

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 古賀涼子

### 緒論

亜鉛は生体内に 2 番目に多い金属元素であり、亜鉛蛋白質や亜鉛イオンとして存在している。亜鉛は、亜鉛蛋白質の構造保持と機能制御に密接に関与している。本研究では 2 つの蛋白質を対象にして、蛋白質の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手法を、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手法を用いて研究を行った。

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

**背景と目的** ヒト免疫不全ウイルス (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 がもつ蛋白質のうち、アクセサリ蛋白質 (Vif・Vpr・Nef・Vpu・Vpx) は HIV の複製・存続・病原性発現に関わるさまざまな機能をもつ。HIV-2 は Vpx と Vpr をもつが、HIV-1 は Vpr しかもたない。HIV-2 Vpr は Vpx とホモロジーが高く、3 つの $\alpha$ ヘリックスをもつと予測される。近年、Vpx は亜鉛をもつことが明らかとなった。その亜鉛結合モチーフは  $H^{39}H^{82}C^{87}C^{89}$  で構成され、それらアミノ酸残基への変異導入により Vpx 発現量が減少した。HHCC モチーフをもたない Vpr は Vpx とホモロジーが高いにも関わらず、その発現量は Vpx 発現量よりも低いことが知られていたが、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、HIV-2 Vpr の低発現量は亜鉛と関連があるという仮説を立て、実験を行った。

**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 株の Vpr と Vpx 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に対応する Vpr のアミノ酸は  $H^{38}H^{76}C^{81}R^{83}$  であった。そこで GH-1 株の発現ベクターを基にして、R83C (HHCR を HHCC モチーフに変換した) 変異体発現ベクターを構築した。各発現ベクターを 293T 細胞へ導入し、得られた細胞破碎液のウエスタンブロット解析から R83C 変異体における Vpr 蛋白質発現量上昇を見出した。亜鉛結合モチーフの重要性を確認するために、R83C に加えてモチーフ様部位を構成する他のアミノ酸に変異を導入して発現量を検討した。R83C 変異を有するにも関わらず、他のアミノ酸への変異導入により Vpr 発現量が減少した。よって亜鉛結合モチーフ HHCC

が存在する場合に Vpr 蛋白質の発現が高くなることが示された。HIV-2 の 41 分離株のアミノ酸アライメントから、亜鉛結合モチーフ様部位のアミノ酸配列パターンは約 90%が HHCH または HHCR であった。HHCH パターンである 2 つの HIV-2 分離株と、HIV-2 と分子系統学的に同グループに属するサル免疫不全ウイルス (SIV) である SIVmac 分離株の Vpr の発現ベクターおよび HHCC を導入した変異体を構築し、発現量を調べた。その結果、亜鉛結合モチーフ HHCC の導入によって HIV-2 グループ分離株の Vpr 発現量上昇が確認された。

**発現量上昇のメカニズム** Vpr 発現量上昇のメカニズム検討のために転写・翻訳段階と蛋白質安定性を調べた。

野生型と R83C 変異体発現ベクターから産生される mRNA 量に大きな差は見られなかった。試験管内転写・翻訳システムを用いた実験から、翻訳効率上昇が考えられた。また、シクロヘキシミドを用いて各発現ベクターから産生された Vpr 蛋白質の分解の経時変化から、R83C 変異体は安定化していることが示された。次に、野生型および R83C 変異体の MG132 処理下での発現量が上昇したことから、いずれもプロテアソーム分解されることが分かった。Vpr に存在する 2 つのリジン残基を変異させた変異体 (2KR) と野生型を用いて発現量・ユビキチン化・プロテアソーム分解について調べると、野生型と 2KR 変異体は同程度の発現量であり、いずれもユビキチン化・プロテアソーム分解されることが明らかになった。従って Vpr はリジン残基以外の残基でユビキチン化が生じ、プロテアソーム分解されることが示唆された。

**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** vpr 遺伝子の 5' 端側に HA タグ配列を導入した全長ゲノムクローン (HIV-2 GH-1 株に基づいたクローン) を構築し、ウエスタンブロット解析を行って R83C 変異導入による HIV-2 Vpr 発現量上昇を確認した。また、発現量上昇に伴って R83C 変異体では野生型と比較して多くの Vpr 蛋白質がウイルス粒子中に取り込まれていた。レポーターアッセイを用いて転写活性について検討すると、全長ゲノムクローンから産生される量と同程度の Vpr 量の場合に NF- $\kappa$ B による転写活性が抑制されていた。続いて産生・放出されるウイルス蛋白質量を p27 ELISA にて測定したところ、R83C 変異体または Vpr 欠損体と比べて野生型ではウイルス蛋白質量が減少した。

**考察** 以上の結果から、HIV-2 Vpr は亜鉛結合モチーフ HHCC をもたないことによって発現量を低く保つと考えられた。HHCC をもつ R83C 変異体では翻訳効率と蛋白質安定性の上昇が見られた。Vpr は構造中に亜鉛を有することによって蛋白質のフレキシビリティが減少して発現量が上昇すると推測される。また、野生型 Vpr はその適切な発現量によりウイルスや宿主の NF- $\kappa$ B の転写活性を抑制することが示唆された。Vpr/Vpx は共通の祖先から進化してきたウイルス蛋白質であり、宿主への適応・進化の過程で多様な機能を持つようになったと考えられる。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。

## **2. 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**

**背景と目的** TRAF6 は、IL-1 誘導性 NF- $\kappa$ B 活性化を含む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。TRAF6 のもつ E3 リガーゼ活性は、TRAF6 自身およびシグナル蛋白質の K63 ユビキチン化に働き、シグナル伝達の足場となるため重要である。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 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。これまでの分子生物学的研究から、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ている。また、RING ドメインと亜鉛フィンガーを含む変異体は RING ドメインのみの変異体よりも E2 である Ubc13/Uev1a とより強く相互作用するとの報告がある。これらの結果は亜鉛フィンガーが TRAF6 の機能において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。

**SN-1 と TRAF6 の結合の確認** TRAF6 亜鉛結合モチーフに対するケミカルプローブとして、さまざまな亜鉛蛋白質との相互作用が示されている SN-1 およびその類縁体を用いることとした。まず、基本骨格である SN-1 と TRAF6 の結合を MOE によるドッキングシュミレーションで検討した。SN-1 は TRAF6 の RING ドメインには結合せず、亜鉛フィンガーと結合することが示された。さらに、ビオチン化 SN-1 と TRAF6 発現ベクターを 293T 細胞に導入して得られた細胞破碎液を用いてプルダウン実験を行った。その結果、試験管内における SN-1 と TRAF6 の結合を確認した。

**ケミカルプローブの選定** 10 種類の 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。 $\kappa$ B 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と、 $\beta$ -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発現ベクターを、IL-1 受容体をもつ HeLa S3 細胞に導入し、化合物を添加後に IL-1 によりシグナルを誘導した。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すると、4 つの化合物が NF- $\kappa$ B 活性化阻害効果を示し、その中で SN-2 は最も強い NF- $\kappa$ B 活性化阻害を示した。さらに MTT 試薬を用いて細胞毒性評価を行った結果、この実験条件下では SN-2 は細胞毒性を示さなかった。SN-2 は細胞内で還元されて SN-1 になると考えられるので、本実験に有用であると考えられた。

**SN-1 を用いた TRAF6 の機能制御** SN-1 による亜鉛結合モチーフを標的とした TRAF6 の機能制御について検討するために、TRAF6 自己ユビキチン化を観察した。まず、TRAF6 発現ベクターを 293T 細胞へ導入し、得られた細胞破碎液を免疫沈降して TRAF6 蛋白質を得て、試験管内ユビキチン化実験を行った。細胞実験では、まず 293T 細胞内で起こるユビキチン化に対して SN-2 添加による影響がないことを確認した。続いて TRAF6

発現ベクターとユビキチン発現ベクターまたはその変異体を 293T 細胞へ共導入した。SN-2 で処理した後に細胞破碎液を得て、免疫沈降・ウエスタンブロット解析を行った。その結果、試験管内ユビキチン化実験と細胞実験のどちらにおいても SN-1 により TRAF6 ポリユビキチン化が抑制された。また、TRAF6 の E3 リガーゼ活性への影響を検討するため、TAK1 ユビキチン化を観察した。TRAF6 発現ベクター、TAK1 発現ベクターおよび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。TAK1 ユビキチン化も TRAF6 同様に抑制されたことから、SN-1 による TRAF6 の E3 リガーゼ活性抑制が示された。SN-2 添加時の IL-1 誘導性 NF- $\kappa$ 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すると、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。また、その NF- $\kappa$ B 活性化阻害効果は MG132 と同程度であった。

**考察** 以上の結果から SN-1 は TRAF6 亜鉛フィンガーに結合して E3 リガーゼ活性・ユビキチン化を抑制すると考えられる。TRAF6 亜鉛フィンガーの機能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 を基盤として、TRAF6 認識部位の導入による特異的阻害剤研究にも発展すると考えられる。

## **総括**

本研究では、2 つの異なるアプローチを用いて蛋白質のもつ亜鉛の役割を検討した。HIV-2 Vpx/Vpr の研究から、ウイルス蛋白質発現量制御という亜鉛による新しい機能制御を示すことができた。またケミカルプローブ SN-1 を用いた研究からは亜鉛による TRAF6 機能制御をケミカルバイオロジー技術から示すことができた。これらの知見は亜鉛によってコントロールされる蛋白質機能の解明の一助となると考えられる。