

2000/034 ~ 1050/

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

目 次

課題番号

第1分野 抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状に対する治療薬の開発に関する研究

10101	国内未承認エイズ治療薬等を用いたHIV感染症治療薬及びHIV感染症至適治療法の開発に係る応用研究	福武 勝幸	……	1
10102	エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究	棚元 憲一	……	13
10103	HIV第二受容体拮抗剤を基盤分子とする戦略的抗エイズ剤の創製と実用化	藤井 信孝	……	16
10104	HIVインテグラーゼおよび複製を制御する蛋白質を標的とする抗ウイルス剤の開発	藤原 民雄	……	22
10105	アポトーシス抑制作用を有する新規抗エイズ薬の開発	吉野公一郎	……	28
10106	細胞性因子を標的にした抗HIV薬の開発研究	金岡 昌治	……	35
10107	カリニ肺炎のゲノム創薬研究	西村 暹	……	46
10108	逆転写酵素阻害剤の併用療法に関する研究	湯浅 聡	……	51
10109	難薬剤耐性且つ多機能を指向した抗エイズ薬の開発及び抗CCR5-CXCR4キメラ環状テトラデカペプチド抗体による感染防御	加藤 英夫	……	61
10110	遺伝子発現制御機能を持つ亜鉛サイクレン錯体による抗エイズ薬の研究	山本 直彦	……	72
10111	HIV-1の細胞侵入機構の解析による抗エイズウイルス薬の開発	鈴木 達夫	……	77
10113	新規クロニング翻訳調節蛋白やIL-15、IL-16、CD26阻害剤によるエイズおよびエイズ付随症状の治療・診断研究	岩倉洋一郎	……	88

第2分野 エイズワクチン等エイズ発症防止薬の開発に関する研究

10201	HIV日本人株及び東南アジア株に対するワクチンの開発とAIDS予防法に関する研究	小室 勝利	……	99
10202	HIV-1vpr遺伝子を用いたHIV感染細胞のアポトーシスによる排除技術の開発	森田 裕	……	115
10204	HIVによる免疫機能不全を治療・予防する新規ワクチンの開発	金子有太郎	……	121

第3分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

10301	エイズ治療薬開発のための評価スクリーニング系の開発	永井 美之	……	133
10303	HIVの病原性遺伝子Nefを標的とした抗AIDS薬開発のための基盤研究	松田 道行	……	144

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状
に対する治療薬の開発に関する研究

カリニ肺炎のゲノム創薬研究

所 属 萬有製薬株式会社つくば研究所 名誉所長
主任研究者 西 村 暹

要 旨

ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*) のゲノムプロジェクトを基盤とする、カリニ肺炎の治療薬、ワクチンの開発研究と抗原変換の分子機構の解明を行う。

1. 研究組織

- (1) 萬有製薬株式会社つくば研究所 名誉所長 西 村 暹
- (2) 東京大学医科学研究所 教授 中 村 義 一
- (3) 奈良先端科学技術大学院大学 教授 森 浩 禎

2. 研究目的

カリニ肺炎はエイズ患者の2/3に発症し重篤化する。本研究の目的は、1) ニューモシスチス・カリニ(日和見性真菌)ゲノム解析を基盤としたゲノム創薬の基礎研究を実施すると同時に、2) 病原性の中心をなす主要表面(MSG)糖蛋白質の抗原変換の遺伝子レベルの仕組みを解明し創薬研究へ応用することである。その必要性・成果については、1) HIV制御が根本的に達成されない限りは、日和見感染の制御研究の必要性・重要性がなくなることはない、2) ニューモシスチス・カリニのように培養が困難な病原微生物に対してはゲノム創薬が有効な戦略であり、3) 微生物ゲノム研究推進の国策に合致し厚生科学行政として独自のプロジェクトになりうる、4) カリニ抗原変換が病原性のかなめとなりうるため創薬の有効な標的となる。

3. 研究方法

*P. carinii*の研究におけるゲノムプロジェクトの重要性の共通認識に基づき国際共同研究による*P. carinii*ゲノムプロジェクト(5ヵ年計画)をシンシナチ大学(米国)のM. Cushion博士らと開始した。1) *P. carinii*の16本の染色体個別のゲノムライブラリーの作成、2) 染色体の塩基配列解析の決定を分業し、平成14年までに、16本の染色体(合計8メガ)の塩基配列の決定を完了する。計画の前半で、ESTプロジェクトを早期に完成させる。主要表面抗原とその関連遺伝子については、分子生物学的方法により、これまで進めてきた研究を応用を視野に入れ展開していく。

4. 研究成果

(1) ESTプロジェクト

感染ラット肺から高純度に精製した*P. carinii*を材料として、λ ZAPIIベクターを使用してcDNAのライブラリーを作成した。合計、4800のESTクローンの末端配列を決定した結果、平均584鎖長の配列解読により、1758種類の独立したESTクローンが同定された。これは全長8メガの約12%である。そのうち、1557クローンは既知遺伝子のホモログとして帰属され、その75%は分裂酵母に近縁で、19%は出芽酵母に近縁である。782クローンは新規な遺伝子である。表面抗原MSG遺伝子は全ESTの約2%を占める。今後、これらのESTクローンは染色体への帰属とコンティグの作成に有用である。

(2) ゲノムプロジェクト

*P. carinii*は16本の染色体から構成されている。染色体DNAをパルスフィールド電気泳動によって分離し、サイズの小さな染色体DNAから順次ラムダZAPIIライブラリーを作製した。同時に、全ゲノムのショットガン・ライブラリーをサイズ・フラクショネーションしたDNAサンプルを用いて作成した。これらを用いて塩基配列決定を進め、全長(8メガ)の1/4にあたる2メガ鎖長の配列情報を入手した。

(3) 創薬プロジェクト：表面抗原変換とサチライシン様プロテアーゼ

細胞表面上に局在している分子は宿主との相互作用など病原性に大きな役割を持っているものが多く、*P. carinii*においては、MSGという主要表面抗原分子の病原性における役割が研究されてきたほか、SSPと呼ぶサチライシン様プロテアーゼが細胞表面に存在するものと推定されており、これらの分子は創薬のターゲットとして重要と考えられる。MSGとSSPは、高度に多型多重的な遺伝子によってコードされており、分子多型を示すものと考えられるが、その意義は未だ解明されていない。SSPは高度に多型の遺伝子によってコードされており、一部のSSP遺伝子のみが発現しプロテアーゼ活性を持つ可能性も少なくないことから、新たに全長のSSPcDNAを含め、新たなSSP分子種のクローニングを行い、異なるSSP分子種について活性の検討を行った。クローニングしたSSPcDNAはこれまでに報告されたSSPと塩基配列上類似の特性を持つ異なる塩基配列をもち、塩基配列の類似性は70%以上であった。

(4) ペプチド鎖解離因子

タンパク質合成の終結ステップの異常が疾患に関連することが最近指摘されているため、ゲノムプロジェクトによるEST解析の結果をもとに、*P. carinii*のペプチド鎖解離因子のクローニングを行った。真核生物のペプチド鎖解離因子であるeRF1, eRF3をESTのBLAST解析結果から検索したところ、eRF1の配列と考えられる約600bpの配列がtranslateion release factor 1のホモログとして得られた。また、eRF3の配列と考えられる約600bpの配列がelongation factor-1 α のホモログの中に認められた。これらの配列を元にRACE法によりPc-eRF1, Pc-eRF3クローニングし塩基配列を決定した。

5. 考察

*P. carinii*は培養の困難さが研究の障害となっているために、ゲノム全塩基配列を決定し、ゲノム研究を基盤とした薬学、医学的な展開をはかることが有効な方針である。*P. carinii*国際標準株は、16本の染色体から構成され、これまで50種類の遺伝子がマップされている。とくに、中村らが発見したMSG抗原変換に必要な発現部位(UCS)は第9染色体にコードされ、その発現変換の仕組みは重要な基礎研究のテーマであると同時に、創薬のターゲットとしても重要な問題を含んでいる。これまでにin vitro培養法及び株化の技術が確立されていないため、実験動物の感染モデル(ラット)を利用して*P. carinii*を培養し、ゲノムDNAライブラリーの作成に用いる方法を採用してきたが、ラットDNAの混入があっても、ショットガン・ライブラリーを用いて大規模配列決定することが可能で実質的であると結論することができた。

MSG抗原は*P. carinii*の病原性の中心分子であるため、抗原変換の分子機構の解明は、カリニ肺炎の医学的、臨床的な問題の解決につながることを期待できる。とくに、AIDS発症時になぜカリニが優先的に増殖ようになるかは大きな問題であり、抗原変換と免疫回避や日和見感染との関係を解明することが重要である。カリニ肺炎はAIDSの流行や臓器移植にもなって今後さらに急激な増加が予想されており、効果的な診断・治療・予防法の開発に基礎研究は欠くことが出来ない。

6. 結論

カリニESTライブラリーの作成とデータベース化が進展し、必要なショットガン・ライブラリーも整い、大規模配列決定の実務的な作業へと進むことができた。本研究の目標であるゲノム全塩基配列決定とそれに基づくゲノム創薬のためには相応の経費と時間が見込まれるが、必要経費(1億円)が工面できれば、国内に整備されてきた配列決定ファクトリーも動員して、今後1年で全ゲノムの配列を完了できる見通しがある。さらに、多型多重的遺伝子ファミリー及びテロメアクローンの解析は、表面抗原遺伝子の制御機構の一端を明らかにしたと同時に、ゲノムプロジェクトの情報解析にあたって情報を提供するものとなる。これらの進展をふまえ、本プロジェクトは微生物ゲノム研究推進の国策にも合致し厚生科学行政として独自のプロジェクトになりうる。

7. 研究発表

1) 論文発表

- 1 Ito, K., Uno, M., Nakamura, Y.: A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. **Nature**, 403: 680-684 (2000)
- 2 Nakamura, Y., Ito, K., Ehrenberg, M.: Mimicry grasps reality in translation termination (minireview). **Cell**, 101: 349-352 (2000).

- 3 Wilson, K., Ito, K., Noller, H., Nakamura, Y.: Functional sites of interaction between release factor RF1 and the ribosome. **Nature Struct. Biol.**, 7: 866-870 (2000).
- 4 Nakamura, Y., Kawazu, Y., Uno, M., Yoshimura, K., Ito, K.: Genetic probes to bacterial release factors: tRNA mimicry hypothesis and beyond. In: *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions* (Garrett, R. A., Douthwaite, S. R., Liljas, A., Matheson, A. T., Morre, P. B., Noller, H. F., eds.), The American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 519-526 (2000)
- 5 Tanaka, R., Satoh, H., Moriyama, M., Satoh, K., Morishita, Y., Yoshida, S., Watanabe, T., Nakamura, Y., Mori, S.: Intronic U50 small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene of no protein-coding potential is mapped at the chromosome breakpoint t(3;6)(q27;q15) of human B-cell lymphoma. **Genes Cells**, 5: 277-287 (2000)
- 6 Tin, O.F., Rykunova, A.I., Muranova, T.A., Toyoda, T., Ito, K., Suzuki, T., Watanabe, K., Garber, M.B., Nakamura, Y.: Proteolytic fragmentation of polypeptide release factor 1 of *Thermus thermophilus* and crystallization of the stable fragments. **Biochimie**, 82: 765-772 (2000).
- 7 Takahashi, T., Hosoya, N., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., and Iwamoto, A.: Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* Isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 3161-3164 (2000).
- 8 Hosoya, N., Takahashi, T., Wada, M., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., Mizuochi, T., and Iwamoto, A.: Genotyping of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. **Microbiol. Immunol.** 44: 591-596 (2000).
- 9 Toyoda, T., Tin, O.F., Ito, K., Fujiwara, T., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Garber, M.B., Nakamura, Y.: Crystal structure combined with genetic analysis of the *Thermus thermophilus* ribosome recycling factor shows that a flexible hinge may act as a functional switch. **RNA**, 6: 1432-1444 (2000).
- 10 Ishino, T., Atarashi, K., Uchiyama, S., Yamami, T., Yoshida, T., Hara, H., Yokose, K., Kobayashi, Y., Nakamura, Y.: Interaction of ribosome recycling factor and elongation factor EF-G with *E. coli* ribosomes studied by surface plasmon resonance technique. **Genes Cells**, 5: 953-963 (2000).
- 11 Fujiwara, T., Ito, K., Nakamura, Y.: Functional mapping of the ribosome contact site in the ribosome recycling factor. **RNA**, 7: 64-70 (2001).
- 12 Nakayashiki, T., Ebihara, K., Nakamura, Y.: Yeast [*PSI+*] 'prions' cross-transmissible and susceptible beyond a species barrier through a quasi-prion state. **Mol. Cell**, In Press (2001).
- 13 Nakamura, Y.: Molecular mimicry between protein and tRNA. **J. Mol. Evol.**, In Press (2001).

2) 学会発表

- 1 Nakamura, Y.
Molecular mimicry between protein and RNA: fundamentals and possible therapeutic tools.
EC Conference on Signal Transduction Pathways and Regulation of Gene Expression
January 26-29, 2000 (Luxembourg)
- 2 Ito, K., Uno, M., Nakamura, Y.
"Tripeptide 'anticodon' of bacterial release factors to decipher stop codons in mRNA"
18th tRNA Workshop
April 8-12, 2000 (Cambridge, UK)
- 3 Fujiwara, T., Ito, K., Nakamura, Y.
"Intragenic suppressor analysis of ribosome recycling factor in *E. coli*"
18th tRNA Workshop
April 8-12, 2000 (Cambridge, UK)
- 4 Toyoda, T., Ouliana, F.T., Ito, K., Fujiwara, T., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Garber, M.B., Nakamura, T.
"Crystal structure of *Thermus thermophilus* ribosome recycling factor"
18th tRNA Workshop
April 8-12, 2000 (Cambridge, UK)

- 5 Nakamura, Y.
"The mechanism and accuracy for deciphering stop codons by tripeptide 'anticodon' of polypeptide release factors"
FASEB Summer Research Conference on "Posttranscriptional Control of Gene Expression"
July 16-21, 2000 (Colorado, USA)
- 6 Nakamura, Y.
"Protein tRNA mimicry in translation termination"
Ribosome biogenesis and nuclear function
August 17-21, 2000 (Tahoe, USA)
- 7 Tanaka, R., Satoh, H., Morishita, Y., Watanabe, T., Nakamura, Y., Mori, S.
"A novel intronic snoRNA gene at the chromosomal breakpoint in human B-cell lymphoma"
Ribosome Biogenesis and Nuclear Function
August 17-21, 2000 (Tahoe, USA)
- 8 Nakamura, Y.
"Structural and functional insight into ribosome recycling factor from or beyond a tRNA mimic"
Structural Aspects of Protein Synthesis
September 21-24, 2000 (Albany, USA)
- 9 Nakamura, Y.
"Genomic aspects of Pneumocystis antigenic variation"
The Second US-Japan Medical Mycology Workshop
November 28, 2000 (Tokyo)
- 10 Nakamura, Y.
"Protein tRNA mimicry in translation termination"
The Fifth Hamamatsu International Symposium on Biology
February 7-9, 2001 (Hamamatsu, Japan)
- 11 Nakamura, Y.
"Structural and functional study of protein tRNA mimic"
February 28 - March 2, 2001 (Tokyo, Japan)
- 12 豊田友彦、Ouliana Tin、伊藤耕一、藤原俊伸、Marina Garber、中村義一
高度好熱菌RRFの結晶構造と分子遺伝学的解析
第2回RNAミーティング (日本RNA学会)
平成12年7月31～8月2日 (東京)
- 13 中屋敷徹、中村義一
解離因子eRF3のプリオン特性と異種間感染性
第2回RNAミーティング (日本RNA学会)
平成12年7月31～8月2日 (東京)
- 14 田中りつこ、佐藤均、森下保幸、中村義一、渡辺俊樹、森茂郎
ヒト悪性リンパ腫の染色体転座点より単離されたsnoRNA U50遺伝子に対する2種類のマウスホモログの構造解析
第2回RNAミーティング (日本RNA学会)
平成12年7月31～8月2日 (東京)
- 15 中村義一
翻訳終結と分子擬態
第73回日本生化学会大会シンポジウム
平成12年10月11～14日 (横浜)
- 16 田中りつこ、佐藤均、森下保幸、中村義一、渡辺俊樹、森茂郎
ヒト悪性リンパ腫の染色体転座点より単離されたsnoRNA U50HGのマウスホモログの構造解析
第59回日本癌学会
平成12年10月4-6日 (横浜)
- 17 豊田友彦、Ouliana Tin、伊藤耕一、藤原俊伸、Marina Garber、熊坂崇、山本雅貴、中村義一
高度好熱菌RRFの結晶構造と分子遺伝学的解析

日本結晶学会年会, pp. 10

平成12年11月21～23日(仙台)

- 18 田中りつこ、佐藤均、森下保幸、渡辺俊樹、中村義一、森茂郎

ヒト悪性リンパ腫の染色体転座点より単離されたsnoRNA U50遺伝子に対する2種類のマウスホモログの構造解析

第23回日本分子生物学会年会

平成12年12月13～16日(神戸)

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究
研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社

