

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^{Gag} 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 Let 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)

学会発表

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.

P-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

非ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤エファレンツによる 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

ライブセル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) 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 Pr55Gag 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、2008 年、大阪

14) 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 the co-chaperonine DNA J/HSP40 protein family

第 22 回日本エイズ学会、2008 年、大阪

15) 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

16) 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

「ランダムアプローチによるエイズおよびエイズ関連疾患に対する新規治療標的の
網羅的探索および新規治療薬開発」に関する研究

（分担）研究者 高橋 信弘 東京農工大学教授

研究要旨 プロテオミクスの手法を用い宿主細胞で Rev が関わり得るタンパク質
間相互作用ネットワークを明らかにし、その結果を基礎として Rev がターゲットと
する新規の宿主タンパク質間相互作用を特定した。

A. 研究目的

本研究の目標はRev機能に関わる宿主タンパク質の働きをプロテオミクスの手法で解析し、その結果に基づいてRev機能を障害する薬剤開発の基礎を構築することである。今年度は、Revが宿主細胞内で相互作用するタンパク質の同定を行い、Revが関与する宿主タンパク質間相互作用ネットワークを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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 検索により解析した。また、既知の Rev 結合タンパク質及び新規同定 Rev 相互作用タンパク質を bait として回収したタンパク質も解析した (図1)。Osprey タンパク質間相互作用解析ソフトを用い、既存のタンパク質間相互作用も含めた Rev が関与する宿主タンパク質間相互作用ネットワークマップを作成した。このマップを基に選定した宿主タンパク質と Rev を共発現し、宿主細胞内で Rev が影響をおよぼすタンパク質間相互作用を探索した。

（倫理面への配慮）

該当項目無し。

C. 研究結果

N 末端側及び C 末端側にエピトープタグを融

合させた Rev タンパク質に結合する複合体の構成タンパク質をそれぞれ質量分析-Mascot 検索で解析した結果、既存のタンパク質 3 種類 (SF2p32, NPM1, CKII) を含む合計 13 種類のタンパク質を Rev の相互作用タンパク質として同定した (図2・3)。次に、同定した NPM1、C23、FBL などのタンパク質を bait として、RNA 依存的及び非依存的に相互作用する複合体を回収し、それぞれについて構成タンパク質を 70-150 種類程度同定した。さらに、SMN1、SKB1 など Rev に二次的な相互作用を介して結合するタンパク質を bait として、それらに結合する複合体を回収し、それぞれについて 5-20 種類程度の構成タンパク質を同定した。これらの結果と既に報告があるタンパク質間相互作用を基に 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 (Edges) が含まれるタンパク質間相互作用ネットワークを明らかにすることができた (図4)。この中で、Rev が直接関与する Nodes は 19 種類、Edges は 28 種類であった (図5)。この Rev が直接関係するタンパク質間相互作用ネットワークには Rev/NPM1/YBX1/DBPA/C23/SF2p32 をコアとして構成されるものと Rev/C23/SF2p32/FBL をコアとして構成されるものの二つの緊密な相互作用ネットワークの存在が明らかになった。特に、後者は、4つのタンパク質のどれを bait にした場合にも、相互に回収される強固な複合体として存在しうることが示唆された。即ち、宿主細胞内で存在する C23/SF2p32/FBL を

コアとした相互作用ネットワークは、Rev が入り込むことで、何らかの影響を被ることが考えられた。

そこで、この中の FBL を bait として検出されるタンパク質間相互作用に Rev を共存させた場合に、何らかの影響が生じるかどうかを調べた。その結果、C23/SF2p32/FBL をコアとした相互作用ネットワークの中で、FBL を介して相互作用していた PRMT1 が Rev によって FBL から解離させられることを見いだした。さらに、C23/SF2p32/FBL をコアとした相互作用ネットワークには、新たに Rev に結合する多くのタンパク質が持ち込まれることが判明した。

D. 考案

本研究によって、今までに知られていない Rev が宿主細胞内でターゲットとするタンパク質間相互作用ネットワークの候補を多数見いだすことができた。これらの候補の中で、今回は C23/SF2p32/FBL をコアとするタンパク質間相互作用ネットワークに対する Rev の効果を調べた結果、Rev は、C23/SF2p32 との相互作用には影響しないが、FBL に相互作用する PRMT1 を解離させて FBL に結合し PRMT1 と置き換わることを見いだした(図6)。FBL は RNA メチル化酵素であり、PRMT1 はアルギニンのモノメチル化と非対称なジメチル化を触媒するタンパク質アルギニンメチル化酵素である。FBL は、また、アルギニンのモノメチル化と対称なジメチル化を触媒する PRMT5 とも結合し、これらと複合体を形成することで RNA 及びタンパク質の両方のメチル化を制御していると考えられている。HIV-1 ウイルスの宿主細胞内でのライフサイクルを維持していく上で PRMT1, PRMT5 などのアルギニンメチル化酵素及び RNA メチル化酵素が HIV-1 の複製や細胞内での移行において抑制的な役割をしていることが知られており、これらが触媒するメチル化反応は HIV-1 ウイルスにとって様々な効果を及ぼす反応であると考えられる。今回の結果は、Rev が FBL を介した PRMT1 反応を乗っ取ることで、メチル化による HIV-1 ウイルスのライフサイクルにおける抑制効果から逃避あるいは逆に利用している可能性を示唆している。Rev と FBL の相互作用を妨害することで、HIV-1 ウイルスの増殖を抑制で

きる可能性がある酵素及び RNA メチル化酵素が HIV-1 の複製や細胞内での移行において抑制的な役割をしていることが知られており、これらが触媒するメチル化反応は HIV-1 ウイルスにとって様々な効果を及ぼす反応であると考えられる。今回の結果は、Rev が FBL を介した PRMT1 反応を乗っ取ることで、メチル化による HIV-1 ウイルスのライフサイクルにおける抑制効果から逃避あるいは逆に利用している可能性を示唆している。Rev と FBL の相互作用を妨害することで、HIV-1 ウイルスの増殖を抑制できる可能性がある。

E. 結論

今回、Rev が FBL と PRMT1 の相互作用を妨害していることを見いだしたが、この他にも Rev が宿主細胞内でターゲットとし得る新規のタンパク質間相互作用を多数明らかにできた。本研究の結果、Rev 機能を障害するための新規のターゲットを網羅的に探索する方法を提供でき、Rev 機能を阻害する薬剤を開発するための新しいアプローチの基礎を構築できたと考える。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

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
他3件

2. 学会発表

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
他10件

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

無し。

図1 Revが関わり得るヒト細胞内タンパク質間相互作用ネットワークの解析

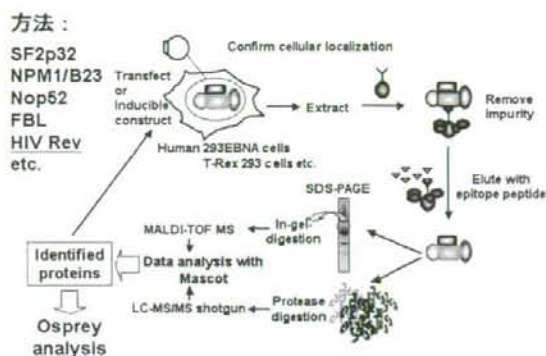


図3 FLAG-Rev or Rev-FLAGに相互作用するタンパク質

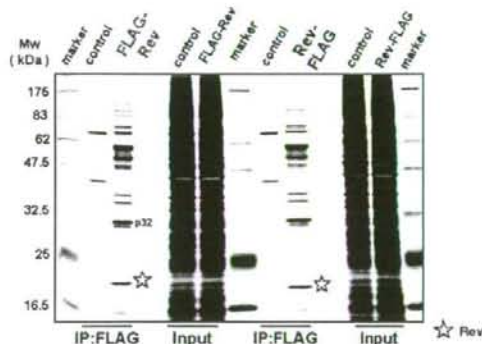


図5 Rev相互作用タンパク質ネットワーク

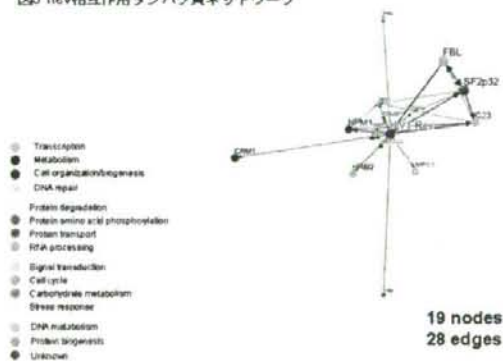


図2 Revはタグの融合位置に関わらず核小体・核質・細胞質に局在する

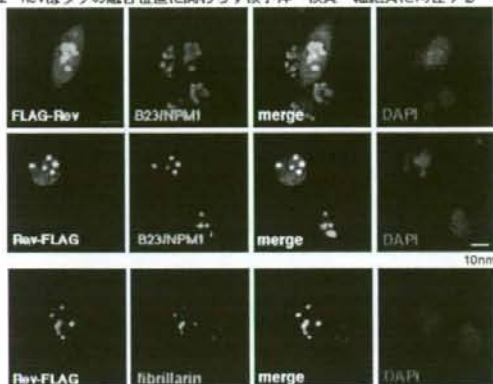


図4 Revが関わり得るタンパク質間相互作用ネットワーク

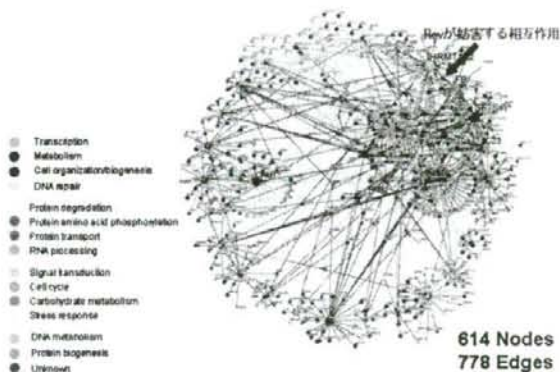
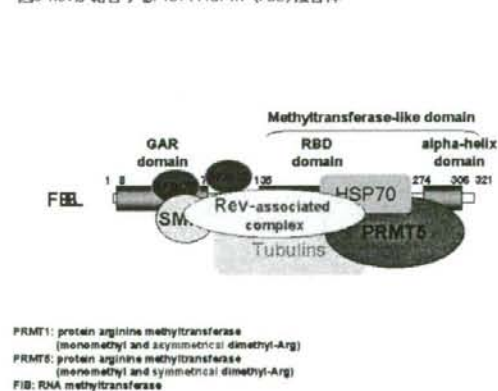


図6 Revが結合するFibrillar in (FBL)複合体



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

分担研究者 岡田誠治 熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野
研究協力者 鈴 伸也 熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野

研究要旨 HIV-1 Nef 蛋白を標的とした新たな抗 HIV-1 薬を開発するために、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系を用いて様々な物質のスクリーニングを行った。得られた数種類の候補物質のうち低分子化合物 2c は、Nef 蛋白と Hck の結合を阻害することにより、Nef の機能を阻害することが判明した。2c は細胞毒性も弱いことから、これまでと作用機序の異なる抗 HIV-1 薬のリード化合物として期待される。

A. 研究目的

HIV-1 の感染者は年々その数が増加し、感染者は全世界で 4 千万人を超え、近年インドや中国では著しく HIV-1 感染者が増加している。本邦においても HIV-1 感染者は 1 万人を突破し、その数は徐々に増えている。有効な治療法がなかったエイズも、有効な薬剤の開発によりその生命予後は著しく改善している。しかし、現在の治療法では HIV-1 の完全な排除は事実上不可能であり、薬剤の長期投与による副作用や薬剤耐性など多くの問題が生じている。現在の治療薬は、HIV-1 の生活環を阻害する薬剤であり、作用機序の異なる新たな薬剤の開発が望まれている。

HIV-1 は、いくつかのアクセサリー蛋白を有しており、これらのアクセサリー蛋白が、エイズの病態に深く関わっていることが知られている。特に、Nef 蛋白は、HIV-1 の複製能を高めるなどエイズの発症を助長する重要な病原因子である。そのため、Nef 蛋白を分子標的とした化合物は、新たな作用機序を持つ抗 HIV-1 薬として潜伏感染や薬剤耐性ウイルスへの効果が期待される。本研究では、Nef 蛋白を標的とした新規薬剤開発を目指して、HIV-1 の重要な標的細胞であるマクロファージ系細胞における Nef 蛋白の影響を指標に、低分子物質ライブラリーを含む様々な物質の大規模スクリーニングを行った。

B. 研究方法

1) Nef 蛋白を標的とした抗 HIV-1 薬のランダムライブラリー大規模スクリーニング

Nef 活性化誘導型細胞株 (TF-1-fms-Nef) が Nef の活性化により増殖抑制をきたすことを指標に、新たなバイオアッセイ系を樹立した。本系では、添加薬剤により Nef の活性化が阻害されると、TF-1-fms-Nef の増殖抑制が解除されることを指標にしたバイオアッセイである。TF-1-fms-Nef を 96 穴プレートに撒き、合成エストロゲンであるタモキシフェンと低分子物質を添加し、MTT 法により細胞増殖を計測し、タモキシフェン単時投与と比べて細胞増殖が回復している低分子化合物を陽性として二次スクリーニングと機能検査をおこなった。

2) Nef 蛋白, Hck, M-CSF 受容体蛋白の結合阻害を指標とした二次スクリーニング系の樹立

Nef 蛋白は、その Proline-rich 領域と非受容体型チロシンキナーゼ Hck の SH3 領域を介して結合する事が既に明らかになっている。そこで、GST 蛋白質と融合させた Nef 蛋白を用いた Pull-down 法による二次スクリーニング法を樹立した。

3) 候補物質の作用機序の解析

変異 Nef 蛋白と Hck を用いて候補物質の作用機序の解析を行った。また、FACS を用いて MHC class I の細胞表面発現低下を指標に効果判定を行った。

(倫理面への配慮)

本年度は、細胞株を用いたバイオアッセイと蛋白解析のみであり、倫理面に配慮が必要な研究は行っていない。

C. 研究結果

1) Nef 蛋白を標的とした抗 HIV-1 薬のランダムライブラリー大規模スクリーニング

Enamine 低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。2万種類すべてのスクリーニングを終了し、3種類の陽性化合物(69-4H, 71-3H, 154-11A)を得た。また、その他の様々な物質ライブラリー等から数種類の候補物質を得た。

2) Nef 蛋白, Hck, M-CSF 受容体蛋白の結合阻害を指標とした二次スクリーニング系

GST 蛋白質と融合した Nef 蛋白を作成し、Pull-down 法により Hck との結合阻害を蛋白レベルで解析する系を樹立した。Enamine 低分子化合物ライブラリーから得られた 69-4H, 71-3H, 154-11A には、Nef と Hck の結合阻害作用は認められなかったため、その他の機序による Nef の機能阻害作用が示唆された。協発酵より供与された UCS15A とその誘導体 2b, 2c(Chemistry & Biology 10;433, 2003)に強い Hck との結合阻害作用が認められた。

3) 候補物質の作用機序の解析

変異 Nef 蛋白と Hck を用いた Pull-down 法により UCS15A とその誘導体 2b, 2c が、Nef proline-rich 領域阻害作用を有していることが判明した。また、特に 2c は、Nef 蛋白により引き起こされる Fms の輸送・成熟障害と MHC Class I の細胞表面発現低下を解除することが証明された。2c は UCS15A, 2b に比べて作用が強く、細胞毒性が少ないことが判明した。

D. 考察

HIV-1 Nef 蛋白を標的とした新たな抗 HIV-1 の開発を目的に、バイオアッセイにより低分子物質の大規模スクリーニングを行った。本スクリーニング系は、Nef 活性化誘導型細胞株 (TF-1-fms-Nef) が、Nef の活性化により細胞増殖が抑制され、Nef の機能阻害剤が存在すると細胞増殖抑制が解除されるというバイオアッセイである。スクリーニングにより数種類の候補物質が同定されたが、Hck と Nef の結合阻害作用を有していたのは、UCS15A とその誘導体 2b, 2c のみであった。これらは、強力な Nef proline-rich 領域阻害作用を有し、軽微な MHC class I 発現低下阻害効果を有していた。特に 2c は細胞毒性も弱く、新たな作用機序を持つ抗 HIV-1 薬のリード薬物として期待できる。抗 HIV-1 薬として HIV-1 Nef

蛋白を標的とした薬剤は、これまでに開発された薬剤とまったく作用機序が異なる抗 HIV-1 薬として、既存の薬剤との併用療法で効果が期待される。また、その作用機序から潜伏感染や薬剤耐性ウィルスに対する効果も期待できることから、その開発が急がれる。

E. 結論

Nef 蛋白を標的とした抗 HIV-1 薬開発のために、低分子物質の大規模スクリーニングを行い、最終的に 1 種類の候補物質を得ることができた。今後、細胞レベル、動物レベルで候補物質の抗 HIV-1 薬としての有効性と作用機序の解明を行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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.

2. 学会発表

- 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

研究報告書
厚生労働科学研究費補助金（政策創薬研究事業）
分担研究報告書

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に関する研究

分担研究者 程 久美子 東京大学大学院理学系研究科准教授

研究要旨

HIV, HCV がヒトに感染した場合に、ヒト内在性の遺伝子発現には影響を与えず、感染した HIV, HCV を特異的に抑制する siRNA 配列設計アルゴリズムをコンピューターシヨナルに開発し、培養細胞への感染実験によって、設計した siRNA の有効性を検証した。

A. 研究目的

RNAi機構分子の設計アルゴリズムの開発とその検証。

B. 研究方法

siRNAは内在性遺伝子を特異的に抑制するだけでなく、細胞に感染したウイルス由来のRNAを標的とすることでウイルスの増殖も抑制できるため、RNAi法をウイルス感染を防止するための臨床的応用技術として利用することが期待されている。しかし、HIVウイルスやHCVウイルスなどの多くのRNAウイルスには、多様な配列のサブタイプが存在する。さらに、1種類のsiRNAを単独で用いた場合、その標的となる部位に非常に早いスピードで変異が入ることによって耐性ウイルスが容易に出現するため、RNAi法での抑制は難しいとされている。そこで我々は、ウイルス自身の生存に不可欠な領域には変異が起りにくいと想定し、ウイルス配列のなかで高度に保存された領域を特定して活性が高いsiRNAを設計し、その効果をヒト培養細胞への感染性クローンの導入実験によってあきらかにする。

（倫理面への配慮）

組換えDNA実験が含まれているため、所属研究機関の組換え生物等の使用等に執る拡散防止措置の確認・承認を受けている。

C. 研究結果

感染した HIV, HCV に特異的に作用する siRNA 設計アルゴリズムを開発し、“siVirus (<http://siVirus.RNAi.jp/>)” という Web サーバを構築して公開した（図1）。さらに、HIV 感染クローンを導入した培養細胞を用いて、設計した siRNA が有効であることを確認した（図2）。

D. 考察

開発した方法に基づく HIV, HCV に特異的に作用する siRNA は、実際に感染細胞で有効であることが明らかとなったが、ヒトゲノム全体におけるプロファイリングを行うことによって、その特異性を検証していくことが必要と考える。さらに、実際の応用についての方法の構築が必要である。

E. 結論

HIV, HCV を特異的に抑制できる新規手法の開発は重要である。その1つの方法として RNAi 法が利用できる可能性を示したことになる。

F. 健康危険情報

siRNA target site	siRNA efficacy prediction	≤ 2 mismatch	Conservation in the selected sequences
21bp target + 2nd overhang	U1-Tel Rev/Rev/Amara/gp120	off-target hits	(-conserved, *not conserved, sequence not available)
AAAGCTCAATAAAGCTTGCTG	yes	1 (0/182)	95% (146/152)
AGCTCAATAAAGCTTGCTG	yes	2 (0/182)	99% (146/152)
TTCAAAATTTGGGTTATTG	yes	2 (0/182)	92.3% (160/172)
TCAAAATTTGGGTTATTG	yes	2 (0/182)	92.3% (160/172)
AGGAGAGATGGGTCGAGAG	yes	2 (0/182)	92.3% (152/165)
CGAGAGCTAGAGGAGAGAG	yes	7 (0/182)	90.3% (136/151)
GACTAGCGAGGCTAGAGAG	yes	0 (0/182)	90.8% (149/164)
CTAGCGAGGCTAGAGAGAG	yes	1 (0/182)	90.8% (149/164)
GGAGCTAGAGGAGAGAGAG	yes	4 (0/182)	90.3% (149/165)
AGCGAGGCTAGAGGAGAGAG	yes	4 (0/182)	90.2% (148/164)
ATTCAAAATTTGGGTTATTG	yes	0 (0/182)	89.5% (163/182)
AGGGAAATTSAGATAGAGAG	yes	2 (0/182)	89% (162/182)
GGGAAATTSAGATAGAGAG	yes	3 (0/182)	87.9% (160/182)
TTTAAATTSAGATAGAGAG	yes	0 (0/182)	87.8% (144/164)
CAGCTAGAGCTAGAGAG	yes	1 (0/182)	87.3% (134/153)
TCAGCTAGAGCTAGAGAG	yes	2 (0/182)	87.3% (134/153)
AGCGAGGCTAGAGGAGAG	yes	0 (0/182)	87.3% (141/161)
AGCGAGGCTAGAGGAGAG	yes	4 (0/182)	87.3% (139/158)
AGCGAGGCTAGAGGAGAG	yes	1 (0/182)	87.1% (129/148)
AGCGAGGCTAGAGGAGAG	yes	2 (0/182)	87.1% (129/148)
CCGAGGCTAGAGGAGAGAG	yes	0 (0/182)	87.1% (129/148)
CCGAGGCTAGAGGAGAGAG	yes	1 (0/182)	87.1% (129/148)
GGTAACTAGAGGAGAGAG	yes	1 (0/182)	87% (101/116)
CGAGGCTAGAGGAGAGAG	yes	3 (0/182)	86.8% (136/156)
CGAGGCTAGAGGAGAGAG	yes	4 (0/182)	86.2% (157/182)
AGTTSAGATAGAGGAGAGAG	yes	1 (0/182)	85.7% (156/182)

図1 siVirus (<http://siVirus.RNAi.jp/>) ウェブサーバによる siRNA 設計結果の一例。HIV-1 のサブタイプ B, C, CRF01_AE の合計 182 種を選択して siRNA 設計をおこなった。

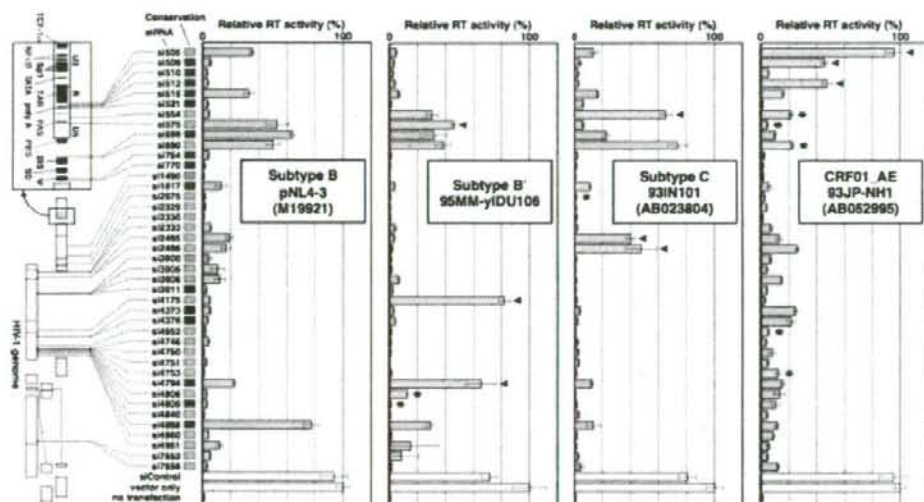


図2 本研究で構築したアルゴリズムで設計した siRNA が示す HIV-1 増殖抑制効果を、4 種の HIV-1 感染性分子クローンで評価した。いずれも siRNA の終濃度は 5 nM。

G. 研究発表

1. 論文

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

2. 学会発表

- 内藤雄樹、納富香子、小野木利成、西郷薫、武部豊、程久美子。哺乳類細胞で有効かつ標的遺伝子に特異的な siRNA 設計法の確立とその抗ウイルス干渉法への応用。RNA 研究若手の会。2007.
- 内藤雄樹、納富香子、小野木利成、程久美子、西郷薫、武部豊。高いゲノム多様性をもつウイルスに効果的な siRNA の設計。日本分子生物学会。2007.
- 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.
- Naito Y, Takebe Y, Ui-Tei K, Saigo K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. 20th IUBMB International

Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 2006.

- Ui-Tei, K. and Saigo, K. The current infrastructure and activities of RNAi research in Japan. NRPGM/A-IMBN Workshop on Genome-Wide Approaches in Genomic Medicine. 2007.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし。

エイズ感染阻害を目指した特殊ペプチドの創製と探索

研究分担者 菅 裕明 東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究要旨 菅研究室で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、本研究班で新規に同定された標的に対する阻害剤を探索する。本年度は、HIV 関連標的蛋白質に対する環状特殊ペプチドの探索を行った。

A. 研究目的

本研究は、菅らが独自開発した PaPID (Random Peptide Integrated Discovery) システムを応用し、生体内安定性を有した特殊ペプチドを迅速に合成して、エイズ感染阻害または複製阻害を目指した新規薬剤を開発する。

B. 研究方法

当研究室で独自に開発した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を合成、薬剤探索にあてる。本技術の特筆すべき点は、フレキシザイム (tRNAアミノアシル化RNA触媒) を用いて、普遍遺伝暗号表を初期化し、通常アミノ酸を異常アミノ酸に対応させた改変遺伝暗号表を作成し、それに沿った形でmRNAを翻訳することで特殊アミノ酸を合成する手法である。また、昨年開発に成功したRaPIDディスプレイ法を用い、標的蛋白質への阻害剤の迅速探索を行う。

(倫理面への配慮)

本研究はヴィトロを中心としており、倫理面への配慮を特に必要ない。ただし、全てP2レベルで実験は行っている。

C. 研究結果

本年度は、RaPIDディスプレイ法を用いて、 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 (図1)、CD81のLEL(-GST-biotin)ドメインに対し、特殊環状ペプチド阻害剤の探索を行った (図2、GST-biotinは固定タグを示す)。その結果、特殊環状ペプチドの濃縮に成功し、現在特殊ペプチドの配列情報の解析を行っている。今後、これらの代表的なペプチドに関して化学合成を行い、その生理活性を探る。

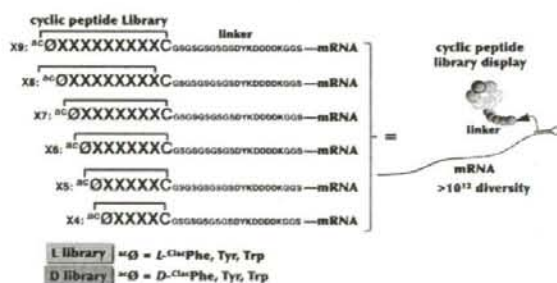


図1

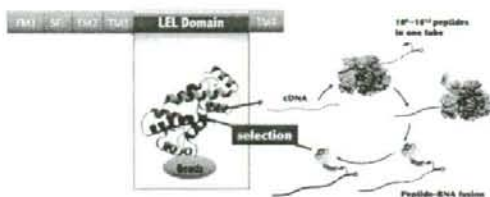


図 2

D. 考案

RaPID ディスプレイ法による特殊ペプチドの探索技術は、迅速且つ確実に標的に結合する特殊環状ペプチドが獲得できることがわかった。専攻研究では、一般的に 100nM 前後の解離定数をもつ分子が獲得でき、場合によってはさらに結合能力の強いものも発見されている。本研究で用いた LEL は HCV 感染標的であるが、HCV と HIV は併発する危険性が極めて高く、HCV の阻害剤の開発は避けられない。また、現在調製が遅れている CXCR4 及び CCR5 についても、調製でき次第探索に取りかかる予定である。

E. 結論

目標の技術開発は達成し、探索の結果特殊環状ペプチドの候補が得られた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga "Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids" *Journal of American Chemical Society* **130**, 16861-16863 (2008).
- 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 HPI chromo domain binding" *Chemistry & Biology* **15**, 1166-1174 (2008).

- A. Ohta, H. Murakami, H. Suga "Polymerization of α -hydroxy acids by ribosomes" *ChemBioChem* **9**, 2773-2778 (2008).

- 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).

- Y. Goto, H. Murakami, H. Suga* "Initiating translation with D-amino acids" *RNA* **14**, 1399-1410 (2008).

- 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).

- T.-J. Kang, H. Suga* "Ribosomal synthesis of nonstandard peptides" *Biochemistry and Cell Biology* **86**, 92-99 (2008).

- A. Ohta, Y. Yamagishi, H. Suga* "Synthesis of biopolymers using genetic code reprogramming" *Current Opinion in Chemical Biology* **12**, 159-167 (2008).

- 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).

- 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).

- 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).

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

研究要旨

C101A 化合物群は、ヒトタンパク質 CD81LEL に結合することで C 型肝炎ウイルス (HCV) の侵入を防ぎ、抗 HCV 活性を有すると考えられている。しかし、今後の論理的創薬研究に必要な C101A 化合物群-CD81LEL の複合体構造はまだ得られていない。本研究では、精密ドッキング計算手法を使用して、信頼性の高い CD81LEL-C101A 類似化合物複合体構造を構築する。

まず、CD81LEL のアポ体 X 線結晶構造に対して、疎水性サイト探索プログラム HBOP を用いた計算を行い、リガンド結合サイト候補を探索した。次に、見つけ出したすべての結合サイト候補に対して、最も強い抗 HCV 活性を有する化合物 C101A-Re の精密ドッキング計算を行った。計算は、Schrödinger 社の Glide を用いて、タンパク質の柔軟性も考慮する Induced Fit モードで行った。得られたポーズの中から、スコアが良い上位 50 個を選択し、MM-PBSA 法を用いて複合体の自由エネルギー (G_{complex}) を評価した。そして、 G_{complex} の値が最も低いポーズを C101A-Re の相互作用様式とした。さらに、C101A-Re に対して得られた鍵穴構造を用いて、抗 HCV 活性が弱い C101A 化合物群のドッキング計算 (通常の XP モード) を行い、同様に各化合物の相互作用様式を決定した。最後に、一点計算の MM-PBSA 法により、各化合物の ΔG_{bind} を評価し、抗 HCV 活性値との相関関係を調べた。

HBOP 計算の結果、3箇所異なる結合サイト候補が同定された。次に、この3箇所の中から、HCV エンベロープタンパク質が結合すると推測されている領域に最も近いサイトが、C101A-Re の結合サイトであると決定できた。最後に、各化合物について計算された ΔG_{bind} の値と抗 HCV 活性実験値の間にある程度相関関係があることがわかった。以上の結果は、得られた相互作用モデルが非常に確からしいことを示す。

A. 研究目的

C101A 化合物群は、ヒトタンパク質 CD81LEL に結合することで C 型肝炎ウイルス (HCV) の侵入を防ぎ、抗 HCV 活性を有すると考えられている。しかし、今後の論理的創薬研究に必要な C101A 化合物群-CD81LEL の複合体構造はまだ得られていない。そこで、本研究の目的は、CD81 を標的蛋白質とする新規エイズ治療薬を合理的に開発するために、精密ドッキング計算手法を使用して、信頼性の高い C101A 化合物群-CD81LEL の複合体構造をモデリングすることである。

B. 研究方法

まず、CD81LEL のアポ体 X 線結晶構造に対して、疎水性サイト探索プログラム HBOP (*Biol Pharm Bull.* 2008, 31(8), 1552-8) を用いた計算を行い、リガンド結合サイト候補を探索した。次に、見つけ出したすべての結合サイト候補に対して、最も強い抗 HCV 活性を有する化合物 C101A-Re の精密ドッキング計算を行った。計算は、Schrödinger 社の

Glide を用いて、タンパク質の柔軟性も考慮する Induced Fit モードで行った。得られたポーズの中から、スコアが良い上位 50 個を選択し、MM-PBSA 法を用いて複合体の自由エネルギー (G_{complex}) を評価した。そして、 G_{complex} の値が最も低いポーズを C101A-Re の相互作用様式とした。さらに、C101A-Re に対して得られた鍵穴構造を用いて、抗 HCV 活性が弱い C101A 化合物群のドッキング計算 (通常の XP モード) を行い、同様に各化合物の相互作用様式を決定した。最後に、一点計算の MM-PBSA 法により、各化合物の ΔG_{bind} を評価し、抗 HCV 活性値との相関関係を調べた。

(倫理面への配慮)

計算化学的研究なので、倫理面で特に配慮すべき点は無い。

C. 研究結果

HBOP 計算の結果、3箇所異なる結合サイト候補が同定された (図 1)。

次に、この3箇所の中から、HCV エンベロープタンパク質が結合すると推測されてい

る領域に最も近いサイトが、C101A-Reの結合サイトであると決定できた。C101A-Reの相互作用様式を図2に示す。

最後に、各化合物について計算された ΔG_{bind} の値と抗HCV活性実験値の間にある程度相関関係があることがわかった(図3, 4)。

D. 考察

構築したCD81LEL-C101A類縁化合物複合体構造に基づいた各リガンドの結合親和性計算値と抗HCV活性実験値との間にある程度相関関係が見いだされたということは、得られたCD81LELとリガンド間の相互作用モデルの信頼性が高いということを示している。

我々のグループは平成20年度のみに参加であったが、次の研究につながる十分な成果が得られたので、今後、今回得られた結果に基づき新たなCD81LEL結合リガンドを探索するために、市販の化合物データベースのin silico screeningを行う予定である。

E. 結論

今回の研究成果から、CD81LEL結合リガンドであるC101A化合物群がエイズ関連疾患の新規治療薬となる可能性が高いことが示されたとともに、新規エイズ治療薬開発のためのin silico screeningを行う道が開けたといえる。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 Letter, 16, 3565-3579 (2008)

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)

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)

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)

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).

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).

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).

「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)

「MM-PBSA法を用いたキチナーゼ阻害剤ArgadinおよびArgifinの結合自由エネルギー計算」

合田浩明, 柳井雄一, 広野修一
Pharma VISION NEWS, No.11(March), 7-11 (2008)

「In Silico 創薬技術に基づく Structure-Based Drug Design (SBDD) の実際」

広野修一, 土田圭一, 相川幸彦
ファルマシア, 44(4), 327-332 (2008)

2. 学会発表

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]

Watanabe E, Yamaotsu N, Kusuhara H, Hirono S, Sugiyama Y

PHARMACOPHORE 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]

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]

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. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

無し

図1 CD81 LELにおける疎水性サイト(リガンド結合サイト候補)の探索



図2 精密ドッキング計算によるC101A-reの相互作用様式解析

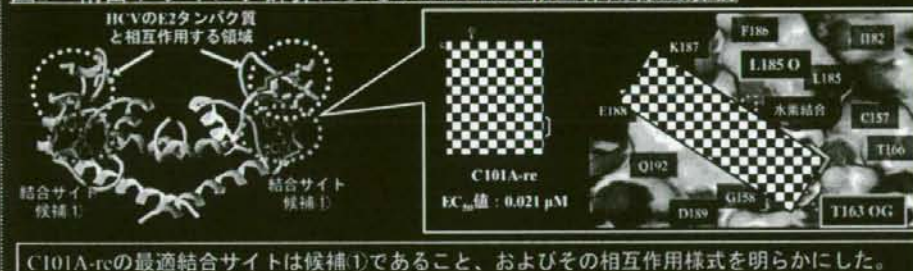
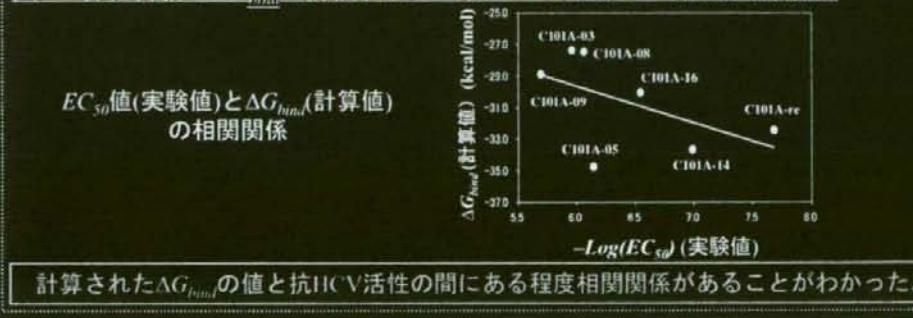


図3 他のC101A化合物群の相互作用様式解析



図4 各化合物の ΔG_{bind} の評価、および抗HCV活性値との相関関係解析



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表