

200727038A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

抗ウイルス作用をもつ宿主防御因子APOBEC3GとHIV-1 Vifとの結合領域  
および特性の解明と、その阻害化合物の検索に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

研究代表者 武田 哲

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

総括研究報告

抗ウイルス作用をもつ宿主防御因子APOBEC3GとHIV-1 Vifとの結合領域および特性の  
解明と、その阻害化合物の検索に関する研究 ----- 1

武田 哲

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者：武田 哲（国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員）

**研究要旨**

今日のHIV-1感染症の標準的な治療方法として多剤併用療法が定着し、疾病予後の改善に大きな成果が挙がってきているが、副作用や薬剤耐性ウイルスの出現の問題を克服するためには、一つでも多く選択可能な治療薬剤を開発することが求められている。そこで、私は宿主の抗ウイルス因子であるAPOBEC3G (A3G)とHIV-1 Vifタンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び生化学的解析により両者の結合特性を解明し、抗HIV-1薬剤を開発に結びつくような基礎研究を行うことを目的として研究を行った。A3Gと核酸の結合に影響を及ぼす因子としては塩濃度やZnキレート剤が、A3GとVifとの結合に影響を及ぼす因子としてはZnキレート剤が確認された。Mg濃度やpHはそのどちらにも影響しなかった。これらの一連の結果よりライブラリスクリーニング用の*in vitro*結合実験用ELISA系に必要な至適条件が分かった。また、A3Gが一本鎖核酸に結合した場合、HIV-1の逆転写酵素の伸長反応を阻害する現象を見いだした。この現象はA3GのDeaminase活性とは関係なく見られたこと、A3Gと逆転写酵素の結合が認められなかったことから、A3Gは物理的に逆転写酵素のスライディングを阻害すると考察された。この現象がA3Gの抗ウイルス作用のDeaminase非依存的な分子メカニズムであることが分かった。

**A. 研究目的**

められている

今日の HIV-1 感染症の標準的な治療方法として多剤併用療法が定着し、疾病予後の改善に大きな成果が挙がってきている。しかし、HIV-1 が既存の薬剤に耐性を獲得したために十分な治療を行えない症例も多数存在し、深刻な問題になっている。さらに、個々の多剤併用療法の観点では、長期的治療ゆえに、副作用や薬剤耐性ウイルスの出現を常に危惧しなければならぬ。このような困難を克服するためには、一つでも多く選択可能な、かつ既存のものとは交差しない治療薬剤を開発することが求

我々の体には、本来、レトロウイルスの増殖を抑制する生体宿主因子 APOBEC3G（以下、A3G）が発現している。しかし、HIV-1 は、ウイルスタンパク Vif を感染細胞で発現し、A3G を細胞内より枯渇させ、宿主防御機構から逃れることができる。

本研究では、宿主の A3G の生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発するための基礎研究を行う。宿主の抗ウイルス因子である APOBEC3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び

生化学的解析により両者の結合特性を解明し、抗 HIV-1 薬剤を開発に結びつくような基礎研究を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

A3G タンパクをバキュロウイルスの発現系を利用して発現し、酵素活性をもつ A3G を精製した。A3G と核酸あるいは Vif への結合実験には Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) を、核酸結合特性の解析には Fluorescence Polarization Binding Assay (FPBA) と Single-Molecule DNA Stretching Assay (SMDSA) を行った。

(倫理面への配慮)

当研究は、遺伝子組換え実験を含むので、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守する。またクラス 3 の病原体 HIV-1 を用いた実験を含む。このため、実験計画は国立感染症研究所の組換え DNA 実験安全委員会に承認をえて同委員会の認可をえた実験者が同委員会の認定した実験室にて行なう。

## C. 研究結果

(1) A3G と Vif タンパクの結合における生化学的な特性を決定した

A3G タンパクと核酸の結合は塩濃度に強く影響され、500 nM 以上の NaCl では解離反応が

増加した。一方、Vif と A3G の結合には塩濃度による強い影響が認められなかった。EDTA による A3G の核酸への影響や Deaminase 活性への影響は認められなかったが、1,10-Phenanthroline (Zn キレーター) は両活性を強く阻害した (IC50 = 3 mM)。このことから、A3G の Zn 配位は A3G の生化学的活性をもつための構造維持に重要であることが推測された。Mg 濃度と pH の影響は A3G の核酸および Vif に対する結合に関して認められなかった。これらの一連の結果よりライブラリスクリーニング用の *in vitro* 結合実験用 ELISA 系に必要な至適条件が分かった。

(2) 抗ウイルス作用メカニズムにつながる A3G の生化学的な特性の発見した

A3G が一本鎖核酸に結合した場合、HIV-1 の逆転写酵素の伸長反応を阻害する現象を見いだした。さらに、SMDSA により A3G の核酸への結合解離速度がかなり遅い特性を見いだした。A3G と逆転写酵素の結合が認められなかったことから、A3G は物理的に逆転写酵素のスライディングを阻害すると考察された。この現象が A3G の抗ウイルス作用の Deaminase-independent な分子メカニズムであること提唱した。

#### D. 考察

最近、A3G と Vif の結合に重要な A3G の領域（アミノ酸配列上）が Malim らのグループによって報告された。現在、我々と共同研究を進めている Gronenborn のグループによるコンピューターモデルを用いた構造解析の結果から、その領域が A3G が核酸に結合に重要であると考えられる領域の近傍である結果が得られた。さらに興味深いことに、それらの領域が構造上 Zn フィンガー (ZnF 1) にも近いことが分かった。我々の研究で得られた結果 (Zn 配位が A3G の核酸結合と酵素活性に必須である) を加味すると、Vif が A3G に結合した場合、A3G に 2 通りの生化学的あるいは構造的な変化が起こりうる可能性が考えられる。すなわち、Vif が A3G の Zn 配位に、あるいは A3G の核酸結合部位に影響を与える（あるいは両方の）可能性である。本年度はこれらの可能性も検証しながら、構造的／生化学的な結合特性を解析する必要があると考えられる。

#### E. 結論

ウイルスの構成因子（逆転写酵素など）やその複製に必要な生体因子（ケモカインレセプターなど）を阻害する既存の抗 HIV-1 薬剤とは

全く異なり、生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発するための基礎研究を行っている。宿主の抗ウイルス因子である A3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び生化学的解析により両者の結合特性を解明し、新規抗 HIV-1 薬剤開発への新たな道を模索している。平成 19 年度は、初年度として A3G と Vif あるいは核酸への結合特性を生化学的に進め、ケミカルスクリーニングに必要な至適条件を見出した。さらに、結合特性の解析の中で、A3G の抗ウイルス作用の分子メカニズムにつながる重要な現象も見いだした。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし