

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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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。HIV-1 Rev、宿主 Crm1 等のプローブを作成し、恒常活性型 Ran を導入し FRET 値を高めることで、多細胞数を同時に扱えるフローサイトメトリー解析系を確立することができた。実際に Rev の核外輸送阻害因子である TTP101 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。

### 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 のアクセサリータンパク質の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  $\beta$  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ことを目的とした。

### B. 研究方法

#### ① FRET プローブの構築

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

(改良型キサピラオレンジ) 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。TTP101 の発現には  $\beta$  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。Rev 発現細胞のすべてにおいて恒常活性化型 Ran (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。

② プローブ発現細胞の蛍光顕微鏡による解析観察には、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ェア (日本モレキュラーデバイス社) を用いて解析を行った。

### ③ 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。発現ベクターは fucene6 を用いて 293F 細胞へ導入した。

### ④ 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、さらに active 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。

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。

(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 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。最も高い FRET の値を示すペアは CFP-Rev、Crm1-YFP のペアであり、FRET ratio = 0.09 を示した。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。

② 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。

③ 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 非存在下ではレプトマイシン B (LMB) は FRET を減弱させた。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。

④ セルソータの解析の結果、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。

#### D. 考察

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 TTP101 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、TTP101 は Rev 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。

#### E. 結論

FRET プローブと、さらに active Ran を用いて FRET 値を高め、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ことが可能となった。実際に Rev の核外移行阻害因子 TTP101 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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ueno, T. Tokunaga, K. Sawa, H. Maeda, M. Chiba, J. Kojima, A. Hasegawa, H. Shoya, Y. Sata, T. Kurata, T. Takahashi, H. Nucleolin and the packaging signal,  $\psi$  promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol Immunol* 48(2), 111-118, 2004.

Takahashi, H. Sawa, H. Hasegawa, H. Nagashima, K. Sata, T. Kurata, T. Topoisomerase I dissociates human Immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) reverse transcriptase from genomic RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 1073-1078, 2004.

Harada T, Tatsumi M, Takahashi H, Sata T, Kurata T, Kojima A. Specific reactions between purified HIV-1 particles and CD4(+)cell membrane fragments in a cell-free system of virus fusion or entry. *Microbes Infect* 6(5), 421-428, 2004.

Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T,

Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T. BCL-6-positive human herpesvirus 8-associated solid lymphoma arising from liver and spleen as multiple nodular lesions. *Leuk Lymphoma* 45(10):2169-2172, 2004

Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *Journal of Medical Virology*, 2004. *J Med Virol.* ;75(1):130-6. 2005

Terai K, Matsuda M. Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO Rep*. 2005 ;6(3):251-5.

Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YO, Matsuda M. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell*. 2004;15(3):1003-10

Takaya A, Ohba Y, Kurokawa K, Matsuda M. RalA activation at nascent lamellipodia of epidermal growth factor-stimulated Cos7 cells and migrating Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*. 2004;15(6):2549-57.

Aoki K, Nakamura T, Matsuda M. Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem*. 2004;279(1):713-9.

Iwasaki T, Inoue S, Tanaka K, Sato Y, Morikawa S, Hayasaka D, Moriyama M, Ono T, Kanai S, Yamada A, Kurata T. Characterization of Oita virus

296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Arch Virol.*;149(6):1139-54. 2004.

Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Synthetic double-stranded RNA Poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol*. 79(5):2910-9. 2005.

Okada Y, Suzuki T, Sunden Y, Orba Y, Kose S, Imamoto N, Takahashi H, Tanaka S, Hall WW, Nagashima K, Sawa H. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep*, 6(5):452-457. 2005

Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med*. 2006

Itoh RE, Kurokawa K, Fujioka A, Sharma A, Mayer BJ, Matsuda M. A FRET-based probe for epidermal growth factor receptor bound non-covalently to a pair of synthetic amphipathic helices. *Exp Cell Res*. 307(1):142-152. 2005

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

Kurokawa K, Nakamura T, Aoki K, Matsuda M. Mechanism and role of localized activation of

Rho-family GTPases in growth factor-stimulated fibroblasts and neuronal cells. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 4):631-634. 2005

Takada E, Shimo K, Hata K, Abiake M, Mukai Y, Moriyama M, Heasley L, Mizuguchi J. Interferon-beta-induced activation of c-Jun NH2-terminal kinase mediates apoptosis through up-regulation of CD95 in CH31 B lymphoma cells. *Exp Cell Res.* 304(2):518-530. 2005

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.

、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