

Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (ed. Kuan Teh Jeang). Advances in Pharmacology vol. 56: 1-25, 2008.

和文

- 1) 武部 豊 (2009). エイズワクチンの開発動向: アデノウイルスワクチン国際臨床試験頓挫の波紋とその意味 (特集: 各医療機関における国際共同試験の取り組み) PHARM STAGE Vol.8, No.10: 1-6, 2009
 - 2) 武部 豊, 上西理恵 (2008). 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. C 型肝炎のすべて・2009 新規治療法. 肝胆膵 57(5): 1047-1056, 2008.
 - 3) 武部 豊. 「エイズワクチン開発の最新動向」 Challenges to AIDS vaccine development 細胞, Sept. 2008.
 - 4) 武部 豊, 長谷彩希, 廖 華南, 上西理恵. (2008). アジアにおけるエイズ危機と日本: 危険水域に入った我が国. 感染・炎症・免疫 2008 Vol.38 (3): 182-193, 2008.
 - 5) 廖 華南, 長谷彩希, 上西理恵, 武部 豊 (2008). エイズに対する新規治療薬の開発動向. Pharmastage ファームステージ 2008 年 8 月号.
 - 6) 武部 豊, 山本直樹. 「エイズワクチン (メルク・アデノウイルスワクチン)・トライアルの失敗の意味すること」病原微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) [http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html] June, 2008.
 - 7) 上西理恵, 長谷彩希, Liao Huanan, 武部豊. (2008). C型肝炎ウイルスに対する新規治療薬の開発動向. PHARM STAGE Vol.8, No.3: 1-5, 2008.
2. 学会発表 (2008-2009)
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)

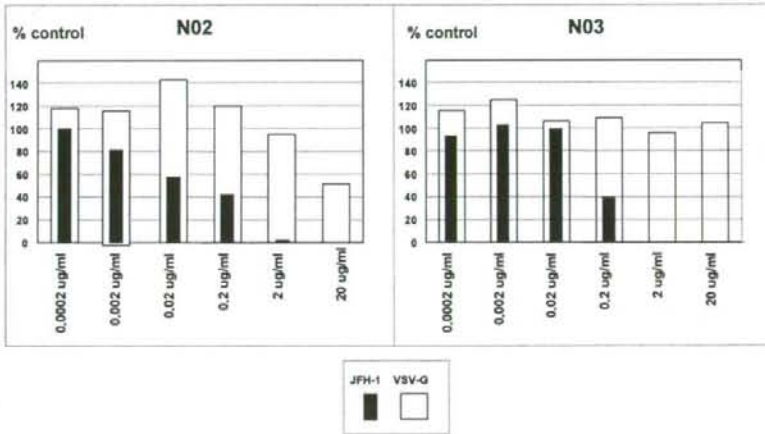
5. 武部豊, 上西理恵, 納富香子, 廖華南, 長谷彩希, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 袴田航. CD81 を標的とする新しいクラスの低分子性 HCV エントリー阻害剤の同定. 第 56 回日本ウイルス学会 (2008.10.26-10.28. 岡山)
6. 上西理恵, 廖華南, 袴田航, 納富香子, 長谷彩希, 赤澤大輔, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 武部豊. HCV JFH-1 infectivity assay を用いた低分子 HCV 阻害剤の探索とその評価. 第 56 回日本ウイルス学会 (2008.10.26-10.28. 岡山)
7. 森一泰, 杉本智恵, 成瀬妙子, 椎野禎一郎, 武部豊, 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2008)
特許出願 (準備中を含む)

1. 特許出願 (準備中を含む)
 - 1) 「C型肝炎ウイルス侵入阻害剤」(出願準備中)
 - 2) 「新規 HIV 阻害剤」(特願 2008-333922, 2008 年 12 月 26 日)
 - 3) 「HCV 阻害剤」(特願 2008-115873, 2008 年 4 月 25 日)
 - 4) 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願 2008-33598, 2008 年 2 月 14 日)
 - 5) 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767, 2007 年 6 月 13 日)
 - 6) 「C型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害剤」(特願 2007- 018145) [PCT 出願 : PCT/JP2008/51086]
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

☒2

HCVpp assay



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 IC₅₀ が 100nM という強い HIV 活性を示す小分子化合物を同定することに成功した。本阻害剤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、プロテアーゼ、インテグラーゼ、RNase H 活性を阻害しないことが明らかとなった。これは薬剤の標的部位が異なる新規抗 HIV-1 薬として有用な先導化合物であると期待される。

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は不可欠である。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。どちらも一長一短であり、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。

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た。その結果、HIV 特異的に抗ウイルス活性 IC₅₀ が 100nM という強い HIV 活性を示す小分子化合物を同定することに成功した。本年度はウイルス酵素阻害活性について検討を加えた。

B. 研究方法

阻害剤は 2 万種類のランダムケミカルライブラリーの中から同定された先導化合物（エナミン社）を使用した。HIV-1 RT-associated RNase H 活性は Chan KC et al., Anal Biochem 2004 に準じて実施した。

Integrase 活性は Chi G et al., Bioorg Med Chem Lett. 2007 に準じて実施した。HIV-1 感染初期過程プロセスの各ステップを分割して評価する方法は Brussel A et al., Methods Mol Biol 2005 に準じて実施した。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

抗ウイルス作用を示す先導化合物は HIV-1 RT-associated RNase H 活性を阻害しなかった (図 1)。また、インテグラーゼのもつ 3' processing 活性及び strand transfer 活性ともに阻害活性を検出する事は出来なかった (図 2)。PCR による感染ステップ評価により、逆転写は進行し Alu-LTR コピー数が減少する。しかし 2-LTR の減少が検出されない事から核移行の積極的阻害は起こっていなかった (図 3)。

D. 考察

本リード化合物は HIV-1 の感染初期過程を阻害し、酵素活性を直接阻害しないが核内へのゲノム移行および核内でのウイルスゲノム挙動に影響を及ぼすために HIV-1 感染が阻害されることが判明した。阻害剤の標的がウイルス酵素活性ではない事が明らかとなったが、細胞因子かウイルス遺伝子産物かは未だ明らかではない。耐性ウイルス誘導によるウイルス遺伝子変異部位の同定やキメラウイルスによる阻害剤感受性規定部位の同定が必要と考えられる。昨年度報告した既存の抗レトロウイルス薬との協調作用を有する事などを考え合わせると、本リード化合物は既存の抗エイズ薬とは異なった新規作用機序を持つ事が示唆された。

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) 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)
- 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) Akihito Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi Soeda1, 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. SOCSI 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

学会発表 (抜粋)

海外

1) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. A CD63 MUTANT INHIBITS CXCR4 TRAFFICKING TO THE PLASMA MEMBRANE AND BLOCKS X4 HIV-1 ENTRY. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

2) 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

3) 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

国内

1) 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. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

2) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta lpleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

3) 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. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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 阻害剤である. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008、大阪

8) 青木 徹、清水佐紀、浦野恵美子、濱武牧子、寺嶋一夫、玉村啓和、村上 努、森川裕子、山本直樹、駒野 淳. HIV-1 Pre55Gag のミリスチ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、2008、大阪

9) 高橋良明、村上 努、駒野 淳、古田 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、2008、大阪

10) 浦野 恵美子、奥長浩之、森川裕子、山本直樹、駒野 淳. Inhibition of HIV-1 replication by co-chaperone DNA J/HSP40 protein family. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪

11) 小林明子、芳田 剛、駒野 淳、小柳義夫. レンチウイルスバクターを用いた抗 HIV 因子のスクリーニングとその解析. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008、大阪

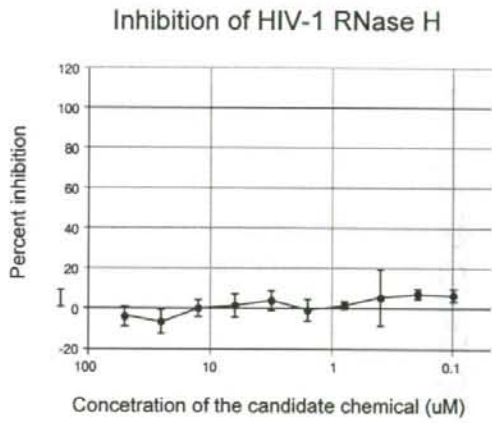
12) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008、神戸

13) 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

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

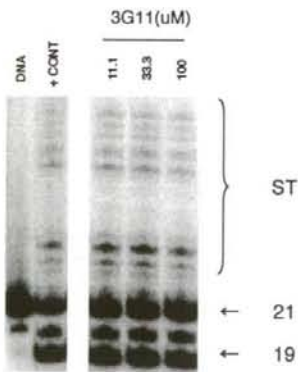
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

☒ 1

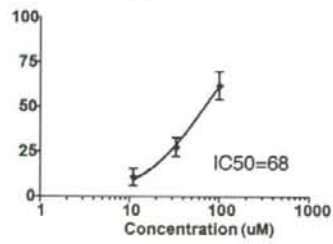


☒ 2

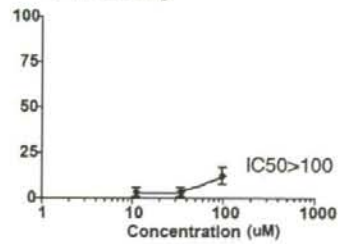
Inhibition of HIV-1 Integrase



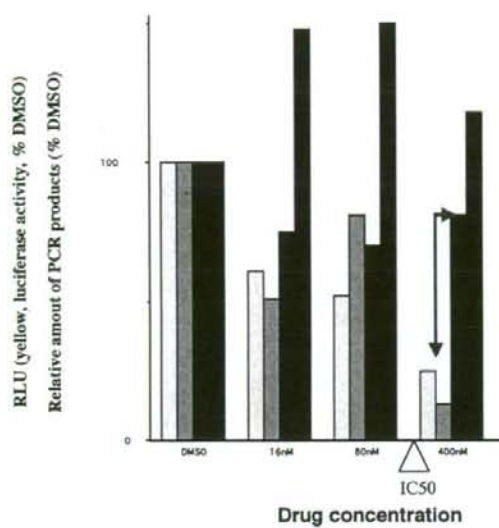
Strand Transfer



3' Processing



3



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: 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、今年度は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 結合蛋白の中で Rab7 とそのエフェクター蛋白である RILP と BCA2 についてウイルス産生・放出への関与を検討した。その結果、Rab7 とそのエフェクター蛋白 (RILP、BCA2) が HIV-1 蛋白の細胞内動態 (合成・輸送・分解など) に影響を与える可能性が示された。一方、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おいて抗ウイルス活性を示す部分ペプチドがあることが判明した。

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、今年度は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 結合蛋白の中で Rab7 とそのエフェクター蛋白である RILP と BCA2 についてウイルス産生・放出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、細胞内導入を可能にした形でこれらの部分ペプチド (共同研究者: 玉村博士) の抗ウイルス活性を評価する試みを開始した。

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 Rab7 またはエフェクター蛋白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・放出、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) Rab7DN の過剰発現がウイルス粒子毛性に及ぼす影響: 293T 細胞に HIV-1 plasmid(pNL4-3) と EGFP-Rab7DN 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 GFP-Rab7 量に応じて細胞内の Gag、Env 蛋白レベルが減少し、それに対応するように放出されるウイルス量も減少していた (図 1)。HeLa 細胞においても同様の現象が観察された。

(2) 内因性 Rab7 の knock down がウイルス粒子形成に与える影響: HeLa 細胞に存在する Rab7 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、Rab7DN の過剰発現のときと同様に、調べた

3種類の siRNA の内、2種類の siRNA の処理で細胞内の Gag、Env 蛋白レベルが減少し、それに対応するように放出されるウイルス量も減少していた(図2)。

(3) RILP WT、RILP DN の過剰発現がウイルス粒子形成に与える影響: HeLa 細胞に HIV-1 plasmid(pNL4-3)と Rab7 のエフェクター蛋白の一つである RILP WT または RILP DN 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、RILP WT の過剰発現は、コントロールの顕著な違いは認められなかったが、RILP DN の過剰発現では、細胞内の Gag、Env 蛋白レベルが増加し、それに対応するように放出されるウイルス量も増加していた(図3)。293T 細胞においても同様の現象が観察された(図4)。

(4) RILP WT、RILP DN と HIV-1Gag との相互作用の検討(共免疫沈降実験): HeLa 細胞に HIV-1Gag (FLAG-tagged)と Rab7 のエフェクター蛋白の一つである RILP WT または RILP DN を導入・発現させ、細胞のライセートを抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行うと、RILP WT または RILP DN の共沈降が認められ、Gag 蛋白と RILP の相互作用が示唆された。

(5) BCA2 の過剰発現がウイルス粒子形成に与える影響: HeLa 細胞に HIV-1 plasmid(pNL4-3)と Rab7 のもう一つのエフェクター蛋白である BCA2 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、BCA2 の過剰発現によって、細胞内の Gag、Env 蛋白レベルの顕著な減少とそれに対応する放出ウイルス量の減少が観察された(図5)。

(6) 細胞導入型 MA 部分ペプチドの抗 HIV-1 活性の検討: HIV-1NL4-3 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ライブラリの C 末端に Octa-Arg を付加して細胞導入型とした。このペプチドで処理した細胞が HIV-1 複製に対して抵抗性になるか否かを検討した結果、3番目の 15 mer が EC50: 3.5 μ M と中等度の抗ウイルス活性を示した(表1)。

D. 考察

Rab7 とそのエフェクター蛋白が HIV-1 蛋白の細胞内動態(合成・輸送・分解など)に影響を与える可能性が示された。また、細胞導入型 MA 部分ペプチドが抗 HIV-1 活性を示したことにより、このアプローチによる新たな作用機序の抗 HIV-1 剤の開発の可能性が示された。

E. 結論

Rab7 とそのエフェクター蛋白が HIV-1 蛋白の細胞内動態(合成・輸送・分解など)に影響を与える可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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^{Gag} 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.

2. 学会発表

- 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

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし。

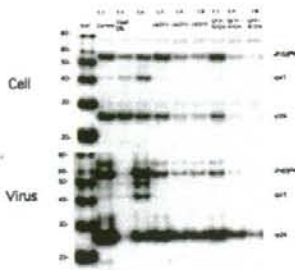


図1. Rab7DN の過剰発現が HIV-1 粒子産生・放出に与える影響

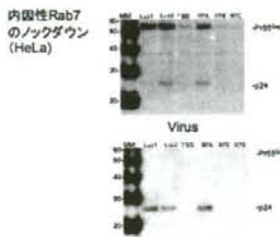


図2. 内因性 Rab7 の発現抑制が HIV-1 粒子産生・放出に与える影響

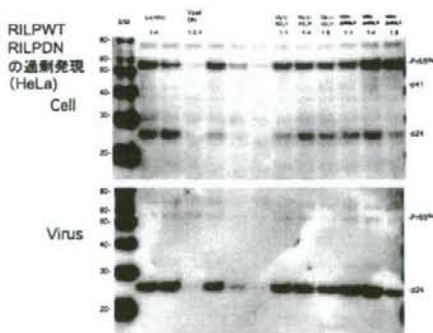


図3. RILP WT または DN の過剰発現が HIV-1 粒子産生・放出に与える影響 (HeLa)

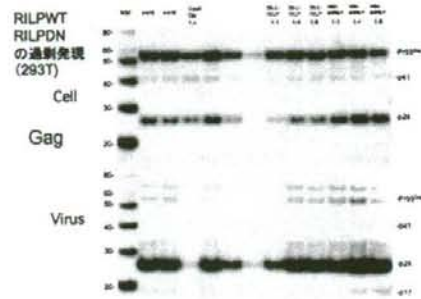


図4. RILP WT または DN の過剰発現が HIV-1 粒子産生・放出に与える影響 (293T)

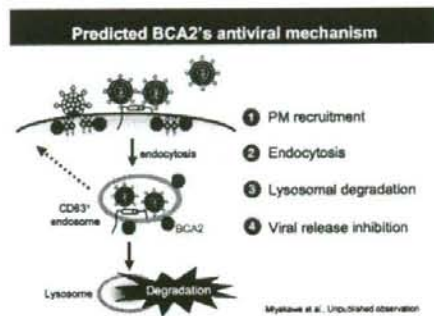


図5. BCA2 の抗ウイルス作用機序 (推定)

細胞内導入型MAペプチドの抗HIV-1活性 (MT-4/NL4-3)

Sequence	EC50 (μM)	CC50 (μM)
MA peptide-1R	26	>50
MA peptide-2R		18
MA peptide-3R	3.5	>50
MA peptide-4R		4.4
MA peptide-5R	28	>50
MA peptide-6R	11	38
MA peptide-7R	32	>50
MA peptide-8R		22
MA peptide-9R	24	>50
MA peptide-10R	24	>50
MA peptide-11R	18	>50
MA peptide-12R	17	>50
MA peptide-13R	31	>50
R (Octa-Arg)	>50	>50
AZT	0.085	23

3R(PM targetingなど) が比較的高い抗HIV-1 (NL4-3)活性を示した。

表1. MA 部分ペプチドの抗 HIV-1 活性

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する。その中でも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。EBVの潜伏感染において最も重要なEBNA1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。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。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。また、カポジ肉腫、非ホジキンリンパ腫などはAIDS(acquired immunodeficiency syndrome)指標疾患であり、HHV(human herpesvirus)-8が関与していると考えられている。しかも、両ウイルスは、 γ -ヘルペスウイルス亜科に属し、生活環が非常によく似ている。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、続いて M2-アガロースにて

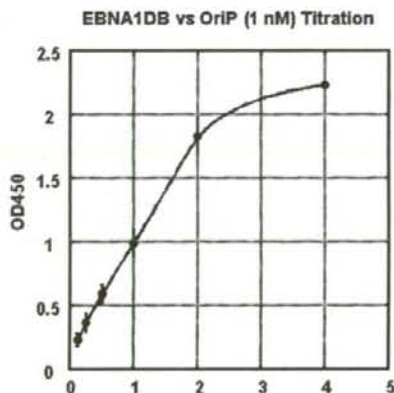
GST-EBNA1DB-FLAG を精製した。

2. 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、パキョ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。

3. 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 穴プレートに 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、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。Analyticon Discovery 社の天然物ライブラリー、化学合成物ライブラリー、および既知の各種阻害剤 200 種類を含む合計約 5000 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 ³²P-ATP を用いて末端ラベルし、GST-EBNA1DB-FLAG と化合物を加え、30℃、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

EBV の抗ウイルス剤のスクリーニング系の構築を行った。潜伏感染に必須で悪性リンパ腫の発症に深く関わる EBNA1 をターゲットとした。EBNA1 は細胞内で EBV ゲノムの oriP 領域の EBS (EBNA1 binding sequence)に結合し、DNA 複製、維持に関与する。そこで迅速で簡便なスクリーニング系として in vitro ELISA 法の確立を試みた。大腸菌で EBNA1 の DNA 結合領域に FLAG タグをつけ (GST-EBNA1DB-FLAG) 大量に産生精製し、5'末端をビオチン化した oriP の DS 断

片と混合、アビジン 96 穴プレートに吸着させた。DS に結合した GST-EBNA1DB-FLAG を HRP 標識抗 FLAG 抗体で検出することで高感度な ELISA 系を確立した (図 1)。

図 1. EBNA1DB と DS の検出曲線

この系を用い Analyticon Discovery 社の約 5000 の化合物を 2 連で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 69 個を得た (図 2)。

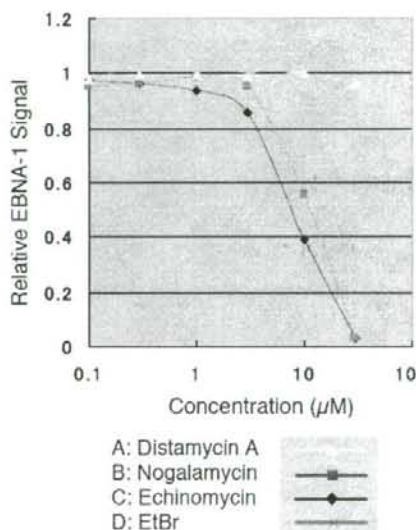


図 2. 強い阻害活性を示した阻害剤

2つの強く阻害する化合物について EMSA 法で阻害活性について調べた。その結果、図 3 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。

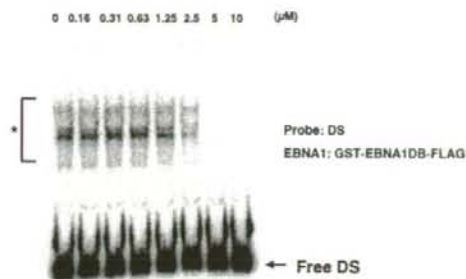


図 3. EBNA1 における EMSA を用いた echinomycin の阻害作用

次に EB ウイルスを保持する培養細胞 AKAT/細胞を用い echinomycin の *in vivo* での作用を検討した。echinomycin は毒性が高いので、細胞死が始まる直前の薬剤処理時間 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)。

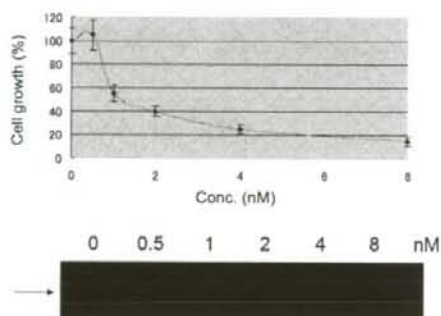


図 4. AKATA 細胞における echinomycin 処理によるウイルス DNA への影響

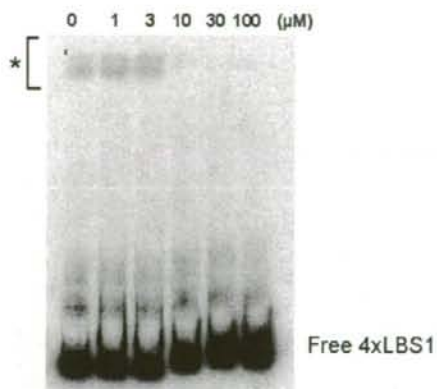


図 5. LANA における EMSA を用いた echinomycin の阻害作用

また、ELISA 法で 20% 以下の弱い阻害活性を示すものについては、EMSA では阻害活性を検出できなかった。次にこの阻害の特異性を調べるために EMS を使い LANA1 の結合配列 LBS に対する echinomycin の効果を調べたところ図 5 のように阻害効果が見られた。このように LANA の DNA 結合阻害活性も持つことが明らかとなった。

D. 考案

本研究で確立した 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 0.1 mg/ml の濃度で加えた。実際にエチジウムブロミド 10 μg/ml では、本スクリーニング系で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エチジウムブロミドの様な DNA インターカレーターではあるが、塩基配列特異的な DNA インターカレーターである。このことは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ことを示す。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 EBNA1 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 69 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確立し、それにより 2 つの有力な阻害剤候補が見つかった。しかしながら *in vivo* では EBV ゲノムの維持への阻害効果は見ることができなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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

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。

Gag-Gag 相互作用を阻害する化合物の探索と抗 HIV 作用

分担研究者 森川裕子（北里大学 大学院感染制御科学府）

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低分子化合物ライブラリから見いだした阻害候補化合物のうち、抗 HIV 活性が期待できる化合物 172A6 について解析した。HIV 感染 MT4 細胞で調べたところ、濃度依存的な抗 HIV 活性が見いだされた。HIV を感染させた末梢血単核球に 172A6 を添加したところ、50 μ M でも HIV 増殖の遅延が認められた。作用機序を明らかにするため、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 蛋白の細胞内輸送を阻害しないが、濃度依存的に粒子産生を阻害することが判明した。精製 CA 蛋白を用いた試験管内アセンブリ反応系に添加したところ、わずかながらも阻害活性が見いだされた。

A. 研究目的

現在、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、プロテアーゼ阻害薬が抗 HIV 薬として用いられている。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、作用点の異なる抗 HIV 薬の開発が望まれる。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の Gag-Gag 相互作用反応系を酵母 CytoTrap Two Hybrid 法を利用して構築した。その酵母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を探索したところ、候補化合物を 6 個見いだした。本年度はこれら 6 つの候補化合物のうち、抗 HIV 活性が期待できる化合物 172A6 について、その活性を調べるとともに、作用機序の解析を試みた。

B. 研究方法

1) 低分子化合物ライブラリ

Enamine 社の Reopresentative Diversity Set (80 化合物/96 穴プレート×250 枚=20,000 化合物)を使用した。

2) 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。

3) 共焦点レーザー顕微鏡

HeLa 細胞に Gag-GFP を発現する pNL43 (pol 領域欠損) を transfection し、化合物を添加した。24 時間後に細胞を 3.7% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100 で処理した。核染色には TOPRO-3 を用いた。

4) 試験管内 CA アセンブリ反応

精製 p24CA 蛋白 (単量体) に 500 μ M NaCl (最終濃度) を加え 37 $^{\circ}$ C で 1 時間加温した。反応産物を 70-20%蔗糖勾配にのせ遠心した。分画後、Western blotting で抗原を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究では HIV 患者からの臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。実験遂行上の安全対策は、遺伝子組換え実験については二重省令・二重告示に従った。

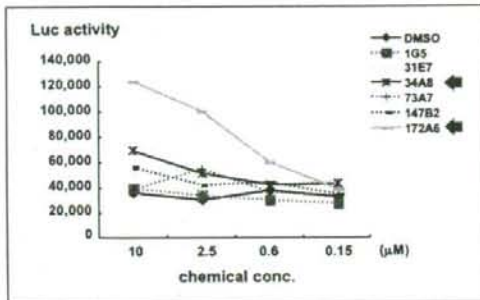
C. 研究結果

1) MT-4 Luc 細胞を用いた候補化合物の抗 HIV 活性の評価

これまでに、酵母 Gag-Gag 相互作用反応系を用いて市販の低分子化合物ライブラリ (10 μ M) を探索し、Gag-Gag 特異的な 6 個の阻害候補化合物を見いだした。これら候補化合物 (10 μ M から段階希釈) の抗 HIV 活性を HIV-1 (HXB2 株) 感染 MT-4 Luc 細胞を

用いて調べた。MT-4 Luc 細胞は恒常的に luciferase を発現する細胞であり、HIV 増殖によりその luciferase 値が低下する。この細胞を用いて調べたところ、化合物 172A6 と 34A8 に濃度依存的な抗 HIV 活性が認められた。172A6 の方が有望と思われたが、それでもその IC50 は 25-50 μ M と高く、NFV や EFV と比べると約 500-1000 倍であった (図 1)。

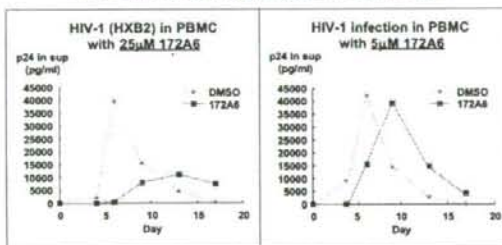
図 1. HIV 感染 MT-4 Luc 細胞における候補化合物の抗 HIV 活性



2) 末梢血単核球を用いた候補化合物の抗 HIV 活性の評価

HIV-1 (HXB2 株) を感染させた末梢血単核球に 172A6 を 5, 25 μ M で添加して培養し、経時的に培養上清中の HIV 粒子産生量を ELISA で調べた。25 μ M 添加では HIV 産生は顕著に低下し、5 μ M 添加でも HIV の増殖遅延が認められた (図 2)。

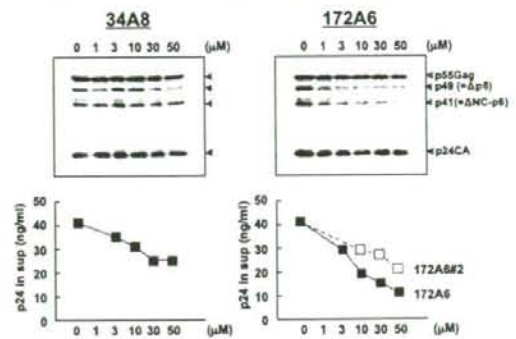
図 2. PBMC における候補化合物 (172A6) の抗 HIV 活性



3) 候補化合物の HIV 粒子産生抑制

HeLa 細胞に pNL43 を transfection し、3-50 μ M の 34A8 と 172A6 をそれぞれ添加して培養した。Western blotting で細胞内 Gag 発現を調べたところ、いずれの候補化合物も Gag 蛋白発現を阻害しなかったが、172A6 では Gag 蛋白のプロセッシングパターンに変化、すなわち、切断反応中間体である p41(MA-CA)や p46(MA-CA-NC)の減少が認められた。粒子産生量を ELISA で測定したところ、いずれの候補化合物も濃度依存的に粒子産生を阻害したが、その活性は 172A6 の方が強かった (図 3)。

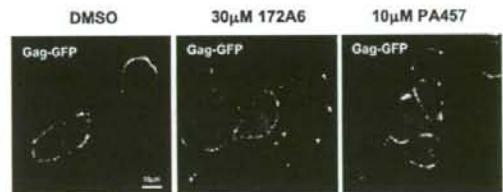
図 3. HIV 粒子産生における候補化合物の阻害活性



4) 候補化合物の Gag 蛋白の細胞内輸送への影響

HeLa 細胞に Gag-GFP を発現する pNL43 を transfection し、30 μ M の 172A6 と 10 μ M の既知化合物 PA457 (プロセッシング阻害剤) をそれぞれ添加して培養した。共焦点顕微鏡で Gag-GFP の細胞内局在を調べたところ、いずれのものでも Gag-GFP は形質膜に観察されたことから、172A6 は Gag 蛋白の細胞内輸送過程には影響を与えないと考えられた (図 4)。

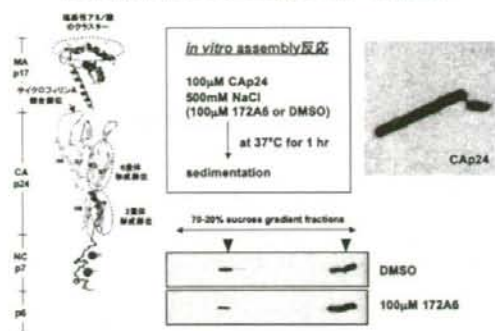
図 4. Gag 蛋白の細胞内局在



5) 候補化合物の Gag-Gag 相互作用阻害活性

候補化合物 172A6 が Gag-Gag 相互作用を阻害するかを明らかにする目的で、試験管内 CA アセンブリ反応系を用いた。100 μ M 精製 CA 蛋白 (2.5mg/ml に相当) 100 μ M 172A6 を加えた stoichiometric な条件で調べたところ、わずかではあるが、172A6 存在下では多量体形成画分が少なかったことから、172A6 の Gag 蛋白内標的領域は CA に存在する可能性が示唆された (図 6)。

図5. 化合物(172A6)のGag-Gag相互作用阻害



D. 考察

本研究では、低分子化合物ライブラリから見いだした Gag-Gag 相互作用を標的とする候補化合物の抗 HIV 活性の評価を行なうとともに、その作用機作の解明を試みた。

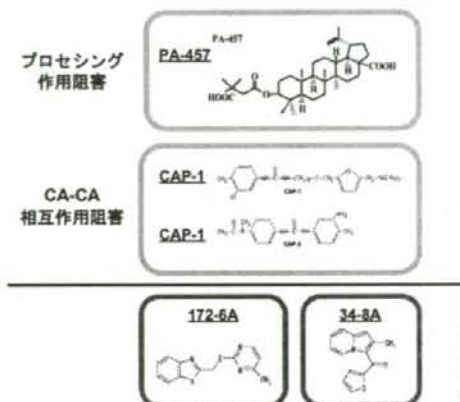
候補化合物 172A6 の抗 HIV 活性を HIV-1 感染 MT-4 Luc 細胞を用いて調べたところ、化合物 172A6 が有望と思われたが、それでもその IC50 は 25-50 μM と高く、化学修飾でも改善できなかった。しかし、末梢血単核球を用いた実験では 5 μM でも HIV の増殖遅延が認められたことから、172A6 存在下で産生された HIV 粒子は複製効率が減弱している可能性が考えられた。

pNL43 を transfection した HeLa 細胞に 172A6 添加して調べたところ、Gag 蛋白の切断反応中間体 p41(MA-CA)や p46(MA-CA-NC)の減少が認められた。しかしながら、最終切断産物である CAp24 生成量に減少がなかったことから、プロテアーゼ阻害剤のような作用機作ではないと思われる。

近年、HIV 粒子形成の Gag アセンブリ過程を作用点とした抗 HIV 阻害剤がいくつか (PA-457、CAI、CAP1, 2) 報告されている (図6)。PA-457 (分子量 584) は Gag 蛋白の CA-SP1 から CA への切断を阻害する化合物で、成熟過程を阻害し、形態学的に異常な非感染性 HIV 粒子を産生させるプロセッシング阻害剤である (IC50=10nM)。一方、CAI は 12 残基のペプチドで CA の C 末端ドメインに結合し 2 量体形成部位を変化させ CA-CA 相互作用を阻害する (Kd=15 μM)。同様に CAP-1 は CA の N 末端ドメインと C 末端ドメインの interface に結合し、6 量体形成部位の構造を変化させ CA-CA 相互作用を阻害する (CAP-1:

Kd=820 μM、CAP-2: Kd=52 μM)。これらの CA-CA 相互作用を作用点とする阻害剤の Kd や IC50 は高く、これは HIV 粒子が 2000-5000 分子の Gag 蛋白多量体であるためと思われる。本研究で見いだした候補化合物 172A6 も IC50 が高く、かつ試験管内 CA アセンブリ反応系で阻害が認められたことから、172A6 も類似的作用機序をもつ可能性が考えられる。

図6. 既知化合物と候補化合物の化学構造式



E. 結論

市販の低分子化合物ライブラリから見いだした化合物 172-6A に抗 HIV 活性が確認できた。その IC50 値は高かったが、Gag 蛋白に作用し Gag-Gag 相互作用を阻害する可能性が示唆された。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

論文発表

- 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.