

HCV ヘリカーゼ (NS3 の C 末がヘリカーゼ活性をもつ) の 3 次元構造を基にした薬剤探索によって、いくつかの強力な阻害剤が同定されている。QU663 はそのようなヘリカーゼ阻害剤の一つで、その評価が進行中である。

3 宿主タンパク質を標的とする HCV 治療薬開発

HCV はその増殖過程の中で、様々な宿主機能を利用していることが知られている。HCV 増殖に必須な宿主因子を特異的に阻害する薬剤は HCV 治療薬として応用できる可能性がある。

3.1 サイクロフィリン B 阻害剤

HCV の複製に係るポリメラーゼ複合体は、ポリメラーゼ本体の NS5B を中核として、NS4B, NS5A といったウイルスタンパク質と、それらと相互作用をするサイクロフィリン B や human vesicle-associated membrane protein (VAMP) -associated membrane protein A (hVAP-A), FBL2 などの宿主タンパク質から形成される。先に述べたようにシクロスポリン A や DEBIO-025 は、このポリメラーゼ複合体を形成している宿主タンパク質の一つであるサイクロフィリン B に結合することによって、NS5B ポリメラーゼ活性を阻害する (前節 2.2 (3) 参照のこと)。

3.2 スフィンゴ脂質合成

(セリンパルミトイル転移酵素) 阻害剤

ポリメラーゼ複合体は、コレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ「脂質ラフト (lipid raft)」とよばれる膜構造を足場として機能する。中でも、NS5B ポリメラーゼはスフィンゴ脂質結合サイトをもち、ポリメラーゼ活性が発揮されるには、スフィンゴ脂質を介してラフトに係留されていることが必要である。そのため、一連のスフィンゴ脂質合成阻害剤は HCV 増殖阻害作用を示すことが知られている。スフィンゴ脂質合成の律速段階を触媒する key enzyme である serine palmitoyl

transferease (SPT) を標的とするミリオシンや NA455 (中外) はスフィンゴ脂質の生合成を阻害することで、HCV 増殖阻害効果を示す。

3.3 コレステロール・イソプレノイド生合成阻害剤

HCV 複製は、また脂質ラフトの主要な構成脂質であるコレステロール代謝・生合成系と緊密な関連性があることが知られている。コレステロール生合成の key enzyme である 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA 還元酵素 (HMG CoA reductase) を阻害するフルバスタチンなどのスタチン類 (高コレステロール血症治療薬として用いられる) は、コレステロール合成や、イソプレノイド合成を阻害することを介して HCV 増殖を阻害することが知られている。その分子標的の一つは、ポリメラーゼ複合体に関与する宿主タンパク質 FBL2 (NS5A に結合している) であり、イソプレノイドの一つであるゲラニルゲラニオールが FBL2 に付加することがポリメラーゼ活性発現に必要であることが明らかにされている。ゲラニルゲラニル化修飾の標的タンパク質の一つが FBL2 であり、実際ゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤によって HCV 増殖が阻害される。

ここに述べた宿主因子を標的とする HCV 阻害剤のいくつかについては、臨床試験が現在進行中である。宿主因子を標的とする場合、潜在的に副作用の問題があるが、ウイルスタンパク質を標的とする場合と異なって、変異性の問題をほとんど考慮する必要がないことは、治療薬開発を考える上で有利な点と考えられる。

4 新規治療標的

以上に述べたターゲットだけでなく、理論的には HCV の生活環のあらゆるステップが阻害剤開発の標的となりうる。現在次に述べるような阻害剤が開発中にある。

4.1 α -グリコシダーゼ阻害剤

以上に述べた作用点以外を標的とする開発中の薬剤の一つとして iminosugar が知られている。

Iminosugar は、細胞膜を透過して ER に蓄積し、ER に局在する α -グリコシダーゼを阻害することが予測される。 α -グリコシダーゼを阻害することによって HCV エンベロープタンパク質の糖鎖修飾に異常が起こり、ウイルスのアッセムブリーが阻害される。このようなカテゴリーの薬剤として、UT-231B (United Therapeutics) や MX-3253 (celgosivir) (Migenex) が知られている。後者はカスチノスベルミンのプロドラッグである。単独では、抗ウイルス効果はさほど強力ではないが、Peg-IFN 十リバビリン併用による第 2 相試験が進行中である。

4.2 p7 イオンチャネル阻害剤

HCV がコードする p7 タンパク質は陽イオンチャネルの機能を持ち、ウイルスの粒子の成熟・放出に関与するいわゆる viroporin ファミリー (ウイルス由来のチャネルタンパク質) の一つと考えられている。長鎖アルキル側鎖をもつ Iminosugar のあるもの (N-nonyl-deoxyjirimycin など) は、このイオンチャネルの阻害剤としての機能をもつことが報告されており、治験が進められている。すなわち長鎖アルキル側鎖を持つ Iminosugar は α -グルコシダーゼ阻害活性と p7 イオンチャネル阻害活性の双方によって HCV 複製阻害効果をもつと考えられる。

4.3 HCV エントリー阻害剤

HCV エントリー受容体を標的とする阻害剤の開発は魅力ある課題である。HCV のエントリー受容体としては、CD81, SR-B1, Claudin-1 が同定されているが、例えば HeLa 細胞にこの 3 種の受容体を強制発現しても HCV は感染しないことから、肝細胞に特異的な未同定の因子がさらに関与していると推定されている。これらの HCV 受容体は阻害剤探索の魅力あるターゲットと考えられるが、現時点ではそれらを標的とする阻害剤は報告されていない。最近われわれは、HCV の感染性クローン JFH-1 を用いた感染性アッセイを用いて同定した阻害物質の中に、CD81 そのものを標的とする可能性のある低分子 HCV エントリー阻害剤を見出した。現在、標

的タンパク質との結合モデルを手掛かりに、合成展開、構造活性相関解析が進行中である。

5 おわりに—今後の展望

これまで HCV 阻害剤探索は、主として細胞内の増殖過程を標的とするものであった。それは、HCV の良い細胞培養系がなく、いわゆる「サブゲノミック・レプリコンアッセイ」が、ハイ・スループットの薬剤探索・評価を可能とするほとんど唯一の方法であったためである。しかし、脇田らが HCV 感染性 HCV クローン (JFH-1) の分離に世界で初めて成功し、それをを用いた細胞培養系が (少なくともゲノタイプ 2a に関しては) 確立した現在、阻害剤探索に新たな可能性が開かれている。HCV infectivity assay が可能となった現在、「サブゲノミック・レプリコンアッセイ」では評価できない HCV 生活環境のエントリーを含む初期過程や、アッセムブリーからウイルス放出に至る増殖サイクルの最後期過程を標的とするあらゆるステップを対象とした阻害剤探索が可能となっており、今後、様々な標的に対する新規薬剤が続々と見出される可能性がある。

阻害剤探索は、単に創薬展開のシーズをもたらすだけでなく、その作用メカニズム、作用標的の解析を介して HCV 感染・増殖の分子機構の解明への手掛かりを与え、という意味でも重要である。今後、従来の阻害剤探索のアプローチに加えて、最新の chemical biology の手法を駆使した新たな創薬展開が期待される。

参考文献 (総説論文の紹介にとどめる)

- 1) DeFrancesco, R. and Migliaccio, G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 436 : 953-960 (2005)
- 2) Pawlotsky, J. -P., Chevaliez, S. and McHutchison, J. G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 132 : 1979-1998 (2007)
- 3) Moradpour, D. Penin, F. and Rice, C. M. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology* 5 : 453-463 (2007)
- 4) 土方誠, 渡士幸一, 下連野邦忠. HCV 増殖システム. pp. 114-118. *肝疾患 Review* 2006-2007. 日本メディカルセンター

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

武部 豊 上西理恵

索引用語：HCVエントリー阻害剤, JFH-1, 阻害剤スクリーニング,
HCVccアッセイ, HCVppアッセイ

要旨：ウイルスエントリーは重要な創薬標的である。しかしHCVに関しては、これまでよい細胞培養系が存在しなかったことから、HCVエントリーやウイルス増殖の最後期過程を標的とする阻害剤の探索は、ほとんど未開拓な分野として残されてきた。しかし、感染性分子クローンJFH-1を用いた細胞培養(HCVcc)アッセイや、シェード粒子を用いた(HCVpp)アッセイ系が確立・整備されてきたことで、新しいタイプのエントリー阻害剤や粒子形成阻害剤の探索が可能となってきた。

1 はじめに

これまで、HCV阻害剤スクリーニングやその薬効評価には、HCVサブゲノムを用いたレプリコン・アッセイ¹⁾が汎用されてきたが、レプリコン・アッセイによっては、ウイルスの吸着、エントリー、脱殻などの感染初期過程や、ウイルス粒子のアッセブリーから粒子放出に至る感染の最後期過程の阻害剤の探索・評価はできないという原理的問題があった(図1)。

しかし、脇田らによって樹立された感染性HCV分子クローン(pJFH-1)²⁾に基づく

HCVの細胞培養系(HCVccアッセイ)が開発されたことにより、HCV感染からウイルス放出までのHCV増殖サイクルのいずれのステップに対する阻害剤も同定・評価できるようになった。

一般に、抗ウイルス剤開発の標的としてまず第一に取り上げられるターゲットは、ウイルスゲノムにコードされ、かつウイルス増殖に必須な機能(酵素活性)をもつウイルスタンパク質である。HCVでは、そのような標的タンパク質として、NS3/NS4A遺伝子でコードされるプロテアーゼおよびNS5B遺伝子でコードされるRNAポリメラーゼの2つがあ

Yutaka TAKABE and Rie UENISHI: Novel HCV entry inhibitors: Strategy for screening and characterization
国立感染症研究所エイズ研究センター [〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1]

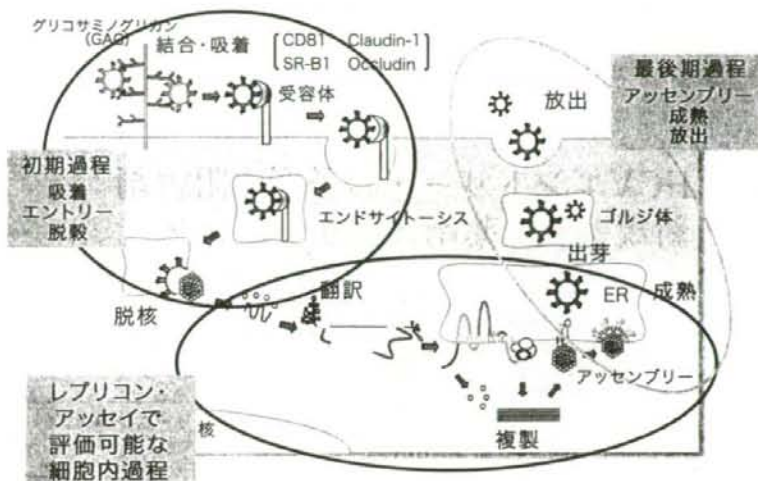


図1 HCV生活環(ライフサイクル)とレプリコン・アッセイによって可能な阻害剤探索の範囲背景の原因は松浦善治・鈴木哲雄博士の好意による

り、これら酵素タンパク質に対する阻害剤開発がHCV治療薬開発研究の中心となっている。それに対して、これら2種のウイルスタンパク質以外を標的とする開発研究は現時点では非常に限られている。なかでも、HCVエンタリー阻害剤の開発は魅力的な研究課題であるが、ほとんど未開拓のまま残されている。本小論文では、HCVエンタリーを標的とする治療薬開発の現状と、エンタリー阻害剤探索の戦略に関して、われわれの経験を交えながら概説したいと考える。

2 HCVエンタリー阻害剤の探索システム

1. HCV 阻害剤アッセイ

(a) HCV レプリコン・アッセイ

レプリコン・アッセイは、HCVの感染初期過程をバイパスしたアッセイであり、エンタリー後段階(post-entry)の細胞内でのウイルス複製過程を標的とする阻害剤の探索評価に非常に便利なシステムである。ハイスル-

ット (high throughput) 化が可能であり、阻害剤の大規模な探索・評価に広く用いられている。しかし、エンタリー過程をバイパスしたアッセイのため、ウイルスエンタリーを阻害するような薬剤の探索はできないという難点がある。しかし、後述するように、他のアッセイで抗HCV活性がみられ、一方レプリコン・アッセイで活性が検出されない場合、その薬剤の作用段階が、感染初期あるいは感染最後期段階にあると推定できる。レプリコン・アッセイの結果はエンタリー阻害剤を探索する上で、有力なクライテリアとなる。

(b) HCV シュード粒子 (HCVpp) アッセイ
HCVppアッセイは、HCVエンベロープを被ったシュード粒子を用いることによってHCVエンタリー (ウイルスの吸着、受容体結合、細胞侵入、膜融合、脱殻までの過程) を直接評価できる系である。シュード粒子は本来のエンベロープタンパク質の代わりに、他のウイルスのエンベロープタンパク質を

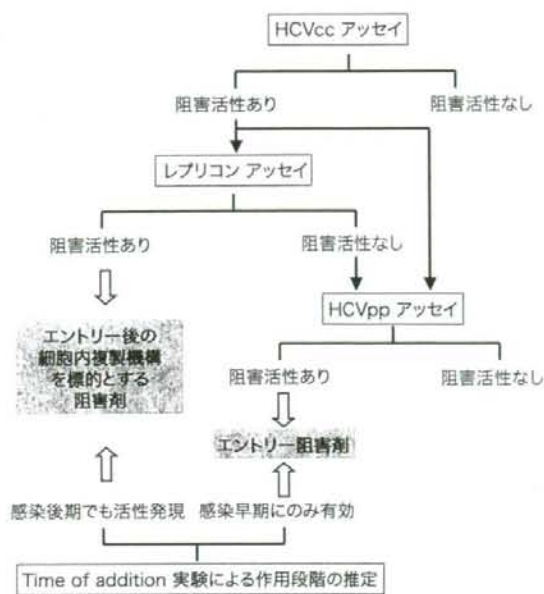


図2 HCVエントリー阻害剤の探索戦略

被ったウイルスのことを指すもので、水疱性口内炎ウイルス(vesicular stomatitis virus, VSV)³⁾あるいはレトロウイルス由来のものがあるが、われわれはレトロウイルス・ベクターを用いた系を利用している。その場合、HCVエンベロータンパク質E1/E2を被ったキャプシドの中にレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)がパッケージングされていて、HCVエンベロータンパク質に依存した細胞へのウイルスエントリーをレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)の発現量で簡便に評価することができる⁴⁾。

(c)細胞培養系を用いた(HCVcc)アッセイ

先に述べたようにHCVccアッセイが樹立されたことによって、現在汎用されているレプリコン・アッセイでは可能でなかったエントリー過程を含むHCV増殖環のすべてのステップに対する阻害剤の探索を実現することができようになった。HCVで細胞培養系が

樹立される前には、HCVのモデルとして、近縁のウシウイルス性下痢症ウイルスBovine viral diarrhea virus (BVDV)⁵⁾が用いられ、BVDVをHCVのサロゲート surrogate モデルとした阻害剤の評価が行われてきた⁵⁾。脇田らによるJFH-1クローンの樹立²⁾は、この分野での文字通りの大きなブレイクスルーである。しかし、現時点では、細胞培養系によって十分に強力(robust)なウイルス増殖が可能なのは、HCVジェノタイプ2aのJFH-1クローンに限られる⁶⁾。特に現行のインターフェロン/リバビリン療法に難治性のジェノタイプ1bを含む多様なジェノタイプのウイルス株による増殖系の確立は重要な意味がある。HCV阻害剤の感受性は、ジェノタイプの違いによって異なる場合が往々にしてあり、様々なジェノタイプのHCVに対する増殖(HCVcc)アッセイ・システムの整備が待たれる。

表1 これまでに知られているHCVエントリー・粒子形成阻害剤

阻害剤(標的)クラス	阻害剤	標的・作用機構	備考
非特異的HCVエントリー阻害剤			
糖鎖結合因子(CBAs)			
ペプチド性(CBP)	シアノピリン-N (CV-N)	エンペロープタンパク質E1/E2結合N-グリカンへの結合による吸着阻害	ドメイン・スワップド=量体(図5A-1) .単量体としての分子量約11,000
非ペプチド性	ブラジミシン(PRM-A) ベナノミシン(BNM-A)	同上	
α -グリコシダーゼ阻害剤	N-ブチル-デオキシノジリマイシン(NB-DNJ) N-ノニル-デオキシノジリマイシン(NN-DNJ) セルゴシビル(MX-3253)	エンペロープタンパク質E1/E2の糖鎖異常を引き起こし、その結果としてウイルス粒子の感染性が失われる	IFN α /リバビリン併用での第2相試験(Migenix社)、カスタンノスベルミン誘導体
その他	α -アルビドール(ARB)	膜融合阻害?	
特異的HCVエントリー阻害剤			
CD81拮抗剤	-		
SR-B1拮抗剤	-		
Claudin-1拮抗剤	-		
その他	-		

-: 報告なし

2. HCVエントリー阻害剤探索の戦略

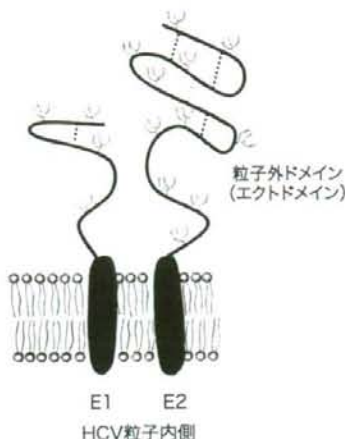
ある薬剤がウイルスエントリーに作用するかどうかは、いくつかのアッセイを組み合わせることでその性質を調べることによって検証することができる。われわれは、図2に示すように、HCVccアッセイ、レプリコン・アッセイ、HCVppアッセイ、さらにいわゆる“Time of addition”実験を組み合わせることによって、阻害剤の作用点を組織的に推定・分類する戦略をとっている。

表1に示すように、もし同定された阻害剤の作用点がウイルスエントリーにある場合、HCVccアッセイおよびHCVppアッセイでは

活性を示すが、レプリコン・アッセイによっては活性が検出されないという結果が期待される。図2は、このような原理に基づき、われわれが現在行っているHCV阻害剤アッセイの流れと、作用機構推定のためのフロー・チャートをdecision tree (決定木)として示したものである。

“Time of addition”実験は、ウイルス感染に対して、薬剤を添加するタイミングをずらして行って(例えば1時間毎に)、薬剤が効果を発揮できる時間条件を検討することで、ウイルスの増殖環における薬剤の作用時期を推定するための実験である。ある薬剤が薬効を

A. HCVエンベロープタンパク質E1/E2は高度の糖鎖修飾を受けている



B. 高マンノース型N-グリカンの構造と糖鎖結合因子(CBA)の作用標的

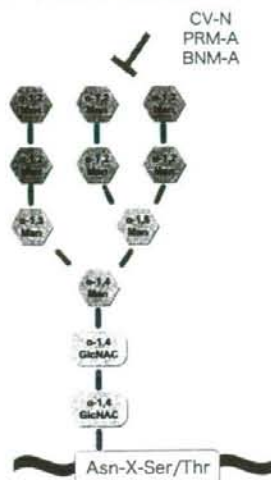


図3 HCVエンベロープタンパク質E1/E2の糖鎖構造

HCVエンベロープタンパク質E1, E2はそれぞれ4, 11個のN-結合糖鎖結合サイトを持ち、高度の糖鎖修飾を受けている(A)。結合糖鎖は、宿主細胞にはほとんどみられない高マンノース型N-グリカン(B)である。シアノピリン-N (CV-N)、プラジミシンA (PRM-A)、ベナノミシンA (BNM-A)は高マンノース型N-グリカンの末端 α -1,2マンノース残基に結合する。

発揮するために、薬剤をウイルス感染前あるいはその直後に添加する必要がある場合、その薬剤はウイルスエントリーを含む感染初期過程に作用点があると推定できる。一方、試験薬剤をウイルス感染の数時間後に添加した場合にでも、薬効が発揮される場合、その薬剤はウイルスエントリーが完了したのちの細胞内複製過程のどこかを標的としているものと推定できる。

われわれは、図2に示すように、HCVccアッセイで抗HCV活性を示すが、レプリコン・アッセイでは活性を示さないというクライテリアからエントリー阻害剤候補を絞り込み、ついでHCVppアッセイ、“Time of addition”実験で検証するような手順を取っている。

もちろんHCVppアッセイで最初からエント

リー阻害剤を探索する方法もその一つと考えられるが、われわれは、HCVppアッセイはあくまでもHCVエントリーのサロゲート・surrogateアッセイ(HCVエントリーを完全には反映しない可能性がある)と考えている点と、大規模スクリーニングに必要なHCVシュード粒子を準備・調製することが必ずしも容易でないこと、また、エントリー阻害剤以外のさまざまな治療薬シーズをより広く探索する目的で、HCVccアッセイによるunbiased (バイアスなし)のアッセイをスクリーニング戦略の中心におく、“Brutal force”による方法を敢えてとっている。

3 HCVエントリー阻害剤開発の現状

1. ウイルス粒子側に作用する薬剤

(a) 糖結合因子(carbohydrate binding

agents; CBAs)

HCVの標的細胞への感染には、HCVのエンペロープ糖タンパク質E1, E2が重要な役割を果たしている。E1, E2にはそれぞれ少なくとも4個、11個のN-結合糖鎖(N-グリカン)が付加している(図3A)。これら糖鎖は、エンペロープタンパク質の適正な折り畳み(フォールディング)、アッセンブリーに必須で、ウイルス粒子が感染性をもつためには不可欠である。また、N-グリカンは、構成する糖鎖構造の違いから、トリ-アンテナ型(tri-antennary complex-type)、ハイブリッド型(hybrid-type)と高マンノース型(high-mannose-type)の3種に分類されるが、このうち、高マンノース型N-グリカン(図3B)は、HCVやHIVなどのエンペロープウイルスに豊富にみいだされるもので、細胞側の糖鎖にはほとんどみいだせないという特徴があり、したがって、特に高マンノース型N-グリカンに特異的に結合する薬剤は抗ウイルス剤として望ましい性質を持っている可能性が期待される。

CBAsにはペプチド性(タンパク質性)のもの、非ペプチド性のあるものがある。前者は糖結合タンパク質(carbohydrate binding proteins, CBPs)であり、いわゆる糖結合性生物活性物質レクチンが含まれる。このカテゴリーに属する代表的な物質がシアノピリン-N (CV-N)である。後者にはプラジミシンA (PRM-A)⁷⁾やベナノミシンA (BNM-A)などもとも抗真菌剤として知られていた抗生物質が知られている。これらのCBAsはいずれも高マンノース型N-グリカン末端の α (1,2)マンノースに対して特異的結合能を持っている(図3B)⁸⁾。

CV-Nはシアノバクテリアには由来する抗ウイルス性レクチンで、分子量は11,000(単

量体で)、2量体として機能する。HIV、インフルエンザウイルス、SARS-コロナウイルス(SARS-CoV)など多くのエンペロープ・ウイルスの感染を強力に阻害することが知られている^{9,10)}。HCVにおいてはHCVppアッセイ法により様々なジェノタイプのHCVエンターリーをナノモル濃度で阻害することが明らかにされている¹¹⁾。

非ペプチド性のもので知られているPRM-AやBNM-Aは、有効濃度がマイクロモル・レベルで必ずしも強力なものではないものの、HIVやHCV双方に対する阻害活性をもっており、これらをリードとしてより有効性の高い薬剤の開発が計画されている。

なお、CBPはタンパク質性のため、大量調製・精製にコストがかかることや、長期投与によってそれに対する抗体が作られ、活性が減弱するおそれや、過敏反応のような副作用の危険性が予測される。しかし、その高い抗ウイルス効果から粘膜面での感染阻害を目的とするマイクロブサイドとして、とりわけ魅力的な特性をもっている。また、タンパク質であるため、良好な経口吸収性や薬理動態 pharmacokinetics は期待できないが、皮下注射や経鼻噴霧によって、インフルエンザウイルスやSARS-CoVなどの感染を阻止できるという観察がなされているという(私信)。

(b) α -グリコシダーゼ阻害剤

小胞体(ER)でのHCVエンペロープタンパク質が機能的な分子として成熟するには、 α -グリコシダーゼによって糖鎖が適正に付加・解裂し、レクチン様(糖鎖結合性)のERシャペロンタンパク質であるカルネキシン calnexin に結合し、正しく折り畳まれる必要がある。したがって、 α -グリコシダーゼを阻害すると、HCVエンペロープタンパク質の糖鎖修飾に異常が起こり、エンペロープタンバ

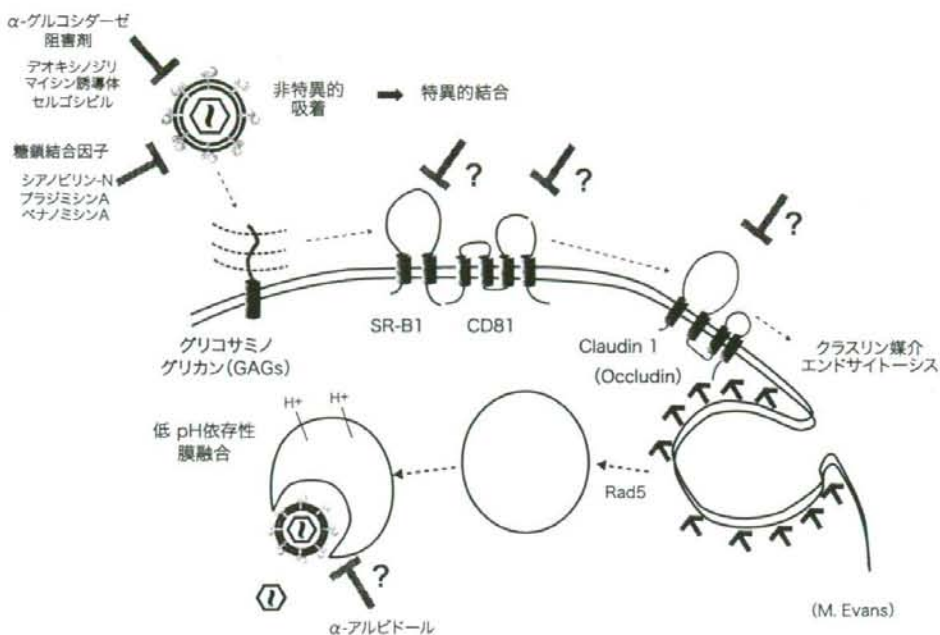


図4 HCVエンタリー機構と阻害剤標的

ク質の適正な折り畳み、アッセムブリーが阻害され、その結果としてウイルスの感染性が失われるために、エンタリー阻害剤としての活性を発現する。

α -グリコシダーゼ阻害剤として、糖のアナログ(イミノ糖 iminosugar)であるデオキシノジリマイシン(DNJ)が知られている。DNJそのものは、ほとんどHCV阻害活性を示さないが、長鎖アルキル鎖をもつDNJ誘導体[N-ブチル-デオキシノジリマイシン(NB-DNJ)], N-ノニル-デオキシノジリマイシン(NN-DNJ)は、HCVのエンタリーをマイクロモル濃度で阻害する¹²⁾。同様な作用機構をもつ薬剤として、セルゴシビル CELGOSIVIR (MX-3253, Migenix社)¹³⁾が臨床応用を目的として開発されている。セルゴシビルは α -グリコシダーゼ阻害剤の一つであるカス

スベルミン(castanospermine)のプロドラッグである。単独の薬効はさほど高くないが、現在Peg-IFN・リバビリンとの併用による第2相治験が進行中である。

なお、HCVがコードするウイルスタンパク質p7は、陽イオン・チャネルの機能を持ち、ウイルス粒子の成熟・放出に参与するいわゆる viroporin ファミリー(ウイルス由来のチャネルタンパク質)の一つと考えられているが、長鎖アルキル側鎖をもつイミノ糖(NN-DNJなど)は、このイオンチャネルの阻害剤としての機能を持つことが報告されている¹⁴⁾。したがって、DNJ誘導体の抗HCV活性は、 α -グリコシダーゼ阻害活性とイオンチャネル阻害活性の双方によるものと考えられる。しかし、これらの薬剤の抗HCV作用はそれほど強力なものではなく(マイクロモ

A. 糖結合因子(CBAs)

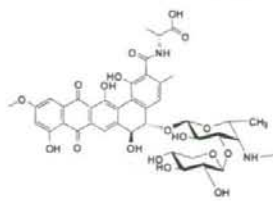
A-1 ペプチド性
[糖結合タンパク質(CBPs)]

シアノピリン-N
(Cyanovirin-N, CV-N)

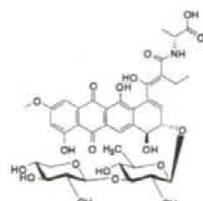


A-2 非ペプチド性

プラジミシンA
(Pradimicin A, PRM-A)

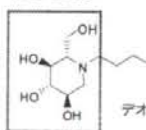


ベナノミシンA
(Benanomycin A, BNM-A)



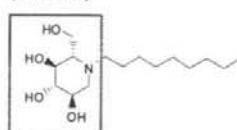
B. α -グルコシダーゼ阻害剤

N-ブチル-デオキシノジリマイシン
(NB-DNJ)



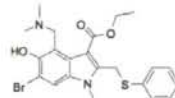
デオキシノジリマイシン骨格
(DNJ)

N-ノニル-デオキシノジリマイシン
(NN-DNJ)

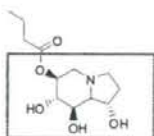


C. その他

α -アルビドール
(α -Arbidol, ARB)



セルゴシビル
(Cergocivir)



カスタノスペルミン骨格
(Castanospermine)

図5 これまでに報告されているHCVエンタリー阻害剤(非特異的阻害剤)の化学構造

ル濃度での阻害作用), 最適化の試みがなされている。

(c) HCVエンタリーに関連するその他の阻害剤

α -アルビドール Arbidol (ARB)

ARBはHCVppアッセイで、マイクロモル濃度でHCV膜融合を阻害することが知られている¹⁵⁾。この薬剤は当初インフルエンザに有効な薬剤として開発され、ロシアや中国でタミフルの安価な代替品として臨床治験が進行中である。細胞膜に親和性の高い化合物で、脂質2重膜にとけ込むことで、宿主細胞膜とウイルスエンベロープ膜との融合反応を

阻害するものと考えられる。

2. 特異的HCVエンタリー阻害剤

以上に述べたエンタリー阻害剤は、いずれもHCVだけでなくHIVなど他のウイルス群にも作用するいわば非特異的な抗ウイルス剤である。HIV-1においては、エンタリー阻害剤として、CCR5拮抗剤(CCR5はHIV-1感染に必須なコレセプターの一つ)とペプチド性の融合阻害剤の2種の特異的阻害剤が開発され、新薬として臨床応用されているが、HCVでは、これに対応するような特異的エンタリー阻害剤は知られていない。

このクラスの阻害剤の開発は、HCVエン

トリー機構の解明と切り離せない。HCV エントリーは、図4に示すようなメカニズムによることが現在までに明らかにされている。HCVはまず細胞表面にあるグリコサミノグリカン(プロテオグリカンの基本骨格となる多糖類の総称)に非特異に吸着される。ついで、HCV粒子はエンベロープタンパク質E2を介してHCVエントリー受容体であるSR-B1およびCD81に結合し、ついでClaudin-1 (tight junction TJタンパク質、最近第4のHCVエントリー受容体として、TJタンパク質の1つであるoccludinが報告されている)が共同して、細胞内に取り込まれると考えられている¹⁶⁾。したがってこれらの受容体タンパク質の機能を阻害する薬物は、抗HCV剤としての可能性が期待されるが、現時点では、これらHCVエントリー受容体を標的とする薬剤はみだされていない。われわれは、最近HCVccアッセイによるランダム(unbiased)スクリーニングの結果によってみだされたHCV阻害剤の中に、HCVエントリーの特異的阻害剤と考えられる低分子化合物をいくつか同定し、現在その作用機構の解明を急いでいる。

なお、図5、表2に、これまでに報告されているHCVエントリー阻害剤の化学構造およびその性質の概略を示す。いずれもHCVだけではなくHIVを含む他のウイルスの感染も阻害するような非特異機構による侵入阻害剤であり、今後、HCVエントリーを特異的に阻害するような真の意味でのHCVエントリー阻害剤の開発が期待される。

4 おわりに

HCV治療薬開発はHIV治療薬開発が辿ってきた道を進むことになるかと予測される。HIVの場合にそうであったように、HCVで

も、短中期的には、ウイルス側機能タンパク質を標的とする阻害剤(RNAポリメラーゼ阻害剤やプロテアーゼ阻害剤)が開発競争の中心となることは疑いない。しかし、これら薬剤が極めて高いpotencyをもっているにもかかわらず、早晩耐性変異が出現することは不可避と考えられる。実際、急速な耐性変異株の出現が、開発途上の薬剤のいずれにおいても問題となっている。HCVはHIV-1と同程度あるいはそれ以上の極めてゲノム多様性、より高い複製能(*in vivo*でのHCVのturnover rateはHIV-1のそれを2桁以上高い 10^{12} /日のレベルにある)を有しており、このようなウイルス学的な性質から考えて、耐性ウイルスの問題は、むしろHIV-1を凌ぐ深刻な問題となりうる可能性がある。

一方、宿主側因子を標的とする薬剤は、ウイルス側の変異の問題を回避できる利点が期待される(しかし、HIV-1エントリー阻害剤の一つであるCCR5拮抗剤を例にとると、ウイルス側の変異によって耐性化は全く何の障壁なく起こってしまうようにみえる)が、その一方、宿主因子を標的とする限り、副作用の可能性を念頭におかねばならない。宿主機能に障害を与えない、より特異性の高い薬剤の開発が望まれる所以である。

エイズ治療に行われているような多剤併用療法(highly active antiretroviral therapy; HAART)は、HCV治療においても現実的な治療戦略となることが予測される。臨床応用可能なHCVエントリー阻害剤が将来開発された場合、おそらくその他のクラスの阻害剤と同様、現行のPEG-インターフェロン α /リバビリンとの併用療法と組み合わせることによって副作用の強いインターフェロン・リバビリンの用量を低減し、副作用を抑え、かつその抗ウイルス作用をより強力なものとする

薬剤選択肢として位置づけられることになる
と考えられる。またHCVによる肝不全に対
する肝移植の際に、移植片のHCV感染を防
止する目的での臨床応用が考えられる。

一方また、HCV治療薬開発の問題から離
れて、純粋に科学的側面で考えると、HCV
の極めて複雑な受容体システムの相互の役割
を解明する上で、様々なクラスのエントリー
阻害剤をみいだすことは非常に重要と考えら
れる。われわれは、同定した阻害剤をシーズ
として創薬展開を計ると同時に、それらを
「採り針(プローブ)」として複雑なHCVエン
トリー機構全体の理解とその解明に役立てた
いと願っている。国内外における今後の研究
展開を期待したい。

文 献

- 1) Lohmann V, Korner F, Koch J et al : Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepa-
toma cell line. *Science* 285 : 110-113, 1999
- 2) Wakita T, Pietschmann T, Kato T et al : Produc-
tion of infectious hepatitis C virus in tissue cul-
ture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11 :
791-796, 2005
- 3) Lagging LM, Meyer K, Owens RJ et al : Func-
tional role of hepatitis C virus chimeric glyco-
proteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J*
Virology 72 : 3539-3546, 1998
- 4) Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL : Infectious
hepatitis C virus pseudo-particles containing
functional E1-E2 envelope protein complexes. *J*
Exp Med 197 : 633-642, 2003
- 5) Buckwold VE, Beer BE, Donis RO : Bovine viral
diarrhea virus as a surrogate model of hepatis-
tis C virus for the evaluation of antiviral agents.
Antiviral Res 60 : 1-15, 2003
- 6) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G et al : Robust
hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad*
Sci USA 102 : 9294-9299, 2005
- 7) Bertaux C, Daelemans D, Meertens L et al :
Entry of hepatitis C virus and human immuno-

deficiency virus is selectively inhibited by car-
bohydrate-binding agents but not by polyanions.
Virology 366 : 40-50, 2007

- 8) Bolmstedt AJ, O'Keefe BR, Shenoy SR et al :
Cyanovirin-N defines a new class of antiviral
agent targeting N-linked, high-mannose gly-
cans in an oligosaccharide-specific manner. *Mol*
Pharmacol 59 : 949-954, 2001
- 9) Boyd MR, Gustafson KR, McMahon JB et al :
Discovery of cyanovirin-N, a novel human immu-
nodeficiency virus-inactivating protein that binds
viral surface envelope glycoprotein gp120: po-
tential applications to microbicide development.
Antimicrob Agents Chemother 41 : 1521-1530,
1997
- 10) O'Keefe BR, Smee DF, Turpin JA et al : Potent
anti-influenza activity of cyanovirin-N and interac-
tions with viral hemagglutinin. *Antimicrob Agents*
Chemother 47 : 2518-2525, 2003
- 11) Helle F, Wychowski C, Vu-Dac N et al : Cyanovi-
rin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding
to envelope protein glycans. *J Biol Chem* 281 :
25177-25183, 2006
- 12) Zitzmann N, Mehta AS, Carrouee S et al : Imino
sugars inhibit the formation and secretion of
bovine viral diarrhoea virus, a pestivirus model
of hepatitis C virus: implications for the devel-
opment of broad spectrum anti-hepatitis virus
agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 11878-11882,
1999
- 13) Whitby K, Taylor D, Patel D et al : Action of cel-
gosivir (6-O-butanoyl castanospermine) against
the pestivirus BVDV: implications for the treat-
ment of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother* 15
: 141-151, 2004
- 14) Pavlovic D, Neville DC, Argaud O et al : The hep-
atitis C virus p7 protein forms an ion channel that
is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar deri-
vatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 6104-6108,
2003
- 15) Boriskin YS, Pêcheur EI, Polyak SJ : Arbidol: a
broad-spectrum antiviral that inhibits acute and
chronic HCV infection. *Virology* 333 : 56, 2006
- 16) Evans MJ, von Hahn T, Tschernig DM et al : Clau-
din-1 is a hepatitis C virus co-receptor required
for a late step in entry. *Nature* 446 : 801-805, 2007

*

*

*

Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex

Saki Shimizua^{a,b}, Emiko Urano^a, Yuko Futahashi^a, Kosuke Miyauchi^a,
 Maya Isogai^a, Zene Matsuda^a, Kyoko Nohtomi^a, Kazunari Onogi^a,
 Yutaka Takebe^a, Naoki Yamamoto^{a,b} and Jun Komano^a

Objective: Tat-dependent transcriptional elongation is crucial for the replication of HIV-1 and depends on positive transcription elongation factor b complex (P-TEFb), composed of cyclin dependent kinase 9 (CDK9) and cyclin T. Hexamethylene bisacetamide-induced protein 1 (HEXIM1) inhibits P-TEFb in cooperation with 7SK RNA, but direct evidence that this inhibition limits the replication of HIV-1 has been lacking. In the present study we examined whether the expression of FLAG-tagged HEXIM1 (HEXIM1-f) affected lentiviral replication in human T cell lines.

Methods: HEXIM1-f was introduced to five human T cell lines, relevant host for HIV-1, by murine leukemia virus vector and cells expressing HEXIM1-f were collected by fluorescence activated cell sorter. The lentiviral replication kinetics in HEXIM1-f-expressing cells was compared with that in green fluorescent protein (GFP)-expressing cells.

Results: HIV-1 and simian immunodeficiency virus replicated less efficiently in HEXIM1-f-expressing cells than in GFP-expressing cells of the five T cell lines tested. The viral revertants were not immediately selected in culture. In contrast, the replication of vaccinia virus, adenovirus, and herpes simplex virus type 1 was not limited. The quantitative PCR analyses revealed that the early phase of viral life cycle was not blocked by HEXIM1. On the other hand, *tat*-dependent transcription in HEXIM1-f-expressing cells was substantially repressed as compared with that in GFP-expressing cells.

Conclusion: These data indicate that HEXIM1 is a host factor that negatively regulates lentiviral replication specifically. Elucidating the regulatory mechanism of HEXIM1 might lead to ways to control lentiviral replication. © 2007 Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2007, 21:1–8

Keywords: CDK9, cyclin T, HEXIM1, lentivirus, *tat*

Introduction

Activation of transcription elongation requires the positive transcription elongation factor b complex (P-TEFb) composed of cyclin dependent kinase 9 (CDK9) and cyclin T1, T2, or K [1]. P-TEFb is essential for efficient transcriptional elongation from the promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the long

terminal repeat (LTR) (reviewed in [2,3]). The functional interaction between P-TEFb and the viral protein Tat has been well studied. Immediately after viral transcription starts at the LTR of the integrated proviral genome, the nascent viral transcript forms a three-dimensional structure called TAR. In the presence of P-TEFb, Tat binds to TAR. Through the Tat-TAR interaction, Tat activates P-TEFb and therefore assures the efficient

From the ^aAIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, and the ^bDepartment of Molecular Virology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

Correspondence to Jun Komano, AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan.

E-mail: ajkomano@nih.go.jp

Received: ?? ??; revised: ?? ??; accepted: ?? ??.

AQ1

completion of viral gene transcription and the propagation of HIV-1.

Recently, the regulatory mechanisms of P-TEFb function have been elucidated. In 2001, the interaction of P-TEFb with 7SK RNA was found to be necessary to inactivate the kinase activity of CDK9 within P-TEFb [4–6]. However, the binding of 7SK RNA alone is not sufficient to inactivate P-TEFb. More recently, Yik *et al.* demonstrated that the inactivation of P-TEFb requires hexamethylene bisacetamide-induced protein 1 (HEXIM1; synonyms CLP1, MAQ1, and HIS1) [7–9]. The inactivation of P-TEFb by the HEXIM1-7SK RNA complex appears to regulate the transcriptional elongation of cellular genes.

The HEXIM1-7SK RNA complex has been shown to physically compete with Tat for binding to P-TEFb [10]. In agreement with this finding, HEXIM1 was shown to inhibit Tat-dependent transcription from the HIV-1 LTR in transient transfection assays [8,11,12]. However, no data demonstrating that HEXIM1 is able to limit HIV-1 replication has been provided. Here we provide direct experimental evidence that the constitutive expression of HEXIM1 specifically limits lentiviral replication.

Methods

Plasmids

The FLAG-tagged HEXIM1 expression constructs were generated by reverse-transcription PCR using RNA isolated from CEM cells as templates. The primers used were 5'-CACCTCGAGCCACCATGGACTACAAA-GACGATGACGACAAGGCCGAGCCATTCTTGT-C-3' and 5'-CAATTGCTAGTCTCCAAACTTGGAAAGCGGCGC-3' for amino terminus FLAG tagging, and 5'-CACCTCGAGCCACCATGGCCGAGCCA-TTCTTGTGTCAGAATATC-3' and 5'-CAATTGCTAGT-CGTTCATCGTCTTTGTAGTCGTCTCCAAACTT-GGAAAGCGGCGCTC-3' for carboxy terminus FLAG tagging. The *XhoI*-*MfeI* fragments of the PCR products were cloned into the *XhoI*-*MfeI* sites of pCMMP IRES GFP, generating pCMMP f-HEXIM1 and pCMMP HEXIM1-f [13]. The cytomegalovirus (CMV) promoter-driven *gag-pol* expression vector *psyn-gag-pol* has been previously described by Wagner *et al.* [14] and pLTR-*gag-pol* was constructed by cloning the *MluI*-*HindIII* fragment encoding the LTR from pNL-luc [15] into the *MluI*-*HindIII* sites of *psyn-gag-pol*. The tax-expressing plasmid pCGtax and pHTLV LTR luciferase were kindly provided by Dr. Watanabe (Tokyo Medical Institute). The *tat*-expressing plasmid pSVtat was a generous gift from Dr. Freed (National Cancer Institute-Frederick, Frederick, Maryland, USA). The plasmid pLTR-luc has been described previously (Miyachi *et al.*, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, in press). The following plasmids have been described previously by Komano *et al.* [13]:

pVSV-G, pMDgag-pol, pTM3Luci, phRL-CMV and pSIVmac239ΔnefLuc.

Cells and transfection

All the mammalian cells were maintained in RPMI 1640 (Sigma, St Louis, Missouri, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Japan Bioserum, Tokyo, Japan), penicillin and streptomycin (Invitrogen, Tokyo, Japan). Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen).

Western blotting

Cells were lysed with sample buffer, sonicated, and boiled for 5 min. Samples were separated on 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) for western blotting according to standard techniques. Membranes were blocked with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 (TBS-T) containing 5% (w/v) non-fat skim milk (Yuki-Jirushi, Tokyo, Japan) for 1 h at room temperature and incubated with primary antibodies including the M2 anti-FLAG epitope monoclonal antibody (Sigma), an anti-actin monoclonal antibody (MAB1501R; Chemicon/Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), an anti-cyclin T1 rabbit polyclonal antibody (H-245; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), an anti-cyclin T2a/b goat polyclonal antibody (A-20; Santa Cruz), an anti-p24 monoclonal antibody (183-H12-5C; NIH AIDS Research and Reference Reagent Program), an anti-HIS1 chicken polyclonal antibody (N-150; GenWay), and an anti-Bip/GRP78 monoclonal antibody (clone 40; BD Biosciences/Transduction Laboratories, San Jose, California, USA) for 1 h at room temperature. Membranes were washed with TBS-T and incubated with appropriate second antibodies including biotinylated anti-goat (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, New Jersey, USA) or anti-chicken IgY (Promega, Madison, Wisconsin, USA), and EnVision+ (Dako, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. For a tertiary probe, we used horseradish peroxidase (HRP)-streptavidine (GE Healthcare) if necessary. Signals were visualized with an LAS3000 imager (Fujifilm, Tokyo, Japan) after treating the membranes with the Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Reporter assay

Luciferase activity was measured 48 h after transfection or infection using a DualGlo assay kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. The beta-galactosidase activity was measured using a LumiGal assay kit (BD Biosciences/Clontech, San Jose, California, USA) according to the manufacturer's protocol. The chemilu-

AQ2

AQ3

minescence was detected with a Veritas luminometer (Promega).

Monitoring viral replication

AQ4

To monitor HIV-1 replication, the culture supernatants were subjected to either a reverse transcriptase assay [16] or an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect p24 antigens using a Retro TEK p24 antigen ELISA kit according to the manufacturer's protocol (Zepto Metrix, Buffalo, New York, USA). For simian immunodeficiency virus (SIV) a p27 antigen ELISA kit was used according to the manufacturer's protocol (Zepto Metrix). The signals were measured with a Multiskan Ex microplate photometer (ThermoLabsystems, Helsinki, Finland). For vaccinia virus, adenovirus, and herpes simplex virus (HSV)-1, the activity of reporter genes was measured as previously described [13].

Generating viruses

To produce HIV-1 and SIV, 293T cells were transfected with plasmids encoding proviral DNA of HIV-1 (pHXB2) or pSIVmac239 Δ nefLuc and culture supernatants containing viruses were collected at 48 h post-transfection. Murine leukemia virus (MLV) and lentiviral vectors pseudotyped with VSV-G were produced as described previously by cotransfecting 293T cells with either the pNL-Luc and pVSV-G vectors or the pMDgag-pol, pVSV-G, and pCMMP vectors [13]. Green fluorescent cells were sorted by fluorescence activated cell sorter (FACS) Aria (Becton Dickinson, San Jose, California, USA).

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated with an RNeasy kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instruction. The reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR) assay was performed with a One Step RNA PCR Kit (Takara, Otsu, Japan), imaged by a Typhoon scanner 9400 (GE Healthcare), and quantified with Image Quant software (GE Healthcare). For the amplification of endogenous HEXIM1, the forward primer 5'-ACCACACGGAGAGCCTGCA-GAAC-3' and the reverse primer 5'-TAGCTAAA-TTACGAAACCAAAGCC-3' were used. For the amplification of HEXIM1-f, the forward primer 5'-GTACCTGGAAGTGGAGAAGTGCC-3' and the reverse primer 5'-CAATTGCTAGTCGTCATCGTC-TTGTAGTC-3' were used. For cyclophilin A, the forward primer 5'-CACCGCCACCATGGTCAAC-CCCACCGTGTCTCTCGAC-3' and the reverse primer 5'-CCCGGGCCTCGAGCTTTCGAGTTGT-CCACAGTCAGCAATGG-3' were used.

Quantitative real time polymerase chain reaction

The real time PCR reaction was performed in a DNA Engine Opticon 2 Continuous Fluorescence Detection System (Bio-Rad, Hercules, California, USA). The cellular genomic DNA and total RNA were extracted

48 h post-infection with a DNeasy kit (Qiagen) and RNeasy kit (Qiagen), respectively, according to the manufacturer's instruction. For the reagents, we used QuantiTect SYBR Green PCR and RT-PCR Kits (Qiagen). To estimate the amount of integrated HIV-1 DNA, Alu-LTR PCR was performed according to the method described previously using the following primers: for the first PCR, 5'-AACTAGGGAACCCACTGCT-TAAG-3' and 5'-TGCTGGGATTACAGGCGTGAG-3', and for the second PCR, 5'-AACTAGGGAACCCACTGCTTAAG-3' and 5'-CTGCTAGAGATT-TCCACACTGAC-3' [17]. The beta-globin primers have been described previously [18]. To estimate the amount of HIV-1 RNA, the second PCR primers for the Alu-LTR PCR were used. The primers for cyclophilin A are described above.

Results and discussion

The HEXIM1 cDNA tagged with a FLAG epitope at either the amino terminus (δ -HEXIM1) or the carboxy terminus (HEXIM1-f) was cloned in a mammalian expression plasmid (Fig. 1a). A luciferase assay revealed that the Tat-dependent enhancement of transcription from the HIV-1 LTR was reduced by co-transfecting HEXIM1-expressing plasmids, whereas neither Tat-independent basal transcription from the HIV-1 LTR nor CMV promoter-driven transcription was affected (Fig. 1b). An oncogenic retrovirus human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) encodes for *tax*, a functional homologue of HIV-1's *tat*, that utilizes P-TEFb to enhance transcription from the LTR promoter [19]. However, *tax*-dependent enhancement of transcription was not affected by HEXIM1 in similar experimental conditions (Fig. 1c). To monitor the effect of HEXIM1 on HIV-1 replication, we introduced HEXIM1-expressing plasmids into HeLa-CD4 cells along with pNL4-3, which produces replication-competent HIV-1, and measured the RT activity in the culture supernatant 1 week post-transfection. Transfecting HEXIM1-expressing plasmids decreased the RT activity in a dose-dependent manner (Fig. 1d). Next, we asked whether the inhibition of viral replication was specific to HIV-1 by examining vaccinia virus, adenovirus, and HSV-1 replication. We found that the propagation of these three viruses was not inhibited by HEXIM1-f expression (Fig. 1e-g), suggesting that the inhibition of viral replication by HEXIM1 was HIV-1-specific.

To examine whether HEXIM1 negatively affects lentiviral replication in the physiologically relevant host, we isolated human T cell lines constitutively expressing HEXIM1-f. We cloned HEXIM1-f cDNA into a pCMMP (MLV retroviral vector plasmid (Fig. 2a). The plasmid encoded an internal ribosomal entry site (IRES)-mediated green fluorescent protein (GFP)

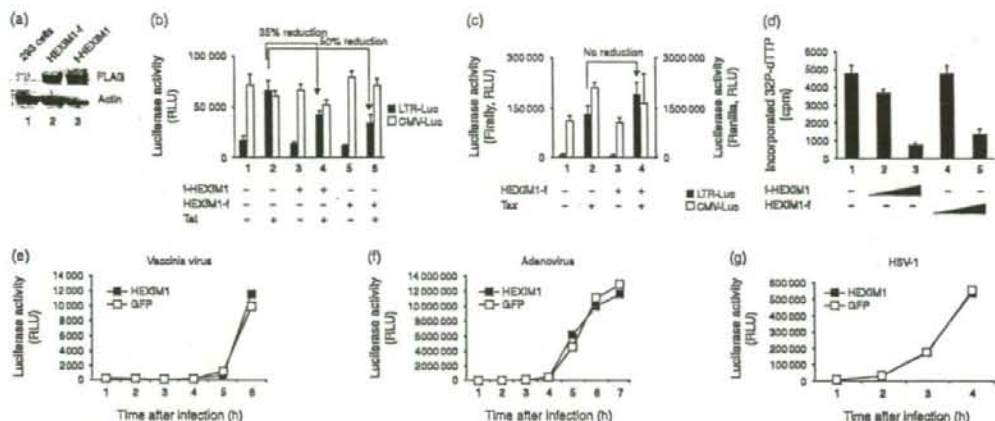


Fig. 1. Expression of hexamethylene bisacetamide-induced protein 1 (HEXIM1) specifically inhibits HIV-1 replication. (a) Detection of HEXIM1 cDNA tagged with a FLAG epitope at either the amino terminus (f-HEXIM1) or the carboxy terminus (HEXIM1-f) by western blot analysis in transiently transfected 293 cells (upper panel, approximately 65 kD). A western blot against actin is shown as a loading control (lower panel). (b) Expressing FLAG-tagged HEXIM1 decreased the luciferase activity driven by HIV-1 long terminal repeat (LTR) promoter in the presence of Tat (lanes 4 and 6, LTR-Luc, solid bars). However, FLAG-tagged HEXIM1 did not affect the expression of renilla luciferase from co-transfected plasmid driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter (CMV-Luc, open bars). Representative data from three independent experiments done in triplicate are shown. Cells were transfected with 0.8 μ g HEXIM1-expressing plasmid for the indicated lanes, 0.1 μ g of pSVtat for the indicated lanes, and 0.1 μ g of pLTR-Luc and 0.5 μ g for pHRL/CMV for all lanes. (c) Expressing FLAG-tagged HEXIM1 did not decrease the luciferase activity driven by HTLV-1 LTR promoter in the presence of Tax (lanes 2 and 4, LTR-Luc, solid bars) as well as renilla luciferase driven by the CMV promoter (CMV-Luc, open bars). Representative data from three independent experiments done in triplicate are shown. Cells were transfected with 0.8 μ g of HEXIM1-expressing plasmid for the indicated lanes, 0.1 μ g of pCGtax for the indicated lanes, and 0.1 μ g of pHTLV LTR Luc and 0.5 μ g for pHRL/CMV for all lanes. (d) The dose-dependent reduction of HIV-1 production by transfection of HEXIM1-encoding plasmids (0.1 μ g for lanes 2 and 4, 0.4 μ g for lanes 3 and 5) along with a plasmid producing infectious HIV-1 (pNL4-3, 0.1 μ g) in HeLa-CD4 cells. (e-g) Expressing HEXIM1-f did not limit the replication of vaccinia virus (e), adenovirus (f), or HSV-1 (g) in 293T cells. The y-axis represents the reporter gene activity, which reflects viral replication. Representative data from three independent experiments are shown. GFP, green fluorescent protein; RLU, relative light unit.

expression cassette, so that MLV vector-infected cells could be readily identified by the green fluorescence. Human T cell lines, including SUP-T1, MOLT-4, CEM, Jurkat, and M8166 were infected with MLV pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G), and GFP-positive cells were collected with a FACS (Fig. 2a). For the negative control, we used MLV expressing GFP only. The successful introduction of HEXIM1-f into the cells was verified by RT-PCR and Western blot analysis (Fig. 2b and c). The total HEXIM1 protein expression in HEXIM1-f-transduced cells was approximately 3.7-, 1.5-, 2.0-, 4.8-, and 1.8-fold higher than in GFP-transduced cells in the CEM, Jurkat, MOLT-4, SUP-T1, and M8166 cell lines, respectively (Fig. 2c). To our surprise, the HEXIM1-f-expressing T cell lines remained GFP-positive, and therefore HEXIM1-f-positive, for more than 6 months and proliferated at rates almost indistinguishable from GFP-expressing cells. The expression levels of cyclin T1, cyclin T2, actin, and Bip/GRK78 in HEXIM1-f-expressing cells were almost identical to those in GFP-expressing cells, suggesting that the gene expression did not compensate the upregulated HEXIM1

(Fig. 2b and c). Expression of cyclin T2 was undetectable in M8166 cells (Fig. 2c). Similarly, HEXIM1-f-expression did not affect the cell surface levels of the HIV-1 receptors CD4 and CXCR4 as demonstrated by FACS analysis (data not shown). These data indicate that the expression of HEXIM1-f did not reach levels where the physiological regulation of P-TEFb blocked cellular gene transcription.

The replication kinetics of HIV-1 or SIV was monitored by measuring the accumulation of viral capsid antigen in the culture medium. Strikingly, HIV-1 replicated more slowly in cells of all four T cell lines expressing HEXIM1-f than in cells expressing GFP (Fig. 2d-g). Similarly, HEXIM1-f-expressing M8166 cells supported SIV replication less efficiently than did GFP-expressing M8166 cells (Fig. 2h). Interestingly, the magnitude of HIV-1 replication delay was the most substantial in SUP-T1 cells, in which the levels of endogenous HEXIM1 were the lowest among the four cell lines tested for HIV-1 replication (Fig. 2c). Similar observations were made when the HIV-1 infection experiments were repeated,

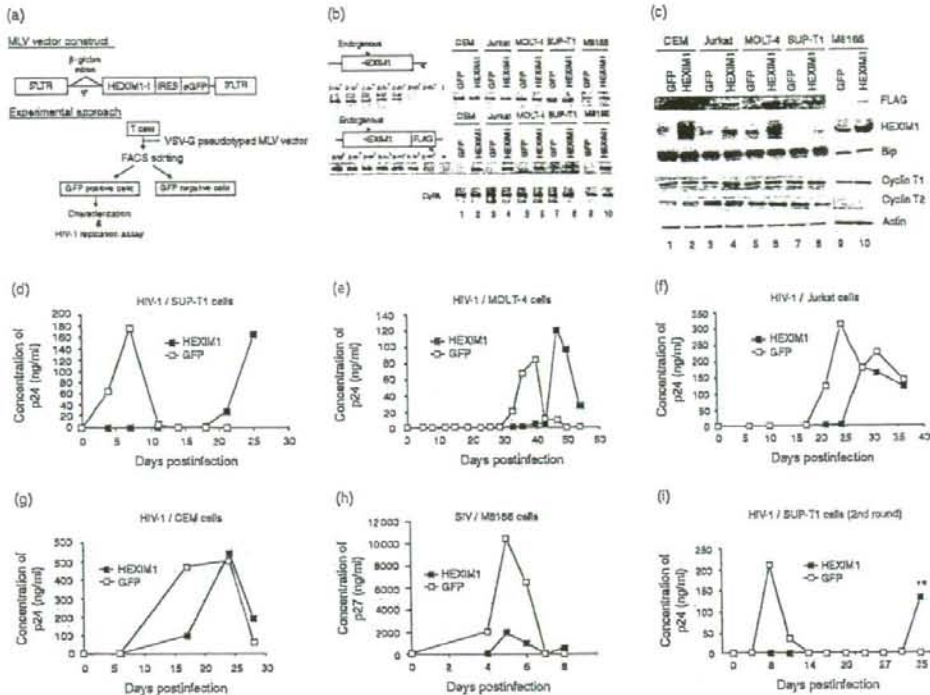


Fig. 2. Lentiviral replication is inhibited in various T cell lines constitutively expressing hexamethylene bisacetamide-induced protein 1 (HEXIM-1) cDNA tagged with a FLAG epitope at the carboxy terminus (HEXIM1-f). (a) The genomic organization of the retroviral vector expressing HEXIM1-f and a schematic representation of the experimental approach. (b) Detection of endogenous HEXIM1 and murine leukemia virus (MLV)-transduced HEXIM1-f (exogenous) mRNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in green fluorescent protein (GFP)- and HEXIM1-f-expressing cells. The primer design is drawn schematically. Amplification efficiency was examined by using a known number of templates as standards for HEXIM1. Cyclophilin A (CyPA) was amplified to ensure the quality of the RNA. (c) Western blot analysis demonstrating expression of HEXIM1-f (denoted FLAG), endogenous HEXIM1 (HEXIM1), Bip, cyclin T1, cyclin T2, and actin in isolated T cell lines. (d–g) Replication profiles of HIV-1 (HXB2) in SUP-T1 (d), MOLT-4 (e), Jurkat (f), and CEM (g) cells either expressing HEXIM1-f or GFP alone. Representative data from two or three independent experiments are shown. (h) Replication profile of SIV in M166 cells either expressing HEXIM1-f or GFP alone. Representative data from two independent experiments are shown. (i) The replication profiles of HIV-1 recovered from SUP-T1/HEXIM1-f cells (asterisk in Fig. 2d) in fresh SUP-T1/GFP or SUP-T1/HEXIM1-f. LTR, long terminal repeat.

indicating that the expression of functional HEXIM1-f did not change over the course of the replication monitoring. We tested whether the viruses emerged in HEXIM1-f-expressing cells were 'revertants' that might be able to replicate in HEXIM1-f-expressing cells as fast as in GFP-expressing cells. To address this, we recovered virus-containing culture supernatants from SUP-T1/HEXIM1-f cells at the peak of replication kinetics (asterisk, Fig. 2d). Then, both fresh SUP-T1/GFP and SUP-T1/HEXIM1-f were infected with the recovered virus and the replication kinetics was monitored. However, HIV-1 still replicated in SUP-T1/HEXIM1-f cells more slowly than in SUP-T1/GFP cells (Fig. 2i), akin to the original profiles (Fig. 2d), and the nucleotide sequences of LTR and *tat*, the primary targets of HEXIM1, remained unchanged (double asterisk in

Fig. 2i). In addition, no mutations were found in viruses propagated in GFP-expressing SUP-T1 cells. Similar observations were made in MOLT-4 cells (data not shown). These data provide direct evidence that the expression of HEXIM1 inhibits lentiviral replication in human T cell lines.

Based on our experimental observations as well as the reported functions of HEXIM1, we assumed that the ability of HEXIM1 to limit HIV-1 replication was mostly due to the inhibition of Tat/P-TEFb-dependent transcriptional elongation. However, it was possible that HEXIM1 might also have targeted other viral replication steps. To test this possibility, we examined the viral entry and production processes separately. The efficiency of viral entry was analyzed by measuring the efficiency of

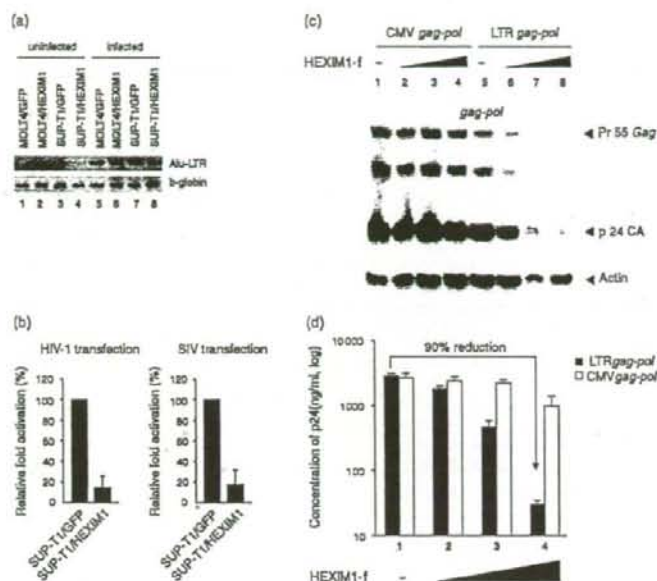


Fig. 3. Hexamethylene bisacetamide-induced protein 1 (HEXIM1) cDNA tagged with a FLAG epitope at the carboxy terminus (HEXIM1-f) does not affect the efficiency of viral integration or post-translational processes. (a) The Alu-long terminal repeat (LTR) and beta-globin polymerase chain reaction products from VSV-G-pseudotyped HIV-1-infected MOLT-4 and SUP-T1 cells expressing either green fluorescent protein (GFP) or HEXIM1-f alone were separated in an agarose gel and photographed. (b) The luciferase activities in SUP-T1/GFP or SUP-T1/HEXIM1-f cells electroporated with 10 μ g of a plasmid encoding LTR-driven firefly luciferase plus 1 μ g of pRL/cytomegalovirus (CMV). The firefly luciferase activity normalized to renilla luciferase activity in SUP-T1/GFP cells was set to 100%. The error bars represent the standard deviation of three independent experiments. (c) Western blot analysis showing Gag and its cleaved products expressed from either CMV promoter- or LTR promoter-driven *gag-pol* expression plasmid in the presence of pSVtat (0.1 μ g, all lanes) and increasing amounts of HEXIM1-f (0.2 μ g for lanes 2 and 6, 0.6 μ g for lanes 3 and 7, and 2.0 μ g for lanes 4 and 8). (d) The amount of p24 produced in the culture supernatant from cells analyzed in Fig. 3c was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Representative data from three independent experiments done in triplicate are shown. SIV, simian immunodeficiency virus.

viral integration. SUP-T1/GFP or SUP-T1/HEXIM1-f cells were infected with a replication-incompetent HIV-1 vector pseudotyped with VSV-G that expresses luciferase upon successful infection. We conducted an Alu-LTR PCR assay to detect the integrated viral genome. PCR products were detected only from HIV-1-infected cells (Fig. 3a). The signal intensities of Alu-LTR PCR products from GFP- and HEXIM1-f-expressing cells were similar. To compare the efficiency of viral infection as well as transcription quantitatively, we employed a real time PCR technique. Some infected cells were collected for an Alu-LTR PCR assay to quantify the amount of integrated viral genome, and the rest were processed to measure the amount of viral transcript as well as the luciferase activity. The amount of Alu-LTR PCR product from SUP-T1/HEXIM1-f cells was 3.5- and 3.3-fold more to that from SUP-T1/GFP cells from two independent experiments, respectively (Table 1). These data suggest that the efficiency of viral integration was not inhibited in HEXIM1-f-expressing SUP-T1 cells. In contrast, the relative abundance of HIV-1 transcript

expressed in SUP-T1/HEXIM1-f cells was substantially decreased to 0.03 and 2.9% relative to SUP-T1/GFP cells (Table 1). Furthermore, the luciferase activities were 200-fold lower in SUP-T1/HEXIM1-f cells than in SUP-T1/GFP cells (Table 1). Similar data was obtained from MOLT-4 cells infected with HIV-1 pseudotyped with VSV-G (data not shown). The transfection of plasmids encoding reporter viral DNA can bypass the viral entry and make it possible to measure the effect of HEXIM1 on LTR-driven transcription and translation. Consistent with above data, transfecting pNL-Luc into SUP-T1/HEXIM1-f cells gave significantly lower luciferase activities than SUP-T1/GFP cells (Fig. 3b, left). Similar data were obtained using pSIVmac239 Δ nefLuc (Fig. 3b, right). These data strengthen the possibility that HEXIM1 targets post-integration processes.

To test this further, we analyzed the efficiency of post-transcriptional processes with a transient transfection assay measuring the amount of Pr55 Gag, a viral gene product, and virus-like particles (VLPs) produced in the culture

Table 1. Effect of hexamethylene bisacetamide-induced protein 1 (HEXIM1) cDNA tagged with a FLAG epitope at the carboxy terminus (HEXIM1-f) on viral entry and transcription in SUP-T1 cells examined by quantitative real time polymerase chain reaction.

Exp.	Transduced gene	Integrated HIV-1 genome			HIV-1 transcript			Luciferase activity	
		Alu-LTR (copy)	β -globin (copy)	Normalized ^a (%)	HIV-1 RNA (copy)	CyPA (copy)	Normalized ^b (%)	RLU ^c	Normalized ^d (%)
1	GFP	5.2×10^5	6.7×10^6	100.0	1.6×10^6	6.8×10^7	100.0	3.2×10^5	100.0
	HEXIM1-f	2.0×10^6	7.4×10^6	351.3	6.7×10^1	1.0×10^8	0.03	1.5×10^3	0.5
2	GFP	4.6×10^6	1.8×10^7	100.0	3.1×10^8	8.9×10^7	100.0	7.1×10^5	100.0
	HEXIM1-f	1.6×10^7	1.9×10^7	333.2	9.4×10^6	9.3×10^7	2.9	3.4×10^3	0.5

^aThe number of Alu-long terminal repeat (LTR) products divided by the number of beta-globin products in SUP-T1/GFP is set to 100%. The abundance of Alu-LTR products in SUP-T1/HEXIM1-f relative to SUP-T1/green fluorescent protein (GFP) is shown.

^bThe number of HIV-1 RNA transcripts in SUP-T1/GFP divided by the number of cyclophilin A (CyPA) transcripts is set to 100%. The abundance of HIV-1 RNA in SUP-T1/HEXIM1-f relative to SUP-T1/GFP is shown.

^cThe luciferase activity is shown by relative light unit (RLU).

^dThe luciferase activity in SUP-T1/GFP is set to 100%. The luciferase activity in SUP-T1/HEXIM1-f relative to SUP-T1/GFP is shown.

supernatants. For this purpose, we used the CMV promoter-driven *gag-pol* expression plasmid, because HEXIM1-f did not affect CMV-driven transcription (Fig. 1b). At the levels of HEXIM1-f where LTR-driven Tat-dependent transcription was drastically inhibited (Fig. 3c, lanes 7, 8), the amount of CMV promoter-driven Gag expression was almost identical to that in the absence of HEXIM1-f (Fig. 3c, lanes 1–4). Furthermore, the processing pattern of Pr55 Gag in the presence of HEXIM1-f was identical to that in its absence (Fig. 3c). These data indicate that HEXIM1-f did not inhibit the transcription from a Tat-independent promoter, the translation of viral protein, or the protease activity of HIV-1. Finally, the potential effect of HEXIM1 on viral budding was examined. To do this, the amount of p24 CA in the culture supernatant of transfected cells was quantified as a representation of the amount of VLP. Expressing HEXIM1-f reduced VLP production from cells co-transfected with pLTR_{gag-pol} and pSVtat at levels comparable to the protein expression levels (Fig. 3c and d). In contrast, expressing HEXIM1-f did not reduce the amount of VLP produced by cells co-transfected with pCMV_{gag-pol} and pSVtat in conditions in which Tat-dependent LTR transcription was substantially inhibited (Fig. 3c and d). Taken together, this indicates that HEXIM1-f lowers the efficiency of Tat-dependent transcription from LTR promoter but does not block the efficiency of the late phase of the viral life cycle including translation, Gag's assembly, and budding. Thus, it is likely that HEXIM1 primarily targets Tat/P-TEFb-dependent transcription to inhibit HIV-1 replication.

Our findings demonstrated that HEXIM1, a cellular P-TEFb inhibitor, is a specific negative regulator of lentiviral replication in human T cell lines. The replication of vaccinia virus, adenovirus, and HSV-1 were not affected by HEXIM1-f expression; however, the *tat*-dependent transcription of the LTR promoter of both HIV-1 and SIV was reduced by HEXIM1-f. HEXIM1 limited replication of HIV-1 dramatically at levels where it did not visibly affect cell physiology (as little as a 5-fold

increase over the endogenous levels), nor were revertants immediately selected in HEXIM1-f-expressing cells. These data support the feasibility of developing HIV-1 inhibitors targeting the processes in which HEXIM1 is involved. For example, it is conceivable to hunt for a non-toxic chemical inducer for HEXIM1 since expression of HEXIM1 is induced by hexamethylene bisacetamide (HMBA) that is considerably toxic for cells [20].

P-TEFb has been shown to support transcription of the *c-myc* and CIITA transcription factors (reviewed in [21,22]). The functions of these transactivators are critical for cell proliferation, but in this study constitutive expression of HEXIM1-f, which reduces P-TEFb activity, did not affect the cell proliferation of human T cell lines, the human epithelial cell lines HEK293 or the NP2 glioblastoma cell lines (data not shown). How can this be explained? Very recently, a high-molecular-weight bromodomain protein, Brd4, was found to function as a 'cellular *tat*' [23,24]. Interestingly, it was shown that Brd4 binds not only to cyclin T1 but also to cyclin T2, a widely expressed variant of cyclin T, to which HEXIM1 binds but Tat does not [23–25]. We hypothesize that Brd4 might be able to recruit and activate P-TEFb more efficiently than does Tat, leaving cellular transcription unaffected by the upregulated expression of HEXIM1 from the retroviral vector. An alternative possibility comes from the fact that HEXIM1 does not interact with the ubiquitously expressed cyclin K, which functions as a P-TEFb component. It is possible that Tat is not able to utilize P-TEFb consisting of CDK9 and cyclin K but Brd4 can, such that cyclin K may substitute for cyclin T1 to support Brd4-mediated cellular gene transcription.

Acknowledgements

We thank Dr. Tsutomu Murakami for the critical reading of the manuscript. This work was partly supported by Japan Health Science Foundation, Japanese Ministry of

Health, Labor and Welfare, and Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

Sponsorship: This work was partly supported by Japan Health Science Foundation, Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare, and Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

References

- Marshall N, Price D. Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol* 1992; 12:2078-2090.
- Kulken C, Foley B, Hahn B, Korber B, Marx P, McCutchan F, et al., editors. *HIV Sequence Compendium 2000*. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, 2000.
- Barboric M, Peterlin BM. A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS Biol* 2005; 3:e76.
- Nguyen V, Kiss T, Michels A, Bensaude O. 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 2001; 414:322-325.
- Yang Z, Zhu Q, Luo K, Zhou Q. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* 2001; 414:317-322.
- Li Q, Price J, Byers S, Cheng D, Peng J, Price D. Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. *J Biol Chem* 2005; 280:28819-28826.
- Michels A, Nguyen V, Fraldi A, Labas V, Edwards M, Bonnet F, et al. MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Mol Cell Biol* 2003; 23:4859-4869.
- Yik J, Chen R, Pezda A, Samford C, Zhou Q. A human immunodeficiency virus type 1 Tat-like arginine-rich RNA-binding domain is essential for HEXIM1 to inhibit RNA polymerase II transcription through 7SK snRNA-mediated inactivation of P-TEFb. *Mol Cell Biol* 2004; 24:5094-5105.
- Barboric M, Kohoutek J, Price J, Blazek D, Price D, Peterlin B. Interplay between 7SK snRNA and oppositely charged regions in HEXIM1 direct the inhibition of P-TEFb. *EMBO J* 2005; 24:4291-4303.
- Schulte A, Czudnochowski N, Barboric M, Schonichen A, Blazek D, Peterlin B, Geyer M. Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *J Biol Chem* 2005; 280:24968-24977.
- Fraldi A, Varrone F, Napolitano G, Michels A, Majello B, Bensaude O, Lania L. Inhibition of Tat activity by the HEXIM1 protein. *Retrovirology* 2005; 2:42.
- Michels A, Fraldi A, Li Q, Adamson T, Bonnet F, Nguyen V, et al. Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *EMBO J* 2004; 23:2608-2619.
- Komano J, Mlyvauchi K, Matsuda Z, Yamamoto N. Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses. *Mol Biol Cell* 2004; 15:5197-5207.
- Wagner R, Graf M, Bieler K, Wolf H, Grunwald T, Foley P, Uberia K. Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2000; 11:2403-2413.
- Masuda T, Planelles V, Krogstad P, Chen I. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 att site: unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain. *J Virol* 1995; 69:6687-6696.
- Willey R, Smith D, Laskey L, Theodore T, Earl P, Moss B, et al. In vitro mutagenesis identifies a region within the envelope gene of the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. *J Virol* 1988; 62:139-147.
- Butler SL, Hansen MS, Bushman FD. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med* 2001; 7:631-634.
- Graf Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, Wellmann S, Seifert G, Henze G, Seeger K. Deletion analysis of p16(INKa) and p15(INKb) in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99:4629-4631.
- Zhou M, Lu H, Park H, Wilson-Chiru J, Linton R, Brady JN. Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *J Virol* 2006; 80:4781-4791.
- Kusuhara M, Nagasaki K, Kimura K, Maass N, Manabe T, Ishikawa S, et al. Cloning of hexamethylene-bis-acetamide-inducible transcript, HEXIM1, in human vascular smooth muscle cells. *Biomed Res* 1999; 20:273-279.
- Price DH. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 2000; 20:2629-2634.
- Garriga J, Grana X. Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* 2004; 337:15-23.
- Jang M, Mochizuki K, Zhou M, Jeong H, Brady J, Ozato K. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 2005; 19:523-534.
- Yang Z, Yik J, Chen R, He N, Jang M, Ozato K, Zhou Q. Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* 2005; 19:535-545.
- Napolitano G, Licciardo P, Gallo P, Majello B, Giordano A, Lania L. The CDK9-associated cyclins T1 and T2 exert opposite effects on HIV-1 Tat activity. *AIDS* 1999; 13:1453-1459.