

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

エイズ医薬品等開発研究

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状
に対する治療薬の開発に関する研究

HIVアクセサリ-遺伝子Vprを標的とした新規抗エイズ療法開発

所 属 国立国際医療センター・難治性疾患研究部

研究者 大沢宜明

要旨

HIV アクセサリ-遺伝子 Vpr は宿主細胞に様々な機能異常を誘発する。本研究では細胞外よりの Vpr タンパク質のトランス作用によるゲノム不安定性の誘発の機序を明らかにするため、rVpr の精製および Vpr に結合する宿主タンパク質の同定を行った。

1. 研究目的

抗エイズ療法として HAART 療法が行われているが、本治療を受ける HIV 感染者中のウイルス半減期は約 4-3 ヶ月、ウイルスの完全駆逐は 6-8 年かかるとの試算がなされている(Nat. Med. 5, 512-17, 1999)。一方、現在の全世界における HIV 感染者は 4,000 万人でその内の 90%が開発途上国に居住している。このような現状から、安価で安全かつ新しい戦略に基づいた新規抗エイズ療法の開発が急務と考えられる。

HIV-1 アクセサリ-遺伝子の一つである Vpr は、プロウィルス DNA の核内への移行、潜伏感染した細胞に対するウィルス再産生誘導、さらに、感染した細胞を G2/M 期に貯留させるなどの機能を有することが知られている。申請者が所属する国立国際医療センター研究所、難治性疾患研究部では、Vpr 遺伝子を自由に調節することが可能な細胞株（以下 MIT-23）を世界に先駆けて樹立し、これを用いて Vpr により誘導される細胞周期異常が HIV-LTR 転写活性上昇の分子基盤になっていることを示唆する解析結果が得られている。この知見は、Vpr により誘導される細胞周期異常の分子機構を解析することにより、新しい抗 HIV 因子が開発される可能性を強く示唆する。細胞周期異常としては、G2/M 期での貯留、染色体の数の異常、中心体の数の異常などが誘起されるが、本研究では、特に Vpr により誘導されるゲノムの不安定性に着目して、以下のようなステップで解析を展開する。

Vpr により誘導される細胞周期異常の分子機構の解析

↓

Vpr の機能を阻害するペプチドあるいは化合物の同定

↓

Vpr により誘導されるゲノム不安定性に対する阻害効果の検定

具体的には、Vpr が結合する宿主側のタンパク質を同定し、Vpr との結合部位を明らかにする。そして、Vpr 機能を阻害するペプチドあるいは化合物を同定し、ゲノムの不安定性の誘発に対する影響を解析する。本研究により、これまでとは作用機構の異なる全く新しい抗 HIV 因子が同定され、新規抗エイズ療法開発の可能性が明らかになると期待される。

また、HIV 感染者の血清中に Vpr タンパク質が存在することが報告されており、さらにエイズ症例では高率に B 細胞性悪性リンパ腫が発症し、エイズ病例の予後因子になっている。これらのことに着目し、細胞外に添加された Vpr タンパク質の作用（以下、トランス作用）を解析し、ゲノム不安定性の誘発の有無とその機序を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

—リコンビナント Vpr タンパク質の精製及び活性測定—

Vpr 遺伝子を pGEX6P に組み込んだコンストラクトを用い、GST-Vpr 融合タンパク質を大腸菌株 BL21 にて発現させた。GST-Vpr 融合タンパク質をグルタチオンセファロース 4B を担体としたアフィニティーカラムにて抽出した後、PreScission プロテアーゼ処理にてリコンビナント Vpr を精製した。

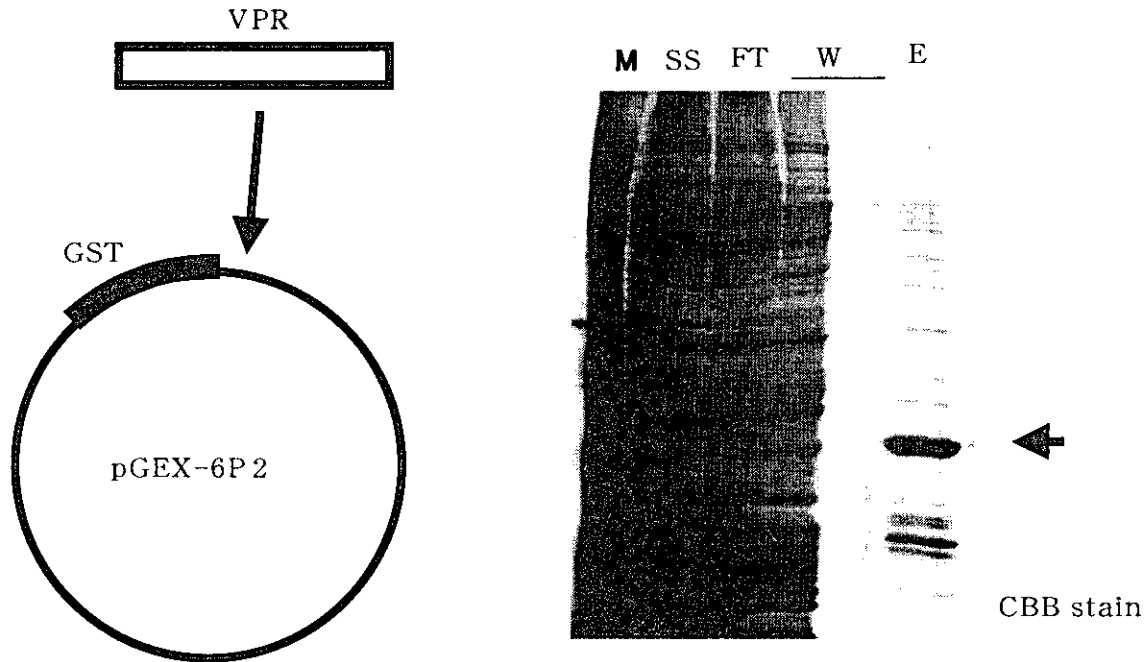
この、精製 VPR を細胞培養液中に添加して 3 日間培養した後、付着系細胞ではクリスタルバイオレット染色した後、カロリメトリック法により定量し、浮遊系細胞では MTT assay にて細胞増殖能に対する生物活性を測定した。

—Two-hybrid screening—

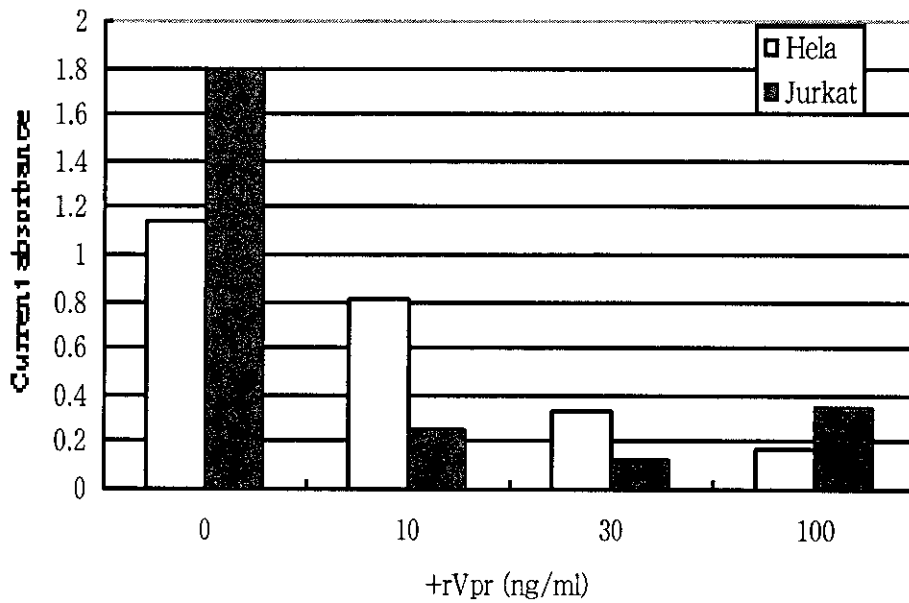
ランダムペプチドライブラリーよりスクリーニングした、Vpr に結合するペプチドである VAP-1(Vpr associated peptide-1)をプローブとして用い、Vpr の C-末端側、45 アミノ酸を断片化させた合成ペプチドをスロットプロットによりメンブレンフィルターに吸着させたものと hybridize させた。ここで同定されたアミノ酸をコードする塩基配列を合成し、ベイトベクターに組み込んだ。Hela 細胞由来の cDNA ライブラリーをターゲットとし、Two-hybrid assay を行った。得られた陽性クローンをそれぞれ精製し、auto-sequencer により塩基配列を解析した。

3. 研究成果

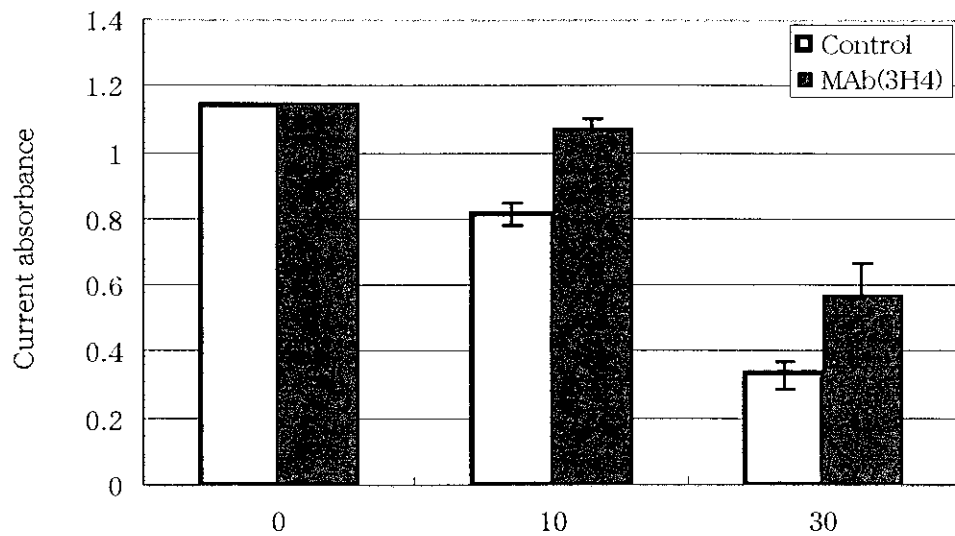
・大腸菌で発現させた GST-Vpr よりリコンビナント Vpr タンパク質が得られた。精製に用いた pGEX6P2-Vpr コンストラクトの概略及び精製パターンを下図に示す。



この、調製した Vpr タンパク質を培養液中に添加することにより、ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa およびヒト T 細胞株 Jurkat の各細胞株に対して増殖阻害を示した(下図)。さらに、この阻害効果は添加した rVpr の量に依存して上昇した。



この阻害効果について、抗Vprモノクローナル抗体を用いてさらに検討した。Vprと抗Vprモノクローナル抗体とで前処理した後に細胞培養液に添加したところ、増殖阻害効果は抑制された（下図）。

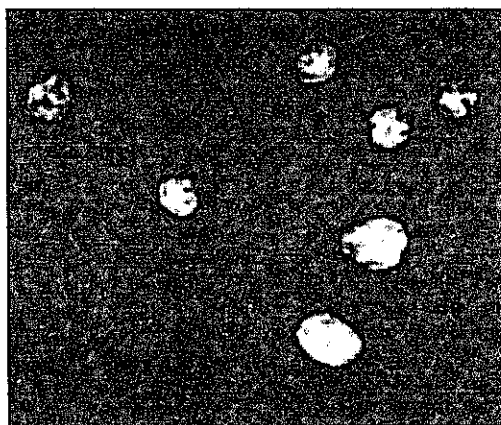


次に、免疫染色により培養液添加後のVprの挙動を調べたところ、細胞内へ取り込まれ、核周辺に局在することを確認した（下図）。

Untreated



+VPR



このアミノ酸をコードするオリゴヌクレオチドと、Hela 細胞由来の cDNA ライブラリーとで Two-hybrid assay を行った。得られた陽性クローン 100 個の塩基配列を解析したところ、下表に示すように、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) および NTF2 (nuclear transport factor 2) 遺伝子が高頻度にクローン化された。

Protein	clone	E value
GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	#37-1-1	8.00E-73
	#44-2-3	0
	#53-2-2	0
	#66-1-1	2.00E-18
	#101-1-1	3.00E-07
NTF2 (nuclear transport factor 2, placental protein 15)	#25-2-2	1.00E-133
	#78-1-1	0

4. 考察

Vpr のトランス作用としては、HIV 産生誘導、アポトーシス及び G2 arrest の誘発が報告されているが、ゲノム不安定性の誘発については不明である。今後、Vpr のトランス作用によるゲノム不安定性誘発能を明らかにするとともに、その機序を解明する予定である。

Vpr は核内へ移行し、核膜孔を拡大させる作用が報告されている。NTF2 は結合するタンパク質を核内に運び、また、自身は核膜に局在し、核膜孔の形成に係わるタンパク質である。このタンパク質と Vpr との相互作用が強く示唆される。今後はこれらのタンパク質と Vpr との細胞内での関連について検討していく予定である。

5. まとめ

Vpr により誘導される宿主細胞の異常の分子機構を解析することにより、新しい抗 HIV 因子の探索が可能となり、ひいては新しい抗エイズ療法の開発につながる可能性が示唆される。さらに、Vpr と複合体を形成する宿主側のタンパク質を同定し、Vpr との結合部位を明らかにすること、同定したタンパク質と Vpr との結合を阻害することにより、Vpr の機能を抑制させる因子の開発を試みたいと考えている。本研究を展開していくことにより、新規抗エイズ療法開発の可能性が明らかにできるものと期待される。

6. 研究発表

特になし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10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