

図 6

Vif 機能を応用した新規抗 HIV 薬開発のための基盤的研究

分担研究者 明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

研究協力者 李永仲、飯島沙幸

研究要旨：HIV-1 粒子内 Vif (v-Vif) は Gag p2/NC プロセッシングを特異的に制御する一方、過剰量ではウイルス成熟過程の阻害によりウイルス感染性を抑制する。その結果、Vif 10-13 アミノ酸残基（特に Trp11 および Gln12）が Gag p2/NC processing 阻害およびそれによるウイルス感染性抑制作用に係る機能ドメインであることが示された。この結果は Vif 及び Gag の結合様式やウイルス成熟阻害の分子機構の解明に重要な情報であり、Vif 機能をベースとした創薬に繋がることが期待される。

A. 研究目的

ウイルス粒子内 Vif (v-Vif) は用量依存性に Gag p2/NC プロセッシングのみを特異的に抑制することでウイルス成熟過程を阻害し、その結果として HIV-1 の感染性を抑制する (Akari et al.: J Biol Chem (2004) 279, 12355)。本研究ではこれまでとは異なる戦略、すなわち Vif 蛋白の本来持つ機能を部分的に負の方向へ拡大し、既存のプロテアーゼ阻害剤とは異なる機序でウイルス成熟を阻害することにより抵抗性変異ウイルスの出現を誘導しにくい新規抗 HIV 薬を開発することを目的とする。そこで Vif/Gag 蛋白間の結合様式や成熟阻害の分子機構を解明するためのステップとして、本機能を規定するアミノ酸領域のマッピングを行なった。

B. 研究方法

HIV-1 Vif タンパク質発現ベクターである pNLA1-43Vif を基に、site-directed mutagenesis 法により導入した一連の Vif N 末端欠失変異体もしくは点変異体発現ベクターを作成した。これらを HIV-1 分子クローンである pNL4-3Δenv 発現ベクターと共に H9 細胞または HeLa 細胞へ遺伝子導入し、24 時間後ウイルスおよび導入細胞を回収した。ウイルスタンパク質は Western blotting 法により解析を行った。ウイルス感染性は LuSIV 細胞を用いた single-round infectivity assay により評価した。

C. 研究結果

Vif N 末端欠失変異体発現ベクター及び pNL4-3Δenv を HeLa 細胞へ遺伝子導入し、24 時間後得られたウイルスの感染性を LuSIV 法により測定したところ、M-3 変異体で 10-13 アミノ酸残基の欠失変異により感染性抑制作用は完全に消失した (図 1)。細胞内における変異体の発現はほとんど野生型 Vif と同程度であった。またウイルス粒子への取り込み効率は、M-1 から M-5 までの変異体においてやや低下が見られた。しかしこれらの変異体間での違いは特に認められなかった (図 1)。この機能欠損は野生型 Vif とは異なり、発現量を増加させてもウイルス感染性抑制効果はほとんど見られなかった (図 2)。これらの結果は、10-13 アミノ酸残基 (VWQV) を全てアラニンに置換した M-3/4A 変異体においても M-3 同様に感染性抑制作用はほとんど認められなかった (図 3)。

次に M-3 領域 (VWQV) において、1 ないしは 2 アミノ残基を Ala に置換した変異体を作成し、これを用いて同様の解析を行った。この結果、Trp11 および Gln12 を Ala に置換した変異体 (W11A/Q12A) のみで感染性抑制作用が欠失するという予備的結果が得られた (図 4)。

ところで、22-25 アミノ酸残基の欠失変異体 (M-6) は野生型 Vif よりもさらに強い感染性抑制効果を示すが (昨年本研究班報告)、この作用は M-3 変異体とは異なり用量依存性であった (図 5)。

D. 考察

Vif は HIV-1 の標的細胞である CD4 リンパ球やマクロファージへの感染増殖に不可欠なウイルス蛋白である。しかし反面、最適量の数倍程度過剰に発現させるとウイルス感染性に負の影響を及ぼすことから、Vif は「両刃の剣」である。このためウイルス自体は steady-state level の発現量を制御することにより、負の作用を制御していると考えられる。本研究では、この負の作用のみを応用したウイルス制御技術を開発する事により、抵抗性変異ウイルスの出現を誘導しにくい新規抗 HIV 薬開発が期待される。

今年度の研究成果から、v-Vif による Gag p2/NC cleavage およびウイルス感染性抑制効果が Vif N 末端の ¹⁰VWQV¹³ (Ala-scanning による予備的結果から、おそらく W¹¹ および Q¹²) により規定されている事が強く示唆された。最近、bioluminescence resonance energy transfer (BRET) 法による解析において、Vif が p2/NC processing を用量依存性に阻害している事が報告されている (Hu et al., 2005)。本法はより簡便に v-Vif の阻害活性を評価出来る事から、今後は本法を導入し Vif 及び Gag の結合様式や protease 阻害の分子機構を詳細に解明していく予定である。最終的にはこの Vif 機能や構造を mimic するような化合物のスクリーニングにより創薬に繋がる事が期待される。

他方、Vif そのものをベースとしたポリペプチドとしては、①ウイルス粒子に効率よく取り込まれ、② N 末端の ¹⁰VWQV¹³ を保持し、③ M-6 領域および、抗 Apobec 活性に関与する領域を可能な限り欠損する、といった構造が考えられる。現在、こうした「minimal i-Vif」構築に向けて変異体作成を準備中である。

E. 結論

Vif 10-13 アミノ酸残基 (Trp11 および Gln12) が Gag p2/NC processing 阻害およびそれによるウイルス感染性抑制作用に係る機能ドメインであることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Tomonaga M, Izumi T, Fukunaga K, Sasada A, Abudu A, Miyauchi Y, Akari H, Iwai K, Uchiyama T: Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. *Virology* 344, 263-266, 2006.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

図1 M-3領域の欠失によるVif感染性抑制効果の消失

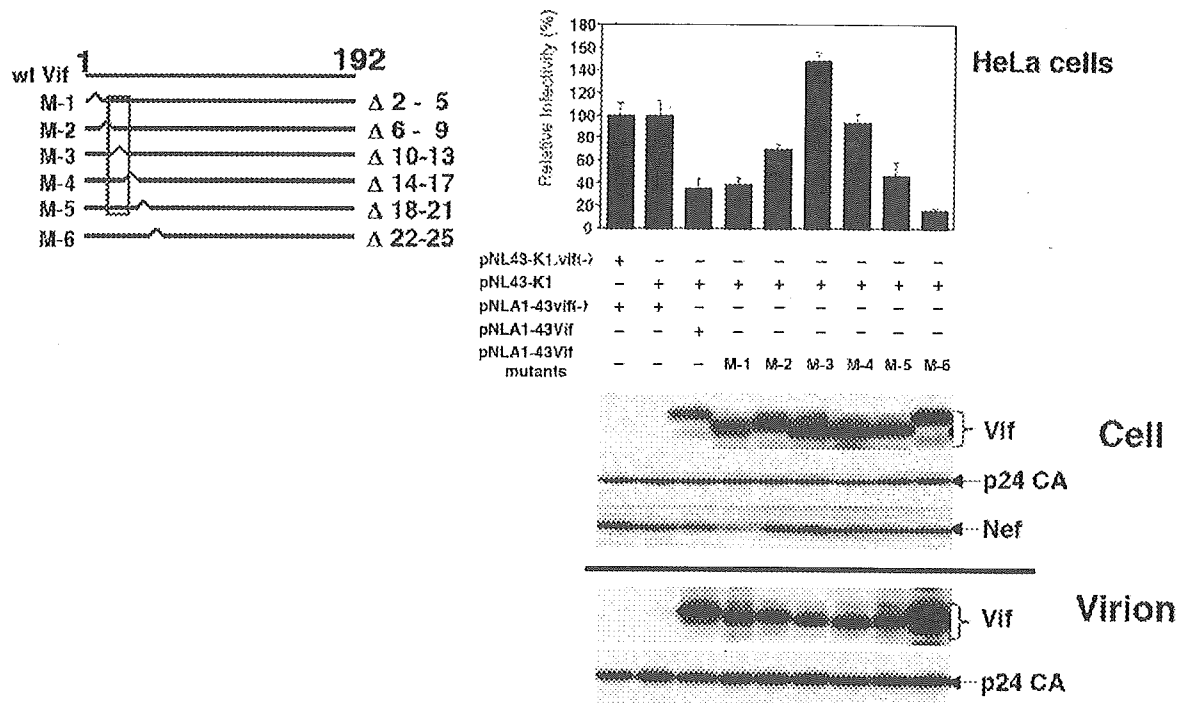


図2 M-3欠失変異による容量非依存性Vif機能の欠損

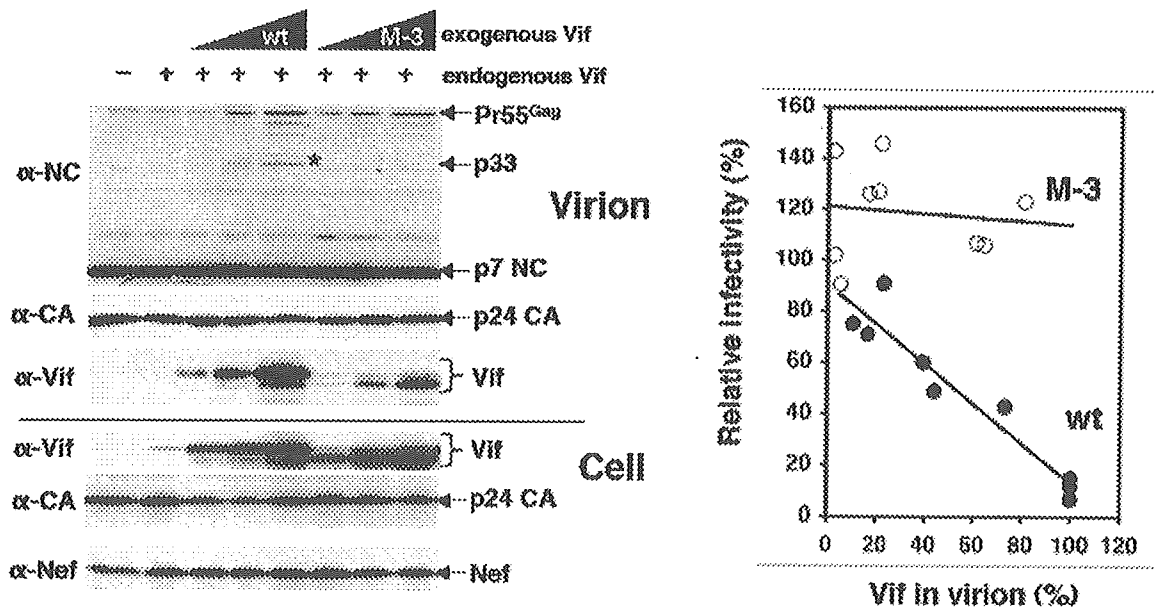


図3 10-13Ala置換変異体はM-3同様にVif機能が欠損した

		1	5	10	15	
wt Vif		MENRW	QVMIV	WQVDR	MR	
M-3		-----	-----	-----	-----	∴ アミノ酸欠失
M-3/4A		-----	-----A	AAA-----	-----	A: Alanineに置換

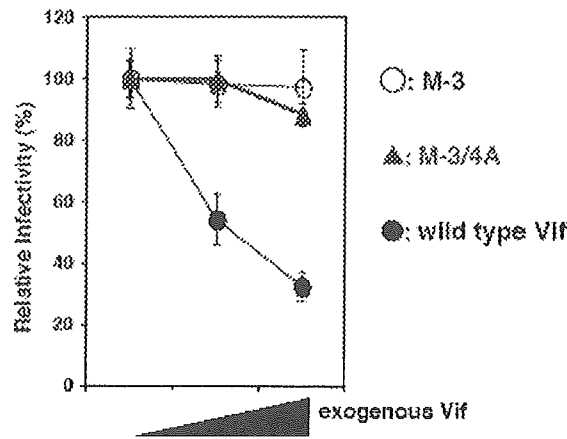


図4 Vif機能発現におけるTrp11, Gln12の意義

		5	10	15	
wt Vif		MENRW	QVMIV	WQVDR	MR
V10A/W11A		-----	-----A	A-----	-----
Q12A/V13A		-----	-----	-----AA	-----
W11A/Q12A		-----	-----	-----AA	-----
V10A/V13A		-----	-----A	-----A	-----
V10A		-----	-----A	-----	-----
W11A		-----	-----	-----A	-----
Q12A		-----	-----	-----A	-----
V13A		-----	-----	-----A	-----

A: Alanineに置換

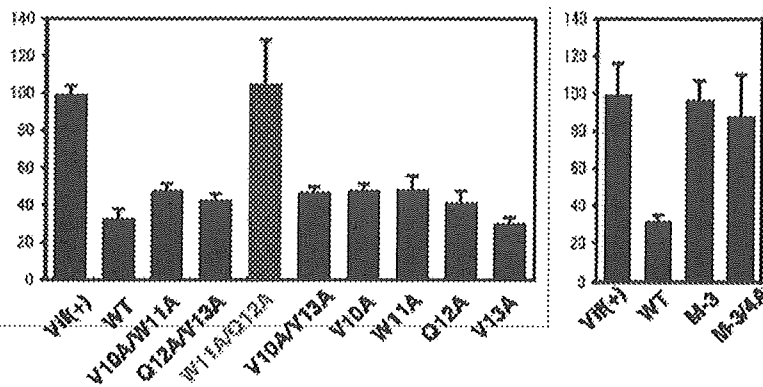
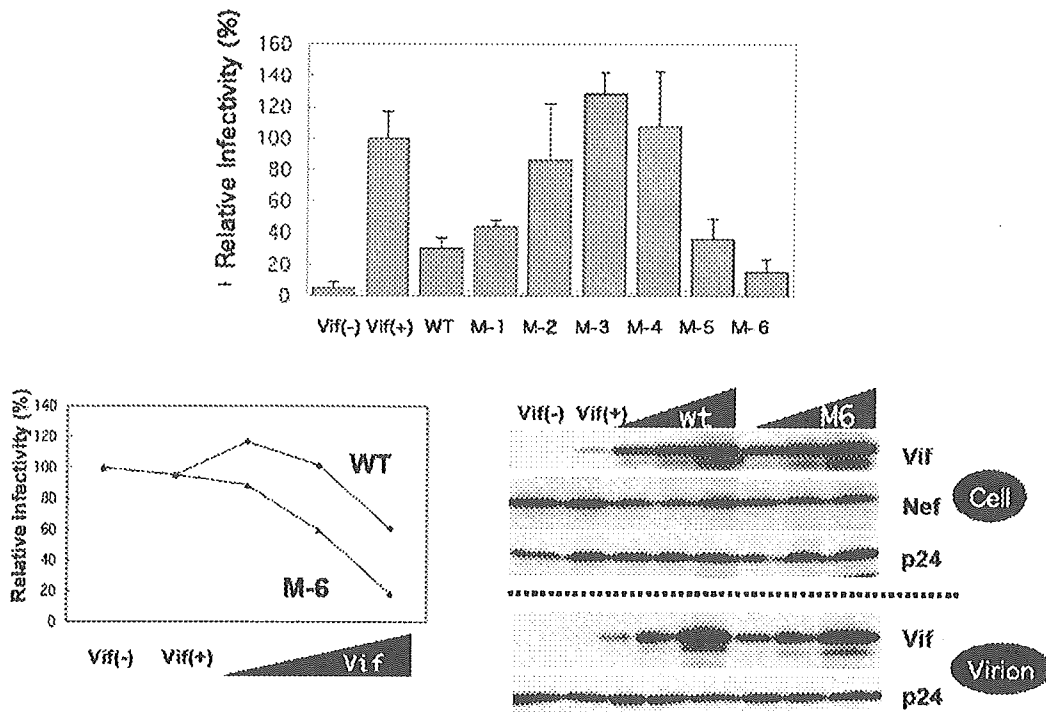


図5 M-6変異体による用量依存性感染性抑制作用



研究要旨

HIV の組み込み反応は HIV の増殖に必須である。この反応は HIV の組み込み酵素が触媒する。組み込み酵素の阻害薬をスクリーニングするためには可溶性も活性も高い組み込み酵素サンプルが必要である。活性中心に近いフェニルアラニン残基を置換することで可溶性・仮性ともに高い組み込み酵素を大腸菌で合成できた。HIV の組み込み酵素の阻害薬の中には HIV 以外のレトロウイルスであるマウス白血病ウイルスの組み込み反応を阻害できたものがあった。

A. 研究目的

HIV は(+) 鎖 RNA をゲノムとして有するレトロウイルスであり、ヒト CD 4 陽性細胞に感染する。感染細胞内の細胞質でゲノム RNA は逆転写酵素 (RT) によって線状 2 本鎖 DNA に変換される。この DNA 分子は HIV の組み込み酵素 (IN) を含む様々なタンパク質とともに沈降係数が 300S 以上の大きな核酸-タンパク質複合体 (組み込み前複合体、preintegration complex; PIC) を形成する。この PIC は細胞質から細胞核に移行し、細胞核内で宿主ゲノム DNA に組み込み (狭義の組み込み反応) を起こしてプロウイルスとなる。この一連の過程はレトロウイルスに特徴的な反応なので、この過程を特異的に阻害することによって HIV の感染を抑制することが可能である。そのような制御が可能になれば、治療に大いに役立つであろう。本研究は、この DNA への変換以降のステップのメカニズムを明らかにする事を目的とする。

本年は HIV の組み込み酵素の阻害剤をスクリーニングするために用いる組み込み酵素を大量かつ簡便に合成・精製する系を確立する事を目指して大量に合成するには溶解度の高い組み込み酵素が必要であるので、溶解度の高い変異体を作製することを目的とした。さらに *in vitro* の組み込み活性測定系でのスクリーニングで採択された候補化合物の組み込み活性阻害度を非 HIV であるレトロウイルスにおいて

も調べることができる系の作製を第 2 の目的とした。

B. 研究方法

データベースに登録がある HIV の pol 遺伝子配列を調べて組み込み酵素をコードする領域のさまざまな配列から疎水性残基 (特に 185 番目のフェニルアラニン) が親水性残基に置換されている変異を探す。その組み込み酵素を大腸菌で作製して溶解度と活性を調べる。

ヒト培養細胞にレンチウイルスではないレトロウイルスであるマウス白血病ウイルス (MLV) を感染させる系を用いる。候補組み込み阻害剤をさまざまな濃度で培養液中に存在させながら MLV 感染させてその組み込み相対活性を調べる。

(倫理面での配慮)

該当しない。動物を用いないし、かつ、ヒトを対象とする研究でもないから。

C. 研究結果

185 番目のフェニルアラニン (F185) がリシン K に置換されている F185K が溶解性が増すことが知られていたが、組み込み活性もいくらか低下することが問題であった。今回、ヒスチジンに置換された変異体 F185H が溶解度が高く *in vitro* 組み込み活性は低下しないこと

が分かった。

富山化学から供与された2つのHIVの組み込み酵素阻害薬（ここでは、化合物1および化合物2と称する）について、MLVの組み込み活性を阻害できるかどうか調べたところ化合物1、2とも10 μ Mでは活性を10%以下にまで抑えた。化合物2は0.3 μ Mでも10%抑制効果があった。

D. 考察

今後、F185H変異株を大量に合成して阻害剤のスクリーニングに供したいと考えている。

HIV-1組み込み酵素阻害薬の効果をマウス個体を用いて実験可能かもしれない。。

E. 結論

HIVの組み込みにcisに関わる領域のあることを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 発表

(1)原著

1. Yan H, Chiba-Mizutani T, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, & Sugiura W. A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. Antiviral Chemistry & Chemotherapy 16, 363-373, 2005
2. Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R,

Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H. Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. J Antibiot. 58, 65-68, 2005

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）

分担研究報告書

「ヒト樹状細胞を標的にした HIV-1 感染評価系の確立」

分担研究者 木村 廣光 国立成育医療センター 研究所・共同研究管理室 室長

研究要旨：HIV-1 ウイルスの標的細胞の一つと考えられる、樹状細胞の純粋培養方法の確立とワクチン治療開発を目的として、ヒト臍帯血、ヒト樹状細胞株、小動物（マウス・ラット）骨髄血液幹細胞並びに、皮膚由来樹状細胞株を用いて、HIV 改変第三世代型レンチウイルスベクターの樹状細胞前駆細胞への遺伝子導入の効率と有効性の解析、並びに、転写抑制因子遺伝子 Foxp3 の遺伝子クローニングと発現解析を行った。

A. 研究目的

これまでに報告されている、ヒト樹状細胞株：im-NMD、マウス樹状細胞株：XS106 と正常ヒト臍帯血中のCD34陽性・血液幹細胞、並びにマウス・ラット骨髄細胞、及び皮膚から、HIV-1の標的細胞である樹状細胞を、純粋培養・分離する培養精製技術を確立し、更に、ワクチン治療開発を目的として、各種ウイルスベクターの樹状細胞前駆細胞への遺伝子導入の効率の解析を行い、小動物実験系への移植システム応用を確立する事により、抗HIV-1薬剤耐性を評価するための実験系を確立する事を目的とする。

B. 研究方法

材料：ヒト樹状細胞株：im-NMD、ヒト臍帯血及び骨髄細胞由来CD34陽性細胞)及びマウス新生児皮膚由来樹状細胞株 XS106、正常マウス・ラット骨髄細胞を実験材料として用いた

細胞培養：GIT培地，各種サイトカイン（Flt3, SCF, IL-6, GM-CSF, IL-4, TNF- α ）を用い 1×10^5 /mlにて培養

遺伝子導入システム：緑色蛍光タンパク質（EGFP）を発現系とするアデノウイルスベクター、第三世代型HIVウイルスベク

ター、HVJウィルベクター

（倫理面への配慮）：

1. ヒト臍帯血細胞は BioWhittaker 社：米国 FDA 認可正常細胞提供プログラムにて調整されたものを実験材料とした。ヒト樹状細胞株は NEMOD Biotherapeutics GmbH & Co. KG（輸入元：フナコシ株）より購入
2. 本研究の実施にあたり、使用する小動物に関しては、当研究施設の動物実験指針及び実験規定により、また環境省動物愛護と管理行政に関する法律を遵守する立場から、また、遺伝子組み換え実験に際しては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守し、拡散防止措置の区分、当施設、遺伝子組み換え実験安全委員会の定める区分に則り、遺伝子組み換え実験を遂行している。

C. 研究結果

ヒト慢性骨髄性白血病由来樹状細胞株 im-NMD細胞は、培養期間中に、細胞表面に発現する免疫関連分子の変動が観察され、樹状細胞を標的とする分子細胞学的解析には必ずしも適してはいないという

結果であった。

マウス新生児皮膚由来樹状細胞株 XS106は、アデノウイルスベクター (AdCMV5GFP)、HIV改変レンチウイルスベクターによる遺伝子導入効率が、比較的高い事が観察された。上記ヒト慢性骨髄性白血病由来樹状細胞株im-NMD細胞に対する同遺伝子ベクター、またHVJベクターによる、遺伝子導入は極めて困難である事が判明した。本結果は、これまでマウス及びラット骨髄細胞培養法によって得られた樹状細胞に対する遺伝子導入効率が極めて低い事に合致する。但し、FITC標識ランダムプライマーを用いた、HVJベクターからの結果から、樹状細胞内へのプライマー導入は、可能である事から、細胞内に導入された遺伝子が、発現するまでの過程に於いて、外来遺伝子の発現をinterfereないしは、阻害する未知の因子がある事が強く示唆された。

ラット骨髄細胞培養にて得られる、樹状細胞は、これまで、免疫調節T細胞に、特異的に発現していると報告されてきた、転写抑制因子Foxp3を高発現している事、ヒトで報告されている、splicing variantsである、少なくとも二つの isoformを有する事を、樹状細胞から得られた、cDNAを材料に、PCR cloningにより同定した。

D. 考察

これまでマウス及びヒト樹状細胞を標的細胞とする、遺伝子導入システムは、主としてアデノウイルスベクターを用い

て報告されてきたが、我々は、GM-CSF非依存性樹状細胞培養法を確立。ラット骨髄細胞から樹状細胞・前駆細胞を増殖・分化させる事により、培養誘導した樹状細胞、同様にヒト血液幹細胞から培養誘導した樹状細胞を標的細胞として、各種遺伝子導入ベクターを用いて、遺伝子導入を試みた。

典型的な樹状細胞を標的とする場合、第三世代HIVウイルスベクター以外に、有効な遺伝子発現を確認する事はできなかった。本研究結果から、樹状細胞が、真にHIV感染のprimary target となりうるか否かに関しては、むしろHIV感染症に対するfirst defenseに関わっている事の可能性が強く示唆するものである。

一方、本方法で培養誘導される、樹状細胞は、これまで、免疫抑制に深く関連すると報告されてきた、免疫抑制サイトカインIL-10, TGF- β , CTLA-4を強く発現しており、さらに驚くべき事は、近年、免疫調節T細胞 (regulatory T cells; RegT) に特異的に発現すると報告されてきた、転写抑制因子Foxp3がラット樹状細胞に高発現している事を発見した (論文投稿準備中)。Foxp3の樹状細胞に於ける遺伝子発現が、例外的な現象であるか、一般的なものであるか、また、その生物学的意義を解明する事が、今後の課題である。

Foxp3遺伝子の樹状細胞分化段階に於ける発現、樹状細胞が有する免疫調節サイトカインプロファイルとHIV感染性、ウイルス増殖の関係を明らかにする事が極

めて重要であると考える。

E. 結果

これまで樹状細胞を標的細胞とする各種遺伝子ベクター、特にアデノウイルスを用いた遺伝子導入・発現システムが有効であるとのがなされて来たが、これらの報告は、多くの場合、樹状細胞を含むマクロファージ細胞を標的細胞として実験が施行された可能性が高い。真の樹状細胞は標的細胞とした遺伝子導入システムの解析結果から、樹状細胞が、HIV感染のprimary target としてよりも、むしろHIV感染症に対するfirst defenseに関わっている事の可能性が強く示唆された。

樹状細胞に於ける、転写調節因子Foxp3発現、免疫調節サイトカインの免疫生物学的意義とHIV感染の関連を明らかにする事が、今後の大きな研究課題である。

F. 健康危険情報¹

特記すべき事なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Funeshima N, Fujino M, Kitazawa Y, Hara Y, Hayakawa K, Okuyama T, Kimura H, Li XK.

Inhibition of allogeneic T-cell responses by dendritic cells expressing transduced indoleamine 2,3-dioxygenase. J Gene Medicine 2005 May;7(5):565-75

2) Satoh E, Yan H, Miyagi T, Li XK, Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Ariei S, Kimura H.

Studies on the most efficient vector systems for gene transduction into dendritic cells. Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):12-4.

3) Katayama H, Hattori Y, Ogata K, Yan H, Satoh E, Teramoto K, Ariei S, Kamide R, Nakagawa H, Kimura H.

Phenotype and functional identity of GM-CSF-independent dendritic cells generated by long-term propagation of DC progenitor cells in bone marrow cells and skin Langerhans cells. Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):17-9.

4) Satoh E, Hattori Y, Guo L, Li XK, Teramoto K, Ariei S, Kimura H.

Immunosuppressive effect of long-term drainage of thoracic duct on immunological memory in adult thymectomized rats. Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):1947-1948

5) Satoh E, Hara Y, Fuji N, Li XK, Teramoto K, Ariei S, Kimura H.

Comparison of the vector systems for gene transduction into rat dendritic cells and peritoneal exudate cells. Transplant Proc. 2005 May;37(4):1953-6.

2. 学会発表

1) メモリーT細胞は再循環するか？

木村 廣光、藤 直子、北澤 祐介、李 小康、宮本 愛

日本免疫学会総会 2005、12月1

3日 15日 於パシフィコ横浜

2) CD28 superagonist 抗体の機能解析と臓器移植への応用

酒井 隆敏、北澤 祐介、原 義明、藤野 真之、木村 廣光、安部 良、李 小康

日本免疫学会総会 2005、12月1

3日 15日 於パシフィコ横浜

3) 樹状細胞を標的とした新規免疫抑制化合物 NK026680 の免疫制御機構解明および臓器移植への応用

藤(船島) 直子、李 小康、原 義明、北澤 祐介、徳中 一寛、江崎 太一、

木村 廣光

日本免疫学会総会 2005、12月1

3日 15日 於パシフィコ横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

SIVを用いた新規抗レトロウイルス薬の開発

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 主任研究官

研究要旨

我々は新たに HIV-1 の integrase 阻害剤のリード化合物となるペプチド性化合物を約千種類のペプチドライブラリーから 2 種類同定した。これらは塩野義製薬が副作用のため開発を断念した diketo 構造を持つ integrase 阻害剤とほぼ同じ IC₅₀ を有する非常に強い integrase 阻害活性を持つ。細胞培養レベルでウイルス複製抑制効果を評価するため、非ペプチド化を推進すべく酵素の立体構造をもとに電算機的解析を駆使した integrase—ペプチド相互作用ドメインの解析を行っている。

A. 研究目的

世界的に蔓延するエイズに対し、実用に足る有効なワクチンの開発は未だ報告されておらず、化学療法は薬剤耐性ウイルスの発生という難題に直面している。したがってエイズの完全抑止には新たな治療標的の検索が必須である。現存する化学療法（HAART 療法）の重大な問題点である薬剤耐性ウイルスの発生を回避するためには、多様な作用機序を持つ薬剤を速やかに同定し、実用化することが求められる。これらは、薬剤耐性ウイルスによる難治症例の治療をも可能にする。

現在市場に流通している抗エイズ薬の標的は逆転写酵素、プロテアーゼ、エンベロープタンパク質などである。未だにインテグラーゼは実用化されていない。我々は新たに integrase 阻害剤としてのリード化合物を発見することに着手し、ペプチドライブラリーからの抗 integrase 作用を持つペプチド同定に成功した。現在これらの活性を培養細胞系にて検証するため、北里大学広野教授との共同研究にて computer 解析に

よる非ペプチド化および最適化を試みている。また新規標的を探索するため、ウイルス複製を制御する細胞因子の解析及び同定とウイルス遺伝子産物における新たな標的部位を検討した。当稿では新たな抗エイズ薬の標的因子探索に関する詳細な記載は結論に述べるにとどめる。

B. 研究方法

HIV-1がコードする 9 個の遺伝子（vifを除くすべての遺伝子）のタンパク質をそれぞれ N 末端から 10 から 15 アミノ酸ずつ、約 5 アミノ酸の重複を許して順次合成し、これをペプチドライブラリーとした（overlapping peptide library）。合成に際しては、水溶液に可溶化するかが考慮された。これらにふくまれるペプチドはおよそ千種類となる。

ペプチドライブラリーを 20 から 50 種類ごとに 16 のプールに分取し、試験管内におけるインテグラーゼ反応を抑制するかを検索した。各ペプチドの濃度は最終 5 μM になるよう調整した。検出系は杉浦博士（国

立感染症研究所エイズ研究センター)らの有するin vitro strand transfer assay系を用いた。陽性反応が得られた場合、プールしてある各個のペプチドを単独で抗 integrase作用の有無を検索し、inhibitory concentraion 50 (IC50)を算定した。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

1. 一次スクリーニング：プール化することにより、インテグラーゼ阻害活性のあるペプチドを見落とす可能性が懸念されたが、16のペプチドプールから、再現性よく integrase in vitro strand transfer 活性阻害作用を有する2つのプールを同定した(図1、赤色丸印部)。

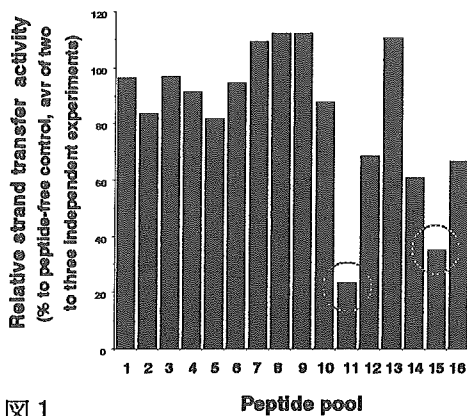


図1

2. 二次スクリーニング：さらに各個のペプチドを試験したところ、プール11には2つの integrase 阻害活性を(図2、赤色丸印部)、プール15には1つの integrase 阻害活性を(図3、緑色丸印部)有する連続したペプチドの存在がそれぞれ明らかとなった。

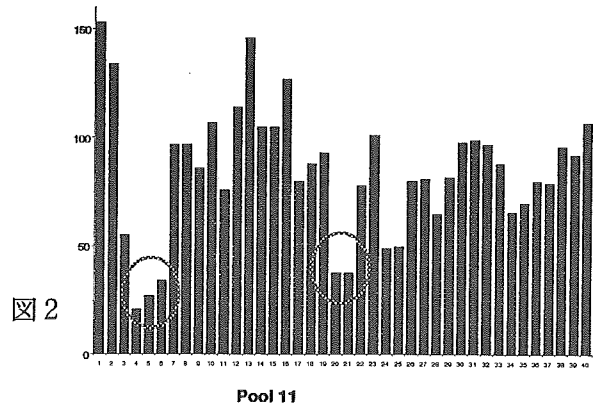


図2

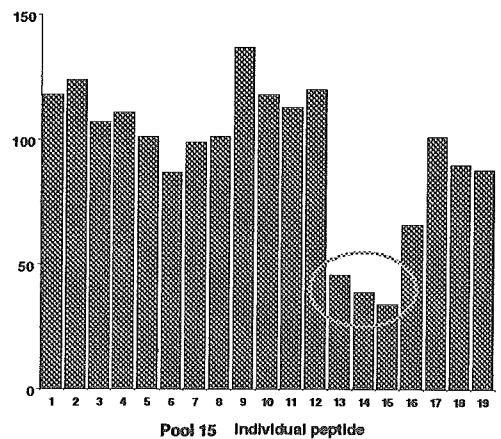


図3

3. アミノ酸配列の分析：これらの overlapping peptide アミノ酸配列を分析すると、env、vpr とともに最小6アミノ酸配列が integrase 阻害活性に関与していることが明らかとなった(図4、赤四角内)。

この配列は、比較的疎水性アミノ酸が多い配列中に存在する。6アミノ酸配列を強い陽性荷電を有する連続する水溶性アミノ酸を付加した状態で化学合成すると integrase 阻害活性を失うことが明らかとなったことから疎水性 integrase 阻害活性はペプチドが周囲に存在するアミノ酸配列に強い影響を受けることが判明した。Env と Vpr の3次元立体構造から予想される当該

Peptide sequences that inhibited the strand transfer activity of integrase *in vitro*

Red rectangles seemed to be the amino acid motifs responsible for the inhibition of IN activity.

Env 4 pool

3,4,5,6, 7

NWFDITNWLWYIKI
 TNWLWYIKIFIMIV
 WYIKIFIMIVGGLV
 IFIMIVGGLVGLRI
 VGGLVGLRIVFAVL

The transmembrane domain of gp41.

19,20,21, 22

SGRLVDGFLALIWV
 VDGFALALIWVDLRS
 ALIWVDLRSLSLCLFS
 DLRSLSLCLFSYHRLR

The cytoplasmic tail of gp41.

Vpr pool

12,13,14,15, 16

GDTWAGVEAIRIL
 AGVEAIRILOOLLF
 IIRILOOLLFIHFRI
 LOOLLFIHFRI
 LOOLLFIHFRI
 LOOLLFIHFRI

The protein-protein interaction motif involved in the cell cycle arrest.

A part of the cell permeable motif of Vpr.

図4

アミノ酸配列の構造はヘリックス構造である。よって、integrase 阻害活性にはヘリックス構造による立体的配向が重要であることが示唆された。Env の長鎖ペプチドモチーフは以後の解析が困難と考えられたため、更なる解析には用いなかった。

4. integrase 阻害活性の評価：これらの活性が酵素とどのような相対的数量関係にあるかを検索したところ、酵素の約10倍の分子数にて IC50 を与えることが明らかとなった。現有系における IC50 はおよそ5 μM であると算定された。

5. 新規薬剤標的の探索：上記と並行して、新たな治療標的の同定を目標として、HIV-1 複製を制御する宿主因子とウイルス遺伝子の同定および機能解析を進めている。現在までに新規ウイルス複製の制御因子として Arp2/3 複合体を同定し、その作用機序が感

染初期過程の抑制であることを同定した。これはレンチウイルスに特異的な活性であるため、エイズ治療の標的として有望である。また、ウイルスレセプター CXCR4 のリガンド非存在下における新規発現制御メカニズム

を解析し、CXCR4 細胞表面発現の制御に関するアミノ酸シグナル配列を同定した。これに結合する宿主因子を標的にすることにより、リガンド類似体とはことなるメカニズムでウイルスレセプター発現を制御する創薬開発が可能となろう。LTR-tat 系を負に制御する新規細胞因子 HEXIM1 を同定した。HEXIM1 の機能を正に制御する蛋白質機能を増強する（たとえば HEXIM1 発現を誘導する HMBA などが知られている）か、HEXIM1 を負に制御する方法を開発することにより、エイズウイルス複製を抑制することが可能と考えられる。ウイルス Envelop タンパク質のあらたな薬剤標的的部位として膜貫通ドメインが候補として同定された。ウイルスの gag-pol junction に存在するフレームシフトを制御する小分子化合物 sparsomycin の検討を行い、フレームシフトの微弱な増加にてウイルス複製が飛躍的に増大することを見だし、フレームシフトを標的部位と

する薬剤開発の可能性を実験的に証明した。

E. 結論

我々は最小 6 アミノ酸からなる integrase 阻害活性を有するペプチドを 2 つ同定した。これらは塩野義製薬が副作用のため開発を断念した diketo 構造を持つ integrase 阻害剤とほぼ同じ IC50 を有する非常に強い integrase 阻害活性を持つ。細胞培養レベルでウイルス複製抑制効果を評価するため、非ペプチド化を推進すべく酵素の立体構造をもとに電算機的解析を駆使した integrase—ペプチド相互作用ドメインの解析を北里大学広野教授らのグループとの共同研究を行っている。これは、既存の integrase 立体構造とヘリックス構造をとる 6 アミノ酸モチーフとが最も安定に結合する部位を計算化学的に同定し、これを実験的に検証するプロセスである。これが妥当なモデルと判明した場合、integrase が 6 アミノ酸モチーフと結合する分子を同定し、これと結合する非アミノ酸小分子化合物をデザインし、合成し、ウイルス阻害活性および integrase 阻害活性を探索する。

アミノ酸は細胞膜透過性に乏しいが、化学的な修飾により 6 アミノ酸ペプチド構造を模倣した化合物に細胞膜透過性を賦与することは可能である。また立体的なアミノ酸配向を維持することも環状ペプチドの化学合成技術の進化により十分実現可能であろう。

一方、ウイルス学的には 6 アミノ酸配列の由来となる 2 つのウイルス遺伝子が integrase と結合する可能性がある。Env はそもそもその可能性は著しく低いが、Vpr は 6 アミノ酸配列を介して integrase と結合

する、あるいは同時にこれを抑制する可能性が考えられる。理研の間には、Vpr と integrase の相互作用を精製蛋白質を用いた免疫沈降法にて証明している。Vpr は細胞質内で integrase を抑制し、ウイルスゲノムによるウイルスゲノムへの”abortive integration”を回避するシステムなのかもしれない。今後この可能性も追求して行く。

これに加えて、新たな治療標的として細胞因子を 2 種類、ウイルス因子として 2 種類、治療標的の存在を示唆する成果を 1 例得ている。今後これらのさらなる機能解析を行い、治療標的としての可能性を探求して行く。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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. 2005 Apr; 79(8): 4720-4729

2) Komano J, Futahashi Y, Urano E, Miyauchi K, Murakami T, Matsuda Z, Yamamoto N.

The Interaction of HIV-1 with the Host Factors.

Jpn J Infect Dis. 2005 Jun; 58(3): 125-30.

3) 山本直樹、松田善衛、村上努、駒野 淳
AIDS の新たな治療標的を求めて : HIV-1 の
宿主因子

実験医学 Vol.23 No.13 2068-2073 2005

4) Kosuke Miyauchi, Rachael Curran, Erin
Matthews, Jun Komano, Tyuji Hoshino,
Naoki Yamamoto, Don M. Engelman and Zene
Matsuda.

Mutations of conserved glycine residues
within the membrane-spanning domain of
human immunodeficiency virus type 1
(HIV-1) gp41 can inhibit membrane fusion
and incorporation of Env onto virions.
(in press)

2. 学会発表

1) May 24-29 Miyauchi K, Curran R, Komano
J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman DM,
Matsuda Z. The rotational phase of the
localized region of gp41
membrane-spanning domain alpha-helix
affected the Env biogenesis. Cold Spring
Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY,
USA

2) May 24-29 Murakami T, Ablan S,
Nagashima K, Komano J, Miyauchi K,
Matsuda Z, Freed EO, Yamamoto N.
Characterization of HIV-1 matrix
mutants-Effects on an early stage of
infection. Cold Spring Harbor Meeting
Retroviruses, CSH, NY, USA

3) Nov 16-17 Jun Komano, Yuko Futahashi,
Yasunari, Emiko Urano, Toru Aoki, Kosuke

Miyauchi, Takeshi Yoshida, Yoshio
Koyanagi, Zene Matsuda, Naoki Yamamoto.
Identification of SES as an
SDF-1alpha-independent internalization
motif of HIV-1 co-receptor CXCR4. 10th
International Conference on Emerging
Infectious Diseases in the Pacific Rim,
Hanoi, Vietnam

4) Nov 20-22 清水佐紀、駒野淳、浦野恵
美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松
田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、
山本直樹. HIV-1 感染細胞における Tat を
介した P-TEFb の活性化を抑制する細胞内
因子の解析. 第53回日本ウイルス学会学
術集会、横浜

5) Nov 20-22 篠田知宏、村上努、宮内浩
典、駒野淳、磯貝まや、松田善衛、山本直
樹. 感染前期過程に欠損を有する変異株を
用いた HIV-1 マトリックス蛋白質結合宿主
因子の探索. 第53回日本ウイルス学会学
術集会、横浜

6) Nov 20-22 宮内浩典、駒野淳、村上努、
松田善衛. The function of
membrane-spanning domain of HIV-1 gp41
in Env biogenesis. 第53回日本ウイル
ス学会学術集会、横浜

7) Nov 20-22 駒野淳、二橋悠子、浦野恵
美子、貝の瀬由成、青木 徹、宮内浩典、磯
貝まや、松田善衛、山本直樹. The
non-tyrosine-based diacidic motif
within the cytoplasmic tail regulates
the cell surface expression of CXCR4. 第

5 3回日本ウイルス学会学術集会、横浜

8) Nov 20-22 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛. HIV-1 gp41 の膜貫通ヘリックス間相互作用—GXXXG モチーフ変異体の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜

9) Dec 1-3 駒野淳、二橋悠子、浦野恵美子、青木 徹、貝の瀬由成、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、山本直樹. Cell surface expression of CXCR4 is regulated by a non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail. 第19回日本エイズ学会学術集会、熊本

10) Dec 1-3 村上努、篠田知宏、内藤幸美、宮内浩典、磯貝まや、駒野淳、松田善衛、山本直樹. HIV-1 マトリックス蛋白質のウイルス感染前期過程における役割、第19回日本エイズ学会学術集会、熊本

11) Dec 1-3 駒野淳、宮内浩典、Lay Myint、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、杉浦互、山本直樹. Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of HIV-1 by a -1 frameshift enhancer sparsomycin. 第19回日本エイズ学会学術集会、熊本

12) Dec 1-3 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹. T-type cyclin/CDK9 複合体の活性化を抑制する細胞内因子による HIV-1 複製制御. 第19回日本エイズ学会学術集会、熊本

13) Dec 7-10 村上努、篠田知宏、内藤幸美、宮内浩典、磯貝まや、駒野淳、松田善衛、Eric Freed、山本直樹. マトリックス蛋白質変異が HIV-1 感染前期課程や結合宿主因子に与える影響. 第28回日本分子生物学会年会、福岡

14) Dec 7-10 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛. HIV-1 gp41 の膜貫通領域に存在する GGXXG 配列の解析. 第28回日本分子生物学会年会、福岡

15) Dec 7-10 Jun Komano, Yuko Futahashi, Yasunari, Emiko Urano, Toru Aoki, Kosuke Miyauchi, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Zene Matsuda, Naoki Yamamoto. Identification of SDF-1alpha-independent internalization motif Ser-asp/Glu-Ser within CXCR4's cytoplasmic tail. 第28回日本分子生物学会年会、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

「接着・侵入阻害剤及びインテグラーゼ阻害剤の開発」

分担研究者 田中 晴雄 北里研究所部長

研究要旨

- 1) 放線菌由来の抗 HIV 蛋白質アクチノヒビン (AH) は、すでに gp120 のように多数の高マンノース型糖鎖を持つ糖蛋白質にのみ結合することが明らかにされているが、AH に結合する糖鎖には複数の α 1-2) マンノピオース構造が必要であることが分かった。
- 2) AH は、HIV の糖鎖認識抗体 2G12 の認識糖鎖のみならず、それ以外の糖鎖にも結合することが分かった。
- 3) AH の患者分離 HIV 株に対する活性を調べた結果、耐性マーカーに関係なく活性を示すことが分かった。しかし、糖鎖数の多い (17-20) HIV 株に対しては強い活性を示すが、糖鎖数の少ない (14-16) 株に対しては比較的弱い活性しか示さないことが明らかとなった。
- 4) 糖鎖数の少ない患者分離株に対しても強い活性を示す変異体の取得を目的として、AH の 2 量体の調製を試みた結果、AH の 4 倍の合胞体形成阻害活性を示すものが得られた。糖鎖数の少ない患者分離株に対する活性測定が急がれる。
- 5) *Streptomyces lividans* を用いて転写および翻訳に必要なとされる AH 遺伝子領域を解析した結果、AH の発現には DNA 塩基配列 254 番目から 1252 番目までの 998 bp が必要であることが明らかになった。
- 6) イノシンモノフォスフェートデヒドロゲナーゼの阻害剤であるマイコフェノール酸 (MPA) は、逆転写酵素を阻害するのみならず、gp120 の発現を減少させることにより接着・侵入を阻害することを示した。

A. 研究目的

新属新種の放線菌 *Longispora albida* の培養液より発見したアクチノヒビン (AH, 図 1) は、 α (1-2) マンノピオースを含む多くの高マンノース型糖鎖を持つ gp120 に結合することにより、HIV の細胞への接着・侵入を阻害し、T-及び M-指向性の HIV 株に対して抗 HIV 活性を示すことが、これまでの研究により明らかになっている (表 1)。ここではさらに、1) AH に対する高マンノース型糖鎖の結合様式の計算化学的手法による解明、2) HIV 糖鎖認識抗体 2G12 の AH-gp120 結合に対する影響の解析、3) AH の患者分離

株に対する抗 HIV 活性の測定、4) 高活性 AH 変異体の調製、5) AH の大量調製法のための整備など、AH の抗 HIV 薬としての開発を目的とした研究を展開した。さらに 6) 合胞体形成阻害剤として糸状菌培養液から単離して同定された mycophenolic acid (MPA) の作用メカニズムを解明した。

B. 研究方法

<AH に対する高マンノース型糖鎖の結合様式の解明>

平林らによって開発されたフロントアルフィニティー・クロマトグラフィー (Methods enzymol.

362, 352-368, 2003)及びコンピュータを用いる計算化学的手法により解析した。

<AH-gp120 結合に対する 2G12 の影響>

Dr. Hermann Katinger から NIH AIDS Res. Ref. Program を通して分与された 2G12 を用いて、ELISA 法により AH-gp120 結合に対する影響を調べた。

<患者分離株に対する抗 HIV 活性>

MAGIC 5 assay により岡ら (国際医療センター) により測定された。

<高活性 AH 変異体の調製>

変異体の遺伝子を PCR 法により作成し、すでに確立された大腸菌での AH 生産系を用いて変異体を調製した。また、変異体の活性は、HIV の接着・侵入の過程をモデル化した合胞体形成系を用いて評価した。

<AH 前駆体の発現とその解析>

AH 生産菌 *L. albida* の染色体 DNA よりクローニングした AH 遺伝子を含む約 2.0 Kbp の DNA 領域について、5'側および 3'側より欠失させた種々の長さの断片を PCR 法で作成し、放線菌 *S. lividans* に導入して AH 前駆体の発現を解析した。AH 前駆体は SDS-PAGE およびウェスタンブロット法で検出した。

<MPA の作用の解析>

MPA のモデル細胞に対する影響を調べた。合胞体形成系に対する阻害活性はレポーター遺伝子として組み込んだβ-ガラクトシダーゼの発現を確認することで検定した。β-ガラクトシダーゼ及び本アッセイ系で細胞の接着に関与する gp120 の蛋白質質量に及ぼす影響はウェスタンブロット法で調べた。また MPA の影響がグアノシン添加で回復するかどうか併せて調査し、イノシンモノフォスフェートデヒドロゲナーゼ (IMPDH) 阻害活性の関与を確認した。

C/D. 研究結果と考察

1) AH に対する高マンノース型糖鎖の結合様式

フロントアルフィニティー・クロマトグラフィーにより、α(1-2) マンノピオースを含む各種マンノース型糖鎖の AH に対する親和性を調べた結果、α(1-2) マンノピオースのドメインを少なくとも2個含むことが必要であることが明らかとなった (図 2)。また、コンピュータを用いる計算化学的手法により、α(1-2) マンノピオース 1 分子のみでは、すでに gp120 との結合に必須であることが明らかとなっている6種のアミノ酸 (Asp15、Tyr23、Leu25、Asn28、Tyr32 及び Gln33) をカバーすることは不可能であること (図 3)、及び 2 個の α(1-2) マンノピオースドメインによりこれらのアミノ酸とフィットすることが明らかとなった (図 4)。これらの結果から、gp120 上に存在する Man8 と Man9 が AH との結合において重要であり、特に Man9 がより強い親和性を示すことが分かった。しかし、すでに明らかにしたように、Man9 単独あるいは Ribonuclease B のように単独の高マンノース型糖鎖を持つ糖蛋白質では AH に対する親和性は弱く、gp120 のように多くの Man9 を持つ糖蛋白質にのみ強い親和性を示す。これが、AH が HIV に対する高い選択性を有する理由であると考えられる。

2) AH-gp120 結合に対する糖鎖認識抗体 2G12 の影響及び 2G12-gp120 結合に対する AH の影響

図 5 に示すように、2G12 は gp120 上の N295、N332 及び N392 に付加した糖鎖と結合することが知られているが、ELISA 法で AH-gp120 結合に対する 2G12 の影響を調べた結