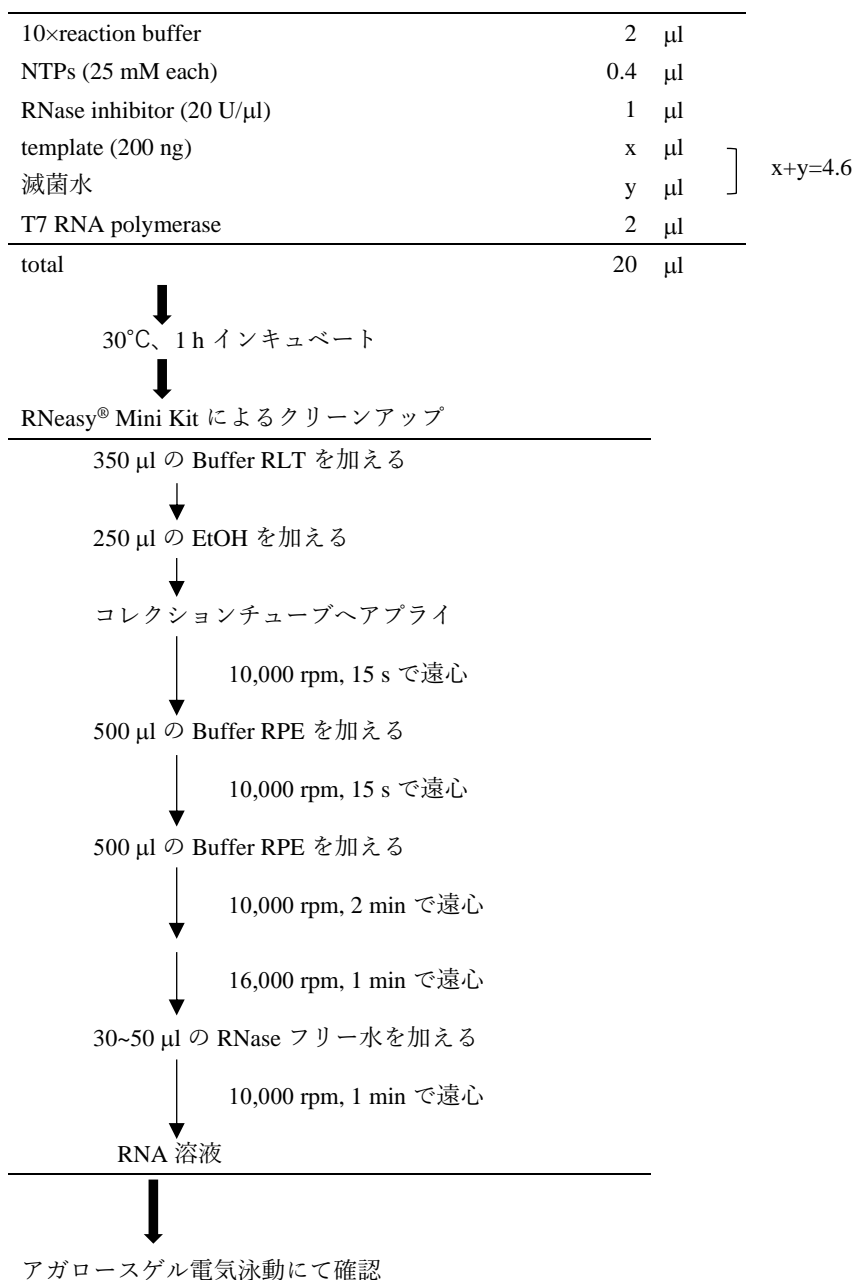


Fig. 5-12 試験管内転写実験のプロトコール

第 10 項 試験管内翻訳反応実験

前項で得た mRNA を鋳型とし、Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated (Promega)を用いてプロトコールに従って実験を行った。キットに含まれる試薬類が正しく反応しているかどうかを確認するために、ネガティブコントロールとして鋳型を添加しないサンプルを、ポジティブコントロールとしてキットに付属しているルシフェラーゼ遺伝子由来の RNA を添加したサンプルを準備して評価したいサンプルと同様に反応を行った。得られたサンプルは 4×Sample buffer を添加して 100°C、10 分間加熱して、ウェスタンブロット解析に用いた (Fig. 5-13)。

Rabbit Reticulocyte Lysate	35	μl	
amino acid (Leu-)	0.5	μl	
amino acid (Met-)	0.5	μl	
RNase inhibitor	1	μl	
RNA (0.5 μg)	x	μl] x+y=4.6
RNase Free 水	y	μl	
total	50	μl	

↓

30°C、1.5 h インキュベート

↓

Sample buffer を加えて、70°C、10 min インキュベート

↓

Western Blot 解析

Fig. 5-13 試験管内翻訳実験のプロトコール

第 11 項 シクロヘキシミドチェイス実験

各発現ベクターを遺伝子導入した 293T 細胞に、シクロヘキシミド (富士フィルム和光) を終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。37°C でインキュベートし、0、1、2、4 時間後の時点で培養シャーレから剥離して、1×PBS で洗浄して細胞を回収した。各サンプルは 2×Sample buffer を添加して 100°C、1 時間加熱したのちに、ウエスタンブロット解析に用いた。

第 12 項 MG132 を用いたプロテアソーム分解確認実験

各発現ベクターを遺伝子導入した 293T 細胞に、遺伝子導入から約 28 時間後に MG132 を終濃度 5 μM となるように添加し、37°C でインキュベートした。MG132 添加から約 16 時間後に細胞を剥離し、1×PBS で洗浄して細胞を回収した。各サンプルは 2×Sample buffer を添加して 100°C、1 時間加熱したのちに、ウエスタンブロット解析に用いた。

第 13 項 免疫沈降実験

各発現ベクターを遺伝子導入した 293T 細胞を剥離し、1×PBS で洗浄して細胞を回収した。得られたペレットをアプロチニン 10 $\mu\text{g/ml}$ を添加した TNE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.8)、300 mM NaCl、1 mM EDTA、NP-40 0.5%) で懸濁し、氷上にて 15 分間静置後、4°C で 30 分間転倒混合を行った後、12,000 rpm、5 分間、4°C で遠心することにより、細胞破碎液を得た。目的とする蛋白質に結合している余分な蛋白質を除くために、得られた細胞破碎液に終濃度 1% となるように SDS を加えて 100°C で 10 分間加熱処理を行った。加熱処理した細胞破碎液は、SDS が終濃度 0.1% となるように先述の TNE buffer にて希釈した。免疫沈降を行うための準備として、Protein G sepharose beads (SIGMA-ALDRICH) に抗 HA 抗体を 1 サンプルにつき 1 μl 添加し、4°C で 1 時間転倒混合することでビーズと抗

体を結合させた。その後、得られた細胞破碎液に抗 HA 抗体結合ビーズを添加し、4°Cで終夜転倒混合を行った。蛋白質が結合したビーズを 10,000 rpm、1 分間、4°Cで遠心し、上清を除いた。TNE buffer を加えて 10,000 rpm、1 分間、4°Cで遠心する操作をさらに 4 回繰り返すことでビーズの洗浄を行った。洗浄後、上清を完全に取り除き、2×Sample buffer を添加して 100°C、10 分間加熱したサンプルをウエスタンブロット解析に用いた。

第 14 項 細胞分画実験

細胞を細胞質と可溶性および難溶性核画分に分画する実験は、遺伝子導入を行った細胞を回収し、プロトコールに従ってリソピュア™核・細胞質タンパク質エクストラクターキット (富士フィルム和光)を用いて行った。得られたサンプルは 4×Sample buffer を添加して 100°C、10 分間加熱したのちに、ウエスタンブロット解析に用いた。細胞質画分、可溶性核画分および難溶性核画分の各画分のコントロールとして、抗 GAPDH、抗 PARP-1 および抗 Histone H3 抗体を用いて正しく分画が行われているかを判断した。

第 15 項 p27 ELISA 実験

全長ゲノムクローンを遺伝子導入した際のウイルス量を測定するために、SIV p27 Antigen ELISA キット (ZeptoMetrix Corporation)を用いて、プロトコールに従って p27 ELISA を行った。450 nm の吸光度の測定はプレートリーダー (InfiniteM2000, TECAN)にて行った。

第 16 項 ウイルス粒子の単離

全長ゲノムクローンを遺伝子導入した 293T 細胞の上清を 0.45 μm のフィルターでろ過し、Viro-Ademeads (Ademtech)にてプロトコールに従ってウイルス粒子を単離した。

第 17 項 ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼ活性の測定には、ホタルルシフェラーゼ活性を測定するために Luciferase Assay System (Promega) を、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定するために Renilla Luciferase Assay System (Promega) を用いて、プロトコールに従って行った。

遺伝子導入を行った細胞を剥離し、 $1 \times \text{PBS}$ で洗浄した。得られた細胞ペレットに Luciferase Cell Culture Lysis Reagent (ホタルルシフェラーゼ用) または Renilla Luciferase Assay Lysis Buffer (ウミシイタケルシフェラーゼ用) を $250 \mu\text{l}$ 加えて懸濁し、室温で 15 分間穏やかに振とうした。振とう後、 $15,000\text{rpm}$ 、3 分間遠心することによって得られた上清を測定用サンプルとし、サンプル $50 \mu\text{l}$ にそれぞれの基質である Luciferase Assay Substrate または Renilla Luciferase Assay Substrate $25 \mu\text{l}$ を添加してプレートリーダー (Infinite M2000, TECAN) にて測定を行った。

第 18 項 アミノ酸配列のアライメント

アミノ酸配列アライメントは、Los Alamos HIV Sequence database に登録されている HIV-2 グループに属する分離株の Vpr のアミノ酸配列を用いて、Molecular Evolutionary Genetic Analysis software (MEGA) 7¹⁰⁹⁾ にて行った。

第2節 第3章に関する実験

第1項 細胞培養

ヒト胎児由来腎臓上皮細胞である 293T 細胞は、前述の方法を用いて培養し、遺伝子導入実験に使用した。

ヒト子宮頸癌細胞である HeLa S3 細胞は、高グルコース含有 D-MEM 培地 (富士フィルム和光) に 56°C、30 分で非働化处理をしたウシ胎仔血清を 10 %、抗生物質としてストレプトマイシン (明治製菓ファルマ) を 89 µg/ml、抗真菌薬としてファンギゾン (ブリストル・マイヤーズ) を 0.89 µg/ml 添加して使用した。9 cm 培養シャーレで 37°C、CO₂ 5 % 条件下にてコンフルエントになるように培養した。0.25 % トリプシン (Gibco) に 0.537 mM の EDTA を添加した細胞剥離用溶液を用いて細胞を剥離し、3.5 cm 培養シャーレまたは 24 ウェル培養プレートに播種して実験に使用した。

第2項 プラスミド

TRAF6 発現ベクターである pME-FLAG-TRAF6、TAK1 発現ベクターである pME-FLAG-mTAK1⁸¹⁾、NEMO 発現ベクターである pcDNA3.1-HA-NEMO¹¹⁰⁾を用いた。pcDNA3.1-HA-TAK1 は、pcDNA3.1-HA-NEMO を基にして NEMO の配列部分を mTAK1 に置換することで作製した。すなわち、pcDNA3.1-HA-NEMO を *Xba* I で、pME-FLAG-mTAK1 を *Not* I で制限酵素処理し、T4 DNA ポリメラーゼを用いて末端平滑化を行った。さらに末端を平滑化した各 DNA 断片を *Eco* RI で制限酵素処理し、ライゲーションを行うことで TAK1 の塩基配列をもつ発現ベクターを得た。各操作は第1節第2項と同様に行った。その他に、myc タグをもつユビキチン発現ベクターである pcDNA3-6×myc-Ub (WT) およびその変異体である pcDNA3-6×myc-Ub (K63) と pcDNA3-6×myc-Ub (R63)を用いた。また HA タグ

をもつユビキチン発現ベクターの pcDNA-HA-Ub¹¹¹⁾、ルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターである 3κB-tk-luc および pRL-Luc⁵⁸⁾を用いた。

第3項 トランスフェクション

293T 細胞を 3.5 cm 培養シャーレ (住友ベークライト)に播種し、2 日後にリン酸カルシウム法を用いて常法に従ってトランスフェクションを行った。トランスフェクションから約 4 時間が経過したのちに、新鮮なメディウム 1 ml に置換した。遺伝子導入後、約 1~2 日間培養した後に 1×PBS で洗浄して細胞を回収し、実験に供試した。なお、遺伝子導入の際には、事前にトランスフェクション用培地に置換した。1×PBS およびトランスフェクション用培地については第 1 節第 3 項に示す。

第4項 化合物および試薬類

ケミカルプローブとして用いた各化合物は既報の方法で合成され^{89), 90), 91)}、Bis (2-nitrophenyl)disulfide は東京化成から購入した。化合物は DMSO (富士フィルム和光)に溶解して使用した。DTT (富士フィルム和光)は滅菌水に溶解して還元剤として用いた。MG132 (SIGMA-ALDRICH)は IL-1 誘導性 NF-κB 活性化シグナル阻害を評価するための試薬として用いた。細胞実験にて化合物を添加する際には、DMSO が溶液に対して 1% となるように使用した。

第5項 ウェスタンブロット解析

第 2 章と同様に行った。

第 6 項 1 次抗体および 2 次抗体

ウエスタンブロット解析の 1 次抗体としては、抗 FLAG M2 抗体 (SIGMA-ALDRICH)、抗 HA 抗体 (COVANCE)、抗 myc 抗体、抗 His 抗体 (以上 2 つは MBL)、抗 pIKK α 抗体、抗 pIkB α 抗体、抗 IkB α 抗体 (以上 3 つは Cell Signaling Technology)、抗 β -actin 抗体 (SIGMA-ALDRICH) を用いた。2 次抗体は、1 次抗体に応じて抗 mouse 抗体または抗 rabbit 抗体 (いずれも GE ヘルスケア) を用いた。

第 7 項 TRAF6 または TAK1 に対する免疫沈降実験

各発現ベクターを遺伝子導入した 293T 細胞を剥離し、1×PBS で洗浄して細胞を回収した。得られたペレットをアプロチニン 10 μ g/ml を添加した TNE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.8)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 % NP-40) で懸濁し、氷上にて 15 分間静置後、4°C で 30 分間転倒混合を行った後、12,000 rpm、5 分間、4°C で遠心することにより、細胞破碎液を得た。目的とする蛋白質に結合している余分な蛋白質を除くために、得られた細胞破碎液に終濃度 1 % となるように SDS を加えて 100°C で 10 分間加熱処理を行った。加熱処理した細胞破碎液は、SDS が終濃度 0.1 % となるように先述の TNE buffer にて希釈した。抗 FLAG 抗体による沈降実験の場合は、得られた細胞破碎液に抗 FLAG 抗体結合アガロースビーズ (ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel、SIGMA-ALDRICH) を添加し、4°C で終夜転倒混合を行った。抗 HA 抗体による沈降実験の場合は、Protein G sepharose beads (GE ヘルスケア) に抗 HA 抗体を 1 サンプルにつき 1 μ l 添加し、4°C で 1 時間転倒混合することでビーズと抗体を結合させた。その後、得られた細胞破碎液に抗 HA 抗体結合ビーズを添加し、4°C で終夜転倒混合を行った。蛋白質が結合したビーズを 10,000 rpm、1 分間、4°C で遠心し、上清を除いた。TNE buffer を加えて 10,000 rpm、1 分間、4°C で遠心する操作をさらに 4 回繰り返すことでビーズの洗浄を行った。洗浄後、上清を完全に取り除き、

2×Sample buffer を添加して 100°C、10 分間加熱したサンプルをウェスタンブロット解析に用いた。

第 8 項 ビオチン-アビジン結合を用いたプルダウン実験

遺伝子導入を行った 293T 細胞を培養シャーレから剥離し、1×PBS で洗浄した。得られたペレットをアプロチニン添加 TNE バッファーで懸濁し、氷上で 5 分間静置後、4°C で 30 分間転倒混合し、12,000 rpm、5 分間、4°C で遠心後に得られた上清を蛋白質溶液とした。蛋白質溶液に Biotin methyl ester または Biotin-SN-1 を終濃度 10 μM となるように添加し、4°C で 1 時間、転倒混合した。続いて Streptavidin-Agarose (Merck) を 10 μl 添加して、4°C で 1 時間、転倒混合した。その後、10,000rpm、1 分間、4°C で遠心を行って、ビーズおよび結合した蛋白質を沈降させて上清を除き、Wash バッファーを加えて 10,000rpm、1 分間、4°C で遠心を行う操作を 4 回繰り返すことでビーズの洗浄を行った。得られたサンプルに 2×Sample buffer を 20 μl 加えて 100°C、10 分間加熱処理を行い、これをウェスタンブロット解析のサンプルとして用いた。

第 9 項 試験管内ユビキチン化実験

TRAF6 発現ベクターを用いて遺伝子導入を行った 293T 細胞を培養シャーレから剥離し、1×PBS で洗浄した。免疫沈降実験の項目に示す方法で TRAF6 蛋白質を得た。得られた TRAF6 蛋白質結合ビーズに、UBE1 (E1)、Ubc13/Uev1a (E2)、Ub (いずれも R&D Systems) の各蛋白質および 10×ATP buffer を添加し、SN-2 を終濃度 10 μM となるように添加して 30°C で 1.5 時間振とうした。なお、細胞内では SN-2 は還元されて SN-1 になると考えられるので、事前に還元剤である DTT 30μM と混合してから用いた。各サンプルに 4×Sample buffer を添加して反応を停止させた。サンプルを 100°C、10 分間加熱し、ウェスタンブロット解析のサンプルとした。実験の概要および試薬組成を Fig. 5-14 に示す。

UBE1 (0.7 μ M)	3.6 μ l
Ubc13/Uev1a (4 μ M)	2.5 μ l
Ub (5 mg/ml)	4.3 μ l
10 \times ATP buffer ^{*1}	2.5 μ l
50 \times Complete protease inhibitor ^{*2}	0.5 μ l
Total	25 μ l



免疫沈降で得た M2 アガロース-TRAF6 蛋白質と
上記反応液を混合



30°C、1.5h インキュベート



Sample buffer を加えて反応を止める

^{*1}10 \times ATP buffer

1M Tris-HCl (pH 7.5)	100 μ l
1M MgCl ₂	10 μ l
200 mM ATP	20 μ l
500 mM Phosphocreatine	40 μ l
Creatine Kinase (3500 U/ml)	2 μ l
滅菌水	28 μ l
total	200 μ l

^{*2}50 \times Complete protease inhibitor

Complete protease inhibitor cocktail (Roche)	1 個
滅菌水	1 μ l

Fig. 5-14 試験管内ユビキチン化実験のプロトコール
および試薬組成

第 10 項 タイムコース実験

HaLa S3 細胞を 3.5 cm 培養シャーレに播種し、1 日間培養した。終濃度 10 μ M となるように SN-2 を添加して、37°C で 1 時間インキュベートした。1 時間後に 0.2% BSA 溶液で調製した IL-1 (PEPROTECH) を 1 μ g/ml となるように添加することでシグナルを誘導し、0, 5, 15, 30, 60 分後に細胞を 2×Sample buffer と 1×PBS との 1:1 混合液を加えて回収した。各サンプルを 100°C、1 時間加熱し、ウエスタンブロット解析のサンプルとした。

第 11 項 TRAF6 と Ubc13 との相互作用に関する免疫沈降実験

TRAF6 発現ベクターを用いて遺伝子導入を行った 293T 細胞を培養シャーレから剥離し、1×PBS で洗浄した。免疫沈降実験の項目に示す方法で TRAF6 蛋白質を得た。得られた TRAF6 溶液に、試験管内ユビキチン化実験の項で示したように還元剤で処理した SN-2 を終濃度 10 μ M となるように添加し、4°C で 1 時間転倒混合した。続いて Ubc13/Uev1a (R&D System Science) を終濃度 0.25 μ M となるように添加して、4°C で 1 時間転倒混合した。その後、抗 His タグ抗体を結合させた Protein G Sepharose beads (SIGMA-ALDRICH) を 1 サンプルにつき 20 μ l で添加し、4°C で 30 分間転倒混合した。転倒混合の後、10,000rpm、1 分間、4°C で遠心を行って、ビーズおよび結合した蛋白質を沈降させて上清を除き、TNE buffer を加えて 10,000rpm、1 分間、4°C で遠心を行う操作を 4 回繰り返すことでビーズの洗浄を行った。得られたサンプルに 2×Sample buffer を 15 μ l 加えて 100°C、10 分間加熱処理を行い、これをウエスタンブロット解析のサンプルとして用いた。

第 12 項 ルシフェラーゼアッセイ

第 1 節第 17 項と同様に行った。活性値の算出は、ホタルルシフェラーゼ活性値をウミシイタケルシフェラーゼ活性値で割ることによって遺伝子導入効率を補正した。

第 13 項 細胞毒性試験

HaLa S3 細胞を 24 ウェルプレートに播種して 2 日間培養した後、各化合物を終濃度 10 μM となるように添加して 37°C で 1 時間インキュベートした。なお、化合物に対して 3 等量となるように DTT (終濃度 30 μM) を添加した。静置培養後、IL-1 を終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加して 37°C で 3 時間培養した。その後、MTT 溶液 (1.1 mg/ml) を 100 μl 添加して 37°C で 4 または 8 時間培養し、ホルマザンによって呈色した細胞を回収して、プレートリーダー (Infinite M2000, TECAN) を用いて波長 550 nm にて測定を行った。

第 14 項 ドッキングシュミレーション

TRAF6 と SN-1 との結合については、統合計算化学システム (Molecular Operating Environment; MOE) を用いたドッキングシュミレーションを行った。TRAF6 の結晶構造については蛋白質データベースに登録されているデータ (PDB ID: 3HCS、3HCT、3HCU) を用いた。

参考文献

- 1) Kambe T., Tsuji T., Hashimoto A. and Itsumura N. The Physiological, and molecular rules of zinc transporter in zinc homeostasis and metabolism., *Physiol. Rev.*, 2015, 95, 749-784.
- 2) Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome., *J. Proteome Res.*, 2006, 5, 196-201.
- 3) Maret W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life., *Adv. Nutr.*, 2013, 4, 82-91.
- 4) Andriini C. and Bertini I. A bioinformatics view of zinc enzymes., *J. Inorg. Biochem.*, 2012, 111, 150-156.
- 5) Vallee B. L. and Auld D.S. Zinc coordination, function and structure of zinc enzyme and other proteins., *Biochemistry*, 1990, 29, 5647-5659.
- 6) Vallee B. L. and Falchuk K.H. The biochemical basis of zinc physiology., *Physiol. Rev.*, 1993, 73, 79-118.
- 7) Scott D.A. Crystalline insulin., *Biochem. J.*, 1934, 28, 1592-1602.
- 8) Blundell T. L., Cutfield J. F., Cutfield S. M., Dodson E. J., Dodson G. G., Hodgkin D. C. and Mercola D. A. Three-dimensional atomic structure of insulin and its relationship to activity., *Diabetes*, 1972, 21, 492-505.
- 9) Emdin S. O., Dodson G. G., Cutfield J. F. and Cutfield S. M. Role of zinc in insulin biosynthesis. some possible zinc-insulin interaction in the pancreatic B-cell., *Diabetologia*, 1980, 19, 174-182.
- 10) Hutton J.C. The insulin secretory granule., *Diabetologia*, 1989, 32, 271-281.
- 11) Criszak E. and Smith G. D. Crystallographic evidence for dual coordination around zinc in the T3R3 human insulin hexamer., *Biochemistry*, 1994, 33, 1512-1517.
- 12) Miller J., McLachlan A.D. and Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes., *EMBO J.*, 1985, 4, 1609-1614.
- 13) Ganss B. and Jheon A. Zinc finger transcription factors in skeletal development., *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2004, 15, 282-297.
- 14) Laity J. H., Lee M. and Wright P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, 11, 39-46.
- 15) Browns R. S. Zinc finger proteins; getting a grip on RNA., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005, 15, 94-98.
- 16) Hall T. M. Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005, 15, 367-373.
- 17) Andriini C., Bertini I. and Cavallaro G. Minimal functional sites allow a classification of zinc sites in proteins., *PLoS One*, 2011, 6, e26325.
- 18) Berg J. M. and Shi Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the role of zinc., *Science*, 1996, 271, 1081-1085.

- 19) Gamsjaeger R., Liew C. K., Loughlin F. E., Crossley M. and Mackay J. P. Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs, *Trends Biochem. Sci.*, 2007, 32, 63-70.
- 20) Krishna S. S., Majumdar I. and Grishin N. V. Structural classification of zinc fingers: survey and summary., *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, 532-550.
- 21) Keilin D. and Mann T. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme., *Biochem. J.*, 1940, 34, 1163-1176.
- 22) 松井利郎. レニン-アンジオテンシン系と血圧調節. *化学と生物*, 2015, 53, 228-235.
- 23) Fyhrquist F. and Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited., *J. Int. Med.*, 2008, 264, 224-236.
- 24) 高血圧治療ガイドライン；日本高血圧学会 2014
- 25) Ondetti M. A., Rubin B. and Cushman D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme; New class of orally active antihypertensive agents., *Science*, 1977, 196, 441-444.
- 26) Natesh R., Schwager S. L. U., Evans H. R., Sturrock E. D. and Acharya K. R. Structural details on the binding of antihypertensive drugs Captopril and Enalaprilat to human testicular Angiotensin I-converting enzyme., *Biochemistry*, 2004, 43, 8718-8724.
- 27) Natesh R., Schwager S. L. U., Sturrock E. D. and Acharya K. R. Crystal structure of the human Angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex., *Nature*, 2003, 421, 551-554.
- 28) Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. Zinc through the three domains of life., *J. Proteome Res.*, 2006, 5, 3173-3178.
- 29) Coleman J. E. Zinc proteins: enzyme, storage proteins, transcription factors, and replication proteins., *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, 61, 897-946.
- 30) South T. I., Blake P. R., Sowder III R. C. Arthur I. O., Henderson L. E. and Summers M. F. The nucleocapsid protein isolated from HIV-1 particles bind zinc and forms retroviral-type zinc fingers., *Biochemistry*, 1990, 29, 7786-7789.
- 31) Omichinski J. G., Clore G. M., Sakaguchi K., Appella E. and Gronenborn M. Structural characterization of a 39-residue synthetic peptide containing the two zinc binding domains from the HIV-1 p7 nucleocapsid protein by CD and NMR spectroscopy., *FEBS Lett.*, 1991, 292, 25-30.
- 32) Morellet N., Julian N., De Rocquigny H., Maigret B., Darlix J. I. and Roques B. P. Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by ¹H NMR., *EMBO J.*, 1992, 11, 3059-3065.
- 33) De Guzman R. N., Wu Z. R., Stalling C. C., Pappalardo L., Borer P. N. and Summers M. F. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element., *Science*, 1998, 279, 384-388.
- 34) Nyamweya S., Hegedus A., Jaye A., Rowland-Jones S., Flanagan K. L. and Macallan D. C. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis., *Rev. Med. Virol.*, 2013, 23, 221-240.

- 35) 野間口雅子, 足立昭夫 アクセサリー蛋白質と抗 HIV 細胞因子., *ウイルス*, 2009, 59, 67-74.
- 36) Fujita M., Nomaguchi M., Adachi A. and Otsuka M. SAMHD1-dependent and -independent function of HIV-2/SIV Vpx protein., *Front. Microb.*, 2012, 3, 297.
- 37) Sauter D. and Kirchhoff F. Multilayered and versatile inhibition of cellular antiviral factors by HIV and SIV accessory proteins., *Cytokine and Growth Factor Rev.*, 2018, 40, 3-12.
- 38) Khamsri B., Murao F., Yoshida A., Sakurai A., Uchiyama., Shirai H., Matsuo Y., Fujita M. and Adachi A. Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpr/Vpx proteins., *Microb. Infect.*, 2006, 8, 10-15.
- 39) Wecker. K., Morellet N., Bouaziz S. and Roques B. P. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr in H₂O/trifluoroethanol. Comparison with the Vpr N-terminal (1-51) and C-terminal (52-96) domain., *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269, 3779-3788.
- 40) Wu. Y., Zhou X., Barnes C. O., DeLucia M., Cohen A. E., Gronenborn A. M., Ahn J. and Calero G. The DDB1-DCAF1-Vpr-UNG2 crystal structure reveals how HIV-1 Vpr steers human UNG2 toward destruction., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2016, 10, 933-940.
- 41) Schwefel D., Groom H. C. T., Boucherit V. C., Christodoulou E., Walker P. A. Stoye J. P., Bishop K. N. and Taylor I. A. Structural basis of lentiviral subversion of a cellular protein degradation pathway., *Nature*, 2014, 505, 234-238.
- 42) Yamamoto M., Koga R., Fujino H., Shimagaki K., Ciftci H. I., Kamo M., Tateishi H., Otsuka M. and Fujita M. Zinc-binding site of human immunodeficiency virus 2 Vpx prevents instability and dysfunction of the protein., *J. Gen. Virol.*, 2017, 98, 275-283.
- 43) Kewalramani V. N., Park C. S., Gallombardo P. A. and Emerman M. Protein Stability influences human immunodeficiency virus type 2 Vpr virion incorporation and cell cycle effect., *Virology*, 1996, 218, 326-334.
- 44) Hasegawa A., Tsujimoto H., Maki K., Ishikawa K., Miura T., Fukasawa M., Miki K. and Hayami M. Genomic divergence of HIV-2 from Ghana., *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 1989, 5, 593-604.
- 45) Fujita M., Otsuka M., Miyoshi M., Khamsri B., Nomaguchi M. and Adichi A. Vpx is crucial for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophage., *J. Virol.*, 2008, 8, 7752-7756.
- 46) Clavel F., Guyader M., Guétard D., Sallé M. Montagnier L. and Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2., *Nature*, 1986, 324, 691-695.
- 47) Ibe S., Yokomaku Y., Shiino T., Tanaka R., Hattori J. Fujisaki S., Iwatani Y., Mamiya N., Utsumi M. Kato S. et. al. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2., *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2010, 54, 241-247.
- 48) Kestler H., Kodama T., Ringler D., Marthas M., Pedersen N., Lackner A., Regier D., Sehgal P., Daniel M. and King N. Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus., *Science*, 1990, 248, 1109-1112.
- 49) Regier D. A. and Desrosiers R. C. The complete nucleotide sequence of a pathogenic molecular clone of simian immunodeficiency virus., *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1990, 6, 1221-1231.

- 50) Adachi A., Gendelman H. E., Koenig S., Folks T., Wiley R., Rabson A. and Martin M. A. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone., *J. Virol.*, 1986, 59, 284-291.
- 51) Hirsch V. M., Dapolito G., Johnson P. R., Elkins W. R., London W. T., Montali R. J., Goldstein S. and Brown C. Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication., *J. Virol.*, 1995, 69, 955-967.
- 52) Bibollet-Ruche F., Bailes E., Gao F., Pourrut X., Barlow, K. L., Clewley J. P., Mwenda J. M., Langat D. K., Chege G. K., McClure H. M., Mpoudi-Ngole E., Delaporte E., Peeters M., Shaw G. M., Sharp P. M. and Hahn B. H. New simian immunodeficiency virus infecting De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*): evidence for a *Cercopithecus* monkey virus clade., *J Virol.*, 2004, 78, 7748-7762.
- 53) Hirsch V. M., Campbell B. J., Bailes E., Goeken R., Brown C., Elkins W. R., Axthelm M., Murphey-Corb M. and Sharp P. M. characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIV) from L' Hoest monkeys (*Cercopithecus l'hoesti*): implication for the origins of SIVmnd and other primate lentiviruses., *J. Virol.*, 1999, 73, 1036-1045.
- 54) Miyake A., Fujita M., Fujino H., Koga R., Kawamura S., Otsuka M., Ode H., Iwatani Y., Sakai Y., Doi N., Nomaguchi M., Adachi A. and Miyazaki Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation., *J. Gen. Virol.*, 2014, 95, 179-189.
- 55) Accola M. A., Bukovsky A. A., Jones M. S. and Göttinger H. G. A conserved dileucine-containing motif in p6^{gag} governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIVmac and SIVagm. *J. Virol.*, 1999, 73, 9992-9999.
- 56) Kawamura M., Sakai H and Adachi A. Human immunodeficiency virus Vpx is required for the early phase of replication in peripheral blood mononuclear cells., *Microb. Infect.*, 1994, 38, 871-878.
- 57) Krebs F. C., Hogan T. H., Quiterio S., Gartner S. and Wigdahl B. Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis., *HIV Sequence Compendium 2001*, pp29
- 58) Kanemaru Y., Momiki Y., Matsuura S., Horikawa T., Gohda J., Inoue J., Okamoto Y., Fujita M. and Otsuka M., An artificial copper complex incorporating a cell-penetrating peptide inhibitors nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation., *Chem. Pharm. Bull.*, 2011, 59, 1555-1558.
- 59) Ueno F., Shiota H., Miyaura M., Yoshida A., Sakurai A., Tatsuki J., Koyama A. H., Adachi A. and Fujita M. Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells., *Microb. Infect.*, 2003, 5, 387-395.
- 60) Laguette N., Brégnard C., Hue P., Basbous J., Yatim A., Larroque M., Kirchhoff F., Constantinou A., Sobhian B. and Benkirane M. Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing., *Cell*, 2014, 156, 134-145.
- 61) Romani B., Baygloo N. S., Aghasadeghi M. R. and Allahbakhshi E. HIV-1 Vpr protein enhances proteasomal degradation of MCM10 DNA replication factor through the Cul4-CCB1[VprBP] E3 ubiquitin ligase to induce G2/M cell cycle arrest., *J. Biol. Chem.*, 2015, 290, 17380-17389.

- 62) Romani B., Baygloo N. S., Hamidi-Fard M., Aghasadeghi M. R. and Allahbakhshi E. HIV-1 Vpr protein induces proteasomal degradation of Chromatin-associated class I HDACs to overcome latent infection of macrophages., *J. Biol. Chem.*, 2016, 291, 2696-2711.
- 63) Hrecka K., Hao C., Shun M., Kaur S., Swanson S. K., Florens L., Washburn M. P. And Skowronski J. HIV-1 and HIV-2 exhibit divergent interactions with HLTf and UNG2 DNA repair proteins., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, 113, E3921-3930.
- 64) Lv L., Xu Y., Tsao L., Nakagawa T., Guo H., Su L. and Xiong Y. Vpr targets TET2 for degradation by CRL4^{VprBP} E3 kinase to sustain IL-6 expression and enhance HIV-1 replication., *Mol. Cell*, 2018, 70, 961-970.
- 65) Kirkpatrick D. S., Hathaway N. A., Hanna J., Elsasser S., Rush J., Finley D., King R. W. and Gygi S. P. Quantitative analysis of *in vitro* ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology., *Nat. Cell Biol.*, 2006, 8, 700-710.
- 66) Lu Y., Wang W. and Kirschner M. W. Specificity of the anaphase-promoting complex: A single-molecule study., *Science*, 2015, 348, 1248737.
- 67) Lu Y., Lee B. H., King R. W., Finley D. and Kirschner M. W. Substrate degradation by the proteasome: A single-molecule kinetic analysis., *Science*, 2015, 348, 1250834.
- 68) 佐伯泰. プロテアソームの作動機構と細胞内動態. *生化学*, 2015, 87, 705-722.
- 69) Wang H., Guo H., Su J., Rui Y., Zhang W., Gao W., Zhang W., Li Z., Jiu G., Markham R. B. Wei W. and Yu X-F. Inhibition of Vpx-Mediated SAMHD1 and Vpr-mediated host helicase transcription factor degradation by selective disruption of viral CRL4 (DCAF1) E3 ubiquitin ligase assembly. *J. Virol.*, 2017, 91, e00225-17.
- 70) Zhao J. Z., Wang L., Mukherjee S. and Narayan. Biochemical Mechanism of HIV-1 Vpr function. Oligomerization mediated by the N-terminal domain., *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 32131-32137.
- 71) Ciftci H. I., Fujino H., Koga R., Yamamoto M., Kawamura S., Tateishi H., Iwatani Y., Otsuka M. and Fujita M. Mutational analysis of HIV-2 Vpx shows that proline residue 109 in the poly-proline motif regulates degradation of SAMHD1., *FEBS Lett.*, 2015, 589, 1505-1514.
- 72) Fletcher III, T. M., Brichacek N.S., Sharova N., Newman M. A., Stivahtis G., Sharp P. M., Emerman M., Hahn B. H. And Stevenson M. Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr proteins are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV_{SM}., *EMBO J.*, 1996, 15, 6155-6165.
- 73) Lim E., Fregoso O. I., McCoy C. O., Matsen F. A., Malik H. S. And Emerman M. The ability of primate lentiviruses to degrade the monocyte restriction factor SAMHD1 preceded the birth of the viral accessory protein Vpx., *Cell Host Microbe*., 2012, 11, 194-204.
- 74) Skaug B., Jiang X. and Chen Z. J. The role of ubiquitin in NF-κB regulatory pathways., *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, 78, 769-796.
- 75) Walsh MC., Lee J. and Choi Y. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system., *Immunol. Rev.*, 2015, 266, 72-92.

- 76) Inoue J., Gohda J. and Akiyama T. Characteristics and biological functions of TRAF6., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, 597, 72-79.
- 77) Lamothe B., Besse A., Campos A. D., Webster W. K., Wu H. and Darnay B. G. Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I κ B kinase activation., *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 4102-4112.
- 78) Swatek K. N. And Komander D. Ubiquitin modifications., *Cell Res.*, 2016, 26, 399-422.
- 79) Deng L., Wang C., Spencer E., Yang L., Braun A., You J., Slaughter C., Pickart C. and Chen Z. J. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain., *Cell*, 2000, 103, 351-361.
- 80) Sun L., Deng L., Ea C. K., Xia Z. P. And Chen Z. J. The TRAF6 ubiquitin and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocyte., *Mol. Cell*, 2004, 14, 289-301.
- 81) Gohda J., Irisawa M., Tanaka Y., Sato., Ohtani K., Fujisawa J. and Inoue J. HTLV-1 Tax-induced NF κ B activation is independent of Lys-63-linked-type polyubiquitination., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 357, 225-230.
- 82) Fan Y., Yu Y., Shi Y., Sun W., Xie M., Ge N., Mao R., Chang A., Xu G., Schneider M. D., Zhang H., Fu S., Qin J. and Yang J. Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine158 is required for tumor necrosis factor α and interleukin- β induced IKK/NF- κ B and JNK/AP-1 activation., *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 5347-5360.
- 83) Yamasaki K., Gohda J., Kanayama A., Miyamoto Y., Sakurai H., Yamamoto M., Akira S., Hayashi H., Su B. and Inoue J. Two mechanistically and temporally distinct NF- κ B activation pathways in IL-1 signaling., *Sci. Signal.*, 2009, 2, ra66.
- 84) Sebban-Benin H., Pescatore A., Fusco F., Pascuale V., Gautheron J., Yamaoka., Moncla A., Ursini M. V. and Courtois G. *Hum. Mol. Genet.*, 2007, 16, 2805-2815.
- 85) Ishida T. Mizushima S., Azuma S., Kobayashi N., Tojo T., Suzuki K., Aizawa S., Watanabe T., Misialos G., Kieff E., Yamamoto T. and Inoue J. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 28745-28748.
- 86) Lamothe B., Campos A. D., Webster W. K., Gopinathan A., Hur L. and Darnay G. The ring domain and first zinc finger of TRAF6 coordinate signaling by interleukin-1, Lipopolysaccharide and RANKL., *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 24871-24880.
- 87) Yin Q., Lin S. C., Lamothe B., Lu M., Lo Y. C., Hura G., Zhang L., Rich R. L., Campos A. D., Myszkowski D. G., Lenardo M. J., Darnay B. G. and Wu H. E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009, 16, 658-666.
- 88) Fujita M., Otsuka M. and Sugiura Y. Metal-chelating inhibitors of a zinc finger protein HIV-EP1. Remarkable potentiation of inhibitory activity by introduction of SH groups., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 503-507.
- 89) Maekawa T., Sakura H., Sudo T. and Ishii S. Putative metal finger structure of the human immunodeficiency virus type 1 enhancer binding protein HIV-EP1., *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 14591-14593.

- 90) Otsuka M., Fujita M., Sugiura Y., Yamamoto T. and Inoue J. Synthetic inhibitors of regulatory proteins involved in the signaling pathway of the replication of human immunodeficiency virus 1., *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, 5, 205-215.
- 91) Hamasaki A., Naka H., Tamanoi F., Umezawa K. and Otsuka M. A novel metal-chelating inhibitor of protein Farnesyltransferase., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 1523-1526.
- 92) Tanaka A., Radwan M. O., Hamasaki A., Ejima T., Obata E., Koga R., Tateishi., Okamoto Y., Fujita M., Nakao M., Umezawa K., Tamanoi F. and Otsuka M. A Novel inhibitor of farnesyltransferase with a zinc site recognition moiety and a farnesyl group., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, 27, 3862-3866.
- 93) Ejima T., Hirota M., Muzukami T., Otsuka M. and Fujita M. An anti-HIV-1 compound that increases steady-state expression of apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G., *Int. J. Mol. Med.*, 2011, 28, 613-616.
- 94) Radwan M. O., Sonoda S., Ejima T., Tanaka A., Koga R., Yoshinari O., Fujita M. and Otsuka M. Zinc-mediated binding of a low-molecular-weight stabilizer of the host anti-viral factor apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G., *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, 24, 4398-4405.
- 95) Wertz I. E. and Dixit V. M. Signaling to NF- κ B: regulation by ubiquitination., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010, 3, a003350.
- 96) Petroski MD., Zhou X., Dong G. Q., Daniel-Issakani S., Payan D. G. and Huang J. Substrate modification with lysine 63-linked ubiquitin chains through the UBC13-UEV1A ubiquitin-conjugating enzyme., *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 29936-29945.
- 97) Middleton A. J., Budhidarmo R., Das A., Zhu J., Foglizzo M., Mace P. D., Day C. L. The activity of TRAF RING homo- and heterodimers is regulated by zinc finger 1., *Nat. Commun.*, 2017, 8, 1788.
- 98) Fu T. M., Shen C., Li Q., Zhang P. and Wu H. Mechanism of ubiquitin transfer promoted by TRAF6., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2018, 115, 1783-1788.
- 99) Hu L., Xu J., Xie X., Zhou Y., Tao P., Li H., Han X., Wang C., Liu J., Xu P., Neculai D. and Xia Z. Oligomerization-primed coiled-coil domain interaction with Ubc13 confers processivity to TRAF6 ubiquitin ligase activity., *Nat. Commun.*, 2017, 8, 814.
- 100) Qi Y., Pradipta AR., Li M., Zhao X., Lu L., Fu X., Wei J., Hsung R. P., Tanaka K. and Zhou L. Cinchonine induces apoptosis of HeLa and A549 cells through targeting TRAF6., *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2017, 36, 35-
- 101) Brenke JK., Popowicz G. M., Schorpp K., Rothenaigner I., Roesner M., Meininger I., Kalinski C., Ringelstetter L., R'kyek O., Jürjens G., Vincendeau M., Plettenburg O., Sattler M., Krappmann D. and Hadian K. Targeting TRAF6 E3 ligase activity with a small-molecule inhibitor combats autoimmunity., *J. Biol. Chem.*, 2018, 293, 13191-13203.
- 102) Hänel K., Möckel L., Brummel M., Peiris K., Hartmann R., Dingley A., Willbold D. and Loidl-Stahlhofen A. Expression and purification of soluble HIV-2 viral protein R (Vpr) using a sandwich-fusion protein strategy., *Protein Expr. Purif.*, 2014, 95, 156-161.

- 103) Eijkelenboom A. P. A. M., van den Ent F. M. I., Vos A., Doreleijers J. F., Hård K., Tullius T. D., Plasterk R. H. A., Kaptein R. and Boelens R. The solution structure of the amino-terminal HHCC domain of HIV-2 integrase: a three-helix bundle stabilized by zinc., *Curr. Biol*, 1997, 7, 739-746.
- 104) Chen Q., Chen T., Li W., Zhang W., Li Y., Huang Y., Shen Y. and Yu C. Mycoepoxydiene inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through the of TRAF6 polyubiquitination., *PLoS One*, 2012, 7, e44890.
- 105) Chiou W. F., Huang Y. L. and Liu Y. W. (+)-Vitisin A inhibits osteoclast differentiation by preventing TRAF6 ubiquitination and TRAF6-TAK1 formation to suppress NFATc1 activation., *PLoS One*, 2014, 9, e89159.
- 106) Inoue J., Gohda J., Akiyama T. and Semba K. NF-kappaB activation in development and progression of cancer., *Cancer Sci.*, 2007, 98, 268-274.
- 107) Sun H., Li X. B., Meng Y., Fan L., Li M. and Jing F. TRAF6 upregulates expression of HIF-1 α and promotes tumor angiogenesis., *Cancer Res.*, 2013, 73, 4950-4959.
- 108) Gudey SK., Sunder R., Mu Y., Wallenius A., Zang G., Bergh A., Heldin C. Landström M. TRAF6 stimulates the tumor-promoting effects of TGF β type I receptor through polyubiquitination and activation of presenilin 1., *Sci. Signal.*, 2014, 7, ra2.
- 109) Kumar S., Stecher G. and Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets., *Mol. Biol. Evol.*, 2016, 33, 1870-1874.
- 110) Shibata Y., Oyama M., Kozaka-Hata H., Han X., Tanaka Y., Gohda J. and Inoue J., p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO., *Nat. Commun.*, 2012, 3, 1061.
- 111) Fukuchi M., Imamura T., Chiba T., Ebisawa T., Kawabata M., Tanaka K. and Miyazono K., *Mol. Biol. Cell.*, 2001, 12, 1431-1443.

謝 辞

本論文を終えるにあたり、本研究に対する懇切なるご指導およびご鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所分子発癌分野 井上純一郎教授に厚くお礼申し上げます。討論を通して科学的な考え方や研究成果の発表・伝達の仕方など数多くのことを学ばせていただきました。

本論文作成に際し、有益なご助言ならびにご校閲を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 蛋白質代謝学教室 村田茂穂教授、生理化学教室 北川大樹教授、細胞情報学教室 名黒功准教授、衛生化学教室 河野望准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、実験手法ならびに HIV に関する知識などのご指導・ご鞭撻を頂き、また学会発表等の機会を与えて頂きました熊本大学大学院生命科学研究部 サイエンスファーム生体機能化学共同研究講座 藤田美歌子特任教授に深く感謝いたします。

本研究に関して、創薬化学の視点から考え方を含めたご指導・ご鞭撻ならびに学位取得に関して多大なるご配慮を頂きました熊本大学大学院生命科学研究部 サイエンスファーム生体機能化学共同研究講座 大塚雅巳客員教授に深く感謝いたします。

本研究に際して実験へのご協力・ご助言を頂きました熊本大学大学院生命科学研究部 サイエンスファーム生体機能化学共同研究講座 立石大特任助教に深く感謝いたします。

本研究に際してセミナー等での討論やご助言を頂きました熊本大学大学院生命科学研究部 機器分析学分野 岡本良成助教に深く感謝いたします。

熊本地震の後に、実験遂行のための便宜を図って頂くとともに、TRAF6 に関する研究に対して討議への参加ならびに有益なご助言を頂きました東京大学医科学研究所分子発癌分野 柴田佑里博士 (現 The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Postdoctoral Fellow)、

田口祐助教および山本瑞生助教に深く感謝いたします。

本研究に使用した多くのケミカルプローブの有機合成、ならびに MOE による化合物と蛋白質のドッキングシュミレーションを行って頂きましたサイエンスファーム株式会社 Mohamed Osman Radwan 博士に深く感謝いたします。

私が本研究を進めるにあたって、多くのご協力を頂きましたサイエンスファーム株式会社 Halil Ibrahim Ciftci 博士、ならびに熊本大学大学院生命科学研究部 サイエンスファーム生体機能化学共同研究講座の学生諸氏に心より感謝いたします。

最後に、論文博士として学位取得を目指すにあたり、理解を示し、暖かく見守ってくれたアドバンテック株式会社の関係各位・友人・家族に心より感謝します。

2020 年 古賀涼子