

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

ランダムアプローチによるエイズおよび  
エイズ関連疾患に対する新規治療標的の  
網羅的探索および新規治療薬開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

武 部 豊

平成19（2007）年3月

厚生科学研究費補助金総括・分担研究報告書目次		
<b>I. 総括研究報告書</b>		
ランダムアプローチによるエイズおよびエイズ関連疾患に対する新規治療標的の網羅的探索および新規治療薬開発	武部 豊	1
<b>II. 分担研究報告書</b>		
1. HCV 感染性分子クローンをを用いた HCV 感染・増殖アッセイ系の開発とそれによる阻害剤探索	武部 豊	9
2. HIV-1 の高度保存領域を標的とする至適 siRNA 機能分子の設計アルゴリズムの開発	西郷 薫	13
3. 新規治療標的の探索と HIV、HCV、EBV 阻害剤の先導化合物の同定および抗ウイルス作用機序の解明 – 新規抗 HIV 薬のリード化合物の同定	駒野 淳	17
4. 分担Rev機能を障害する薬剤開発のための基礎研究： Rev が相互作用するタンパク質の機能解析	高橋 信弘	21
5. 抗 EB ウイルス剤をめざした in vitro スクリーニング	山越 智	23
6. HIV-1 Gag-Env の相互作用の解析ならびに関連宿主因子の探索・同定	村上 努	27
7. 酵母を用いた抗 HIV 薬の探索	森川 裕子	31
8. HIV-1 Vpr に対する拮抗薬の分裂酵母モデルを用いた検索	増田 道明	37
9. ランダムアプローチによる HIV-1 Nef 蛋白を標的とした新規抗 HIV-1 薬のスクリーニング	岡田 誠治	39
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>		41
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷</b>		43

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）  
平成18年度総括研究報告書

ランダムアプローチによるエイズおよびエイズ関連疾患  
に対する新規治療標的の網羅的探索および新規治療薬開発

分担研究者：武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）  
西郷 薫（東京大学大学院理学系研究科・教授）  
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）  
高橋信弘（東京農工大学農学部応用生物科学科・教授）  
山越 智（国立感染症研究所生物活性物質部・主任研究官）  
村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）  
森川裕子（（社）北里生命化学研究所・教授）  
増田道明（獨協医科大学微生物学講座・教授）  
岡田誠治（熊本大学エイズ学研究センター・教授）

研究要旨

エイズおよびエイズ関連疾患に対する新規治療薬・新規治療標的の探索・開発を目指し、次の3つを柱として研究を進め、次に述べる研究成果を得た。

[抗 HIV 阻害剤探索] 1) 2万種の化合物ライブラリーから抗 HIV 作用を有する化合物の探索を行い、IC<sub>50</sub> が 0.1 μM の低分子化合物を見出した。この化合物は HIV-1 に特異的で SIV, HIV-2 には作用しないという性質をもつ（駒野班員）。2) 新たに開発した酵母 CytoTrap two hybrid 法を用いて、HIV Gag タンパク質の形質膜への targeting と Gag-Gag 相互作用に基づく多量体形成を再現できるスクリーニング系を構築し、数種の Gag-Gag 相互作用阻害物質、1種の酵母生育阻害物質を見出した（森川班員）。3) HIV-1 Vpr が分裂酵母の増殖を強く抑制されることを用いて、Vpr 拮抗薬の検索系を構築し、この系を用いて約 10,000 種類の化学物質をスクリーニングした結果、拮抗物質を約 60 種類同定することに成功した（増田班員）。4) HIV-1 Nef 蛋白を標的とした新たな抗 HIV-1 薬を開発するために、Nef 活性化誘導型細胞株を用いたパイオアッセイを創出し、この系を用いたスクリーニングによって3種類の候補物質を同定した（岡田班員）。一方、5) RNA 干渉現象を用いた核酸創薬のための基盤技術として、遺伝学的多様性の高い病原体ゲノム中での保存領域に対して有効な siRNA 配列を探索するプログラムを開発し、HIV-1 グループ M をモデルとして高度保存領域に対する至適 siRNA をデザインし、その抗 HIV-1 効果の網羅的評価を行った（西郷班員・武部班員）。

[エイズ関連疾患に対する創薬シーズの探索]

EBV に関連する悪性リンパ腫や HCV による肝障害は、HIV 感染症に伴って起こる重要かつ難治性疾患である。それら疾患に対する創薬シーズの探索のため、次の取り組みがなされた。1) EBV の潜伏感染に必須で悪性リンパ腫の発症に関わる EBNA-1 機能を標的とする高感度な in vitro ELISA 系を確立し、化合物スクリーニングの結果3種の阻害剤候補を同定した（山越班員）。2) 感染性 HCV クローンを利用した新しい感染・増殖アッセイ系を樹立し、この系を用いた化合物スクリーニングを行い4種の新規の阻害剤候補の同定に成功した（武部班員）。うち一個は IC<sub>50</sub> が 0.1 μM、CC<sub>50</sub> が 50 μM と良好なプロファイルを示すものであり、現在作用メカニズムに関して解析が進行中である。

[新規治療標的・宿主因子の探索]

1) HIV-1 Env のウイルス粒子への取り込みに関与すると報告された TIP47 が、Gag または Env タンパク質の発現下でモータータンパク質の一種である MyH9 と相互作用することが見出された（村上班員）。また 2) HIV-1 Rev 結合タンパク質 SF2p32 に細胞内で相互作用するタンパク質をプロテオミクスの手法で探索し～80 種類を同定した。本研究で用いた手法は Rev 機能を障害する薬剤開発のためのターゲット候補を探索する方法として有効と考えられる（高橋班員）。

本年度の研究の結果、エイズおよびエイズ関連疾患に対する治療薬開発のためのリード化合物がいくつ得られた。これらをリード化合物の構造の至適化、作用機構の解明に向けた研究が進行中である。

## A. 研究目的

多剤併用療法 (HAART)が導入されて以来、我が国を含む先進工業国においては、エイズ死亡率が激減し、エイズ患者の予後の画期的な改善を見ている。しかし、副作用による治療中断や薬剤耐性ウイルスの出現は依然治療上の大きな問題である。従って多剤併用療法が確立した現在においても新しいエイズ治療薬の開発に向けた不断の研究努力が必要と言わねばならない。とりわけ、ワクチン開発が大きな困難に直面している現在、従来型のエイズ治療薬開発に加えて、新たな治療標的の探索、創薬シーズの探索への努力を継続して進めていく必要がある。

一方、HAARTによりエイズ患者の予後が大幅に改善された結果、エイズに関連するHCVやEBVなどのウイルス感染症による重篤な肝疾患や悪性リンパ腫による死亡率が高まっている。HCVや悪性リンパ腫に対する治療の選択肢は限られており、安全で且つ有効性の高い治療薬の開発が待ち望まれている。

そこで、われわれは、エイズおよびエイズ関連疾患に対する治療薬と新規治療標的の探索・同定に向けた基礎研究を強力に推進したいと考える。

## B. 研究方法

(1) 2万種の化合物ライブラリーから HIV 増殖アッセイ系を用い、新規阻害剤を探索した (駒野班員)

(2) HIV Gag タンパク質の形質膜への targeting と Gag-Gag 相互作用に基づく多量体形成を再現できる酵母を用いたスクリーニング系を開発し、スクリーニングを行った (森川班員)。3) HIV-1 Vpr が分裂酵母の増殖を強く抑制されることを用いて、Vpr 拮抗薬の検索系を構築し、この系を用いて約 10,000 種類の化学物質をスクリーニングした (増田班員)。

4) HIV-1 Nef 蛋白を標的とした新たな抗 HIV-1 薬を開発するために、Nef 活性化誘導型細胞株 (TF-1-fms-Nef) を用いたバイオアッセイによるスクリーニング系を用いてスクリーニングを行った (岡田班員)。

5) HIV-1 など著しく遺伝学的多様性の高い病原体ゲノム中での保存領域に対して有効な siRNA 配列を探索するプログラムを開発し、設計された siRNA の効果評価を行った (西郷班員・武部班員)。

[エイズ関連疾患に対する創薬シーズの探索]

EBV に関連する悪性リンパ腫や HCV による肝障害など HIV 感染症に随伴しておこる重要かつ難治性疾患に対する創薬シーズの探索のため、1) EBV の潜伏感染に必須で悪性リンパ腫の発症に関わる EBNA-1 機能を標的とする高感度な *in vitro* ELISA 系を確立し、化合物スクリーニングを行った (山越班員)。2) 脇田らによって樹立された感染性 HCV クローンを利用した新しい感染・増殖アッセイ系を樹立し、この系を用いた化合物スクリーニングを行った (武

部班員)。

[新規治療標的・宿主因子の探索]

プロテオミックスの手法を用いて 1) HIV-1 Env のウイルス粒子への取り込みに関与する TIP47 (村上班員)。2) HIV-1 Rev 結合タンパク質 SF2p32 に細胞内で相互作用するタンパク質を探索した (高橋班員)。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

## C. 研究結果

[抗 HIV 阻害剤探索] 1) 2万種の化合物ライブラリーから抗 HIV 作用を有する化合物の探索を行い、IC50 が 0.1  $\mu$ M の低分子化合物を見出した。この化合物は HIV-1 に特異的で SIV, HIV-2 には作用しないという性質をもつ (駒野班員)。2) 新たに開発した酵母 CytoTrap two hybrid 法を用いて、HIV Gag タンパク質の形質膜への targeting と Gag-Gag 相互作用に基づく多量体形成を再現できるスクリーニング系を構築し、数種の Gag-Gag 相互作用阻害物質、1 種の酵母生育阻害物質を見出した (森川班員)。3) HIV-1 Vpr が分裂酵母の増殖を強く抑制されることを用いて、Vpr 拮抗薬の検索系を構築し、この系を用いて約 10,000 種類の化学物質をスクリーニングした結果、Vpr の細胞増殖抑制能に対する拮抗物質を約 60 種類同定することに成功した (増田班員)。4) HIV-1 Nef 蛋白を標的とした新たな抗 HIV-1 薬を開発するために、Nef 活性化誘導型細胞株 (TF-1-fms-Nef) を用いたバイオアッセイによるスクリーニングを行い、約 2万種のライブラリーのうち、1.6万種のスクリーニングを終了し、3種類の候補物質を得た (岡田班員)。これらをリード化合物として構造の至適化を図ることにより、既存の抗 HIV 薬とは標的の異なる新薬創製を目指し、解析を進めている。

また、5) 核酸創薬に向けた基盤的解析手法として、HIV-1 など著しく遺伝学的多様性の高い病原体ゲノム中での保存領域に対して有効な siRNA 配列を探索するプログラムを開発し、設計された siRNA の効果評価を行った (西郷班員・武部班員)。

[エイズ関連疾患に対する創薬シーズの探索]

EBV および HCV に対する治療薬開発を目指し、新規の阻害剤スクリーニング系の開発と、それを用いた阻害剤スクリーニングを進めた。1) EBV の潜伏感染に必須で悪性リンパ腫の発症に関わる EBNA-1 機能を標的とする高感度な *in vitro* ELISA 系を確立し、化合物スクリーニングの結果 3 種の阻害剤候補を同定した (山越班員)。2) 脇田らによって樹立された感染性 HCV クローンを利用した新しい感染・増殖アッセイ系を樹立し、この系を用いた化合物スクリーニングを行い 4 種の阻害剤候補を同定した。うち一個は IC50 が 0.1  $\mu$ M、CC50 が 50  $\mu$ M と

良好なプロファイルを示すものであり、現在作用メカニズムに関して解析が進行中である。

[新規治療標的・宿主因子の探索]

1) HIV-1 Env のウイルス粒子への取り込みに関与すると報告された TIP47 が、Gag または Env タンパク質の発現下でモータータンパク質の一種である MyH9 と相互作用することを見出した (村上班員)。また 2) HIV-1 Rev 結合タンパク質 SF2p32 に細胞内で相互作用するタンパク質をプロテオミクスの手法で探索し~80 種類を同定した。(高橋班員)。

#### D. 考察

(1) 従来の cell-based の HIV 感染増殖アッセイに加え、HIV-1 タンパク質の中でウイルス増殖メカニズムやエイズ発症に重要な役割を果たすと考えられる Gag タンパク質や Nef, Vpr タンパク質の生物学的性質を利用したアッセイ系を樹立し、それをベースとする新しいクラスの阻害剤の同定が可能となることが期待される。

(2) HCV による肝疾患、EBV による悪性リンパ腫は、エイズ治療を巡るポスト HAART 時代の医療課題として、今後一層重要になると考えられる。この面に注目した研究は少なく、今後の展開が期待される。

(3) HCV 阻害剤スクリーニングには従来レプリコン・アッセイが用いられてきたが、このアッセイによっては、細胞内過程の阻害剤しか検出できないという問題点があった。本年度の研究によって、HCV の生活環のあらゆるステップの阻害剤の探索が可能となるアッセイ系が樹立されたことの意義は大きい。

(4) プロテオミクスの手法を用いたウイルスタンパク質と相互作用をもつ宿主タンパク質を組織的に探索する技術は、ウイルス増殖に関わる新規の宿主因子の同定、新しい治療標的の探索に有用な武器になると考えられる。

#### E. 結論

新規阻害剤スクリーニング系の開発によってエイズおよびエイズ関連疾患 (HIV, HCV, EBV) に対する期待もてる創薬シーズをいくつか同定することに成功した。特に HCV 感染性クローンを利用した阻害剤探索の系は、HCV に対する創薬シーズの探索に新たな局面を切り開くものとして大きな意義を持っている。また新規治療標的の探索手法としてプロテオミクスを用いた解析手法の開発が進んだ。

#### F. 健康危険情報

本研究に関連しては、該当事項なし

#### G. 研究発表 (2006-2007)

##### 1. 論文発表

主任研究者

武部 豊

1) Naito, Y., Ui-Tei, K., Nishikawa, T., Takebe, Y., Saigo, K. (2006). siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl. Acid Res. (Web Server issue)* W448-W450.

2) Takebe, Y. and Telesnitsky, A. (2006). Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate via human gene transduction. submitted to *Nature Med.*

3) Murakami, Y., Yamagoe, S., Noguchi, K., Takebe, Y., Uehara, Y. and Fukazawa, H. (2006). Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J. Biol. Chem.* 281(38): 28113-28121.

4) Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2006). Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33\_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. AIDS* 43(5): 523-9.

5) Shimizu, S., Komano, J., Urano, E., Futahashi, Y., Miyauchi, K., Isogai, M., Matsuda, Z., Notomi, K., Onogi, T., Takebe, Y., and Yamamoto, N. (2006). Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex (P-TEFb). *AIDS* (in press).

#### 分担研究者

西郷 薫

1) Ui-Tei K, Naito Y, Saigo K. Guidelines for the selection of effective short-interfering RNA sequences for functional genomics. *Methods Mol. Biol.* 361, 201-216 (2006).

2) Ui-Tei K, Naito Y, Saigo K. Essential notes regarding the design of functional siRNAs for efficient mammalian RNAi. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006, 65052 (2006).

3) Naito Y, Ui-Tei K, Nishikawa T, Takebe Y, Saigo K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, W448-W450 (2006).

駒野 淳

1) Futahashi Y, \*Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Sci.* 2007 Mar;98(3):373-9.

2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex. *AIDS.* 2007 Mar 12;21(5):575-82.

3) Miyauchi K, \*Komano J, Myint L, Futahashi Y,

Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother.* 2006;17(4): 167-174  
4) Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J, Hoshino T, Engelman DM, \*Matsuda Z. Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis.* 2006 Apr;59(2):77-84.

高橋 信弘

1) Oda, T., Hayano, T., Miyaso, H., Takahashi, N., and Yamashita, T. (2007) Hsp90 regulates the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *Blood* in press

2) Sekiguchi, T., Hayano, T., Yanagida, M., Takahashi, N., Nishimoto, T. (2006) NOP132 is required for proper nucleolus localization of DEAD-box RNA helicase DDX47. *Nucleic Acids Res.* 34(16):4593-4608.

山越 智

1) Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Takahashi N, Uehara Y, Fukazawa H. Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J Biol Chem.* 281:28113-28121, 2006.

村上 努

1) T. Murakami, and N. Yamamoto. AIDS: How Do We Overcome This Social or Biodisaster (Review)? *The Journal of Disaster Research*, In press, 2007

森川 裕子

1) S. Sakuragi, J.-I. Sakuragi, Y. Morikawa, & T. Shioda.

Development of a rapid and convenient method for the quantitation of HIV-1 budding.

*Microbes Infect.* 8: 1875-1881 (2006)

2) 森川裕子

酵母を用いた動物ウイルスの研究  
*ウイルス* 56: 9-16 (2006)

岡田 誠治

1) Suzu S, Hiyoshi M, Yoshidomi Y, Harada H, Takeya M, Kimura F, Motoyoshi K, and Okada S; M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation. *J Cell Physiol* in press

2. 学会発表 (2006-2007)

主任研究者

武部 豊

1. Takebe, Y. (2006). Selective advantage of LTR of HIV-1 subtype C in in Vivo recombination: Insights into in vivo mechanism of HIV-1 recombination. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infectious (Feb.5-9, Denver, Colorado)

2. Takebe, Y. (2006). ICR (Inter-CRF recombinant): Discovery of new class of HIV-1 recombinants and its epidemiological implication. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infectious (Feb.5-9, Denver, Colorado)

3. Takebe, Y. (2006). Compilation of recombination breakpoints of HIV-1 chimeras comprised of CRF01\_AE and subtype B/B' emerging in Asia: Biological and epidemiological implications. 13th HIV dynamics and evolution (April 5-8, Woods Hole, MA)

4. 武部 豊 (2006). アジアにおけるエイズ危機と我が国の役割. 平成 18 年国立感染研シンポジウム (5/5/06)

5. Takebe Y. (2006). Strategic research project on AIDS and related infectious diseases in ARC, NIID (Shinjuku, Tokyo). Drug discovery and vaccine development program: Our "Seeds". 2nd eIMBL Workshop (May 20-21, Seoul, Korea)

6. Takebe Y. (2006). Molecular epidemiology of HIV in Asia: Understanding the genesis of Asia's expanding AIDS epidemic. Combating the "Big Three" Diseases: AIDS, Tuberculosis and Malaria (Symposium on infectious diseases) (June 15, Royal Netherlands Embassy, Tokyo)

7. Naito, Y., Takebe, Y., Ui-Tei, K., Saigo, K. (2006). siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology/11th FAOBMB Congress (June 18-23, Kyoto, Japan)

8. Xia, X., Yu, J., Zhao, W., Ben, K., Zhang, N., Tee, KK., Li, X-J, Takebe, Y. (2006). Unique profile of HCV genotype distribution among HIV/HCV co-infected. Injecting Drug Users in Yunnan Province, China: Identification of novel HCV genotype and implications for interrelationship with surrounding regions. 6th China-Japan Virology Congress (June 22-24, Shanghai, China)

9. Naito, Y., Takebe, Y., Ui-Tei, K., Saigo, K., Nohtomi, K., Onogi, T., Takebe, Y. (2006). Rational design and evaluation of the effect of siRNA targeted

to HIV-1 group M genomes using bioinformatics approach. 6th China-Japan Virology Congress (June 22-24, Shanghai, China)

10. Li, X-J., Hoshina, Y., Yokota, Y., Aye, KT, Thwe, M., Xia, X., Kusagawa, S., Takebe, Y. (2006). Dual infections with multiple lineages of HIV-1 strains in unique geographical recombination "hotspots" in Asia. 6th China-Japan Virology Congress (June 22-24, Shanghai, China)

11. Tee, KK., Li, X-J., Nohtomi, K., Ng, KP., Kamarulzaman, A., Takebe, Y. (2006). Identification of a Novel circulating recombinant form (CRF33\_01B) disseminating widely among various risk populations in Malaysia. XVI IAC (August 13-18, Toronto, Canada)

12. Takebe, Y., Telesnitsky, A. (2006). Role of recombination-Driven human sequence transduction on the genesis of multiple-drug resistant mutant identified in Japan. 7th Symposium on antiviral drug resistance (November 12-15, Chantilly, Virginia)

13. Takebe, Y., Sato, H., Shiino, T., Telesnitsky, A. (2006). Role of recombination-driven human sequence transduction on the genesis of multiple-drug resistant mutant identified in Japan. 第6回分子環境予防医学研究会 (12月1-2日 京都)

14. Takebe, Y., Sato, H., Shiino, T., Telesnitsky, A. (2006). High level of plasticity and flexibility of HIV-1: Detection of unusual case of human sequence transduction. Us-Japan Cooperative Medical Science Program: 19th Joint Meeting of the AIDS Panels (December 6-7, Kagoshima)

15. 草川茂、武部豊：HIV-1 CRF08\_BC 感染性分子クローンの構築とそのウイルス学的性質の解析。第54回日本ウイルス学会学術集会総会、2006年11月

16. 草川茂、武部豊：HIV-1 サブタイプ B' 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析。第20回日本エイズ学会学術集会総会、2006年12月

分担研究者

西郷 薫

1) Naito Y, Takebe Y, Ui-Tei K, Saigo K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto (2006).

駒野 淳

1) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K,

Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb). May 23-27, 2006. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY

2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb), Poster, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.

3) Miyauchi K, Curran R, Mathews E, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelmann DM, \*Matsuda Z. Alteration of intracellular transport of the envelope protein of HIV-1 by a shift in a helical phase within its membrane-spanning domain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.

4) Komano J. Characterization of neutralizing antibodies found in long-term non-progressors of Japanese hemophiliacs. 3<sup>rd</sup> Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS. Sep 7-9, 2006. Center for Disease Control Department of Health, Taiwan, R.O.C.

5) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of CDK9/Cyclin T complex (P-TEFb). 7<sup>th</sup> AIDS Seminar in Kumamoto, Kumamoto. Sep 21-22, 2006. Japan.

6) Komano J, Futahashi Y, Isogai M, Hamatake M, Matsuda Z, Shiino T, Takebe Y, Sato H, Yamamoto N. Drug Resistance Mutations in the Polymerase Catalytic Domain Negatively Affect the RNase H Activity of HIV-1 Reverse Transcriptase. 7<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA

7) Murakami T, Yasutomi E, Ablan S, Miyakawa K, Komano J, Matsuda Z, Freed EO, Yamamoto N. Detailed analyses of HIV-1 matrix mutants: Effects on an early stage of infection. 7<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA

8) 青木徹, 貝の瀬由成, 二橋悠子, 清水佐紀, 松田善衛, 山本直樹, 駒野淳. HIV-1 GagN 末端のミリスチン酸化非依存的な分子集合・出芽および VLP の性質に関する解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋



- 9) 濱武牧子, 浦野恵美子, 花房忠次, 加藤真吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳. AIDS 長期未発症の HIV 感染血友病患者における高力価中和抗体の存在とその病期進行への寄与に関する解析. 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋
- 10) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹. 挿入変異を伴う多剤耐性 HIV-1(CRF01\_AE) における薬剤耐性亢進のメカニズム—薬剤耐性獲得における RNase H 活性の関与. 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋
- 11) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 藤義秀, 星野忠次, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 の逆転写酵素が持つ RNase H 活性に対する特異的阻害剤の開発. 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋
- 12) Komano J. Myristoylation independent assembly, transport, and VLP formation of HIV-1 Gag. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京
- 13) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNase H 活性阻害薬の開発 (1) —小分子化合物ライブラリーからのスクリーニング. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京
- 14) 濱武牧子, 浦野恵美子, 花房忠次, 加藤真吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳. 血友病患者におけるエイズ長期未発症症例における高力価中和抗体の存在と標的部位の同定. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京
- 15) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 逆転写酵素 polymerase active site への薬剤耐性変異が誘導する RNase H 活性の低下と耐性亢進への寄与. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京
- 16) Jun Komano. Broadly reactive strong neutralizing antibody against HIV-1 in long-term survivors of HIV-1-infected haemophiliacs. The US-Japan Cooperative Medical Science Program 19th Joing Meeting of AIDS Panel. Dec 6-7, 2006. Kagoshima, Japan
- 17) 駒野淳. HIV-1 複製制御の分子メカニズムとエイズ治療法への展望. 造血幹細胞移植と感染症対策. Feb 03, 2007. 東京
- 18) Jun Komano et al. Broadly reactive strong neutralizing antibody against HIV-1 in long-term survivors of HIV-1-infected haemophiliacs. Keystone symposia, HIV vaccine and molecular and cellular determinants of HIV pathogenesis. Mar 25-30, 2007. Whistler, British Columbia, Canada

高橋 信弘

- 1) 第2回総合脳・タンパク3000・蛋白研共催プ

ロテオミクスシンポジウム、岡崎、2007年1月13日

2) 第2回植物プロテオームシンポジウム、筑波、2006年11月17日

3) 分子生物学会フォーラム2006、名古屋、2006年12月7日

村上 努

1) T. Murakami, E. Yasutomi, S. Ablan, K. Miyakawaa, J. Komano, Z. Matsuda, E. O. Freed, and N. Yamamoto. Detailed analyses of HIV-1 matrix mutants: Effects on an early stage of infection. November 12-15, 2006, 7<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Chantilly, Virginia, USA.

2) 篠田知宏、村上 努、安富英理子、真鍋美奈子、宮内浩典、駒野 淳、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同定. 日本ウイルス学会、名古屋、2006年11月19-21日

3) 村上 努、大隈 和、熊倉 成、田中礼子、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹. 新規 CXCR アンタゴニスト KRH-3166 は経口投与可能な高 HIV-1 剤である. 日本エイズ学会、東京、2006年11月30-12月2日

森川 裕子

1) N. Tsurutani, T. Goto, I. S. Ohno, & Y. Morikawa. Identification of host cellular machinery for HIV-1 Gag trafficking. CSH Meeting, 2006 年、米国

2) N. Tsurutani, T. Goto, I. S. Ohno, & Y. Morikawa. Identification of host cellular machinery for HIV-1 Gag trafficking. ASCB Meeting, 2006 年、米国

3) F. Momose, A. Kawaguchi, A. Iwamatsu, Y. Morikawa & K. Nagata. Stimulation of influenza virus RNA synthesis by a host factor RAF-2 that is bound to viral nucleoprotein and the genome RNA. 第 13 回 ICNSV, 2006 年、スペイン

4) 森川裕子、後藤俊幸. HIV 非ミリスチル化 Gag 蛋白によるドミナントネガティブな粒子形成出芽の阻害機構. 第 54 回日本ウイルス学会、2006 年、名古屋

5) 鶴谷直美、百瀬文隆、森川裕子. HIV Gag 蛋白の細胞内輸送及び粒子形成における責任宿主因子の関与. 第 54 回日本ウイルス学会、2006 年、名古屋

6) 酒巻望、大庭賢二、D.M. Zahidunnabi、稲垣好雄、山岡昇司、森川裕子、山本直樹. HIV 感染細胞障害性を示す NK 細胞活性化の条件検討について. 第 54 回日本ウイルス学会、2006 年、名古屋

7) 百瀬文隆、川口敦史、森川裕子、永田恭介. 宿主因子 RAF-2p36 に依存したインフルエンザウイルス RNP の形成促進. 第 54 回日本ウイルス学会、2006 年、名古屋

8) Y. Morikawa. Dominant negative inhibition of HIV particle production by the non-myristoylated form of Gag. 第 20 回日本エイズ学会、2006.

増田 道明

1) 増田道明、中村祐介、アクセサリー蛋白 Vpr を標的とする抗 HIV 薬の分裂酵母を用いたスクリーニング、日本ウイルス学会第 54 回学術集会、横浜、平成 18 年 11 月。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2007)

主任研究者

武部 豊

1. 「RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム、及び RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物」(特願 2005-55064、平成 17 年 2 月 28 日)  
(東大理と共同出願)
2. 「C 型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法」(特願 2006-351809、平成 18 年 12 月 27 日出願)(国立感染研ウイルス II 部脇田、鈴木らとの共同出願)
3. 「(用途) C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害化合物」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日)
4. 「最高度の保存領域に対する抗 HIV-1 siRNA 配列」(東大理との共同出願準備中)

分担研究者

西郷 薫

1. 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-008741、平成 17 年 1 月 17 日出願)(神奈川衛生研究所 今井光信・近藤真規子博士と共同出願)
2. 「RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム、及び RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物」(特願 2005-55064、平成 17 年 2 月 28 日出願)(東大理と共同出願)
3. 「C 型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法」(特願 2006-351809、平成 18 年 12 月 27 日出願)(国立感染研ウイルス II 部脇田、鈴木らとの共同出願)
4. 「(用途) C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害化合物」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日)
5. 「最高度の保存領域に対する抗 HIV-1 siRNA 配列」(東大理との共同出願準備中)

## Ⅱ. 分担研究報告書

HCV 感染性分子クローンをを用いた HCV 感染・増殖アッセイ系の開発とそれによる阻害剤探索

分担研究者：武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）

共同研究者：上西理恵、磯貝まや（国立感染研エイズ研究センター）

脇田隆宇、鈴木哲朗（国立感染研ウイルス II 部）

研究要旨 われわれは、脇田らによって樹立された感染性 HCV クローンをベースとした新規の HCV 感染/増殖アッセイ系の開発に成功した。このスクリーニング系は、従来のレプリコン・アッセイでは実現できなかった HCV 感染からウイルス放出までの HCV 増殖サイクルのいずれのステップの阻害剤も検出できるという大きな利点をもっている。このアッセイ系を用いたスクリーニングによって IC50 $\approx$ 100 nM, CC50 $\approx$ 50  $\mu$ M (Selective index $\approx$ 500) の化合物を含む数個のヒット化合物を得ている。現在その作用メカニズムの解明に向けた解析と構造活性相関に基づく最適化の作業が進行中である。

A. 研究の背景とその目的

多剤併用療法 (HAART)の導入によりエイズ患者の予後が大幅に改善された結果、エイズに関連する HCV や EBV などのウイルス感染症による重篤な肝疾患や悪性リンパ腫による死亡率が高まってきている。とりわけ、我が国における血友病 HIV-1 感染者では HCV 共感染率が 97% 以上で、共感染した HCV による肝障害が死亡原因として重要となりつつある。

しかし、HCV による肝疾患に対する現行の治療法としてはインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、約半数の感染者にしか有効でないことと、発熱、精神症状、溶血性貧血などの重篤な副作用があることから、有効且つ安全性の高い治療薬の開発が待ち望まれている。

これまで、HCV 阻害剤スクリーニングには部分ゲノムを用いたレプリコン・アッセイが用いられてきた。しかし、レプリコン・アッセイによっては HCV 生活環の細胞内過程に対する阻害剤の探索・評価は可能であるが、エン트리阻害剤などの感染初期過程や粒子放出などの感染後期過程の阻害剤の検出はできないという難点があった (図 1)。

そこで、われわれは、脇田らによって樹立さ

れた 感染性 HCV 分子クローン (pJFH-1) (Wakita *et al. Nat. Med.* 2005) を用いた新たな阻害剤スクリーニング法の開発とそれによる新規阻害物質の探索を目指した。

B. 研究方法

(1) 感染性 HCV ストックの調製

pJFH-1 由来の HCV ゲノムを Pol I プロモーター支配下に発現するプラスミド pHH-JFH1 を Huh7.5.1 細胞に導入して得た stable transformant (国立感染研 鈴木より分与を受けた) の培養上清を感染性 HCV ストックとして用いた。通常 HCV コア抗原量として約 2 万 fmol/L が得られるが、必ずしも感染のタイターとは平行しないため、感染の力価を実験に用いる前に確認する。

(2) 阻害剤スクリーニング法

(1) で得た HCV ストックを Huh7.5.1 細胞に感染させた後、試験化合物 (5  $\mu$ M) を加え 72 時間後の培養上清中の HCV コア抗原量をコア抗原アッセイキットを用いて測定し、抗ウイルス効果を測定した。アッセイの陽性対照としては、インターフェロン  $\alpha$  (100 u/ml)あるいは抗 CD81 抗体を用いた。

(倫理面への配慮) 該当せず。

## C. 研究結果

### (1) 阻害剤スクリーニング・システムの確立

96-well format での HCV infectivity/replication assay 系を確立した。標準条件は次のようである。

- 1) 前日に Huh7.5.1 細胞 ( $10^4$  cells) をシード
- 2) 試験化合物 5  $\mu$ M を添加
- 3) 約 15 分後に感染性 HCV ストック (HCV コアタンパク質量として約 0.2 fmol に対応する量) を感染させる
- 4) 72 あるいは 120 時間後に培養上清を回収。HCV 産生量を HCV コア抗原アッセイを用いて測定。
- 5) 試験化合物の細胞毒性は、WST アッセイによって評価  
アッセイのフロー図を図 2 に示す。

(2) 上記のアッセイ系を用いることにより、低分子化合物ライブラリー (Enamine representative diversity library) 8,000 化合物より 4 個のヒットを得た。図 3 に、各ヒット化合物の IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> の測定のための抗ウイルス効果、細胞毒性の用量依存曲線カーブを示す。

## D. 考察

われわれは、脇田らによって樹立された感染性 HCV クローンをベースとした新規の HCV 増殖アッセイ系の開発に成功した。このスクリーニング系は、従来のレプリコン・アッセイでは実現できなかった HCV 感染からウイルス放出までの HCV 増殖サイクルのいずれのステップの阻害剤も検出できるという大きな利点をもっている。

このアッセイ系を用いたスクリーニングによって得られたヒット化合物の 1 つは IC<sub>50</sub> ≈ 70 nM, CC<sub>50</sub> ≈ 35  $\mu$ M, Selective index ≈ 500 であり、期待がもたれる。現在この新規阻害剤の構造を手がかりとして、活性-構造相関の解析が進行中である。また本化合物は、感染初期過程を阻害している可能性を示唆する証拠を得ており、現在その作用メカニズムの解明に向けた解析を進めている。

## E. 結論

脇田らによって樹立された感染性 HCV 分子ク

ローンをもちいることによって、従来のレプリコン・アッセイでは実現できなかった HCV 感染からウイルス放出までの HCV 増殖サイクルのいずれのステップの阻害剤も検出できる新規の HCV 阻害剤アッセイ系の確立に成功した。また本アッセイ系を用いることによって、低分子化合物ライブラリーからいくつかのヒット化合物を同定した。

## F. 健康危険情報

本研究に関連するものはない。

## G. 研究発表 (2006-2007)

### 1. 論文発表

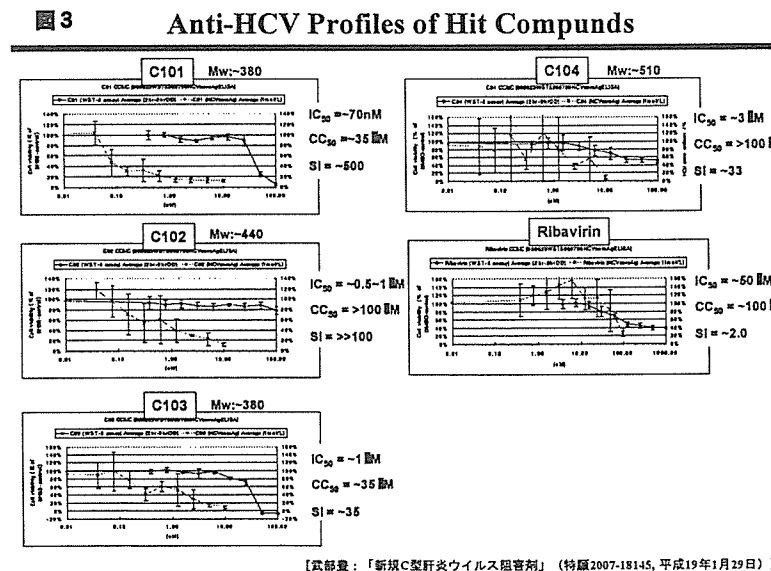
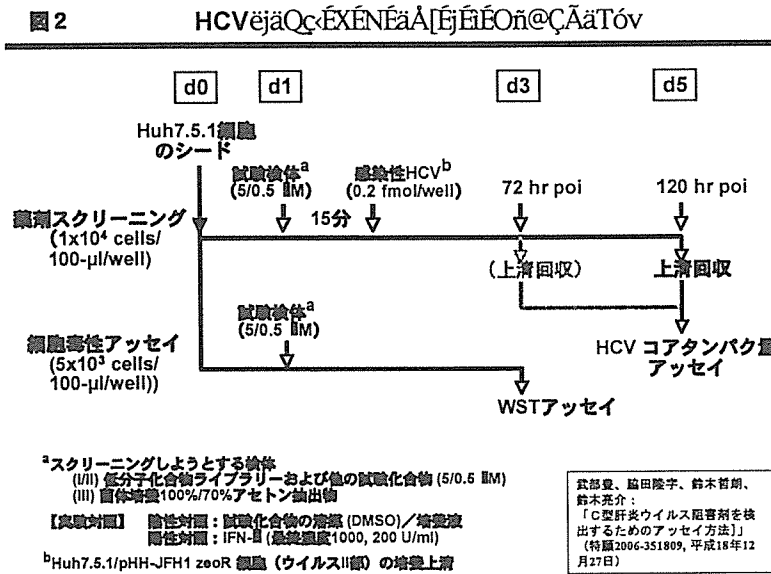
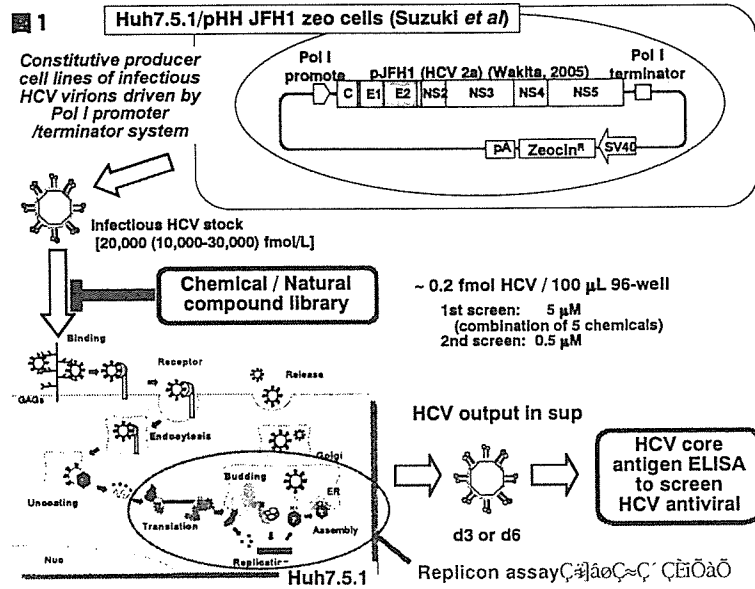
1. Naito, Y., Ui-Tei, K., Nishikawa, T., Takebe, Y., Saigo, K. (2006). siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl. Acid Res. (Web Server issue)* **W448-W450**.
2. Takebe, Y. and Telesnitsky, A. (2006). Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate *via* human gene transduction. *Virology* **351**: 1-6.
3. Murakami, Y., Yamagoe, S., Noguchi, K., Takebe, Y., Uehara, Y. and Fukazawa, H. (2006). Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J. Biol. Chem.* **281(38)**: 28113-28121.
4. Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2006). Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33\_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. AIDS* **43(5)**: 523-9.
5. Shimizu, S., Komano, J., Urano, E., Futahashi, Y., Miyauchi, K., Isogai, M., Matsuda, Z., Notomi, K., Onogi, T., Takebe, Y., and Yamamoto, N. (2006). Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex (P-TEFb). *AIDS* (in press).

### 2. 学会発表 (2006-2007)

1. Takebe, Y. (2006). Selective advantage of LTR of HIV-1 subtype C in in Vivo recombination: Insights into in vivo mechanism of HIV-1 recombination. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infectious (Feb.5-9, Denver, Colorado)

2. Takebe, Y. (2006). ICR (Inter-CRF recombinant): Discovery of new class of HIV-1 recombinants and its epidemiological implication. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infectious (Feb.5-9, Denver, Colorado)
3. Takebe, Y. (2006). Compilation of recombination breakpoints of HIV-1 chimeras comprised of CRF01\_AE and subtype B/B' emerging in Asia: Biological and epidemiological implications. 13th HIV dynamics and evolution (April 5-8, Woods Hole, MA)
4. 武部 豊 (2006). アジアにおけるエイズ危機と我が国の役割. 平成 18 年国立感染研シンポジウム (5/5/06)
5. Takebe Y. (2006). Strategic research project on AIDS and related infectious diseases in ARC, NIID (Shinjuku, Tokyo). Drug discovery and vaccine development program: Our "Seeds". 2nd eIMBL Workshop (May 20-21, Seoul, Korea)
6. Takebe Y. (2006). Molecular epidemiology of HIV in Asia: Understanding the genesis of Asia's expanding AIDS epidemic. Combating the "Big Three" Diseases: AIDS, Tuberculosis and Malaria (Symposium on infectious diseases) (June 15, Royal Netherlands Embassy, Tokyo)
7. Naito, Y., Takebe, Y., Ui-Tei, K., Saigo, K. (2006). siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology/11th FAOBMB Congress (June 18-23, Kyoto, Japan)
8. Xia, X., Yu, J., Zhao, W., Ben, K., Zhang, N., Tee, KK., Li, X-J, Takebe, Y. (2006). Unique profile of HCV genotype distribution among HIV/HCV co-infected. Injecting Drug Users in Yunnan Province, China: Identification of novel HCV genotype and implications for interrelationship with surrounding regions. 6th China-Japan Virology Congress (June 22-24, Shanghai, China)
9. Naito, Y., Takebe, Y., Ui-Tei, K., Saigo, K., Nohtomi, K., Onogi, T., Takebe, Y. (2006). Rational design and evaluation of the effect of siRNA targeted to HIV-1 group M genomes using bioinformatics approach. 6th China-Japan Virology Congress (June 22-24, Shanghai, China)
10. Li, X-J., Hoshina, Y., Yokota, Y., Aye, KT, Thwe, M., Xia, X., Kusagawa, S., Takebe, Y. (2006). Dual infections with multiple lineages of HIV-1 strains in unique geographical recombination "hotspots" in Asia. 6th China-Japan Virology Congress (June 22-24, Shanghai, China)
11. Tee, KK., Li, X-J., Nohtomi, K., Ng, KP., Kamarulzaman, A., Takebe, Y. (2006). Identification of a Novel circulating recombinant form (CRF33\_01B) disseminating widely among various risk populations in Malaysia. XVI IAC (August 13-18, Toronto, Canada)
12. Takebe, Y., Telesnitsky, A. (2006). Role of recombination-Driven human sequence transduction on the genesis of multiple-drug resistant mutant identified in Japan. 7th Symposium on antiviral drug resistance (November 12-15, Chantilly, Virginia)
13. Takebe, Y., Sato, H., Shiino, T., Telesnitsky, A. (2006). Role of recombination-driven human sequence transduction on the genesis of multiple-drug resistant mutant identified in Japan. 第 6 回分子環境予防医学研究会 (12 月 1-2 日 京都)
14. Takebe, Y., Sato, H., Shiino, T., Telesnitsky, A. (2006). High level of plasticity and flexibility of HIV-1: Detection of unusual case of human sequence transduction. Us-Japan Cooperative Medical Science Program: 19th Joint Meeting of the AIDS Panels (December 6-7, Kagoshima)
15. 草川茂、武部豊 : HIV-1 CRF08\_BC 感染性分子クローンの構築とそのウイルス学的性質の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会総会、2006 年 11 月
16. 草川茂、武部豊 : HIV-1 サブタイプ B' 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析. 第 20 回日本エイズ学会学術集会総会、2006 年 12 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2007)
- 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-008741、平成 17 年 1 月 17 日出願)(神奈川衛生研究所 今井光信・近藤真規子博士と共同出願)
  - 「RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム、及び RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物」(特願 2005-55064、平成 17 年 2 月 28 日出願)(東大理と共同出願)
  - 「C 型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法」(特願 2006-351809、平成 18 年 12 月 27 日出願)(国立感染研ウイルス II 部脇田、鈴木らとの共同出願)
  - 「(用途) C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害化合物」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日)

5. 「最高度の保存領域に対する抗 HIV-1 siRNA 配列」 (東大理との共同出願準備中)



厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）  
平成18年度分担研究報告書

HIV-1 の高度保存領域を標的とする  
至適 siRNA 機能分子の設計アルゴリズムの開発

分担研究者：西郷 薫（東京大学大学院理学系研究科・教授）  
共同研究者：程 久美子（東京大学大学院理学系研究科・助教授）  
内藤 雄樹（東京大学大学院理学系研究科・大学院生）  
武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）

研究要旨 多くの RNA ウイルスは著しくゲノム多様性が高く、1 種類の siRNA を単独で用いた場合、その siRNA に耐性をもつ変異ウイルスが容易に出現し得る。本研究では、多様性の高い HIV-1 を対象としてゲノムの高度保存領域を同定し、それらの領域を標的とする siRNA の設計をおこない有効性を評価した。その結果、評価した siRNA の多くが高い RNA 干渉効果を示し、本研究で構築した siRNA 設計法の有効性を確認できた。本結果に基づき、(1)ウイルス配列の中で保存度が高く、(2)哺乳類細胞に有効で、(3)オフターゲット効果（副作用）の少ない siRNA を設計するウェブサーバ siVirus (<http://siVirus.RNAi.jp/>) を公開した。

#### A. 研究の背景とその目的

RNA 干渉とは、細胞に導入された 2 本鎖 RNA がそれと相同な塩基配列をもつ mRNA を切断することによって遺伝子発現を抑制する現象である。RNA 干渉による遺伝子機能の制御は極めて特異性が高いため、様々な宿主遺伝子だけでなく病原体遺伝子機能の特異的抑制技術として注目されている。しかし HIV-1 や HCV に代表される RNA ウイルスでは、著しく高いゲノム多様性のために、RNA 干渉に対して耐性をもつウイルスが容易に出現する可能性がある。そこで、われわれは、多様なウイルス株のできるだけ多くに対応しうる siRNA 設計を bioinformatics に基づき行い、培養細胞におけるその効果の迅速な評価系の開発を目指した。

#### B. 研究方法

HIV-1 データベースには約 500 種の完全長およびほぼ完全長の塩基配列データが登録されているが、現在入手可能なあらゆる塩基配列に基づき、保存性の高く、且つ siRNA として高い抗ウイルス効果が期待される配列を網羅的に検索し、その抗ウイルス効果を、感染性分子クローンとの

cotransfection および標的 HIV-1 RNA 切断活性を直接的に評価する標的切断アッセイを用いて各 siRNA の有効性を調べた。

##### 1. siRNA の標的切断アッセイ

siRNA 自体が備える標的 RNA 切断活性を評価するアッセイ系を構築した。すなわち、各 siRNA の標的配列を mRNA の一部として発現するコンストラクトを構築し、siRNA とともに HeLa 細胞に導入した。ついで、そのコンストラクトから発現させた標的 mRNA の分解を、リアルタイム PCR 法により定量した。

##### 2. HIV-1 逆転写酵素活性の測定

pNL4-3, 95MM-yIDU106, 93IN101, 93JP-NH1 の各 HIV-1 感染性分子クローンを siRNA（終濃度 5 nM）とともに HeLa 細胞に導入し、48 時間後に培地上清を回収した。ついで、HIV-1 に由来する逆転写酵素活性を測定した。

##### 3. siVirus ウェブサーバの構築

抗ウイルス siRNA 設計ウェブサーバ siVirus を、<http://siVirus.RNAi.jp/> に公開した。ユーザの要求に対して高速に回答できるように、あらかじめ全ウイルス配列を構成する 21-mer をすべて生成し、



そのひとつひとつの 21-mer がどのウイルス配列と完全一致するかを求め、データベース化した。このデータベースを参照し、ユーザが選択したウイルス配列の組み合わせにおいて保存度が高い 21-mer を短時間で求めるプログラムを作成した。また、2 ミスマッチ以内で相同なヒト遺伝子の数を、あらかじめ算出してデータベース化した。

(倫理面への配慮) 該当せず。

### C. 研究結果

#### 1. HIV-1 を標的とする siRNA 設計法の検討

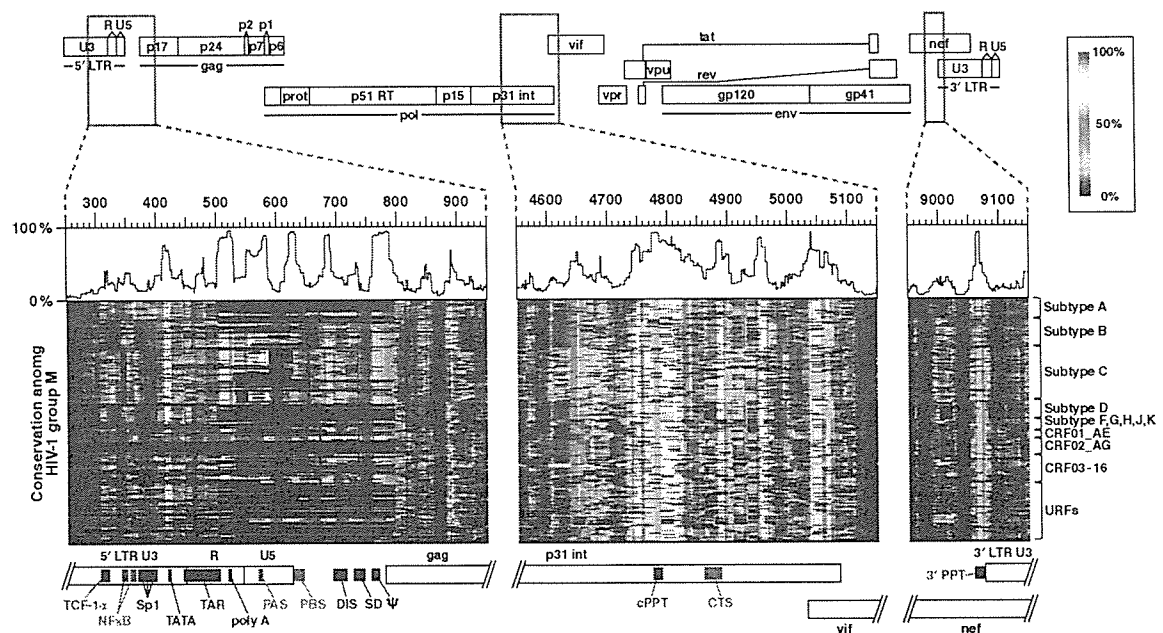
Los Alamos HIV Sequence Database より入手可能な HIV-1 グループ M のゲノム配列 495 種をもとに、siRNA の標的として有力な候補となりうる高度保存領域を同定した。まず、495 種の HIV-1 配列を構成する 21 塩基の部分配列 (以下、単に 21-mer と呼ぶ) をすべて生成し、そのひとつひとつの 21-mer が 495 種のうち何種に共通であるかを調べた。

495 種の HIV-1 配列を構成する 21-mer は合計で 4,417,157 種であった。各 21-mer の保存度を計算したところ、HIV-1 ゲノムの大部分の領域は 21-mer の単位では保存されていないことが明らかになった。なお、HIV-1 を標的とする RNAi 法の試みは既に複数の研究グループより報告され

ているが、それらの研究で使用されている siRNA の多くは保存度が低かった。

しかしながら、21-mer のうち特定の領域に位置するものは高度に保存されていることが判った (図 1)。これらの領域の多くはウイルスの遺伝子発現や増殖に必要な配列を含んでいた。具体的には、ウイルスの遺伝子発現に必要な TATA 配列やポリ A シグナル (AAUAAA)、逆転写に必要な primer activation signal および primer binding site、ウイルスのパッケージングに必要な packaging signal、ゲノムの + 鎖 DNA 合成に必要な central polypurine tract、central termination sequence ならびに 3' polypurine tract などが高度に保存されていた。これらはすべて、アミノ酸配列ではなく RNA の配列自体もしくは RNA の 2 次構造を通して機能を発揮するような領域であることは興味ある知見であった。実際、アミノ酸配列のレベルで保存されているような領域の多くは、コドンの 3 番目の塩基の変異を許容するため、塩基配列レベルでは必ずしも保存されていない例が多かった。

以上の解析により同定した、保存度が 70% 以上であるような 21-mer は 216 種であった。これらの siRNA 配列のうち 36 種が我々の siRNA 設計アルゴリズムによって、哺乳類細胞で有効と予測された。



## 2. siRNA の抗 HIV-1 効果の検証

まず, siRNA 自体が備える標的切断活性を, 標的切断アッセイで評価した. すなわち, 各 siRNA の標的配列を mRNA の一部として発現するコンストラクトを構築し, siRNA とともに HeLa 細胞に導入した. ついで, そのコンストラクトから発現させた標的 mRNA の分解を, リアルタイム RT-PCR 法により定量した. その結果, 各 siRNA を 5 nM で用いた場合, 設計した siRNA のうち 95% のものが標的 mRNA を 40% 以下に抑制した. 配列中に連続するグアニン残基 (GGGGGG) および連続するシトシン残基 (CCCCC), もしくは AAAAUUUU のような回文配列が存在する siRNA は活性が弱い傾向が見られた.

ついで, 各 siRNA の HIV-1 に対する増殖抑制効果を, サブタイプ B, C, CRF01\_AE 属する 4 種の HIV-1 感染性分子クローンで評価した. これら 3 種のサブタイプはアジア地域における HIV-1 流行の主要な原因となっており, また塩基配列のうえでは相互に隔たりのあるクラスタを形成している. 本アッセイでは, それぞれの感染性分子クローンを siRNA とともに HeLa 細胞に導入し, 48 時間後に培地上清を回収して HIV-1 由来の逆

転写酵素活性を測定することにより, ウイルスの増殖を評価した. その結果, 各 siRNA を 5 nM で導入した場合, 26 種の siRNA がすべての HIV-1 株の増殖を 20% 以下に抑制した.

## 3. 抗ウイルス siRNA 設計システムの構築

以上に述べた結果に基づき, (1) ウイルス配列の中で保存度が高く, (2) 哺乳類細胞に有効で, (3) オフターゲット効果の少ない siRNA を設計するシステムを構築した. 特に, HIV-1, HCV, A 型インフルエンザウイルス, SARS コロナウイルスを標的とする抗ウイルス siRNA 設計システムを, siVirus ウェブサーバ (<http://siVirus.RNAi.jp/>) として公開した (図 2).

## D. 考察

本解析結果は, HIV-1 を標的とする siRNA を無作為に設計しても, 高い多様性をもつ HIV-1 を効率よく標的とすることが難しいことを示唆しており, 有効な siRNA を設計するためには, bioinformatics に基づく系統的な配列解析が必要であると考えられた.

The screenshot shows the 'siVirus Result' page for HIV-1. It displays a table with columns for 'siRNA target site', 'siRNA efficacy prediction', '≤ 2 mismatch', 'Conservation in the selected sequences', and 'Off-target hits'. The table lists various siRNA sequences and their corresponding metrics.

siRNA target site	siRNA efficacy prediction	≤ 2 mismatch	Conservation in the selected sequences	Off-target hits
21bp target + 2nt overhang	map to HXB2	Ui-Tei Reynolds Amarzguiou	Off-target hits	
AAGCCTCAATAAAGCTTGCTG	yes	yes	1 [detail]	96% (146/152)
AGCCTCAATAAAGCTTGCTG	yes	yes	2 [detail]	96% (146/152)
TTCAAATTTTCGGGTTTATTac	yes	yes	2 [detail]	92.3% (168/182)
TCAAATTTTCGGGTTTATTac	yes	yes	2 [detail]	92.3% (168/182)
AGGAGAGAGATGGGTGCGAGc	yes	yes	2 [detail]	92.1% (152/165)
CGGAGGCTAGAGGAGAGAGAtg	yes	yes	7 [detail]	90.9% (150/165)
GACTAGCGGAGGCTAGAGGAGa	yes	yes	0 [detail]	90.8% (149/164)
CTAGCGGAGGCTAGAGGAGAGa	yes	yes	1 [detail]	90.8% (149/164)
GGAGGCTAGAGGAGAGAGATg	yes	yes	4 [detail]	90.3% (149/165)
AGCGGAGGCTAGAGGAGAGAGa	yes	yes	4 [detail]	90.2% (148/164)
ATTCAAATTTTCGGGTTTATTa	yes	yes	0 [detail]	89.5% (162/182)
AGGGAAATTTTCGGGTTTATTa	yes	yes	2 [detail]	89% (162/182)
GGGGAAGTGCATAGCAGGAc	yes	yes	3 [detail]	87.9% (160/182)
TTTGAATTTTCGGGTTTATTa	yes	yes	0 [detail]	87.8% (144/164)
CAGCTCTAAGCCTCAATAAAGc	yes	yes	0 [detail]	87.5% (134/153)
TGCTTAAAGCCTCAATAAAGc	yes	yes	2 [detail]	87.5% (141/161)
ACGAGGCTAGAGGAGAGAGAtg	yes	yes	0 [detail]	87.3% (159/182)
AGCAGTCAATGGCAGTATTca	yes	yes	4 [detail]	87.3% (159/182)
AACCCACTGCTAAGCCTCAATA	yes	yes	1 [detail]	87.1% (129/148)
ACCCACTGCTAAGCCTCAATA	yes	yes	2 [detail]	87.1% (129/148)
CCCACTGCTAAGCCTCAATA	yes	yes	0 [detail]	87.1% (129/148)
CCACTGCTAAGCCTCAATA	yes	yes	1 [detail]	87.1% (129/148)
CGTAAGTGCATAGCAGGAc	yes	yes	1 [detail]	87.1% (129/148)
GTGAAGTGCATAGCAGGAc	yes	yes	1 [detail]	87% (101/116)
CAGCAGTCAATGGCAGTATTc	yes	yes	3 [detail]	86.8% (158/182)
GCAGATGATACAGTATTAGa	yes	yes	4 [detail]	86.2% (157/182)
AMGTGACATAGCAGGAGACTa	yes	yes	1 [detail]	85.7% (156/182)
ACAGGAGCAGATGATACAGTAt	yes	yes	2 [detail]	85.7% (156/182)
GGAGCAGATGATACAGTATTAg	yes	yes	8 [detail]	85.7% (156/182)
CTGGTAAGTGCATAGCAGGAc	yes	yes	1 [detail]	85.3% (99/116)
AGCAGATGATACAGTATTAGa	yes	yes	3 [detail]	85.1% (155/182)

また本研究で用いた siRNA の標的切断アッセイは、実際にウイルスを用いることなく培養細胞内での siRNA 活性を迅速に推定する手段として有効であると考えられた。

#### E. 結論

有効と予測される siRNA 配列は 0.5-5 nM で対照の 90-95%以上の阻害効果をもち、また標的 RNA の切断活性を評価する標的切断アッセイにおいても、同様な効果が再現された。同定された siRNA サイトは、データベースの約 60%-90%を網羅することから、標的サイトの違う siRNA を組み合わせることによって、網羅率を上げ、多様な HIV-1 株に対して広汎且つ高い有効性をもつ系の作出が可能となるものと期待される。

#### F. 健康危険情報

本研究に関連するものはない。

#### G. 研究発表 (2006-2007)

##### 1. 論文発表

- [1] Ui-Tei K, Naito Y, Saigo K. Guidelines for the selection of effective short-interfering RNA sequences for functional genomics. *Methods Mol. Biol.* **361**, 201-216 (2006).
- [2] Ui-Tei K, Naito Y, Saigo K. Essential notes regarding the design of functional siRNAs for efficient mammalian RNAi. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 65052 (2006).
- [3] Naito Y, Ui-Tei K, Nishikawa T, Takebe Y, Saigo K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, W448-W450 (2006).

##### 2. 学会発表 (2006-2007)

- [1] Naito Y, Takebe Y, Ui-Tei K, Saigo K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*, Kyoto (2006).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2007)

- [1] 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-008741, 平成 17 年 1 月 17 日出願) (神奈川衛生研究所 今井光信・近藤真規子博士と共同出願)
- [2] 「RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法, RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置, RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法, RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム, 及び RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物」(特願 2005-55064, 平成 17 年 2 月 28 日出願) (東大理と共同出願)
- [3] 「C 型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法」(特願 2006-351809, 平成 18 年 12 月 27 日出願) (国立感染研ウイルス II 部脇田, 鈴木らとの共同出願)
- [4] 「(用途) C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害化合物」(特願 2007-018145, 平成 19 年 1 月 29 日)
- [5] 「最高度の保存領域に対する抗 HIV-1 siRNA 配列」(東大理との共同出願準備中)

平成 18 年度 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
分担研究報告書

分担研究課題：新規治療標的の探索と HIV、HCV、EBV 阻害剤の先導化合物の同定および

抗ウイルス作用機序の解明 - 新規抗 HIV 薬のリード化合物の同定

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 第3室 主任研究官）

研究要旨

エイズの根治療法が存在せず、世界的流行と薬剤耐性ウイルスに対応するためには、新規作用機序を有する抗エイズ薬開発が必須である。我々は 300 万の小分子化合物の構造の特徴を抽出し代表的な小分子化合物として選択された 2 万種類のランダムケミカルライブラリーの中から培養細胞系にて抗 HIV 作用を有する化合物を直接同定することに試み、IC50 が 100nM という強い HIV 活性を示す小分子化合物を同定することに成功した。これは HIV 特異的に抗ウイルス活性を示し、MLV や SIV への抗ウイルス活性は検出されなかった。薬剤の作用機序解析により、既存の抗レトロウイルス薬と標的が異なることが示唆され、有用な先導化合物であることが期待される。

A. 研究目的

エイズの治療薬は劇的に進歩したが、完治させる治療薬は未だ存在せず感染防御ワクチン及び治療ワクチンの開発も滞っている。薬剤耐性ウイルスが蔓延する現状に早急に対応するためには既存の薬剤と異なる作用機序を持つ薬剤の開発は不可欠である。新薬に求められる要件としては、既存の多剤耐性ウイルスに有効であること、多種のウイルス株に有効であること、既存の治療ツールと相乗効果があり、容易に耐性を誘導せず、安価に製造できるものであり、経口投与可能な小分子化合物であることが望ましい。

薬剤開発には大きく分けて2つの戦略が知られている。一つは計算機によるモデリングに基づく drug design を用いた限られた数の化合物の中から生物活性を有するものを同定するものであり、もう一つが標的プロセスを high throughput 化した実験系で実際にケミカルライブラリーから生物活性を有するリード化合物を同定することである。どちらも現時点での優位性は明らかではない。いずれの戦略においても、標的プロセスを抽出した実験系と、標的プロセスを絞り込まず、直接抗ウイルス活性の有無を指標にリード化合物を同定し、次にその標的プロセスを同定する戦略がある。どちらも一長一短であり、先導化合物同定への道のりには王道はないと考えられている。

我々は培養細胞系にて抗 HIV 作用を有する化合物を直接同定する戦略を選択した。その結果、強い抗 HIV 活性を示す小分子化合物が同定されたのでここに報告する。

B. 研究方法

300 万の小分子化合物の構造の特徴を抽出し、代表的な小分子化合物として選択された 2 万種類のランダムケミカルライブラリーをスクリーニングに使用した。抗ウイルス作用を持つ分子の同定には、MT2 細胞を標的細胞として、HXB2 をウイルスとし、ウイルス感染 4 日後の CPE が検出されないことを指標に顕微鏡下で抗 HIV 活性を評価した。スクリーニングは5つの化合物をプールにして1次スクリーニングを行い、陽性と判定されたプールのみ2次スクリーニングで各化合物を単独で検査し、3次スクリーニングにて用量依存性を検査した。最も低い IC50 を有する化合物に対し、ウイルス特異性及び作用機序の解析を行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

抗ウイルス作用を示す化合物を 8 種類得ることができた。IC50 は 100nM-2 $\mu$ M であり、構造的には互いに関連の少ないものが同定された。中でも最も IC50 が高い化合物について解析を進めた (図 1)。

この先導化合物は MT-2 細胞と CEM 細胞において複製をウイルスの p24 抗原量で定量する方法でも、RT 活性で評価する方法でも、同様に IC50 が 100~200nM を示した (図 2, 3)。本リード化合物は 10 $\mu$ M 以下で SIV に対する複製抑制能を持たなかった。ウイルスベクターを利用した解析により、MLV は本先導化合物により感染は阻害されなかった。また、同濃度での細胞毒性は検出されなかった。

レンチウイルスベクターを用いて抗ウイルス