

政策創薬総合研究事業
政策創薬総合研究推進事業

平成18年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

目 次

重点研究

課題番号

KA11501	エイズに関連する日和見原虫感染症に対する新規創薬に関する研究	野崎 智義 ……	1
KA21503	HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛 ……	22
KA31504	ヒト型リンパ濾胞を持つエイズモデルマウスの作成とその応用	清水 則夫 ……	32
KA31505	HIV-1およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA核外輸送機構の解明に基づく創薬	高橋 秀宗 ……	45

国際研究グラント

SA14801	多剤耐性HIV-1変異株に高い活性を発揮する「新世代のプロテアーゼ阻害剤」の研究・開発	満屋 裕明 ……	57
SA14802	酵素との相互作用の解析に基づく耐性克服をめざしたエイズ治療薬の開発	木曾 良明 ……	71
SA14803	HIV感染者のエイズ発症抑制に関与する遺伝的・免疫学的素因の解析	横田 恭子 ……	88
SA14804	多剤耐性HIV-1の克服に向けた新規核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究	馬場 昌範 ……	103
SA14831	エイズ患者におけるカポジ肉腫、リンパ腫の発症機構の解明とその治療薬開発	片野 晴隆 ……	116
SA24807	宿主感染抵抗性遺伝子の分子同定と発現解析によるエイズワクチン戦略の開発	宮澤 正顕 ……	122
SA24808	細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発の研究	滝口 雅文 ……	157
SA24809	細胞性免疫誘導型prime/boostエイズワクチンの臨床評価系の確立	山本 直樹 ……	174
SA24810	CD4+細胞機能を活性化するワクチン、免疫療法の開発	森 一 泰 ……	193
SA34811	エイズ抗酸菌症治療のための新しい化学療法システムの開発	森 亨 ……	206
SAC4861	HIV転写制御機構の解明と新規治療法の開発	岡本 尚 ……	216
SAC4862	霊長類モデルを用いたエイズ腸管病態形成機構の解明と治療への応用	三浦 智行 ……	221

HIV-1およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA 核外輸送機構の解明に基づく創薬

所 属 国立感染症研究所 感染病理部

研究者 高橋 秀宗

研究要旨 HIV-1 ゲノム RNA の核外輸送を含む複製を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)分子プローブを使って観察可能とし、HIV-1 Rev の核外輸送を阻害するが、それ以外の核内蛋白の核外輸送は阻害しない薬剤のスクリーニング系を開発することを目的とした。MEK を内在性コントロールとしておくことより、Rev に特異的に作用する薬剤がスクリーニングできるようになった。また恒常活性型 Ran の存在により FRET 値を高めることができ、さらに阻害因子を使用して Rev の機能阻害を評価できる系であることを示した。一方 Rev と恒常活性型 Ran を同じベクターから発現させることにより Rev と Crm1 の会合に由来する高い FRET 値を得ることができ、フローサイトメトリーによるスクリーニング能を向上させた。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 感染病理部
飛梅 実
- (2) 京都大学大学院医学研究科
松田道行
- (3) (株) イムノヘルス ジャパン
森山雅美
- (4) (株) 大道産業 山口靖雄

A. 研究目的

HIV-1 のアクセサリタンパク質の 1 つである Rev は、HIV-1 ゲノムの Env 上に位置する RRE(Rev response element)配列に結合し、ウイルス RNA を核外へ輸送する。Env を含むウイルス mRNA はスプライシングを受けていない全長に相当し、ウイルス粒子へのゲノム RNA 取り込みにおいて、Rev が重要な役割を果たしていることがわかる。このとき Rev は、宿主細胞に存在する輸送タンパク質 Crm1 と結合し核外輸送を行うことが知られている。Crm1 は

importin β ファミリーに属する輸送タンパク質で、核外移行シグナルを持つ Rev と結合するが、それ以外にも多くの蛋白の核外輸送を担っている。従って、Rev の核外輸送の阻害を指標に薬剤スクリーニングを行った場合、他の蛋白の核外輸送をも阻害する可能性が高い。

そこで本研究では、ウイルスゲノムの粒子への取り込みを阻害する薬剤の開発を目標に、国産蛍光タンパク質を用いて、生細胞における Rev の核外輸送を阻害するが、それ以外の核内蛋白の核外輸送は阻害しない薬剤のスクリーニング系を開発する。

低分子 G 蛋白質ファミリーに属する Ran は、エネルギー依存的に細胞質から核内への輸送に関与していることが知られている。Ran は GDP 結合型として細胞質に存在し、核内では GTP 結合型として存在する。核内に存在する GTP 結合型 Ran は、Rev そして Crm1 と三者複合体を形成し細胞質へ移行する。その後 GTP 結合型 Ran は、細胞質で GDP 結合型へと加水分解され、三

者複合体は解離するという一連の反応をたどる。これまで成果により、我々の開発した Rev と Crm1 の会合を検出する FRET プローブは、恒常活性化型 Ran (Active Ran) の補完により、より強い FRET シグナルを誘導することが明らかとなっている。しかしながら、昨年度の検討では Crm1 の機能阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) の添加では active Ran 存在下で誘導された FRET の消失は認められなかった。本年度は我々の研究により Rev の機能を阻害することが明らかとなった欠損 TTP 変異体に加え、Rev-Crm1 の会合を詳細に検討した。

Rev 及び Crm1 の FRET プローブを作成し、既知の結合阻害剤が FRET 効率に与える影響をセルソーターを使用して検討した。セルソーターは多数の細胞を短時間に解析することが可能である。ソート機能により、任意のシグナル強度を持つ細胞を分離・回収することが可能である。これまでの研究において、我々は Rev-Crm1 の会合に由来する FRET シグナルを FACS-Aria を用いて検出することを可能にした。この系においても、active Ran 共存下では FRET シグナルは増強され、シグナルの分離が容易になることを昨年度報告している。本年度は、細胞への active Ran 導入効率を上げるため新規のベクター構築とそのベクター評価を行った。

B. 研究方法

① FRET プローブの構築

Rev のプローブ作製には、アマルガム社の蛍光タンパク質 AG (アザミグリーン) を用いた。対照として Crm1 により核外輸送されることが知られているセリンスレオニンチロシンリン酸化酵素 MEK を用いた。MEK のプローブ作成にはアマルガム社の蛍光タンパク質 KO (クサビラオレンジ) を用いた。これらの蛋白を安定に発現する細胞株を樹立するために、レトロウイル

スベクター-pMCs を改変してブラストシチジン耐性遺伝子を組み込んだ pMCsbsr を作成した。ついで、このベクターに hMEK1 と KO の融合遺伝子を組み込んだ。同様に、レトロウイルスベクター-MSCVpac に Rev と AG の融合遺伝子を組み込んだ。

Crm1 と融合する蛍光蛋白質として YFP (Yellow fluorescence protein) を用いた。YFP は励起波長 470nm であり、530nm の蛍光を発する。このときの Rev と融合発現する蛍光タンパク質として CFP (Cyan fluorescence protein) を用いた。CFP は励起波長 433nm であり、475nm の蛍光を発する。また、国産の蛍光分子であり CFP/YFP と同様に FRET を観察可能な蛍光分子ペアである mKO (改良型クサビラオレンジ) および mAG (改良型アザミグリーン) を用いた。mAG は最大励起波長 405 nm 最大蛍光波長 505 nm を有する。mKO は、最大励起波長 550 nm 最大蛍光波長 560 nm を有する。これらの蛍光蛋白質を Rev または Crm1 との融合蛋白質として発現するベクターを構築した。ベクターには β アクチンプロモーターを持つ pCAGGS を用いた。Rev 及び Crm1 の発現には、高い FRET 値を示す CFP-Rev、Crm1-YFP のペアを用いた。TTP 変異体 (TTP101) の発現には β アクチンプロモーターを持つ pCAGGS を用いた。また Rev の Crm1 結合配列を変異させた Rev M10 変異体 (Rev M10) を発現するベクターを構築した。

② 細胞株の樹立

ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞に、まず、Ecotropic virus の受容体遺伝子を pCX4hyg レトロウイルスベクターを用いて安定導入した。細胞はハイグロマイシン 200 μ g/ml で選択培養した。ついで、MCsbsr-MEK-KO と、MSCVpac-Rev-AG とから作成したレトロウイルスを感染させ、ブラストシチジンおよびピューロマイシンで選択培養した。また、MCsbsr-MEK-KO 単独を感染させた細胞も作

成し、プラストシチジンで選択培養した。

③ プローブ発現細胞の蛍光顕微鏡による解析
上記プローブ発現細胞を、直径 35mm のガラス底培養皿に播き、付着後に観察のため自家蛍光のないフェノールレッド不含の無血清培地に置換した。観察には、倒立型蛍光顕微鏡 IX81 (Olympus 社) に、冷却 CCD カメラ CoolSNAP-HQ (日本ローパー製) を搭載したもので画像取り込みを行った。画像は、メタモルフソフトウエア (日本モレキュラーデバイス社) を用いて解析を行った。各蛍光分子に対応した光学フィルターは、クロマ社の物を用いた。対物レンズは 60 倍の油浸レンズ (Olympus 社) を使用した。

Rev 及び Crm1 の細胞内局在の観察のため、ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞を、直径 35mm のガラス底培養皿に播き、上記のプローブを Fugen6 を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 36 時間後に、観察のため自家蛍光のないフェノールレッド不含の無血清培地に置換した。観察には、上記と同じ、倒立型蛍光顕微鏡、冷却 CCD カメラで画像取り込みを行った。解析も同様に (メタモルフソフトウエア) 行った。対物レンズは 60 倍の油浸レンズ (Olympus 社) を使用し、キセノンランプからの光を照射した。CFP の観察には 440AF21 励起、455DRLP ダイクロイックミラー、480AF30 蛍光フィルターを、YFP の観察には 485DF22 励起、505DRLP ダイクロイックミラー、535DF35 蛍光フィルターを用いた。mAG の観察には、BA410 励起フィルターと D505/40M 蛍光フィルターを、mKO には D555/40M 蛍光フィルターを用いた。ビームスプリッターには 470DCLP を用いた。

④ Rev と Crm1 の FRET プローブ

Rev 発現細胞のすべてにおいて active Ran を発現させるため、CFP-Rev の cDNA 下流に IRES

配列を挿入し、その下流に active Ran cDNA を挿入した。Crm1 発現ベクターは従来のものを利用した。

アマルガム社の蛍光タンパク質 AG (アザミグリーン) と KO (クサビラオレンジ) を、それぞれ FRET のドナータンパク質、アクセプタータンパク質として用い、Crm1 には AG を FRET ドナーとした。プローブとして、Crm1 の N 末 (AG-Crm1) または C 末 (Crm1-AG) に AG を融合させたもの、2 種類を作成した。

一方、Rev には mKO2L (改良型 KO) を融合し、FRET アクセプターとした。Crm1 と同様に、Rev の N 末 (mKO2L-Rev) または C 末 (Rev-mKO2L) に mKO2L を融合したプローブを作成した。

⑤ 細胞への導入

細胞は 293F 細胞を用いた。これはヒト腎臓細胞株 293 細胞由来の浮遊細胞であり、高効率に遺伝子導入が可能な細胞株である。

Rev-CFP-IRES-active Ran および Venus-Crm1 発現ベクターは fugene 6 を用いて 293F 細胞へ導入した。導入 30 時間後に細胞を回収し解析した。

⑥ Rev-Crm1 に対する恒常活性化型 Ran の効果の評価

Rev、Crm1 プローブ共発現時、そこへ更に恒常活性化型 Ran を共発現させた場合の FRET 効率の比較検討には、セルソーターを用いた。

⑦ セルソーターによる解析

ヒト腎臓由来浮遊系 293F 細胞を 6 穴プレートに撒き、上記のプローブを 293 フェクチンを用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 36 時間後に、FACS Aria (ベクトンディッキンソン社) により解析した。CFP の励起には 405nm バイオレットレーザーを用いた。CFP の蛍光によって励起される Venus の蛍光は 405nm レーザーラインの検出器を用いた。Crm1

の発現はVenusを指標として488nmブルーレーザーを用いて検出した。

(倫理面への配慮)

特に患者試料の使用や動物実験を行っていない。

C. 研究結果

① MEKおよびRev単独発現細胞においては、MEKおよびRevの双方とも細胞質に局在していた。しかし、両方を発現させると、Revの発現が著しく低下することがわかった。これは、RevのN末側にAGを融合させた場合も、C末側にAGを融合させた場合も同様であった。そこで、まず、MEK-KOを安定に発現する細胞株樹立し、この細胞にRevを発現させることとした。この系を用いて、レプトマイシン処理により、MEKおよびRevが核内に蓄積する系を作成した。Revの核内貯留を定量的に解析するためのプログラムを作成し、自動的に薬剤の効果が判定できるようになった。

② Rev及びCrm1のペアの組み合わせを変えてトランスフェクションしFRETの値を調べた。これまでの結果と同様に最も高いFRETの値を示すペアはCFP-Rev、Crm1-YFPのペアであり、CFP-Rev:Crm1-YFP=1:5の発現比でトランスフェクションした場合に最も高いFRET ratio=0.09を示した。他のペアでのFRET ratioは0.02から0.06程度と低い値であった。また、国産蛍光分子であるmKOおよびmAGを用いた検討では、CFP/YFP系で最も高いFRET値を示した組み合わせをmKO/mAGに置換した場合に最も高いFRET値を検出した。しかしながら、CFP/YFP系で得られたFRET値よりも低い値であった。

③ Rev及びCrm1発現細胞の観察から、Revの多くは細胞質に局在し、一部核小体に存在することがわかった。またCrm1は、Rev同様に

細胞質に多く存在し、一部核膜、核小体に局在する様子が観察された。Rev M10は核内に集積していた。Rev M10はウイルスゲノムの核外輸送能を持たないことが報告されている。Rev発現細胞をLMBを用いて処理した場合もRev M10同様にRevの核内への集積が認められた。LMBはCrm1に直接作用し、Crm1の核外移行を阻害する結果、Revの核内への集積を誘導するものと考えられる。RevとTTP101を共発現した場合も同様にRevの核内への集積が認められた。このとき共存するCrm1の局在には変化は認められなかった。

④ これまでの報告と同様にRev-Crm1の会合によって誘導されるFRETはactive Ranによって2倍近く増強されることが確認された。active Ran非存在下ではLMBはFRETを減弱させた。昨年度の解析ではactive Ran存在下ではLMBによるFRETの減弱は認められなかった。LMB同様にRevの局在に影響を与えるTTP101存在下ではactive Ranによって誘導された高いFRET値にも減弱が認められた。

⑤ CFP-Revおよびactive Ran同時発現ベクターを新たに構築した。RevおよびCrm1共にpCAGGSベクターに組み、 β アクチンプロモーターによって発現が誘導される。CFP-Rev発現ベクターではCFP-Rev下流のIRESによりactive RanまでのmRNAが転写され、CFP-Revと同時にactive Ranが発現される。これにより、CFP陽性細胞はRevおよびactive Ranを発現する。

⑥ FACS-AriaによるRev-Crm1の会合に由来するFRET検出では、405nmのレーザー光により励起されたCFP分子は480nmの蛍光を発し、近接するVenus分子の励起光となる。Venusの蛍光は検出器直前の525DLPダイクロイックミラーにより525nm以上の波長光は検

出器で検出され、525nm 未満の波長光は反射され検出器に誘導される。検出器では 470nm 未満の波長は除去され 470AF40 のバンドパスフィルターを経由した光、すなわち CFP の蛍光のみを検出する。488nmBlue Laser は Venus のみを励起し、Venus の発現細胞を検出器で検出する。

⑦ 293F 細胞に CFP-Rev/Crm1-Venus, CFP-Rev/Crm1-Venus/active Ran 及び CFP-Rev-active Ran/Crm1-Venus をトランスフェクションし 30 時間後に Aria を用いて解析した。その結果、active Ran 非存在下で認められる FRET は 72.603 (Ratio mean intensity) であるのに比べ、active Ran をコトランスフェクションすることで 92.219 に FRET 値は上昇した。Active Ran を CFP-Rev と IRES を介して発現させた場合 FRET 値は 109.918 にまで上昇した。Active Ran をコトランスフェクションした場合、CFP-Rev 陽性細胞への導入効率、発現効率にばらつきが存在する。しかしながら CFP-Rev と IRES を介して active Ran を発現する場合、CFP 陽性細胞には Rev および active Ran が必ず存在し、Rev と Ran の発現比も安定していると考えられる。このため、CFP-Rev-IRES-active Ran を用いたプローブでは高い FRET 値を得られたと考える。

D. 考察

Rev の核外輸送を阻害する薬剤をスクリーニングする細胞株を樹立した。この系においては、非特異的核外輸送の阻害を除外するために、Rev と同様に Crm1 を介して細胞外に輸送されることが知られている MEK を内在性コントロールとしておくことより、Rev に特異的に作用する薬剤がスクリーニングできるようになった。

現在、Rev-AG と MEK-KO の双方を安定に発現する細胞株の樹立には成功していない。

これは、Rev および MEK の双方を過剰発現することが細胞に対して毒性を有している可能性を示唆するが、今後の研究課題である。あるいは、薬剤の種類や発現ベクターを変更することで克服できるかもしれないので、現在、様々なレトロウイルスベクターに Rev-AG を組み込んで Rev-AG と MEK-KO の双方を安定に発現する細胞株の樹立を試みている。

0.09 というレシオ比の FRET の値は過去の報告に比較しても遜色ない値であり、検出も比較的容易である。タンパク間結合の阻害を誘導する薬剤やタンパク分子を FRET を用いてスクリーニングするという事は、FRET が起きている状態から FRET の消失を検出することになる。従い、高い FRET 値を持つことが重要であり、CFP/YFP 系を用いたプローブが最も有効であると考えられる。

本研究で得られた Rev-Crm1 の会合をモニターする FRET プローブを、ハイスループットに対応できる薬剤等のスクリーニング系に移行させる場合、非常に高い FRET 効率が重要である。高い FRET シグナルを得るための active Ran 共存系は非常に有効な手段であると考えられる。Rev と Crm1 の複合体は、核内、核膜近辺に多く存在するが、細胞質でも若干結合している。active Ran の存在下では、Rev、Crm1 そして Ran の 3 者複合体は細胞質に移行後、加水分解による GTP フォーム型 active Ran の GDP 型への変換が行われないため、Rev と Crm1 の会合に由来する FRET 値が上昇するものと考えられる。active Ran 存在下では、既存の Crm1 阻害剤である LMB を用いた実験では FRET の減衰が認められなかった。LMB の作用機序は Crm1 への直接作用であり、Rev と Crm1 の結合阻害ではないため、active Ran 存在下では FRET の減衰が認められないものと推察される。一方 TTP-101 は、LMB 同様に Rev の局在を変化させ、さらに FRET の値も減衰させる。TTP-101 は active Ran 存在下でも Rev-Crm1 の会合に由来する FRET

を減衰させる。作用機序については明らかではないが、TTP-101はRevによるHIV-1ゲノムRNAの核外輸送を減衰させることが分かっており、われわれが開発したRev-Crm1の会合をモニターするプローブはactive Ran存在下でもRevの機能阻害を評価できる系であることが明らかとなった。

CFP-Revとactive Ranを同じベクターから発現させることによりRevとCrm1の会合に由来する高いFRET値を得られた。この系では、CFP陽性細胞はすべてRevおよびactive Ran陽性であり、FACS-Ariaを用いた解析ではCFP陽性細胞のみを解析することで高く安定したFRET値を検出することが出来る。またactive RanはIRESを介して発現されるため、Revとの発現比も安定しており、active Ranのコトランスフェクションに比べ、誘導されるFRET値にばらつきが少ない利点を有する。

E. 結論

MEKを内在性コントロールとしておくことにより、Revに特異的に作用する薬剤がスクリーニングできるようになった。またactive Ranの存在によりFRET値を高めることができ、阻害因子を使用してRevの機能阻害を評価できる系であることを示した。

FRETプローブを用いて、RevとCrm1の会合を直接阻害する薬剤の影響をフローサイトメトリーにより調べるのが可能となった。Revとactive Ranを同じベクターから発現させることによりRevとCrm1の会合に由来する高いFRET値を得ることができ、スクリーニングにあると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi H, Maeda M, Sawa H, Hasegawa H,

Moriyama M, Sata T, Hall WW, Kurata T. Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(3):807-814. 2006

Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., Matsuda, J., Sata, T., Kurata, T., Nagashima, K., and Hall, W.W. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med* 12(4): 466-472, 2006.

Maeda, M., Sawa, H., Tobiume, M., Tokunaga, K., Hasegawa, H., Ichinohe, T., Sata, T., Moriyama, M., Hall, W.W., Kurata, K., and Takahashi, H. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes and Infection* 8, 2647-2656, 2006.

Takaya A, Kamio T, Masuda M, Mochizuki N, Sawa H, Sato M, Nagashima K, Mizutani A, Matsuno A, Kiyokawa E, Matsuda M. R-Ras Regulates Exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated Activation of RalA on Endosomes. *Mol Biol Cell.* 2007

Fukano T, Sawano A, Ohba Y, Matsuda M, Miyawaki A. Differential Ras activation between caveolae/raft and non-raft microdomains. *Cell Struct Funct.* 2007;32(1):9-15. Epub 2007

Yoshizaki H, Mochizuki N, Gotoh Y, Matsuda M. Akt-PDK1 complex mediates epidermal growth factor-induced membrane protrusion through Ral activation. *Mol Biol Cell.* 2007 Jan;18(1):119-28.

Yoshizaki H, Aoki K, Nakamura T, Matsuda M. Regulation of RalA GTPase by phosphatidylinositol

3-kinase as visualized by FRET probes. *Biochem Soc Trans.* 2006 Nov;34(Pt 5):851-4.

Terai K, Matsuda M. The amino-terminal B-Raf-specific region mediates calcium-dependent homo- and hetero-dimerization of Raf. *EMBO J.* 2006 Aug 9;25(15):3556-64. Epub 2006 Jul 20.

Nakamura T, Kurokawa K, Kiyokawa E, Matsuda M. Analysis of the spatiotemporal activation of rho GTPases using Raichu probes. *Methods Enzymol.* 2006;406:315-32.

Fujioka A, Terai K, Itoh RE, Aoki K, Nakamura T, Kuroda S, Nishida E, Matsuda M. Dynamics of the RAS/ERK map kinase cascade as monitored by fluorescence probes. *J. Biol. Chem.*, Vol. 281, Issue 13, 8917-8926, 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

平成18年度

エイズ医薬品等開発研究
重点研究報告書
国際研究グラント事業 研究報告書

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社