

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

- I. 平成20年度 総括・分担研究報告書
- II. 平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者

武 部 豊

平成21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

- I. 平成20年度 総括・分担研究報告書
- II. 平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者

武 部 豊

平成21（2009）年3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

I. 平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

武 部 豊

平成21 (2009) 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		
1. 武部 豊	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	1 - 11
II. 分担研究報告書		
1. 武部 豊	HIV/HCV デュアル阻害剤：糖鎖結合因子による強力な抗 HIV/HCV 作用	13 - 18
2. 駒野 淳	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	19 - 24
3. 村上 努	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	25 - 28
4. 山越 智	抗 EB ウイルス剤をめざした <i>in vitro</i> スクリーニング	29 - 32
5. 森川 裕子	Gag-Gag 相互作用を阻害する化合物の探索と抗 HIV 作用	33 - 37
6. 高橋 信弘	「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	39 - 42
7. 岡田 誠治	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	43 - 45
8. 程 久美子	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	47 - 49
9. 菅 裕明	エイズ感染阻害を旨とした特殊ペプチドの創製と探索	51 - 53
10. 広野 修一	<i>in silico</i> 創薬技術に基づく新規エイズ治療薬の開発 - 計算化学手法による C101A 化合物群と CD81 LEL の相互作用解析 -	55 - 58
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		59 - 62

# 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）  
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）  
村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）  
山越 智（国立感染症研究所生物活性物質部・主任研究官）  
森川裕子（社）北里生命化学研究所・教授）  
高橋信弘（東京農工大学農学部応用生物科学科・教授）  
岡田誠治（熊本大学エイズ学研究中心・教授）  
程 久美子（東京大学大学院理学系研究科・准教授）  
菅 裕明（東大先端科学技術研究センター・教授）  
広野 修一（北里大薬学部・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。そこで、われわれは、エイズおよびエイズ関連ウイルス感染症（HCVおよびEBV）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、次に示すような研究成果を得た。

1) HIV-1 およびHCV 双方に対して抗ウイルス作用を有する生体物質由来の糖鎖結合タンパク質 N02, N03 を同定した。これらの物質はウイルスエンベロープに豊富に存在するが、動物細胞には稀な高マンノース型N-グリカンに特異的な結合能力をもち、その結果、ウイルスの細胞への吸着 attachment をnM オーダーで阻害する（武部班員）。2) HIV-1 と同様、極めて高いゲノム多様性をもつHCVゲノムにおける高度保存領域を、系統的且つ定量的に検索する探索プログラム（siVirus）を開発し、それを用いてsiRNAを設計し、その有効性を検証した（呈班員）。3) 独自に開発した特殊ペプチド合成法（RaPID システム）を用いて、新規標的に対する阻害剤探索の手法を樹立した（菅班員）。4) HCV 受容体であるヒトCD81 の Long external loop (LEL) の X 線結晶構造に対するドッキング計算の結果、3箇所の結合サイトを同定し、そのうち1カ所が、先に本研究班で同定されたヒット化合物が結合すると推測した（広野班員）。5) 先に同定した HIV-1 阻害剤（3G11）は、ウイルス感染初期過程を標的にしているが、逆転写酵素、インテグラーゼ、RNaseH 活性を阻害しないことを示した（駒野班員）。6) プロテオミクス的手法を用いて宿主細胞で Rev が関わり得るタンパク質間ネットワークを明らかにし、その結果に基づき、Rev が標的とする宿主タンパク質間相互作用を特定した（高橋班員）。7) EBV EBNA1 およびカボジ肉腫・非ホジキン肉腫の原因である HHV-8 LANA タンパク質の DNA 結合を利用した高感度の in vitro ELISA 系を確立し、いくつかの阻害剤候補を同定した。（山越班員）。8) HIV-1 マトリックスタンパク質の細胞導入型部分ペプチドを合成し、その中に抗 HIV-1 活性を示すものを見いだした（村上班員）。9) 酵母を用いたスクリーニング系によって探索された Gag-Gag 多量体形成を阻害するシーズ化合物（172A6）を同定し、これが、cell-based assay で HIV-1 複製を数 uM 前後で阻害し、濃度依存的に粒子産生を阻害することを明らかにした（森川班員）。10) 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って同定した阻害活性物質 2C が、Nef タンパク質と Hck への結合を阻害することで、Nef 機能を阻害することを明らかにした（岡田班員）。

これらは、これまでと作用機序の異なる抗 HIV-1/抗 HCV 薬のリード化合物として期待される。

## 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を行った。

## B. 研究方法

### (1) 既得 HIV-1 阻害剤候補の作用機構解析：

既得ヒット化合物について、その作用機序、作用標的を次のような方法で解析した。1) *in vitro* の酵素反応系 (逆転写酵素、インテグラーゼ、RNase H 活性) への阻害効果の測定 (駒野班員)、2) 細胞内 Gag タンパク質を Western blot で解析 また試験管内 CA アッセムブリー反応への阻害効果を評価 (森川班員)、4) GST-Nef タンパク質との pull down による Hck, M-CSF 受容体タンパク質との結合阻害を指標とした 2 次スクリーニング系を樹立し、ヒット化合物の作用機構を解析した (岡田班員)。

### (2) 抗 HCV 阻害剤探索・評価：

米国 NCI (O'Keefe 博士) より生物由来の糖鎖結合タンパク質 (N02, N03) の供与を受け、HCVcc assay により細胞培養系での HCV 増殖阻害効果を評価すると共に、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、その作用機能を解析した (武部班員)。

### (3) 抗 EBV 阻害剤探索：

EBV EBNA-1, HHV-8 LANA タンパク質の DNA 結合能を利用した高感度の *in vitro* ELISA 系を確立し、低分子化合物・天然物ライブラリーを用いて、阻害剤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：

Rev を釣り餌 Bait として相互作用するタンパク質をプルダウン法により回収し、それを質量分析と Mascot 検索によって解析した (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：

HIV-1, HCV に代表される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)。

### (6) 特殊ペプチドライブラリー創製とそれによる阻害剤探索系の開発：

独自に開発された RaPID (Random Peptide Integrated Discovery) システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドライブラリーを構築した。RaPID システムは、Flexizyme (tRNA アミノアシル化 RNA 触媒) を用いて、普遍暗号表を初期化し、特殊アミノ酸に対応させた改変暗号表を作製し、それに沿った形で特殊ペプチドを合成する手法である。このようにして創製した特殊ペプチドライブラリーを用いて、CD81 LEL に対する結合能をもつペプチド探索の系の確立を行った (菅班員)。

### (7) *in silico* 創薬技術に基づく抗ウイルス

#### (HCV) 剤探索：

CD81 LEL のアゴペ X 線結晶構造に対して疎水性サイト探索プログラム (HBOP) を用いてリガンド結合サイト候補を探索。Glide (Schroedinger 社) を用いて、タンパク質の柔軟性も考慮する induced fit モードで精密ドッキング計算を行い、スコアの良い上位化合物を選択した (広野班員)。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

## C. 研究結果

### (1) 抗 HIV 阻害剤探索と作用機序の解明：

1) 2 万種の化合物ライブラリーから見いだされた抗 HIV-1 ヒット化合物 (IC<sub>50</sub>=0.1 μM) はウイルス感染初期過程に作用するが、逆転写酵素、インテグラーゼ、RNaseH 活性は阻害しないことを見いだした (駒野班員)。

2) 酵母 CytoTrap two hybrid 法を利用した Gag-Gag 相互作用反応系を用いたスクリーニングによって見いだされたヒット化合物 172A6 は細胞培養系で感染阻害効果を示した (IC<sub>50</sub>=25-50 μM)。172A6 は Gag タンパク質の細胞内輸送は阻害しないが、濃度依存的に粒子産生を阻害し、また試験管内アッセムブリー反応をわずかに阻害することを見いだした (森川班員)。

3) 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によって同定された阻害活性物質 2C は、GST-Nef タンパク質を用いた pull-down assay によって Nef タンパク質の Hck に対する結合阻害活性をもつことを明らかにした (岡田班員)。

4) 細胞導入型 MA 部分ペプチドの中で、3 番目の 15-mer が EC<sub>50</sub>=3.5 μM の抗ウイルス活性を示した (村上班員)。

### (2) HCV 阻害剤探索：

生物由来の高マンノース型糖鎖結合タンパク質 N02, N03 は HCV, HIV-1 双方に対して強い抗

ウイルス作用をもつ。抗ウイルス活性 (EC50) はそれぞれ、HCV に対しては、16.9 nM (SI=1,400), 1.8 nM (SI=90,000); HIV-1 に対しては 0.3 nM, 0.04 nM であった。特に N03 の抗 HCV/HIV-1 活性は、われわれがこれまでに見いだした抗ウイルス性物質の中で最強のものであった。N02, N03 はいずれも HCV pseudoparticle の感染を阻害することから、HCV のエンタリー阻害剤である (武部班員)。

### (3) 抗 EBV 阻害剤探索 :

EBNA-1 と oriP EBS (EBNA1 結合配列) との結合アッセイを用いた化合物スクリーニングの結果、ヒット化合物として Ethiomycin および Nogalamycin を見いだした (IC50=2.5 μM)。いずれも DNA intercalator としての活性をもつ物質であった (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 :

Rev タンパク質に結合する複合体の構成タンパク質を質量分析-Mascot 検索で解析した結果、既存のタンパク質 3 種 (SF2p32, NPM1, CKII) を含む合計 13 種類のタンパク質を Rev 相互作用タンパク質として同定した。さらに、これらのタンパク質を bait として RNA 依存性、非依存性に相互作用する複合体を回収し、既存情報を加えた Osprey 解析を行った結果、614 種類のタンパク質 (Nodes) と 778 種類のタンパク質間相互作用ネットワークを明らかにした (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 :

HIV-1, HCV に対する siRNA 設計アルゴリズムを開発し、siVirus (<http://siVirus.RNAi.jp/>) という Web サーバーを構築し、公開した。これによって、HIV-1 および HCV ゲノム上の高度保存領域に対する siRNA を設計し、その細胞培養系での有効性を検証した (程班員)。

### (6) 特殊ペプチドライブラリー創製とそれによる阻害剤探索系の開発 :

RaPID ディスプレー法を用いて、 $10^{12}$  を超える多様性をもつ特殊環状ペプチドライブラリーを構築し、CD81 GST-LEL-biotin ドメインに対して結合能をもつ特殊環状ペプチドの探索システムを確立した (菅班員)。

### (7) in silico 創薬技術に基づく抗ウイルス (HCV) 剤探索 :

HBOP 計算の結果、3 カ所の異なる結合サイトを同定した。この中で、HCV エンベロープタンパク質が結合すると推定される領域に最も近いサイトが既得の HCV 阻害活性をもつヒット化合物 (武部班員) の結合サイトであることが推定された。またその類縁化合物の抗 HCV 活性と、計算された  $\Delta G_{bind}$  の間にある程度の相関関係があることがわかった (広野班員)。

## D. 考察

(1) cell-based の HIV 感染増殖アッセイに加え、HIV-1, HCV 関連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ウイルスおよび宿主タンパク質の構造情報・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阻害剤候補が同定された。しかし、一部のヒット化合物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) 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や、特殊ペプチドライブラリーを用いた阻害剤探索技術、in silico 創薬技術を駆使した抗ウイルス剤探索、創薬展開の有効性が示された。

(3) 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。本研究班によってはじめて同定された HCV エンタリー阻害剤候補の作用機序の解明が急がれる。

## 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。また、特殊ペプチド・ライブラリーを用いた新規の抗ウイルス剤スクリーニング・創薬技術、プロテオミックスを用いた新規治療標的の探索技術や、抗ウイルス核酸医薬創製のための至適 siRNA 設計のアルゴリズムが開発された。

## 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 (2008-2009)

### 1. 論文発表

主任研究者

武部 豊

1. Liu, P., Xiang, K., Tang, H., Zhang, W., Wang, X., Tong, X., Takebe, Y., Yang, R. (2008). Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus in former blood donors in central China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Jan ;24(1):1-6.
2. Takebe, Y., Uenishi, R., and Li, X.-J. (2008). 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.

3. Xia, X., Lu, L., Tee, K. K., Zhao, W., Wu, J., Yu, J., Li, X., Lin, Y., Mukhtar, MM., Hagedorn, CH., Takebe, Y. (2008). The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China. *J. Med Virol.* 80 (7): 1142-52.
4. Shinizu, N., Tanaka, A., Mori, T., Ohtsuki, T., Hoque, A., Jinno-Oue, A., Apichartpiyakul, C., Kusagawa, S., Takebe, Y., Hoshino, H. (2008). A formylpeptide receptor FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology.* 25(Jun): 5-52.
5. Tee KK., Pybus, OG., Li, XJ., Han, X., Shang, H., Kamarulzaman, A., Takebe, Y. (2008). Temporal and spatial dynamics of human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms 08 BC and 07 BC in Asia. *J Virol.* 82(18):9206-9215.
6. Xia, X., Zhao, W., Tee, kk., Feng, Y., ZTakebe, Y., Li, Q., Pybus, OG., Lu, L. (2008). Complete genome sequencing and phylogenetic analysis of HCV isolates from China reveals a new subtype designated 6u. *J Med Virol.* 80 (10):1740-1746.
7. Tee KK., Takebe, Y., Kamarulzaman, A. (2008). Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997-2007. *Int J Infect Dis.* Nov. 13
8. 上西理恵、長谷彩希、Liao Huanan、武部豊。C型肝炎ウイルスに対する新規治療薬の開発動向。 *Pharm Stage* 8(3):1-5, 2008.
9. 武部豊、上西理恵。HCV エントリー・粒子形成阻害剤：新規クラス薬剤スクリーニング。 *肝胆膵：特集 C型肝炎のすべて 2009*. Vol.57 (Nov.): 1047-1056. 2008.
- 2) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J. Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis. *Cancer Sci* (in press)
- 3) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J Gen Virol* (in press)
- 4) 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. *AIDS.* May 31; 22(9):1081-3, 2008.
- 5) Akihide Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi SoedaI, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 8; 105(1):294-9 2008.
- 6) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic.* Apr; 9(4):540-58 2008.
- 7) Komano J, Hamatake M, and Yamamoto N. Analyses of long-term surviving HIV-infected Japanese patients with coagulation disorders hint at novel means to prevent and treat HIV/AIDS (review). *Challenging practices on HIV/AIDS in Japan 2008*, Kashiwazaki ed., JFAP publications, 97-99, 2008.

分担研究者

駒野 淳

- 1) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Let* (in press)

村上 努

- 1) 村上 努 HIV の粒子形成のメカニズム— Gag 蛋白に関する最新の知見— Confronting HIV2009. In press.
- 2) Iwasaki, Y., H. Akari, T. Murakami, S. Kumakura, Z. Dewan, M. Yanaka, and N. Yamamoto. *Cancer Sci.* In press.
- 3) Urano, E., T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami, Y. Morikawa, N. Yamamoto, and J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55<sup>Gag</sup> with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J. Gen. Virol.* 89(Pt 12): 4374-4377, 2008.
- 4) Tanaka, T., H. Tsutsumi, W. Nomura, Y. Tanabe, N. Ohashi, A. Esaka, C. Ochiai, J. Sato, K. Itotani, T. Murakami, K. Ohba, N. Yamamoto, N. Fujii, and H. Tamamura. Bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. *Org. Biomol. Chem.* 6:4374-4377, 2008.
- 5) T. Murakami. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle? *Microbiol. Immunol.* 52:287-295, 2008.

山越 智

- 1) Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Takahashi N, Uehara Y, 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.* 281:28113-28121, 2006.
- 2) Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Takahashi N, Yamagoe S, Uehara Y.  $\gamma$ -Herpesviruses and cellular signaling in AIDS-associated malignancies. *Cancer Sci.* 98:1288-1296, 2007.

森川 裕子

- 1) 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)

- 2) S. Yamayoshi, T. Noda, H. Ebihara, H. Goto, Y. Morikawa, I. S. Lukashevich, G. Neumann, H. Feldmann, & Y. Kawaoka. Ebola virus matrix VP40 protein uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe* 3: 168-177 (2008).
- 3) E. Urano, S. Shimizu, Y. Futahashi, Makiko Hamatake, Y. Morikawa, N. Takahashi, H. Fukazawa, N. Yamamoto, & J. Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. *AIDS* 22: 1081-1083 (2008)
- 4) S. Kawada, T. Goto, H. Haraguchi, A. Ono, & Y. Morikawa. Dominant negative inhibition of human immunodeficiency virus particle production by the non-myristoylated form of Gag. *J. Virol.* 82: 4384-4399 (2008)
- 5) E. Urano, T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami, Y. Morikawa, N. Yamamoto, & J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55<sup>Gag</sup> with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J. Gen. Virol.* 86: 3144-3149 (2008)
- 6) E. Urano, Y. Kariya, Y. Futahashi, R. Ichikawa, M. Hamatake, H. Fukazawa, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Lett* 582: 4053-4058 (2008)
- 7) 森川裕子 HIV 粒子形成機構 日本エイズ学会誌 10: 33-40 (2008)

高橋 信弘

- 1) Hayano, T., Yamauchi, Y., Asano, K.,

Tsujimura, T., Hashimoto, S., Isobe, T. and Takahashi, N. (2008) Automated SPR-LC-MS/MS System for Protein Interaction Analysis. *J. Proteome Res.* 7:4183-4190.

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)
- 3) Murakami T, Harada H, Suico MA, Shuto T Suzu S, Kai H, and Okada S; Ephedrae herba, a component of Japanese herbal medicine *Mao-to*, efficiently activates the replication of latent HIV-1 in a monocytic cell line. *Biol Pharm Bull* 31(12):2334-2337, 2008
- 4) 鈴伸也, 岡田誠治. Src キナーゼの新たな役割—ゴルジ体を通して. *血液・腫瘍科* 57(3):326-329, 2008.

程 久美子

- 1) Naito, Y., Ui-Tei, K., Nishikawa, T., Takebe, Y. and Saigo, K. (2006) siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, W448-450.
- 2) 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, 80.
- 3) Naito, Y., Saigo, K. and Ui-Tei, K. (2008) Evaluation of published rational siRNA design algorithms using firefly luciferase gene as a reporter. *RNA Interference Research Progress.* 3-10.
- 4) Ui-Tei, K., Naito, Y., Nishi, K., Juni, A. and Saigo, K. Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are

major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Res.* in press.

菅 裕明

- 1) T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga "Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids" *Journal of American Chemical Society* 130, 16861-16863 (2008).
- 2) T.-J. Kang, S. Yuzawa, H. Suga "Combinatorial lysine modifications of histone H3 tails under the reprogrammed genetic code suggest crosstalk between epigenetic markers upon HP1 chromo domain binding" *Chemistry & Biology* 15, 1166-1174 (2008).
- 3) A. Ohta, H. Murakami, H. Suga "Polymerization of  $\alpha$ -hydroxy acids by ribosomes" *ChemBioChem* 9, 2773-2778 (2008).
- 4) H. Xiao, H. Murakami, H. Suga, A. R. Ferre-D'Amare "Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme" *Nature* 454, 358-361 (2008).
- 5) Y. Goto, H. Murakami, H. Suga\* "Initiating translation with D-amino acids" *RNA* 14, 1399-1410 (2008).
- 6) Y. Sako, J. Morimoto, H. Murakami, H. Suga\* "Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions" *Journal of American Chemical Society* 130, 7932-7934 (2008).
- 7) T.-J. Kang, H. Suga\* "Ribosomal synthesis of nonstandard peptides" *Biochemistry and Cell Biology* 86, 92-99 (2008).
- 8) A. Ohta, Y. Yamagishi, H. Suga\* "Synthesis of biopolymers using genetic code reprogramming" *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 159-167 (2008).
- 9) Y. Sako, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga\* "Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond" *ACS Chemical Biology* 3, 241-249 (2008).
- 10) Y. Goto, A. Ohta, Y. Sako, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga\* "Reprogramming the

initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides" *ACS Chemical Biology* 3, 120-129 (2008).

- 11) T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga\* "Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides" *Chemistry & Biology* 15, 32-42 (2008).

広野 修一

- 1) H. Gouda, Y. Yanai, A. Sugawara, T. Sunazuka, S. Omura, S. Hirono. Computational analysis of the binding affinities of the natural-product cyclopentapeptides argifin and argadin to chitinase B from *Serratia marcescens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 3565-3579 (2008)
- 2) M. Lohitnavy, Y. Lu, O. Lohitnavy, L. S. Chubb, S. Hirono, R. S. H. Yang. A Possible Role of Multidrug-Resistance-Associated Protein 2 (Mrp2) in Hepatic Excretion of PCB126, an Environmental Contaminant: PBPK/PD Modeling. *Toxicological Sciences*, 104(1), 27-39 (2008)
- 3) T. Fujimoto, Y. Matsushita, H. Gouda, N. Yamaotsu, S. Hirono. In silico multi-filter screening approaches for developing novel b-secretase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 18(9), 2771-2775 (2008)
- 4) Y. Aikawa, K. Morimoto, T. Yamamoto, H. Chaki, A. Hashiramoto, H. Narita, S. Hirono, S. Shiozawa. Selective c-Fos/activator protein-1 inhibitor designed by molecular dynamics simulation resolves arthritis. *Nature Biotechnology*, 26(7), 817-823 (2008)
- 5) Yamaotsu N., Oda A., Hirono S. Determination of Ligand-Binding Sites on Proteins Using Long-Range Hydrophobic Potential. *Biol. Pharm. Bull.*, 31(8), 1552-1558 (2008).
- 6) A. Oda, N. Yamaotsu, S. Hirono, O. Takahashi. Brownian dynamics simulations of a wild type and mutants of bovine pancreatic trypsin inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, in press (2008).
- 7) H. Nagase, N. Yamamoto, T. Nemoto, K. Yoza,

K. Kamiya, S. Hirono, S. Momen, N. Izumimoto, K. Hasebe, H. Mochizuki, H. Fujii. Synthesis of a Stable Iminium Salt and Propellane Derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*, 73, 8093-8096 (2008).

- 8) 「イン・シリコ創薬技術に基づく合理的薬剤分子設計」広野修一、*薬剤学*, 68, 107-115 (2008)

2. 学会発表 (2008-2009)

研究代表者

武部 豊

1. 武部豊. HCV エントリー阻害剤の同定とその解析: ポスト-HAART 時代のエイズ治療戦略の開発に向けて. 第 82 回日本感染症学会 (2008.4.17-4.18. 松江市 島根県民会館)
2. Kok-Keng Tee, Oliver Pybus, Joseph Parker, Kee Peng Ng, Adeeba Kamarulzaman, Yutaka Takebe. Timing of HIV-1 recombination: a novel approach. *Keystone Symposia* (4.8-13, 2008, USA).
3. 武部豊. CD81 を標的とする HCV エントリー阻害剤候補の同定とその解析. 第 18 回抗ウイルス療法研究会 (2008.5.23-24. 鹿児島)
4. 廖華南、Kok Keng Tee、長谷彩希、上西理恵、LiXiao-jie、Adeeba Kamarulzaman、草川茂、PhamHong Thang、Nguyen tran Hien、Xiaoxu Han、Hong Shang、Pybus Oliver、武部豊. HIV-1 組換え型流行株のアジアにおける感染拡大の年代推定. 第 56 回日本ウイルス学会 (2008.10.26-10.28. 岡山)
5. 武部豊、上西理恵、納富香子、廖華南、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆宇、袴田航. CD81 を標的とする新しいクラスの低分子性 HCV エントリー阻害剤の同定. 第 56 回日本ウイルス学会 (2008.10.26-10.28. 岡山)
6. 上西理恵、廖華南、袴田航、納富香子、長谷彩希、赤澤大輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、武部豊. HCV JFH-1 infectivity assay を用いた低分子 HCV 阻害剤の探索とその評価. 第 56 回日本ウイルス学会 (2008.10.26-10.28. 岡山)
7. 森一泰、杉本智恵、成瀬妙子、椎野禎一郎、武部豊、木村彰方、山本直樹、永井美之. Heterologous SIV 感染モデルによる多様性ウイルス感染を防御する宿主応答の解析. 第 22 回日本エイズ学会 (2008.11.26-11.28. 大阪)
8. 長谷彩希、上西理恵、廖華南、草川茂、人見重美、武部豊. 日本における HIV-1 感染症の最近動向: 東関東地域における新知見. 第 22

回日本エイズ学会 (2008.11.26-11.28, 大阪)

- 9) 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、杉浦互、HIV-1 薬剤耐性変異の感染者集団における固定/消失時間の解析。第 22 回日本エイズ学会 (2008.11.26-11.28, 大阪)

分担研究者

駒野 淳

- 1) Emiko Urano, Yuki Kariya, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY
- 2) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto and Jun Komano. FUNCTIONAL SUBSTITUTION OF THE MYRISTOYLATION SIGNAL OF HIV-1 GAG WITH PHOSPHOLIPASE C DELTA 1 PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAIN. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY.
- 3) 浦野 恵美子、奥長浩之、森川裕子、駒野 淳。DNA J/HSP40 Co-chaperone family による HIV-1 複製抑制。第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年、岡山
- 4) 駒野 淳、浦野 恵美子、刈屋 祐美、二橋 悠子、市川 玲子、濱武 牧子、深觸 秀輔、森川 裕子、芳田 剛、小柳 義夫、山本 直樹。T 細胞における HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング - Brd4 C 末端ドメインの同定とその機能解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年、岡山
- 5) 駒野 淳、濱武 牧子、青木 徹、浦野 恵美子、二橋 悠子、山本 直樹。BiFC/BRET による癌転移増強分子 CXCR4 の Ligand 非依存的な多量体形成の解析。第 67 回日本癌学会学術総会、2008、名古屋。
- 6) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization

state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008、神戸

- 7) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008、神戸

村上 努

- 1) T. Aoki, S. Shimizu, U. Emiko, Y. Futahashi, M. Hamatake, K. Terashima, H. Tamamura, T. Murakami, Yuko Morokawa, N. Yamamoto and J. Komano. FUNCTIONAL SUBSTITUTION OF THE MYRISTOYLATION SIGNAL OF HIV-1 GAG WITH PHOSPHOLIPASE C DELTA 1 PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAIN. May 19-24 2008, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA. 22-27 2007, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.
- 2) 村上 努、大隈 和、田中礼子、濱武牧子、駒野 淳、田中勇悦、山本直樹。KRH-3955: 新規 CXCR4 アンタゴニストは経口投与可能な高活性抗 HIV-1 剤である 第 56 回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008 年 10 月 26-28 日
- 3) 村上 努、大隈 和、田中礼子、仲宗根 正、濱武牧子、駒野 淳、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹。KRH-3955 は経口投与可能な高活性抗 X4 HIV-1 剤である。第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008 年 11 月 26-28 日
- 4) 宮川 敬、梁 明秀、大庭賢二、村上 努、山本直樹。RING フィンガー蛋白質 BCA2 は HIV-1 粒子産生を阻害する 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008 年 11 月 26-28 日
- 5) 青木 徹、清水佐紀、浦野恵美子、濱武牧子、寺島一夫、玉村啓和、村上 努、森川裕子、山本直樹、駒野 淳。HIV-1Pr55Gag のミリストイル基非依存性ウイルス粒子産生と

感染性 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008 年 11 月 26-28 日

- 6) 高橋良明、村上 努、駒野 淳、吉田篤司、田中礼子、山本直樹、田中勇悦。宿主由来タンパク OX40L、OX40 の HIV-1 感染に与える影響 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008 年 11 月 26-28 日
- 7) T. Aoki, S. Shimizu, U. Emiko, M. Hamatake, K. Terashima, H. Tamamura, T. Murakami, Yuko Morokawa, N. Yamamoto and J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC DELTA 1 pleckstrin homology domain results on fully infectious pseudovirion production. 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 9-12 日

山越 智

- 1) Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Takahashi N, Uehara Y, 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*. 281:28113-28121, 2006.
- 2) 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.

森川 裕子

- 1) E. Urano, Y. Kariya, Y. Futahashi, M. Hamatake, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano. Identification of the carboxy-terminal domain of chromatin-associated transcriptional activator bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. CSH Meeting, 2008 年、米国
- 2) H. Haraguchi & Y. Morikawa. Intracellular trafficking machinery of human immunodeficiency virus Gag-Pol protein. 第 8 回感染症免疫フォーラム、2008 年、淡路島
- 3) F. Momose, T. Sekimoto, & Y. Morikawa

Live-cell imaging of influenza viral RNP trafficking. 第 8 回感染症免疫フォーラム、2008 年、淡路島

- 4) Y. Morikawa & S. Saegusa. AUP1 regulates HIV particle production. 第 8 回感染症免疫フォーラム、2008 年、淡路島
- 5) E. Urano, Y. Kariya, M. Hamatake, H. Fukazawa, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano. -TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. 第 8 回感染症免疫フォーラム、2008 年、淡路島
- 6) 浦野恵美子、奥長浩之、森川裕子、駒野淳 DNA J/ HSP40 Co-chaperonine family による HIV-1 複製抑制 第 56 回日本ウイルス学会、2008 年、岡山
- 7) 原口日和、森川裕子. HIV-1 Gag-Pol 蛋白の発現比率は粒子産生を制御する 第 56 回日本ウイルス学会、2008 年、岡山
- 8) 百瀬文隆、関本哲也、森川裕子. インフルエンザウイルス RNP 複合体のプラスミドトランスフェクションによる再構成と核外輸送機構の解析 第 56 回日本ウイルス学会、2008 年、岡山
- 9) 駒野淳、浦野恵美子、刈屋祐美、二橋悠子、市川玲子、濱武牧子、深澤秀輔、森川裕子、芳田剛、小柳義夫、山本直樹. T 細胞における HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング- Brd4 C 末端ドメインの同定とその機構解析. 第 56 回日本ウイルス学会、2008 年、岡山
- 10) 周東翔、原口日和、湯永博之、森川裕子. 非スクレオチド系逆転写酵素阻害剤エファビレンツによる HIV 粒子形成阻害機構. 第 56 回日本ウイルス学会、2008 年、岡山
- 11) 関本哲也、百瀬文隆、森川裕子. ライブセイメージングによるインフルエンザウイルス子孫 RNP 複合体の細胞内輸送機構の解析. 56 回日本ウイルス学会、2008 年、岡山
- 12) 三枝祥子、森川裕子. 宿主因子 AUP1 による HIV の複製制御機構の解析. 56 回日本ウイルス学会、2008 年、岡山
- 13) 百瀬文隆、関本哲也、森川裕子. インフルエンザウイルス RNP 複合体輸送機構のライブセルイメージング. 第 31 回日本分子生物学

会/第 81 回日本生化学会、2008 年、神戸

- 14) E. Urano, Y. Kariya, M. Hamatake, H. Fukazawa, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. 第 31 回日本分子生物学会/第 81 回日本生化学会、2008 年、神戸

高橋 信弘

- 1) Takahashi N., Proteomic characterization of human pre-ribosome particles. MPSA 2008 (17th International Meeting of Methods in Protein Structure), Sapporo, Japan, 2008 8/26-29 (Invited speaker)
- 2) Yoshikawa H., Kawasaki M., Komatsu W., Yanagida M., Hayano T., Izumikawa K., Ishikawa H., Shinkawa T., Yamauchi Y., Isobe T., and Takahashi N., Proteomic analysis of proteins associated with splicing factor-2 associated protein p32 revealed its possible involvement in human ribosome biogenesis. 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science (PRICPS) and 5th Asian Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO), Cairns, Australia, 2008, 6/22-26.

岡田 誠治

- 1) 1) Seiji Okada, Hideki Harada, Masateru Hiyoshi, Shinya Suzu. Selective inhibition of receptor pathways for macrophage-specific cytokines by HIV-1 Nef protein. XVI International AIDS Conference. (Toronto, Canada) Aug.13-18, 2006.
- 2) Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, Hideki Harada, Seiji Okada. HIV-1 Nef inhibits M-CSF signals by down-regulating its receptor Fms through Hck. 48th Annual Meeting of American Society of Hematology. (Orlando, USA) Dec. 9-12, 2006.
- 3) Masateru Hiyoshi, Shinya Suzu, Yuka Yoshidomi, Hideki Harada, Seiji Okada. HIV-1 Nef inhibits macrophage colony-stimulating factor signals by down-regulating its receptor through Src family kinases. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (Los Angeles, USA), 26-28 Feb. 2007.

- 4) 鈴 伸也、日吉真照、吉富友香、原田英樹、岡田誠治. HIV-1 Nef による M-CSF/M-CSF レセプター経路の選択的阻害とその分子機構. 第 68 回日本血液学会総会、2006 年 10 月 6-8 日、福岡
- 5) 日吉真照、鈴 伸也、吉富友香、原田英樹、岡田誠治. Nef は Hck を介して M-CSF 受容体の細胞内における成熟過程を阻害する. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19-21 日、名古屋
- 6) 鈴 伸也、日吉真照、吉富友香、原田英樹、岡田誠治. Nef は M-CSF 受容体の発現低下を誘導する. 第 20 回日本エイズ学会学術集会総会、2006 年 11 月 30 日—12 月 2 日、東京
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 日吉真照、鈴 伸也、岡田誠治. HIV Nef のマクロファージにおける新たなゴルジ体機能の阻害機構. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26-28 日、岡山
- 11) Ranya Hassan, 鈴 伸也、日吉真照、岡田誠治. Hierarchical actions of HIV-1 Nef on Hck determined maturation arrest of cytokine receptor, Fms. 第 22 回日本エイズ学会学術集会総会、2008 年 11 月 26 日-11 月 28 日、大阪

程 久美子

- 1) 程久美子. RNAi 基盤技術開発—siRNA 配列設計法. 第 81 回日本薬理学会 薬理学テクニカルセミナー. 2008.

菅 裕明

1. 8.28.2008 The 17th Meeting of Methods in Protein Structural Analysis, Sapporo, Japan
2. 9.11.2008 Aminoacyl-tRNA Synthetase Meeting

2008, Veyrier du Lac, **France**

3. 9.16.2008 International Symposium on Molecular Recognition of DNA: Biological Applications, Tokyo, **Japan**
4. 10.30.2008 Japanese-German Frontier of Science, Heidelberg, **Germany**
5. 11.12.2008 RIKEN International Conference Chemical Biology, Narita, **Japan**
6. 2008年3月28日: 第128回日本薬学会年会・特別講演、横浜
7. 2008年5月19日: 日本ケミカルバイオロジー研究会シンポジウム、東京
8. 2008年6月6日: 第7回新規素材探索研究会セミナー、横浜
9. 2008年6月7日: 第56回日本化学療法学会総会、岡山
10. 2008年6月18日: 前期有機合成化学講習会、東京
11. 2008年10月15日: BIO JAPAN、横浜
12. 2008年12月11日: 東北大学多元研・研究会、仙台

広野 修一

- 1) Yamaotsu N, Saito H, Ishikawa T, Hirono S. IDENTIFICATION OF PHARMACOPHORES OF HUMAN ABCG2 TRANSPORTER INHIBITORS 第23回日本薬物動態学会年会(熊本) 日本薬物動態学会 2008.10.30 [第23回日本薬物動態学会年会講演要旨集 p.334,2008.10]
- 2) Watanabe E, Yamaotsu N, Kusuhara H, Hirono S, Sugiyama. YPHARMACOPHORE AND 3-DIMENSIONAL QUANTITATIVE STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIPS (3D-QSAR) OF LIGANDS FOR ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDE 1B1 (OATP1B1) 第23回日本薬物動態学会年会(熊本) 日本薬物動態学会 2008.11.1 [第23回日本薬物動態学会年会講演要旨集 p.289 2008.10]
- 3) Nakagome I, Yamaotsu N, Gouda H, Hirono S The constructions of 3D-QSAR models for the PPARs agonists in consideration of membrane transport 第36回構造活性相関シンポジウム 日本薬学会構造活性相関部会 2008.11.2 [第36回構造活性相関シンポジウム講演要旨集 p.59-60 2008.11]

- 4) 合田浩明、井口加奈美、菅原章公、山本 剛、廣瀬友靖、塩見和朗、砂塚敏明、大村 智、広野修一 NMR および計算化学手法を用いたキチナーゼBと Argifin 由来ジペプチド阻害剤の相互作用解析 第27回メディシナルケミストリーシンポジウム(大阪) 日本薬学会医薬化学部会 2008.11.26 [第27回メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集 p.88-89 2008.11]

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (2006-2008)

研究代表者

武部 豊 特許取得・出願

1. 「アジア型 HIV DNA (仮称)」(準備中)
2. 「HIV/HCV デュアル・インヒビター (仮称)」(準備中)
3. 「C型肝炎ウイルス進入阻害剤」(準備中)
4. 「HCV 阻害剤」(出願準備中)
5. 「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)
6. 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767、平成19年6月13日出願)
7. 「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)]
8. 「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)

研究分担者

程 久美子 特許取得・出願

1. 「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」武部 豊、内藤 雄樹、西郷 薫、名取 幸和、特開 2006-238724.
2. 武部 豊、内藤 雄樹、西郷 薫、程 久美子、特願 2007-156767. 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」



## Ⅱ. 分担研究報告書

## HIV/HCV デュアル阻害剤：糖鎖結合因子による強力な抗 HIV/HCV 作用

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、Liao Huanan、長谷彩希（国立感染症研究所エイズ研究センター）

Barry O'Keefe（米国国立がん研究所, NCI）

研究要旨 HIV や HCV などのウイルス粒子表面に存在するエンベロープタンパク質は、高度に糖鎖修飾を受けている。糖鎖修飾はエンベロープタンパク質の適切な folding, assembly, さらにウイルス粒子の感染性獲得に不可欠である。また、ウイルスエンベロープタンパク質に付加している糖鎖 N-glycan は宿主細胞にはほとんど見いだされない高マンノース型のものであり、従って、高マンノース型糖鎖に特異的に結合する物質（糖鎖結合因子, CBAs）は、ウイルス阻害剤としての可能性が期待される。われわれは、生体物質由来の CBAs の中に、強力な抗ウイルス効果をもつタンパク質性因子 (N02, N03) (分子量約 10,000) を見いだした。HIV-1 NL432 株/C8166R5 細胞および HCV JFH-1 株/Huh7.5.1 細胞を用いた cell-culture assay によって抗ウイルス活性を評価した結果、抗 HIV-1 活性に関しては、N02 の EC50 (50%阻害濃度) が 4.35 nM (選択係数 SI=291), N03 の EC50=1.91 nM (SI=946)。一方、抗 HCV 活性に関しては、N02 の EC50 が 16.9 nM (SI=1,410)、N03 の EC50=0.37 nM (SI=90,800)であった。いずれも low nM から sub-nM 濃度の EC50 をもつ、極めて強力な抗ウイルス活性をもつことが明らかとなった。とりわけ N03 は、高い抗ウイルス活性をもつだけでなく、SI が 3 桁近くあるいはそれを超える高い SI 値をもつことが明らかとなった。これらの物質は、共にウイルス粒子の糖鎖に結合することで、ウイルス粒子の標的細胞表面への非特異的吸着を阻害することによって、抗ウイルス作用を示すものと推定される。

### 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。

薬剤開発が進み、治療選択肢が豊富なエイズ治療薬に比較して、現在 HCV 感染症に有効とされている標準療法 (SOC) は PEG-インターフェロンとリバビリンの併用療法のみである。PEG-インターフェロンとリバビリンの併用療法の治療奏効率は、我が国や欧米に多い genotype 1 では 50% 以下で、しかも発熱、溶血性貧血、精神

症状、などの比較的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望されている。

われわれは、HIV-1 および HCV 個々をターゲットとして創薬シーズ探索を行っているが、HIV-1 と HCV 双方に有効な薬剤の開発は、魅力的な課題である。

HIV-1 と HCV 双方に有効な薬剤として既に知られているものには、インターフェロンやシクロスポリン A (その標的分子は、HIV-1 に関してはサイクロフィリン A; HIV-1 キャプシドタンパク質; HCV に関してはサイクロフィリン B; NS5B ポリメラーゼ) などが知られているが、われわれは、ウイルスのエントリー・ステップの dual 阻害の可能性に注目して研究を進めた。両ウイルスのエントリー阻害を期待できる一群

の物質に糖鎖結合性因子 (carbohydrate binding agent, CBA) がある (図 1)。われわれは、新しく報告された生物由来のタンパク質性 CBA である N02, N03 とよばれる物質の抗ウイルス効果 (抗 HIV-1 および抗 HCV 活性) の評価を行い、その結果、それらが、HIV-1/HCV dual inhibitor として顕著な抗ウイルス活性を示すことを明らかにした。

## B. 研究方法

### (1) 試験検体

海洋生物から分離された新規の糖鎖結合性タンパク質 N02, N03 は O'Keefe 博士から供与を受けた。実験対照 (陽性対照) として、既存の CBA の一つであるシアノピリン-N (CV-N) (HCV assay に関しては、さらにインターフェロン $\alpha$  (5, 50 u/ml) を陽性対照として用いた。

### (2) 抗ウイルス活性のアッセイ

抗 HIV-1 活性は、HIV-1 NL432 株/C8166R5 細胞の系で d5 の培養上清中に産生される viron-associated reverse transcriptase (RT) assay によって、抗 HCV 活性は、HCV JFH1 株/Huh7.5.1 細胞の系で d3 の培養上清中に産生される HCV core タンパク質量の定量によって測定した。

併行して、試験化合物の細胞毒性を WST アッセイを用いて評価した。

### (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  $\Delta$ 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  $\Delta$ 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。

(倫理面への配慮) 該当なし。

## C. 研究結果

### (1) 糖鎖結合性タンパク質 (N02, N03) の抗ウイ

### ルス効果

HIV-1 NL432 株/C8166R5 細胞の系で抗 HIV-1 活性を、HCV JFH1 株/Huh7.5.1 細胞の系で抗 HCV 活性を評価した。アッセイのコントロール (標準物質) として、試験検体の類縁物質 (CBA の一つ) である CV-N を用いた。結果を表 1 にまとめる。

表 1 に示すように、抗 HIV-1 活性は、CV-N : EC50=2.3 nM (選択係数 SI=140); N02: EC50=4.35 nM (SI=291); N03: EC50=1.91 nM (SI=946)。一方、抗 HCV 活性に関しては、CV-N : EC50=7.6 nM (SI=52.0); N02: EC50=16.9 nM (選択係数 SI=1,410); N03: EC50=0.37 nM (SI=90,800) であった。

いずれも low nM-sub nM の極めて強力な抗ウイルス活性を示すが、抗ウイルス効果の強度順にみると、抗 HIV-1, 抗 HCV 活性共に、N03>CV-N>N02 の順であった。N03 は最も強力な活性を示し、しかも SI が 3 桁近くあるいはそれ以上で、極めて良好な抗ウイルス活性を示す。一方、CV-N は幾分か細胞毒性が強い (HCV assay の系での SI=32.0)。N02 の抗ウイルス活性は、CV-N に幾分か劣るが、より高い SI を示す (表 1)。

### (2) HCVpp assay

N02, N03 は共に、HCVpp の感染を阻害する (図 2)。この阻害効果は HCV エンベロープタンパク質 E1/E2 に特異的で、VSV-G pseudotype の感染には影響しない。これらの結果は、N02, N03 の抗 HCV 効果が、ウイルス感染 (エントリー) のステップにあることが示す。

## D. 考察

ウイルスエントリーは、治療薬開発の魅力的なターゲットである。ウイルスのエンベロープタンパク質が正しく folding し assemble して、感染性のウイルス粒子が形成されるには、適切な糖鎖修飾が不可欠である。糖鎖の主体をなしている N-グリカンは、一般に複合型、ハイブリッド型、高マンノース型の 3 タイプに分類されるが、ウイルス・エンベロープタンパク質に見られる糖鎖は、高マンノース型である (図 1)。高マンノース型 N-グリカンは動物細胞にはほとんど検出されないという特徴があり、高マンノース型 N-グリカんに特異的に結合する能力をもつ化合物ないし物質は、ウイルス感染阻害剤として有望な性質をもつものと期待される。

本研究においては、高マンノース型 N-グリカ

ン結合する能力をもつ新規の生物由来物質である N02, N03 が、高い抗 HCV 活性を有することを、はじめて明らかにした。特に N03 は subnanomolar の抗 HCV 活性をもち、SI は 10 万倍近い値を示す (表 1)。

HCV pseudoparticle 感染を阻害することから、抗 HCV 活性に関しては、エントリー段階に作用点があると考えられる (図 2)。HCV のエントリー過程は、非特異的なウイルス吸着の後に、HCV エントリー受容体群 (SR-B1, CD81⇒tight junction proteins, Claudin-1, Occludin) に受け渡され、ついでクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると考えられているが、N02, N03 などの CBAs はウイルスエンベロープタンパク質を被覆する N-グリカンに結合することで、ウイルス粒子の細胞表面への非特異吸着を阻害し、その結果、ウイルス粒子の受容体群への結合が妨げられ、ウイルス感染を阻害するものと考えられる (図 1A)。

CBA はこのような非特異的な機構によってウイルス感染を阻害することから、HIV-1 や HCV だけでなく、糖鎖修飾を受けているいわゆるエンベロープ型ウイルスの感染を広く阻害する活性をもっている。そのため、その抗ウイルス活性は、広範なスペクトラムをもっていて、例えば Ebola virus や SARS Co-V 感染を強力に阻害することが知られている。

しかし、一方、分子量が 10,000 を超えるタンパク質であるために、経口吸収性や良好な血中薬理動態を期待できないことや、抗体産生の誘導のために薬理効果が短期間で減弱する可能性、さらに過敏性反応 (アナフィラキシー・ショック) などの重篤な副作用を起因する可能性から、病原体の粘膜局所での感染阻止のための "microbicide" としての利用の可能性が考えられる。

#### E. 結論

抗 HCV 活性など強力な抗ウイルス活性をもつ生物由来のタンパク質性の糖鎖結合タンパク質 (N02, N03) を同定した。その高分子性と極めて強力な抗ウイルス作用から、microbicide 候補として有望な可能性を秘めている。

#### 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 (2008-2009)

##### 1. 論文発表

- 1) Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S. Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J Virol Methods*. 2009 Jan 3. [Epub ahead of print]
- 2) Tee KK, Takebe Y, Kamarulzaman A. Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997-2007. *Int J Infect Dis*. 2008 Nov 13. [Epub ahead of print]
- 3) Xia, X., Lu, L., Tee, K. K., Zhao, W., Wu, J., Yu, J., Li, X., Lin, Y., Mukhtar, MM., Hagedorn, CH., Takebe, Y. (2008). The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China. *J. Med Virol*. 80 (7): 1142-52.
- 4) Tee, K. K., Pybus, OG., X-J, Li., Han, X., Shang, H., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2008). Temporal and spatial dynamics of human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms 08\_BC and 07\_BC in Asia. *J. Virol* 82: 9206-9215.
- 5) Shimizu, N., Tanaka, A., Mori, T., Ohtsuki, T., Hoque, A., Jinno-Oue, A., Apichartpiyakul, C., Kusagawa, S., Takebe, Y., and Hoshino, H. (2008). A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology* 5: 52
- 6) Xia X, Lu L, Tee KK, Zhao W, Wu J, Yu J, Li X, Lin Y, Mukhtar MM, Hagedorn CH, Takebe Y. (2008). The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China. *J Med Virol*. 2008 Jul;80(7):1142-52.
- 7) Liu P, Xiang K, Tang H, Zhang W, Wang X, Tong X, Takebe Y, Yang R. (2008). Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus in former blood donors in central China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Jan;24(1):1-6.
- 8) Louisirochanakul S, Sutthent R, Wasi C, Chuenchitra T, Nitayaphan S, Brown AE, Polonis VR, Nakayama EE, Shioda T, Liu H, Takebe Y. (2008). Host genetic analysis of HIV type 1 subtype CRF01\_AE (E)-infected Thai patients with different rates of disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Dec;23(12):1605-8.
- 9) Tee, K. K., Pybus, OG., Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X-J., and Takebe, Y. (2008). Chronology of the HIV-1 CRF07\_BC expansion in East-Asia. *AIDS* 22: 156-158, 2008.
- 10) Takebe, Y, Uenishi, R., and Li. X-J. (2008).