

研究課題：電算機的アプローチを活用した RNaseH 活性を標的とする HIV-1 複製阻害剤開発に関する研究（若手育成型）

課題番号：H18-エイズ-若手-003

分担研究課題：RNase H 阻害剤先導化合物の酵素-化合物相互作用の電算機的解析に関する研究

分担研究者 星野忠次（千葉大学・大学院薬学研究院・薬品物理化学研究室 助教授）

研究要旨

現在、国内で認可されている抗エイズ薬の作用機序は、HIV-1 プロテアーゼの酵素活性あるいは逆転写酵素の DNA ポリメラーゼ活性を阻害することにある。ところが多剤併用療法に抵抗性を示す薬剤耐性ウイルスの出現により、新規の抗エイズ薬の開発が必要とされている。本研究では、逆転写酵素の RNaseH ドメインの働きに着目して、新規抗エイズ薬として RNaseH 活性を阻害する薬物をコンピューターシミュレーションによって設計し、有機化学実験により合成することを目的とする。分担研究では生化学実験でのスクリーニングによって見出された RNaseH 阻害作用を有する分子化合物を用いて、逆転写酵素に対するドッキングシミュレーションを行った。その結果、化合物の多くは、RNaseH ドメインの活性部位に対して、類似の結合様式を示した。これらの化合物は、Mg²⁺イオンとキレートするような形で結合しており、RNA 中のリン酸基が Mg²⁺イオンに配位するのを阻害することで活性を示すと推察される。薬物候補化合物と RNaseH ドメインの結合様式が明確になったので、今後は新たな化合物を設計することが可能となった。RNaseH 阻害活性を持つ分子は共通の分子構造を持っている。そこでこの共通構造を有機化学実験により合成し、実際に薬物化合物として得た。さらにこの化合物を出発原料として実験的スクリーニングによって最も強い活性を持つ化合物の合成を試みた。

A. 研究目的

現在、HIV-1 感染症治療においては、主に逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬を用いた多剤併用療法 (HAART) が行われている。ところが HIV-1 は遺伝子変異を起こしやすいため、長期間の薬剤投与により、ウイルスが薬剤耐性を獲得する現象が起こる。このウイルスの薬剤耐性の獲得は、現在のエイズ治療において最も深刻な問題の一つとなっている。現在認可されている抗エイズ薬は、どれもウイルスの薬剤耐性により薬効が低下することが知られている。現在、抗エイズ薬の多剤併用療法によりエイズの発症を遅らせる

ことはできるようになったが、抗エイズ薬の長期服用による薬剤耐性ウイルスの発生は免れず、ほとんどの患者が最終的にはエイズを発症する。薬剤耐性の問題を回避するために、抗エイズ薬の開発には2つの動向がある。一つは、従来からの逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤とは異なり、別の部位に標的を定めた抗エイズ薬の開発である。HIV のウイルスが宿主細胞に侵入する過程を阻止する薬剤などが、これまでに発表されている。もう一方のアプローチは、薬剤耐性ウイルスにも薬効を大きく低下させない逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発である。本研究班

では、前者のアプローチ、すなわち新しい標的部に作用する抗エイズ薬の創出を研究目的としている。

研究代表者（感染研：駒野）は、2万種類の化合物ライブラリーよりスクリーニングを行った。その結果、逆転写酵素を構成する蛋白質 p66 に含まれる RNaseH ドメインに作用する化合物を見出した。RNaseH は、逆転写酵素の働きの一部として、RNA の特定配列部位を切断する機能を持つ。すなわち RNaseH は HIV-1 の逆転写が行われる際に、鋳型となる RNA を分断する働きを持ち、逆転写の過程において非常に重要な機能を担っている。研究代表者（駒野）により見出された化合物は、この RNA 切断機能を阻害して酵素の働きを抑える効果がある。つまり RNaseH 活性部位に結合することで、本来の RNaseH の機能を阻害することが可能であり、この RNaseH 活性阻害剤を開発することが、本研究班の研究目標である。

化合物ライブラリーの中に含まれている化合物の中で、最も強い阻害活性を示すもの（ヒット化合物）は、IC₅₀ でサブ μ M レベルのものである。医薬品として成立するためには、さらに 1-2 桁低いレベルで活性阻害効果を持つものが望まれる。そこで分担課題として、コンピューターを用いて、標的蛋白質 (RNaseH) と化合物の結合様式を理解した上で、さらに結合親和性の強い化合物構造を考案することが求められている。すなわち計算機により、リード化合物の設計を実行することが、分担課題の最大の任務である。本研究では、設計した化合物について、実際に有機合成を行う。合成化合物は、合成の中間体や派生物も含めて、研究代表者（駒野）により活性測定が行われる。この作業を繰り返して最適なリード化合物を見出すことが、本研究の目的である。

B. 研究方法

(B-1) 計算機解析

研究代表者（感染研：駒野）により RNaseH に対する阻害活性を持つヒット化合物が見出されている。RNaseH の分子構造は既に X線結晶解析により明らかにされている。ヒット化合物の構造も判る。但し、ヒット化合物が RNaseH のどの部分に、どのような配置で結合するかは、明確でない。そこでドッキングシミュレーションソフトウェアを使用して、これを解析した。

Protein Data Bank には、逆転写酵素の 3 次元立体構造として、1SUQ の構造が登録されている。RNaseH は、逆転写酵素のサブドメインであるので、この構造を計算に使用した。

初めにドッキング計算の下準備をするために、富士通株式会社より販売されている BioMedCACHe というソフトウェアを用いて、ヒット化合物の構造を計算機内で作成して、その安定コンフォメーションを求めた。またタンパク質側は、化合物の結合サイトの探索範囲を絞り込むために、逆転写酵素の RNaseH 部位にある 4 つの荷電性アミノ酸残基 (Asp443, Glu478, Asp498, Asp549) から 20 Å 以内を、結合部位として指定した。ヒット化合物に加えて、弱い阻害活性を持つ 32 種類の化合物もドッキング計算に使用し、比較検討ができるようにした。

ドッキングシミュレーションは、シュレディンガー社の Glide というソフトウェアとケンブリッジ結晶データセンターが販売する Gold というソフトウェアの両者で行った。両者ともドッキングシミュレーションプログラムの中では実績のあるソフトウェアである。但し、ドッキング計算は現在の最新の計算機とソフトウェアでも、その予測精度は、必ずしも十分に高いとは言い難い面がある。そこで、2 つのソフトウェアによるドッ

キングシミュレーションを実行して、両者で等価な結果が得られた場合に、算出結果を化合物と RNaseH ドメインの結合構造として採択することとした。

(B-2)有機合成

幾つかの RNaseH 阻害活性を持つ化合物には、共通の分子構造があることが判明した。そこでこの共通構造ならびに最も活性の強いヒット化合物について有機合成を行う。次年度以降これを改良してより活性の強い化合物を作る計画である。従って、基本骨格について有効な合成経路を確立しておくことが重要になる。合成反応では、薄層クロマトグラフィーの後に、主にカラム精製を行い、生成物を分離する。合成で得られた化合物は、核磁気共鳴分光法 (NMR) ならびに電子線イオン化質量分析法 (EI-MASS) により、その構造を確認する。

C. 研究結果

(C-1)計算機解析

RNaseH 阻害活性を持つ複数の化合物について、RNaseH と化合物のドッキングシミュレーションを実行した。これらの化合物は、1C50 でサブ μ M レベルの阻害活性を示すもの、5 μ M 以下の活性を示すもの、50 μ M 以下の活性を示すもの、50 μ M レベルの活性を示すもの、全く活性を示さないものに分類して計算を実施した。ドッキングシミュレーションでは、全く活性を示さないものであっても、何らかの結合構造が答えとして出力される。また結合親和性は、ドッキングスコアとして提示される。図1に幾つかの化合物について、Glide ソフトウェアによって算出されたドッキングスコアを示す。計算から得られるドッキングスコアを参照することで、全く活性を示さないものについては、明らかに他に分類される化合物と区

別することができる。ところが多少でも活性がある化合物については、ドッキングスコアからは結合の強さ (結合親和性) は、判断できないという結果となった。Gold ソフトウェアによっても、結合親和性の目安となるドッキングスコアが算出されるが、やはり多少でも活性のある化合物については、その活性の強さを予測することは困難であった。

ヒット化合物の中から代表的な2つの化合物を図2に示す。研究代表者 (駒野) により活性がある化合物のほとんどが、図中で赤円で囲んだ構造を共通に含んでいる。すなわちニトロ基の結合したフラン環から酸素原子の多数結合した炭素鎖が伸びる構造をとり、炭素鎖の末端部分に疎水性の官能基が付く形となっている。

ヒット化合物のうち結合親和性の高い化合物 (215A07) について、RNaseH との結合構造を図3に示す。Glide ソフトウェアと Gold ソフトウェアの両者で、ほぼ同様の構造が得られた。RNaseH ドメインでは、活性部位に4つの荷電性アミノ酸残基 (Asp443, Glu478, Asp498, Asp549 : 図3中に赤で表示) が存在するが、これを横切るような形で溝ができています。溝と4つの残基の交わる部分には、 Mg^{2+} イオンが配位している。化合物の酸素原子が多く存在する箇所は、丁度、この Mg^{2+} イオンに配位結合して安定化していると推察される。Glide と Gold という2つのソフトウェアで同一の結果が得られたことや、ヒット化合物が溝に填ることから判断して、この結合構造は確からしいと思われる。

RNaseH 阻害活性は、それほど高くはないが、疎水性の官能基部分が比較的大きな化合物 (086F04) について、RNaseH とドッキングシミュレーションした結果について、図4に示す。これを見ると、図中に赤い囲みで示したように、フラ

ン環の吸着位置が、215A07とは逆になっていることが判る。活性部位の溝に填るために、活性を持つ化合物は、細長い形をしている。溝に填る細長い形状という特徴から、結合構造については、フラン環の向きに注目すると、2方向の可能性があることが判る。現在、さらに高精度の計算を実行して、いずれの構造がより確からしいかを求めている。

(C-2)有機合成

活性がある化合物のほとんどが、図2で赤円で囲んだ構造を共通に含んでいることを先に示した。この部分は、RNaseH阻害の基幹となる部分であるので、最も初めに合成に取り組んだ。比較的安価に調達できる出発化合物として、5-Nitro-2-Furoic acidとMethyl Glycolateを選び、一段階の脱水重合反応で合成を試みた(図5)。溶媒にはテトラヒドロフランを用いて、75°Cで6時間の反応を行った。核磁気共鳴分光法(NMR)で測定したところ、水素NMRならびに炭素NMRともに期待される波長にピークが観測された(図6)。さらに電子線イオン化質量分析法(EI-MASS)により測定したところ、最大分子量が229と測定されて(図7)、この分子が正しく合成されていることが確認できた。

次に、反応1の生成物にAdamantamineを用いて、アミンによるアシル炭素の求核置換反応を行い、かさ高い疎水基の付加を試みた(図8)。これにより結合親和性の高いヒット化合物(215A07)が合成できる。溶媒にはジメチルホルムアミドを用いて、170°Cで12時間の反応を行った。核磁気共鳴分光法(NMR)で測定したところ、生成物はAdamantane構造の開裂を示唆しており(図9)、目的の構造物が正しく作成されていないことを示していた。今後、Adamantane構造の開裂を起こさせないような緩和な条件で、かつ効

率的にAdamantaneの付加が起こるような実験条件の探索が必要である。

D. 考察

計算機によりRNaseH阻害活性が確認されている化合物と逆転写酵素のRNaseHドメインとのドッキング計算を実行した結果、さらに活性の高い化合物は以下の指針で構築できることが示唆される。(1)活性中心には、 Mg^{2+} イオンが存在しており(図10の緑の四角)、化合物はこれをキレートして配位結合を形成するようにする。従って酸素原子が適当な間隔(3.2Å程度)で離れて位置する構造が良い。この箇所は、図中に橙色で示すように親水性領域となる。(2) Mg^{2+} イオンが存在している部位から外側に3箇所の空間が広がっている(図10)。これを埋めるように疎水性残基を配置する。3箇所の全ての空間を埋めるような化合物分子は、分子量が大きくなる可能性があるため、最小限の大きさで溝に当て填るようにする。結合親和性を高めるために、芳香族環などで π - π 相互作用を持つように工夫する必要がある。(3) Mg^{2+} イオンから図10で左側に伸びる疎水性領域は、かなり強い疎水傾向をもつので、親水的な官能器は一切、排除してよい。(4)中央の親水性部分(図中の橙色の円)が大きいため、薬剤の腸管吸収や膜透過性を考慮して、疎水性残基で、親水性部分を囲むようにする。

新規化合物の設計を行う際に、RNaseH阻害活性が認められるライブラリー化合物を組み合わせ、解析することも、RNaseHドメインの薬剤結合構造を調べる上で参考になる。例えば図11に示すように、RNaseH阻害の基幹となる共通構造の部分はそのままに、活性のある2つの化合物を組み合わせることで、新しい構造を作ることができる。このような方法で試しに24種類の構造を作成し

て、ドッキング計算を行った。図 11 にあるように 3 方向に側鎖が伸びている構造では、比較的安定に RNaseH ドメインの溝に当て填ることが確認できた。従って、RNaseH 阻害活性は、上記で述べたように、Mg²⁺イオンに配位結合できるように親水性残基を配置した上で、複数箇所以上に疎水性残基が伸びている構造が有望である。

有機合成実験において、RNaseH 阻害の基幹となる構造については正しく合成することができた。但しその合成収率は、著しく小さかった（1%以下）。その理由は図 12 に示すように一旦合成された生成物が、水分子あるいはアルコール分子等により分解を受けることが原因であると考えられる。特にアシル炭素原子の部分が、攻撃を受けやすいと推測される。今後、より疎水性の高い溶媒中で実験を行うなどの、効率的な反応経路の探索をする必要がある。

E. 結論

ドッキングソフトウェアを用いた親和性評価については、活性を有するものと、全く活性を示さないという 2 グループに分ける程度のスクリーニングは可能であった。Glide (シュレディンガー社) および Gold (ケンブリッジ結晶データセンター) という 2 種類のドッキングソフトウェアを使用した結果、両者で類似の結合構造が得られた。ここまでの研究段階で、活性を持つ基本骨格が判り、その結合構造も大よそ確認できたことで、今後の薬物設計の足掛りを得た。逆転写酵素の RNaseH ドメインへの化合物の結合方向は、化合物の側鎖疎水部分の大きさや向きなどにも依存してする。現在のヒット化合物は、まだ分子量が小さいので、さらに大きくすることが可能である。特に基本骨格から疎水性官能基を結合させるべき方向が判ってきたので、リード化合物の適切な

設計が可能である。有機合成については、最も基本となる骨格構造の生成には成功した。今後、計算機解析により設計した新規化合物の効率的な合成経路の構築を行うと同時に、温度・反応溶媒・反応時間などの条件を検討して、収率の高い合成方法を模索する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ode, H., Neya, S., Hata, M., Sugiura, W., Hoshino, T. : Computational Simulations of HIV-1 Proteases -Multi-drug Resistance Due to Nonactive Site Mutation L90M-, J. Am. Chem. Soc., 128, 7887-7895 (2006)
- Miyauchi, K., Curran, R., Matthews, E., Komano, J., Hoshino, T., Engelman, D. M., 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., 59, 77-84 (2006)

2. 学会発表

- 大出裕高, 松山翔, 畑晶之, 根矢三郎, 杉浦互, 星野忠次 「HIV-1 プロテアーゼ Non-active Site 変異による薬剤耐性の分子動力的機構解析」日本薬学会第 126 年会要旨集-2, 37 (2006) 仙台
- 成田友之, 横幕能行, 宮内浩典, 松田善衛, 松田昌和, 杉浦互, 根矢三郎, 星野忠次 「HIV-1 薬剤耐性評価における HIV-1 プロテアーゼ活性測定システムの構築」日本薬学会第 126 年会要旨集-3, 103 (2006) 仙台

- Ode, H., Matsuyama, S., Neya, S., Hata, M., Sugiura, W., Hoshino, T., “NFV-Resistant Mechanism due to Non-active Site Mutation N88S on Subtype AE HIV-1 PRs.”, 2006 Annual Meeting of CBI Society, Proceedings, 54 (2006) Tokyo, Japan.
- Fuji, H., Tatsumi, J., Komano, A., Hoshino, T., “Development of HIV-1 RNaseH inhibitor by Computer-Assisted Drug Design.”, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Program p.442, (2006) Okinawa, Japan.
- 藤秀義, 辰巳絢子, 駒野淳, 星野忠次 「HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNase H 活性阻害薬の開発 —in silico 解析による作用機序解析と最適化の試み—」第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 214 (2006) 東京
- 大出裕高, 松山 翔, 柿澤淳子, 杉浦 互, 星野忠次 「CRF01_AE HIV-1 における NFV 耐性変異 N88S の出現メカニズムに関する構造学的知見」第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 241 (2006) 東京
- 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 藤秀義, 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 54 回日本ウイルス学会学術集会 (2006) 東京

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

実績無し。

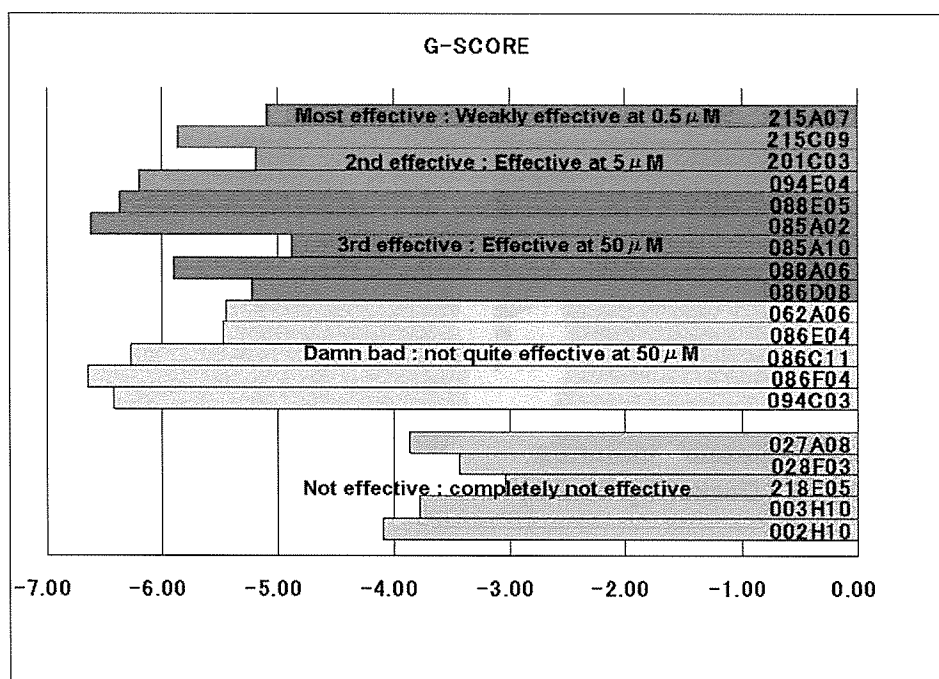


图 1

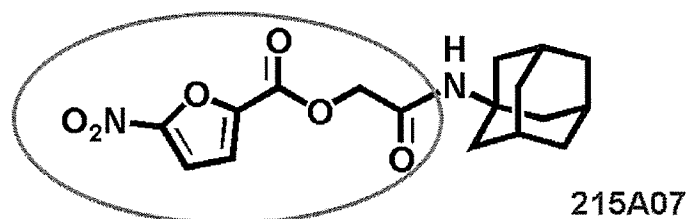
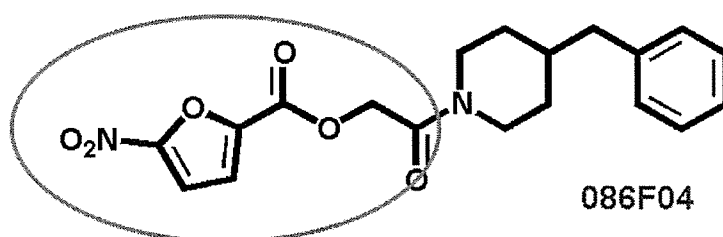
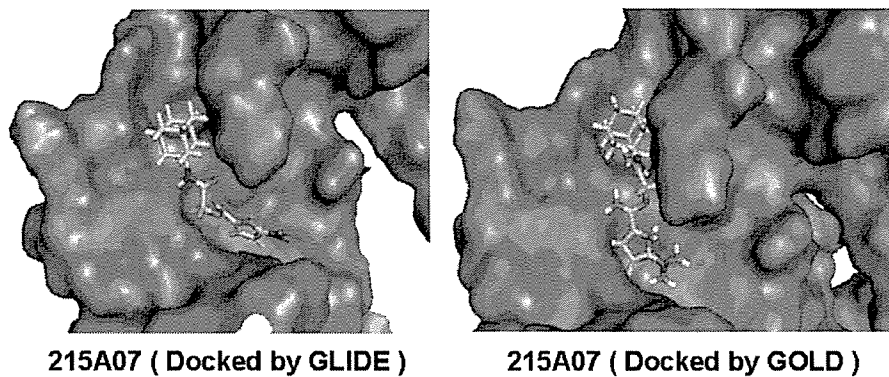
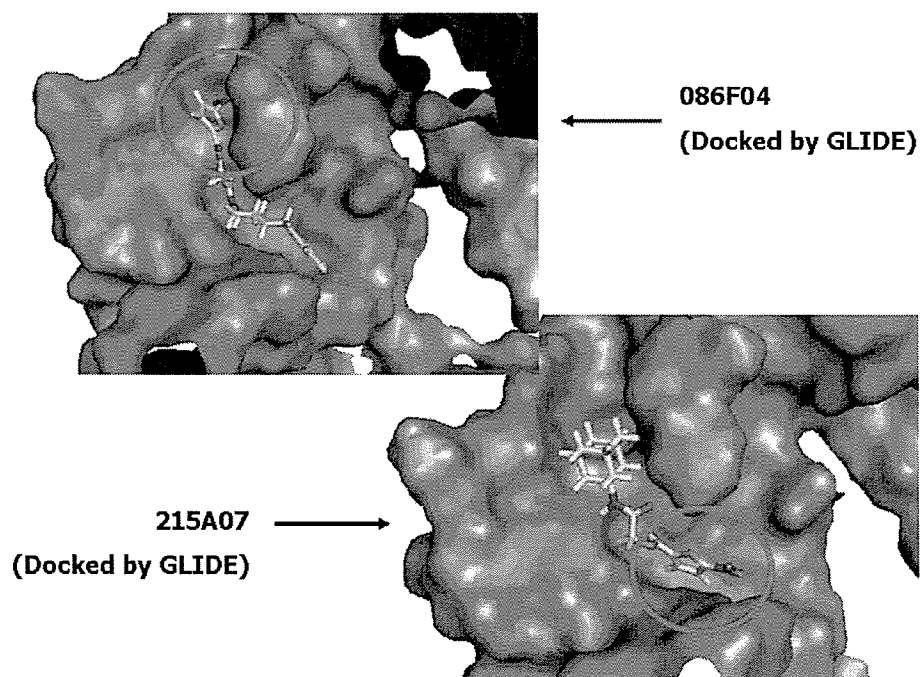


图 2



☒ 3



☒ 4

Reaction 1

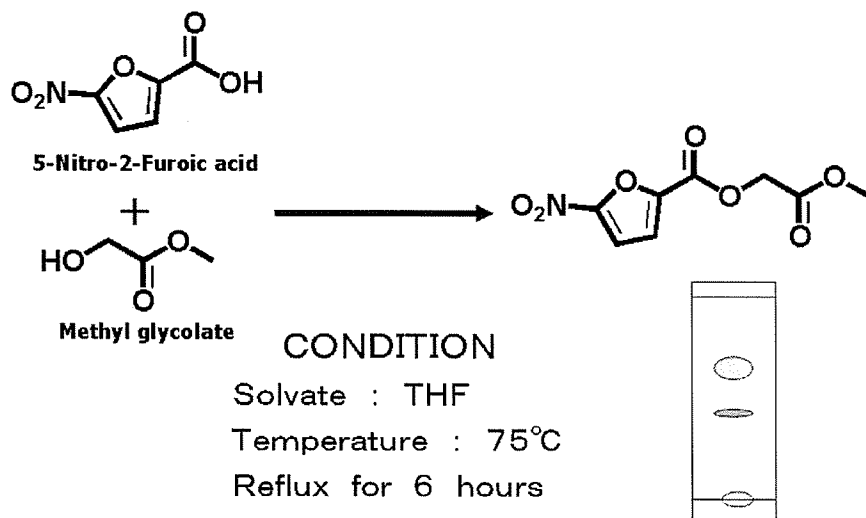


图 5

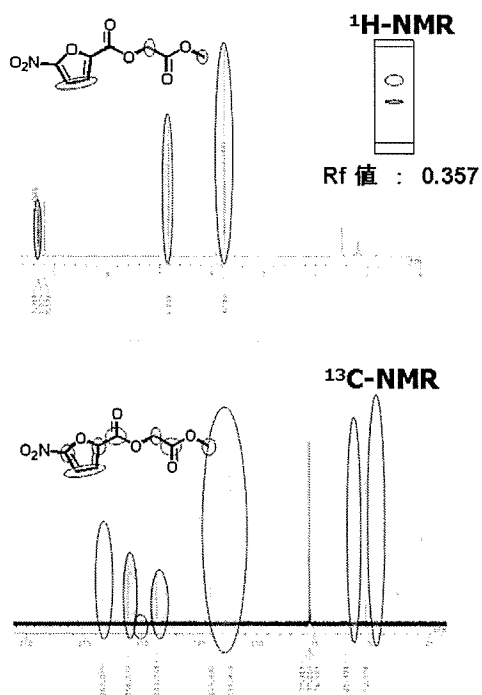


图 6

06/12/14 14:12:58

File: SK1 Date Run: 12-14-2006
Instrument: JEOL GCmate

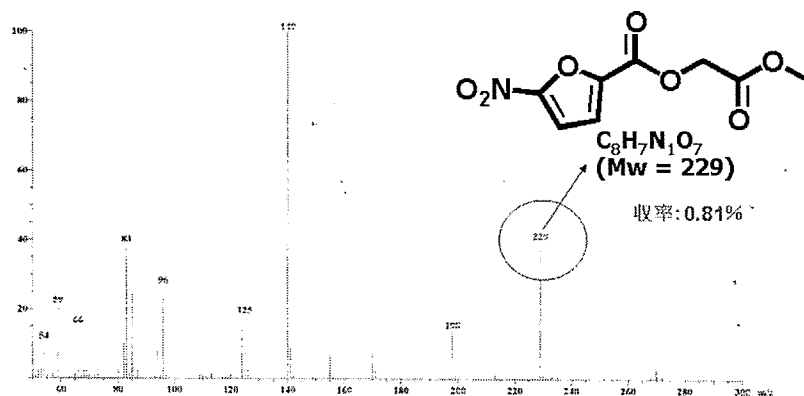
Time Run: 14:08:26
Inlet: Direct Probe

Sample: 215A07
Ionization mode: EI+

Scan: 4
Base: m/z 140; 70%FS TIC: 3440762 (Max Inten : 734394)

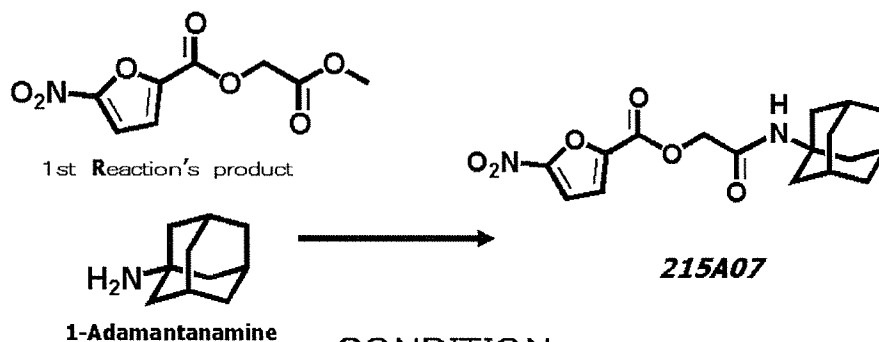
R.T.: 0:05.3

#Ions: 297



☒ 7

Reaction 2



1-Adamantanamine

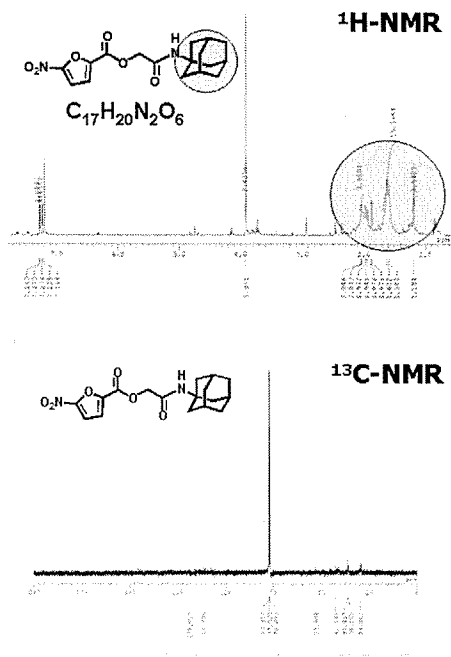
CONDITION

Solvate : DMF

Temperature : 170°C

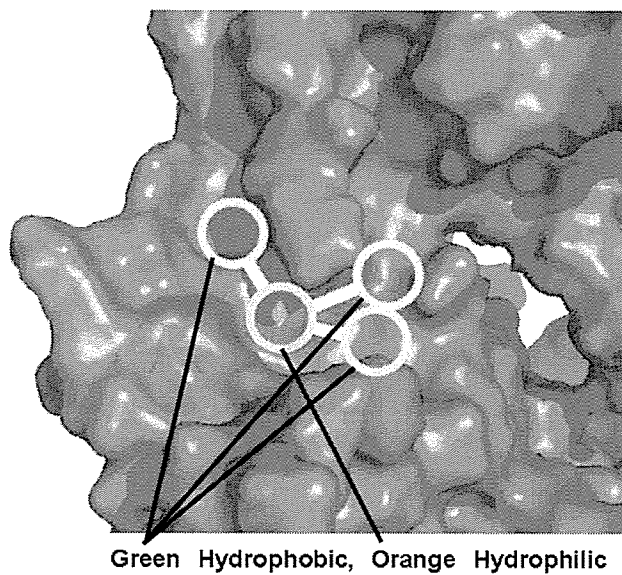
Reflux for overnight

☒ 8



☒ 9

Pharmacophore Model



☒ 10

新規化合物の探索

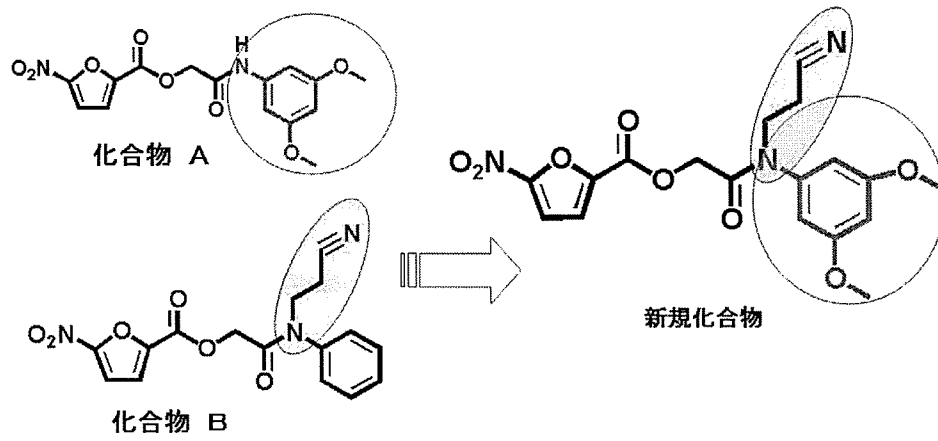


図 1 1

副生成物 生成機構

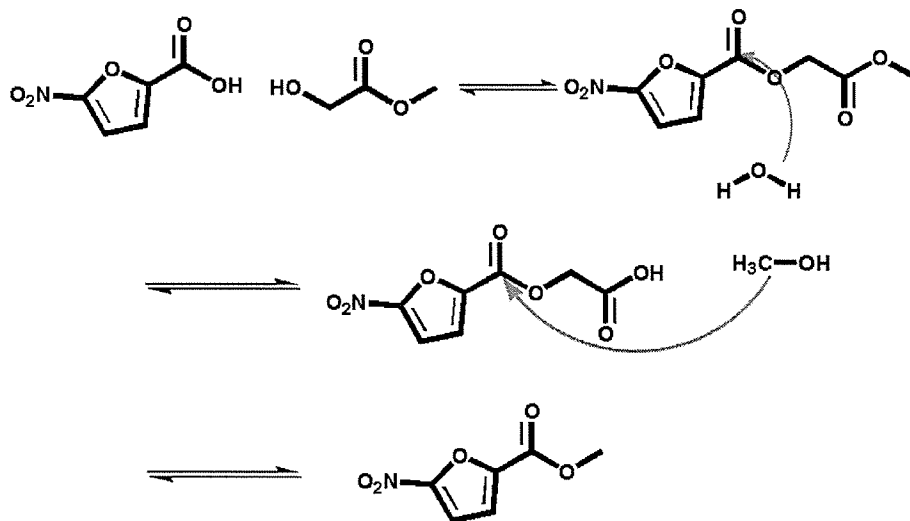


図 1 2

III. 平成18年度 業績一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者 駒野 淳

書籍:なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, <u>Komano J.</u>	Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex.	AIDS, In press	-	-	2007
Futahashi Y, <u>Komano J.</u> , 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 Science. In Press	-	-	2007
Futahashi Y, <u>Komano J.</u> , Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N.	Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin.	Antivir Chem Chemother	17(4)	167-174	2006
Miyauchi K, Curran R, Matthews E, <u>Komano J.</u> , 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	59(2)	77-84	2006

分担研究者 星野 忠治

書籍:なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ode, H., Neya, S., Hata, M., Sugiura, W., <u>Hoshino, T.</u>	Computational Simulations of HIV-1 Proteases -Multi-drug Resistance Due to Nonactive Site Mutation L90M-	J. Am. Chem. Soc.	128 (24)	7887-7895	2006
Miyauchi, K., Curran, R., Matthews, E., Komano, J., <u>Hoshino, T.</u> , Engelman, D. M., 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.	59 (2)	77-84	2006

**IV. 平成 1 8 年度 刊行物別刷
(抜粋)**

刊行物別刷解説

1. Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin (Miyauchi et al.)

小分子化合物の活性標的プロセスの詳細な分析の一例である。RNaseH 阻害剤が細胞内で確かに酵素阻害を介してウイルス複製抑制に働いているかを証明するための実験的な基礎を提供するものである。

2. Computational simulations of HIV-1 protease-Multi-drug resistance due to nonactive site mutation L90M (Ode et al.)

電算機解析による HIV-1 の遺伝子産物の構造機能関連を研究した一例である。解析手法はタンパク質局所のアミノ酸の熱力学動態と小分子化合物との相互作用の詳細なフィッティング解析に応用できるため、RNaseH 阻害剤開発の最適化段階、とくに分子設計とその妥当性を検討する際に貴重な情報を提供する。

Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin

Kosuke Miyauchi, Jun Komano*, Lay Myint, Yuko Futahashi, Emiko Urano, Zene Matsuda, Tomoko Chiba, Hideka Miura, Wataru Sugiura and Naoki Yamamoto

AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Toyama, Shinjuku, Tokyo, Japan

*Corresponding author: Tel: +81 3 5285 1111; Fax: +81 3 5285 5037; E-mail: ajkomano@nih.go.jp

Here we report that sparsomycin, a streptococcal metabolite, enhances the replication of HIV-1 in multiple human T cell lines at a concentration of 400 nM. In addition to wild-type HIV-1, sparsomycin also accelerated the replication of low-fitness, drug-resistant mutants carrying either D30N or L90M within HIV-1 protease, which are frequently found mutations in HIV-1-infected patients on highly active antiretroviral therapy (HAART). Of particular interest was that replication enhancement appeared profound when HIV-1 such as the L90M-carrying mutant displayed relatively slower replication kinetics. The presence of sparsomycin did not immediately select the fast-replicating HIV-1 mutants in culture. In addition, sparsomycin did not alter the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of anti-retroviral drugs directed against HIV-1 including nucleoside reverse transcriptase inhibitors

(lamivudine and stavudine), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (nevirapine) and protease inhibitors (nelfinavir, amprenavir and indinavir). The IC_{50} s of both zidovudine and lopinavir against multidrug resistant HIV-1 in the presence of sparsomycin were similar to those in the absence of sparsomycin. The frameshift reporter assay and Western blot analysis revealed that the replication-boosting effect was partly due to the sparsomycin's ability to increase the -1 frameshift efficiency required to produce the *Gag-Pol* transcript. In conclusion, the use of sparsomycin should be able to facilitate the drug resistance profiling of the clinical isolates and the study on the low-fitness viruses.

Keywords: drug resistant mutants, enhancement of replication, HIV-1, low-fitness mutants, sparsomycin

Introduction

Highly active antiretroviral therapy (HAART) has been successful in controlling the progression of AIDS caused by HIV-1. However, HAART has accelerated the emergence and spread of multidrug-resistant HIV-1. Once drug-resistant HIV-1 occurs in a HIV-1-infected patient, the success rate of HAART drops substantially. Resistance testing has been shown to be valuable to optimize HAART against HIV-1 infection (Hirsch *et al.*, 2000; Rodriguez-Rosado *et al.*, 1999). Profiling drug resistance might be necessary even before the initiation of HAART because of the spread of drug-resistant HIV-1 (Boden *et al.*, 1999; Gehringer *et al.*, 2000; Yerly *et al.*, 1999).

Genotypic and phenotypic resistance testing are the two major ways to determine the drug resistance of clinical HIV-1 isolates. For genotyping, the HIV-1 genome isolated from the infected individuals is sequenced. This HIV-1 genome is then cross-referenced with a database and we are able to predict the drug resistance profile of HIV-1. However, it is impossible to predict the phenotype

when we encounter a combination of mutations that has never been documented. This may raise a concern when a new drug is released in the market. Another problem in the genotyping is the presence of genotype-phenotype discordance (Parkin *et al.*, 2003; Sarmati *et al.*, 2002).

Alternatively, for the phenotypic resistance testing, the drug resistance profiles are measured by many biological/virological assay systems (Hertogs *et al.*, 1998; Iga *et al.*, 2002; Jarmy *et al.*, 2001; Kellam & Larder, 1994; Menzo *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 1999). Phenotypic resistance testing is powerful because the diagnosis is based on experimental observations. Among the systems, ones that depend on the multi-round HIV-1 replication seemed to provide the best drug resistance data reflecting the *in vivo* condition. However, many drug-resistant mutants have lower replication capabilities than wild-type (wt) HIV-1, which makes the phenotypic resistance testing difficult and time-consuming. In order to overcome these problems, it would be useful to develop a technique to make HIV-1

replicate faster without altering the effectiveness of antiretroviral compounds.

During our search for an inhibitor of HIV-1 replication, we found sparsomycin, a metabolite from *Streptomyces sparsogenes*, which reproducibly enhanced the replication of HIV-1. Therefore, we tested whether sparsomycin merits phenotypic drug resistance profiling studies on low-fitness HIV-1 isolates.

Materials and methods

Cells and viruses

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT, USA), penicillin and streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). H9, Jurkat, SupT1 and HPB-Ma cells were maintained in RPMI1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS, penicillin and streptomycin. All the cell lines were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. As previously described, HIV-1 (HXB2) was produced by transfecting proviral DNA into 293T cells and collecting the culture medium 3 days post-transfection (Komano *et al.*, 2004). The replication-incompetent HIV-1 (HXB2 Δ *vp*, Δ *rev*, Δ *env*, Δ *nef*) was produced by transfecting the proviral DNA carrying renilla luciferase with the *nef* open reading frame into 293T cells, along with the expression plasmid for *env*, *tat*, *rev* and *nef*(pIIIex) as described previously in Komano *et al.* (2004). As previously described, the D30N, L90M, and D25N protease mutants of HIV-1 were generated by the site-directed mutagenesis (Sugiura *et al.*, 2002). The multidrug-resistant HIV-1 DR3577 was a clinical isolate from a patient on HAART in which reverse transcriptase carried the following mutations M41L, D67N, K70R, V75M, K101Q, T215F and K219Q and protease carried the following mutations L10I, K20R, M36I, M46I, L63P, A71V, V82T, N88S and L90M. For the generation of replication-incompetent murine leukaemia virus (MLV) vector expressing firefly luciferase, pCMMP luciferase was transfecting into 293T cells along with *gag/pol* and VSV-G expressing plasmids as described previously (Komano *et al.*, 2004).

Chemical compound

Sparsomycin was either purchased from Sigma-Aldrich (cat. S1667) or obtained from Dr Nakajima (Toyama Prefectural University, Toyama, Japan). Sparsomycin was dissolved in 2mM dimethyl sulphoxide and stored at -20°C until use.

Monitoring HIV-1 replication

For HIV-1 infection, 1×10^6 cells were incubated with the culture supernatant containing approximately 10 ng of p24.

Alternatively, wt HIV-1, or D30N and L90M mutants were introduced into cells either by electroporation or DEAE-dextran-mediated protocol as previously described (Matsuda *et al.*, 1993; Miyauchi *et al.*, 2005). The culture supernatants were collected everytime the infected cells were split until they ceased to proliferate. The amount of p24 antigen of HIV-1 in the culture supernatants was quantified by using Retro TEK p24 antigen ELISA kit according to the manufacturer's protocol (Zepto Metrix, Buffalo, NY, USA). The signal was detected by Vmax ELISA reader (Molecular Devices, Palo Alto, CA, USA).

Determining 50% inhibitory concentrations (IC₅₀)

IC₅₀ was calculated by using a reporter cell line, MARBLE, developed by Sugiura *et al.* (personal communication). In brief, a clone of HPB-Ma carrying the long terminal repeat (LTR)-driven firefly luciferase cassette integrated in its genome was infected with HIV-1 and incubated in the presence of varying concentrations of antiretroviral compounds for a week. The cells were then lysed to measure the firefly luciferase activity, which represented the propagation of HIV-1 in culture. The firefly luciferase activity was normalized by constitutively-expressed renilla luciferase activity. The dual luciferase assay was performed according to the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI, USA). Chemiluminescence was detected by Lmax (Molecular Devices).

Reporter assay

The -1 frameshift reporters, pLuc (-1) and pLuc (0), were kindly provided by Dr Brakier-Gingras (Dulude *et al.*, 2002). The renilla luciferase expression vector pHRL/CMV was purchased from Promega. pLTR Luc encoded GFP-luciferase under the regulation of HIV-1's LTR promoter (Komano *et al.*, 2004). pLTR Δ *nef*Luc encoded renilla luciferase by substituting *nef* in the proviral context of HXB2 (Komano *et al.*, 2004). Plasmids were transfected into 293T cells by Lipofectamine 2000 plus reagent in accordance with the manufacturers' protocol (Invitrogen). For the detection of luciferase activities, the dual glo luciferase assay was performed at 2–3 days post-transfection or post-infection according to the manufacturers' protocol (Promega). The signal was detected by Vmax ELISA reader (Molecular Devices).

Western blot analysis

COS-7 cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or Fugen6 (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's protocol with proviral DNA encoding the D25N protease mutant. At 48 h post-transfection, cells were washed with PBS and lysed in a buffer containing 4% SDS, 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 12% 2-ME, 20% glycerol and bromophenol blue.

Samples were boiled for 10 min. Protein lysates approximately equivalent to 5×10^4 cells were separated in 5–20% SDS-PAGE (Perfect NT Gel, DRC, Tokyo, Japan), transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P^{8Q}, Millipore, Billerica, MA, USA), and blocked with 5% dried non-fat milk (Yuki-Jirushi, Tokyo, Japan) in PBS. For the primary antibody, we used rabbit anti-*Gag* polyclonal antibody or mouse anti-*Gag* monoclonal antibody. For the secondary antibody, either a biotinylated anti-rabbit antibody or a biotinylated anti-mouse goat antibody (GE Healthcare Bio-Science, Piscataway, NJ, USA) was used. For the tertiary probe, a horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (GE Healthcare Bio-Science) was used. Signals were developed by incubating blots with a chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (GE Healthcare Bio-Science) and detected by using Lumi-Imager F1 (Roche).

Results

The structure of sparsomycin, a metabolite from *Streptomyces sparsogenes*, is unique in that it comprises two unusual entities, a monooxidithioacetal moiety and a uracil acrylic acid moiety (Figure 1A). H9 cells were infected with HIV-1 and then maintained in the presence of varying concentrations of sparsomycin. Dimethyl sulphoxide was added in the absence of sparsomycin throughout this study. At 7 days post-infection, a massive syncytial formation was found in the presence of sparsomycin (Figure 1B). The higher the concentration of sparsomycin, the faster p24 accumulated in the culture supernatants (Figure 1C). Similar observations were made in Jurkat, SupT1 (Figures 1D and E), and HPB-Ma cells although the speed of p24 accumulation appeared different among the cell lines. On the other hand, sparsomycin did not show any detectable effect on the cell growth under concentrations of 500 nM.

These results could be due to sparsomycin's ability to either boost HIV-1 replication or select a mutant that replicated substantially faster than the wt HIV-1. To differentiate these possibilities, we recovered the virus-containing culture supernatants from the H9 cell culture at the peak of HIV-1 replication in the presence of 400 nM sparsomycin (asterisk in Figure 1F). Then fresh H9 cells were infected with the recovered virus, the cells were split into two samples and 400 nM of sparsomycin was added to each sample. If sparsomycin selected fast-growing mutants, the replication profiles of HIV-1 should resemble the original sample with sparsomycin (solid circle, Figure 1F) regardless of sparsomycin's presence. However, the replication profile in the presence of sparsomycin shifted leftward (Figure 1G), suggesting that it was unlikely that sparsomycin selected the fast-replicating viral mutants. Therefore, it is likely that sparsomycin boosted HIV-1 replication.

Replication-enhancing effects were also seen by using the chemically-synthesized derivatives of sparsomycin (unpublished data; Nakajima *et al.*, 2003). The replication-boosting effect levelled-out at 500 nM, an approximately 20-fold lower concentration than the 50% toxic dose (TD₅₀) of sparsomycin (Ash *et al.*, 1984).

To demonstrate the usefulness of sparsomycin in HIV-1 research, we have examined whether sparsomycin can also boost the replication of drug-resistant low-fitness isolates. The D30N and L90M are common drug-resistant mutations found within HIV-1 protease in HIV-1-infected patients on HAART (Devereux *et al.*, 2001; Kantor *et al.*, 2002; Pellegrin *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 2002). We introduced proviral DNA carrying the D30N or L90M mutation into H9, Jurkat, and SupT1 cells. HIV-1 replication was then monitored in the presence of 400 nM of sparsomycin. The replication of both viral mutants was substantially enhanced in the presence of sparsomycin in H9 cells (Figures 2A and B). The replication of the L90M-carrying mutant was also enhanced in Jurkat and SupT1 cells (Figures 2C and D). Of note, the replication enhancement appeared profound when HIV-1 displayed relatively slower replication kinetics (for example, the replication of D30N-carrying mutant versus the wt HIV-1 in H9 cells or the replication of HIV-1 in SupT1 versus H9 cells).

Considering the use of sparsomycin in the phenotypic resistance testing, it is critical to know whether sparsomycin affects HIV-1's sensitivity to the antiretroviral drugs. The respective IC₅₀ of representative antiretroviral drugs in the absence and the presence of 400 nM sparsomycin were as follows: reverse transcriptase inhibitors; lamivudine, 13.7 and 10.4 nM, and stavudine, 6.3 and 17.0 nM; a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, nevirapine, 78.2 and 146.4 nM; and protease inhibitors, nelfinavir, 2.8 and 1.0 nM, indinavir, 4.2 and 3.0 nM, and amprenavir, 3.4 and 3.3 nM. Then, we examined whether the presence of sparsomycin affected the IC₅₀ of both zidovudine (AZT) and lopinavir (LPV) against a multidrug-resistant HIV-1 isolate, DR3577. The magnitude of both AZT and LPV-resistance of DR3577 was in the order of 2 log (data not shown). The IC₅₀s of AZT in the presence and absence of 400 nM sparsomycin were 14.0 and 36.7 nM, respectively, and for LPV they were 103.1 and 78.9 nM, respectively. These data suggested that the presence of sparsomycin did not significantly influence the IC₅₀ of antiretroviral drugs on the replication of both wt and drug-resistant HIV-1.

Finally, we investigated the possible mechanisms that sparsomycin enhanced the replication of HIV-1 and its mutants although the estimated magnitude of enhancement per single replication cycle was small. To do this, we used non-T cells to increase the sensitivity of assays. First, we examined if the early phase of HIV-1's life cycle was