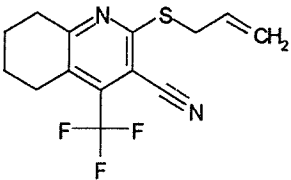
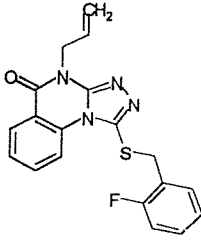
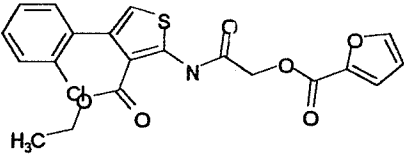
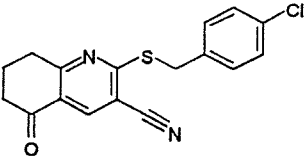


## Integrase 阻害活性を持つペプチドモチーフ

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

Env 4 pool	Vpr pool
<b>3,4,5,6, 7</b>	<b>12,13,14,15, 16</b>
NWFDITNWLWYIKIF TNWLWYIKIFIMIV WYIKIFIMIVGGLV IFIMIVGGLVGLRIV VGGLVGLRIVFAVL	SGRLVDGFLALIWV VDGFLALIWVDLRSL ALIWVDLRSLCLFSY DLRSLCLFSYHRLR
The transmembrane domain of gp41.	The cytoplasmic tail of gp41.
	The protein-protein interaction motif involved in the cell cycle arrest. A part of the cell permeable motif of Vpr.

## SIV複製後期過程を阻害するリード化合物

 <p>IC50 0.3871 uM</p>	 <p>IC50 0.5689 uM</p>
 <p>IC50 0.4712 uM</p>	 <p>IC50 0.4712 uM</p>

## 研究要旨

- 1) 新属新種の放線菌 *Longispora albida* 由来のアクチノヒビン (AH)は、HIV エンベロープ蛋白質 gp120 の高マンノース型糖鎖末端の  $\alpha(1-2)$  マンノビオースと結合することで、ウイルスの細胞への接着・侵入を阻害することを明らかにした。
- 2) AH は分子内に 3 つのセグメント (糖鎖結合ポケット) を持ち、ポケット 1 つが高マンノース型糖鎖 1 本と結合し、AH 1 分子あたり 3 本の糖鎖を捕らえることで gp120 と結合する。また、ポケット 1 つと糖鎖 1 本の結合力は弱いものであるが、この結合数を増すごとに、いわゆるレクチンの“クラスター効果”により、AH の gp120 に対する親和性は相乗的に上昇し、抗 HIV 活性も強力になることを見出した。
- 3) AH は、HIV の糖鎖認識抗体 2G12 の認識糖鎖のみならず、それ以外の高マンノース型糖鎖にも結合することが分かった。抗 HIV 蛋白質シアノビリン-N (CV-N) は、高マンノース型糖鎖 1 本に対しても強力に結合するため、gp120 以外で高マンノース型糖鎖を有する糖蛋白質 thyroglobulin や RNase B に対しても強く結合し、選択性が劣る。一方 AH は、糖鎖数の少ない thyroglobulin や RNase B に対しては、クラスター効果が発揮されないため親和性は弱く、gp120 のように多くの高マンノース型糖鎖を持つ糖蛋白質に対して選択的に強い親和性を示すことが示された。
- 4) AH の 3 つの糖鎖結合ポケットは、それぞれ糖鎖に対する親和性が異なっており、最も親和性が高いポケットを 3 つにした変異体 His-Seg 1 trimer は、AH の 2 倍の合胞体形成阻害活性を示した。
- 5) 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 HIV 株に対しては強い活性を示すが、糖鎖数の少ない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。AH 2 量体は、このような AH 非感受性株に対してもある程度阻害効果を示したことから、AH のさらなる多量体化による非感受性株の完全なる克服が期待される。
- 6) *Streptomyces griseus* を用いて AH の生産系を確立した。また、*S. lividans* を用いて転写および翻訳に必要とされる 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。
- 7) 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、114 アミノ酸残基で構成される蛋白質であり、HIV の接着・侵入の過程をモデル化した合胞体形成をも nM レベルで阻害するのみならず T-及び

M-指向性 HIV の細胞への接着・侵入を低濃度 (2-110 nM) で阻害する。AH の抗 HIV 活性は、HIV エンベロープタンパク質 gp120 上の高マンノース型糖鎖と結合することにより発揮されることが、これまでの研究で明らかにされている。ここではさらに、1) AH が結合に必要とする高マ

ンノース型糖鎖の最小構造の特定、2) AH が有する 3 つの糖鎖結合ポケットと高マンノース型糖鎖との結合様式の解明、3) AH と他の抗 HIV 活性を有する蛋白質との糖蛋白質認識機構の比較、4) AH の高活性変異体の調製、5) AH の患者分離 HIV 株に対する活性評価と AH 非感受性株の克服及び 6) 高活性変異体の大量生産系の確立と AH 発現に必須な DNA 領域の解析を行った。また、合胞体形成阻害活性を指標にした HIV 接着・侵入阻害剤探索の結果見出された 7) マイコフェノール酸 (MPA) の接着・侵入阻害機構の解析についても検討した。

## B. 研究方法

<AH の gp120 及び高マンノース型糖鎖との結合の評価>

AH と gp120 の結合について分子間相互作用解析装置 IAsys を用いて測定した。HIV-1 NL4-3 由来 env 発現 HeLa/T-env 細胞の培養上清より精製した gp120 を各種エンドグリコシダーゼで処理した後、IAsys 用アミノシランキュベットに固相化した AH との結合を酵素処理していない gp120 と比較した。AH と高マンノース型糖鎖との結合は、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 (FAC)(*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 の糖蛋白質に対する結合特性>

ELISA 法：糖蛋白質を固相化した ELISA プレートに各試料を加えて、糖蛋白質に結合した各試料を、それぞれに対する抗体を用いて検出した。

分子間相互作用解析：IAsys 用カルボキシレートキュベットに gp120 または RNase B を固相化した。そこへ各試料を加え、結合・解離曲線から結合速度定数および解離速度定数を解析ソフト FASTfit で計算し、その結果から解離平衡定数(親和性)を求めた。

<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。

<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。

<高活性変異体の大量生産系の確立と AH 発現に必須な領域の解析>

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 領域を放線菌ベクター pIJ702 に連結し、*Streptomyces griseus* を形質転換した。AH の産生の確認は SDS-PAGE 及び合胞体形成系を用いて評価した。また、2.0 kbp の DNA 領域の、5' 側及び 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

及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。合法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  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現を確認することで検定した。 $\beta$ -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 が結合に必要とする高マンノース型糖鎖の最小構造の特定

これまでの研究結果から、AH が高マンノース型糖鎖末端の  $\alpha(1-2)$  マンノビオース部分を標的としていることが示唆されていたが、分子間相互作用解析装置 IAsys により、 $\alpha(1-2)$  マンノシダーゼ処理した gp120 に AH が結合しなくなったことを確認した (図 2)。このことから、AH が  $\alpha(1-2)$

マンノビオースを標的としていることが分かった。また、FAC を用いて各種高マンノース型糖鎖アナログと AH の親和性を測定した。その結果、AH が高マンノース型糖鎖と強く結合するためには、糖鎖末端に存在する 3 つ (D1、D2 及び D3 位) の  $\alpha(1-2)$  マンノビオースのうち、D1 が最も重要であり、次いで D3 位が重要であることが明らかになった (図 3)。

## 2) AH が有する 3 つの糖鎖結合ポケットと高マンノース型糖鎖との結合様式の解明

AH は分子内に 3 つのセグメントを持ち、各セグメントに存在する LD モチーフから QXW モチーフまでの配列で糖鎖結合ポケットが形成されている (図 4)。セグメント 1 においては、Asp15、Tyr23、Leu25、Asn28、Tyr32 及び Gln33 の 6 種のアミノ酸残基が gp120 との結合に重要であることが分かっている。コンピュータを用いる計算化学的手法により高マンノース型糖鎖と AH の結合を推定したところ、ポケット 1 つに糖鎖 1 本が丸ごと収容されており、特に、D1 及び D3 位のマンノビオースがポケット内に収まり、D2 位のマンノビオースはポケットから外れている状態が観察された (図 5)。この結果は、FAC による解析結果と一致する。従って、AH はポケット 1 つに糖鎖 1 本が収まり、AH 1 分子としては 3 つのポケットが協調的に gp120 上の 3 本の糖鎖を捕らえる (図 6) ことが gp120 と強く結合するのに必要であると考えられた。このことは、糖鎖結合ポケットを 1 つ又は複数潰した変異体 (QA 置換体) の gp120 への親和性の低下からも示された (図 7)。また、ポケット数を増やすことは、相乗的に合胞体形成阻害活性を上昇させることが伺えた (図 8)。このような相乗効果は一般的にレクチンのクラスター効果と呼ばれている。従って、AH のポケット 1 つと糖鎖 1 本の結合は弱いものであるが、これを 3 つにすることでクラスター効果が働き、gp120 と強く結合して強い抗 HIV 活性を示すと考えられた。

## 3) AH と他の抗 HIV 活性を有する蛋白質との糖蛋白質認識機構の比較

図 9 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 の影響を調べた結果、影響は認められず、逆に 2G12-gp120 結合を AH が阻害することが明らかとなった。この結果は、2G12 は上記の 3 部位の糖鎖にのみ結合するが、AH は gp120 上のすべての高マンノース型糖鎖と結合でき、2G12 が存在しても AH は 2G12 の結合部位以外の高マンノース型糖鎖に結合することを示すものである。

*Nostoc ellipsosporum* 由来のシアノビルリン-N (CV-N) は、HIV gp120 の高マンノース型糖鎖末端の  $\alpha(1-2)$  マンノビオースと結合することで、HIV の接着・侵入を阻害する。AH と CV-N の高マンノース型糖鎖及び各種糖蛋白質に対する結合性を調べた。その結果、CV-N は高マンノース型糖鎖に対しても gp120 に対すると同等の親和性を示し、thyroglobulin や RNase B に対しても強力に結合した (表 1 及び図 10)。このことから、CV-N は選択性が劣ると思われる。最近になって組換え植物を用いて CV-N の大量生産に成功して前臨床試験を実施した結果、免疫抑制作用と粘膜刺激作用が認められたので開発を中止したとの未公開情報もある。

一方、AH は遊離の高マンノース型糖鎖に対する親和性は弱いですが、gp120 に対しては強力に結合する (表 1)。これは、AH のポケット 1 つと糖鎖 1 本の親和性は弱いですが、gp120 のように高マンノース型糖鎖を多く持つ糖蛋白質に対してはクラスター効果が発揮されて親和性が相乗的に上昇するためであると考えられた。従って、thyroglobulin や RNase B のように高マンノース型糖鎖が少ない糖蛋白質に対しては、クラスター効果が発揮されず、強い親和性を示せなくなると考えられた (図 10)。このことから AH は選択性において CV-N より遙かに優れており、副作用の少ない有効な薬剤として期待できる。

#### 4) AH の高活性変異体の調製

AH のポケットを 1 つずつ潰した変異体 His-AH(Q33A) 、 His-AH(Q71A) 及び His-AH(Q109A) の合胞体形成阻害活性を測定したところ、いずれの変異体でも活性の低下が見られたが、それぞれで活性低下の程度が異なっていた (図 8)。このことから、各糖鎖結合ポケットの糖鎖に対する親和性が異なっていると予想された。そして、最も親和性の高いポケットを 3 つにすることで AH の活性を上昇させることができると考え、各ポケットで統一した変異体 His-Seg1 trimer 、 His-Seg2 trimer 及び His-Seg3 trimer を作成した。その結果、His-Seg1 trimer で合胞体形成阻害活性を 2 倍上昇させることに成功した (図 12)。

#### 5) AH の患者分離 HIV 株に対する活性評価と AH 非感受性株の克服

AH は T-及び M-指向性に関係なく、実験室株及び糖鎖数の多い(17-20)患者分離株に対し、また逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に対する耐性株に対してその耐性マーカーに関係なく活性を示した (表 2)。しかし、糖鎖数の少ない(14-16)患者分離株には、ほとんど活性を示さないことが明らかとなった。このことから AH の活性は gp120 上の糖鎖数、特に AH が標的とする高マンノース型糖鎖数に依存すると考えられた。今回試験した HIV 株の gp120 上の糖鎖数は分かっているが、高マンノース型糖鎖数は不明である。高マンノース型糖鎖数が明らかになれば、抗 HIV 活性との対応がさらに明確になると思われる。最近、糖鎖を標的とした抗 HIV 剤に耐性な株では糖鎖がまばらになっており、gp120 の蛋白質がむき出しになることで抗原性が高まり、しかも免疫原性も高まるという仮説が出され、新しい HIV/AIDS 対策の観点からも、また AH の抗 HIV 薬としての開発においても新しい方向を示すものとして注目される。

上述のように、AH は糖鎖数の少ない HIV 株 (AH 非感受性株) に対してはほとんど活性を示

さないことが明らかとなった。そこで、これらの糖鎖数の少ない株に対しても活性を示す AH 変異体の調製を目的として、糖鎖結合部位を増やした AH 2 量体の調製を試みた。AH を 2 量体とするうえで、2 分子を直結すると活性は失われてしまうため (図 12)、適切なリンカーを介する必要があると考えられた。黄色ブドウ球菌プロテイン A 由来の fragment B をリンカーとした AH 2 量体 (AH dimer/FB) と Ricin B 鎖の配列をリンカーとした AH 2 量体 (AH dimer/RTB-L) の 2 種類を調製し (図 12)、これらの変異体の合胞体形成阻害活性を測定した結果、His-TEV-AH dimer/FB では 5 倍に、His-TEV-AH dimer/RTB-L では 20 倍に活性が上昇した (図 12)。2 種類の変異体で活性上昇の程度が異なっていたが、各 2 量体の AH 部分の立体的配置により糖鎖への結合のし易さが異なり、合胞体形成阻害活性が異なると推定された。最も活性上昇の大きかった His-TEV-AH dimer/RTB-L について、患者分離株に対する抗 HIV 活性を測定したところ、株によって程度は異なるが 2-20 倍程度の活性上昇が見られ、特に AH 単量体で効果の無かった株に対しても、ある程度効果を示すようになった (表 3)。今後、AH 非感受性株の完全なる克服を目的として、AH のさらなる多量体化 (3 量体又は 4 量体) を検討する。

#### 6) 高活性変異体の大量生産系の確立と AH 発現に必須な DNA 領域の解析

AH 変異体は、大腸菌にて His Tag を含む 30 アミノ酸残基との融合蛋白質として発現させているが、Tag の切り離しに用いるプロテアーゼが非常に高価なため、大量生産には向かない。そこで、放線菌を用いて、AH 変異体の安価で Tag を含まない状態での生産系確立について検討した。*L. albida* から切り出した AH 遺伝子を含む DNA 断片を鋳型とし、AH 遺伝子及びその上流のプロモーター領域と下流のターミネーター領域を含むと推定される約 2.0 kbp 部分を PCR で増幅し、放線菌ベクター pIJ702 に連結した。このプラス

ミドを *S. lividans* に組み込み、AH の発現を試みた。その結果、AH は発現されたがシグナル配列とスペーサー領域が除去されておらず、合胞体形成阻害活性も失われていた。次に、*S. albus*、*S. ambofaciens* 及び *S. griseus* で AH の発現を試した。その結果、*S. griseus* でのみ、シグナル配列とスペーサー領域が除去された形で、かつ *L. albida* から得られた AH と同等の合胞体形成阻害活性を示す AH の発現に成功した。今後、上述の高活性変異体の発現を検討する。次に、AH 遺伝子のプロモーター領域とターミネーター領域の特定を行った。PCR で増幅させた種々の長さの AH 遺伝子を放線菌 *S. lividans* に形質転換し、AH 前駆体蛋白質生産の有無を調べた。その結果、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 (図 13)。AH 構造遺伝子の下流に存在する、DNA 塩基配列 1145 番目から 1252 番目の間にはヘアピン構造が存在し、これが転写終結領域であると考えられた。また、AH 構造遺伝子の上流部分の塩基配列を詳細に検討した結果、AH 構造遺伝子の 302 bp から 262 bp 上流の間にプロモーター領域が存在し、261 番目の 'A' から転写が開始されると予想された。7) マイコフェノール酸 (MPA) の接着・侵入阻害機構の解析

微生物由来の合胞体形成阻害剤の探索の過程で選択されたが、IMPDH を阻害し、免疫抑制剤として用いられる MPA を生産していることを見出した。MPA は合胞体形成に依存した D-ガラクトシダーゼ活性の上昇を 3.1  $\mu$ M でほぼ完全に阻害した (図 14)。また、タンパク質レベルでも D-ガラクトシダーゼと gp120 の発現を同様に阻害した。一方、いずれの阻害もグアノシンを添加することにより回復した。従って、MPA は IMPDH を阻害することで gp120 の発現を抑制し、その結果それを介した合胞体形成が阻害されたと考えられる。従って、MPA の抗 HIV 作用においても、その作用メカニズムの一つとして gp120 のようにウイルスの接着・侵入に関与し、なおかつ発現量が多い蛋白質を減少させることが含まれるこ

とが示唆された。

## E. 結論

AH は、その 3 つの糖鎖結合ポケットに gp120 上の 3 本の高マンノース型糖鎖が結合することにより、強い親和性と高い選択性を示す。しかし、その特徴故に糖鎖数の少ない患者分離 HIV 株に対する活性が弱いことが明らかとなった。本研究で得られた高活性 2 量体 His-TEV-AH dimer/RTB-L は、AH 感受性株のみならず非感受性株に対しても強い抗 HIV 活性を示すようになった。今後、非感受性株の完全なる克服を目指し、さらなる多量体化 (3 量体又は 4 量体) を検討する。また、このような高活性変異体の大量生産系を確立しなければならない。*S. griseus* を用いた、Tag を含まない形での生産系にて変異体の生産を取り急ぎ行う。また、放線菌に限らず大腸菌又は植物細胞を用いた大量生産系の確立についても検討する。また、His-TEV-AH dimer/RTB-L を用いて前臨床試験 (免疫原性、抗原性、粘膜刺激作用など) や、サルを用いた SIV の感染阻害実験の実施についても検討する。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) H. Chiba, J. Inokoshi, H. Nakashima, S. Omura and H. Tanaka. Actinohivin, a novel anti-human immunodeficiency virus protein from an actinomycete, inhibits viral entry to cells by binding high-mannose type sugar chains of gp120 Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, 316, 203-210.
- (2) K. Shiomi, R. Matsui, M. Isozaki, H. Chiba, T. Sugai, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, T. Chiba, H. Yan, Y. Kitamura, W. Sugiura, S. Omura and H. Tanaka. Fungal phenalenones

inhibit HIV-1 integrase J. Antibot. 2005, 58, 65-68.

(3) A. Takahashi, J. Inokoshi, H. Chiba, S. Omura and H. Tanaka. Essential regions for antiviral activities of actinohivin, a sugar-binding anti-human immunodeficiency virus protein from an actinomycete. Arch. Biochem. Biophys. 2005, 437, 233-240.

(4) H. Ui, S. Asanuma, H. Chiba, A. Takahashi, Y. Yamaguchi, R. Masuma, S. Omura and H. Tanaka. Mycophenolic acid inhibits syncytium formation accompanied by reduction of gp120 expression. J. Antibiot. 2005, 58, 514-518.

## 2. 学会発表

(1)菅井隆弘、千葉春美、猪腰淳嗣、田中晴雄、松尾一郎、伊藤幸成、大村智 抗 HIV タンパク質 アクチノヒビンは  $\alpha$ 1-2mannose 側鎖を認識する 第 77 回日本生化学会大会(横浜)2004. 10. 13-16.

(2) 高橋淳、猪腰淳嗣、千葉春美、大村智、田中晴雄 gp120 high-mannose 型糖鎖と結合する抗 HIV 蛋白質 actinohivin の活性必須領域の解析 第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 2004. 10. 13-16.

(3) A. Takahashi, J. Inokoshi, H. Chiba, S. Omura and H. Tanaka Analysis of essential regions for biological activities of the potent anti-HIV protein actinohivin that binds to high-mannose sugar chains of gp120. GMBIM/BMP (San Diego, CA) 2004.11.14-18

(4) 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 actinohivin の高活性変異体の調製 日本薬学会第 125 年会 (東京) 2005.3.29-31

(5) 千葉春美、菅井隆弘、猪腰淳嗣、大村智、田中晴雄 抗 HIV タンパク質 actinohivin の gp120 高マンノース型糖鎖への結合 日本薬学会第 125 年会 (東京) 2005.3.29-31

(6) H. Tanaka, H. Chiba, J. inokoshi, A.

Takahashi and S. Omura. The anti-HIV protein actinohivin that blocks viral entry to cells binds to high-mannose type sugar chains of gp120 specifically like an antibody. KEYSTONE SYMPOSIA (Banff, Alberta, Canada) 2005. 4. 9-15

(7) Haruo Tanaka. "Actinohivin, a promising anti-HIV protein of microbial origin" Max Tishler Memorial Symposium (Tokyo, Japan) 2005. 7. 12

(8) H. Tanaka, H. Chiba, J. inokoshi, A. Takahashi, S. Omura. The anti-HIV protein actinohivin that blocks viral entry to cells by its specific binding to high-mannose type sugar chains of gp120 through cluster effects as lectin. Interscience Conference on(Washington, DC, USA) 2005. 12. 16-19

(9) 猪腰淳嗣、高橋淳、供田洋、大村智、田中晴雄 アクチノヒビン遺伝子の転写領域の解析と放線菌を宿主とした発現系の確立 日本薬学会 126 年会 (仙台) 2006. 3. 28-30

(10) 高橋淳、猪腰淳嗣、大村智、田中晴雄 抗 HIV 蛋白質 アクチノヒビンの高活性変異体 2 日本薬学会 126 年会 (仙台) 2006.3.28-30.

(11) H. Tanaka, H. Chiba, A. Takahashi, J. Inokoshi, S. Omura. Actinohivin, a Promising Anti-HIV Protein of Microbial Origin. Natural Products Discovery and Production: New Challenges: New Opportunities (Santafe, USA) 2006. 6. 4-8.

(12) H. Tanaka, H. Chiba, J. inokoshi, A. Takahashi, S. Omura. Actinohivin, a Promising Anti-HIV Protein of Microbial Origin. World AIDS Day (Tianjin, China) 2006. 12. 1-3

(13) 高橋淳、猪腰淳嗣、岡慎一、蜂谷敦子、大村智、田中晴雄 抗 HIV 蛋白質 アクチノヒビンの多量体化による高活性変異体の調製 日本薬学会 127 年会 (富山) 2007.3.28-30

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

#### (1) 特願 2004-346644、PCT/IP2005/021981

抗 HIV 薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子、抗 HIV 薬の製造方法 発明者：田中晴雄、猪腰淳嗣、大村智、  
出願人：北里学園

#### (2) 特願 2006-323043

発明の名称：アクチノヒビン多量体を含む融合タンパク質からなる抗 HIV 薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子および抗 HIV の製造法

発明者：田中晴雄、猪腰淳嗣、高橋淳、大村智

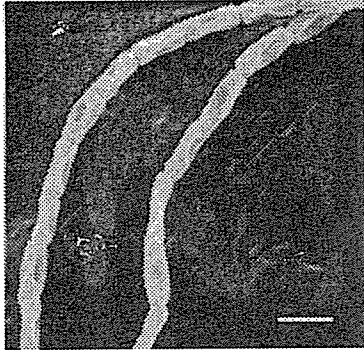
出願人：有限会社キイム・ファーマ・ラボ

### 2. 実用新案登録

該当無し



1- 38 ASVTIRNAQTGRLLD SNYNGNVYTL PANGGNYQRWTGP  
 39- 76 GDGTVRNAQTGRCLD SNYDGAVYTL PCNGGSYQKWLFY  
 77-114 SNGYIQNVETGRVLD SNYNGNVYTL PANGGNYQKWYTG  
 — : LD motif                      - - - - - : QXW motif



*Longispora albida* gen. nov., sp. nov.  
 (Scale: 1 μm)

Virus strain	IC <sub>50</sub> (nM)
T-tropic HIV-1	
IIIB	2
NL4-3	16
O18A (Primary isolate)	110
M-tropic HIV-1	
JR-CFS	38
HIV-2	
ROD	14
EHO	3.7

図 1. AH の生産菌、AH のアミノ酸配列及び AH の抗 HIV 活性

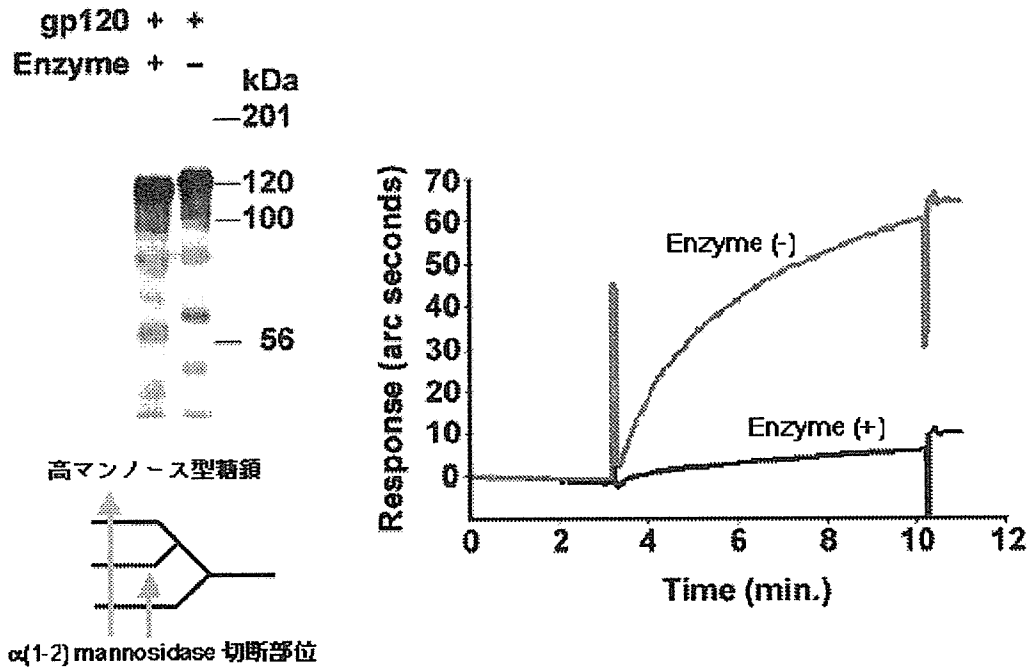


図 2. α(1-2) mannosidase 処理前後の gp120 と AH の結合

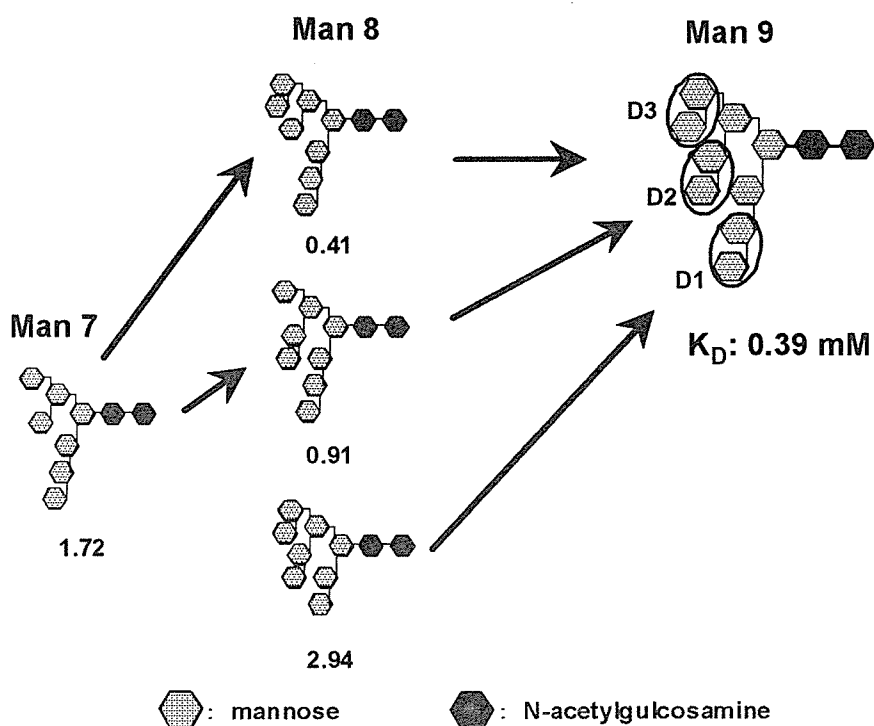


図 3. AH の各種高マンノース型糖鎖に対する親和性 (フロンタルアフィニティー・クロマトグラフィーによる。糖鎖解析センターの平林博士及び久野博士との共同研究)

Protein (binding specificity)	Amino acid sequence		
<i>Longispora albida</i> Actinohivin (high mannose type oligosaccharide)	1	ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYTLPANGGNYQRWTGP	38 segment 1
	39	G̲D̲G̲T̲V̲R̲N̲A̲Q̲T̲G̲R̲C̲L̲D̲S̲N̲Y̲D̲G̲A̲V̲Y̲T̲L̲P̲C̲N̲G̲G̲S̲Y̲Q̲K̲W̲L̲F̲Y	76 segment 2
	77	S̲N̲G̲Y̲I̲Q̲N̲V̲E̲T̲G̲R̲V̲L̲D̲S̲N̲Y̲N̲G̲N̲V̲Y̲T̲L̲P̲A̲N̲G̲G̲N̲Y̲Q̲K̲W̲Y̲T̲G	114 segment 3
<i>Ricinus communis</i> Ricin B chain (lactose, galactose)	11	--VRIVG--R̲N̲G̲L̲C̲V̲D̲V̲R̲D̲G̲R̲F̲H̲N̲G̲N̲A̲I̲Q̲L̲W̲P̲C̲K̲S̲N̲T̲D̲A̲N̲Q̲L̲W̲T̲L̲K	
	53	RDNTIRS--NG-R̲C̲L̲T̲T̲Y--G̲Y̲S̲P̲G̲V̲Y̲V̲M̲I̲Y̲D̲C̲N̲T̲A̲A̲T̲D̲A̲T̲R̲W̲Q̲I̲W	
	94	D̲N̲G̲T̲I̲I̲N̲P̲-R̲S̲S̲I̲V̲L̲A̲A̲T--S̲G̲N̲S̲G̲T̲T̲L̲T̲V̲Q̲T̲N̲I--Y̲A̲V̲S̲O̲G̲W̲L̲P̲T̲N̲T̲O̲P	
	140	<u>F̲V̲T̲T̲I̲V̲G--L̲Y̲G̲I̲C̲L̲Q̲A̲N--S--G̲Q̲V̲W̲I̲E̲D̲C̲S̲S--E̲K̲A̲E̲Q̲Q̲W̲A̲L̲Y</u>	
	177	ADG̲S̲I̲R̲P̲Q̲N̲R̲D̲N̲C̲L̲T̲S--D̲S̲N--I̲R̲E̲T̲V̲V̲K̲I̲L̲S̲C̲G̲P̲A--S̲S̲G̲Q̲R̲W̲M̲E̲K	
224	NDG̲T̲I̲L̲N̲L--Y̲S̲G̲I̲V̲L̲D̲V̲R̲A--S̲D̲P̲S̲L̲K̲Q̲I̲I̲L̲Y̲P̲L̲H--G̲D̲E̲N̲Q̲I̲W̲L̲P̲L̲F		

□: sugar binding pocket      —: linker  
•: sugar binding site

図 4. CBM13 に属する AH と Ricin B 鎖のアミノ酸配列

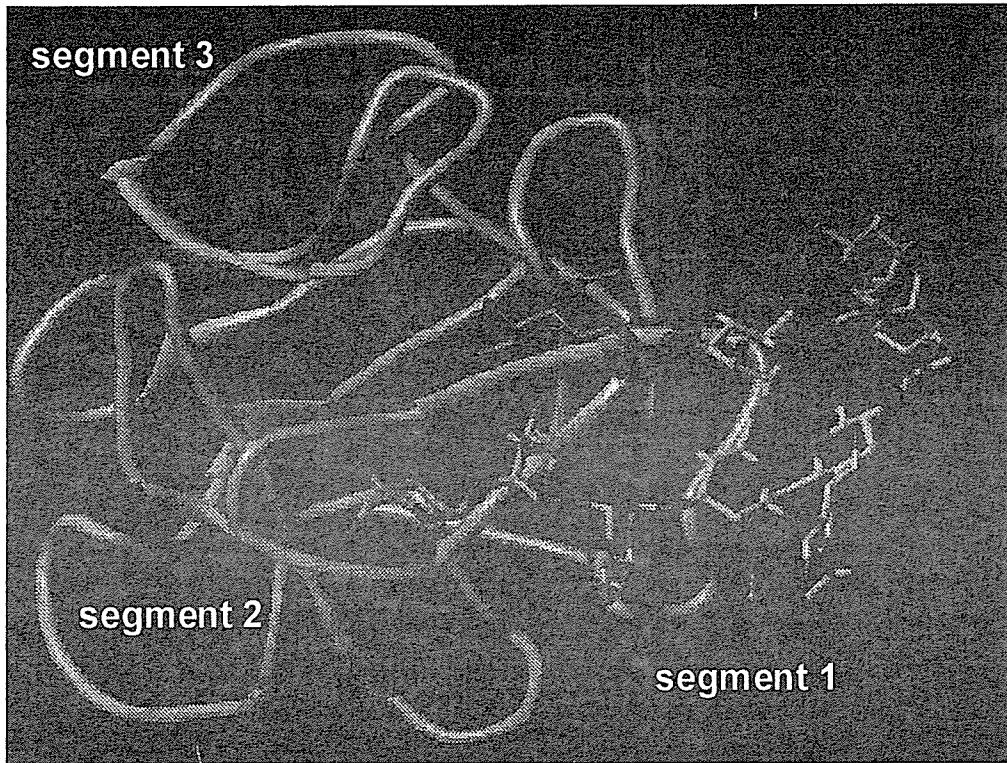


図 5. AH と高マンノース型糖鎖複合体の三次元構造  
(北里大・薬 広野教授との共同研究)

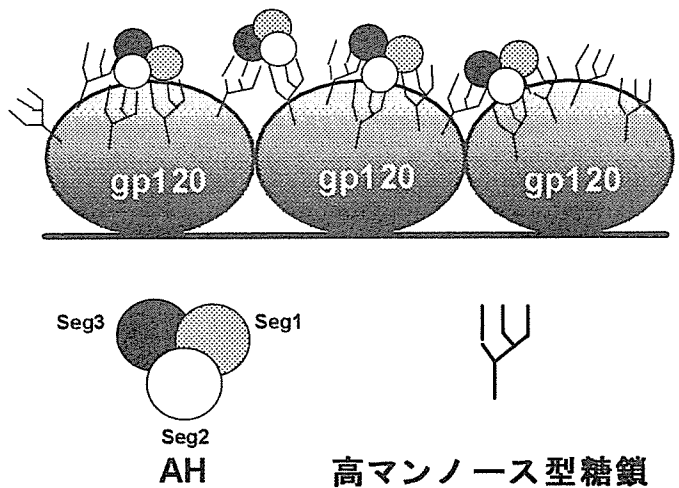
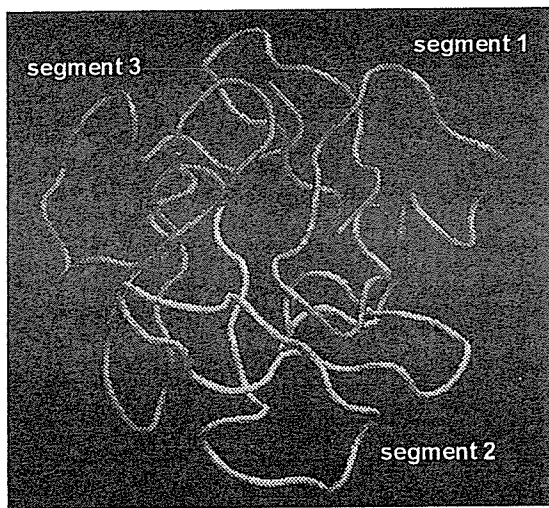


図 6. AH の推定立体構造と gp120 との結合様式

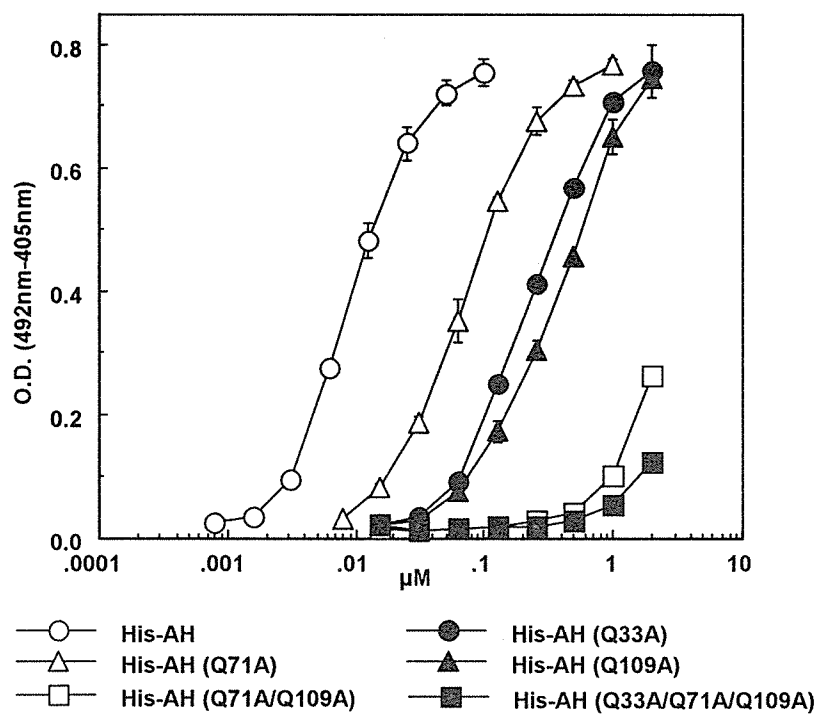
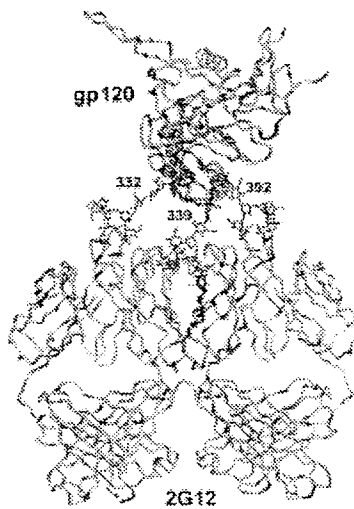


図 7. QA 置換体の gp120 への結合性 (ELISA 法による)

Protein	Structure	IC <sub>50</sub> (μM)
His-AH		0.52
His-AH (Q33A)		9.04
His-AH (Q71A)		4.96
His-AH (Q109A)		15.0
His-AH (Q71A/Q109A)		>50
His-AH (Q33A/Q71A/Q109A)		>50

図 8. QA 置換体の合胞体形成阻害活性

(1) Antibody 2G12

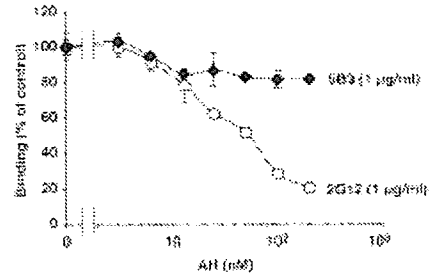


D. A. Colaresi et al. Science vol. 300, 2003 p2065-71

2G12 recognizes the sugar chains at N295, N332 and N392 on gp120.

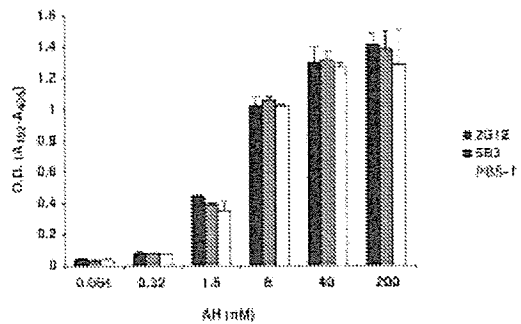
2G12 was obtained from Dr. Hermann Kalinger through the NIH AIDS Research and Reference Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.

(2) Effect of AH on gp120-2G12 binding



Antibody 5B3 recognizes N-terminal C1 region of gp120. The result shows that AH binds to sugar chains recognized by 2G12

(3) Effect of 2G12 on gp120-AH binding



AH-binding was not inhibited by these antibodies, indicating that AH also binds other sugar chains than those that 2G12 recognizes.

図 9. HIV の糖鎖認識抗体 2G12 の AH-gp120 結合に対する影響

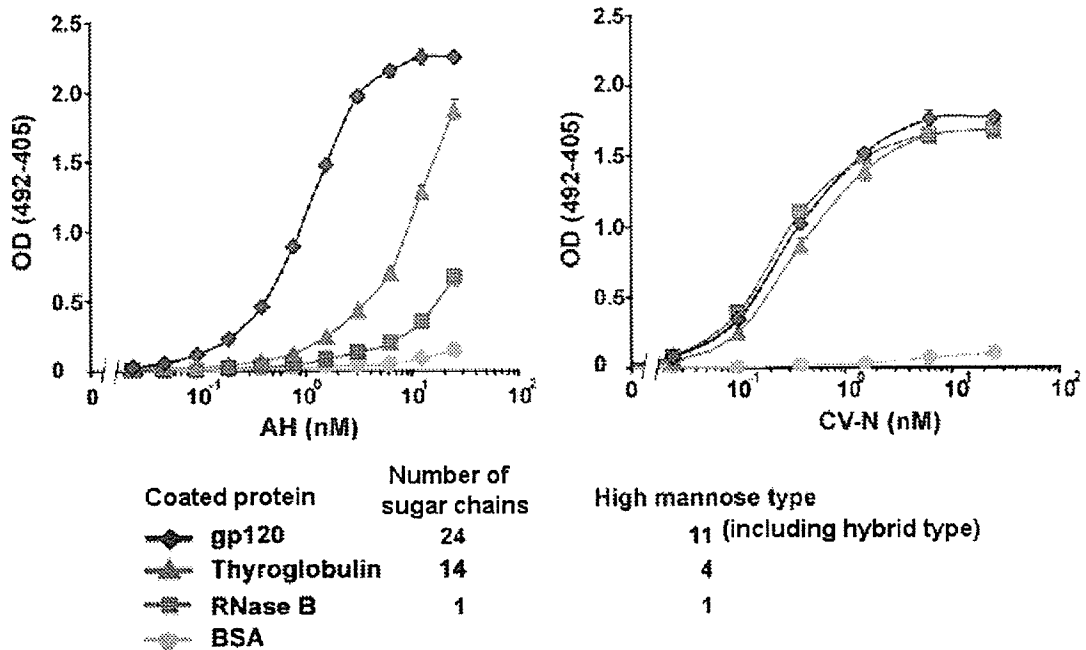


図 10. AH 及び CV-N の各種糖蛋白質への結合性 (ELISA 法による)

Protein	Amino acid sequence	IC <sub>50</sub> (μM)
His-AH	ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYTLPANGGNYQRWTGP GDGTVRNAQTGRCLDSNYDGAVYTLPCNGGSYQKWLFFY SNGYIQNVETGRVLD SNYNGNVYTLPANGGNYQKWTG	0.56
His-Seg1 trimer	ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYTLPANGGNYQRWTGP GDGTVRNAQTGRLLDSNYNGNVYTLPANGGNYQRWLFY SNGYIQNVETGRLLDSNYNGNVYTLPANGGNYQRWYTG	0.28
His-Seg2 trimer	ASVTIRNAQTGRCLDSNYDGAVYTLPCNGGSYQKWTGP GDGTVRNAQTGRCLDSNYDGAVYTLPCNGGSYQKWLFFY SNGYIQNVETGRCLDSNYDGAVYTLPCNGGSYQKWTG	2.71
His-Seg3 trimer	ASVTIRNAQTGRVLD SNYNGNVYTLPANGGNYQKWTGP GDGTVRNAQTGRVLD SNYNGNVYTLPANGGNYQKWLFFY SNGYIQNVETGRVLD SNYNGNVYTLPANGGNYQKWTG	0.48

図 11. セグメントトリマーの合胞体形成阻害活性

Protein	Structure	IC <sub>50</sub> (nM) (fold)
His-TEV-AH		127 (1.0)
His-TEV-AH/dimer		>1000 (-)
His-TEV-AH dimer /FB	<p>-Q-K-W-Y-T-G-A-K-K-L-N-D-A-Q-A-P-K-S-D-A-S-V-T-I-R-N-A-</p>	24 (5.3)
His-TEV-AH dimer /RTB-L	<p>-Q-K-W-L-P-T-N-N-T-Q-P-F-V-T-T-I-R-N-A-</p> <p>RTB*3</p>	7 (18.6)
Recombinant AH		113 (1.0)
AH dimer/FB		53 (2.4)
AH dimer/RTB-L		14 (8.9)

\*1 TEV : TEV protease recognition sequence

\*2 FB: fragment B of *Staphylococcus aureus*

\*3 RTB: residues 132-143 of ricin B chain

図 12. 各種 AH 2 量体の構造と合胞体形成阻害活性

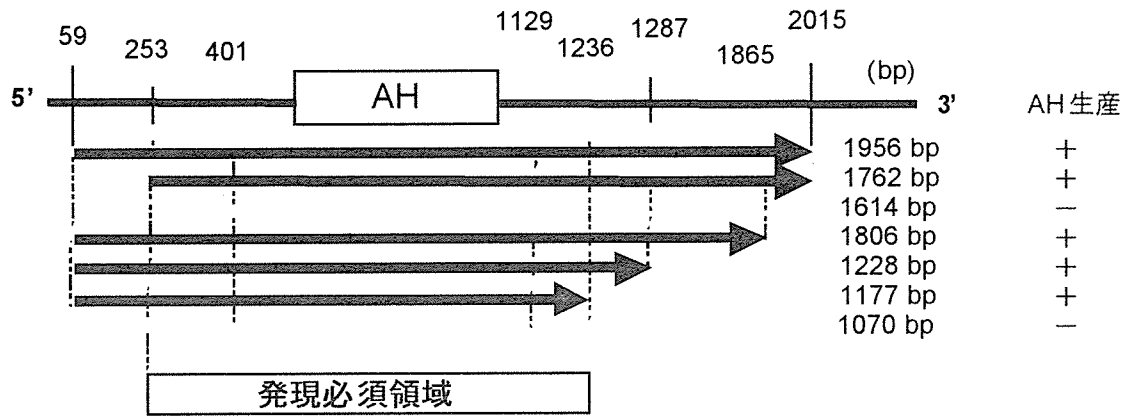


図 13. AH 発現に必要な AH 遺伝子領域

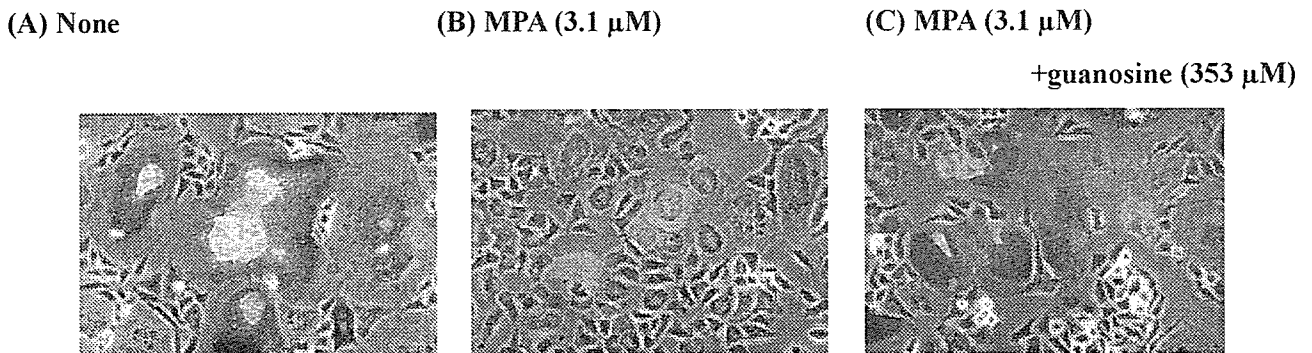


図 14. MPA による合胞体形成阻害とグアノシンによる回復  
 HeLa/T-env/Tat 細胞と HeLa/CD4/LacZ 細胞を混合培養することにより生じた合胞体のβ-ガラクトシダーゼ活性を X-gal で染色した。

表 1. AH とシアロリン-N (CV-N) の糖鎖と糖蛋白質に対する親和性の比較

	Man $\alpha(1-2)$ Man	Man 9	RNase B	gp120
AH	a $5.8 \times 10^{-4}$	a $3.9 \times 10^{-4}$	—	c $3.4 \times 10^{-8}$
CV-N	b $1.5 \times 10^{-6}$	b $6.7 \times 10^{-9}$	c $3.0 \times 10^{-8}$	c $1.7 \times 10^{-8}$

a: determined by FAC b: colorimetry c: biosensor IA sys

( $K_D$ : M)

表 2. 臨床分離株を含む種々の HIV 株に対する AH の抗 HIV 活性

表 2-1. 実験室株に対する AH の抗 HIV 活性

Laboratory strain	IC <sub>50</sub> (nM)
NL432	64
BaL	35
IIIB	26

表 2-2. 臨床分離株に対する AH の抗 HIV 活性

Subtype	ACC No	Resistance	IC <sub>50</sub> (nM)
B	158	RTI/NNRTI/PI	<10
	182	NNRTI/PI	68
	242	RTI/NNRTI/PI	700
	307	Sensitive	840
	37	NNRTI	>10000
AE	251	RTI/PI	28
	214	Sensitive	56
	36	Sensitive	>10000

表 2-3. AH の抗 HIV 活性と gp120 の糖鎖数

Subtype	ACC No	IC <sub>50</sub> (nM)	Number of N-glycosilation
B	37	>10000	14
B	307	840	15
AE	36	>10000	16
B	BaL	35	17
AE	214	56	17
AE	251	28	17
B	NL	64	18
B	IIIB	26	18
B	182	68	18
B	242	700	19
B	158	<10	20



表 3. His-TEV-AH dimer/RTB-L の臨床分離 HIV 株に対する抗 HIV 活性

HIV strain	IC <sub>50</sub> (nM)		Fold	Nnumber of N-glycosilation
	AH	His-TEV-AH dimer/RTB-L		
37	>10000	>1000	-	14
307	620	35	18	15
36	>10000	4	>2500	16
Bal	34	4	8	17
214	44	6	8	17
251	23	7	3	17
NL	34	2	16	18
182	30	9	3	18
242	140	76	2	19
158	10	2	5	20

「hu-PBL-SCID マウス系での薬剤の抗 HIV-1 活性の評価」

分担研究者 田中勇悦 琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究要旨：本研究では、生体内で機能しかつ多剤耐性 HIV-1 の制御を可能とする新たな治療戦略の候補として、HIV-1 の coreceptor アンタゴニストおよびヒト CD4+T 細胞が産生する R5 HIV-1 抑制因子（CD4 因子）に着目しその有効性を検討することを主な目的とした。平成 16～18 年度の研究により、CXCR4 指向性 HIV-1 の多剤耐性 HIV-1 株の制御は CXCR4 アンタゴニストで可能であることを試験管内およびヒト化マウス(hu-PBL-SCID)で検証することに成功した。

### A. 研究目的

HIV-1 はヒト以外の動物にはエイズを起こさない。エイズモデルとして霊長類を用いる感染実験系では、人工的に病原性を付加したサルエイズウイルス（SIV-1）と HIV-1 の合の子ウイルスが用いられるが、これらの動物入手が困難であることもあり HIV-1 によるエイズの研究には制限があるのが現状である。そこで本研究では、これらヒトや猿の代わりに、HIV-1 生体感染実験をシュミレーションできるモデルである hu-PBL-SCID マウスを用いて HIV-1 感染実験を行い、個体内における種々の薬剤耐性 HIV-1 の感染病態を解明し、その制御法について研究開発を進めることを目的とした。具体的には、薬剤耐性 HIV-1 に対する HIV-1 coreceptor アンタゴニストの抗 HIV-1 効果、および樹状細胞免疫法を用いて誘導されるヒト CD4+T 細胞由来の R5 HIV-1 抑制因子の抑制効果について様々な角度から詳細な検討をすることを目的とした。

### B. 研究方法（倫理面への配慮）

用いた多剤耐性 HIV-1 株は、国立感染症研究所

の杉浦博士、西澤博士らより供与された。ウイルスの受領においては双方の研究機関間の感染性微生物の取り扱いに関する規程に従った。標準 HIV-1 には、HIV-1 NL4-3(X4)の分子クローン株を使用した。In vitro では、正常ドナーの PBMC を 10 mg/ml PHA-P、20 U/ml の IL-2 を含む 5% FCS-RPMI 培地で 3 日間刺激培養した細胞群を標的細胞とした。感染個体として成人 PBMC 移植した hu-PBL-SCID マウスを用いた。coreceptor アンタゴニストにはクレハから提供を受けた CXCR4 アンタゴニストの KRH-1636 と CCR5 アンタゴニストである SCH-C を用いた。

ヒト CD4+T 細胞由来の R5 HIV-1 抑制因子の誘導のために、培養樹状細胞を不活化 HIV-1 抗原で感作し、hu-PBL-SCID マウスを免疫した。応答する CD4+T 細胞がどのような抗原を認識するのかについては、500 種余の HIV-1 のペプチド（米国エイズプログラムから供与）を用いて検討した。

HIV-1 の感染の度合いは、HIV-1 p24 の ELISA による定量法で推定した。

最終年度には、ヒト IL-4 を産生する免疫不全マ

ウス（実中研との共同研究）を用いた。

この動物実験計画は、琉球大学の動物実験倫理委員会で審査され、許可されている。また供血者には十分な説明をして了解を得た上で協力をいただいた。

### C.研究結果

(1) CCR5 アンタゴニストによる CXCR4 指向性への変異の有無  
現在日本で入手可能な 3 系統の hu-PBL-SCID マウス(C.B-17、NOG、RAG2/ $\gamma c$ -系統)に、R5 HIV-1JR-CSF 株を感染させバイレミアが起きている状態のマウスに、CCR5 アンタゴニスト SCH-C を接種直後に体内濃度が 10  $\mu$ M になるように腹腔内接種した。量は、1 日 1 回、5 日間連続投与である。このマウスで CCR5 アンタゴニストを回避し、その代用として CXCR4 を使う変異株が出現するかどうかを、回収血清、腹腔洗浄液、回収細胞について調べた。CXCR4 を使う HIV-1 は効率良く MT-2 細胞で増殖することから、上記サンプルを MT-2 細胞培養に加え、1 ヶ月継代培養を行った。培養上清中のウイルス p24 を定期的にモニターしたが、X4 ウイルスの存在は観察できなかった。したがって、hu-PBL-SCID マウスの系では、R5 から X4 への変異は短期間では起きないことが示唆された。

(2) CD4 因子を産生する Th の標的ペプチド RAG2/ $\gamma c$ -系統 SCID マウスにヒト PBMC と不活化 HIV-1 感作培養樹状細胞を移植した hu-PBL-SCID マウスには、R5 HIV-1 特異的抑制因子が誘導される。この因子は CD4+T 細胞が産生するが、どのようなウイルス蛋白に反応する CD4+T 細胞クロンが産生するのかを検討した。つまり、免疫 CD4+T 細胞を種々の HIV-1 ペプチドで再刺激し、培養上清中の R5 HIV-1

抑制活性を測定した。その結果、抗原性を持つ HIV-1 ペプチドには多様性があり、複数のウイルス抗原が認識されることが分かった。HLA 拘束性と思われるドナー間の差違も観察された。このような差違がエイズの病態形成に深く関与することも考えられる。

(3) 多剤耐性 HIV-1 の CD4 因子への感受性調べたのは CCR5 を使うと推定される 11 の多剤耐性株である。感染価をそろえて活性化 PBMC に感染させた。CXCR4 アンタゴニスト、CCR5 アンタゴニスト、CD4 因子の前処理の効果を p24 産生で比較すると 11 株中 4 株が CCR5 アンタゴニストおよび CD4 因子の抑制感受性を示した。コントロールに用いた R5 HIV-1 JR-CSF および X4 HIV-1 NL4-3 株は感染 5 日目まで 10~20 ng/ml まで p24 値が上昇したが、耐性株の増殖は全てその半以下であり、耐性株は感染・増殖性が低いことが示唆された。CCR5 アンタゴニストおよび CD4 因子の抑制感受性を示した 4 株では、これらの両方の抑制因子による相乗効果は見られなかった。CCR5 アンタゴニスト非感受性株は、CXCR4 も同時に使う dual tropic である可能性があったので、CXCR4 アンタゴニストと CCR5 アンタゴニストを併用したが、どのウイルスの感染もこれらの操作で完全に抑制される例はなかった。

(4) IL-4 hu-PBL-SCID マウスでの CXCR4 アンタゴニストの活性  
多剤耐性 HIV-1 株の中で活性化 PBMC で良く増殖し、かつ CXCR4 アンタゴニスト KRH-1636 に感染抑制感受性を示す 3 株を選んで hu-PBL-SCID マウスの感染に用いた。腹腔洗浄液、血清中の p24 のレベルで比較するとコントロールの酒石酸投与群では、4 匹中 4 匹に感染が認められた。しかし、KRH-1636 投与群では、4 匹中 3 匹が p24 陰性、残りの一匹も p24

値は低い値であった。また、コントロール群の腹腔細胞をヒト CD3 群で p24 の細胞内染色を試したところ 4 匹中、4 匹に高い陽性率で感染細胞群が認められた。しかし、薬剤投与群での陽性率は低かった。

#### D. 考察

感染初期からエイズ期において感染者内に寄生する R5 HIV-1 の増殖抑制とその CXCR4 指向性 HIV-1 への変異を予防する治療法を開発することは、エイズ発症阻止につながる大きな目標である。

今回、R5 HIV-1 感染 hu-PBL-SCID マウスの CCR5 antagonist SCH-C 投与実験では CXCR4 指向性 HIV-1 が回収されなかった。この観察は、以前の報告で変異が起きるとされている別の CCR5 antagonist AOP-RANTES よりも SCH-C が変異予防に優れていることを示唆する。あるいは、今回の hu-PBL-SCID マウス実験系が CXCR4 指向性 HIV-1 への変異に対し抑制的に働く生体内環境なのかもしれない。何れにせよ、本薬剤および CXCR4 アンタゴニストが、薬剤耐性の R5 HIV-1 に効果があるかどうかの検討を進める必要がある。

一方、R5 HIV-1 特異的抑制因子を産生する免疫ヒト CD4+T 細胞は、複数の HIV-1 抗原の複数の HIV-1 ペプチドを認識することが明らかとなった。そこで、薬剤耐性の R5 HIV-1 が抗原エпитープを保持していれば、樹状細胞免疫で制御が可能かもしれない。薬剤耐性 R5 HIV-1 がこの因子で制御できるかを今後検討してゆきたい。

本研究で、調べた薬剤耐性 HIV-1 は、半数以上が CXCR4 を使用する HIV-1 であった。数株のみが CCR5 をある程度利用することが明らかとなった。CCR5 の利用性と CD4 因子に対する感

受性は相関していたが、多剤耐性ウイルスが全体としてどの程度 CXCR4 および CCR5 を使用するのか、今後検討する必要がある。免疫療法の効果に関して不明であるが、これらのウイルスの免疫原性について樹状細胞を用いた hu-PBL-SCID マウス免疫システムで検討したい。

今回の実験により、多剤耐性 HIV-1 株の中でも強い病原性を持つ CXCR4 使用 HIV-1(X4 HIV-1)が、CXCR4 アンタゴニスト(KRH-1636)に対して *in vivo* でも感受性を示すことが明らかにされた。このような成果は、新たに開発されたヒト IL-4 を産生する免疫不全マウスを用いて作製した hu-PBL-SCID マウスを用いたことにより明らかにされた事実である。薬剤感受性臨床分離 HIV-1 でも、多剤耐性 HIV-1 でも CXCR4 の指向性獲得は強い病原性と相関することから、薬剤耐性 HIV-1 が CXCR4 使用性にシフトすることはコントロールが難しい病態へのシフトにつながるものが強く懸念される。そこで CXCR4 指向性へのシフトを避けるためにも今回のような CXCR4 アンタゴニストの臨床応用に期待がかけられる。同様に CCR5 アンタゴニストの抗ウイルス活性にも新たな期待がかけられており、経口投与が可能であり、毒性の少ないかつ少量で効果を示す新たな薬剤の開発が必須である。以上の成果は、今後のアンタゴニストのさらなる研究開発に弾みをつけることが期待される。

#### E. 結論

R5 HIV-1 感染後バイレミアになった hu-PBL-SCID マウスでは、短期間の CCR5 アンタゴニスト SHC-C 投与によって X4 HIV-1 が出現しないこと、ヒト CD4 因子は複数の