

200406638A

平成16年度 厚生労働科学研究研究費補助金
エイズ対策研究事業
課題番号 H16-エイズ-004

HIV の増殖・変異の制御に関する研究

総括・分担研究報告書

平成17年3月
主任研究者 佐藤 裕徳
(国立感染症研究所・遺伝子解析室・主任研究官)

研究組織

班員

研究者名	分担	所属	役職
佐藤 裕徳	班長	国立感染症研究所・遺伝子解析室	主任研究官
高橋 秀宗	班員	国立感染症研究所・感染病理部	室長
駒野 淳	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	研究官
西澤 雅子	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	研究官
村上 努	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
明里 宏文	班員	国立感染症研究所・靈長類センター／エイズ研究センター	主任研究官
小島 朝人	班員	国立感染症研究所・感染病理部	室長
久保 嘉直	班員	長崎大熱帯医学研究所・エイズ感染防御分野	助手
櫻木 淳一	班員	大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染分野	助手
原田 信志	班員	熊本大学大学院・医学薬学研究部感染防御分野	教授
森川 裕子	班員	北里大学附属北里生命科学研究所・ウイルス感染制御学教室	教授
服部 俊夫	班員	東北大学大学院・医学系研究科感染病態学分野	教授
間 陽子	班員	理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット	ユニットリーダー
増田 貴夫	班員	東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科免疫治療学	助教授
岡本 尚	班員	名古屋市立大学大学院・医学研究科細胞分子生物学	教授
増田 道明	班員	獨協医科大学・微生物学講座	教授
足立 昭夫	班員	徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学	教授
生田 和良	班員	大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野	教授
三隅 将吾	班員	熊本大学大学院 医学薬学研究部薬学生化学分野	助教授

研究協力者

研究者名	所属	協力内容
加藤 博章	京都大学大学院・薬学研究科構造生物薬学分野／理化学研究所・播磨研究所 放射光利用連携研究 速度論的結晶学研究チーム	X線結晶構造解析
北所 健吾	京都大学低温物質科学研究センター 学際低温応用研究部門	X線結晶構造解析
梅山 秀明	北里大学薬学部・生物分子設計学教室	計算科学
後藤 純一	夔化システム・科学技術システム本部 計算科学部	計算科学
阿久津 秀雄	大阪大学蛋白質研究所・蛋白質物性研究部門	NMR
森居 隆史	生体分子計測所	原子間力顕微鏡
齋藤 賢治	サイファージェン・バイオシステムズ	プロテインチップ
山口 由美	産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター 統合データベース解析チーム	データベース解析

目 次

I. 総括研究報告書

1. 総括研究報告書..... 1
主任研究者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所・遺伝子解析室）

II. 分担研究報告書

柱 1. HIV 変異制御研究

1. 逆転写酵素の基質選択制御の研究：調節因子探索 7
主任研究者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所・遺伝子解析室）
2. 逆転写酵素機能制御の研究：阻害因子探索 11
分担研究者：駒野 淳（国立感染症研究所・エイズ研究センター）
3. 脱殻・逆転写制御の研究：調節因子探索 15
分担研究者：村上 努（国立感染症研究所・エイズ研究センター）
4. ゲノム二量体化制御の研究：調節因子探索 21
分担研究者：櫻木 淳一
（大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染分野）
5. ゲノム安定性制御の研究：調節因子探索 27
分担研究者：高橋 秀宗（国立感染症研究所・感染病理部）
6. プロテアーゼ耐性変異制御の研究 31
分担研究者：西澤 雅子（国立感染症研究所・エイズ研究センター）
7. Tat による OGG1 発現誘導と HIV のゲノム保持機構 35
分担研究者：岡本 尚
（名古屋市立大院・医学研究科細胞分子生物学）

柱 2. HIV 複製制御研究

(i) 侵入制御の研究

1. 脂質二重膜流動性制御因子の探求 39
分担研究者：原田 信志
（熊本大学大学院・医学薬学研究部感染防御分野）
2. V3 ループペプチドの CD 解析と SDA-1env 発現偽ウイルスの作成 45
分担研究者：服部 俊夫
（東北大学大学院・医学系研究科感染病態学分野）
3. HIV 侵入過程の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法を用いた解析 49
分担研究者：小島 朝人（国立感染症研究所・感染病理部）
4. エズリンの関与 51
分担研究者：久保 嘉直
（長崎大熱帯医学研究所・エイズ感染防御分野）

柱 2. HIV 複製制御研究 (続)	
(ii) 初期過程制御の研究	
5. Vpr 結合因子の検索	55
分担研究者：間 陽子	
(理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット)	
6. ウイルスゲノム動態におけるインテグラーゼの機能的関与 および関連宿主因子の同定	59
分担研究者：増田 貴夫	
(東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科免疫治療学)	
(iii) 転写制御の研究	
7. T 細胞サブセットと HIV-1 トロピズム	63
分担研究者：生田 和良	
(大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野)	
(iv) 複製後期過程の制御	
8. Gag 蛋白の細胞質内輸送経路の解析	67
分担研究者：森川 裕子	
(北里大附生命科学研究所・ウイルス感染制御学教室)	
(v) アクセサリー蛋白質の制御	
9. Vif およびその結合因子の構造機能解析	71
分担研究者：足立 昭夫	
(徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学)	
10. Vif 新規機能探索	75
分担研究者：明里 宏文	
(国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター)	
11. Vpr 誘導細胞周期異常の機構解明	79
分担研究者：増田 道明 (獨協医科大学・微生物学)	
(vi) ウイルス粒子のプロテオーム解析	
12. HIV 粒子のプロテオーム解析	81
分担研究者：三隅 将吾	
(熊本大学大学院・医学薬学研究部薬学生化学分野)	
III. 業績一覧 (2004)	85

I. 総括研究報告書

HIV の増殖・変異の制御に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所・遺伝子解析室・主任研究官）

研究要旨

当該年度は、3年計画の1年目にあたる。

【目的】 ゲノム易変異性に富む HIV の制御には、絶えず新たな作用点をもつ抗 HIV 薬を開発していくと共に、易変異性を直接制御する方法を開発することが重要と考える。そこで本研究では、HIV の複製と変異の「未知の調節機構」を立体構造の情報を取り入れて明らかにし、HIV の理解と新規抗 HIV 薬の開発に役立てることを目的とする。

【期待される成果】 本研究で得られる新情報を速やかに国内外学術誌等に発信し、HIV 複製と変異研究の進展に貢献する。新たな抗 HIV 薬開発の基礎情報を提供する。3年計画の年度内に期待される学術上の主な新知見を以下に記す。

- (1) HIV 変異と複製の新たな調節因子の発見
- (2) HIV 変異と複製の新たな調節機構の発見
- (3) HIV 蛋白質およびその結合因子の立体構造

【当該年度成果】 分担計画を概ね達成し、次年度以降の基礎を作った。一部の分担研究で、学術的なインパクトが高く、かつ新規抗 HIV 薬の開発（Tat 阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、Vpr 阻害剤、Gag 輸送阻害剤、RT 阻害剤）につながる興味深い知見を得た。

【展望】 3年計画の年度内に抗 HIV 薬候補化合物のスクリーニングに着手する。

分担研究者（18名）

高橋 秀宗（国立感染症研究所）
村上 努（国立感染症研究所）
駒野 淳（国立感染症研究所）
西澤 雅子（国立感染症研究所）
明里 宏文（国立感染症研究所）
小島 朝人（国立感染症研究所）
櫻木 淳一（大阪大微生物病研究所）
久保 嘉直（長崎大熱帯医学研究所）
増田 貴夫（東京医科歯科大学大学院）
三隅 将吾（熊本大学大学院）
間 陽子（理化学研究所）
森川 裕子（北里生命科学研究所）
増田 道明（獨協医科大学）
原田 信志（熊本大学大学院）
服部 俊夫（東北大学大学院）
岡本 尚（名古屋市立大学大学院）
生田 和良（大阪大微生物病研究所）
足立 昭夫（徳島大学大学院）

る。HIV 感染者の総数は2004年末で約4,000万人と推定され、年間500万人が新たに感染している。感染規模の大きさ、および予防・根治治療の困難性などから、人類共通の大きな社会問題となっている。

HIV 感染の予防・根治治療を難しくする原因は、ウイルスの易変異性にある。HIV はその高度の変異性により、今のところ、感染と増殖を阻止するためのあらゆる方法（宿主免疫、抗 HIV 薬治療、ワクチン）の効果を減じること成功している。この問題に対処するには、①新たな作用点をもつ抗 HIV 薬を開発し、ウイルス増殖抑制効果を高めて間接的に逃避変異体出現頻度を低めるとともに、②変異を直接制御する方法を開発することが重要と考える。

本研究では、これらの新抗 HIV 薬（複製・変異制御薬）の開発基盤を提供することを目的とし、HIV の複製・変異に関わる未知の調節過程を分子レベルで明らかにするための基礎研究を組織的に実施する。

A. 研究目的

エイズの原因となる HIV 感染は、近隣アジア諸国も含めた全世界的流行が続いてい

B. 研究方法

概ね以下の戦略で HIV の理解を深め、薬剤開発につなげる。

(1) HIV 変異と複製の調節因子の同定

A. 結合因子の同定

- * pulse-chase 免疫沈降法
- * pull-down 法
- * 酵母 two-hybrid 法
- * phage display 法
- * 親和性クロマトグラフィー、など

B. 相互作用の意義検証

- * 変異導入解析
- * 代謝阻害剤
- * siRNA
- * dominant negative 変異体
- * 反応速度解析、など

(2) 立体構造情報の入手

立体構造・分子認識解析の専門家との連携を強化。調節因子とウイルス因子の接触面の構造情報を得る。以下の手法については、研究班独自に解析を試みる。

A. 計算科学解析

B. X線結晶構造解析

(3) 阻害候補分子の探索

- A. in silico screening → 化学合成 → 実験による評価
- B. 粗抽出液からの精製

● 分担研究課題

* 複製・変異の2本の研究の柱を設定。以下の分担課題を3年計画で遂行。本年度は3年計画の初年度で、研究基盤形成を主目標とした。

(柱1. HIV 変異制御研究)

① 転写酵素の基質選択性制御の研究 (佐藤): 基質選択の調節因子の同定と in silico screening による薬剤耐性発現・ウイルス変異制御分子の探索。② 逆転写酵素機能制御の研究 (駒野): 細胞由来の逆転写酵素阻害因子の同定とこれを用いた制御法開発。③ 脱殻制御の研究 (村上): HIV 脱殻・逆転写調節因子の同定とこれを用いた制御法開発。④ 変異率制御の研究 (久保): 細胞内環境での逆転写に伴う変異導入頻度の迅速測定系樹立。①②③で同定された細胞因子が変異頻度に及ぼす影響の検討。⑤ ゲノム二量体化制御の研究 (櫻木): HIV ゲノム二量

体化と逆転写・組み替え効率に影響する RNA 構造要因と蛋白質の同定。⑥ ゲノム安定性制御の研究 (高橋): ゲノム安定性の調節因子の同定。組み換え頻度の迅速定量法の樹立。①②③⑤で同定された因子が組み換え頻度に及ぼす影響の検討。⑦ プロテアーゼ変異制御の研究 (西澤): 薬剤耐性プロテアーゼの X 線結晶構造解析。

(柱2. HIV 複製制御研究)

① 侵入制御の研究: 脂質膜流動性の調節要因探索とこれに基づく侵入制御法開発。(原田)、HIV-1 V3 の水溶液中の立体構造解析とこれに基づく侵入制御法開発(服部)、膜裏打ち/細胞骨格蛋白質の調節要因探索とこれに基づく侵入制御法開発(久保)、侵入過程を再現する無細胞系と細胞系の樹立と、阻害剤探索(小島)。② 複製初期過程制御の研究: インテグラーゼ新機能と結合蛋白質の同定、これに基づく複製初期過程制御法開発(増田貴)。Vpr 新機能と結合蛋白質の同定、これに基づく複製初期過程制御法開発因子(間)。③ 転写制御の研究: Tat/結合因子の複合体の構造解析と in silico screening による Tat 阻害分子の探索(岡本)。HIV 転写制御因子の同定とその制御法開発(生田)。④ 複製後期過程制御の研究(森川): Gag 細胞内輸送の責任因子の同定とその制御法開発。⑤ Vif 機能制御の研究: Vif 新規能同定とその制御法開発(明里)。Vif 分解調節機構の解明とその制御法開発(足立)。⑥ 細胞周期/HIV 増殖制御の研究(増田道): Vpr の G2/M arrest 誘導の責任因子の同定とその制御法開発。⑦ ウイルス粒子のプロテオーム解析(三隅): HIV 粒子中の蛋白質修飾の同定とその意義の解明。粒子中に存在し、複製・変異に関与する細胞因子の同定。

* 平成17年度新企画: siRNA ライブラリー (257 種) を用いた宿主因子の網羅的探索、または生理的意義の検証 (希望者全員が参加)

(倫理面への配慮)

本研究では、人と動物を用いた研究は行わなかった。

C. 研究結果

各自、予定の分担研究計画を概ね達成し、次年度以降の展開の基礎を作った。一部の分担研究で、学術的なインパクトが高く、かつ新規抗 HIV 薬の開発につながる興味深い知見を得た。

(柱1. HIV 変異制御研究)

- ① 逆転写酵素の基質選択性制御の研究 : ATP に逆転写酵素の基質選択に関わる“allosteric effector”機能があることをはじめて見いだした。計算科学的手法により ATP 結合部位の構造情報を得た。この結果と反応速度解析をもとに、基質アナログ耐性発現と基質選択を説明するモデルを作った (佐藤)。
- ② 逆転写酵素機能制御の研究 : HeLa 細胞、非霊長類ほ乳類細胞、酵母と大腸菌の抽出液中に、逆転写酵素活性を抑制する因子を検出した (分子量 50 kD 以上、熱感受性、非プロテアーゼ/ヌクレアーゼ、非多糖類)。それらの生化学的性質は異なっていた (駒野)。
- ③ 脱殻制御の研究 : 脱殻・逆転写に欠損をもつ Gag マトリックス変異ウイルス、およびその復帰変異体を同定した。これらを用いたプロテオーム解析により脱殻・逆転写調節因子を同定する系の樹立を検討中 (村上)。
- ④ ゲノム二量体化制御の研究 : 独自のゲノム RNA 二量体化アッセイ系を用い、二量体化の必要十分領域を約 150 塩基に絞った。ポリアデニル化シグナル、プライマー結合領域、スプライシングドナー等の機能領域は不要であった (櫻木)。
- ⑤ ゲノム安定性制御の研究 : 新たな HIV-1 ゲノム RNA の安定性の制御因子として、AU に富む mRNA の分解に関与する tristetruprolin (TTP) を同定した。TTP は、活性化 T 細胞において、HIV 産生を抑制した。(高橋)
- ⑥ 変異制御プロテアーゼ変異制御の研究 : 薬剤耐性変異を導入した HIV-1 プロテアーゼの高度精製方法を確立した。活性型プロテアーゼの結晶構造解析の準備を整えた (西澤)。
- ⑦ 変異制御の研究 : Tat 発現に伴う宿主

遺伝子発現変化を追求し、Tat は AP-4 と相互作用することで DNA 傷害の際の修復酵素である OGG1 の発現を強く誘導し、細胞内 8-oxo-dG 産生を抑制することを見いだした。HIV プロウイルス DNA の GC→TA transversion の抑制に関わる可能性を示唆した (岡本)。

(柱2. HIV 複製制御研究)

- ① 侵入制御の研究
 - ・電子スピン共鳴法により、HIV 吸着時の膜流動性変化 (温度、脂質、キシロカイン処理に伴う変化) が HIV 感染価の変化と相関することを証明した。HIV-1 の multiple-site binding が感染成立に必要で、この過程に膜流動性が関与することを示唆した (原田)。
 - ・円二色性分光 (CD) 解析により、V3 ループは中性水溶液中で一般に不規則構造をとるが、pH 低下により、25-40%が α ヘリックス構造をとることを見いだした (服部)。
 - ・膜裏打ち蛋白質と細胞骨格を架橋するエズリンが HIV 感染に果たす役割を調べた。エズリンの dominant negative 変異体強発現により、HIV-1 感染価がヒト細胞の種類依存的に 40-70%に低下することを見いだした。エズリンが侵入効率の調節因子であることを示唆した (久保)。
 - ・ β ラクターゼをパッケージした HIV-1 粒子を用いた細胞侵入・脱殻の半定量解析系を樹立した (小島)。
- ② 複製初期過程制御の研究
 - ・インテグラーゼの変異導入解析 (ウイルスゲノム cDNA との結合能欠損変異体の作製の形質解析) により、インテグラーゼの新規機能 (プロウイルス核内輸送能) をはじめて明確に証明した。また、酵母 two-hybrid 法などにより複製に必須の新規インテグラーゼ結合因子を同定した (増田貴)。
 - ・Vpr の変異導入解析 (Importin α 結合能欠損変異体、核膜局在能欠損変異体の作製と形質解析) により、Vpr/Importin α 複合体形成がウイルスのマクロファージおよび T 細胞における増殖に必要である

ことを証明した。また、大腸菌を用いて発現・精製した Vpr と Importin α が安定に複合体を形成する条件を決め、結晶構造解析の準備を整えた (間)。

③ 転写制御の研究

・ HIV-1 Tat の機能発現に必要な Tat/TAR/Cyclin T1 複合体形成に着目し、計算科学的手法により 3 つの分子の複合体モデルをつくり、実験結果をよく説明するモデルを得た。これにより、それぞれの分子の接触面の精密な構造情報を得ることはじめて成功した (岡本)。

・ CD4+T 細胞 CD38+ 及び CD38- サブセット間で HIV-1 感受性の差を生み出す転写調節関連因子の候補として、19 種の宿主遺伝子を同定した。このうちの RNF125 について解析を進め、RING ドメインを介した HIV-1 LTR 転写阻害効果を見いだした (生田)。

④ 複製後期過程制御の研究

・ 酵母の分子遺伝学解析により、Gag 細胞内輸送の責任因子候補を網羅的に探索し、初期エンドゾーム/TGN 及び後期エンドゾームの輸送蛋白質を複数同定した。これらのヒトホモログ Syntaxin6, 16, 12 と Gag をヒト細胞で強発現して局在を調べ、これらが相互作用する可能性を示唆した (森川)。

・ Vif の一部はウイルス粒子内に取り込まれて Gag p2/NC プロセッシングを阻害すること、Vif N 末欠損変異体の中に、ウイルス粒子に過剰に取り込まれ、強く感染性低下をもたらすものがあることを見いだした (明里)。

⑤ Vif 機能制御の研究：細胞内 Vif の発現量がプロテアソームでの分解により調節されており、他の HIV 蛋白質より短寿命 (半減期 20 分) であることを見いだした。変異導入解析によりプロテアソーム分解調節に関与する残基を同定した (足立)。

⑥ Vpr 依存細胞周期制御の研究：分裂酵母の分子遺伝学解析により Vpr 依存 G2/M arrest に関与する細胞周期調節蛋白質を複数同定した。ヒトホモログ 14-3-3 β についてヒト細胞での G2/M arrest に関与することを示した。また、FIV Orf-A 遺

伝子産物に、Vpr と同様の G2/M arrest 誘導活性があることを見いだした (増田道)。

⑦ ウイルス粒子のプロテオーム解析：ズブチリシンを用いた独自の高度精製 HIV-1 粒子精製法を樹立し、粒子由来蛋白質の種類と修飾状態を網羅的に解析した。その結果、粒子内 Gag p24 の一部が N 末プロリンのホルミル化を受けていること、粒子に取り込まれる Cyclophilin A に最低 4 種の isoform が存在する事を見いだした (三隅)。

D. 考察

活発な研究を行い、分担研究計画を概ね達成し、次年度以降の展開の基礎を作った。一部の分担研究で、学術的なインパクトが高く、かつ新規抗 HIV 薬の開発につながる興味深い知見を得た。

なかでも

- (1) インテグラーゼ研究 (インテグラーゼ新機能の証明、並びに複製に必須のインテグラーゼ結合因子の同定 [増田貴])
- (2) Tat 研究 (Tat/TAR/Cyclin T1 複合体モデル作製と評価 [岡本])
- (3) Vpr 研究 (Vpr/Importin α 複合体形成の重要性の証明 [間])
- (4) Gag 研究 (Gag 細胞内輸送の責任因子の網羅的探索と候補因子の同定 [森川])
- (5) RT 研究 (RT 耐性発現と基質選択に関わる因子の発見と結合部位の予測 [佐藤])

は、特筆に値する。いずれもまだ課題はあるが、計画年度内に独自性と水準の高い研究に発展する可能性がある。(2)は、in silico screening による阻害剤候補化合物の同定と実験評価を試みる段階に来たと考える。(5)は分子遺伝学的解析により ATP 結合の生理的意義を確認すれば、in silico screening による阻害剤候補化合物の同定と実験評価を試みる価値があると考えられる。(1)、(3)は、複合体形成の生理的意義についてはよく検証されているので、結合因子とウイルス因子の接触面の構造情報を入手すれば、調節の分子機序解明とともに薬剤開発につながる

る。(4)は、酵母で見いだされた調節因子のヒト細胞での意義/Gag 結合能を検証して真の責任因子を明らかにすれば、複製後期過程は謎が多いため学術価値が高く、また薬剤開発にもつながる。

他の分担研究も概して水準が高く、次年度以降の進展が大いに期待される。それぞれ独自の複製・変異調節因子、あるいは調節機構を見いだしており、解析を着実に進めれば HIV 蛋白質/ゲノムと相互作用する重要な調節因子の特定が期待できる。3年計画の年度内に期待される学術上の主な新知見を以下に記す。

- (1) HIV 変異と複製の新たな調節因子の発見
- (2) HIV 変異と複製の新たな調節機構の発見
- (3) HIV 蛋白質およびその結合因子の立体構造

***当該年度の達成度について：**

活発な研究により、初年度研究計画はおおむね達成された。

***研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：**

得られた成果を国際学術誌にコンスタントに多数発信しており、また特許取得に活用していることから、本研究の学術的・国際的・社会的意義は高い。

***今後の展望について：**

次年度は、①一部の分担研究について、阻害剤候補化合物のスクリーニングに着手する、②“意味のある構造解析・薬剤開発”のために、また“作用点の異なる2の矢、3の矢の薬剤標的分子発見”のために、各自の分担研究を続行し、HIV複製と変異調節の理解に活用する、③分担研究における立体構造解析の適用度を高める、の3点に重点を置く。今後2年間の研究により、エイズ制御と生命科学のブレークスルーにつながる学術成果を複数得ること、新しい作用点をもつ抗HIV薬の候補化合物を一種類以上同定すること、を3年計画の最終目標としたい。

E. 結論

3年計画の1年目として活発な分担研究を行い、各自の計画をおおむね達成した。概して研究水準は高く、特に一部の分担研究で、学術的インパクトが高く、かつ新規抗HIV薬の開発につながる興味深い知見を得た。今後2年間の研究計画年度終了時までには、複数の高水準の学術成果と抗HIV薬開発基盤の提供が期待できる。ただし、薬剤開発を現実的なものとするには研究面と財政面の双方にまだ課題がある。関係者とともに対応策を議論し、さらなる研究の進展につなげたい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

業績一覧参照。

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

(1) 駒野淳：A Method of Identifying Inhibitors of EBNA-1(William M. Sugden, A. Jun Komano, Gregory D. Kennedy., US patent #6, 811, 983).

(2) 間陽子：HIV-1 感染を阻害する変異 Vpr タンパク質及びそれを含む医薬組成物（間陽子、飯島沙幸、笠原優子、木全清典、特願 2004-226462）。

(3) 間陽子：アポトーシス誘導物質を含む医薬組成物（間陽子、渡来仁、三浦智行、特願 2004-298288 号）。

(4) 間陽子：リポソーム（間陽子、渡来仁、河野健司、特願 2004 298238）。

(5) 生田和良：HIV 等のウイルス感染の有無、又はプリオン感染の有無を近赤外線分光法により検査・判定する方法、及び同方法に使用する装置（作道章一、ツェンコバ・ルミアナ、生田和良、小野寺節、特願 2004-329249）。

II. 分担研究報告書

1. 逆転写酵素の基質選択制御の研究：調節因子探索

主任研究者： 佐藤 裕徳 国立感染症研究所 遺伝子解析室
研究協力者： 横山 勝 同上& 熱帯医学研究所 エイズ感染防御分野

研究要旨：昨年度、反応速度解析により、ATP に逆転写酵素 (RT) の基質選択調節に関わる allosteric effector 機能があることを見いだした。今回、計算科学的手法 (MOE) により、ATP と dNTP の結合部位が異なることを示した。これらの結合部位は、RT の分子遺伝学解析、および生化学解析の実験結果をよく説明した。この結果と反応速度解析の結果をもとに、ATP 依存的基質選択を説明するモデルを作った。

A. 研究目的

HIV ゲノムの変異は、HIV 感染の予防・治療を難しくする主要原因である。変異性を制御できれば、治療薬とワクチンの効果を高めることができる。しかし、現行の変異研究は“HIV 変異の観察記録”に終始しており、変異の制御法開発には役立たない。

HIV 変異の制御には、変異率を調節するしくみを理解する必要がある。HIV 変異率は他の DNA ポリメラーゼに比べて高い。これは、主に HIV 逆転写酵素 (RT) による基質選択の精度が低く、かつ校正機能を持たないためと推測されている。仮に RT 基質選択の trans 制御因子がわかれば、変異率制御法の開発につながる。また、HIV 感染者の治療薬である基質アナログに対する耐性発現のしくみを理解し、制御する方法の開発にもつながる。

DNA 合成に関わるポリメラーゼに共通する高精度の基質選択のしくみは、まだ十分にはわかっていない。生物の遺伝と進化に関連する未解決の重要課題といえる。精度が低いとされる HIV RT でさえ塩基置換率は約 10^4 置換/塩基と報告されており、高度の忠実度を保っている。RT をモデルとして DNA 合成酵素の高精度の基質選択のしくみを解き明かすことは、学術的意義も大きい。ただしこれまでにポリメラーゼの基質選択を trans に調節する因子の報告は無い。

昨年度までに、薬剤治療を受けた感染者由来の HIV を用いた分子遺伝学的解析により、基質アナログ耐性の発現に必要な変異の組み合わせ (多剤耐性変異) をゲノムの RT 遺伝子上に特定した。不思議な事に、

これらの変異をもつ RT を精製し、*in vitro* RT 活性測定で薬剤感受性を調べると、野生株と同等の高い感受性を示した。この結果は、生理的条件下での高精度の基質選択能は、RT の構造要因だけでは付与されず、trans に調節する細胞因子を必要とすることを強く示唆する。

RT 基質選択の細胞性 trans 調節因子の候補として ATP に着目した。ATP は、RT の本来の基質である dNTP に構造が類似する。また、生理的条件下で逆転写反応がおきる場である細胞質に mM 濃度で存在する。さらに、試験管内で、DNA 合成の逆反応であるピロリン酸分解反応を誘起する。これらの性質は、RT と ATP が直接相互作用してその機能を調節する可能性を示唆する。実際、精製 RT の反応速度解析により、ATP に RT の基質選択調節に関わる allosteric effector 機能があることを見いだした。

今回、計算科学的手法 (MOE) により、上の結論を支持する結果として、ATP は基質と異なる場所に結合するとの結果を得た。また、ATP および dNTP の結合部位は、これまでの RT に関する分子遺伝学解析、および生化学解析の実験結果をよく説明した。

B. 研究方法

(1) 計算科学解析用アプリケーション

北米で開発された統合計算化学システム MOE (カナダ CCG 社) を用いた。

(2) RT 分子モデル作製の材料

東南アジア流行株 HIV-1 CRF01_AE の 93JP-NH1 株 (薬剤感受性株) と ②ERT-mt6 株 (ヌクレオシドアナログ多剤耐性株)

の配列を用いた。

(3) 蛋白質分子モデル作製法

RT の X 線結晶構造の 3 次元位置座標情報 (1RTD または 1N6Q) をもとに MOE のホモロジーモデリングとエネルギー最小化プログラムを用いて作製した。得られた初期モデルは、チャーム (CHARMM22) 力場またはアンバー (AMBER94) 力場を用いてエネルギー最小化を行い、熱力学的に最も安定で立体障害の無い構造を決定した。PDB 番号 1RTD は、HXB2 株 p66p51 ヘテロダイマー・DNA・dTTP・Mg⁺⁺複合体、1N6Q は HXB2 株 p66p51 ヘテロダイマー・DNA-AZTMP・Mg⁺⁺複合体である。

(4) 低分子化合物分子モデル作製

逆転写酵素の基質、基質アナログ、ATP の分子構造は、PDB 3 次元位置座標情報をもとに、MMFF94S 力場を用いてエネルギー最小化を行い、熱力学的に最も安定な構造を求めた。

(5) ATP 結合部位の検索

モデル分子に対して結合シミュレーションプログラム (AS_Dock) を用いて、ATP 結合部位検索を行い、ATP の結合部位を予測した。薬剤・基質の結合エネルギーは、 $E_{bind} = E_{complex} - (E_{enzyme} + E_{inhibitor})$ により求めた。ここで E_{bind} は結合エネルギー、 $E_{complex}$ は複合体の内部エネルギー、 E_{enzyme} は酵素の内部エネルギー、 $E_{inhibitor}$ は薬剤の内部エネルギーとした。

今回と同様の方法で HIV-1 プロテアーゼと基質アナログの結合シミュレーションを行い、得られた結果を既知の結晶構造と比較し、両者のずれの平均値 (RMSD 値) を求めた。その結果、RMSD 値は 0.45Å 未満に収まった。MOE を用いたタンパク質と低分子化合物の結合シミュレーションは精度が極めて高いことが確認できた。

C. 研究結果

(1) RT 分子モデル作製

HXB2 株 RT を鋳型とし、RT による DNA 合成における 4 つの状態のうちから 2 つの状態、トランスロケーション前の複合体 (pre-translocation complex) およびトランスロケーション後の複合体

(post-translocation complex) の構造を作製した。

(2) RT 分子モデルの評価

得られたモデルについて Ramachandran plot, Chi plot, Distance Matrix 解析を行い、種々の補正を行った後、熱力学的に安定で立体障害の無い構造 (ヘテロダイマー) が得られた。

(3) ATP 結合部位予測 (図 1)

RT の pre-translocation complex および post-translocation complex 分子モデルに対する結合シミュレーションより、ATP は Palm 内腔の一部に結合する結果が得られた。

(4) 基質結合部位予測 (図 1)

フィンガードメインの開いた酵素/DNA/基質複合体 (open ternary complex) 分子モデルを、post-translocation complex 分子モデルに対して dTTP 結合シミュレーションを行うことで作製した。得られた分子モデルから、dTTP はβ3-β4 ループに沿った部位に結合する結果が得られた。他の dNTP、および基質アナログも、ほぼ同一の部位に結合した。

(5) 結合シミュレーションの評価

ATP と dTTP の予測された結合部位は、これまで得られた種々の実験結果をよく説明した。

①ATP 結合部位は基質結合部位とは異なっていた。これは、ATP は RT のアロステリック調節因子であるとする反応速度解析結果と一致する。

②ATP は、Primer 3'末端塩基近傍に結合した。これは、ATP に 3'末端切断反応を促進する効果があるとの実験結果と一致する。

③ATP は、酵素のトランスロケーション反応に関与する YMDD モチーフの D185 の近傍に結合した。これは、ATP 結合が RT の DNA 合成速度 (Kcat) に影響するとの反応速度解析結果と一致する。

④基質および基質アナログはβ3-β4 ループに結合した。これは、基質アナログ耐性変異がβ3-β4 ループ近傍に集中していることをよく説明する。

⑤ATP はβ3-β4 ループの一部のアミノ酸

側鎖と相互作用する位置に結合した。これは、ATP 結合が $\beta 3$ - $\beta 4$ ループに生じる変異と協調して、高度の基質アナログ耐性を発現することをよく説明する。

(6) 基質選択モデルの作製 (図 2)

これまでの我々の実験結果と計算科学解析結果、および他の研究グループによる RT の解析結果をもとに、RT による基質選択のモデルを作った。

D. 考察

今回、計算科学的手法を用い、ATP および基質の結合部位を予測した。得られた結果は、我々、および他の研究グループの実験結果をよく説明した。また、既知の複合体構造との比較により、MOE による低分子化合物結合部位検索が超高精度で行えることも確認できた。これらの点から、今回、ATP と基質の妥当な結合部位を予測したと考えている。この点は、さらに予測された結合部位の変異導入解析などにより明確にしていく予定でいる。

また、これまでの結果を統合して、RT による基質選択モデルをつくった。このモデルは、基質選択は、①基質の Fingers 結合時、②Fingers 構造変化、③トランスロケーション反応時、の複数のステップで調節されていると予測する。さらに、RT の基質選択の忠実度は、Fingers 変異 (= 基質アナログ耐性変異) と ATP 結合により変化することを予測する。今後、モデルの検証を通じ、ATP による基質選択調節のしくみ、ならびに薬剤耐性発現のしくみを明確にしたい。さらには、得られた情報を新規薬剤の開発につなげたい。

E. 結論

ATP に逆転写酵素の耐性発現と基質選択に関わる "allosteric effector" 機能があることをはじめて見だし、計算科学的手法により ATP 結合部位の構造情報を得た。この結果と反応速度解析をもとに、耐性発現と基質選択を説明するモデルを作った。今後は、①変異導入解析を行い、ATP 結合の基質選択 (薬剤耐性発現) における生理

的意義を検証する、②in silico screening を行い、ATP 結合を阻害する候補化合物を同定する、などを実施する。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kinomoto M, Yokoyama M, Sato H, Kojima A, Kurata T, Ikuta K, Sata T, and Tokunaga K. Amino acid 36 in HIV-1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J. Virol.* (in press)

2. 口頭発表

- (1) 長縄聡、富田康浩、横山勝、北村勝彦、佐藤裕徳、HIV-1 準種の中和抵抗性と定方向進化第 5 2 回ウイルス学会総会、2004 年 11 月 21-23 日、横浜。
- (2) 富田康浩、Wadchara Pumpradit、Nuanjun Wichukchinda、Panita Pathipvanich、Pathom Sawanpanyalert、草川茂、武部豊、巽正志、田中真理、横山勝、有吉紅也、佐藤裕徳：HIV-1 CRF01_AE R5 ウイルス株 NH2 に固有の抗体回避機構。第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月 9-11、静岡。
- (3) 長縄聡、富田康浩、横山勝、鈴木健之、白井輝、上田敦久、岳野光洋、武部豊、加藤佳代子、椎野禎一郎、朽久保修、石ヶ坪良明、北村勝彦、佐藤裕徳：HIV-1 CRF01_AE R5 ウイルス V3 配列に起因する抗体回避機構。第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月 9-11、静岡。
- (4) 横山勝、木ノ本正信、徳永研三、佐多徹太郎、長縄聡、北村勝彦、蜂谷敦子、岡慎一、服部知秀、田中真理、横幕能行、有吉紅也、星野忠次、仲宗根正、佐藤裕徳：計算科学の HIV-1 研究への適用に関する基礎研究。第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月 9-11、静岡。

H. 知的所有権の取得状況

なし

図1 ATP と基質の結合部位予測

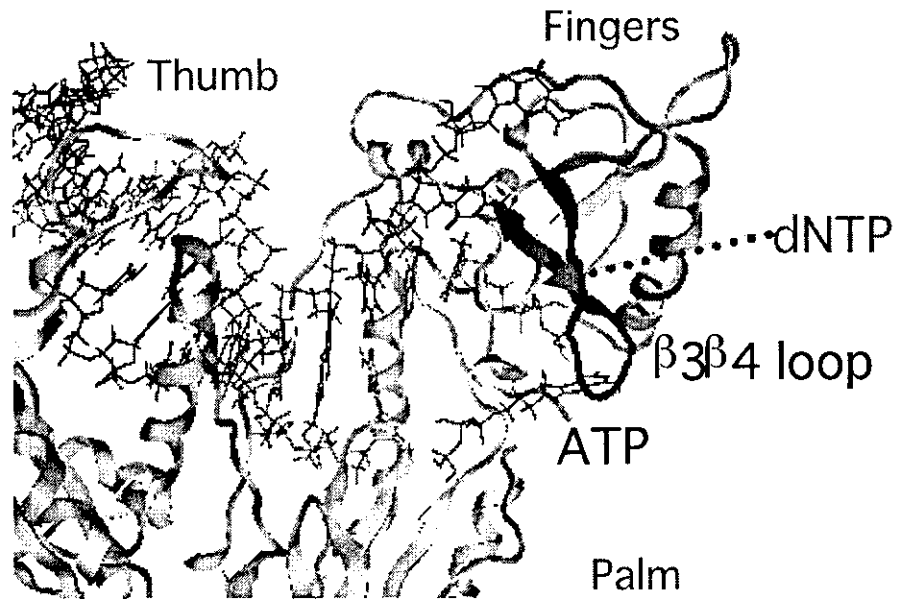
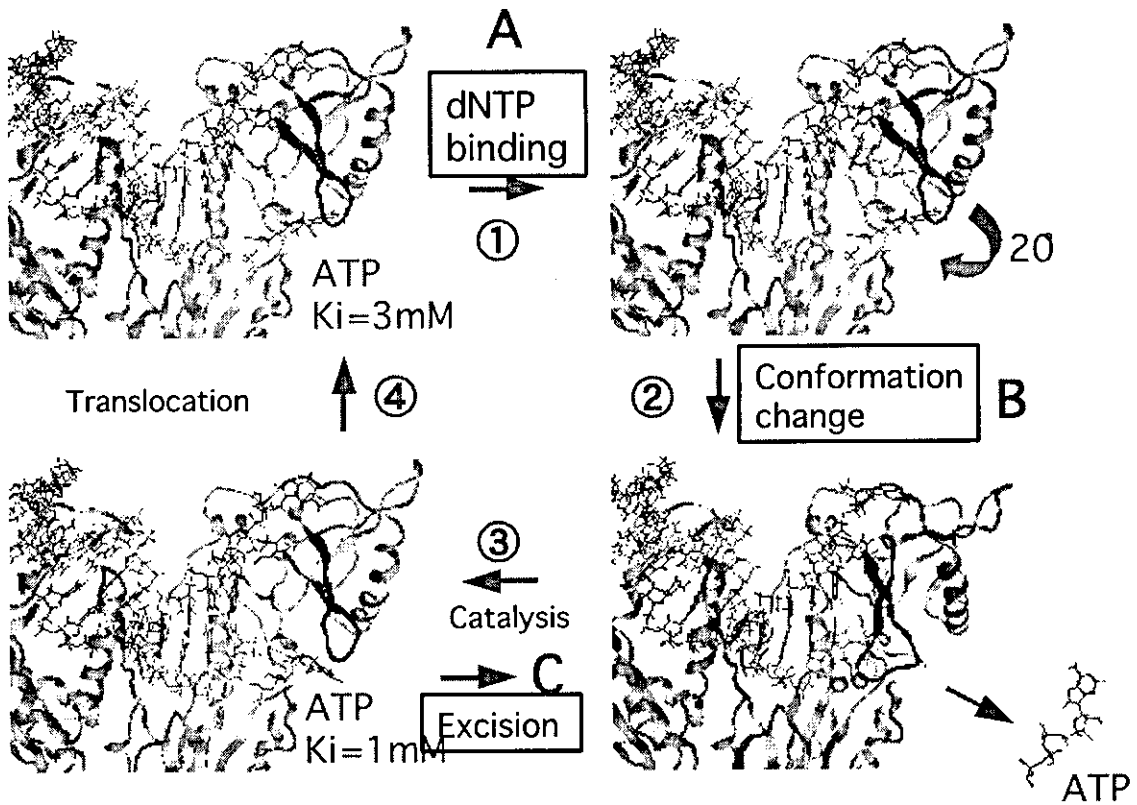


図2 基質選択のモデル



2. 逆転写酵素機能制御の研究

分担研究者 駒野 淳 (国立感染症研究所 エイズ研究センター)

研究要旨

逆転写酵素(RT)は、HIV-1 の複製に必須のウイルス酵素である。RT の機能を理解することはウイルス複製を制御し、エイズの治療法を開発するために重要な示唆を与える。細胞が HIV-1 感染に抵抗性を持つ場合、restriction factor によって RT の進行が阻害されることがある。また、RT の fidelity は試験管内と細胞内では異なる。このように、細胞因子が RT 機能に影響することを示す知見が複数存在する。本研究では、HIV-1 の RT に直接結合し、その機能に影響を及ぼす宿主因子が存在するかを生化学的アプローチにて検索した。その結果、おそらくタンパク性の易熱性 RT 阻害因子の存在が示唆された。

A. 研究目的

レトロウイルスの複製において、逆転写は必須のプロセスである。これによってゲノム RNA が DNA に変換され、宿主のゲノムに組み込まれる。逆転写を担う酵素は、逆転写酵素 reverse transcriptase (RT) であり *pol* 遺伝子産物である。HIV-1 の RT 特異的阻害剤は HAART の構成要素として非常に重要である。

精製された RT は、試験中で逆転写反応を遂行することが出来る。しかし、HIV-1 が感染した細胞における RT 活性は、試験管内のそれとはやや異なることが知られている。例えば、HIV-1 感染に抵抗性を示す一部の細胞では、Lv1/Ref1 と呼ばれる感染抑止因子によって HIV-1 感染が成立しないことが知られている。このとき、ウイルスゲノムの逆転写が阻害される。この現象に capsid と宿主因子の相互作用が重要であることが知られている。一方、逆転写反

応の際 RT は一定の確率 (約 1/10,000) で間違ったヌクレオチドの取り込みを起こす。fidelity も試験管内と細胞内では異なることが知られている (Mansky L M, Temin H M. J Virol. 1995 Aug; 69(8): 5087-94)。細胞因子に由来する RT 酵素活性の修飾は HIV-1 感染メカニズムを解明するのに重要な手がかりを与えるだけでなく、これを利用してウイルス複製を制御し、エイズ進行を阻止することを可能にするかもしれない。

RT には RNA-dependent DNA polymerase 活性、DNA-dependent DNA polymerase 活性、RnaseH 活性がある。本年度は RT の RNA-dependent DNA polymerase 活性に着目し、これを制御する細胞因子が存在するか生化学的手法を用いて解析したのでここに報告する。

B. 研究方法

精製された HIV-1 RT に基質 (polyA, oligo

dT、³²P dTTP) を加え、逆転写反応を行い、合成されたDNAに取り込まれたRI活性によりRNA-dependent DNA polymerase活性を測定する。この系に細胞抽出液を加え、その結果活性が変化するかを測定する。また、活性を変化させる因子がどのような物理的特徴をもつかを分子量、熱安定性、種特異性、Rnase/Dnase/Protease inhibitor、ConA に対する感受性他をもとに決定した。

C. 研究結果

RTのRNA-dependent DNA polymerase活性は、HeLa細胞、RK13細胞、S. Cerviciae、E. Coli抽出液存在下で抑制された。摂氏60度1分の加熱処理でHeLa細胞、RK13細胞、S. Cerviciae抽出液中のRT抑制活性は消失した。E. Coli抽出液は、摂氏60度に抵抗性を示した。分子量を特定するため、MWC0フィルターを使用して各抽出液を分画したところ、HeLa細胞、RK13細胞、S. Cerviciae抽出液中のRT抑制活性は100kD以上の分画に、E. Coliは50kD以上の分画に存在することが示唆された。一方過剰のBSA、過剰のRNase阻害剤、protease阻害剤、sheared DNA、ConAの存在下でRT抑制活性は阻害されなかった。抑制限界濃度で長時間反応させても基質や産物の分解は生じず、RT非存在下あるいはRTの特異的阻害剤存在下ではシグナル増強を検出しなかった。

D. 考察

この方法は、高分子核酸の中に取り込まれる RI 活性が、細胞抽出液存在下で低下

するかを検出するが、これは目的とする HIV-1 RT inhibitor 以外に、複数の原因で検出される可能性がある。それは、RT を分解する protease、基質を分解する RNase、基質あるいは産物を分解する DNase、dTTP を消費する活性をもつ酵素などである。一方、細胞抽出液に存在する内在性酵素による RT と同様の活性 (endogenous RT activity または DNA/RNA polymerase activity など) あるいは sheared DNA などによって結果が左右される可能性もある。しかし、これらの可能性は否定的であったことから、HeLa 細胞の抽出液中に、摂氏 60 度 1 分の加熱処理で活性を失う非プロテアーゼ、非ヌクレアーゼである 100kD 以上の分子量を有するか、100kD 以上の複合体を形成するようなタンパク性易熱性 RT 抑制因子が存在することが示された。これは非霊長類のほ乳類細胞 (RK13 細胞、ウサギ由来) や分裂酵母細胞抽出液にも存在する。しかし、大腸菌の細胞抽出液には、これとやや異なる物理的特徴をそなえた RT 抑制因子が存在することが示された。

HeLa 細胞に CD4 を発現させると、HIV-1 は感染することが出来る。しかし、RT 活性を抑制する因子が HeLa 細胞中に存在する。単純計算でおよそ 1 細胞あたり 10,000 分子の阻害分子が存在することが予想される。HIV-1 は RT 阻害活性を有する宿主因子を避けるルートで細胞に感染するのかもしれない。または、RT と異なる HIV-1 の遺伝子産物が RT 阻害活性を有する宿主因子の働きを阻害しているのかもしれない。

あるいは、RT と出会うことのない宿主因子が試験管の中で偶然出会った結果を見ている可能性も考えられる。

今後、免疫共沈降法とマスペクトロメトリーを併用するか、リバーズ・プロテオミクスなどの方法で RT と直接相互作用する因子の同定を試みる。

E. 結論

種々の生物種由来の細胞抽出液中に RT の RNA-dependent DNA polymerase 活性抑制因子が存在することが示唆された。

F. 研究発表

(1) 論文発表

Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Yamamoto N. Inhibiting the Arp2/3 Complex Limits Infection of Both Intracellular Mature Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses. *Mol Biol Cell*. 2004 Dec; 15(12): 5197-207. Epub 2004 Sep 22.

Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z. Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol* (in press)

(2) 学会発表

May 25-30 (Poster) Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Yoshiyuki Yokomaku, Zene Matsuda, The membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 is involved in the late steps of the membrane fusion, Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY, USA

May 25-30 (Poster) Zene Matsuda, Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Naoki Yamamoto, Inhibiting Arp2/3 complex limits infection of primate lentiviruses, Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY, USA

June 04-06 (Oral) Jun Komano, Do HIV-1's receptor/coreceptor molecules cluster upon viral attachment?, レトロウイルス研究会夏期セミナー (SRC2004) 千葉県長生郡長柄町

Aug 30-Sep 02 (Poster) Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Zene Matsuda, and Naoki Yamamoto, Inhibiting the Arp2/3 Complex Limits Infection of both Intracellular Mature Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses, The 4th Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefectural Awaji Yumebutai International Conference Center 1 Yumebutai, Awaji Island, Hyogo

Nov 21-23 (poster) 駒野 淳、浦野 恵美子、二橋 悠子、宮内 浩典、松田 善衛、山本 直樹、ウサギ由来の RK13 細胞においてヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)感染は逆転写後に抑制される、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜

Nov 21-23 (Poster) 駒野 淳、宮内 浩典、松田 善衛、山本 直樹、感染初期過程におけるウイルス種特異的なアクチン利用の相違、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜

Nov 21-23 (Oral) 駒野 淳、宮内 浩典、二橋 悠子、浦野 恵美子、松田 善衛、千葉 智子、三浦 秀佳、Lay Myint、杉浦 互、山本 直樹、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)複製を特異的に増強する小分子化合物 sparsomycin、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜

Nov 21-23 (Poster) 宮内 浩典、駒野 淳、松田 善衛、Alanine-insertion mutagenesis in membrane-spanning domain of HIV-1gp41、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜

Dec 8-11 (Poster) Jun Komano, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Kosuke Miyauchi, Zene Matsuda, and Naoki Yamamoto, Restriction of HIV-1 infection at the post-nuclear translocation process in rabbit cell

line RK13, the 27th Annual Meeting of the MBSJ, Kobe, Japan

Dec 8-11 (Poster) 宮内 浩典、駒野 淳、松田 善衛、Ala 残基挿入変異による HIV-1gp41 膜貫通領域の構造機能連関の解析 Analysis of structure-function relationship of membrane spanning domain of HIV-1 gp41 by scanning alanine-insertion mutagenesis, the 27th Annual Meeting of the MBSJ, Kobe, Japan

Dec 7-10, (Oral) Jun Komano, Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses, the 40th US-Japan Cooperative Medical Science Program, AIDS Panel, Kyoto, Japan

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

Nov 2, US patent #6,811,983

A Method of Identifying Inhibitors of EBNA-1

William M. Sugden, A. Jun Komano, Gregory D. Kennedy

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

3. HIV-1 脱殻・逆転写制御：調節因子探索

分担研究者 村上 努 国立感染症研究所エイズ研究センター

研究要旨：逆転写の効率と合成された DNA の安定性を低下させるマトリックスタンパク（MA）の変異（20LK）とその復帰変異（20LK/73EK/82AT）に細胞依存性があるかを種々の T 細胞株を用いて検討した。293T (HeLa)細胞を野生株、MA 変異株、復帰変異株でトランスフェクトして得られたウイルスを種々の T 細胞株に感染させ増殖を比較した。20LK 変異によるウイルス増殖阻害は細胞によってその程度が大きく異なっていた。一方、復帰変異はほとんどの T 細胞株で 20LK 変異を補償していたが CEM (12D7)細胞では全く補償しなかった。この復帰変異株の細胞依存性はシュードウイルスを用いた single round 感染系でも確認された。以上の結果は、MA 変異、復帰変異によってウイルスタンパクとの相互作用が変化する宿主因子の発現レベルに細胞依存性があることを示唆している。

A. 研究目的

我々は、HIV-1 マトリックスタンパク（MA）の 20LK 変異がウイルス侵入後の逆転写の効率と合成されたウイルス DNA の安定性を低下させること、73EK、82AT の 2 箇所の補償的追加変異がこの 20LK による欠損をほぼ完全に回復させることを報告してきた。本研究では、ウイルス侵入後の脱殻・逆転写過程に関与する宿主因子の探索・同定を最終目的として、20LK 変異と 20LK/73EK/82AT 復帰変異に細胞依存性があるかを種々の T 細胞株や活性化 PBMC を用いて検討した。また、HIV-1 侵入直後に欠損をもつ他の MA 変異株の検索も行った。

B. 研究方法

(1) ウイルス増殖カイネティクス測定：293T 細胞（または HeLa 細胞）を野生株（NL4-3）、MA 変異株、復帰変異株の分子クローンプラスミドでトランスフェクトして得られたウイルスを種々の T 細胞株（H9、CEM(12-7)、Jurkat、Molt-4、MT-4）、固定化抗 CD3 抗体で活性化したヒト PBMC に感染させ、上記ウイルスの増殖カイネティクスを測定した。

(2) Single round 感染系：ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として組込んだ Env タンパク欠損組換えウイルスプラスミドと HIV-1 Env（または Amphotropic MuLv Env, VSV-G）発現ベクターをコトランスフェクトして得られたシュード