

作用を検索したところ、HIV 由来の遺伝子が gag, pol 遺伝子産物およびゲノム RNA であるレンチウイルスベクターの産生を低下させず、IC50 が 100 ~ 200nM にて感染を抑制した。以上のことから、ウイルス複製初期過程が本剤の標的のプロセスであり、その標的ウイルス遺伝子は gag, pol, genome のいずれかであることが判明した。先導化合物は精製酵素による反応系にて逆転写酵素活性を阻害せず、Western blot による解析にて Gag のプロセッシングに影響を及ぼさないことが判明した。リアルタイム PCR を用いた解析により逆転写そのもの、および核移行は阻害されておらず、インテグレーション過程が標的である可能性が示唆された。インテグレースの SIV/HIV キメラレンチウイルスベクターを使った解析により薬剤の標的は HIV インテグレース遺伝子領域であることが判明した。

#### D. 考察

ランダムスクリーニングによる抗 HIV 活性を示す薬剤のヒット率 (2 万分の 8) は一般的な薬剤スクリーニングとほぼ同様であり、CPE によるウイルス複製阻害評価が適切なものであると思われた。CPE による感染阻害評価法を選択したため、感染初期過程を阻害標的とする先導化合物が得られたと推測される。

今後異なる clade を含む primary isolate および multi-drug resistant viral isolate に対する抗ウイルス効果の検証、宿主細胞を PBMC とした際の抗ウイルス効果の検証、現存する抗レトロウイルス薬との additive effect の有無、インテグレースの酵素活性を直接阻害するかどうかについて検討する必要がある。また、容易に薬剤耐性ウイルスが選択されるかを調査する必要があり、薬剤耐性ウイルスを分離することができれば、薬剤の作用機序も明らかにすることができるかと期待される。先導化合物の分子量は 300 未満であり、細胞透過性を維持した状態でさらなる化学修飾が可能であるため、最適化による改良が期待できる。

#### E. 結論

2 万種類のランダムケミカルライブラリーの中から抗 HIV 作用を有する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。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た。インテグレースを標的とする薬剤は世界で未だ認可されていないため、新規エイズ薬のリード化合物として非常に有望であると思われる。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

図 1 抗HIV活性を有する先導化合物の構造式

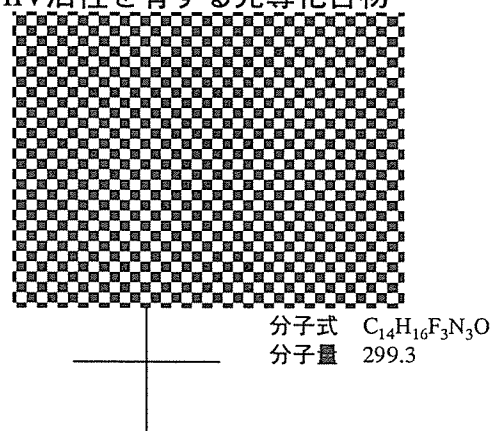


図 2 Inhibition of HIV-1 replication by the compound A in MT-2 cells

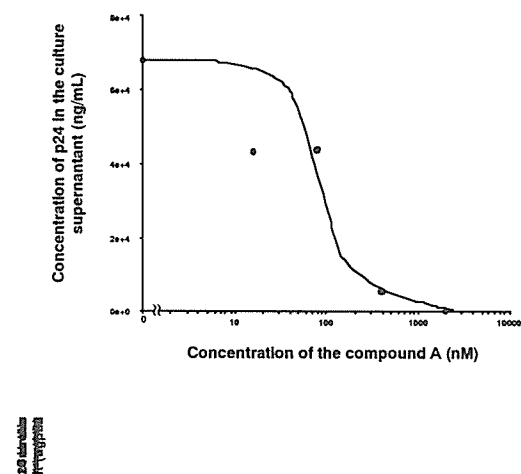
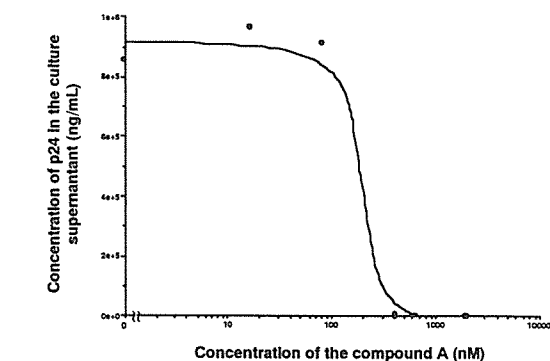


図 3 Inhibition of HIV-1 replication by the compound A in CEM cells



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

### 2. 学会発表 (抜粋)

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, Engelman 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 5 4 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20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20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

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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  
分担研究者：高橋 信弘（東京農工大学教授）

研究要旨

Rev がヒト細胞内で結合する SF2p32 の機能を明らかにする目的で、SF2p32 に相互作用するタンパク質をプロテオミクスの手法で解析した。その結果、SF2p32 の持つ今まで知られていない細胞内での機能を示唆する知見が得られた。

A. 研究目的

本研究の目標はRev機能に関わる宿主タンパク質の働きをプロテオミクスの手法で解析し、その結果に基づいてRev機能を障害する薬剤開発の基礎を構築することである。今年度は、Revが宿主細胞内で結合するSF2p32への相互作用タンパク質を同定することを目的とした。

B. 研究方法

Revが相互作用するSF2p32にFLAGエピトープを融合させたものを細胞に発現させ、それに相互作用するタンパク質を免疫沈降法により回収・精製した。そして、SDS電気泳動分離後のペプチドマスフィンガープリント（PMF）法およびプロテアーゼ消化後のショットガン法により同定した。また、イムノブロット法も適用し同定結果の検証を行った。

（倫理面への配慮）

該当項目無し。

C. 研究結果

免疫染色法により内在性のSF2p32はミトコンドリアだけでなく核小体及びCajal bodiesにも局在することを見いだした。FLAGタグをC末端側に融合したSF2p32のみがミトコンドリア及び核内に局在し内在性のものと同等の挙動を示したので、これについて免疫沈降で回収した相互作用タンパク質を解析した。その結果、PMF法で約30種類、ショットガン法で約60種類同定した。その中には、今までSF2p32と相互作用することが報告されているASF/SF2、Lamin B receptor、及びfibrillarinが全て含まれ、用いた方法が相互作用タンパク質を回収・同定するために有効であることが確認できた。SF2p32へ相互作用するタンパク質には、スプライシングあるいはRNA結合に関わるもの12種類、転写に関わるもの15種類、リボソームタンパク質あるいはリボソーム生合成に関わるもの16種類などが含まれていた。

D. 考察

Rev タンパク質の今までに知られている主な機能は宿主内でのイントロンを含むウイルス mRNA のスプライシングと細胞内輸送の制御にある。特に、ウイルス mRNA のスプライシングの制御には Rev が HIV ウイルスのイントロンを持つ mRNA の Rev response element と ASF/SF2 の間に SF2p32 を橋渡しさせることが重要であると考えられている。今回の解析は、SF2p32 が関わるスプライシングの制御には、SF2p32 は ASF/SF2 との相互作用だけでなく、SF2p32 が関わるスプライシングとそれに関連した他の多くのタンパク質との相互作用も必要である可能性を明らかにした。これらのタンパク質が SF2p32 と Rev との橋渡しにどのような影響を及ぼすかを明らかにすることは、Rev によるウイルス mRNA のスプライシングの制御のより詳細な機構を解明するために重要と考えられる。これらの結果に加え、今回の SF2p32 はリボソーム生合成に関与する多くのタンパク質とも相互作用しているとの結果から、SF2p32 はリボソーム生合成においても何らかの役割を持つ可能性が示された。Rev タンパク質は構造的特徴だけでなく細胞分裂時の細胞内挙動においてもリボソーム生合成に関わる他のトランス作用因子の幾つかと類似している。さらに、Rev が結合する HRB2 の酵母ホモログ Krr1p は 40S リボソームの生合成に関わり、B23 はほ乳類において 60S リボソームの生合成に関与することが知られている。これらの事実は、Rev は HRB2、B23、そして SF2p32 を介してリボソーム生合成に何らかの影響を及ぼす可能性を示している。この可能性を明らかにすることは、Rev 機能を障害する新たな薬剤開発のターゲットを特定する上で重要と考えられる。今回の解析で、Rev と SF2p32 の間の機能的関連において新たな可能性が示されたもう一つの注目すべき結果は、SF2p32 が精神障害の発症に関わる fragile X-related proteins (FXR1p, FXR2p, 他)との相互作用が明らかになったことである。FXRs は RNA induced silencing complex (RISC)との相互作用を介して非常に多くの mRNA の翻訳を制御し

ている。このことは、SF2p32 はまた FXRs を介して RISC に働くことで mRNA の安定性や細胞内輸送に関わっている可能性も示唆している。Rev タンパク質の核小体移行シグナルが FXRs のそれに類似しているとの知見は、Rev が RISC による mRNA の安定性の制御にも関わっている可能性を示唆している。

E. 結論

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～80種類同定することができた。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。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

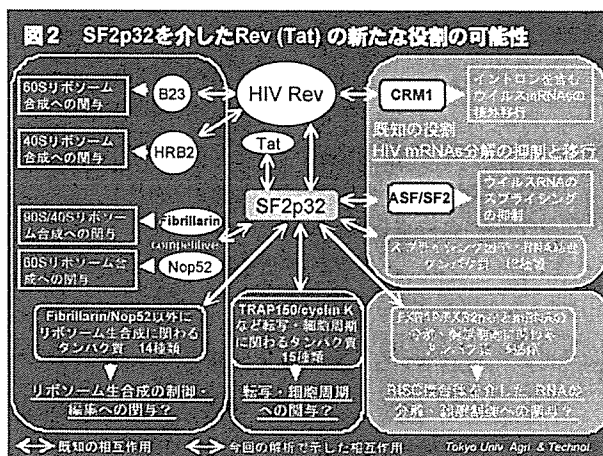
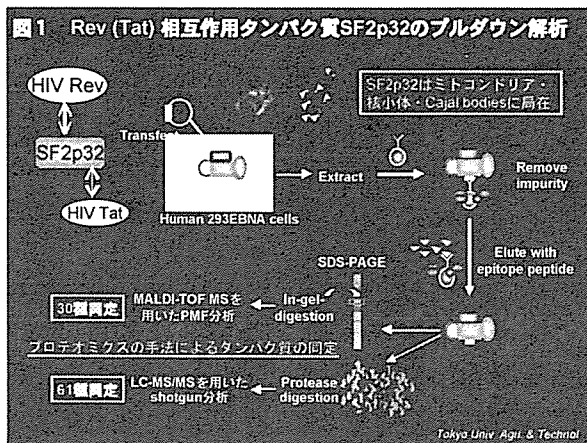
1) 第2回総合脳・タンパク3000・蛋白研共催プロテオミクスシンポジウム、岡崎、2007年1月13日

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し。



厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）  
分担研究報告書

抗 EB ウイルス剤をめざした in vitro スクリーニング

分担研究者 山越 智 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨 HIV 感染症では、細胞性免疫の低下により悪性腫瘍の発症が増加する。特にリンパ腫の治療は予後が悪いため重要な課題となっている。本分担研究では悪性腫瘍に関わる EBV(Epstein-Barr virus)および HHV(human herpesvirus)-8 に対する抗ウイルス剤を開発することを目的とした。今年度は、EBV の潜伏感染に必須で悪性リンパ腫の発症に深く関わる EBNA1 機能をターゲットとする迅速で高感度な in vitro ELISA 系を確立した。植物、微生物由来の 2 次代謝産物からなる天然物化合物ライブラリーをスクリーニングし 3 つの化合物を阻害剤候補として同定した。

A. 研究目的

HIV 感染症では、細胞性免疫の低下がみられる。その結果、様々な日和見感染症を起こすが、それに加えて悪性腫瘍の発症も増加することが知られている。カポジ肉腫、非ホジキンリンパ腫などは AIDS(acquired immunodeficiency syndrome)指標疾患である。カポジ肉腫は、HHV(human herpesvirus)-8 が関与し、多くの悪性リンパ腫は EBV(Epstein-Barr virus)が主に関与すると考えられている。特にリンパ腫は予後が極めて悪いためその治療は重要な課題となっている。そこで本研究ではこれら悪性腫瘍発症に関わるウイルスに対する阻害剤を開発することを目的とする。

B. 研究方法

1. ウイルス蛋白質の合成

GST 蛋白質の下流に EBV の EBNA1 蛋白質の DNA 結合部位を連結し、その C 末

端に FLAG エピトープタグを付けた蛋白質 (GST-EBNA1DB-FLAG) を発現するプラスミドを大腸菌 BL21 に導入し、GST-EBNA1DB-FLAG を大量に発現させた。大腸菌粗抽出液を調整し、グルタチオンセファロース、M2-アガロースにて GST-EBNA1DB-FLAG を精製した。FLAG-LANA 蛋白質は、HHV-8 の LANA の N 末端に FLAG タグを連結した蛋白質をコードする遺伝子を用い、バキュロウイルス発現系にて大量に合成し、ウイルス感染 sf9 細胞の粗抽出液を M2 アガロースに供することで FLAG-LANA 蛋白質を精製した。

2. EBNA1-oriP ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent) Assay によるスクリーニング

ストレプトアビジンでコートされた 96 穴プレートを Blocking buffer(1% BSA, 0.1 mg/ml in PBS)にて室温で 1 時間ブロッキングし、洗浄後、5'末端をビオチン化した oriP

の DS 領域、GST-EBNA1DB-FLAG、スクリーニング化合物を混合した溶液を加えた。室温で1時間放置後、洗浄し HRP conjugated M2-antibody を加えた。さらに室温で1時間放置し、洗浄後、TMB 溶液を加え発色した。0.5N HClにより反応を止め、OD<sub>450nm</sub>にて吸光度を測定した。スクリーニング化合物は、Analyticon Discovery社の天然物ライブラリーを使用した。

### 3. EBNA1-oriP の EMSA(electrophoretic mobility shift assay)法

プローブとして DS 領域を用い <sup>32</sup>P-ATPにて末端ラベルし、GST-EBNA1DB-FLAGと化合物を加え、30°C、30分間インキュベーションした。その後、4%アクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、乾燥後、オートラジオグラムにて解析した。

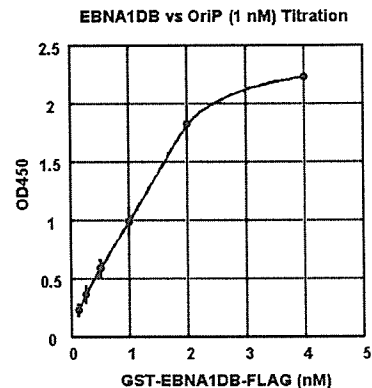
### 4. EBNA1-oriP の EMSA 法

プローブとして LBS(LANA binding sequence)1を用い <sup>32</sup>P-ATPにて末端ラベルし、FLAG-LANAと混合し、EMSA法に供した。

## C. 研究結果

EBVの抗ウイルス剤のスクリーニング系の構築を行った。潜伏感染に必須で悪性リンパ腫の発症に深く関わる EBNA1 をターゲットとした。EBNA1は細胞内で EBVゲノムの oriP 領域の EBS (EBNA1 binding sequence)に結合し、DNA複製、維持に関与する。そこで迅速で簡便なスクリーニング系として in vitro ELISA 法の確立を試みた。大腸菌で EBNA1 の DNA 結合領域に FLAG タグをつけ(GST-EBNA1DB-FLAG)大量に産生精製し、5'末端をビオチン化した oriP の DS 断片と混合、アビジン 96 穴プレ

ートに吸着させた。DS に結合した GST-EBNA1DB-FLAG を HRP 標識抗 FLAG 抗



体で検出することで高感度な ELISA 系を確立した (図1)。

図1. EBNA1DB と DS の検出曲線

この系を用いて Analyticon Discovery社の約1840化合物からなる天然物ライブラリーをスクリーニングした。552個の化合物をスクリーニングした段階で、50%以上の阻害効果を示す化合物3つ(C, D, E)を見出した (図2)。

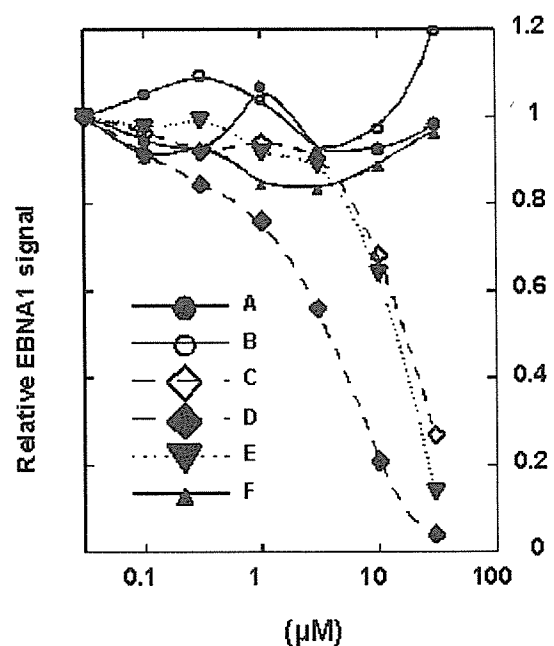


図2. 阻害剤候補の阻害曲線

その中でもっとも阻害効果の高い化合物 D を検証した。ELISA と同じ DS 領域をプローブに使い、GST-EBNA1DB-FLAG を用い EMSA 法における化合物 D の作用を調べた。その結果、図 3 の様に EMSA でも ELISA の結果が再現された。

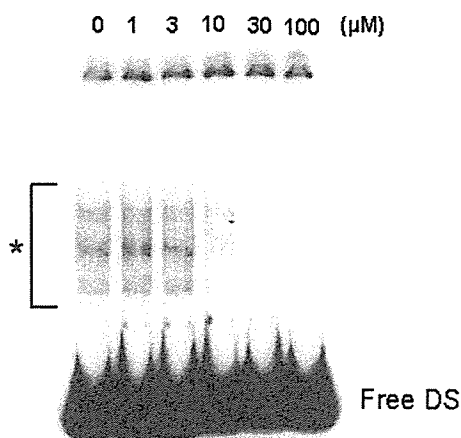


図 3. EBNA1-oriP EMSA における化合物 D の阻害効果

次にこの阻害の特異性を調べるために EMS を使い LANA1 の結合配列 LBS に対する化合物 D の効果を調べたところ図 4 のように阻害効果が見られた。

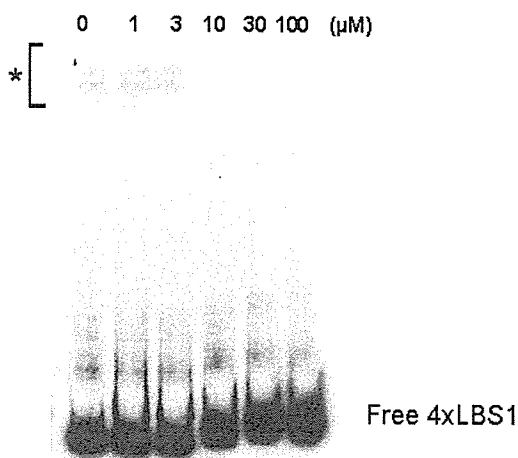


図 4. LANA-LBS EMSA における化合物 D の阻害効果

#### D. 考案

ELISA 法を用いた高感度の *in vitro* スクリーニング系が確立できた。今年度は、それにより 3 つの化合物が阻害剤候補として見つかった。その中で最も活性が強い化合物 D は EMSA でも阻害効果を示したことは、阻害の作用点が EBNA1-oriP の相互作用に直接働くこと、さらには確立した ELISA 系は EBNA1-oriP の相互作用を阻害する物質をスクリーニングするための有効な系であることを意味する。また、EMSA により化合物 D は EBNA1-oriP だけでなく LANA-LBP の相互作用を阻害したことから、この化合物 D の阻害の特異性が低いことが考えられた。LANA を用いて同様の ELISA 系を確立し、EBNA1 の ELISA 系と併用することにより、特異性を考えた有効なスクリーニングをすることができると考えられる。

#### E. 結論

EBNA1-oriP の相互作用をターゲットとした ELISA 法を用いた高感度の *in vitro* スクリーニング系が確立できた。今年度は、それにより 3 つの化合物が阻害剤候補として見つかった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

HIV-1Gag-Env の相互作用の解析ならびに関連宿主因子の探索・同定

分担研究者： 村上 努 国立感染症研究所エイズ研究センター

研究要旨: HIV-1Env のウイルス粒子への取込に関与すると報告された TIP47 について追試を行い、TIP47-Gag、TIP47-Env の相互作用を免疫沈降により確認した。さらに、種々の TIP47 変異体を用いて、これらの相互作用には TIP47 の N 末の 140aa で十分であることが示唆された。TIP47 はウイルス粒子へ取り込まれないと報告されているが、我々もそれを確認した。興味深いことに、TIP47 変異体 (1-384) がウイルス粒子に取り込まれることを見いだした。HIV-1Env のウイルス粒子への取込みに関与する TIP47 以外の宿主因子を探索・同定を試みた結果、TIP47 が Gag または Env の発現下でモータータンパクの一種 MyH9 と相互作用することを見いだした。

A. 研究目的

本研究の最終目標は、HIV-1 Env のウイルス粒子への取込みのメカニズムを明らかにすることにより、この過程を標的とした新規作用機序を有する HIV-1 感染性粒子形成阻害剤の開発につながることである。そのため、まず HIV-1 Env のウイルス粒子への取込みに関与すると報告された宿主タンパク TIP47 について、その内容の確認を試みた。つぎに種々の長さの TIP47 変異体を用いて Gag、Env との相互作用に関与する TIP47 の責任領域の同定を試みた。これらの情報は、TIP47-Gag、TIP47-Env の相互作用を標的とした抗 HIV-1 剤探索のための有益な情報となる（名古屋大学・藤本豊士先生との共同研究）。さらに、HIV-1 Env のウイルス粒子への取込みに関与する TIP47 以外の宿主タンパクを同定するため、TIP47 を bait として TIP47 もしくは Env 取込みのための機能複合体（Gag-TIP47-Env）と相互作用する宿主因子の探索・同定を試みた。培養細胞に上記タンパク（複合体）を強制発現させ、これらを免疫沈降したさいに共沈してくるタンパクを MALDI/TOF-MS にかけて解析・同定した。

B. 研究方法

(1) TIP47 と Gag、Env の相互作用の解析: HIV-1 Gag または Env を 293T 細胞に強制発現させ、細胞破碎液を抗 TIP47 抗体で免疫沈降し共沈物

を Gag または Env に対する抗体でウエスタンブロットティングを行った。

(2) V5 タグ付き TIP47 と Gag、Env の相互作用の解析: V5 タグ付き TIP47、HIV-1 Gag または Env を 293T 細胞に強制発現させ、細胞破碎液を抗 TIP47 抗体で免疫沈降し共沈物を Gag または Env に対する抗体でウエスタンブロットティングを行った。

(3) TIP47 と相互作用する蛋白質の探索・同定: HIV-1 Gag または Env を 293T 細胞に強制発現させ、細胞破碎液を抗 TIP47 抗体で免疫沈降し、共沈してくる蛋白質を MALDI/TOF-MS で解析後 MS-Fit によるデータベース検索により目的蛋白質を同定した（Tagged-MS 法）。抗体が入手可能なものについてはウエスタンブロットティングによる確認も行った。

(4) VLP、ウイルス粒子の調製: Gag、Env 発現プラスミドもしくは HIV-1 分子クローンを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後の培養上清中の VLP またはウイルス粒子を超遠心分離により回収し、ウエスタンブロットティングを行った。

（倫理面での配慮）

該当事項なし。

C. 研究結果

(1) TIP47 に関する報告（PNAS, 103, 14947,

2006) の実験結果の確認実験 :

293T 細胞に Gag と Env を強制発現させて、抗 TIP47 抗体で内因性 TIP47 を免疫沈降すると、Pr55Gag と Env が共沈した (図 1)。Gag の代わりに MA を強制発現すると TIP47 の免沈で MA が共沈してくることより、MA を介して Pr55Gag と TIP47 は相互作用していることを確認できた。また、抗 TIP47 抗体で内因性 TIP47 を免疫沈降すると WT Gag、L12E/V34I MA を有する Gag は共沈したが、L12E を有する Gag は共沈せず、PNAS の Y2H のデータを免沈で確認できた (図 2)。しかしながら、同じ細胞ライセートを Env で免沈しても Gag は共沈してこなかった。

(2) Gag、Env との結合に必要な TIP47 の責任領域の解析 :

293T 細胞に Gag、Env、と V5 タグ付き TIP47 (FL と種々の長さの C 末端削除変異体) を強制発現させて抗 V5 抗体で免沈したところ、使用したすべてのタグ付き TIP47 で Pr55Gag、Env との相互作用が確認され (図 3)、Gag、Env との相互作用には TIP47 の N 末 140aa で十分であることが示唆された。

(3) TIP47 変異体が HIV-1 粒子、VLP に取り込まれるという知見 :

HIV-1 粒子:293T 細胞に pNL4-3 とタグ付き TIP47 を共発現させた細胞から産生されたウイルス粒子内には TIP47FL は取り込まれなかったが、TIP47 変異体 (1-384) は取り込まれていた (図 4)。VLP : Gag/Env/V5-TIP47 発現細胞から産生された VLP には、V5-TIP47FL のほか使用した C 末端削除 V5-TIP 変異体が検出された。さらに、Gag/Env/untag-TIP47 発現細胞から産生された VLP には、少なくとも TIP47FL は検出された。

(4)TIP47 と共沈するタンパク MyH9 の同定 :

293T 細胞に Gag と Env を強制発現させて、抗 TIP47 抗体で内因性 TIP47 を免疫沈降し、共沈してきたタンパク質中で、Gag、Env の両方を発現させたときに顕著に共沈したと考えられるバンドを中心に切り出して MALDI/TOF-MS にかけたところ、MyH9 (Myosin heavy chain 9) が同定された (図 5)。その相互作用は WB によっても確認され、共沈してくるためには少なくとも Gag または Env のどちらかが発現している必要があることが示唆された (図 6)。

## D. 考察

(1) TIP47 に関する PNAS の実験結果の確認では、Gag と TIP47 の MA を介しての相互作用、TIP47 を強制発現させてもウイルス粒子には取り込まれないこと、を確認できた。今後は、より重要な知見である TIP47 のロックダウンによる Env のウイルス粒子への取込み阻害、その逆の TIP47 の過剰発現による Env のウイルス粒子への取込み量の増加を確認する予定である。

(2) Gag、Env との結合に必要な TIP47 の責任領域の解析の結果、Gag、Env との相互作用には TIP47 の N 末 140aa で十分であることが示唆されたが、さらに N 末を欠失した TIP47 変異体を使用した実験によって責任領域を確定する予定である。

(3) TIP47 と共沈するタンパクとして MyH9 が同定された。この細胞骨格タンパク (非筋肉ミオシン) と TIP47 の相互作用が Env 取込みに何らかの役割を果たしているかを、まず MyH9 をロックダウンしてその影響を検討する予定である。また、なぜ共沈してくるためには少なくとも Gag または Env のどちらかが発現している必要があるのかについても解析を加える予定である。

## E. 結論

(1)TIP47 と Gag(MA)との相互作用など PNAS の報告内容の一部が確認された。

(2) Gag、Env との相互作用には TIP47 の N 末 140aa で十分であることが示唆された。

(3) Gag または Env の存在下で TIP47 と相互作用するタンパクとして MyH9 (Myosin IIA)が同定された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

T. Murakami, and N. Yamamoto. AIDS: How Do We Overcome This Social or Biodisaster (Review)?

The Journal of Disaster Research, In press, 2007

### 2. 学会発表

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1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 アントゴニスト 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

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当事項なし

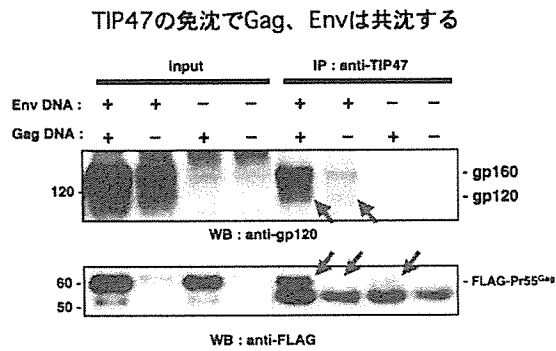


図 1. TIP47 と Gag、Env の相互作用

TIP47とGag (MA)の相互作用はEnv取込みの可否と相関する

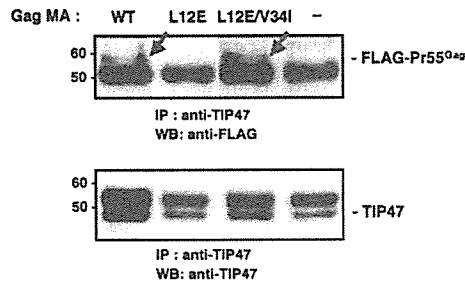


図 2. TIP47 と Gag (MA 変異体) の相互作用

TIP47とGagの相互作用 (共沈)

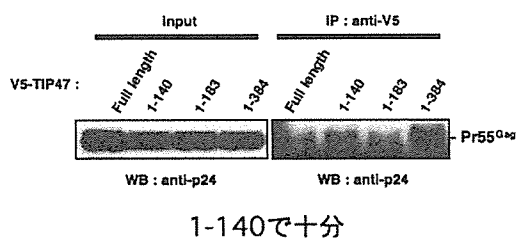
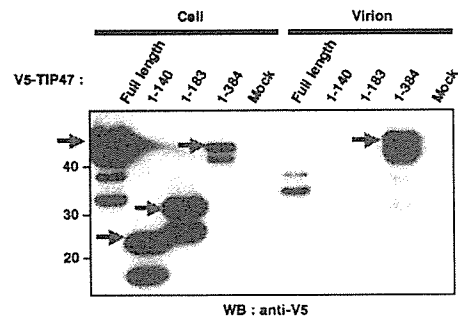


図 3. TIP47 変異体と Gag との相互作用



1-384のみウイルス粒子に取り込まれている!

図 4. ウイルス粒子中への TIP47 とその変異体の取込みの有無

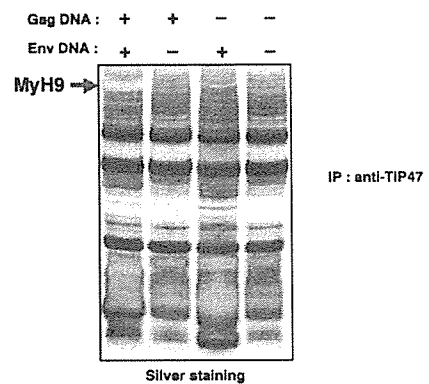


図 5. TIP47 と相互作用する MyH9 (1)

TIP47とMyH9との相互作用 (共沈) が観察されるのは少なくともGag、またはEnvのどちらか一方が発現しているときである

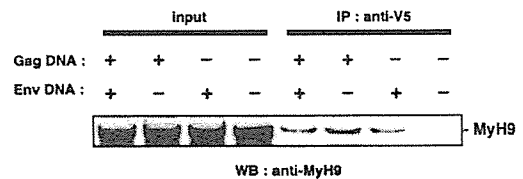


図 6. TIP47 と相互作用する MyH9 (2)

酵母を用いた抗 HIV 薬の探索

分担研究者 森川裕子（北里大学 生命科学研究所）

研究要旨

酵母を用いた抗 HIV 薬の探索を目的に、酵母 CytoTrap Two Hybrid 法を利用して、HIV Gag 蛋白の形質膜 targeting と多量体形成（Gag-Gag 相互作用）を再現できるスクリーニング系を構築した。この酵母 CytoTrap 法では蛋白質相互作用を生育シグナルとして検出でき、蛋白質相互作用の阻害は酵母の生育抑制として検出できる。この構築した酵母 Gag-Gag 相互作用反応系を用いて約 20,000 個の低分子化合物ライブラリ（10mM）を探索したところ、酵母の生育を 50%以下に抑制する化合物が 10 個見いだされた。この 10 化合物のうち 4 化合物は、Gag-Gag 相互作用反応系を他の蛋白質相互作用反応系（Positive Control）に代えても阻害効果が認められたことから、Gag-Gag 相互作用特異的でないと判断された。このうち 1 化合物は通常の酵母細胞培養系でも増殖阻害が認められた。すなわち、6 化合物の Gag-Gag 相互作用特異的阻害物質、3 化合物の非特異的阻害物質、1 化合物の酵母生育阻害物質が発見された。本研究で発見された Gag-Gag 特異的阻害物質は、それ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につながると期待される。

A. 研究目的

現在臨床で用いられている抗 HIV 薬はヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬、およびプロテアーゼ阻害薬である。ウイルス独自の酵素に対する阻害剤であるため特異性が高いものの、ウイルスの変異により耐性ウイルスが生じる。特に、これらを単独で使用すると容易に薬剤耐性ウイルスが出現するため、これらを組み合わせた多剤併用療法 HAART が標準的な治療法として実施されている。この療法により患者体内の HIV の増殖が強力に抑えられ、事実 AIDS 死亡者数も減少した。しかし、これらの薬剤に対する交差耐性や多剤耐性ウイルスの出現が問題となっており、既存の抗 HIV 薬剤とは異なる作用機序をもつ新たな薬剤の開発が切望されている。

一般的に、精製酵素を用いた *in vitro* の探索系では薬剤の活性を nM レベルで検出できるのに対し、*in vivo* の探索系では高濃度の薬剤を必要とする。これは *in vivo* ではその薬剤が形質膜を通過できなかったり、細胞内で分解を受けたり、あるいは細胞毒性があったりするからである。しかしながら、ウイルスは細胞内寄生体であることから、こうした難

点をクリアできる薬剤でなければ意味がない。換言すれば、*in vivo* 探索系で単離される活性物質は生体内でも同じように効果を示す可能性が高いと思われる。以上の観点から、*in vivo* assay 系で、かつ high-throughput で大量のサンプルを処理できる探索系が最適である。酵母は取り扱いが比較的容易であるにもかかわらず、高等真核細胞との類似性が高く、しばしば真核細胞のモデルとして用いられる。また酵母は、細胞壁除去を必要とするものの、HIV Gag 蛋白が形質膜に輸送され粒子形成が再現できる細胞である。

本研究では新たな抗 HIV 薬の作用点として粒子形成過程に注目し、まずその過程の主反応である膜結合 Gag-Gag 蛋白の相互作用反応系を酵母細胞で構築し、次にその探索系を用いて市販の 20,000 個の低分子化合物ライブラリから抗 HIV リード化合物をスクリーニングすることを試みた。

B. 研究方法

1) 低分子化合物ライブラリ

Enamine 社の 96 穴プレートに分注されたスクリーニング用化合物の Reoresentative Diversity Set (80 化

化合物/プレート×250枚=20,000化合物)を使用した。

## 2) 酵母 CytoTrap Two Hybrid 法を利用した探索系の構築

*Saccharomyces cerevisiae* cdc25Ha 株 (*MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 cdc25-2 Gal<sup>+</sup>*) を用いた。本酵母株はゲノムの CDC25 遺伝子に温度感受性変異があるため、25°C (許容温度) では生育可能であるが、37°C (非許容温度) では生育できない。CDC25 はヒト hSOS のオルソログであり、本酵母株はその変異が SOS で相補された時のみ RAS 経路が活性化され、37°Cでも生育可能となる。

HIV Gag 蛋白発現には2種類の酵母発現ベクター (pSos と pMyr) を用いた。HIV-1 gag 遺伝子をこれらの酵母発現ベクターに挿入し (Gag/pSOS と Gag/pMyr)、それらを酵母 cdc25Ha 株に導入して Gag-Gag 相互作用反応系とした。別の2種類のコントロールプラスミド (MAFB/pSOS と SB/pMyr) も同様に酵母 cdc25Ha 株に導入し Positive Control の相互作用反応系として使用した。

## 3) 酵母 Gag-Gag 相互作用反応系を用いた低分子化合物ライブラリのスクリーニング

形質転換した酵母 cdc25Ha 株を uracil, leucine dropout の SD 培地 (2% raffinose 含有) で培養した。一夜培養液を洗浄後、細胞濃度を OD600=0.1 に調製し化合物ライブラリ (最終濃度 10mM) とともに uracil, leucine dropout の SD 培地 (2% galactose 含有) で培養した。培養には平底 96 穴プレートを用い、37°C で5日間振盪培養した。OD630 のプレートリーダーで酵母培養液の濁度を測定して酵母の生育率を調べた。コントロールとの相対値を算出しサンプルの阻害効果を判定した。

## 4) 酵母に対する細胞毒性

酵母 cdc25Ha 株を化合物ライブラリとともに許容温度である 25°C で2日間振盪培養し、酵母の生育率を調べた。

## 5) 高等真核細胞に対する毒性

黒色 96 穴プレートに 293T 細胞を調製し化合物を添加して2日間培養した。alarBlue を添加し、4時間に蛍光プレートリーダーで蛍光を測定した。

## 6) 抗 HIV 活性

LuSIV 細胞を indicator 細胞として用いた。HIV (感染細胞) とサンプルを添加して 37°C で4日間培養し、その luciferase 活性を測定した。

## (倫理面への配慮)

本研究では HIV 患者からの臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。実験遂行上の安全対策は、遺伝子組換え実験については二種省令・二種告示に従った。

## C. 研究結果

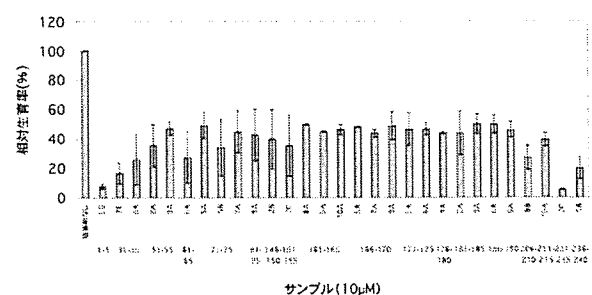
### 1) 酵母 Gag-Gag 相互作用探索系の構築

本研究では酵母 CytoTrap Two Hybrid 法を用いてまず、HIV 粒子形成過程の主反応である形質膜直下での Gag-Gag 多量体形成を再現し、かつそれを酵母の生育シグナルとして検出できる酵母での Gag-Gag 蛋白相互作用探索系を構築した。

### 2) 低分子化合物ライブラリのスクリーニング

上記の Gag-Gag 蛋白相互作用探索系を用いて市販の 20,000 個の低分子化合物ライブラリをスクリーニングした。1次スクリーニングには5化合物ずつを1つにまとめた5化合物混合 (10mM each) の低分子化合物ライブラリを用いた。スクリーニングを行ったところ、化合物を添加しないコントロールと比較し酵母の生育率が 50%以下に抑制できたものが 29 pool 見出された (図1)。

図1. 低分子化合物ライブラリ (5化合物混合) の1次スクリーニング

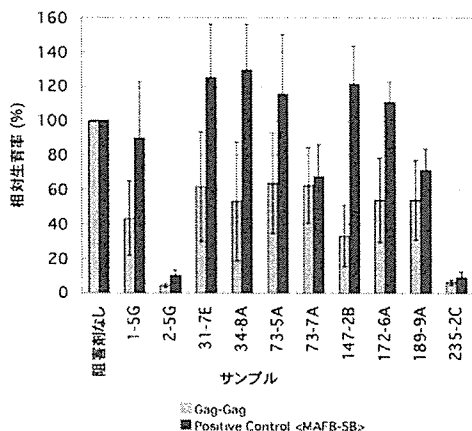


次に、この5化合物混合の 29 pool をそれぞれ1化合物に分けて2次スクリーニングを行ったところ、1化合物で阻害効果の認められたのは 10 化合物 (1-5G、2-5G、31-7E、34-8A、73-5A、73-7A、147-2B、172-6A、189-9A、235-2C) だけであり (図2)、多くの5化合物混合において認められた阻害活性が1化合物に分けると失われた。

2次スクリーニングで得たこれら 10 化合物について、その阻害が Gag 蛋白特異的かどうかを調べ

た。すなわち、Gag-Gag 蛋白相互作用反応系を Positive Control として用いられる MAFB-SB 蛋白相互作用反応系に代えて調べたところ、4 化合物 (2-5G、73-7A、189-9A、235-2C) は Positive Control 反応系でも増殖抑制が認められた (図 2)。このことから、これら 4 化合物は Gag-Gag 相互作用反応系と Positive Control 相互作用反応系に共通する作用点を標的として作用し、酵母生育を抑制したと推測され、Gag 特異的でない判断された。

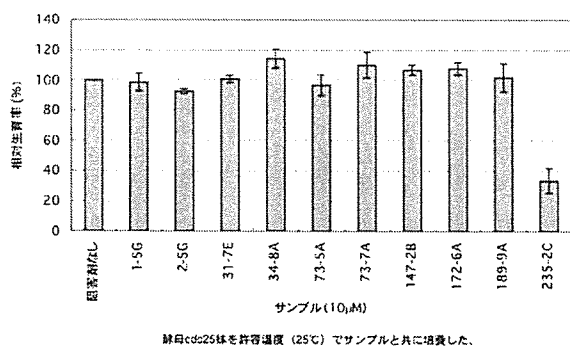
図 2、低分子化合物ライブラリ (単化合物) の 2 次スクリーニング



### 3) 低分子化合物の細胞毒性

2 次スクリーニングで選択された 10 化合物の細胞毒性を調べた。まず酵母に対する細胞毒性を調べた。スクリーニングで用いた形質転換酵母にこれらの化合物 (最終濃度 10mM) を添加し許容温度である 25°C で培養した。この温度条件では酵母 CytoTrap Two Hybrid 法の特徴である蛋白質相互作用に依存せず酵母は生育する。こうした条件においても 235-2C には酵母に対する生育阻害効果が認められた。一方、その他の 9 化合物には生育阻害効果はなかった (図 3)。

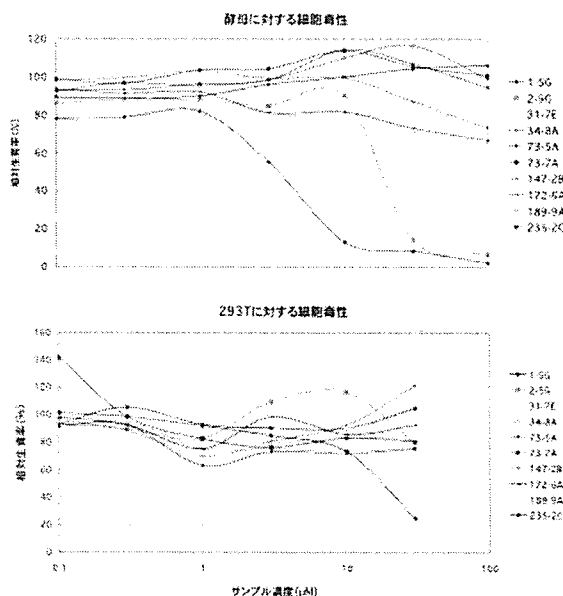
図 3、酵母に対する細胞毒性



化合物の濃度を変えて調べたところ、化合物 235-2C は 3mM で約 50%、10mM ではほぼ完全に酵母の生育を阻害した。一方、他の 9 化合物は 10mM では酵母生育を阻害せず、特に 2-5G 以外の 8 化合物は 100mM でも阻害しなかった (図 4)。

次に、高等真核細胞 (293T 細胞) に対する細胞毒性を alamarBlue で調べた。毒性が認められたのは 235-2C だけであったが、酵母とは異なり 10mM では認められなかった。その他の 9 化合物は 30mM でも細胞毒性はなかった (図 4)。

図 4、細胞毒性の比較 (酵母と高等真核細胞)

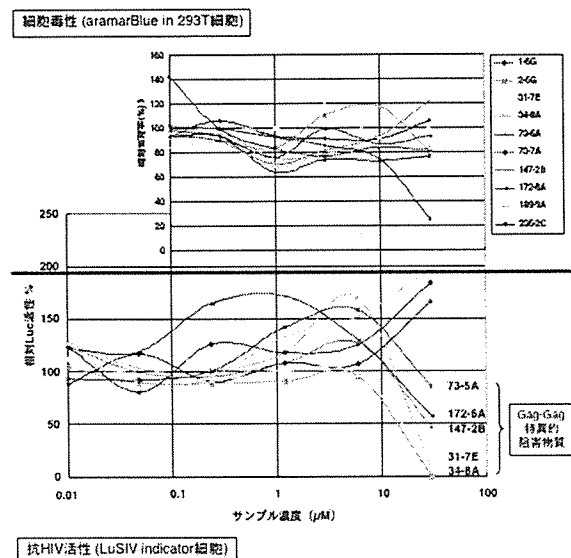


### 4) 低分子化合物の抗 HIV 活性

上記の 9 化合物について、LuSIV 細胞すなわち HIV の感染を luciferase reporter 活性として定量できるヒト T リンパ球系培養細胞を用いて抗 HIV 活性を測定した。いずれの化合物も低濃度では効果がなかったが、30μM では 2-5G、31-7E、34-8A、147-2B、172-6A に抗 HIV 活性が認められた (図 5)。



図5. 候補化合物の細胞毒性と抗HIV活性



#### D. 考察

本研究では HIV 粒子形成過程に着目し、膜結合 Gag-Gag 蛋白の相互作用反応を標的とするリード化合物を低分子化合物ライブラリから探索した。

まず 5 化合物混合のライブラリで 1 次スクリーニングし、29 pool の有効候補を得た。しかし、これらを単一の化合物にして計 145 化合物を再度スクリーニングすると、有効と認められたのはわずか 10 化合物であった。換言すれば、20 pool の 5 化合物混合物は単一化合物にするとその阻害活性が失われた。これは 5 種類の化合物が共存することで化合物同士の反応あるいは化合物の構造変化が生じより活性の高い化合物に変換されていた可能性や、1 化合物の阻害活性がわずかでも作用部位の異なる化合物の共存により相乗効果が得られていたことが考えられた。

これらの単一で有効と判定された 10 化合物を Gag とは無関係の MAFB-SB 相互作用反応系 (Positive Control) で調べたところ、2-5G、73-7A、189-9A はその Positive Control 反応系でも阻害活性を示すことが明らかになった。すなわち、これら 3 化合物の阻害効果は Gag-Gag 相互作用の阻害によるものではなく、Positive Control である反応系と共通のもの、例えば、Ras 経路を標的する、あるいは蛋白ミリスチル化や蛋白の膜輸送を阻害したと推測された。

これら 10 化合物の細胞毒性を調べたところ、235-2C は酵母と高等真核細胞いずれに対しても細

胞毒性を示した。しかし、その有効濃度は酵母に対しては  $TC_{50}=3.5\text{mM}$ 、高等真核細胞に対しては  $TC_{50}=17.1\text{mM}$  であり、この差がさらに広がれば AIDS 随伴の日見感染症であるカンジダ症等に対する抗真菌剤としての利用も考えられる。

LuSIV 細胞で 235-2C を除く 9 化合物の抗 HIV 活性を調べたところ、酵母での結果と相関する結果が得られた。すなわち、酵母細胞で Gag-Gag 相互作用特異的阻害物質と判断した 31-7E、34-8A、147-2B、172-6A に阻害効果が認められ、非特異的阻害剤であった 73-7A と 189-9A には抗 HIV 活性は認められなかった。しかしながら、本酵母系で非特異的阻害物質とした 2-5G が高等真核細胞では抗 HIV 活性を示した。これは 2-5G が、例えば蛋白ミリスチル化を阻害したことによる可能性が考えられた。Gag 蛋白のミリスチル化は HIV 粒子形成に必須であり、そのミリスチル化阻害は抗 HIV 活性につながったと思われる。

本研究では酵母を用いた *in vivo* 探索系を構築し利用した。酵母は高等真核細胞と異なり取り扱いが簡単であり、一度に大量のサンプルをスクリーニングできたことや細胞毒性も評価できたことがメリットであった。また、酵母 CytoTrap 法は膜結合蛋白の相互作用を容易に再現できたことも利点である。しかし、本系のスクリーニングにはその数値データに大きなばらつきがあった。これは 37°C で 5 日間培養したものに顕著にみられ、25°C で 2 日間の培養ではそれほどばらつきはなかった。37°C は本酵母 *cdc25H* 株にとって非許容温度であり、長期間の培養で revertant が出現した可能性は否定できない。今後は培養時間の短縮化が求められる。また、本系はサンプルの阻害効果を生育阻害として検出するネガティブスクリーニング系であったため、分解速度の速いサンプルの阻害効果は検出できなかったと思われる。

近年、HIV 粒子形成過程を作用点とした Gag 蛋白に作用する抗 HIV 阻害剤がいくつか (PA-457、CAI、CAP1、2) 報告されている。PA-457 (分子量 584) は Gag 蛋白の CA-SP1 から CA への切断を阻害する化合物で、成熟過程を阻害し、形態学的に異常な非感染性 HIV 粒子を産生させる ( $IC_{50}=10\text{nM}$ )。一方、CAI は 12 残基のペプチドで CA の C 末端ドメインに結合し 2 量体形成部位を変化させ CA-CA 相互作用を阻害する ( $K_d=15\text{mM}$ )。同様に CAP-1 及び CAP-2

は CA の N 末端ドメインに結合し CA-CA 相互作用を阻害する (CAP-1: Kd=820mM、CAP-2: Kd=52mM)。本研究で見いだした抗 HIV 候補化合物の活性は IC50=30mM であり、上記の報告と comparable であるものの、薬剤とするには活性が低い。これら候補化合物をリード化合物として、構造の至適化を図ることが必要と思われる。このような構造の至適化や化学修飾を図るためには、本化合物の Gag 蛋白質結合部位を明らかにするとともにその立体構造解析が重要だと思われる。

#### E. 結論

抗 HIV 薬の作用点として粒子形成過程に注目し、まずその過程の主反応である、次にその探索系を用いて市販の 20,000 個の低分子化合物ライブラリから抗 HIV リード化合物をスクリーニングすることを試みた。酵母 CytoTrap 法を利用して膜結合 Gag-Gag 蛋白質の相互作用反応系を酵母で構築した。この酵母探索系を用いて市販の低分子化合物ライブラリをスクリーニングし、Gag-Gag 相互作用反応系阻害物質を 6 化合物 (1-5G、31-7E、34-8A、73-5A、147-2B、172-6A)、非特異的阻害物質を 3 化合物 (2-5G、73-7A、189-9A)、酵母生育阻害物質を 1 化合物 (235-2C) 選択できた。

#### F. 知的所有権の取得状況

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

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)

##### 2) 学会発表

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 蛋白質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 蛋白質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.

HIV-1 Vpr に対する拮抗薬の分裂酵母モデルを用いた検索

分担研究者 増田 道明 獨協医科大学・医学部・教授

研究要旨：

HIV-1 のアクセサリー蛋白 Vpr は宿主細胞周期の G2 期から M 期への進行を抑制（G2 arrest）したり、細胞毒性を示したりすることにより、宿主細胞の増殖抑制や細胞死を誘導する。この現象は、HIV-1 の複製促進や AIDS の発症機構にも寄与する可能性が報告されている。従って、Vpr に対する拮抗薬が開発されれば、HIV 感染者の治療方針において、補助的治療薬の候補となる可能性がある。一方、Vpr の機能発現機構については未だ不明の点が多く、演繹的な方法論で拮抗薬を開発するのは容易ではない。そこで本年度は、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、改良を行った。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ところ、Vpr の細胞増殖抑制能に対する拮抗作用を持つ物質が約 60 種類得られた。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）がコードする Vpr は多様な機能を持つアクセサリー蛋白である。特に、宿主細胞周期の G2 arrest や細胞死の誘導能は、HIV-1 の複製促進や AIDS の発症機構に関与している可能性がある。

本研究は、Vpr のこれらの機能に対する拮抗作用を有する低分子化合物を同定し、Vpr を標的として HIV の増殖を制御する薬品開発の基礎を作ることを目的としている。

B. 研究方法

分裂酵母用発現ベクター pREP-1 の *nmt1* プロモータ（チアミン非存在下で活性化）の下流に、HIV-1<sub>NL4.3</sub> Vpr（His 標識付き）の遺伝子を挿入し、pREP1-His-Vpr を構築した。このプラスミドを、*h<sup>i</sup> leul* 株の分裂酵母に導入し、形質転換株を得た。この形質転換株を 96 穴プレート寒天培地で、チアミン存在化、チアミン非存在化、種々の低分子化合物（Enamine 社）存在下で培養し、増殖の程度を比較した。

C. 研究結果

得られた形質転換株は、チアミンを含む培地では正常に増殖した。一方、チアミンを含まない培地で培養すると、His 標識 Vpr の発現誘導に伴い、細胞周期の G2 arrest および viability の低下が起こった。この条件では寒天培地上で明確なコロニーを形成することはなかった。種々の化合物を 5 種類ずつ混合して添加した寒天培地（1.6%）で培養すると、チアミンが存在しな

いにもかかわらず、コロニー形成を認める場合があった。その場合は、5 種類を個別に調べると、チアミン非存在下で形質転換株のコロニー形成を可能にする化合物が見出されることがあった。

次に、96 穴プレートに作成した半流動寒天培地（0.15%）を用いて、10,000 種類の化合物をスクリーニングしたところ、形質転換株の増殖様式は、①チアミン非存在下と同程度を示すもの、②チアミン非存在下よりも乏しい増殖を示すもの、③チアミン存在下に近い増殖を示すものの 3 パターンに大別された。このうち、②は分裂酵母に対して細胞毒性を有する化合物であると考えられた。③に相当する化合物は約 60 種類あったが、これらは Vpr 拮抗作用を持つ物質の候補と考えられた。

D. 考察

通常の寒天培地を用いる方法でも、Vpr 拮抗作用を持つ化合物の検索は可能であったが、その手間を考えると検索効率に問題があった。また、混合した 5 種類の化合物の中に細胞毒性を持つものが含まれていると、偽陰性の結果となる危険があった。

一方、半流動寒天培地を用いた系では、検索の効率が上昇し、10,000 種類の化合物を個別にアッセイすることが可能であった。これにより、分裂酵母に対する細胞毒性を有する化合物および Vpr に対する拮抗作用を有する化合物の候補を得ることができた。

E. 結論

分裂酵母の半流動寒天培地培養系を用いて 10,000 種類の化合物をスクリーニングすることにより、HIV-1 Vpr に対する拮抗作用を持つ化合物の候補が約 60 種類得られた。今後、これらの化合物について作用機序を明らかにするとともに、ヒト細胞における Vpr 拮抗作用も検討していきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表  
特になし

2. 学会発表

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.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

