

200727039A

平成19年度厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H19-エイズ-若手-003

多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測
と新規抗 HIV 薬開発

総括・分担 研究報告書

平成19年4月

主任研究者 川下 理日人

大阪大学大学院薬学研究科・助教

目次

I. 平成19年度 総括研究報告書	1
主任研究者 川下 理日人 (大阪大学大学院薬学研究科 微生物動態学分野)	
II. 平成19年度 分担研究報告書	8
1. HIV プロテアーゼにおける変異傾向予測のためのプログラム開発	8
岡本 晃典 (大阪大学大学院 薬学研究科 微生物動態学分野)	
2. AE型 HIV プロテアーゼの薬剤耐性変異の解析	12
中村 昇太 (大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター)	
3. HIV プロテアーゼにおける配列解析および進化予測のためのプログラム開発	15
後藤 直久 (大阪大学微生物病研究所附属 遺伝情報実験センター ゲノム情報解析分野)	
4. タイにおける HIV 配列の特徴及び進化傾向の予測	18
U. Chandimal de Silva (大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター)	
III. 研究成果の刊行物・一覧	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	23

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総括研究報告書

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

主任研究者：川下 理日人（大阪大学大学院 薬学研究科 微生物動態学分野 助教）

当該年度は3年計画の1年目にあたる。

研究要旨

HIV 感染症は種々の抗 HIV 薬の開発やカクテル療法（HAART）の確立により、先進諸国においては慢性疾患へと変化している。しかしながら、HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであり、現実として多剤耐性ウイルスも出現している。それゆえ、既存のカクテル療法に限界が生じるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっており、これらは既存のカクテル療法と組み合わせることにより、さらに大きな効果を上げるものと期待されている。しかし、それら新しい作用機序を有する抗 HIV 薬においても、耐性ウイルスが既に報告されており、これらに対して何らかの対策を取る必要が生じている。

そこで、もしこれらの耐性変異が生じる位置、およびそれらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルスが生じた際にも速やかに対処できると思われる。よって、本研究ではそのような背景下、理論面と実験面から研究を行う予定であり、本年度はプロテアーゼの網羅的な配列解析と平均配列に関するドッキングスタディを行うことにより、薬剤耐性プロテアーゼに関する基礎データの蓄積を行い、膜融合阻害剤に関してはランダムスクリーニングを用いることで、より相互作用の強いペプチドを発見した。

分担研究者（4名）

岡本晃典（大阪大学大学院 薬学研究科 微生物動態学分野 助教）

中村昇太（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任助教）

後藤直久（大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター ゲノム情報解析分野 助教）

U. Chandimal de Silva（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任研究員）

A. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであるため、多剤耐性ウイルスが出現しており、既存の HAART に限界が生ずるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。しかし、それらに対しても耐性ウイルスが既に報告されており、さらなる対策が必要となる。

そこでこれら耐性変異が生じる位置、それらの

構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに対処可能となる。よって、本研究ではそのような背景下、以下の4つの項目に沿って研究を行う。

①耐性ウイルスに対する網羅的配列解析と正の淘汰圧を持つ変異部位の確定 ②多剤耐性ウイルス蛋白質に対する構造予測および阻害剤予測 ③今後起こりうる耐性変異の予測とそれら変異蛋白質の構造予測 ④構造未知蛋白質の X 線結晶構造解析

本年度はまず、HIV-1 ウイルスのサブタイプごとにおける配列解析を行い、保存部位、非保存部位に分類する。また、多剤耐性ウイルスのプロテアーゼなどに対して、ホモロジーモデリング等による構造予測を行い、それに対応する阻害剤を予測する。一方、実験面からは、合わせて多剤耐性ウイルスプロテアーゼなどの X 線構造解析を行う。

B. 研究方法

<プロテアーゼ阻害剤>

(参考 1、2 も参照のこと)

①Los Alamos の HIV データベースより、8 カ国・地域に関する AE 型および B 型の HIV-1 プロテアーゼの核酸配列を入手し、それらの核酸配列をアミノ酸配列に翻訳した。

②カテゴリごとにアミノ酸配列をアライメントした後、残基ごとに最も頻度の高いアミノ酸を決定し、これらの組み合わせからなる配列をそのカテゴリ中での平均配列(表 1)と決定した。さらにサブタイプ AE と B の二つグループに分け、各グループ間の平均配列の差を検討した。なお、同じ平均配列は統合した。

③結晶構造 (PDB ID: 1HVC) をテンプレートとし、統合計算化学ソフト MOE を用いて、平均配列のホモロジーモデリングを行った。

④これらに対し、MOE DOCK 及び FlexSIS を用いて、9 種のプロテアーゼ阻害剤とのドッキングスタディを行い、それらの結果(表 2)と実際の薬剤耐性に関する実験結果との比較を行っている。

また、中村はタイで主に蔓延しているサブタイプ AE 型のプロテアーゼが、既存のサブタイプ B 型で開発されたプロテアーゼ阻害剤に対してどのような感受性や耐性を示すか調べるために、HIV 陽性患者のうち、プロテアーゼ阻害剤に感受性を持つサンプルと、プロテアーゼ阻害剤を 5 年間用いてきたサンプルを入手し、遺伝子解析やドッキングシミュレーションによる比較、薬剤結合評価を行った。

<膜融合阻害剤>

①HIV データベースからすべての AE 型(236 個)、B 型(2325 個)、AG 型(83 個)の HIV-1 gp41 のアミノ酸配列を入手し、その中の C-HR 部分の 34 残基を抽出した。なお、抽出時に同じ配列となった場合はこの際に消去した。

②MOE を用いて、これらの配列全てに対しホモロジーモデリングを行った。構造最適化後、各モデルの全エネルギーを計算することにより、それらの安定性を測定した。

③より膜融合阻害活性の強いペプチドを探索するために、②において最も安定性が高い配列を元に、各残基を変異させ、より安定性の高い配列を設計した。

(倫理面への配慮)

計算化学的手法を用いた分子設計に関しては、ヒトの遺伝子や個人情報等の利用がないため、別段考慮する必要はない。もし、研究協力者がウイルス関係の実験を行うに当たり、個人の血液サンプル等を用いる場合は、倫理委員会の規定に則ると共に、担当研究者以外にその個人情報が漏れないよう、十分配慮する。

C. 研究結果

<プロテアーゼ阻害剤>

先の平均配列から、結果として共通の配列となったものを統合した計 9 つの平均配列(B 型 5 種、AE 型 4 種、図 1)に関して、ホモロジーモデリングとドッキングスタディを行った結果、表 1 のと

おりとなり、ドッキングスコアでは、nelfinavir が他のものと比べて高スコアとなった。

また、中村による研究では、得られたサンプルの遺伝子解析の結果、明らかに耐性変異と思われる遺伝子変異が見つかった。また、ドッキングシミュレーションの結果、用いた 2 種の薬剤だけでなく、9 種中 6 種の薬剤に対して耐性を獲得している可能性が示唆された。

<膜融合阻害剤>

具体的な C-HR 類似ペプチドの配列は公開しないが、ある残基を変異させることにより、N-HR との相互作用エネルギーおよび C-HR 類似ペプチドの安定性が大幅に増加した。以前の研究で、計算化学的手法による相互作用エネルギーと実験的な膜融合阻害活性にはある程度の相関が認められることを報告しており、現在、これらを候補ペプチドとして、それらペプチドの合成、および生物活性の評価を研究協力者（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 亀岡正典特任准教授）に依頼している。

D. 考察

<プロテアーゼ阻害剤>

現在、平均配列に対するスコアリングは終了したが、これだけでは耐性変異の有無を判断することは不可能であるため、今後は耐性変異を有する配列を用いて同様の検討を行い、平均配列との差を取ることで、耐性の有無に関する評価を行う予定である。

しかしながら、MOE Dock によるスコアリングでは、ネルフィナビルが課題評価される傾向にあり、他のドッキングソフトによる検討、および補正の検討なども合わせて行っていきたい。

また、中村による研究では、耐性を有する構造が示唆されているが、実際の構造的な確認は不十分であるため、それらの確認を行う予定である。

<膜融合阻害剤>

配列に関する詳細な情報は省くが、この変異を

導入することにより、構造的には C-HR 類似ペプチドの α -ヘリックスがより固定され、また、N-HR とも新たな相互作用を生むため、相互作用エネルギーおよびペプチドの安定性ともに増大したものと考えられる。

E. 結論

今回我々は、配列解析、ホモロジーモデリング、ドッキングスタディなど、計算機を用いた手法を利用して、プロテアーゼおよび膜融合阻害剤に関する情報を得、一部では阻害剤開発に直結するペプチドの設計を行った。今後、これらの情報を活用して、実際の薬剤耐性ウイルスに対する適用、および阻害剤候補となるペプチドに関しては、実験的な評価を行う予定であり、これらが首尾良く成功すれば、エイズ対策への強力な手段となりうると考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohgaru, T.; Shimizu, R.; Okamoto, K.; Kawashita, N.; Kawase, M.; Shirakuni, Y.; Nishikiori, R.; Takagi, T. Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic Partial Least Squares. *J.Chem.Inf.Model.*, in press.
- 2) Nishikiori, R.; Makino, Y.; Ochi, Y.; Yamashita, Y.; Okamoto, K.; Kawashita, N.; Takahara, J.; Yasunaga, T.; Takagi, T.; Kawase, M. Development of Fingerprint Verification Type Self-Organized Map Applied to Profiling Seized Methamphetamine. *J. Comput. Aided Chem.*, 9, 30-36 (2008).
- 3) Nishikiori, R.; Yamaguchi, M.; Takano, K.; Enatsu, T.; Tani, M.; de Silva, U. C.; Kawashita, N.; Takagi, T.; Morimoto, S.; Hangyo, M.; Kawase, M. Application of partial least square on quantitative

analysis of L-, D-, and DL-tartaric acid by terahertz absorption spectra, *Chem. Pharm. Bull.*, 56, 305-307, (2007).

2. 学会発表

<国際学会>

- 1) Norihito Kawashita, Yu-Shi Tian, Masashi Yasuda, U. Chandimal de Silva, Shota Nakamura, Kousuke Okamoto, Naohisa Goto, Rika Nishikiori, Masanori Kameoka, Masaya Kawase, Teruo Yasunaga, Kazuyoshi Ikuta, Tatsuya Takagi
Computational Studies for HIV Envelope Protein.
The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2007.10

<国内学会>

- 1) Yu-Shi Tian, Norihito Kawashita, Masashi Yasuda, Akiko Kawaguchi, Noriyuki Yamashita, U. Chandimal de Silva, Shota Nakamura, Kousuke Okamoto, Naohisa Goto, Rika Nishikiori, Masanori Kameoka, Masaya Kawase, Teruo Yasunaga, Kazuyoshi Ikuta, Tatsuya Takagi
Computational alanine scanning for the 6-helix bundle model between HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat and membrane fusion inhibitor C34
Computational Biology and Chemistry, 広島、2007年10月
- 2) 錦織理華, 米倉聡, 岡本晃典, 大軽貴典, 松浦晶子, 越智雪乃, 森本正太郎, 齊藤直, 川下理日人, 安永照雄, 川瀬雅也, 高木達也
PLS アルゴリズムを用いたノンパラメトリック回帰手法の改良 情報化学討論会、京都、2007年10月
- 3) 山崎広之, 大軽貴典, 岡本晃典, 川下理日人,

高原淳一, 錦織理華, 川瀬雅也, 安永照雄, 高木達也

回帰判別分析の改良 情報化学討論会、京都、2007年10月

- 4) 石塚賀彦, 大軽貴典, 岡本晃典, 川下理日人, 高原淳一, 錦織理華, 安永照雄, 川瀬雅也, 高木達也

Druglikeness を有する化合物の oral bioavailability 予測 構造活性相関シンポジウム、京都、2007年10月

- 5) 川下理日人、田雨時、中村昇太、岡本晃典、後藤直久、U. Chandimal de Silva、亀岡正典、川瀬雅也、安永照雄、生田和良、高木達也

蛋白質間相互作用計算によるアミノ酸残基と HIV gp41 膜融合阻害剤の阻害活性との関係
日本エイズ学会学術集会、広島、2007年11月

- 6) 川下理日人、田雨時、安田匡志、川口亜希子、山下典之、U. Chandimal de Silva、中村昇太、後藤直久、錦織理華、岡本晃典、亀岡正典、川瀬雅也、安永照雄、生田和良、高木達也

計算化学的手法による HIV 膜融合阻害剤のアミノ酸残基と膜融合阻害活性との関連性考察
フィジカルファーマフォーラム 2008、東京、2008年3月

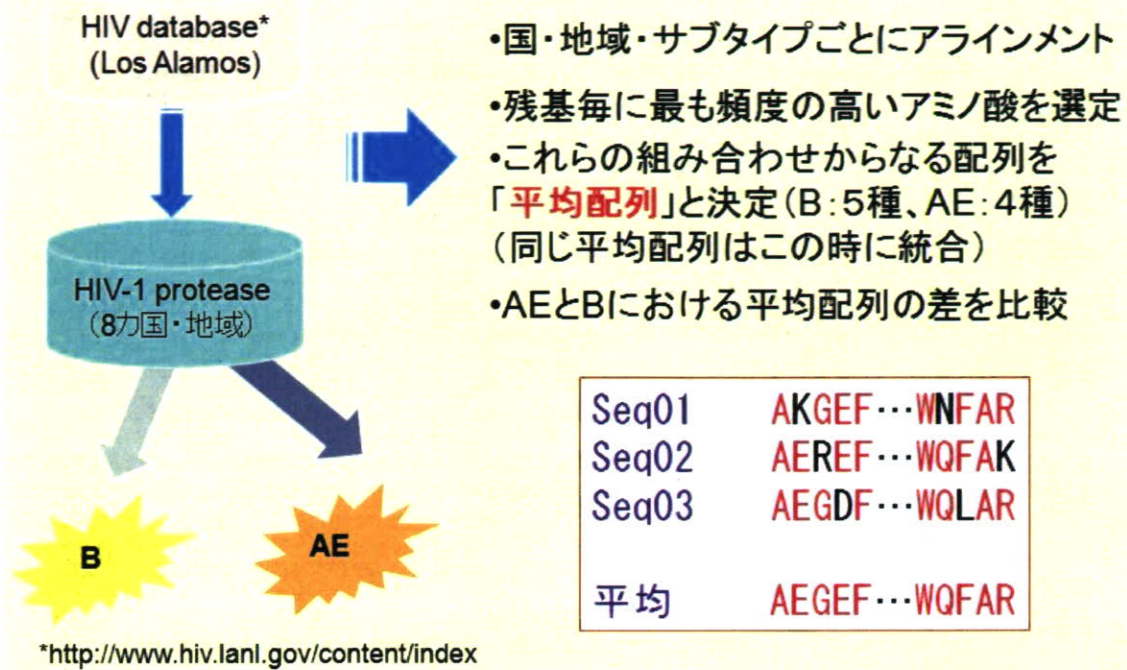
- 7) 川下理日人、田雨時、安田匡志、岡本晃典、錦織理華、亀岡正典、安永照雄、生田和良、川瀬雅也、高木達也

HIV 膜融合阻害剤 C34 に関する構造活性相関研究

日本薬学会第 128 年会、横浜、2008年3月

- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）なし。

(参考1) プロテアーゼの配列解析



(参考2) プロテアーゼ阻害剤とのドッキングスタディ

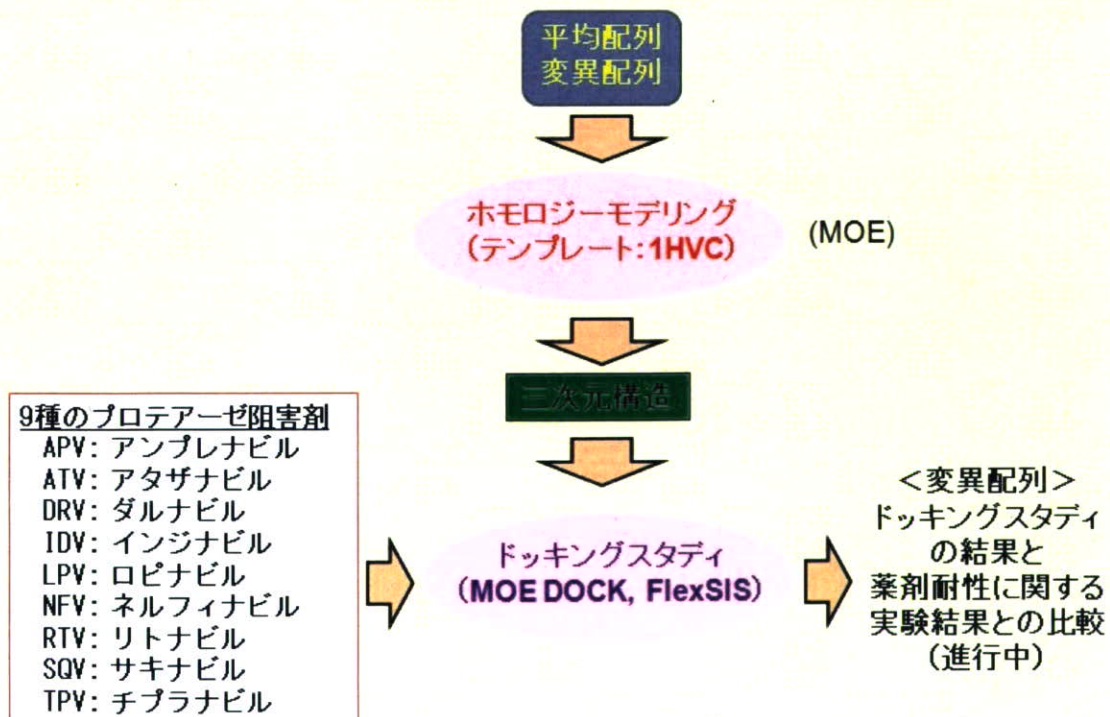


図1 得られた9つの平均配列

PR1	AE_JP(139)	PQITLWQRPFVTVKIGGQLIEALLDTGADDTVLEDINLPGKWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNMLTQIGCTLNF
PR2	AE_AFRICA(21)&AE_CN(80)&AE_TW(11)&AE_US(7)&AE_TH(385)	PQITLWQRPLVTVKIGGQLKEALLDTGADDTVLEDINLPGKWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQILIEICGKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNMLTQIGCTLNF
PR3	AE_DE(4)	PQITLWQRPIVTVKIEGQIREALLDTGADDTVLEDINLPGKWKPKMIGGI GGFVKVRQYDQ-VIEICGKRA-GTVLVGPTPANIIGRNMLTQIGCTLNF
PR4	AE_GB(4)	PQITLWQRPIVTVKIGGQLKEALLDTGADDTVLEDINLPGKWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQILIEICGKKAIGT-LVGPTFVNIIGRNMLTQIGCTLNF
PR5	B_CN(128)	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEDMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGHKAVGTVLIGPTFVNIIGRNLLTQLGCTLNF
PR6	B_AFRICA(21)	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQILIEICGKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNLLTQIGCTLNF
PR7	B_GB(693) & B_JP(169) & B_TW(33) & B_US(16275)	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGHKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNLLTQIGCTLNF
PR8	B_TH(38)	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGHKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNLLTQLGCTLNF
PR9	B_DE(524)	PQITLWQRPIVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGHKVIIGTVLVGPTFVNIIGRNMLTQIGCTLNF

表1 9つの阻害剤に対するドッキングスコア

PR1 から 9 は、図 1 の平均配列と同じ。

阻害剤名は参考 2 を参照のこと。

PR1	
Inhibitor	S
apv	-15.3724
atv	-15.5336
drv	-15.6559
idv	-15.3164
lpv	-14.2866
nfv	-25.0534
rtv	-14.3922
sqv	-16.3868
tpv	-16.5249

PR2	
Inhibitor	S
apv	-16.6566
atv	-20.3993
drv	-17.0701
idv	-19.2711
lpv	-18.7056
nfv	-27.0301
rtv	-19.6791
sqv	-19.0293
tpv	-17.4318

PR3	
Inhibitor	S
apv	-14.6171
atv	-15.5506
drv	-15.4129
idv	-14.1975
lpv	-13.9919
nfv	-22.9073
rtv	-16.5986
sqv	-14.9779
tpv	-14.1929

PR4	
Inhibitor	S
apv	-13.9981
atv	-18.1032
drv	-15.6709
idv	-14.8121
lpv	-15.5657
nfv	-24.9444
rtv	-16.3993
sqv	-15.8451
tpv	-14.9712

PR5	
Inhibitor	S
apv	-11.703
atv	-11.8731
drv	-12.4652
idv	-12.1938
lpv	-14.3459
nfv	-19.2906
rtv	-12.8394
sqv	-14.8436
tpv	-15.0503

PR6	
Inhibitor	S
apv	-10.6414
atv	-10.9402
drv	-12.7713
idv	-12.9622
lpv	-11.9838
nfv	-19.8339
rtv	-13.6058
sqv	-11.4715
tpv	-12.031

PR7	
Inhibitor	S
apv	-17.2241
atv	-14.7075
drv	-17.0858
idv	-13.1984
lpv	-16.0989
nfv	-23.7806
rtv	-17.4706
sqv	-18.3859
tpv	-15.4686

PR8	
Inhibitor	S
apv	-18.469
atv	-15.84
drv	-18.4277
idv	-22.1523
lpv	-15.2125
nfv	-30.5739
rtv	-19.4721
sqv	-15.7841
tpv	-17.2747

PR9	
Inhibitor	S
apv	-16.5224
atv	-14.7499
drv	-16.0901
idv	-17.1325
lpv	-14.9042
nfv	-25.1034
rtv	-19.2533
sqv	-17.3622
tpv	-15.9815

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

分担研究者：岡本 晃典（大阪大学大学院 薬学研究科 微生物動態学分野 助教）

分担研究課題：HIV プロテアーゼにおける変異傾向予測のためのプログラム開発

研究要旨

HIV 感染症は種々の抗 HIV 薬の開発やカクテル療法（HAART）の確立により、先進諸国においては慢性疾患へと変化している。しかしながら、HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであり、現実として多剤耐性ウイルスも出現している。それゆえ、既存のカクテル療法に限界が生じるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっており、これらは既存のカクテル療法と組み合わせることにより、さらに大きな効果を上げるものと期待されている。しかし、それら新しい作用機序を有する抗 HIV 薬においても、耐性ウイルスが既に報告されており、これらに対して何らかの対策を取る必要が生じている。そこで、もしこれらの耐性変異が生じる位置、およびそれらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルスが生じた際にも速やかに対処できると思われる。

本分担研究では、HIV プロテアーゼの網羅的な配列解析とそれに関するプログラム開発を行うことにより、それらの平均配列を抽出し、主任研究者らによるホモロジーモデリング、ドッキングスタディなどにより、プロテアーゼおよび膜融合阻害剤に関する情報提供をすることができた。

A. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであるため、多剤耐性ウイルスが出現しており、既存の HAART に限界が生ずるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。しかし、それらに対しても耐性ウイルスが既に報告されており、さらなる対策が必要となる。

そこでこれら耐性変異が生じる位置、それらの構造変化を前もって予測することができれば、耐

性ウイルス出現時にも速やかに対処可能となる。

そのような背景下、本年度はまず耐性ウイルスに対する網羅的配列解析と正の淘汰圧を持つ変異部位の確定をめざし、HIV-1 プロテアーゼのサブタイプごとにおける配列解析とそれに関連するプログラム開発を行った。

B. 研究方法

（参考 1 も参照のこと）

① Los Alamos の HIV データベースより、8 カ国・地域に関する AE 型および B 型の HIV-1 プロテアーゼの核酸配列を下記のように入手した。

AE_AFRICA(21) AE_CN(80) AE_DE(4)
AE_GB(4) AE_JP(139) AE_TW(11)
AE_US(7) AE_TH(385)
B_AFRICA(21) B_CN(128) B_DE(524)
B_GB(693) B_JP(169) B_TW(33)
B_US(16275) B_TH(38) ()内は配列数。

②MEGA 3を用いて、核酸配列をアミノ酸配列に翻訳した。

③各カテゴリにおいて、最も出現頻度の高い配列を決定するため、各配列のアミノ酸構造を調べた。まず MAFFT を用いて、カテゴリ毎にアミノ酸配列をアライメントした。次に残基毎で出現頻度の最も高いアミノ酸を抽出するプログラムを作成し、この組み合わせからなる配列を各カテゴリにおける平均配列と決定した。さらにサブタイプ AE と B の二つグループに分け、各グループ間の平均配列の差を検討した。なお、同じ平均配列は別途作成したプログラムにより消去した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

本検討で得られた平均配列は図 1 の通りである。最初に得られた 16 個の平均配列 (B 型 8 種、AE 型 8 種) のうち、結果として共通の配列となったものを統合したところ、計 9 つの平均配列 (B 型 5 種、AE 型 4 種) が得られた (図 1)。

D. 考察

表 1 に示した平均配列のうち、サブタイプ AE に特徴的なアミノ酸 (緑字) は Val13、Asp35、Ile36、Lys41、Lys69、Met89 であった。その他、地域ごとに特徴的なアミノ酸 (赤字) は Phe10 (AE_JP)、Ile20 (AE_JP)、Leu63 (AE_TH)、Asp35 (B_CN)、Val72 (B_CN)、Ile77 (B_CN)、Leu93 (B_CN)、Ile10 (B_DE)、Val71 (B_DE)、Met90 (B_DE) などが見られた。もしサブタイプ AE を標的とした阻害剤

開発を行う場合、それらに特徴的であり、かつ耐性変異となる Glu35Asp、Met36Ile などに注意して計算機による評価系を構築する必要があるだろう。

E. 結論

今回我々は、HIV プロテアーゼの網羅的な配列解析を行うことにより、それらの平均配列を抽出することができた。本平均配列は主任研究者らにより、ホモロジーモデリング、ドッキングスタディなどの計算機を用いた手法を利用して、プロテアーゼおよび膜融合阻害剤に関する情報を得るための一助となった。また、本結果を変異傾向の把握などの、更なる配列解析に利用すると共に、本解析手法を逆転写酵素などの蛋白質にも拡張することで、プロテアーゼ同様の検討を行いたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

<欧文>

- 1) Wu, X.; Iguchi, T.; Itoh, N.; Okamoto, K.; Takagi, T.; Tanaka, K.; Nakanishi, T. Ascorbic Acid transported by sodium-dependent vitamin C transporter 2 stimulates steroidogenesis in human choriocarcinoma cells. *Endocrinology*, 149, 73-83, (2008).
- 2) Nishikiori, R.; Makino, Y.; Ochi, Y.; Yamashita, Y.; Okamoto, K.; Kawashita, N.; Takahara, J.; Yasunaga, T.; Takagi, T.; Kawase, M. Development of Fingerprint Verification Type Self-Organized Map Applied to Profiling Seized Methamphetamine. *J. Comput. Aided Chem.*, 9, 30-36 (2008).
- 3) Ohgaru, T.; Shimizu, R.; Okamoto, K.; Kawase, M.; Shirakuni, Y.; Nishikiori, R.; Takagi, T. Ordinal Classification using Comparative Molecular Field Analysis. *J. Chem. Inf. Model.*, in press.
- 4) Ohgaru, T.; Shimizu, R.; Okamoto, K.; Kawashita,

N.; Kawase, M.; Shirakuni, Y.; Nishikiori, R.; Takagi, T. Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic Partial Least Squares. *J.Chem.Inf.Model.*, in press.

2. 学会発表

<国際学会>

- 1) Kawashita, N.; Tian, Y.-S.; Yasuda, M.; de Silva, U. C.; Nakamura, S.; Okamoto, K.; Goto, N.; Nishikiori, R.; Kameoka, M.; Kawase, M.; Yasunaga, T.; Ikuta, K.; Takagi, T.
Computational Studies for HIV Envelope Protein.
The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2007.10

<国内学会>

- 1) Tian, Y.-S.; Kawashita, N.; Yasuda, M.; Kawaguchi, A.; Yamashita, N.; de Silva, U. C.; Nakamura, S.; Okamoto, K.; Goto, N.; Nishikiori, R.; Kameoka, M.; Kawase, M.; Yasunaga, T.; Ikuta, K.; Takagi T.
Computational alanine scanning for the 6-helix bundle model between HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat and membrane fusion inhibitor C34
Computational Biology and Chemistry, 広島、2007年10月
- 2) 錦織理華, 米倉聡, 岡本晃典, 大軽貴典, 松浦晶子, 越智雪乃, 森本正太郎, 斉藤直, 川下理日人, 安永照雄, 川瀬雅也, 高木達也
PLS アルゴリズムを用いたノンパラメトリック回帰手法の改良 情報化学討論会、京都、2007年10月
- 3) 山崎広之, 大軽貴典, 岡本晃典, 川下理日人, 高原淳一, 錦織理華, 川瀬雅也, 安永照雄, 高木達也
回帰判別分析の改良 情報化学討論会、京都、2007年10月
- 4) 石塚賀彦, 大軽貴典, 岡本晃典, 川下理日人, 高原淳一, 錦織理華, 安永照雄, 川瀬雅也, 高木達也
Druglikeness を有する化合物の oral bioavailability

予測 構造活性相関シンポジウム、京都、2007年10月

- 5) 川下理日人、田雨時、中村昇太、岡本晃典、後藤直久、U. Chandimal de Silva、亀岡正典、川瀬雅也、安永照雄、生田和良、高木達也
蛋白質間相互作用計算によるアミノ酸残基と HIV gp41 膜融合阻害剤の阻害活性との関係
日本エイズ学会学術集会、広島、2007年11月
 - 6) 川下理日人、田雨時、安田匡志、川口亜希子、山下典之、U. Chandimal de Silva、中村昇太、後藤直久、錦織理華、岡本晃典、亀岡正典、川瀬雅也、安永照雄、生田和良、高木達也
計算法的手法による HIV 膜融合阻害剤のアミノ酸残基と膜融合阻害活性との関連性考察
フィジカルファーマフォーラム 2008、東京、2008年3月
 - 7) 川下理日人、田雨時、安田匡志、岡本晃典、錦織理華、亀岡正典、安永照雄、生田和良、川瀬雅也、高木達也
HIV 膜融合阻害剤 C34 に関する構造活性相関研究
日本薬学会第128年会、横浜、2008年3月
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）なし。

(参考1) プロテアーゼの配列解析

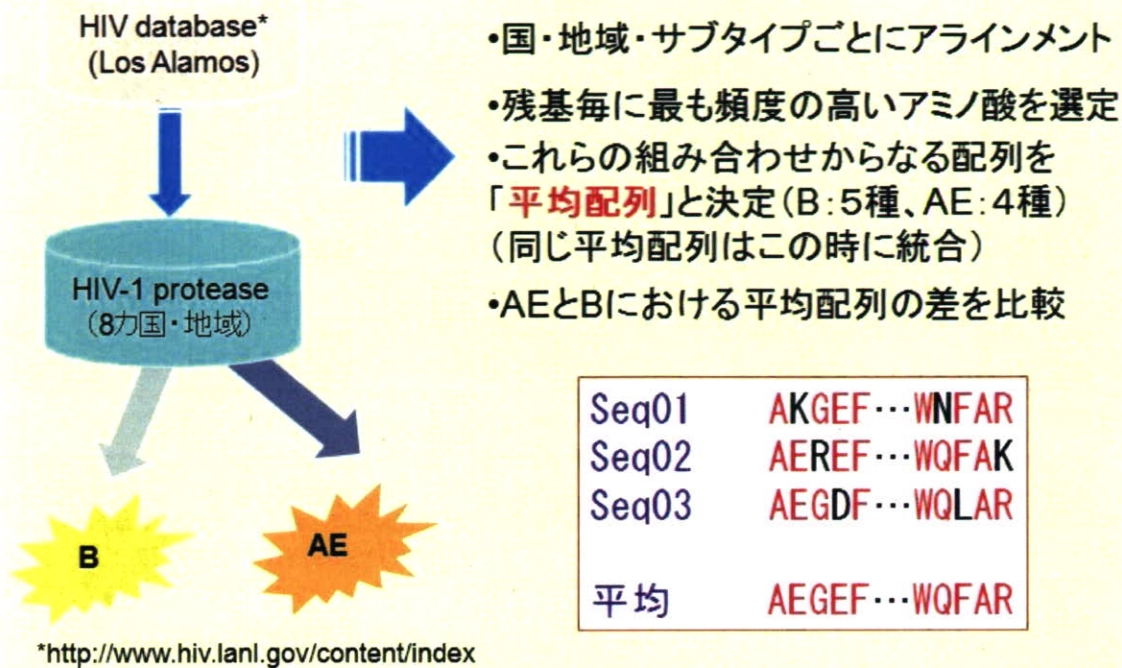


表1 得られた9つの平均配列

PR1	AE_JP(139)	PQITLWQRPFVTVKIGGQLIEALLDTGADDTVLEDINLPGKWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNMLTQIGCTLNF
PR2	AE_AFRICA(21)&AE_CN(80)&AE_TW(11)&AE_US(7)&AE_TH(385)	PQITLWQRPLVTVKIGGQLKEALLDTGADDTVLEDINLPGKWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQILIEICGKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNMLTQIGCTLNF
PR3	AE_DE(4)	PQITLWQRPIVTVKIEGQIREALLDTGADDTVLEDINLPGKWKPKMIGGI GGFVKVRQYDQ-VIEICGKRA-GTVLVGPTFANIIGRNMLTQIGCTLNF
PR4	AE_GB(4)	PQITLWQRPIVTVKIGGQLKEALLDTGADDTVLEDINLPGKWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQILIEICGKKAIGT-LVGPTFVNIIGRNMLTQIGCTLNF
PR5	B_CN(128)	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEDMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGHKAVGTVLIGPTFVNIIGRNLLTQLGCTLNF
PR6	B_AFRICA(21)	PQITLWQRPLVTVKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQILIEICGKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNLLTQIGCTLNF
PR7	B_GB(693)&B_JP(169)&B_TW(33)&B_US(16275)	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGHKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNLLTQIGCTLNF
PR8	B_TH(38)	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGHKKAIGTVLVGPTFVNIIGRNLLTQLGCTLNF
PR9	B_DE(524)	PQITLWQRPIVTVKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGI GGFIKVRQYDQIPIEICGHKVIGTVLVGPTFVNIIGRNMLTQIGCTLNF

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

分担研究者：中村 昇太（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任助教）

分担研究課題：AE 型 HIV プロテアーゼの薬剤耐性変異の解析

研究要旨

サブタイプ AE 型 HIV 由来プロテアーゼの薬剤抵抗性を調べるためにタイの Lampang 県から臨床サンプルを取得し配列解析及びドッキングシミュレーションを行った。その結果、プロテアーゼ阻害剤 (LPV, RTV) と逆転写酵素阻害剤 (AZT, DDI) の 5 年間の併用で薬剤抵抗性と予想される変異を獲得していることが明らかになった。その抵抗性の主な原因は V82F の変異であることが予測された。

A. 研究目的

Human Immunodeficiency Virus (HIV) の遺伝的多様性は非常に高く、主要な HIV では A-K までのサブタイプに分類できる。そのうち、世界で多く広がっているサブタイプは中央アジアの A 型、欧米の B 型、インド・アフリカの C 型である。これらのサブタイプ以外にも、複数の HIV サブタイプの共感染による交配によって、20 種以上の Circulating Recombinant Form: CRF が存在し、世界各地に分布している。これらサブタイプのうち、欧米の B 型の研究が先行し、抗 HIV 薬のカクテル療法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy: HAART) が開発され、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の発症を抑え込むことに成功している。しかし、サブタイプの違いによって様々な病原性、薬剤抵抗性を示すことが報告されており、世界中の HIV を抑え込めたということではない。また新たな脅威となる CRF が出現する可能性もある。

CRF01_AE 型の HIV は南アジアや東南アジアにおいて優勢な CRF である。タイにおいては約 8 割が AE 型の HIV で、残る 2 割が B 型である。タイでは薬剤のライセンス等の問題により、HAART が適用できず、国が生産している逆転写酵素阻害剤 GPOvir のみに頼っているのが現状である。一部その他の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤などの薬剤も適用され始めているが、AE 型に対する薬剤有効性評価やウイルスそのものの性質分析研究などの例は非常に少ない。

2006 年のタイ日本大使館の統計によるとタイ在留邦人数は約 4 万人、タイへの邦人入国数は約 130 万人と非常に多くの交流がある。タイで広がる感染症を対岸の火事と捉えるわけにはいかない。今後、タイにおいても様々な抗 HIV 薬の適用が始まり、プロテアーゼ阻害剤も適用され始めると考えられる。そこで本研究では AE 型 HIV のプロテアーゼの薬剤抵抗性やその機構解明を目的とし、配列解析、構造解析を行う。

B. 研究方法

1. 臨床サンプルのシーケンシング及び配列解析
タイ北部の Lampang 県の Lampang hospital の協力を得て、コホート研究の HIV 陽性患者のうち、プロテアーゼ阻害剤を長期間服用している候補者の中から 2 サンプルを選択した。これらのサンプルは 5 年間逆転写酵素阻害剤(AZT, DDI)と共にプロテアーゼ阻害剤である Kaletra (Lopinavir: LPV と Ritonavir: RTV) の投与を受けている。また薬剤投与前のサンプルの提供も受けた。これらのサンプルから Nested-RT-PCR によりプロテアーゼ領域をクローニングし、シーケンシングを行った結果、計 22 クローンの配列が得られた。

2. ホモロジーモデリングとドッキングシミュレーションによる薬剤結合評価

今回得られた AE 型プロテアーゼのコンセンサス配列と最も相同性の高いサブタイプ B 型の立体構造を Protein Data Bank から取得し、その構造を基に AE 型プロテアーゼのモデリングを Modeller9v3 (A. Sali et al) により行った。モデリングされた AE 型構造に対し、現在入手可能な 9 種類全てのプロテアーゼ阻害剤のドッキングシミュレーションを AutoDock4 (Morris G., M. et al) を用いて行った。

C. 研究結果

薬剤投与前後の塩基配列の比較解析の結果、薬剤投与後には 7 残基から 19 残基の多くの変異を引き起こしていた。共通する主なアミノ酸変異は M46I, I47A, I54V, V82F などであった。HIV Drug Resistance Database (Stanford University)には、これらの変異が薬剤抵抗に関わっている変異であると登録されていた。

ドッキングシミュレーションの結果、薬剤投与前の配列では 9 種の阻害剤全てのプロテアーゼへ

の結合反応の自由エネルギー差が負と予想された。これは薬剤がプロテアーゼに結合でき阻害活性があることを示している。投与後のサンプルのシミュレーションにおいては、投与していた LPV や RTV がプロテアーゼと結合できないことが予想された。また Atazanavir, Indinavir, Saquinavir のドッキングシミュレーションの結果、これらの薬剤に対しても変異後のプロテアーゼは抵抗性がある可能性が示唆された。どの変異が抵抗性に寄与しているか調べたところ、活性部位付近の V82F の変異によるフェニルアラニンのかさ高い側鎖が薬剤との立体障害を引き起こし、投与前の結合状態に見られた最安定コンフォメーションが投与後のプロテアーゼでは取れなくなっていたことが主な原因であると考えられた。

D. 考察

AE 型プロテアーゼの阻害剤に対する抵抗性は他のサブタイプでも報告された主要な抵抗変異を同様に獲得していた。ドッキングシミュレーションからも AE 型プロテアーゼの薬剤抵抗性が予想でき、用いた阻害剤以外の 3 種の阻害剤に対しても同時に抵抗性を獲得している可能性を示した。それ以外の阻害剤では、特に Amprenavir, Nelfinavir, Tipranavir の 3 種は投与後の構造においても安定なコンフォメーションを取っており、これらの薬剤はまだ有効であるかもしれない。

E. 結論

AE 型のプロテアーゼにおいて LPV, RTV の 5 年の服用で、プロテアーゼ阻害剤に対する抵抗変異 V82F やその他の変異が多く出現することを示した。HIV Drug Resistance Database に登録されていない変異などもあったため、それらが薬剤抵抗性にどのように影響するのか、今後、具体的な感染性試験などにより明らかにしたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lin L., Nakano H., Nakamura S., Uchiyama S., Fujimoto S., Matsunaga S., Kobayashi Y., Ohkubo T., and Fukui K., Crystal Structure of *Pyrococcus horikoshii* PPC Protein at 1.60 Å Resolution., *Proteins*, 67, 505-507 (2007).
- 2) Takahashi R., Nakamura S., Yoshida T., Kobayashi Y., and Ohkubo T., Crystallization of human nicotinamide phosphoribosyltransferase., *Acta Crystallogr. F63*, 375-377 (2007).
- 3) Ogawa K., Sonoyama T., Takeda T., Ichiki S., Nakamura S., Kobayashi Y., Uchiyama S., Nakasone K., Takayama S., Mita H., Yamamoto Y., and Sambongi Y., Roles of Shortly Connecting Disulfide Bond in the Protein Stability and Redox Function of

Shewanella violacea Cytochrome *c*₅, *Extremophiles*, 6, 797-807 (2007).

- 4) Li S., Li G., Nakamura S., Ikuta K. and Nakaya T., Reduced incorporation of SARS-CoV spike protein into viral particles due to amino acid substitutions within the receptor binding domain., *Jpn. J. Infect. Dis.*, in press.

2. 学会発表

- 1) Nakamura S., Wichukchinda N., Kameoka M., Jinopat P., Isarangkura-na-ayuthaya P., Pathipvanich P., Yasunaga T., Ikuta K., Auwanit W. and Sawanpanyalert P., The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases, Oct. 2007, (Bangkok) The resistance patterns of Protease inhibitor in HIV-1 CRF01_AE clinical isolates.

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

分担研究者：後藤 直久（大阪大学微生物病研究所附属 遺伝情報実験センターゲノム情報解析分野 助教）

分担研究課題：HIV プロテアーゼにおける配列解析および進化予測のためのプログラム開発

研究要旨

HIV 感染症は種々の抗 HIV 薬の開発やカクテル療法（HAART）の確立により、先進諸国においては慢性疾患へと変化している。しかしながら、HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであり、現実として多剤耐性ウイルスも出現している。それゆえ、既存のカクテル療法に限界が生じるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっており、これらは既存のカクテル療法と組み合わせることにより、さらに大きな効果を上げるものと期待されている。しかし、それら新しい作用機序を有する抗 HIV 薬においても、耐性ウイルスが既に報告されており、これらに対して何らかの対策を取る必要が生じている。そこで、もしこれらの耐性変異が生じる位置、およびそれらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルスが生じた際にも速やかに対処できると思われる。

本分担研究では、HIV プロテアーゼの網羅的な配列解析とそれに関するプログラム開発を行うことにより、それらの平均配列を抽出することができた。今後は、それらのデータを元に淘汰圧の抽出や変異の把握を行い、将来起こりうる進化の方向性を予測していきたい。

A. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであるため、多剤耐性ウイルスが出現しており、既存の HAART に限界が生ずるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。しかし、それらに対しても耐性ウイルスが既に報告されており、さらなる対策が必要となる。

そこでこれら耐性変異が生じる位置、それらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに対処可能となる。

そのような背景下、本年度はまず耐性ウイルスに対する網羅的配列解析と正の淘汰圧を持つ変異部位の確定をめざし、HIV-1 プロテアーゼのサブタイプごとにおける配列解析とそれに関連するプログラム開発を行った。これらの情報は今後の進化傾向の把握に役立つ物と考える。

B. 研究方法

① Los Alamos の HIV データベースより、8 カ国・地域に関する AE 型および B 型の HIV-1 プロテアーゼの核酸配列を下記のように入手した。

AE_AFRICA(21) AE_CN(80) AE_DE(4)
AE_GB(4) AE_JP(139) AE_TW(11)

AE_US(7) AE_TH(385)
B_AFRICA(21) B_CN(128) B_DE(524)
B_GB(693) B_JP(169) B_TW(33)
B_US(16275) B_TH(38) ()内は配列数。

②MEGA 3を用いて核酸配列をアミノ酸配列に翻訳し、各カテゴリにおいて最も出現頻度の高い配列を決定するため、各配列のアミノ酸構造を調べた。まず MAFFT を用いて、カテゴリ毎にアミノ酸配列をアライメントした。次に残基毎で出現頻度の最も高いアミノ酸を抽出するプログラムを作成し、この組み合わせからなる配列を各カテゴリにおける平均配列と決定した。さらにサブタイプ AE と B の二つグループに分け、各グループ間の平均配列の差を検討した。なお、同じ平均配列は別途作成したプログラムにより消去した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

本検討を行った結果、サブタイプ B が 8 種、CRF01_AE が 8 種の計 16 個の平均配列を得た。このうち共通配列を統合したところ、サブタイプ B が 5 種、CRF01_AE が 4 種、計 9 つの平均配列 (B 型 5 種、AE 型 4 種) を得た。

D. 考察

9 つの平均配列のうち、4 つの CRF01_AE に特徴的なアミノ酸は Val13、Asp35、Ile36、Lys41、Lys69、Met89 であった。その他、特徴的なアミノ酸として、日本 CRF01_AE 特有の Phe10、Ile20、タイ CRF01_AE 特有の Leu63、中国サブタイプ B 特有の Asp35、Val72、Ile77、Leu93、ドイツサブタイプ B 特有の Ile10、Val71、Met90 などが見られた。

これらのうちいくつかは、HIV resistance database に登録済みの耐性変異として報告されているものもあり、耐性変異を獲得していった進化傾向把握の鍵となると考えられる。

E. 結論

今回我々は、HIV プロテアーゼの網羅的な配列解析を行うことにより、それらの平均配列を抽出することができた。本平均配列は主任研究者らにより、ホモロジーモデリング、ドッキングスタディなどの計算機を用いた手法を利用して、プロテアーゼおよび膜融合阻害剤に関する情報を得るための一助となった。

今後は、本結果を地域・時代・サブタイプ毎に、さらなる詳細な解析を行って、過去の変異傾向、変異残基の特長を把握すると共に、これらのデータを利用して、進化傾向を予測するプログラム開発へと活かしたいと考えている。また、本研究が首尾良く進行すれば、同様の検討を逆転写酵素などの蛋白質にも拡張したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

<欧文>

1) Goto, N.; Kurokawa, K.; Yasunaga T.

Analysis of invariant sequences in 266 complete genomes

Gene, 401, 172-180, (2007).

2) Lapp, H.; Bala, S.; Balhoff, J. P.; Bouck, A.; Goto, N.; Holder, M.; Holland, R.; Holloway, A.; Katayama, T.; Lewis, P. O.; Mackey, A. J.; Osborne, B. I.; Piel, W. H.; Kosakovsky Pond, S. L.; Poon, A. F. Y.; Qiu, W.-G.; Stajich, J. E.; Stoltzfus, A.; Thierer, T.; Vilella, A. J.; Vos, R. A.; Zmasek, C. M.; Zwickl, D. J.; Vision, T. J.

The 2006 NESCent Phyloinformatics Hackathon: a field report,

Evolutionary Bioinformatics, 3, 357-366, (2007).

2. 学会発表

<国際学会>

1) Kawashita, N.; Tian, Y.-S.; Yasuda, M.; de Silva, U. C.; Nakamura, S.; Okamoto, K.; Goto, N.; Nishikiori, R.; Kameoka, M.; Kawase, M.; Yasunaga, T.; Ikuta, K.; Takagi, T.

Computational Studies for HIV Envelope Protein.

The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2007.10

<国内学会>

1) Tian, Y.-S.; Kawashita, N.; Yasuda, M.; Kawaguchi, A.; Yamashita, N.; de Silva, U. C.; Nakamura, S.; Okamoto, K.; Goto, N.; Nishikiori, R.; Kameoka, M.; Kawase, M.; Yasunaga, T.; Ikuta, K.; Takagi T.

Computational alanine scanning for the 6-helix bundle model between HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat and membrane fusion inhibitor C34

Computational Biology and Chemistry, 広島、2007

年 10 月

3) 川下理日人、田雨時、中村昇太、岡本晃典、後藤直久、U. Chandimal de Silva、亀岡正典、川瀬雅也、安永照雄、生田和良、高木達也

蛋白質間相互作用計算によるアミノ酸残基と HIV gp41 膜融合阻害剤の阻害活性との関係

日本エイズ学会学術集会、広島、2007 年 11 月

4) 川下理日人、田雨時、安田匡志、川口亜希子、山下典之、U. Chandimal de Silva、中村昇太、後藤直久、錦織理華、岡本晃典、亀岡正典、川瀬雅也、安永照雄、生田和良、高木達也

計算化学的手法による HIV 膜融合阻害剤のアミノ酸残基と膜融合阻害活性との関連性考察

フィジカルファーマフォーラム 2008、東京、2008 年 3 月

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
なし。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

分担研究者：U. Chandimal de Silva（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任研究員）

分担研究課題：タイにおける HIV 配列の特徴及び進化傾向の予測

研究要旨

HIV 感染症は種々の抗 HIV 薬の開発やカクテル療法（HAART）の確立により、先進諸国においては慢性疾患へと変化している。しかしながら、HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであり、現実として多剤耐性ウイルスも出現している。それゆえ、既存のカクテル療法に限界が生じるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっており、これらは既存のカクテル療法と組み合わせることにより、さらに大きな効果を上げるものと期待されている。しかし、それら新しい作用機序を有する抗 HIV 薬においても、耐性ウイルスが既に報告されており、これらに対して何らかの対策を取る必要が生じている。そこで、もしこれらの耐性変異が生じる位置、およびそれらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルスが生じた際にも速やかに対処できると思われる。

本分担研究では、タイに普及している HIV の配列解析により、それぞれのサブタイプ及びモザイク形ウイルスのそれぞれの地域にあたっての普及程度に関する情報提供及び新しいモザイク形ウイルスを発見することができた。

A. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであるため、多剤耐性ウイルスが出現しており、既存の HAART に限界が生ずるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。しかし、それらに対しても耐性ウイルスが既に報告されており、さらなる対策が必要となる。

そこでこれら耐性変異が生じる位置、それらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに対処可能となる。

そのような背景下、本年度はまず新しいモザイク形ウイルスの発見を目指して、細胞培養により一人の患者の中に存在する数少ないあるクアシスピシーズのウイルスを選択的に見つけ出す方法を設計し、この有効性を確認するためタイの3地域から血液サンプルを収集し、実験を行った。

B. 研究方法

- ①タイ王国ランパン県、プーケット県とトラン県の病院から81検体の血液サンプルとそれぞれの患者によるアンケートを入手した。
- ②患者血液からPBMCを分離し、健康な人のPBMCと培養し、一部のサンプルからウイルスを分離でき、さらにMT-4細胞に感染した。