

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

(倫理面への配慮) 該当せず.

C. 研究結果

1. HIV-1 を標的とする siRNA 設計法の検討

Los Alamos HIV Sequence Database より入手可能な HIV-1 グループ M のゲノム配列 495 種をもとに, siRNA の標的として有力な候補となりうる高度保存領域を同定した. まず, 495 種の HIV-1 配列を構成する 21-mer をすべて生成し, そのひとつひとつの 21-mer が 495 種のうち何種に共通であるかを調べた. たとえば AAT AGC AAC AGA CAT ACA AAC という 21-mer が 495 種のう

ち 300 種に共通であった場合, その 21-mer の保存度を $300 / 495 \times 100 = 60.6 (\%)$ と計算した. ただし, 本解析に用いた HIV-1 配列の多くは 5' UTR 部分の配列を欠いているため, 5' UTR 領域の保存度を計算する際に分母を 495 とすると, 保存度が過小に評価されるという問題があった. そこで, 5' UTR 領域のうち LTR 部分については, 各々の配列の 3' LTR の配列を用いて補完した. さらに, 保存度の計算では分母を一律に 495 とするのではなく, 保存度を求めようとしている 21-mer に対応する領域を欠いていない配列の個数をその都度求め, それを分母とした. 以上の操作により, 5' UTR 領域の 21-mer についても正確に保存度を評価できた.

495 種の HIV-1 配列を構成する 21-mer は合計で 4,417,157 種であった. 各 21-mer の保存度を計算したところ, HIV-1 ゲノムの大部分の領域は 21-mer の単位では保存されていないことが明らかになった.

しかしながら, 21-mer のうち特定の領域に位置するものは高度に保存されていることが判った (図 1). これらの領域の多くはウイルスの遺伝子発現や増殖に必要な配列を含んでいた. 具体

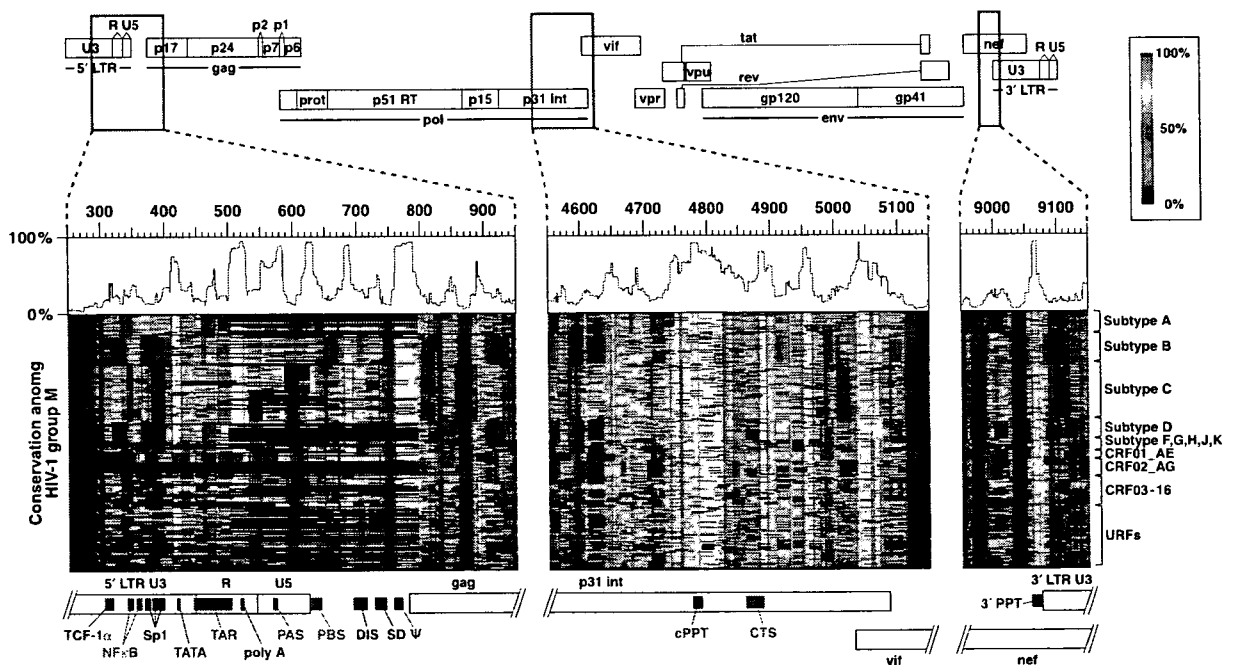


図 1 : HIV-1 ゲノムを構成する 21-mer の保存度. 495 種の HIV-1 配列から生成した 4,417,157 種の 21-mer について保存度を求め, 青色 (保存度 0%) から赤色 (保存度 100%) の点で示した. 折れ線グラフは各位置における保存度の最大値 (最頻値と一致) を示す. 5' UTR, インテグラーゼ遺伝子内の cPPT/CTS 領域, および 3' PPT 領域の拡大図.

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

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

2. siRNA の抗 HIV-1 効果の検証

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

ついで, 各 siRNA の HIV-1 に対する増殖抑制効果を, サブタイプ B, C, CRF01_AE 属する 4 種の HIV-1 感染性分子クローンで評価した。これら 3 種のサブタイプはアジア地域における HIV-1 流行の主要な原因となっており, また塩基配列の

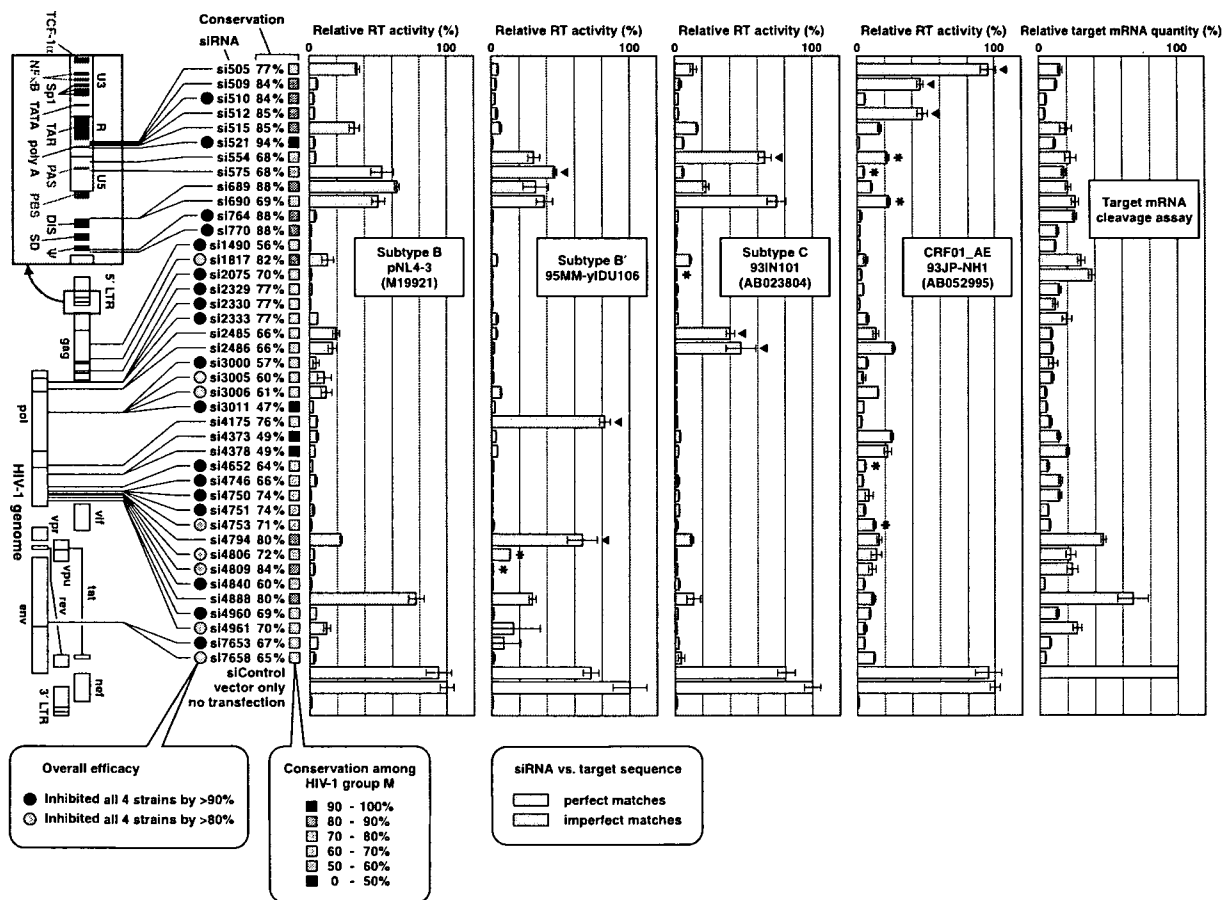


図 2 : 本研究で設計した 41 種の siRNA の評価。いずれも siRNA の終濃度は 5 nM。(A) HIV-1 に対する増殖抑制効果を, 4 種の HIV-1 感染性分子クローンで評価した。(B) siRNA 自体が備える標的切断活性を, 第 1 章で述べた標的切断アッセイで評価した。

siRNA target site	map to HXB2	siRNA efficacy prediction	off-target hits	Conservation in the selected sequences
21bp target + 2nt overhang		UI-Tel Reynolds Amarzougou		(.: conserved, !: not conserved, -: sequence not available)
AAGCCTCAATAAAGCTTGCCTG	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	96% (146/152)
AGCCTCAATAAAGCTTGCCTG	HTTLLFLLLPFL	yes	2 [detail]	96% (146/152)
TTCAAAATTTTCGGGTTTATTAC	HTTLLFLLLPFL	yes	2 [detail]	92.3% (168/182)
TCAAAATTTTCGGGTTTATTAC	HTTLLFLLLPFL	yes	2 [detail]	92.3% (168/182)
AGGAGAGAGATGGGTTGCAGAGC	HTTLLFLLLPFL	yes	7 [detail]	90.9% (150/165)
GGGAGGCTAGAGAGAGAGAGAG	HTTLLFLLLPFL	yes	0 [detail]	90.8% (149/164)
GACTACGGAGCCTAGAGAGAG	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	90.8% (149/164)
CTAGGGAGCCTAGAGAGAGAG	HTTLLFLLLPFL	yes	4 [detail]	90.3% (149/165)
GGAGGCTAGAGAGAGAGAGAG	HTTLLFLLLPFL	yes	4 [detail]	90.2% (148/164)
AGCGGAGCTAGAGAGAGAGAG	HTTLLFLLLPFL	yes	0 [detail]	89.5% (163/182)
ATTCAAAATTTTCGGGTTTATTAC	HTTLLFLLLPFL	yes	2 [detail]	89% (162/182)
AGGGGAAGTGCATAGCAGGAAAC	HTTLLFLLLPFL	yes	3 [detail]	87.9% (160/182)
GGGGAAGTGCATAGCAGGAAAC	HTTLLFLLLPFL	yes	0 [detail]	87.8% (144/164)
TTTGACTAGCGGAGGCTAGAAAG	HTTLLFLLLPFL	yes	0 [detail]	87.5% (134/153)
CACTGCTTAAGCCTCAATAAAGC	HTTLLFLLLPFL	yes	0 [detail]	87.5% (141/161)
TGCTTAAGCCTCAATAAAGC	HTTLLFLLLPFL	yes	0 [detail]	87.5% (141/161)
ACCGAGACTCGGCTTGCCTGAG	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	87.3% (159/182)
AGCAGTACAAATGGAGTATTG	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	87.1% (129/148)
AACGACTGCTTAGAGCTCAATG	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	87.1% (129/148)
ACCACCTGCTTAGAGCTCAATG	HTTLLFLLLPFL	yes	0 [detail]	87.1% (129/148)
CCACCTGCTTAGAGCTCAATG	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	87.1% (129/148)
CCACTGCTTAGAGCTCAATG	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	87.1% (129/148)
GGTAAGTACAGATCCCTCAGACC	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	87% (101/116)
CAGCAGTACAAATGGCAGTATC	HTTLLFLLLPFL	yes	3 [detail]	86.8% (158/182)
GGAGGATACAGATCCCTCAGACC	HTTLLFLLLPFL	yes	4 [detail]	86.2% (157/182)
AAGTGACATAGCAGGAATCACTG	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	85.7% (156/182)
ACAGGAGCAGATGATACAGTAT	HTTLLFLLLPFL	yes	2 [detail]	85.7% (156/182)
GGAGCAGATGATACAGTATTAG	HTTLLFLLLPFL	yes	8 [detail]	85.3% (199/230)
CTGGTAAGTACAGATCCCTCAGACC	HTTLLFLLLPFL	yes	1 [detail]	85.3% (199/230)
AGCAGATGATACAGTATTAGAAAG	HTTLLFLLLPFL	yes	3 [detail]	85.1% (155/182)

図3 : siVirusによるsiRNAの設計結果. HIV-1のサブタイプB, C, CRF01_AEの合計182種を選択してsiRNA設計をおこなった例.

うえでは相互に隔たりのあるクラスタを形成している. 本アッセイでは, それぞれの感染性分子クローンを siRNA とともに HeLa 細胞に導入し, 48 時間後に培地上清を回収して HIV-1 由来の逆転写酵素活性を測定することにより, ウイルスの増殖を評価した. その結果, 各 siRNA を 5 nM で導入した場合, 26 種の siRNA がすべての HIV-1 株の増殖を 20%以下に抑制した (図2).

3. 抗ウイルス siRNA 設計システムの構築

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

D. 考察

本解析結果は, HIV-1 を標的とする siRNA を無作為に設計しても, 高い多様性をもつ HIV-1 を効率よく標的とすることが難しいことを示唆

しており, 有効な siRNA を設計するためには, バイオインフォマティクスに基づく系統的な配列解析が必要であると考えられた.

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

本研究に関連するものはない.

G. 研究発表 (2006-2008)

1. 論文発表

- [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, Nohtomi K, Onogi T, Uenishi R, Ui-Tei K, Saigo K, Takebe Y. Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology* **4**, 80. (2007)
- [3] 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.**
- [4] Ui-Tei K, Naito Y, Saigo K. Guidelines for the selection of effective short-interfering RNA sequences for functional genomics. *Methods Mol. Biol.* **361**, 201-216. (2006)
- [5] Ui-Tei K, Naito Y, Saigo K. Essential notes regarding the design of functional siRNAs for efficient mammalian RNAi. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 65052. (2006)
- [6] Naito Y, Ui-Tei K, Nishikawa T, Takebe Y, Saigo K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, W448-W450. (2006)

2. 学会発表 (2006-2008)

- [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 回日本生化学会大会合同大会, 4P-1126, 横浜. (2007)
- [2] Naito Y, Takebe Y, Ui-Tei K, Saigo K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*, Kyoto (2006).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2008)

- [1] 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-008741, 平成 17 年 1 月 17 日出願)
- [2] 「RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法, RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置, RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法, RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム, 及び RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物」(特願 2005-55064, 平成 17 年 2 月 28 日出願)
- [3] 「C 型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法」(特願 2006-351809, 平成 18 年 12 月 27 日出願)
- [4] 「(用途) C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害化合物」(特願 2007-018145, 平成 19 年 1 月 29 日)

平成 19 年度 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
分担研究報告書

研究課題：「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：駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第3室 主任研究官）

分担研究課題：新規治療標的の探索と HIV、HCV、EBV 阻害剤の先導化合物の同定および抗ウイルス作用機序の解明 - 新規抗 HIV 薬のリード化合物の解析

研究要旨

エイズの根治療法が存在せず、世界的流行と薬剤耐性ウイルスに対応するためには、新規作用機序を有する抗エイズ薬開発が必須である。我々は 300 万の小分子化合物の構造の特徴を抽出し代表的な小分子化合物として選択された 2 万種類のランダムケミカルライブラリーの中から培養細胞系にて抗 HIV 作用を有する化合物を直接同定することを試み、HIV 特異的に抗ウイルス活性を示すリード化合物を同定した。既存の抗レトロウイルス薬との additive effect の有無について解析したところ、既存の抗レトロウイルス薬と協調的な抗 HIV-1 活性がみいだされた。これは薬剤の標的部位が異なることを示唆し、本リード化合物が新規抗 HIV-1 薬として有用な先導化合物であると期待できる。

A. 研究目的

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

薬剤開発には大きく分けて 2 つの戦略が知られている。一つは計算機によるモデリングに基づく drug design を用いた限られた数の化合物の中から生物活性を有するものを同定するものであり、もう一つが標的プロセスを high throughput

化した実験系で実際にケミカルライブラリーから生物活性を有するリード化合物を同定することである。どちらも現時点での優位性は明らかではない。いずれの戦略においても、標的プロセスを抽出した実験系と、標的プロセスを絞り込まず、直接抗ウイルス活性の有無を指標にリード化合物を同定し、次にその標的プロセスを同定する戦略がある。どちらも一長一短があり、先導化合物同定への道のりには王道はないと考えられている。

昨年度、我々は培養細胞系にて抗 HIV 作用を有する化合物を直接同定する戦略を選択し研究を行ったところ、強い抗 HIV 活性を示す小分子化合物が同定された。本年度はこの分子の作用機序を明らかにする目的でさらに詳細な解析をくわえたのでここに報告する。

B. 研究方法

MT-2細胞とCEM細胞において複製をウイルスのp24抗原量で定量する方法でも、RT活性で評価する方法でも、同様にIC₅₀が100~200nMを示した先導化合物 chemical A について既存の抗レトロウイルス薬であるAZT, NFV, T20 という3種との併用により薬剤効果の増強がみられるかどうかを培養細胞レベルでMT-2細胞とBaL株を用いてp24抗原量でウイルス複製を定量する方法にて検討した。これら3種類は異なるカテゴリーの作用機序をもつ薬剤であり、それぞれRT阻害剤、protease阻害剤、fusion阻害剤である。T20は本邦での使用はいまだ認可されていないが、近い将来認可を受けることを念頭において検査対象に加えた。使用した薬剤の濃度は、リード化合物の濃度を50nMとし、それ自身では非常に弱い抗HIV-1活性しか呈さない濃度を使用した。AZT, NFV, T20の濃度はそれぞれ10nM, 5nM, 2.5nMを使用した。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

抗HIV-1活性を示す化合物を chemical A とし、50nMにおける抗HIV-1活性を評定すると図のようになり、DMSO溶媒コントロールと比較して非常に弱い抗ウイルス作用しかないことが分かった(図1)。濃度を100nMにすると、中程度の抗HIV-1活性を検出する事ができる(図2)。AZTとの併用効果をみると、AZT単独での抗HIV-1活性が非常に弱い条件で chemical A を併用するとほぼ完全にウイルス複製を押さえる事が判明した(図3)。同様にNFVとの併用効果をみると、NFV単独での抗HIV-1活性が非常に弱い条件で chemical A を併用するとほぼ完全にHIV-1複製を押さえる事が

判明した(図4)。同様にT20との併用効果をみると、T20単独での抗HIV-1効果が非常に弱い条件で chemical A を併用すると chemical A を2倍濃度で作用させるのに比べるとそれより強い程度で強調してHIV-1複製を抑制する事が判明した(図5)。

D. 考察

以上の結果から、先導化合物 chemical A は既存の抗ウイルス薬との併用効果を有する抗レトロウイルス薬である可能性が示唆された。この結果は chemical A が既存の薬剤とは異なるメカニズムでHIV-1の複製を抑制する事を示唆し、極めて有望な次期抗レトロウイルス薬のリード化合物である事を示している。

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、ウイルス酵素活性を直接阻害するかどうか等について検討を進める必要がある。また、並行してこの薬剤に対して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見いだされた特異的HIV阻害剤が、既存の抗レトロウイルス薬と強調した薬物活性を示した。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、新規エイズ薬のリード化合物として非常に有望と思われた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

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) Akihide 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) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. CD63 and its mutants disrupt CXCR4 trafficking to the plasma membrane and inhibit T-cell tropic HIV-1 entry. (Traffic in press)
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

- 7) 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.
- 8) 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) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yoshiharu Miura, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. CD63 AND ITS MUTANTS INHIBIT FUSION OF CXCR4-CONTAINING VESICLES TO THE PLASMA MEMBRANE AND BLOCK X4 HIV-1 ENTRY. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 3) 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)
- 4) 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)

- 5) 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)
- 6) 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

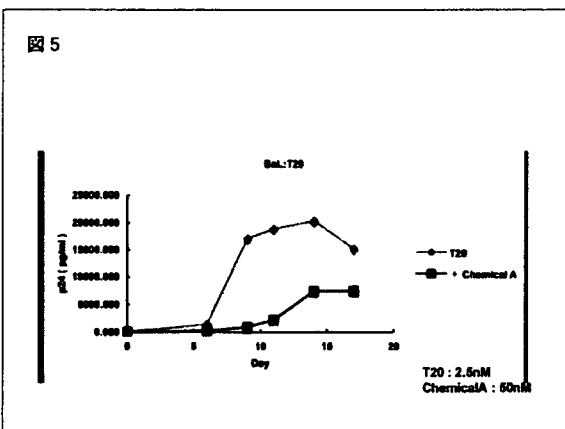
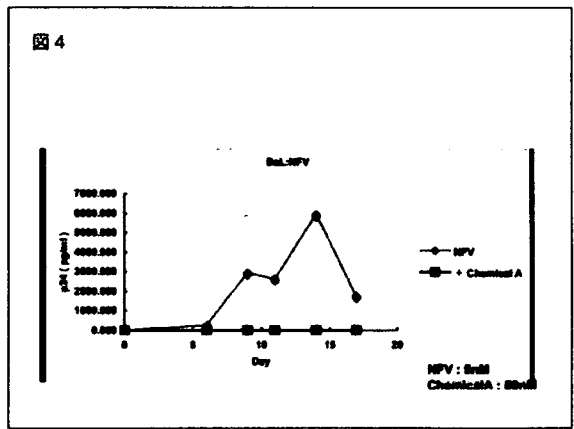
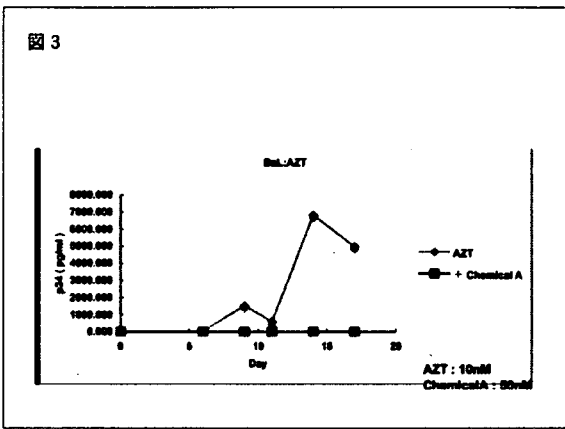
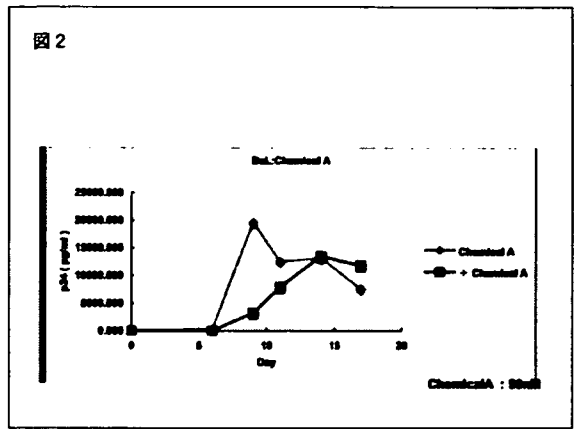
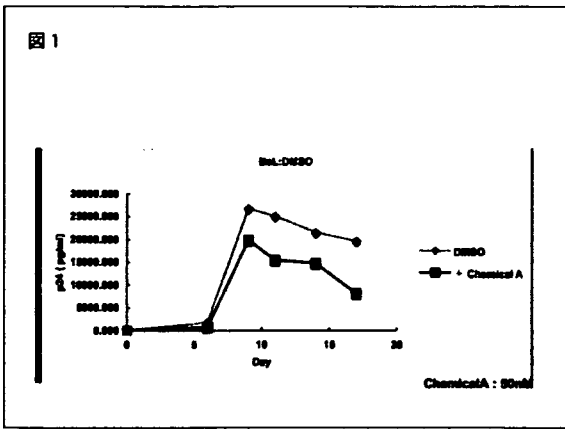
- 1) 藤秀義、辰巳絢子、栗田明宙、駒野淳、星野忠次：コンピュータ支援による HIV-1 治療薬の開発。レトロウイルス研究会夏期セミナー2007 プログラム 2007 年
- 2) 濱武 牧子 駒野 淳 浦野 恵美子 巖 馬華 中原 徹 堤 浩 宮内 浩典 森川 裕子 玉村 啓和 杉浦 互 山本 直樹. HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する6アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性. 熊本エイズセミナー 2007 年、熊本
- 3) 駒野 淳 浦野 恵美子 巖 馬華 中原 徹 堤 浩 濱武 牧子 宮内 浩典 森川 裕子 玉村 啓和 杉浦 互 山本 直樹. HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する6アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性. 第55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55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21回日本エイズ学会学術集会, 2007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) 浜武 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
- 9) 辰巳絢子、藤秀義、駒野淳、根矢三郎、星野忠次. HIV-1 の RNaseH を標的とした新規抗 HIV 薬の設計・評価・合成、日本薬学会第128年会, 2008 年

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



「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」に関する研究
分担研究者 高橋 信弘 (東京農工大学 教授)

研究要旨

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的手法で解析し、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、昨年度の結果を受けて、Rev が宿主細胞内で結合する SF2p32 の機能をリボソーム合成に関わる Fibrillarlin (FIB)及び NNP1/Nop52 (NNP1) への相互作用という観点から解析することを目的とした

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的手法で解析し、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、昨年度の結果を受けて、Rev が宿主細胞内で結合する SF2p32 の機能をリボソーム合成に関わる Fibrillarlin (FIB) 及び NNP1/Nop52 (NNP1)への相互作用という観点から解析することを目的とした。

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 化合物/プレート×250 枚=20,000 化合物)を使用した。化合物の化学修飾は Enamine 社に依頼した。

2) 高等真核細胞における細胞毒性

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。alamarBlue を添加して 4 時間後に蛍光プレートリーダーで蛍光を測定した。また 96 穴プレートに 293FT, HeLa, Jurkat 細胞を調製し化合物を添加して培養した。MTT を添加して 3 時間後に DMSO を加え、吸光度を測定した。

3) 抗 HIV 活性

MT-4 Luc 細胞 (luciferase を発現する MT-4 細胞) に HIV-1 (HXB2 株) を感染させ、化合物 (50mM から段階希釈) を添加した。6 日後に細胞を可溶化し、luciferase 活性を測定した。

CD8(+)細胞を除去したヒト末梢血単核球に HIV-1 (HXB2 株) を感染させ、5、25mM の化合物を添加し 3 週間培養した。経時的に培養上清中の HIV-1 p24CA 量を ELISA (Zeptomatrix 社) で定量した。

HeLa 細胞に pNL43 を transfection し、化合物 (50mM から段階希釈) を添加した。2 日後に培養

上清中の HIV-1 p24CA 量を ELISA で定量するとともに、細胞内 Gag 蛋白を Western blot で解析した。
(倫理面への配慮)

該当項目無し。

C. 研究結果

昨年度同定した SF2p32 への相互作用タンパク質の中で、特にリボソーム合成に関与する蛋白質 nucleolin (NCL)、FIB、及び NNP1 に着目して SF2p32 との機能的関連性を解析した。まず、SF2p32 は NCL と RNA 依存的にのみ相互作用すること、FIB 及び NNP1 には RNA 非依存的に相互作用するがそれぞれは独立しており FIB-SF2p32 複合体には NNP1 は存在せず、逆に NNP1-SF2p32 複合体には FIB は存在しないことを確認した。そして、SF2p32 が細胞分画で調製したリボソーム前駆体画分に存在すること、その画分をショ糖密度勾配超遠心分離法で分画した 90S、60S、40S のリボソーム前駆体画分にミトコンドリア移行シグナルを有する高分子量の分子種として主に存在していることを示した。次に、細胞質に局在する FIB 変異体及び SF2p32 を結合するドメイン変異体を用いて、SF2p32 との相互作用には FIB が核及び核小体内に局在することが必要であることを示した。同時に、FIB は細胞質と核内で異なる蛋白質複合体を形成することも示した。また、NNP1 のドメイン変異体を用いて、SF2p32 は NNP1 の C 末端に存在する約 80 残基のドメイン領域に結合し、全ての SF2p32 結合ドメイン変異体が核小体に存在することも示した。最後に、異なるタグを融合させた FIB と NNP1 を、発現量を変動させて共発現させ、それぞれをプルダウンして結合する SF2p32 を調べたところ、FIB の発現量を増加させても NNP1 の発現量及び SF2p32 の結合に優位なしかし、SF2p32 を結合する NNP1 の最小ドメインの発現量を増加させても FIB の発現量

及びSF2p32 結合量に優位な効果は見られなかった。

D. 考察

昨年度の 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、及び、Rev が結合する HRB2 の酵母ホモログ Krr1p 及び B23 は、それぞれ 40S リボソームの生合成、ほ乳類における 60S リボソームの生合成に関与するとの報告から、今年度は SF2p32 のリボソーム生合成への関与について、90S から 40S 前駆体への形成に関わる FIB 及び 60S 前駆体の形成にかかわる NNP1 との相互作用の役割の観点から解析した。SF2p32 はリボソーム前駆体に存在し、FIB 及び NNP1 と核小体内で相互作用していることが示され、SF2p32 がリボソーム生合成において機能していることがより強く示唆された。そして、FIB と NNP1 の共発現の SF2p32 結合への効果を調べた結果は、NNP1 が SF2p32 を結合した FIB を選択的に認識し、FIB を分解している可能性を示しており、SF2p32 の働きを明らかにする上で非常に重要と考えられる。そこで、今後は、この分解によって SF2p32 が放出され NNP1 と結合しているのか、あるいは、NNP1 が SF2p32 を結合した FIB と共分解しているのかなどについて詳しく解析したい。ただ、今のところ、今回観察した現象がリボソーム生合成に関わった現象なのか、あるいは、FIB、SF2p32、NNP1 のホメオスタシスを制御するための現象なのかは不明であり、これらについても今後明らかにする必要がある。我々のこれまでの研究において、リボソーム生合成にユビキチン-プロテアソーム分解系が関与しているとする結果を報告しており、これとの関連においても今後検討していきたい。

E. 結論

Rev は核小体に局在することが知られているが、その意味については全く不明である。今回、Rev 結合タンパク質 SF2p32 が核小体内で FIB 及び NNP1 と機能的に関連している可能性が示されたことから、今後の解析によって Rev の新たな働きが明らかになると期待できる。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

論文発表

1. 論文発表

Takahashi, N., and Isobe, T. (2007) *Proteomic Biology using LC-MS*, Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey USA, p1-254.

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

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

32th FEBS Congress, Vienna Austria, 2007.7/7-12
3 件発表

5th JHUPO Conference、東京、2007.7/30-31 招待講演他 3 件発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

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、免疫反応の低下により悪性腫瘍の発症が増加し、特にリンパ腫の治療は予後が悪いために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する。昨年度は、EBV の潜伏感染において最も重要な EBNA-1 の DNA 結合を利用した迅速で高感度な *in vitro* ELISA 系を確立した。今年度はそれを用い、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、および化学合成物ライブラリーをスクリーニングし、得られたいくつかの阻害剤候補の解析を行った。

A. 研究目的

HIV 感染症では、細胞性免疫の低下により様々な日和見感染症を起こすが、悪性腫瘍の発症は予後が悪いことから問題となっている。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、悪性リンパ腫の多くは EBV (Epstein-Barr virus) が関与すると考えられている。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した。

B. 研究方法

1. EBNA-1 ウイルス蛋白質の合成

大腸菌発現プラスミド pGEX-6P-1 を用い 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構築した。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。

1. LANA ウイルス蛋白質の合成

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た。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。また、大腸菌発現プラスミド pGEX-6P-1 を用い LANA 蛋白質の DNA 結合ドメイン (900a. a-1129a. a) の N 末端に GST 蛋白質を結合させた GST-LANADB を大腸菌 BL21 にて合成した。さらに pMAL-c4X を用い MBP の下流に LANADB を連結した MBP-LANADB も大腸菌 BL21 で合成した。

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 Blocking buffer (1% BSA, 0.1 mg/ml サケ DNA 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_{450nm} にて吸光度を測定した。昨年に引き続いて Analyticon Discovery 社の天然物ライブラリー、化学合成物ライブラリー、および所属研究部の保有する化合物合計約 2500 種類をスクリーニングした。

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

プローブとして DS 領域を用い ³²P-ATP を用いて末端ラベルし、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. LANA-oriP の EMSA 法

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

5. in vivo での EB ウイルスゲノムの検出

ヒト AKATA 細胞を薬剤の各濃度で処理し、生細胞数をそろえ HART 法にて EB ウイルスゲノムを抽出した。その後、EBNA-1 のプライマーを用い PCR 法にてゲノム DNA を検出した。

C. 研究結果

昨年度作製した in vitro スクリーニング系を用い Analyticon Discovery 社の約 2500 の化合物をスクリーニングした。その結果、50%以上の阻害活性を持つもの 2 化合物 (Ethinomycin, Nogalamycin)、20%以下の阻害活性を持つ化合物 8 個を得た (図 1)。

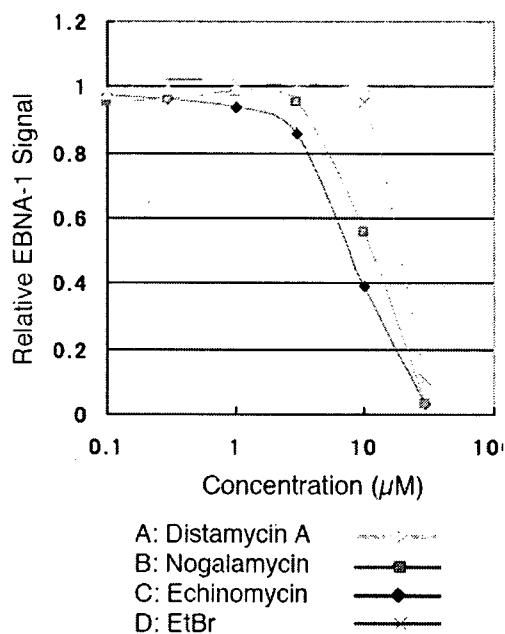


図 1. 強い阻害活性を示した阻害剤

さらに 2 つの化合物について EMSA 法で阻害活性について調べた。その結果、図 2 の様に EMSA でも 2 つの化合物とも阻害活性が再現された。echinomycin の阻害活性の方が高く、阻害の濃度依存性を調べたところ 2.5 μM で阻害効果が検出された (図 2)。

次に EB ウイルスを保持する培養細胞 AKATA 細胞を用い echinomycin の in vivo での作用を検討した。echinomycin は毒性が高いため、細胞死が見られ始める直前の薬剤処理後 1.5 日での各濃度でのウイルス DNA の量を PCR で増幅後、電気泳動にて調べた。その結果、ウイルス DNA の量の変動

は検出できず、echinomycin の EBV ゲノム維持への阻害効果は観察されなかった (図 3)。

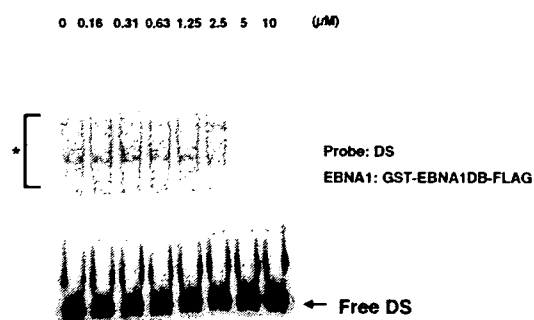


図 2. EMSA を用いた echinomycin の阻害作用

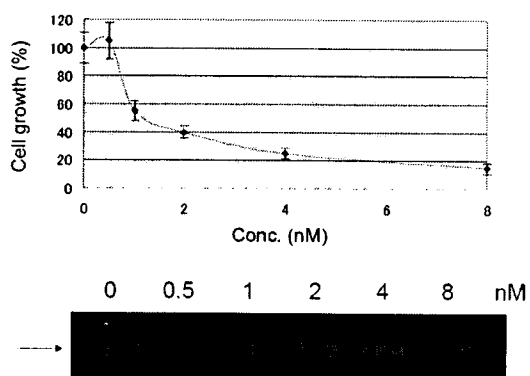


図 3. AKATA 細胞における echinomycin 処理によるウイルス DNA への影響

また、ELISA 法で 20%以下の阻害効果をもつ、残りの 8 つの化合物について EMSA 法を用い阻害作用を検討したが、阻害作用は検出できなかった。

D. 考案

昨年度確立した ELISA 法は、エチジウムブロミドのような非特異的な DNA インターカレーターが陽性にならないように、常に溶液にサケ DNA を 0.1mg/ml の濃度で加えた。

実際にエチジウムブロミド 10ug/ml では、本スクリーニング系では陽性にならないことは確認している。今回得られた 2 つの阻害剤はいずれも塩基配列特異的な、DNA インターカレーターであるので特異的な阻害剤を得るためのスクリーニング系として本系は有効であると考えられる。echinomycin は TGCT の塩基配列をもっとも強く結合することが報告されており、事実 EBNA-1 の認識配列では TGCT が重要であり DNA 結合ドメインとの相互作用が報告されている。残念ながら、20%以下の阻害を示した 8 つの化合物は EMSA では阻害効果が見られなかったが、EBNA-1 と DNA の阻害以外の ELISA 系での何ならかの阻害を検出したものと予想される。

EBV のゲノムは宿主細胞のゲノムと同じように複製、分配される。したがって細胞の倍化時間 (約 1 日) を考えた場合、長時間の阻害剤処理が必要と考えられた。しかし、得られた 2 つの阻害剤は細胞に対する毒性が強く 1.5 日以上処理をすることができなかったことが、今回 *in vivo* で EBV のゲノムのコピー数に対する影響が見られなかった原因の可能性も考えられた。

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* スクリーニング系を用いて 2 つの有効な阻害剤候補が見つかったが、*in vivo* では EBV ゲノムの維持への阻害効果は見ることはできなかった。今後さらにスクリーニングを行い有効な阻害剤を検索して行くことを試みたいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

村上裕子、山越 智、鈴木哲郎、脇田隆宇
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

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。

厚生科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）

分担研究報告書

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

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 室長

研究要旨: 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 TIP47 の機能について検証を行った。その結果、報告された内容とは異なり、1) TIP47 過剰発現によるウイルス粒子への Env 取込み量の増加は、細胞内 Env レベルの増加による可能性が示唆された。2) TIP47 の発現抑制実験の結果より、TIP47 のウイルス産生過程への関与が示唆された。昨年度 Gag または Env の存在下で TIP47 と共沈してくるタンパク質として同定したモータータンパクの一種 MyH9 の Env 取込みやウイルス産生への関与は残念ながら認められなかった。Gag や Env との相互作用に関与する TIP47 領域の同定のための変異体を作製し、その細胞内局在から使用可能な変異体を決定した。MA の N 末端から 5 残基ずつオーバーラップさせた 15 残基の部分 ペプチドを合成中しその C 末端の修飾により細胞内導入を可能にしてその抗 HIV-1 活性を測定するランダムアプローチによる抗 HIV 剤の探索を実施中である。を開始した。

A. 研究目的

感染性 HIV-1 粒子形成に関与する宿主因子に関する研究では、その最終目標を、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おいている。昨年度に引き続き 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蛋白 TIP47 について、その検証を試みた。また昨年度の研究で我々が同定した TIP47 と相互作用する蛋白 MyH9 についてその Env 取込みやウイルス産生への関与を検討した。さらに、エンドサイトーシス、エキソサイトーシスの両方に関与する低分子量 GTP 結合蛋白 Rab について数種を選び、同様に Env 取込みやウイルス産生への関与を検討した。次に、MA を標的としたペプチド阻害剤に関する研究では、MA の部分ペプチドの C 末端に Octa-Arg を連結することによって、細胞内導入を可能した形でこれらの部

分ペプチドの抗ウイルス活性を評価する試み

B. 研究方法

HeLa 細胞、または 293T 細胞にウイルスプラスミドと TIP47 発現プラスミドを共発現させ、cell lysates と virus lysates を WB もしくは p24 ELISA を行い、主に Gag、Env 蛋白についてその細胞内合成、ウイルス粒子産生、Env 取込みについて解析した。siRNA による knock down では 1 日前に目的の蛋白に対する siRNA（陰性コントロール：luciferase に対する siRNA）で細胞を処理して、内因性の宿主蛋白を knock down を開始してからウイルスプラスミドを細胞に導入・発現させ、その影響を検討した。

（倫理面での配慮）

該当事項なし

C. 研究結果

（1）TIP47 を過剰発現させたときの Env のウイルス粒子への取込み：TIP47 を過剰発現させることによって HIV-1 ウイルス粒子中への Env の取り込み量が顕著に増加するかの検証を試みた。HeLa 細胞に HIV-1 plasmid(pNL4-3)と種々の濃度

の TIP47 をコードした plasmid(pcDNA3.1-TIP47FL)を導入・発現させ、細胞とウイルス(培養上清)のライセートを解析した。その結果、細胞に導入した TIP47 量に応じてウイルス粒子中へ取り込まれる Env(gp41)の量も増加していたが、細胞中に存在する TIP47 量もその増加に対応する程度増加していた(図1)。したがって、TIP47 の過剰発現は見かけ上のウイルス粒子中への Env の取り込み量を増加させているが、それは細胞内の Env の存在量の増加の結果をみている可能性も否定できない。

(2) TIP47 を過剰発現させたときの Env のウイルス粒子への取込み:内因性 TIP47 を knock down することによって、HIV-1 ウイルス粒子への Env の取り込み量が顕著に減少するかの検証を試みた。293T 細胞に存在する TIP47 を siRNA によって knock down したあと、HIV-1 plasmid(pNL4-3)を導入・発現させ、細胞とウイルス(培養上清)のライセートを解析した。その結果、ウイルス粒子産生量が顕著に減少し、Env の取り込みもやや減少したこのように、論文に報告された程顕著ではないが、TIP47 の Env の取り込みへの関与が示唆された(図2)。興味深い事に、論文には報告が無かった現象として、TIP47 のウイルス粒子産生への関与を示唆するデータを得た。

(3) MyH9 の Env のウイルス粒子への取込みやウイルス産生における役割の検討: 昨年度報告した Gag または Env 存在下で TIP47 との共沈が確認できた宿主因子 MyH9 が HIV-1 Env のウイルス粒子への取込みやウイルス産生に関与しているか否かを検討した。HeLa 細胞、293T 細胞中の内因性 MyH9 を siRNA によって 90%以上 knock down しても Env のウイルス粒子への取込みやウイルス産生への影響はほとんど認められなかった。

(4) tag 付き TIP47 変異体の作製とその細胞内局在の検討: TIP47 と Gag や Env との相互作用領域の同定をするために、TIP47 full-length(FL)を鋳型とし、変異導入 PCR により FL、1-384、1-316、1-242(246)、1-140 の変異体を作製した。IP 及び BRET での相互作用領域の同定を行うた

め、IP 用に HA-tag、BRET 用に GFP-tag をそれぞれ 5'末端側につけた。それらの細胞内発現を確認後、TIP47 変異体細胞内局在を視覚的に確認するため、HeLa 細胞にそれぞれの tag 付きの TIP47 変異体 plasmid を導入・発現させ HA-tag をつけたものは免疫染色(IF)を行ったのち蛍光顕微鏡にて観察を行った。GFP-TIP47 FL は、細胞質全体に拡散していた。TIP47 変異体では、TIP1-246、TIP1-140 が FL とほぼ同様の細胞内局在を示したが、TIP1-384、TIP1-316 は、核周辺部分に多く存在していた。HA-TIP 変異体でも同様の傾向であった。また、HA-TIP47 変異体について市販のキットを用いて生化学的に細胞分画を行った。内因性 TIP47、TIP47 FL、TIP 1-242、TIP 1-140 は殆どが細胞質画分に存在した。一方、TIP 1-384、TIP 1-316 は細胞骨格画分に多く存在していた(図3)。GFP-tag 付き TIP47 変異体についても同様の結果を得た。以上の結果から、Gag や Env との相互作用領域の決定には、tag 付き TIP47 FL、TIP 1-242、TIP 1-140 が使用可能であることが判明した。

(5) Rab 蛋白の Env 取り込みやウイルス産生への関与の検討: Rab7、Rab9、Rab11a の3種の Rab 蛋白について siRNA による knock down や WT、DN 変異体の過剰発現による標記項目への影響を検討した。HeLa 細胞に存在する Rab9 を siRNA によって knock down したあと、HIV-1 plasmid(pNL4-3)を導入・発現させ、細胞とウイルス(培養上清)のライセートを解析した。その結果、内因性 Rab9 を siRNA によって knock down するとウイルス粒子への Env の取り込みが 40%ほど減少したが、ウイルス粒子産生にはほとんど影響が認められなかった(図4)。Rab7 に関しては、DN 変異体の過剰発現によって、ウイルス産生効率がコントロールの 40-50%に減少した。Rab11a は現在のところ十分な knock down 効率が得られず、まだその影響に関しては結論できていない。

D. 考察

TIP47 の Env のウイルス粒子への取込みに関与する役割については、論文の報告とはやや異なる結果を得たが、はっきりとした結論を出すにはさらに詳細な検討が必要と考えられる。また、Rab 蛋

白については、そのウイルス粒子産生などへの関与を示唆するデータを得たので今後確認実験を含め詳細な検討を予定している。

E. 結論

TIP47 過剰発現によるウイルス粒子への Env 取込み量の増加は、細胞内 Env レベルの増加による可能性が、また TIP47 の発現抑制実験の結果より、TIP47 のウイルス産生過程への関与が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. Miyauchi, 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 暁華、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。Fucoïdan 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

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当事項なし

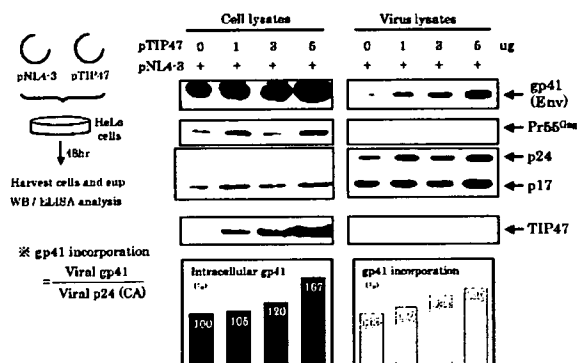


図 1. TIP47 過剰発現が Env のウイルス粒子への取込みとウイルス産生に与える影響

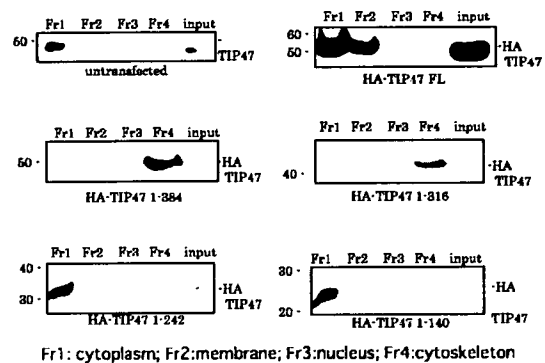


図 3. HA-tag-TIP47 の細胞内局在 (細胞分画法)

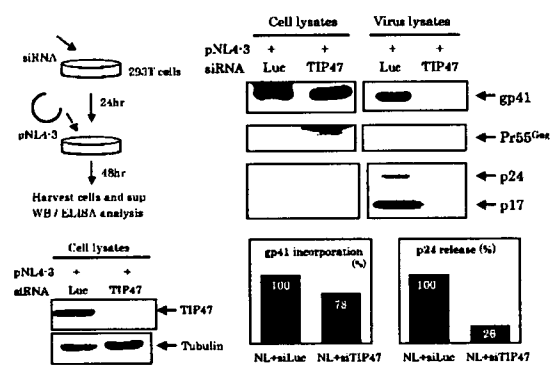


図 2. 内因性 TIP47 の発現抑制が Env のウイルス粒子への取込みとウイルス産生に与える影響

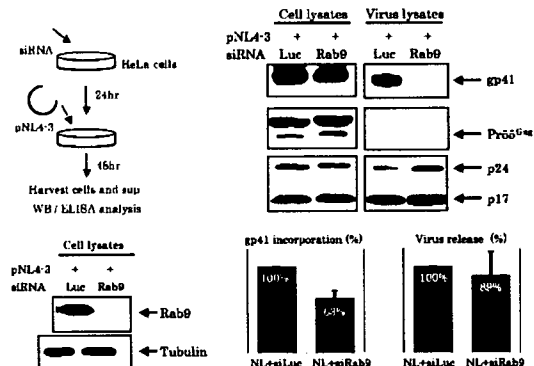


図 4. 内因性 Rab9 の発現抑制が Env のウイルス粒子への取込みとウイルス産生に与える影響

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

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 CytoTrap Two Hybrid 法を利用した 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 (10 μ M) を探索し、酵母での Gag-Gag 相互作用を特異的に阻害する 6 個の候補化合物を見いだした。本年度はこの 6 個の高等真核細胞での抗 HIV 活性を調べた。HIV-1 を MT-4 Luc 細胞に感染させこれらの 6 個の添加したところ、化合物 172A6 と 34A8 に濃度依存的な抗 HIV 活性が認められた。172A6 の方が有効であったが、その IC₅₀=25-50 μ M と高かった。細胞毒性はほとんどなかった。HIV-1 (NL43 株) を感染させた末梢血単核球に 172A6 を添加したところ、5 μ M でも増殖遅延が認められた。pNL43 を transfection した HeLa 細胞に最終濃度 3-50 μ M で 172A6 を添加して調べたところ、172A6 は Gag 蛋白発現を阻害しないが、濃度依存的に粒子産生を阻害することが判明した。IC₅₀ 値を下げる目的で、172A6 化合物に OH 基や CF₃ 基導入を試みたが、その IC₅₀ 値は低下しなかった。

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。

我々は新たな抗 HIV 薬の作用点として粒子形成過程に注目し、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た。昨年度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し、酵母での Gag-Gag 相互作用を阻害する化合物を 6 個見いだした。本年度はこれら 6 つの候補化合物の抗 HIV 活性を高等真核細胞 (末梢血単核球を含む) で評価するとともに、その作用機序の解明を開始した。

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 化合物/プレート×250 枚=20,000 化合物) を使用した。化合物の化学修飾は Enamine 社に依頼した。

2) 高等真核細胞における細胞毒性

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 を添加して 4 時間後に蛍光プレートリーダーで蛍光を測定した。また 96 穴プレートに 293FT, HeLa, Jurkat 細胞を調製し化合物を添加して培養した。MTT を添加して 3 時間後に DMSO を加え、吸光度を測定した。

3) 抗 HIV 活性

MT-4 Luc 細胞 (luciferase を発現する MT-4 細胞) に HIV-1 (HXB2 株) を感染させ、化合物 (50 μ M から段階希釈) を添加した。6 日後に細胞を可溶化し、luciferase 活性を測定した。

CD8(+)細胞を除去したヒト末梢血単核球に HIV-1 (HXB2 株) を感染させ、5, 25 μ M の化合物を添加し 3 週間培養した。経時的に培養上清中の HIV-1 p24CA 量を ELISA (Zeptomatrix 社) で定量した。

HeLa 細胞に pNL43 を transfection し、化合物 (50 μ M から段階希釈) を添加した。2 日後に