

なし
3.その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

微生物由来のインテグラーゼ阻害剤の探索

分担研究者 田中晴雄

北里大学薬学部教授

研究要旨 本研究課題の分担研究者である北村によって調製されたインテグラーゼの酵素試料を用いて、放線菌及び糸状菌の培養液を検索した。結果、阻害剤生産株として放線菌 7 株及び糸状菌 6 株を選択した。また、ケミカル・ライブラリー薬 800 化合物を用いて合胞体形成阻害剤をスクリーニングした。さらに、当教室で発見した放線菌由来の抗 HIV タンパク質 actinohivin は gp120 の糖鎖に結合することがすでに分かっていたが、actinohivin に親和性を示すマンナンの加水分解物を用いて研究の結果、actinohivin は 6 分子以上のマンノース重合体に対して特異的に親和性を示すものと推定された。

A. 研究目的エイズの発症予防と治療のために多種類の逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤が開発され臨床で用いられている。これらの薬剤を用いる多剤併用療法により先進国におけるエイズによる死亡者数の減少が報じられ、延命効果が期待されている。しかし、薬剤耐性のために治療効果の上まらないケースや、治療中断によるウイルスのリバウンド、長期治療による様々な副作用など、治癒が望めないばかりでなく治癒できないケースが増えている。また、ワクチンの開発も進んでいない。従って、HIV の感染阻止とエイズの発症予防・治療のために逆転写酵素やプロテアーゼとは異なる標的に対する新たな薬剤の開発が切望されている。本研究では、抗 HIV 薬の新たな標的の 1 つと

してウイルス遺伝子の染色体への組込みの段階を選び、分担研究者の 1 人北村によって調製されたインテグラーゼの酵素試料を用いて、微生物培養液からの探索系を確立した後、実際にインテグラーゼ阻害剤の探索を実施し、活性が認められた培養液から活性物質を精製中である。また、本分担研究者らによって構築された合胞体形成阻害剤の探索系を用いて、放線菌並びに富山化学工業（株）総合研究所のケミカル・ライブラリーについて探索する研究も合わせて実施した。なお、本分担研究者らは、既にこの合胞体阻害剤の探索系を用いて微生物培養液をスクリーニングし、gp120 の high mannose 糖鎖に選択的に結合する抗 HIV タンパク質 actinohivin (AH) を発見しているので、その作用機構と選択性を明らか

にすべく研究を進めた。

B. 研究方法

<試験サンプルの調製>

13年度の本研究において、土壌より分離した約2000株の放線菌(3種類の培地)および糸状菌160株(4種類の培地)合計2160株を培養し、菌体と培養上清の50%エタノール混合液を用意した。各50%エタノール混合液を株ごとにひとまとめにし、酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチル抽出物を濃縮乾固後、DMSO 50 ulに溶解し、1次スクリーニング試験サンプルとした。

<1次スクリーニング>

IGEN社製M8 analyzerを用いてインテグラーゼ阻害活性を評価した。方法については、M8 analyzerに付属されていたガイドラインに従った。酵素反応系100 ul中に試験サンプル5 ulを添加して測定し、インテグラーゼ阻害率90%以上のサンプルを1次候補とした。

<DNase活性試験>

閉環状プラスミドDNA 0.1 ugと1次候補の試験サンプル0.5 ul(DMSO最終濃度0.5%)を10 ulの緩衝液(500 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgSO₄, 0.1 mM DTT)中、37°Cで1時間インキュベート後、1% agarose gel電気泳動にかけ泳動パターンに変化が見られるものを排除した。

<細胞毒性試験>

CEM細胞を2 x 10⁴個ずつ各穴にまき、1次候補の試験サンプル(DMSO最終濃度0.25%)を添加し、5% CO₂気流下37°Cで24時間培養後、5 mg/ml MTT

(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)を加えて、さらに2時間培養した。培地を取り除きDMSO 100ulを加え、プレートミキサーで15分間処理することにより不溶物を溶解し、極大吸収波長540 nm、対照波長690 nmにおける吸光度差を測定し、細胞生存率70%以上のサンプルを選択した。

<インテグラーゼの基質 oligo DNAの調製>

Oligo A (5' -TGTGAAAATCTCTAGCAG)の5'末端を[γ-32P]ATPとT4 polynucleotide kinaseを用いて標識した。標識は、TaKaRa MEGALABELTMキットを用いた。Oligo A 1 ul (10 pmol)に10 x phosphorylation buffer 1 ul、[γ-32P]ATP (3000 Ci/mmol, パーキンエルマー NEG-002A) 5 ul、T4 polynucleotide kinase 1 ulを加えて全量をミリQ水で10 ulとし、37°Cで60分間反応した。反応後、0.25 M EDTA 1 ulを加えて85°C、15分間加熱することで酵素を失活させ、氷中で冷却した。ミリQ水20 ul、1 M NaCl 4 ul (final 100 mM)、oligo B (5' -ACTGCTAGAGATTTCCACA) 4 ul (40 pmol)を加えて85°C10分間加熱後、時間をかけて冷却させることによりoligo Aとoligo Bをアニーリングさせた。その後、ミリQ水50 ulを加えた後、G-25 カラム (MicroSpin™ G-25 Column, Amersham Pharmacia Biotech)を用いて、oligo DNAを精製した。

<2次スクリーニング>

本プロジェクトの分担研究者である北村により調製された酵素を用いて integrase (IN) 活性を polyacrylamide gel電気泳動法(PAGE)

により測定した。反応溶液 (25 mM MOPS pH 7.2
1 ul, 100 ug/ml BSA 2 ul, 10 mM

-mercaptoethanol 2 ul, 7.5 mM MnCl₂ 1 ul,
IN enzyme 1.5 ul, ミリQ水を加えて全量を
13 ul とした) にサンプル 2 ul 及び 0.5 pmol
基質 oligo DNA を加えて 37°C で 1 時間反応し
た。反応後、20% SDS 0.5 ul 及び、20 mg/ml
proteinase K 0.5 ul を加えて 60°C、15 分間
反応させた。サンプルに formamide
gel-loading buffer(formamide 10 ml, xylene
cyanol 10 mg, bromophenol blue 10 mg, 0.5
M EDTA pH 8.0 200 ul) 20 ul を加えて 95°C、
3 分間加熱後、急冷し、そのうちの 10 ul を
20% denaturing polyacrylamide gel(20%
acrylamide, 50w/v% urea, 1 x TBE) 電気泳
動を行った。分離後の gel を BAS2000 システ
ム (富士フィルム) により放射活性を画像化
し、インテグレーション反応産物の生成を確
認した。

<ケミカル・ライブラリー>

富山化学工業 (株) から供給された合成化合
物約 800 サンプルについて、合胞体形成法に
よるスクリーニングを行った。

<合胞体形成法>

当教室で確立した合胞体形成系を用いて以下
のようにして測定した。96 穴プレートに、受
容体発現細胞 (HeLa/CD4/LacZ) を 1.6 x 10⁵
cells/ml に調製して 50 ul ずつまき、試験
サンプル 10 ul を添加した。続いて env 発現
細胞 (HeLa/T-en/Tat) を同量まき、5% CO₂ 気
流下 37 °C で 24 時間培養後、

-galactosidase 活性を測定した。(Chiba H.,
et al, J Antibiot (2001) 54 P818826)

<AH-rgp120 結合活性の測定>

AH を抗原タンパク質結合用緩衝液で 3 ug/ml
となるように希釈し、ELISA プレートに 50 ul
ずつ分注して 4°C で一晩反応させた。プレー
トを PBS-T で 2 回洗浄し、PBS-T に溶解した
3% スキムミルク溶液を 50 ul ずつ加え、室温
で 1 時間ブロッキング反応を行った。rgp120
(HIV-1 IIB 株) 0.18 ug/ml と試料の混合液
50 ul を加えて 2 時間反応後、PBS-T で 4 回洗
浄した。次に、0.3 ug/ml 抗 gp120 モノクロ
ナール抗体[5B3] (Genentec) を 50 ul ずつ加
え 2 時間反応後、PBS-T で 4 回洗浄した。PBS-T
で 1/5,000 に希釈した HRP 標識抗マウス IgG
抗体を 50 ul ずつ加え 1 時間反応後、PBS-T
で 4 回洗浄した。HRP 用発色試薬を 100 ul ず
つ加えて 8 分間反応後、2 N 硫酸 50 ul を加
え反応を停止させ、吸光度計を用いて極大吸
収波長 492 nm、対象波長 405 nm の 2 波長に
おける吸光度の差を測定した。

<変異体 AH の調整>

当教室ですでに確立された大腸菌による組み
換え AH 生産系を用いた。(Inokoshi J., et al,
Biochem Biophys Res Commun (2001) 281
P1261-1265)

C. 実験結果と考察

(1) インテグラーゼ阻害剤の探索

<1 次スクリーニング>

IGEN 社製 M8 analyzer を用いてインテグラー
ゼ阻害活性を評価した結果、阻害率 90% 以上
を示したサンプルは放線菌で 439 株 (22%)、
糸状菌で 28 株 (17.5%)、合計 467 株 (21.6%)
であった。ヒット率が高かった原因として、

培養液からの DNase が混入している可能性が考えられたので、ヒットした 467 株の酢酸エチル抽出物について DNase 活性を試験した。その結果、467 株中 23 株 (4.9%) においてアガロースゲル電気泳動の泳動パターンに変化が認められたため、これらを除いた。また、細胞に対して毒性の高い物質を含むサンプルを除く目的で CEM 細胞に対する毒性試験を行った結果、細胞生存率 70%以下を示したものが 467 株中 203 株 (43.5%) 存在した。これら DNase 活性、細胞毒性を示すサンプルを除いて 1 次スクリーニング通過株として放線菌 180 株、糸状菌 25 株、合計 205 株 (9.5%) を選択した。

<2 次スクリーニング>

1 次スクリーニングの方法ではインテグレーション反応物を直接検出していないので、実際にはインテグラーゼ活性を阻害していないものもなんらかの反応によって擬陽性となっていることが考えらる。そこで、2 次スクリーニングでは、インテグラーゼ反応生成物を PAGE で分離し、視覚的に検出する方法をとった。その結果、1 次スクリーニングを通過した放線菌 180 株中 41 株で阻害活性が再現された。そこで、放線菌 41 株、及び糸状菌 25 株について、培養培地ごとにサンプルを調製し活性を調べた。その結果、放線菌 12 株 14 broth、糸状菌 11 株 13 broth で阻害活性が確認された。これらの菌株について再培養を行い、活性が再現されるかどうか確認した結果、表 1 に示した合計 13 株 17 broth において、阻害活性が再現されたので、これらの菌株の保存、培養日数及び活性物質抽出条件の検討

などを行い、そのうちの放線菌 31-B5 株、35-A2 株、糸状菌 FKI-1463 株の 3 株について大量に培養し、活性物質の精製を行っている。<糸状菌 FKI-1463 株の生産するインテグラーゼ阻害物質の精製>

FKI-1463 株を生産培地で 7 日間培養後、培養上清と菌体を分離し、酢酸エチル抽出を行い、2.6 L の培養液から菌体酢酸エチル抽出物 4.27 g 及び培養上清酢酸エチル抽出物 1.2 g を得た。酢酸エチル抽出後の水層には活性はほとんどなかった。これら粗抽出物質の IN 阻害活性を PAGE で検出した結果、阻害物質は菌体酢酸エチル抽出物に多く含まれており、3 ug/ml で約 70%の IN 阻害活性を示した。現在さらに精製を進めている。

<放線菌 01-31B5 及び 01-35A2 株の生産するインテグラーゼ阻害物質の精製>

放線菌 9 株のうち活性が比較的強い 01-31B5 と 01-35A2 の 2 株について精製を進めている。01-31B5 の培養液 4 L から得た菌体に 1.5 L のアセトンを加えて活性物質を抽出し、300 mL の水を添加した後にアセトンを留去した。得られた懸濁液に等量の酢酸エチルを加えて抽出した後、減圧乾固した。得られた粗抽出物 932 mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム メタノール混液で溶出した。100:20 溶出画分にインテグラーゼ阻害活性が認められた。回収した粗物質 74.3 mg を用いて更に精製を進める予定である。また、01-35A2 の培養液 4 L についても同様の操作を行い、粗抽出物を得た。得られた粗抽出物 658 mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム メタノール混液

を用いた段階抽出により、100:2¹100:5で溶出された画分にインテグラーゼ阻害活性が認められたので、更に精製を進めている。

(2) 合胞体形成阻害剤の探索

<ケミカルライブラリーのスクリーニング>

富山化学より提供されたケミカルライブラリー約 800 化合物をスクリーニングした結果、50%以上の合胞体形成阻害活性を示す 202 化合物を選択した。活性のあった化合物については富山化学で再現性の確認が実施された (分担研究者野村の報告書参照)。

<放線菌 00-5D2 株によって生産される合胞体形成阻害剤>

00-5D2株の培養液3.8 Lから得た菌体に1.5 Lのアセトンを加えて活性物質を抽出した。300 mLの水を添加した後にアセトンを留去し、更に等量の酢酸エチルを加えて活性物質を抽出した後、減圧乾固した。この粗抽出物 320 mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけた。クロロホルム/メタノール混液で溶出し、100:3 及び 100:5 で溶出された画分に合胞体形成阻害活性が認められたが、前者には細胞毒性が認められたので検討を中止した。一方 100:5 溶出画分に強い合胞体形成阻害活性

(IC₅₀: 0.8 ng/mL) が認められ、MTT 試験による細胞毒性は比較的良かった (IC₅₀ 値 90 ng/mL)。しかしこの活性画分 (7 mg) にはまだ多くの物質を含んでいたため、活性成分は非常に微量であると考えられ、大量培養を行うこととした。その後の培養においては上記の選択性のある画分が得られなくなってしまったため、培養を再現すべく種々培養条件の検討や単孢子分離を試みた結果、当初の培養

と同程度の活性物質生産能を有する菌株を得ることができたので、今後これを用いて大量培養を行い、活性物質の取得を試みる予定である。

(3) 抗 HIV タンパク質 actinohivin の作用機構

<AH の合胞体形成阻害活性に対する酵母マンナンの影響>

HIV の細胞への接着・侵入過程を阻害する actinohivin (AH) は 114 アミノ酸からなるタンパク質で、T 細胞指向性及びマクロファージ指向性 HIV-1 及び HIV-2 の細胞への感染を阻止する (IC₅₀=2110 nM)。これまでの研究により AH は HIV 外套タンパク質である gp120 の高マンノース型糖鎖に結合すると推測されている。一方、AH と gp120 の結合はマンノース存在下では阻害されず酵母マンナン (α型マンナン) 存在下において強く阻害された

(IC₅₀=3 ug/ml)。そこで、酵母マンナンが AH の抗 HIV 活性をも抑制するかどうか、酵母マンナン添加・非添加時における AH の合胞体形成阻害活性を測定した。なお、酵母マンナン添加群は、あらかじめ酵母マンナンを添加した培地に細胞をけん濁し、その後は非添加群と同様の操作を行った。その結果、100 ug/ml の酵母マンナン添加において AH の合胞体形成阻害活性は約 1/10 に低下した。以上の結果から、ELISA 法による AH と gp120 の結合に対する酵母マンナンの阻害活性に比較すると弱い、酵母マンナンは AH の合胞体形成阻害活性をも抑制することが分かった。

<AH-rgp120 結合に対するオリゴマンノース及び多糖類の影響>

酵母マンナン (α 型マンナン) 以外のオリゴマンノース及び β 型マンナンであるコーヒーマンナンなどの多糖類の存在下でAHとgp120の結合への影響を調べ、AHがどのようなものに親和性を示すのかELISA法を用いて検討した。表2の右半分が今回試験した試料の結果である。酵母マンナンに比較すると弱い阻害活性を示したコーヒーマンナンは、1-4結合型のほぼ直鎖状のポリマンノースである。一方、コーヒーマンナンの熱加水分解物では阻害活性は著しく低くなり、酵母マンナン熱加水分解物では阻害せず、 α 型、 β 型mannopentaoseでも阻害活性が見られないことから、マンナンのAH gp120結合阻害活性にはマンナンの結合型ではなくその重合度が重要であると考えられ、少なくとも6つ以上のマンノース分子が重合している必要があると思われる。また、ガラクトマンナンやグルコマンナンなどでは阻害されないことから、マンノースからなる多糖類のみに特異的に結合すると考えられる。AHはgp120以外の高マンノース型糖鎖を持つ糖タンパク質であるRNase Bや thyroglobulinにも結合するが、その結合はgp120に比較すると弱い。他の糖タンパク質に比べてgp120の糖鎖含有率が非常に高いので、分子表面の糖鎖密度が高いと推定され、その部分にAHが効率よく結合するためにgp120に対して選択性を示すものと推定される。今後は、AHと各種糖鎖及び、糖類糖タンパク質とのアフィニティ解析を行うことにより上記の推測を裏付けし、AHのgp120標的部点を明らかにしたい。

<AHの各種変異体の生物活性について>

すでに確立した大腸菌による組み換えAH生産系を用いて、種々のAH欠失体及び、変異体を作成し、これらの合胞体形成阻害活性を検討することでAHの活性発現に必要な領域を明らかにすることを試みた。AHは分子内に互いに相同性の高い3つのセグメントを持ち、これらのセグメントを1つまたは2つにした各種欠失体を作成してそれらの合胞体形成阻害活性を調べたところ(図3)、いずれの欠失体もAHに比べて著しく阻害活性が低下した(表3)。また、AHはセグメント2に2分子のシステインを含み(51Cys, 65Cys)、2分子のシステイン残基をセリンに置換したAH(C \rightarrow S)変異体を作成したところ、AH(C \rightarrow S)はAHと同等の活性を示した(表3)。以上の結果から、AHの合胞体形成阻害活性には3つのセグメントが必要であると考えられた。また、セグメント2に存在する2分子のシステインは合胞体形成阻害活性には関与しないと考えられた。

D. 結論

逆転写酵素及びプロテアーゼ以外をターゲットとする抗HIV薬の開発を目的として、インテグラーゼと接着侵入阻害剤の探索を行うこととし、インテグラーゼについては本研究で確立した探索系を用いて微生物由来の阻害剤を探索し、合胞体形成阻害剤については、以前からの成果をふまえて以下のような成果を得た。

(1) 分担研究者の一人北村により調製されたインテグラーゼの酵素標品を用いて、当教室で分離した放線菌の培養液及び北里生命科

学研究所から供給された糸状菌培養液を用いてスクリーニングを実施し、阻害剤生産株として放線菌7株及び糸状菌6株を選んだ。現在、これらの株を順次大量培養し、活性物質の精製を進めているところである。

(2) 富山化学より提供されたケミカルライブラリー約800化合物の中から合胞体形成阻害活性物質をスクリーニングし、活性のあった化合物について富山化学で再現性を確認した。また、前年度に合胞体形成阻害剤生産株として選択された放線菌00-5D2株については生産量が少なく精製が進められなかったため、単孢子分離により高生産株を取得した。現在精製中である。

(3) 当教室で発見した放線菌由来の抗HIVタンパク質actinohivin(AH)は、gp120の高マンノース糖鎖に結合することにより抗HIV活性を示すと推定されている。すでに、ELISAでAHとgp120の結合を酵母マンナンが阻害することが明らかにされているが、さらに、合胞体形成も酵母マンナンによって阻害されることが明らかとなった。また、 α 型マンナンである酵母マンナンのみならず、 β 型マンナンであるコーヒーマンナンも弱いながらAHとgp120の結合を阻害するが、いずれもその加水分解物では極端に活性が低下し、例えば、mannopentaoseでも活性を示さないことから、AHは6分子以上のマンノースの重合体に対して特異的に親和性を示すものと推定される。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし。

現在精製中の阻害剤について特許を出願し、その後に論文発表の予定である。

2. 学会発表

1) 高橋 淳、猪腰淳嗣、千葉春美、大村 智、田中晴雄

放線菌由来抗HIV蛋白質アクチノヒビンの各種変異体の生物活性について

第46回日本薬学会関東支部大会(東京)

2002.10.26 [第46回日本薬学会関東支部大会講演要旨集 p32 2002]

2) H. Chiba, J. Inokoshi, S. Omura and H. Tanaka

The anti-HIV protein actinohivin binds high-mannose type saccharide chain of gp120. (Honolulu, Hawaii) Seventh International conference on the biotechnology of microbial products

2002.10.27-30 [Seventh International conference on the biotechnology of microbial products Abstracts p55 2002]

3) J. Inokoshi, H. Chiba, A. Takahashi, S. Omura and H. Tanaka

Analysis of sequence requirements for biological activity of actinohivin, a novel anti-HIV-1 protein (Hawaii, Honolulu) Seventh International conference on the biotechnology of microbial products

2002.10.27-30 [Seventh International conference on the biotechnology of microbial products Abstracts p56 2002]

4) 田中晴雄

The anti-HIV protein actinohivin of actinomycete origin binds to high mannose sugar chain of gp120 (東京) 第2回国立感染症研究所エイズ研究センター薬剤耐性ワークショップ 2002.11.13

5) 高橋 淳、猪腰淳嗣、千葉春美、大村 智、田中晴雄

放線菌由来抗 HIV 蛋白質アクチノヒビンの各種変異体の生物活性
日本薬学会第 123 年会 (長崎)
2003.3.27-30[日本薬学会第 123 年会講演要旨集 p361 2003]

F. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

インテグラーゼ阻害剤及び合胞体形成阻害剤について特許出願を予定している。

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

化合物の選定及び合成

分担研究者 野村伸彦

富山化学工業株式会社 主任研究員

研究要旨

約 2 万検体の低分子化合物ライブラリーの評価を行い、高い選択性を有する複数の化合物を見出した。これらの周辺化合物を合成し、リードとしての可能性を見極めて行く。

A. 研究目的

本研究は HIV-1 感染症を治療するための新たな治療薬開発を目的として、HIV-1 感染の開始段階である宿主細胞へのウイルス吸着粒子結合とその後の合胞体形成を阻害する薬剤を探索する。

2001, 54, 818)。また、ヒットサンプルについて

は、Vero 細胞を用いて細胞毒性試験を実施した。

（倫理面への配慮）

特になし

B. 研究方法

HIV-1 の外被タンパク (env) 及び Tat を発現する HeLa 細胞と CD4 及び LTR で制御された LacZ を発現する細胞を用いた合胞体形成反応を用いて検索を行った。T-tropic ウイルスに対しては、NL4-2 env 発現 HeLa/T-env/Tat 及び HeLa/CD4/LacZ 細胞を、M-tropic のウイルスに対しては SF162env 発現 HeLa/M-env/Tat 及び HOS/CD4/CCR5/LacZ 細胞を用いた。LacZ 発現量は合胞体形成率に依存することから、被験物質存在下での LacZ 発現を定量することによって、その阻止率を評価した(参考文献:Chiba et.al. J. antibiotics,

C. 研究結果及び考察

約 2 万検体の低分子化合物ライブラリーの評価を行った結果、LacZ の阻害活性 (IC50) 及び細胞毒性 (CC50) の選択比が、1000 倍以上の新規化合物を含む、M-tropic, T-tropic, M&T-tropic な化合物を、各々、6, 1, 3 化合物見出した。現在、これら化合物の抗 HIV 活性を測定中である。

D. 結論

約 2 万検体の低分子化合物ライブラリーの評価を行い、高い選択性を有する複数の化合物を見出した。これらの周辺化合物を合成しリードとしての可能性を見極めて行く。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

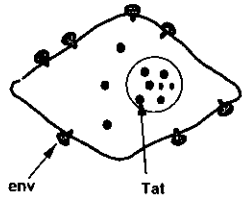
特になし

G. 知的財産権の出願状況・登録状況

特許出願予定中である。

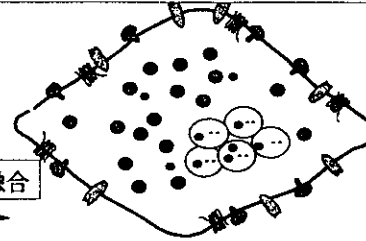
2つのリコンビナント細胞を用いた細胞融合アッセイ

HIVのenvとtatを発現している細胞

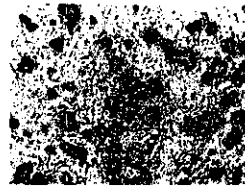
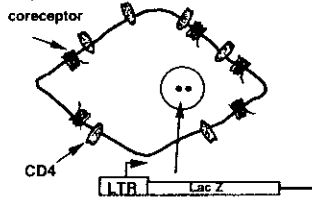


2つの細胞が融合するとシンシチウムを形成し、 β -galactosidaseを発現する。

細胞融合



CD4、co-receptor、およびLTR制御のlacZを発現した細胞



厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

プロテアーゼ阻害剤の探索

分担研究者 松田善衛

国立感染症研究所 エイズ研究センター 第三室長

研究要旨

後天性免疫不全症候群の原因ウイルスである人免疫不全ウイルス（HIV-1）の増殖・複製に必須であるプロテアーゼ産物の阻害剤開発を目的に迅速プロテアーゼアッセイ系 VLP-ELISA 法を用いて、候補薬剤 12,000 種類を一次スクリーニングにかけ、2 次スクリーニング薬剤として 123 薬剤を得た。これらの薬剤について薬剤濃度を変化させ、通常 HIV プロウイルスのコンテキストで 2 次スクリーニングを行った。その結果 13 種の薬剤が 2 次スクリーニングを通過する候補薬剤として同定された。

A. 研究目的

後天性免疫不全症候群の原因ウイルスである人免疫不全ウイルス（HIV-1）の増殖・複製に必須であるプロテアーゼ産物の阻害剤の開発を行うことを最終目的とする。

B. 研究方法

一次スクリーニングに用いる方法としてはわれわれが開発した迅速プロテアーゼ活性測定法（VLP-ELISA）を用いた。この系は基質・酵素の比率が実際の HIV-1 感染と同等になるようにプロウイルスの一部を発現ベクターとして用い、同一 DNA プラスミド上から当該プロテアーゼ遺伝子および基質遺伝子と同じ細胞中で発現させプロテアーゼ活性の測定を行うことを特徴とする。プロテアーゼ

活性は HIV-1 プロテアーゼの本来の基質である Gag 前駆体タンパク質の切断効率を測定することによって求める。VLP-ELISA では切断前の Gag 前駆体量は gag 遺伝子と同じプロモーターから読まれるルシフェラーゼ量（実際にはルシフェラーゼ活性）で代用し、プロテアーゼによって切断を受けた Gag タンパク量は生成産物の一つである p24 を ELISA 定量することによって求める。そして、両者の比 P （ $p24/\text{ルシフェラーゼ活性}$ ）が（生成産物/前駆体）と比例することを利用する。標的培養細胞としては COS7 細胞を用いた。スクリーニングの実験条件は昨年度決定した条件を用いた。

本年度は富山化学からコード番号情報のみを明らかにされた 1 万 2 千候補薬剤

について薬剤濃度 50 μM で一次スクリーニングを行なった。評価後に 2 次スクリーニングにかけた。候補薬剤の評価は p24/ルシフェラーゼ活性の比をもって行った。VLP-ELISA ではルシフェラーゼ活性が間接的ではあるが薬剤の細胞毒性をも反映するので、2 次スクリーニング用の候補薬剤選択の際は上記の比（プロテアーゼ阻害活性の指標）のみでなくルシフェラーゼ活性をも考慮に入れた。理想的な候補薬剤は大きな細胞毒性を示さずかつ p24 値の低下をきたす薬剤である。1 次スクリーニングを通過した薬剤については、2 次スクリーニングを行った。2 次スクリーニングにおいてはより実際の HIV-1 感染に近い条件での検討を加えるため VLP-ELISA のプロウイルス部分を HIV-1 の全ての遺伝子が存在するコンストラクトに換えて実験を行った。また dose-response を見るため薬剤濃度を 50、5、0.5、0.05 μM の 4 点をとって評価した。

C. 研究結果

候補薬剤 12,000 種類についての一次スクリーニングの結果を図 1 に示した。阻害効果の目安となる %p24/luc の値を横軸にとった当該薬剤度数分布はほぼ正規分布を示しておりアッセイに特別なバイアスの無かったことが示された。ND のカテゴリー（評価対象外）に属するものが 1,127 検体あった。それらの内訳はルシフェラーゼ活性で判断される細胞毒性の著しく強いもの（1,117 検体）および p24 アッセイにて p24 が検出限界以下であった 10 検体である。%p24/luc < 25（50 μM で阻害効果が 75%以上を示したも

の)をカットオフラインとして、2 次スクリーニング用の検体として 123 検体を選択した。この段階で、違う時点でスクリーニングされたにもかかわらず共通の母核構造を持つものが見いだされ、スクリーニングの妥当性を間接的に裏づける結果であると判断された。一次スクリーニングを通過した 123 検体について 2 次スクリーニングを行った。1 次スクリーニングに用いたプラスミドでは Gag, PR のみが発現されるようにデザインされていたが、2 次スクリーニングでは実際のウイルスへの影響を見るために、HIV-1 のすべての構造遺伝子、副遺伝子が発現するようなプラスミド（図 2）を用いて 1 次スクリーニングと同様の測定を行った。この際、内部コントロールとして現在臨床で使用できるプロテアーゼ阻害剤であるネルフィナビル (NFV) を用いた。2 次スクリーニングでは薬剤濃度を 50、5、0.5、0.05 μM の 4 点で評価した。代表的なアッセイの結果を図 3 に示した。2 次スクリーニングの結果は一次スクリーニング同様 %p24/luc を阻害の目安としたが、異なる濃度での dose response の有無も考慮に入れた。候補薬剤として 13 を選択したが、現在母格構造等を検討材料として、lead compound としての有機合成の展開可能性を視野に入れた 3 次スクリーニング用の薬剤の決定を行っている。

D. 考察

VLP ELISA を用いたプロテアーゼ活性迅速スクリーニングにより候補化合物 12,000 を一次スクリーニングし、123

検体を2次スクリーニングにかけた。2次スクリーニングによりさらに十数種の検体を選び終えたところである。一次スクリーニングと2次スクリーニングでは違ったプラスミドを用いたので、一部結果に相違が有るものの全体として大きな変動はみられなかった。VLP ELISA 法では プロテアーゼ阻害剤のみでなく、翻訳後過程（ウイルスタンパク質の細胞内輸送、出芽、成熟の各ステップでの阻害剤もスクリーニングを通過する。したがって13種類の2次スクリーニング通過薬剤については個々の薬剤を用いてその阻害機構の同定を行う予定である。

E. 結論

候補薬剤のうち12000について2次スクリーニングまでを終了した。その結果13種類の候補薬剤が選択された。母核構造は今迄のプロテアーゼ阻害剤と異なるものが見受けられることから翻訳後過程のどこかのステップに作用するような薬剤が選択されている可能性は否定できない。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Iga M, Matsuda Z, Okayama A, Sugiura W, Hashida S, Morishita K, Nagai Y, Tsubouchi H. Rapid phenotypic assay for human immunodeficiency virus type 1 protease using in vitro translation. J

Virology Methods. 106(1):25-37 (2002)

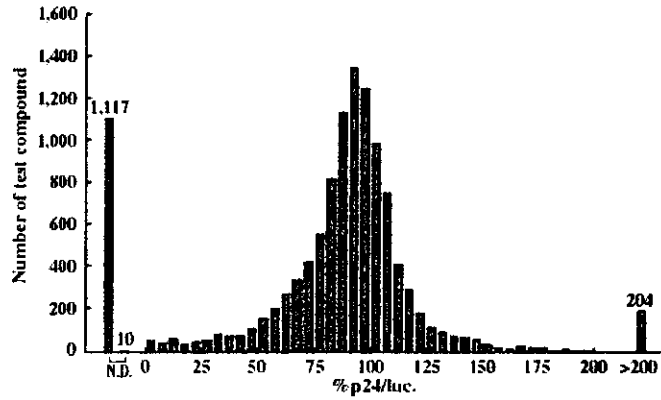
2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願登録情報

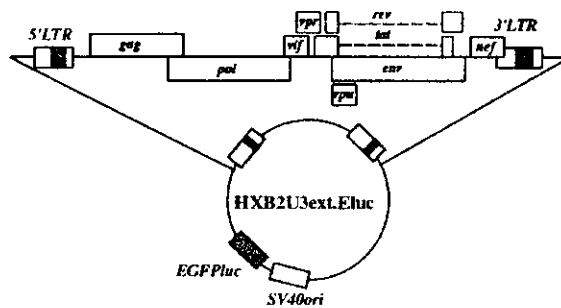
該当なし

図1 12,000検体の1次スクリーニング



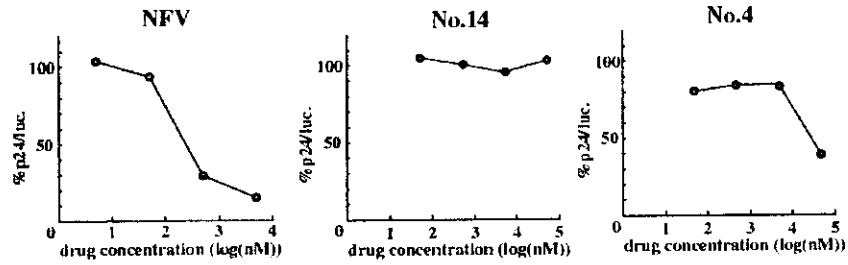
pVLP3を用いたVLP ELISA法によって試験薬剤50mMにおけるウイルス粒子の成熟過程阻害効果を調べた。著しい細胞毒性によりluciferase活性を検出できなかったものが1,117検体、luciferase活性は認めるがp24が検出限界値以下であったものが10検体あった(N.D.: luciferase活性またはp24が検出できなかったもの)。%p24/luc.で200以上の値を示したものは、ほとんどが強い細胞毒性を示し低いluciferase活性を示すものであった。%p24/luc.<25(50mMで75%以上の阻害効果)を示したのものの中から、2次スクリーニングに用いる123検体を選択した。

図2 2次スクリーニングに使用したconstruct



pVLP3のprovirusの部分全てをウイルス遺伝子が存在するものに置き換え、pVLP3ではnef遺伝子領域に組込まれていたGag precursorの代替マーカーであるEGFP-luciferase(EGFP-luc)を同一のベクター上でHIV-1 genome以外の部位から発現させるconstruct(pHXB2U3ext.Eluc)を作成した。

図3 2次スクリーニングの結果



123検体を用いて2次スクリーニングを行った。異なる薬剤濃度(50mM,5μM,0.5mM,0.05mM)での阻害効果をduplicateで検討した。NFVにおけるIC50は約200nMであった。阻害効果が認められなかったもの(No.14)、阻害効果が認められたもの(No.4)の代表的な例を示す。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版 年
Fumihiko Yagyu, Yusei Ikeda, Koya Ariyoshi, Wataru Sugiura, Som Arch Wongkhomthong, Michiaki Matsuda, Hiroshi Ushijima	Differentiation of Subtype B and E of Human Immunodeficiency Virus type 1 by Polymerase chain reaction Using novel env gene primers.	Journal of Virological Methods	101	11-20	2002
Aiko Okano, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Kenji Moriya, Kaneo Yamada and Wataru Sugiura	Discordant Movement of CD4-Positive T-Cell Count in HIV-1 Infected Patients with HARRT Failure.	Jpn. J. Infect. Dis.	55	62-65	2002
Lay Myint, Koya Ariyoshi, Hua Yan, Alexander J. Frater, Wattana Auwanit, Panita Pathipvanith, Kaneo Yamada, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Kazunori Fujita, Myra McClure, Jonathan N. Weber, and Wataru Sugiura	Mutagenically Separated PCR Assay for Rapid Detection of M41L and K70R Zidovudine Resistance Mutations in CRF01_AE (Subtype E) Human Immunodeficiency Virus Type 1.	Antimicrobial Agents & Chemotherapy	Vol.46	3861-3868	2002
Noriko Kobayashi, Hitomi Taguchi-Nakamura, Mieko Goto, Tetsuya Nakamura, Koichiro Nakamura, Wataru Sugiura, Aikichi Iwamoto and Yoshihiro Kitamura	Polymorphisms and Haplotypes of the CD209L Gene and Their Association with the Clinical Courses of HIV-Positive Japanese Patients.	Jpn. J. Infect. Dis.	Vol.55	131-133	2002
L Myint, M Matsuda, Z Matsuda, Y Yokomaku, T Chiba, A Okano, and W Sugiura	HIV-1 Gag cleavage site mutations and non-cleavage site mutations are closely related in viral fitness recovery process.	Antiviral Therapy	Vol.7	S63	2002

K Ariyoshi, M Matsuda, H Miura, K Yamada, NS Hellmann, and W Sugiura	Unique drug resistant mutation patterns found in HIV-1 CRF01_AE (subtype E) with antiretroviral treatment failure.	Antiviral Therapy	Vol.7	S150	2002
Mutsunori Iga, Zene Matsuda, Akihiko Okayama, Wataru Sugiura, Seiichi Hashida, Kazuhiro Morishita, Yoshiyuki Nagai, Hirohito Tsubouchi	Rapid Phenotypic assay for human immunodeficiency virus type 1 protease using in vitro translation.	Journal of Virological Methods	106	25-37	2002
杉浦 互	HIV のゲノムと薬剤耐性	現代医療	34(5)	153-159	2002
杉浦 互	HIV 診断技術と薬物治療の発展	ウイルス	52	83-87	2002
Sakuma S, Kobayashi N, Ae K, Kitamura Y	Inhibitory and Enhancing Effects of Insertion of Central Polypurine Tract and Central Termination Sequence on Gene Expression with Vectors Derived from Human Immunodeficiency Virus Type 1	Biochemical and Biophysical Research Communications		印刷中	2003
Guo L, Li XK, Funeshima N, Fujino M, Nagata Y, Kimura H, Amemiya H, Enosawa S, Tsuji T, Harihara Y, Makuuchi M, Suzuki S.	Prolonged survival in rat liver transplantation with mouse monoclonal antibody against an inducible co-stimulator (ICOS).	Transplantation	73(7)	1027-1032	2002
Guo L, Li XK, Enosawa S, Harihara Y, Funeshima N, Kimura H, Fujino M, Makuuchi M, Suzuki S.	Prolongation of liver xenograft survival by adenovirus vector-mediated CTLA-4lg gene transfer.	Transplant Immunology		In press	2003
Iga M, Matsuda Z, Okayama A, Sugiura W, Hashida S, Morishita K, Nagai Y, Tsubouchi H.	Rapid phenotypic assay for human immunodeficiency virus type 1 protease using in vitro translation.	J Virol Methods	106(1)	25-37	2002