

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

武 部 豊

平成20（2008）年3月

厚生科学研究費補助金総括・分担研究報告書目次

I. 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 武部 豊	1 - 7
II. 分担研究報告書	
1. CD81 を標的とする低分子量 HCV エントリー阻害剤の同定とその解析 HIV-1 Vpr に対する拮抗薬の分裂酵母モデルを用いた検索 武部 豊	9 - 14 15 - 16
2. 高いゲノム多様性をもつウイルスの高度保存領域を標的とする至適 RNAi 分子の設計とその評価 程 久美子	17 - 21
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解析 駒野 淳	23 - 27
4. 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 高橋 信弘	29 - 30
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	31 - 34
6. 感染性 HIV-1 粒子形成に関与する宿主因子と MA を標的としたペプチド阻害剤に関する研究 村上 努	35 - 38
7. 酵母 Gag-Gag 相互作用系を阻害した低分子化合物の抗 HIV 活性 森川 裕子	39 - 43
8. 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	45 - 47
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49 - 52

I . 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）
程 久美子（東京大学大学院理学系研究科・准教授）
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）
岡田誠治（熊本大学エイズ学研究センター・教授）

研究要旨

多剤併用療法（HAART）はエイズ治療に多大の福音をもたらしているが、副作用による治療中断や薬剤耐性ウイルスの出現の問題に加えて、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対する治療が大きな問題になりつつある。われわれは、エイズに加え、関連する重篤なウイルス疾患に対する治療薬シーズ・新規治療標的の探索を目指して研究・開発を進めた。

HIV-1 に対する新しい治療標的に対する様々なシーズ化合物が同定する試みを行い、現在までに次の成果を得た。1) 酵母を用いたアッセイ系によって Gag-gag 多量体形成を阻害するシーズ化合物 172A6 を同定した（森川班員）。2) HIV-1 Vpr が分裂酵母の増殖を強く抑制される現象を用いて、拮抗物質 2 種（YAM1, YAM2）を同定した（増田協力班員）。3) 合胞体形成阻害を指標とすることで submicromolar の EC50 をもつ化合物を同定した（駒野班員）。4) 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、阻害活性物質 2C を同定した（岡田班員）。現在、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、解析が進行中である。またプロテオミックスの手法を用いることによって、ウイルスタンパク質と相互作用する宿主因子の探索を進め、Rev 結合タンパク質 SF2p32 が核小体内で FIB および NNPI と機能的に関連している可能性を示した（高橋班員）。また HIV-1 Env のウイルス粒子への取り込みに関与する因子として報告されている TIP47 の機能の検証を行った（村上班員）。

一方、エイズ関連疾患として重要な HCV に対する創薬シーズ探索を進めた結果、これまでに類例を見ない HCV のエントリー段階を阻害する低分子化合物（化合物 A）を同定した。さらに Molecular docking の手法を用いた解析の結果、非常に興味深いことに、化合物 A の標的が HCV 受容体の一つと考えられる CD81 分子そのものである可能性が明らかとなった（武部班員）。予測される CD81 と阻害剤の複合体分子モデルを手掛かりとして、現在構造活性相関解析、最適化作業が進行中である。また、エイズ関連感染症として重要な EBV の EBNA-1 タンパク質の oriP への結合阻害活性をもつ化合物の探索を行い、いくつかの候補化合物を同定した（山越班員）。

また本研究班の第 3 の柱である核酸創薬に向けた基盤的解析手法として、遺伝学的多様性の高い病原体ゲノム中での保存領域を特定し、それらの領域を標的とする siRNA の設計プログラムの開発を行い、その有効性を評価した。その結果、評価した siRNA の多くが高い RNA 干渉効果を示し、本研究で構築された siRNA 設計法の有効性が確認された。本結果に基づき、ウイルスゲノム配列内で保存度が高く、高い RNA 干渉効果をもち、且つ off-target 効果（副作用）の少ない siRNA を設計する Web server siVirus (<http://siVirus.RNAi.jp/>) を出版・公開した（程班員）。

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である。

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) 抗 HIV 阻害剤探索：

2万種の化合物ライブラリーを用い、それぞれ1) HIV 増殖アッセイ系（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（森川班員）、3) HIV-1 Vpr が分裂酵母の増殖を強く抑制される性質を用いた、Vpr 拮抗薬の検索系（増田協力班員）4) 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抗体nef化合物スクリーニング系（岡田班員）を用いて、それぞれ求める性質をもつ阻害剤を探索し、その作用機構を解析した。

(2) 抗 HCV 阻害剤探索：

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、阻害剤の作用メカニズムをレプリコン・アッセイ、Time of addition 実験、HCV pseudoparticle (HCVpp) アッセイによって解析した（武部班員）。

(3) 抗 EBV 阻害剤探索：

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）

(4) プロテオミックスの手法を用いた新規治療標的の探索：

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因子 TIP47 の機能の再評価を行った（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（高橋班員）の探索を行った。

(5) 高いゲノム多様性をもつウイルスゲノムを標的とする至適 siRNA 設計とその評価：

HIV-1, HCV 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（程班員）。

（倫理面への配慮）

該当事項なし

C. 研究結果

(1) 抗 HIV 阻害剤探索：

1) 2万種の化合物ライブラリーから、IC50 が 0.1 μ 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、また様々なクレードの HIV-1 株、既存の薬剤耐性ウイルスに有効であった（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（172A6）を見出した。IC50 は 25-50 μ M、細胞毒性は低く、粒子形成を濃度依存性に阻害した（森川班員）。3) HIV-1 Vpr が分裂酵母の増殖を抑制する性質を利用した Vpr 拮抗薬の検

索系を構築し、この系を用いて Vpr の細胞増殖抑制能に対する拮抗物質 2 種を同定した（増田協力研究員）。4) 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、阻害活性物質 2C を同定した（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。

(2) HCV 阻害剤探索：

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 種の阻害剤を同定した。中でも最も良好な活性を示す化合物 A (EC50=70nM; CC50=35 μ M) は、レプリコン・アッセイ（post-entry の細胞内増殖過程を標的とする阻害剤の高効率な探索を可能とするが、感染初期過程、アッセンブリー以降の最後期過程を標的とする阻害剤は同定・評価できない）では活性を示さなかった。また Time of addition 実験の結果、その作用点が感染の極初期過程にあること、HCV pseudoparticle (HCVpp) の感染を阻害することから、HCV のエンタリー過程を標的とする阻害剤であることが強く示唆された。さらに興味深いことに、docking simulation によって化合物 A は、HCV 受容体の一つである CD81 と直接的な相互作用をもつ可能性が示唆された（武部班員）。

(3) 抗 EBV 阻害剤探索：

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 ELISA 系を確立し、化合物スクリーニングを行い、いくつかの化合物（多くは核酸に対する intercalator と考えられる）を同定した（山越班員）。

(4) プロテオミックスの手法を用いた新規治療標的の探索：

プロテオミックスを用いた解析手法によって、1) HIV-1 Env のウイルス粒子への取り込みに関与する因子として報告されている TIP47 の機能を検証し、その結果、Env 取り込み量の上昇は細胞内 Env レベルの増加によるものであって、報告が必ずしも追試できないことを示した（村上班員）。2) HIV-1 Rev タンパク質は核小体に局在するが、Rev 結合タンパク質 SF2p32 の核小体内で相互作用する宿主タンパク質として FIB および NNPI を同定し、それらが機能的に関連している可能性を示した（高橋班員）。

(5) 高いゲノム多様性をもつウイルスゲノムを標的とする至適 siRNA 設計とその評価：

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を特定し、それらの領域を標的とする siRNA の設計を行い、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、本研究で構築された siRNA 設計法の有効性が確認された。本結果に基づき、ウイルスゲノム配列内で保存度が高く、高い RNA 干渉効果をもち、且つ off-target 効果（副作用）の少ない siRNA を設計する Web server siVirus (<http://siVirus.RNAi.jp/>) を公開した（程班員）。

D. 考察

(1) 従来 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候補が同定された。しかし、その多くは高濃度でしか有効でなく、細胞毒性が出現する濃度との差が狭く、最適化あるいはさらなる探索が必要と考えられる。

(2) HAART 療法が確立した現在、エイズに関連する他の疾患による死亡率が上昇している。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、細胞内複製過程を標的とする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った。このアッセイ系を利用することによって同定された新規の HCV エントリー阻害剤は、その分子標的が HCV のエントリー受容体 CD81 そのものである可能性が強く示唆されており、注目される。HCV に対する新しいクラスの阻害剤開発の出発点となるだけでなく、HCV のエントリーメカニズムを解明する大きな糸口となる可能性が期待される。

(4) プロテオミッ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、今後の研究の展開が期待される。

E. 結論

ウイルスタンパク質の性質を利用した新規阻害剤スクリーニング系の開発と、それによるスクリーニングによって、エイズおよびエイズ関連疾患に対するいくつかのシーズ化合物が同定された。特に、これまでに類例のない HCV エントリー受容体 CD81 を直接の分子標的とする新規の HCV エントリー阻害剤の同定は特記すべき成果と考えられる。

F. 健康危険情報

本研究に関連して、該当事項なし

G. 研究発表 (2007-2008)

主任研究者

武部 豊

1. 論文発表

1. Takebe, Y., Uenishi, R., and Li, X.-J. Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (ed. Kuan Teh Jeang). *Advances in Pharmacology* vol. 56: 1-25, 2008.
2. Tee, K. K., Pybus, OG., Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X.-J., and Takebe, Y. Chronology of the HIV-1 CRF07_BC expansion in East-Asia. *AIDS* 22: 156-158, 2007.

3. Li, X.-J., Uenishi, R., Hase, S., Liao, H., Tee, K. K., Kusagawa, S., and Takebe, Y. HIV/AIDS in Asia: The shape of epidemics and their molecular epidemiology. *Virologica Sinica* 22(6): 426-433, 2007.
4. Han, X., Zhang, M., Dai, D., Wang, Y., Zhang, Z., Liu, J., Geng, W., Jiang, Y., Takebe, Y., and Shang, H. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV/AIDS patients living in Liaoning Province, China: baseline prevalence and subtype-specific difference. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23(3): 357-364, 2007.
5. Utsumi, T., Nagakawa, H., Uenishi, R., Kusagawa, S., and Takebe, Y. An HIV-2-infected Japanese man who was a long-term nonprogressor for 36 years. *AIDS* 21(13): 1834-1835, 2007.
6. Naito, Y., Nohtomi, K., Onogi, T., Uenishi, R., Ui-Tei, K., Saigo, K., and Takebe, Y. Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology*. 4(1): 80, 2007.
7. Shimizu, S., Urano, E., Futahashi, Y., Miyauchi, K., Isogai, M., Matsuda, Z., Notomi, K., Onogi, T., Takebe, Y., Yamamoto, N., and Komano, J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS* 21: 575-582, 2007.
8. Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. 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, 2006.
9. Murakami, Y., Yamagoe, S. Noguchi, K., Takebe, Y., Uehara, Y. and 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(38): 28113-28121, 2006.
10. Takebe, Y. and Telesnitsky, A. Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate *via* human sequence transduction. *Virology* 351: 1-6, 2006.
11. Naito, Y., Ui-Tei, K., Nishikawa, T., Takebe, Y., Saigo, K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl. Acid Res.* (Web Server issue) **W448-W450**, 2006.
12. 長谷彩希、草川茂、武部豊. 逆転写酵素活性測定法- ³²P を用いた免疫不全ウイルス (HIV) のウイルス学的研究技術. 秀潤社: 細胞工学別冊 RI の逆襲; アイソトープを活用した簡単・安全バイオ実験. 127-131, 2007.
13. 武部豊. HIV サブタイプと感染経路. 治療. **88(12): 2843-2851**, 2006.

2. 学会発表 (2007-2008)

1. Isogai, M., Uenishi, R., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new

- class of HCV inhibitors targeting to the entry or late stages in HCV replication cycle using newly developed JFH-1-based infectivity/ replication assay. HCV 2007 (Sept.9-13, 2007, Glasgow, UK).
2. Takebe, Y. Identification of novel antiviral small molecule compounds that are likely to block early processes in HCV replication cycle. 2nd Hepatitis C, resistance and new compounds workshop (Oct 31-Nov 1, 2007, Boston)
 3. Uenishi, R., Nohtomi, K., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., and Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new class of HCV inhibitors using newly developed JFH-1-based infectivity/ replication assay. 第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム (Sept.1-5, 2007, 淡路島)
 4. 武部豊、上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆字. 感染性 HCV クローン JFH-1 を用いた感染・増殖アッセイに基づくスクリーニングによる新規標的をもつ HCV 阻害剤の同定とその解析. 第55回日本ウイルス学会 (2007.10.20-23, 札幌)
 5. 上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、鈴木亮介、脇田隆字、武部豊. 新規阻害剤探索のための HCV 感染・増殖アッセイ系の樹立とその評価. 第55回日本ウイルス学会学術集会総会 (2007.10.20-23, 札幌)

分担研究者
程久美子

- 1) Ui-Tei, K., Naito, Y., Zenno, S., Nishi, K., Yamato, K., Takahashi, F., Juni, A., Saigo, K. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res.* In press.
- 2) Naito, Y., Saigo, K., Ui-Tei, K. Evaluation of published rational siRNA design algorithms using firefly luciferase gene as a reporter. *RNA interference research progress.* In press.
- 3) Naito, Y., Nohtomi, K., Onogi, T., Uenishi, R., Ui-Tei, K., Saigo, K., and Takebe, Y. (2007). Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology*. **4(1)**: 80.

2.学会発表

- 1) 内藤雄樹、納富香子、小野木利成、程久美子、西郷薫、武部豊。「高いゲノム多様性をもつウイルスに効果的な siRNA の設計」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会合同大会 4p-1126.(2007). 横浜

駒野 淳

1.論文発表

- 1) Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. (in submission)
- 2) Akihiko Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi Soeda, Shinichiro Hattori, Kilian Perrem, Mikio Yamamoto, Joh Chiba, Jun-ichi Mimaya, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, Mitsuo Honda, Akihiko Yoshimura, Ichiro Aoki, Yuko Morikawa and Naoki Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. (PNAS, in press)
- 3) Matsuda Z, Iga M, Miyauchi K, Komano J, Morishita K, Okayama A, Tsubouchi H. In vitro translation to study HIV protease activity. *Methods Mol Biol.* **375**: 135-49. 2007. Review.
- 4) Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnopat P, Dhepakson P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Tokunaga K, Sato H, Komano J, Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Ikuta K. Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 3; **359(3)**:729-34, 2007.
- 5) 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 negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS.* Mar 12; **21(5)**:575-82, 2007.
- 6) 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.* Mar; **98(3)**:373-9, 2007.
- 7) Murakami T, Gottlinger H, Morikawa Y, Komano J, Ryo A, Sato H. Regulation of Gag trafficking and functions (Review) *The Journal of AIDS Research.* **9(2)**; 102-107, 2007.

2.学会発表 (抜粋)

海外

- 1) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Upregulating expression of cyclin K/CPR4 limits the replication of HIV-1. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 2) Toru Aoki, Saki Shimizu, Urano Emiko, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. RERouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV gag by replacing myristoylation signal with membrane proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 3) Kei Miyagawa, Tsutomu Murakami, Yuki Ohsaki, Jun Komano, Toyoshi Fujimoto and Naoki Yamamoto. Analysis of interaction between HIV-1 Gag and tip47 and its associated proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor,

NY (poster)

- 4) Kosuke Miyachi, Rachael Curran, Erin Matthews, Jun Komano, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, Donald M Engelman, and Zene Matsuda. the specific phase of membrane-spanning helix of hiv-1 gp41 is critical for intracellular transport of env. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
 - 5) Jun Komano, Characterization of neutralizing antibodies purified from Japanese LTNP hemophiliacs, US-Japan Cooperative Medical Science Program 20th Joint Meeting of the AIDS Panels September 13-14, 2007 & NHPM2007 Presentation at AIDS Panel: Sept 14, 2007, Monterey, CA
- 国内
- 1) 藤秀義、辰巳絢子、栗田明宙、駒野淳、星野忠次：コンピュータ支援による HIV-1 治療薬の開発。レトロウイルス研究会夏期セミナー2007 プログラム 2007 年
 - 2) 濱武牧子、駒野淳、浦野恵美子、巖馬華、中原徹、堤浩、宮内浩典、森川裕子、玉村啓和、杉浦互、山本直樹。HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する 6 アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性。熊本エイズセミナー 2007 年、熊本
 - 3) 駒野淳、浦野恵美子、巖馬華、中原徹、堤浩、濱武牧子、宮内浩典、森川裕子、玉村啓和、杉浦互、山本直樹。HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する 6 アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性。第 5 5 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年、札幌
 - 4) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Cyclin K/CPR4 による HIV-1 複製抑制とそのメカニズムの解析。第 5 5 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年、札幌
 - 5) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto and Jun Komano. Gag タンパク質の形質膜輸送シグナルがミリストイル化であることのウイルス学的意義について。第 2 1 回日本エイズ学会学術集会, 2 0 0 7 年、広島
 - 6) 浦野恵美子、奥長造之、森川裕子、駒野淳。Co-chaperone タンパク質 DNA J/HSP40 family による HIV-1 複製抑制。BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年、横浜
 - 7) 濱武牧子、二橋悠子、青木徹、山本直樹、駒野淳。Biophysical analysis of homotypic interaction facets that mediate the clustering of the G-protein-coupled receptor CXCR4 in the absence of SDF-1alpha. BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年、横浜
 - 8) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto and Jun Komano. 非ミリストイル化 Gag を用いたレトロウイルス Gag の Vps 輸送経路を通過することによる影響およびそのウイ

ルス学的意義。BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年、横浜

高橋 信弘

1. 論文発表

- 1) Takahashi, N., and Isobe, T. (2007) Proteomic Biology using LC-MS, Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey USA, p1-254.
- 2) Kaji, H., Kamiie, J., Kawakami, H., Kido, K., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, T., Takahashi, N., and Isobe, T. (2007) Large-scale analysis of N-glycoproteins in *C. elegans* suggests atypical translocation mechanism of type III integral membrane proteins. Mol. Cell. Proteomics, in press
- 3) 高橋信弘、藤山沙理、千葉一裕 (2007) アフィニティークロマトグラフィー法、分子間相互作用解析ハンドブック、羊土社、p45-52.

2. 学会発表

- 1) 32th FEBS Congress, Vienna Austria, 2007.7/7-12 3件発表
- 2) 5th JHUPO Conference、東京、2007.7/30-31 招待講演他3件発表

山越 智

- 1) Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Takahashi N, Yamagoe S, Uehara Y. g-Herpesviruses and cellular signaling in AIDS-associated malignancies. *Cancer Sci.* 98:1288-1296, 2007.

2. 学会発表

- 1) 村上裕子、山越智、鈴木哲郎、脇田隆字深澤秀輔：培養細胞をもちいた C 型肝炎ウイルス(HCV)の阻害剤のスクリーニング。第 55 回日本ウイルス学会学術集会

村上 努

- 1) T. Murakami, and N. Yamamoto. AIDS: How do we overcome this social or biodisaster? The Journal of Disaster Research 2 (2): 71-80, 2007
- 2) T. Murakami. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle. Microbiol. Immunol. In press.

2. 学会発表

- 1) K. Miyakawa, T. Murakami, Y. Ohsaki, J. Komano, T. Fujimoto, and N. Yamamoto. Analysis of interaction between HIV-1 Gag and TIP47, and its associated proteins. May 22-27 2007, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.
- 2) T. Aoki, S. Shimizu, U. Emiko, Y. Futahashi, M. Hamatake, K. Terashima, T. Murakami, N. Yamamoto and J. Komano. Rerouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV Gag by replacing myristoylation signal with membrane proteins. May 22-27 2007, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.

- 3) K. Miyachi, R. Curran, E. Matthews, J. Komano, T. Murakami, N. Yamamoto, D. M. Engelman, Z. Mastuda The specific phase of membrane-spanning helix of HIV-1 gp41 is critical for intracellular transport of Env. May 22-27 2007, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.
- 4) 齊曉華、齊藤達哉、山口一成、内藤誠之郎、吉仲由之、山本典生、村上努、山岡昇司、山本直樹。Fucoidan activates HIV-1 replication in latently infected cells. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28-30日
- 5) 青木徹、清水佐紀、浦野恵美子、二橋悠子、濱武牧子、玉村啓和、寺島一夫、村上努、山本直樹、駒野淳。Gagタンパク質の形質膜輸送シグナルがミリストイル化であることのウイルス学的意義について第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28-30日
- 6) 青木徹、清水佐紀、浦野恵美子、二橋悠子、濱武牧子、玉村啓和、寺島一夫、村上努、山本直樹、駒野淳。レトロウイルスGag細胞膜のVps依存的ルート変換がもたらすウイルス複製後期過程におけるGag機能への影響:Gagミリストイル化のウイルス学的意義 第30回日本分子生物学会年会、横浜、2008年12月11-15日

森川 裕子

1. Y. Morikawa, T. Goto, D. Yasuoka, F. Momose, & T. Matano. Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 81: 9911-9921 (2007)
2. F. Momose, Y. Kikuchi, K. Komase, & Y. Morikawa Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect.* 9: 1422-1433 (2007)
3. A. Ryo, N. Tsurutani, K. Ohba, R. Kimura, J. Komano, M. Nishi, H. Soeda, S. Hattori, K. Perrem, M. Yamamoto, J. Chiba, J. Mimaya, K. Yoshimura, S. Matsushita, M. Honda, A. Yoshimura, T. Sawasaki, I. Aoki, Y. Morikawa, & N. Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 294-299 (2008)
4. 森川裕子、鶴谷直美 HIVの粒子形成と成熟機構 蛋白質核酸酵素 52: 1181-1186 (2007)

学会発表

1. E. Urano, S. Shimizu, M. Hamatake, Y. Morikawa, & J. Komano. Upregulating expression of cyclin K/CPR4 limits the replication of HIV-1. CSH Meeting, 2007年、米国
2. 浦野恵美子、清水佐紀、濱武牧子、森川裕子、高橋直子、深澤秀輔、山本直樹、駒野淳 Cyclin K/CPR4によるHIV-1複製抑制とそのメカニズムの解析 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
3. 大倉喬、菊池雄士、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子 H5N1型高病原性トリインフルエンザウイル

スHAに結合する中和モノクローナル抗体のエピトープ解析 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌

4. 駒野淳、浦野恵美子、巖馬華、中原徹、堤浩、宮内浩典、森川裕子、玉村啓和、杉浦互、山本直樹 HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する6アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
5. 須山真理、佐野浩二、森川裕子 HIV潜伏感染細胞からのウイルス産生機構 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
6. 富田有里子、櫻木小百合、森川裕子、河岡義裕 Gag出芽機構に関与する宿主因子の網羅的解析-出芽酵母を利用した遺伝学的アプローチ 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
7. 原口日和、森川裕子 HIV-1 Gag-Pol蛋白の細胞内輸送 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
8. 百瀬文隆、菊池雄士、駒瀬勝啓、森川裕子 新規抗インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体によるRNP複合体の可視化 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
9. 水越文徳、山本拓也、立川(川名)愛、岩本愛吉、森川裕子、横田(恒次)恭子 抗原の糖鎖による樹状細胞のcross-presentationの影響 第21回日本エイズ学会、2007年、広島
10. 大倉喬、菊池雄二、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子 高病原性H5N1トリインフルエンザウイルスHAに結合する中和モノクローナル抗体のエピトープ解析とscFvの作製 第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜
11. 奥長浩之、鶴谷直美、森川裕子 エンドソーム分子HRSによるヒト免疫不全ウイルスのGag輸送制御機能の解析 第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜
12. Komano Jun、浦野恵美子、奥長浩之、森川裕子 Co-chaperonineタンパク質DNA J/HSP40 familyによるHIV-1複製抑制 第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜
13. 原口日和、森川裕子 ヒト免疫不全ウイルスGag-Pol蛋白の細胞内輸送制御機構 第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜
15. 百瀬文隆、菊池雄士、駒瀬勝啓、森川裕子 微小管依存的なインフルエンザウイルス子孫vRNP複合体輸送の可視化 第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜

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* 212(2):519-525, 2007
- 2) Hiyoshi M*, Suzu S*, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, and Okada S; Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111(1):52-58, 2008

(*Equal contribution)

2. 学会発表

- 1) 鈴 伸也、日吉真照、吉富友香、元吉和夫、岡田誠治. Src キナーゼ Hck による M-CSF レセプター輸送・成熟過程の負の制御. 第 69 回日本血液学会総会、2007 年 10 月 11-13 日、横浜
- 2) 日吉真照、鈴 伸也、吉富友香、原田英樹、岡田誠治. HIV Nef の宿主細胞内チロシンキナーゼに対する影響. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月 21-23 日、札幌
- 3) 吉富友香、鈴 伸也、日吉真照、岡田誠治. HIV-1 Nef タンパク質のゴルジ体における機能. 第 21 回日本エイズ学会学術集会総会、2007 年 11 月 28 日—11 月 30 日、広島

H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2008)

1. 特許取得・出願

武部 豊

- 1) 「HCV 阻害剤」(出願準備中)
- 2) 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願 2008-33598、平成 20 (2008) 年 2 月 14 日出願)
- 3) 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767、平成 19 年 6 月 13 日出願)
- 4) 「C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害剤」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日) [PCT 出願: PCT/JP2008/51086 (Jan 25, 2008)]
- 5) 「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)
- 6) 「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)
- 7) 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-08741、平成 17 年 1 月 17 日出願)

Ⅱ. 分担研究報告書

CD81 を標的とする低分子量 HCV エントリー阻害剤の同定とその解析

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、長谷彩希、Liao Huanan、磯貝まや、納富香子

（国立感染症研エイズ研究センター）

袴田 航（日本大学資源科学科）

脇田隆宇、鈴木哲朗（国立感染症研ウイルス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 (JFH-1) に基づく HCV 感染/増殖アッセイ(HCV infectivity assay)を樹立し、低分子化合物ライブラリー(約 10,000 化合物)を用いた阻害剤スクリーニングを行った。その結果、良好な HCV 阻害プロファイル (EC50≈70 nM, CC50≈35 μM, Selective index≈500) を示す化合物 A (分子量約 380) を同定した。化合物 A は、HCV infectivity assay では活性を示すにも拘わらず、レプリコン・アッセイによっては活性が認められないこと、HCV 感染直後に薬剤を添加しない限り、抗 HCV 作用が発揮されないこと。HCV pseudoparticle (HCVpp) の感染を阻害することから、HCV エントリー (感染の初期過程) を阻害する可能性が強く示唆された。また molecular docking study によって、HCV 受容体の一つと考えられている CD81 の HCV エンベロープ E2 結合ドメインである Long external loop (LEL) 表面のポケットに、良好な親和性をもって、結合しうることが推測され、化合物 A の分子標的が CD81 そのものである可能性が明らかとなった。現在、これを作業仮説として化合物 A の作用メカニズムの解明と、創薬展開に向けた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 などの他のウイルス感染症による重篤な肝疾患や悪性リンパ腫など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。また、一方目をアジアに向けると、注射薬物乱用者 (IDU)や供血に伴う感染者 (非衛生的な血液採取に伴い中国の特に内陸部において90年代初めから半ばにかけ数十万人規模で感染者が発生した) など経血液的なルートでの HIV 感染者では、非常に高い HCV 共感染率があり、HAART の普及につれ、HCV による肝障害が、アジアの開発途上国において、エイズ患者治療を考える上で、非常に大きな問題となると推測される。

現在、HCV による肝疾患に対する標準療法 (SOC)はインターフェロンとリバビリンの併用療法であるが、半数以下の感染者にしか有効でないこと、特に我が国に多い genotype 1b で治療困難例が多いこと、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。

現在、様々な NS3/NS4A プロテアーゼ阻害剤や NS5B ポリメラーゼ阻害剤が開発中であり、臨床治験においても、血中 HCV ウイルス量の強力な抑制効果が示されているが、変異ウイルスが急速に出現することが問題となっている。エイズに対する HAART 治療と同様、作用標的の異なる複数の薬剤の併用療法が現実的な方向となるものと考えられている。

これまで、HCV 阻害剤スクリーニングやその薬効評価には部分ゲノムあるいは全ゲノムを用

いたレプリコン・アッセイが用いられてきたが、レプリコン・アッセイによっては、エントリーなどの感染初期過程や、ウイルス粒子のアッセブリー以降、粒子放出までの感染後期過程の阻害剤の検出はできないという理論的問題があった(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進め、その結果、HCV エントリーを標的とする推定される新規阻害剤の同定に成功した。本研究は、その作用機構の詳細を明らかにしようとするものである。

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した。

(2) 阻害剤スクリーニング法 (図 2)

(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 uM) 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、抗ウイルス効果を評価した。併行して、WST アッセイを用いて、試験化合物の細胞毒性を評価した。アッセイの陽性対照としては、インターフェロン α (5, 50 u/ml)を用いた。

(3) HCV pseudoparticle assay:

レトロウイルスベクターを用いた系を利用した。HIV-1 gag 発現ベクターとパッケージング・シグナルをもつ Luciferase 発現プラスミド、および HCV E1/E2 発現プラスミドあるいはコントロールとして VSV-G 発現プラスミド、HCV D E1/E2 発現プラスミドのトリプルトランスフェクションによって、それぞれ HCVpp, VSV-Gpp, HCV D E1/E2pp の 3 種の pseudoparticle を調製。阻害剤存在下、非存在下での各 pseudoparticle の Huh7.5.1

細胞への感染性をルシフェラーゼ活性で測定した。HCVpp 感染の阻害効果を示す陽性対照として、抗 CD81 単クローン抗体を用いた。

(4) MOE を用いた Molecular docking program (ASE Dock, MOE-Dock) によって、HCV エンベロープタンパク質 E2 の CD81 上の結合サイトである Long external loop (LEL) 表面上のポケットを探索し、推測されるポケットと化合物 A との結合親和性をエネルギー・スコア (Kcal/mole) を指標として評価した。CD81 LEL の活性型の構造は、protein database (PDB) 1G8Q (解像度: 1.60 Å)を用いた。

(倫理面への配慮) 該当する項目なし。

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。アッセイの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 uM 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 時間後に培養上清を回収。HCV 産生量 (HCV output) を HCV コア抗原アッセイを用いて測定する。
- 5) 併行して、試験化合物の細胞毒性を、48-72 時間後の WST アッセイによって評価する。
- 6) 陽性対照 IFN α 5-50 u/ml の抗 HCV 効果に匹敵する活性をもち、且つ 5 uM の濃度では細胞毒性をほとんど示さない試験化合物をヒット化合物として、それぞれの EC50, CC50 を用量応答曲線から算定する。

(2) 上記のアッセイ系を用いることにより、化合物ライブラリー (分子量 300-550) (8,000 化合物)より 4 個のヒット (化合物 A-D) を得た。図 3 に、各ヒット化合物の抗ウイルス効果、細胞毒性に関する用量応答曲線とそれから算出される EC50, CC50 値を示す。

(3) 中でも化合物 A の EC50 \approx 70 nM, CC50 \approx 35 μ M (Selective index \approx 500)で、現在最も期待されて

いる抗 HCV 治療薬候補である VX-950 (Telaprevir: NS3/NS4A プロテアーゼ阻害剤)の replicon EC50 (354nM)に匹敵する *in vitro* efficacy を示した (図 4)。

(4) しかしながら、非常に興味深いことに、化合物 A は、genotype 1b, 2a の双方ともレプリコン・アッセイによっては活性を示さない (図 5)。

(5) 化合物 A は HCV pseudoparticle assay において HCV E1/E2 発現 pseudoparticle (HCVpp) の感染を用量依存的に阻害した。阻害の EC50 は infectivity assay のそれにほぼ一致する (数十 nM レベル) (図 6)。また Time of addition 実験によれば、化合物 A が抗 HCV 作用を発揮するには、HCV 感染前から直後の HCV ライフサイクルの極早期に添加する必要があることが明らかになった (図 7)。

(5) 以上の結果から、化合物 A は HCV エントリーのステップを阻害する可能性が推定されることから、HCV のエントリー受容体と考えられている CD81, SR-B1, Claudin-1 の中で、X 線結晶構造解析によって、その 3 次元構造の解明されている CD81 の HCV エンベロープ E2 結合ドメインである LEL との結合性を、MOE を用いた molecular docking 手法によって検討した。その際 Infectivity assay によるスクリーニングの結果得られた他の化合物を control として、結果を比較検討した。

その結果、非常に興味深いことに、化合物 A は、HCV E2 タンパク質と相互作用すると推定されている CD81 LEL の疎水性アミノ酸のクラスターの近傍にあるポケットに、高い親和性で結合し得ることが示された (模式図を図 8 に示すが、結合様式の詳細は、ここに開示できない)。

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 増殖アッセイ系を樹立した。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。とりわけレプリコン・アッセイによっては評価できない HCV 増殖サイクルの初期過程 (ウイルス・エントリーから脱殻) や最末期過程 (ウイルス放出を

含むアッセブリー以降) に標的をもつ阻害剤の探索が可能となると考えられる (図 1)。

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 (化合物 A) は、i) レプリコン・アッセイによっては活性が認められないこと (図 5)、ii) HCV pseudoparticle の感染を阻害すること (図 6)、iii) HCV 感染の極く早期に作用点があること (図 7) から、このカテゴリーではおそらくはじめての HCV エントリー阻害剤であることが強く示唆された。

しかも、非常に興味深いことに、computational なアプローチによって、化合物 A が HCV エントリー受容体の一つである CD81 LEL と直接の相互作用を持っている可能性が推測された (図 8)。

現在われわれは、CD81 LEL の大量発現・精製評品を用いることによって、化合物 A と CD81 LEL との直接の相互作用を証明し、その結合様式の詳細を解明するための研究が現在進行中である。

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 阻害剤アッセイ系を確立した。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、これまでに報告のない低分子性の HCV エントリー阻害剤候補の同定に成功した。さらに computational なアプローチによって、この化合物の分子ターゲットが CD81 分子そのものであることが推定された。現在、創薬展開を視野にいれて、ヒット化合物の作用機構、標的分子との結合様式、構造活性相関の詳細に関して解析が進行中である。

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 (2006-2008)

1. 論文発表

1. Takebe, Y., Uenishi, R., and Li. X.-J. Global molecular epidemiology of HIV:

- Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (ed. Kuan Teh Jeang). *Advances in Pharmacology* vol. 56: 1-25, 2008.
2. Tee, K. K., Pybus, O.G., Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X.-J., and Takebe, Y. Chronology of the HIV-1 CRF07_BC expansion in East-Asia. *AIDS* 22: 156-158, 2007.
 3. Li, X.-J., Uenishi, R., Hase, S., Liao, H., Tee, K. K., Kusagawa, S., and Takebe, Y. HIV/AIDS in Asia: The shape of epidemics and their molecular epidemiology. *Virologica Sinica* 22(6): 426-433, 2007.
 4. Han, X., Zhang, M., Dai, D., Wang, Y., Zhang, Z., Liu, J., Geng, W., Jiang, Y., Takebe, Y., and Shang, H. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV/AIDS patients living in Liaoning Province, China: baseline prevalence and subtype-specific difference. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23(3): 357-364, 2007.
 5. Utsumi, T., Nagakawa, H., Uenishi, R., Kusagawa, S., and Takebe, Y. An HIV-2-infected Japanese man who was a long-term nonprogressor for 36 years. *AIDS* 21(13): 1834-1835, 2007.
 6. Naito, Y., Nohtomi, K., Onogi, T., Uenishi, R., Ui-Tei, K., Saigo, K., and Takebe, Y. Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology*. 4(1): 80, 2007.
 7. Shimizu, S., Urano, E., Futahashi, Y., Miyachi, K., Isogai, M., Matsuda, Z., Notomi, K., Onogi, T., Takebe, Y., Yamamoto, N., and Komano, J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS* 21: 575-582, 2007.
 8. Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. 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, 2006.
 9. Murakami, Y., Yamagoe, S., Noguchi, K., Takebe, Y., Uehara, Y. and 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(38): 28113-28121, 2006.
 10. Takebe, Y. and Telesnitsky, A. Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate via human sequence transduction. *Virology* 351: 1-6, 2006.
 11. Naito, Y., Ui-Tei, K., Nishikawa, T., Takebe, Y., Saigo, K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl. Acid Res.* (Web Server issue) W448-W450, 2006.
- 和文
12. 長谷彩希、草川茂、武部豊. 逆転写酵素活性測定法- ³²P を用いた免疫不全ウイルス (HIV) のウイルス学的研究技術. 秀潤社: 細胞工学別冊 RI の逆襲; アイソトープを活用した簡単・安全バイオ実験. 127-131, 2007.
 13. 武部豊. HIV サブタイプと感染経路. 治療. 88(12): 2843-2851, 2006.
2. 学会発表 (2007-2008)
 1. Isogai, M., Uenishi, R., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new class of HCV inhibitors targeting to the entry or late stages in HCV replication cycle using newly developed JFH-1-based infectivity/ replication assay. HCV 2007 (Sept.9-13, 2007, Glasgow, UK).
 2. Takebe, Y. Identification of novel antiviral small molecule compounds that are likely to block early processes in HCV replication cycle. 2nd Hepatitis C, resistance and new compounds workshop (Oct 31-Nov 1, 2007, Boston)
 3. Uenishi, R., Nohtomi, K., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., and Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new class of HCV inhibitors using newly developed JFH-1-based infectivity/ replication assay. 第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム (Sept.1-5, 2007, 淡路島)
 4. 武部豊、上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆字. 感染性 HCV クローン JFH-1 を用いた感染・増殖アッセイに基づくスクリーニングによる新規標的をもつ HCV 阻害剤の同定とその解析. 第55回日本ウイルス学会 (2007.10.20-23, 札幌)
 5. 上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、鈴木亮介、脇田隆字、武部豊. 新規阻害剤探索のための HCV 感染・増殖アッセイ系の樹立とその評価. 第55回日本ウイルス学会学術集会総会 (2007.10.20-23, 札幌)
 - H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2008)

特許出願 (準備中を含む)

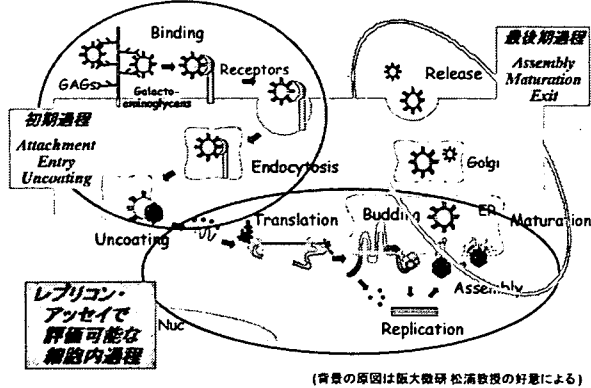
 1. 特許取得・出願
 - 1) 「HCV 阻害剤」(出願準備中)
 - 2) 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願 2008-33598、平成 20 (2008) 年 2 月 14 日出願)
 - 3) 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767、平成 19 年 6 月 13 日出願)
 - 4) 「C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害剤」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日) [PCT 出願: PCT/JP2008/51086 (Jan 25, 2008)]
 - 5) 「C 型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法」(特願 2006-351809、平成 18 年

12月27日出願)

- 6) 「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)
- 7) 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-08741、平成 17 年 1 月 17 日出願)

2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

図1 HCV生活環と新規阻害剤・治療標的探索の戦略



(背景の原因は阪大医研 松浦教授の好意による)

図3 ヒット化合物の抗HCV効果

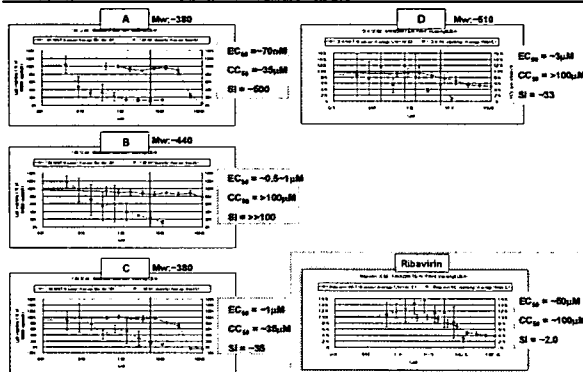


図5 化合物 A はレプリコン・アッセイでは活性を示さない。その作用点はレプリコンアッセイによっては評価できないステップにある

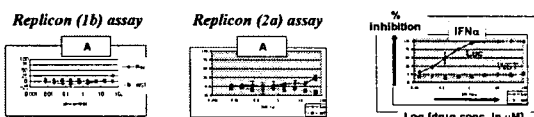


図7 "Time of addition" 実験: Compound Aの作用点はHCV感染直後1時間以内の感染極早期過程にある

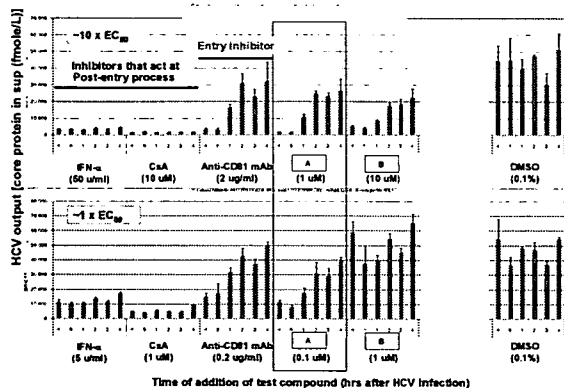


図2 HCV阻害剤スクリーニング法の概要

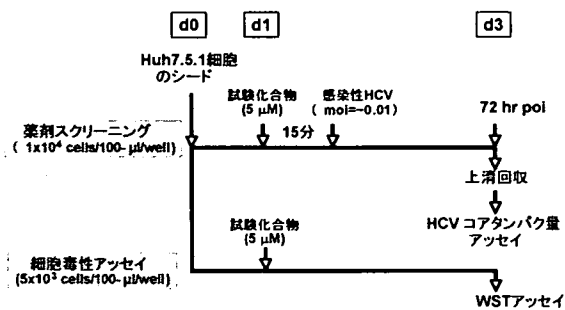


図4 化合物 A の活性プロファイル

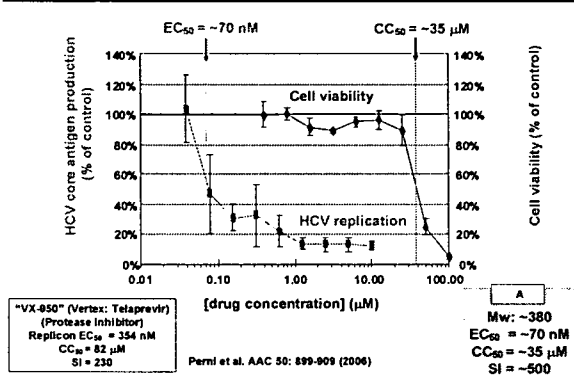


図6 化合物 A はHCV pseudoparticle (HCVpp) の感染を阻害する

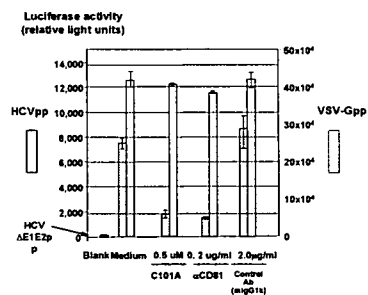
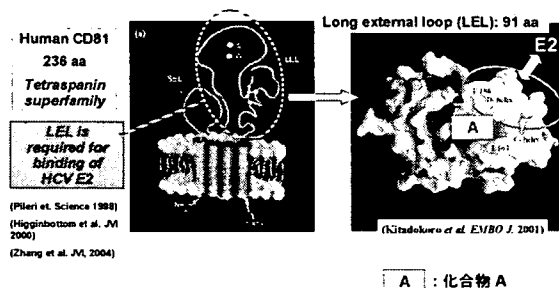


図8 Docking simulationによる検索の結果、compound A はCD81 LEL分子表面に予測されるpocketに高い親和性で結合する可能性が示唆された



A : 化合物 A

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 武部 豊（国立感染症エイズ研究センター・室長）
研究協力者：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。HIV-1 Vpr が分裂酵母の増殖を強く抑制することを用いて、Vpr 拮抗薬の検索系を構築した。この系を用いて 20,000 種類の化学物質をスクリーニングしたところ、Vpr の発現誘導条件下でも酵母の増殖を促す能力のある物質が 2 種類得られた。これら 2 種類の物質の作用機序について解析を行った。

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_{NL4-3} 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 leu1* 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 穴プレート半流動寒天培地（0.15% agar）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。チアミン非存在下、すなわち Vpr 発現条件下でも分裂酵母の増殖が認められた化合物については、*cdc* 表現型の有無による G2 arrest の判定、ウエスタン法による Vpr の発現量の比較、plating efficiency の測定による細胞の viability の解析を行った。

同様に、FLAG 標識付き Vpr の発現プラス

ミド（pREP1-FLAG-Vpr）を構築し、*h leu1* 株の分裂酵母に導入し、形質転換株を得た。この株をチアミンの存在・非存在下、そしてスクリーニングにより得られた化合物の存在・非存在下で培養し、細胞抽出液を調製した。抗 FLAG 抗体アガロースビーズを用いて免疫沈降を行った後、ゲル電気泳動、銀染色を行い、Vpr に直接あるいは間接的に結合する蛋白のプロフィールを比較した。

C. 研究結果

His 標識付き Vpr の発現誘導が可能な分裂酵母株を 96 穴プレートに作成した半流動寒天培地にウェル当たり 300 個播く方法で、20,000 種類の化合物をスクリーニングした。その結果、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に該当するものが約 180 種類あり、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最初のスクリーニングでは約 60 種類得られたが、化合物の濃度を変えながら、1 μ M での再現性を調べたところ、最終的に 2 種類（YAMI および YAM2 と命名）に絞ることができた。

分裂酵母において、Vpr の発現を誘導すると、細胞周期の G2 arrest が起こり、細胞の伸

長 (*cdc* 表現型) が認められるようになる。また、それに伴い、細胞の *viability* は損なわれ、Vpr の発現誘導 36 時間後には、*plating efficiency* が 0.2% 程度に低下する。同様の条件で YAM1 (1 μ M) を添加して培養を行うと、G2 arrest は依然として認められたものの、*plating efficiency* は 10% 前後まで回復した。一方、YAM2 (1 μ M) を添加条件下で Vpr の発現を誘導した場合、明らかな *cdc* 表現型も認められなくなった。ウェスタン法を行ったところ、チアミン非存在下で培養したにもかかわらず、Vpr の発現が殆ど認められないことがわかった。*nmt1* プロモータの下流に GFP 遺伝子をつなぎチアミン非存在下で発現誘導をかけた場合も、YAM2 を添加すると GFP の発現が著しく低下することがわかった。

FLAG 標識した Vpr の発現誘導が可能は分裂酵母株を作成し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により、Vpr に結合する細胞蛋白のプロフィールを解析した。その結果、Vpr と直接あるいは間接的に結合する種々の分裂酵母蛋白の存在が示唆された。YAM1 の存在下では、このプロフィールに一部変化が認められた。

D. 考察

分裂酵母の半流動寒天培地培養系を用いることにより、20,000 種類の化合物を比較的効率良く、個別にアッセイすることが可能であった。これにより、HIV-1 Vpr に対する拮抗作用を有する化合物の候補 2 種類を得ることができた。

そのうちの 1 つ、YAM1 は、Vpr の発現や Vpr による G2 arrest の誘導には殆ど影響を与えないものの、Vpr 発現細胞の *viability* を数十倍改善することがわかった。また、Vpr と結合する細胞蛋白のプロフィールを比較したところ、YAM1 存在下でわずかに変化が認められ、この物質の作用機序に關与する可能

性もある。

スクリーニングにより得られたもう一つの化合物 YAM2 は、Vpr の発現に用いた *nmt1* プロモータの転写活性を抑える可能性があると考えられた。すなわち、*nmt1* プロモータの制御に有用なチアミン以外の物質が得られたことになる。ちなみに、YAM2 とチアミンの化学構造には共通な部分があり、同様の作用機序で *nmt1* プロモータを制御する可能性が示唆された。

E. 結論

分裂酵母の半流動寒天培地培養系を用いて 20,000 種類の化合物をスクリーニングした結果、HIV-1 Vpr に対する細胞 *viability* の低下に拮抗する化合物が 1 種得られた。今後、この化合物およびその類似体についてその活性を詳細に解析するとともに、作用機序やヒト細胞における効果も検討していきたい。また、*nmt1* プロモータの転写活性を抑制するチアミン様化合物も 1 種得られた。これは、分裂酵母における発現誘導実験に利用できるだけでなく、真核細胞における転写制御機構を明らかにする上でも、有用な試薬となる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

中村祐介、荒井梓、松田真理、藤澤隆一、増田道明、HIV-1 アクセサリー蛋白 Vpr に対する拮抗薬の分裂酵母を用いた cell-based screening. 日本ウイルス学会第 55 回学術集会, 札幌, 平成 19 年 10 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

高いゲノム多様性をもつウイルスの高度保存領域を標的とする
至適 RNAi 分子の設計とその評価

分担研究者：程 久美子（東京大学大学院理学系研究科・准教授）

共同研究者：内藤 雄樹（東京大学大学院理学系研究科・助教）

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 本研究では、多様性の高いウイルスを対象としてゲノムの高度保存領域を特定し、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. 研究目的

RNA 干渉 (RNAi) 法は、2 本鎖 RNA を用いて遺伝子発現を特異的にノックダウンする手法であり、特に哺乳類細胞では RNAi を誘導するために約 21 塩基対の短い 2 本鎖 RNA (siRNA) が広く利用されている。RNAi による遺伝子発現の抑制は極めて特異性が高いため、内在性遺伝子だけでなく病原体遺伝子機能の抑制技術として医療応用が期待されている。しかし HIV-1 や HCV に代表される RNA ウイルスに対して RNAi 法を用いる場合、著しく高いゲノム多様性に対応できるような siRNA の設計が難しいばかりでなく、1 種類の siRNA を単独で用いた場合、その siRNA に耐性をもつウイルスが容易に出現しうる。そこで我々は、多様なウイルス株のできるだけ多くに対応しうる siRNA を、バイオインフォマティクスの手法に基づき設計する方法論を構築し、その有効性を培養細胞で迅速に評価する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、保存性が高く、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特定した。それらの siRNA が示す抗ウイルス効果を、異なるサブタイプに属する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評価した。

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応答できるよう、あらかじめ全ウ