

200830032A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

抗ウイルス作用をもつ宿主防御因子APOBEC3GとHIV-1 Vifとの結合領域
および特性の解明と、その阻害化合物の検索に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 武田 哲

平成 21 (2009) 年 4 月

目 次

総括研究報告

抗ウイルス作用をもつ宿主防御因子APOBEC3GとHIV-1 Vifとの結合領域および
特性の解明と、その阻害化合物の検索に関する研究 ----- 1

武田 哲

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者：武田 哲（国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員）

研究要旨

HIV-1 感染治療において、多剤併用療法の定着が感染予後の改善に大きな成果を挙げている。しかし、不適切な薬剤使用のために薬剤耐性ウイルスの出現と伝搬が少なくなく、さらに、すでに薬剤耐性ウイルスに感染してしまっている患者を救済することも重要な課題である。このような問題を打破する為には、より多くの選択可能な治療薬を開発することが必要である。そこで、私は昨年度に続き、APOBEC3G(A3G)と HIV-1 Vif の相互作用に焦点を当て、抗 HIV-1 薬剤の開発に結びつくような基礎研究を行うことを目的として研究を行った。昨年度の生化学的な実験の結果を踏まえて、96 穴プレートを使用する ELISA の系を確立した。原理は、固層化した抗 A3G 抗体で A3G と GST-Vif タンパクの複合体をキャプチャーし Horse Radish Peroxidase を結合させた抗 GST 抗体でサンドイッチした後、化学発光を用いて定量する方法である。もし結合を阻害する化合物が存在する場合、A3G/GST-Vif 複合体の形成が阻害され GST-Vif がプレートにキャプチャーされず、化学発光が認められなくなるという系を確立した。また、一次スクリーニングにより効果の認められた候補化合物を二次スクリーニングにかける目的のために A3G 発現量を調節できる培養細胞系を確立した。この細胞はテトラサイクリンを加えることにより濃度依存的に A3G 発現量が減少させることが出来、A3G の発現の有無での候補化合物の効果を確認することにより A3G/HIV-1 Vif の相互作用に効果を示す化合物のスクリーニングが可能となる。今後、低分子化合物ライブラリ等をこれらの系によりスクリーニングする予定である。

A. 研究目的

HIV-1 感染治療において、多剤併用療法の定着が感染予後の改善に大きな成果を挙げ、HIV-1 感染症はもはや慢性疾患の範疇に入りつつある時代に突入している。しかし、治療が長期化するが故、薬剤耐性ウイルスの出現の懸念も増大している。世界的には、不適切な薬剤使用のために薬剤耐性ウイルスの出現と伝搬が少なくなく大きな社会的不安材料となっている。さらに、すでに薬剤耐性ウイルスに感染している患者を救済することも重要な課題である。このような問題を打破するためにも、よ

り多く選択可能な治療薬を開発することが必要である。さらに、作用点が異なる新規薬剤は併用することにより既存薬の投与量を抑えることができるため、薬剤耐性ウイルス出現のチャンスを下させることができる。このようなことから、作用機序が既存のメカニズムと異なる新規抗 HIV-1 薬の開発を強力に推進することは非常に重要であると考えられる。

HIV-1 の宿主であるリンパ球には、本来、レトロウイルスの増殖を抑制する生体宿主因子 APOBEC3G（以下、A3G）が発現している。しかし、HIV-1 は、ウイルスタンパク Vif を感

染細胞で発現し、A3G を細胞内より枯渇させ、宿主防御機構から逃れることができる。

本研究では、宿主の A3G の生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬を開発するための基礎研究を行う。宿主の抗ウイルス因子である A3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び生化学的解析により両者の結合特性を解明し、抗 HIV-1 薬の開発に結びつくような基礎研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

(1) 一次スクリーニングのための ELISA 法の確立

バキュロウイルスの発現系を利用して、野生型 A3G タンパク、Vif に結合しない変異型 A3G (D128K) タンパクおよび Vif (GST タグつき) タンパクの 3 種を発現させ精製した。一方、A3G の C 末端 17 アミノ酸に対する抗ウサギ血清を作製し、精製 IgG を 96 穴プレートに固層化し、ELISA 系を作製した。

(2) A3G を安定発現する培養細胞の作製

内在性の A3G が発現していない HeLa 細胞と SupT1 細胞を用いた。A3G の細胞内発現量を調節するために、Tet-Off の発現調節系を利用した。

(倫理面への配慮)

当研究は、遺伝子組換え実験を含むので、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守する。またクラス 3 の病原体 HIV-1 を用いた実験を含む。このため、実験計画は国立感染症研究所の組換え DNA 実験安全委員会に承認をえて同委員会の認可をえた実験者が同委員会の認定した実験室にて行なう。

C. 研究結果

(1) ライブラリスクリーニング用の *in vitro* 結合実験系の確立とライブラリスクリーニング

昨年度の生化学的な実験の結果を踏まえて、96 穴プレートスケールの ELISA 系を確立した。原理は、固層化した抗 A3G 抗体で A3G と GST-Vif タンパクの複合体をキャプチャーし、HRP-conjugated 抗 GST 抗体でサンドイッチした後、化学発光を用いて定量する。もし結合阻害化合物が存在する場合、A3G/GST-Vif 複合体形成が阻害され GST-Vif がプレートにキャプチャーされず、化学発光が認められなくなるという系を確立した。実際の候補化合物の検索は、低分子化合物および放線菌・真菌ライブラリライブラリを用い、現在準備進行中である。

(2) 候補化合物のスクリーニングに用いる A3G 発現細胞系の確立

一次スクリーニングにより得られる候補化合物を、二次スクリーニングにかける目的のために、A3G を発現する培養細胞系を確立した。まず、テトラサイクリン(Tet)を細胞培養液に添加することにより、濃度依存的に A3G 発現量が減少する Tet-Off 発現細胞クローンを作製した。親細胞には、内在性 A3G が発現していない HeLa 細胞と CD4 陽性リンパ球である SupT1 細胞を用いた。各細胞、野生型 A3G あるいは Vif に結合しない A3G (D128K)、ユビキチン化されない A3G(Super A3G) の 3 種類をそれぞれ発現する DNA を組込んだ。Tet によって A3G の発現量を調節することにより、vif 欠損 HIV-1 の感染に対して許容あるいは非許容性を変換させることが可能な Phenotype-Switch 細胞を作製した。これらの細胞を利用して、候補化合物の二次スクリーニングに向けた準備も完了した。

D. 考察

A3G と Vif が比較的可溶化が困難であり、結合実験の至適条件には塩濃度を 500mM 以上に上げる必要があった。これは、化学発光の至適条件と相反してしまうので、結果的に A3G/Vif

複合体をキャプチャーする ELISA 系が最も検出レンジが高く効率がよかった。この系を用いて、低分子化合物および放線菌・真菌ライブラリから候補化合物を見つけ出したいと考えている。

候補化合物の二次スクリーニングに用いるための A3G Tet-Off 発現細胞に関して、この細胞は、A3G と Vif の機能阻害剤のスクリーニングだけでなく、Vif と A3G に関わる創薬のスクリーニングにも応用が可能である。

E. 結論

ウイルスの構成因子（逆転写酵素など）やその複製に必須な生体因子（ケモカインレセプターなど）を阻害する既存の抗 HIV-1 薬とは全く異なり、生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬を開発するための基礎研究を行っている。宿主の抗ウイルス因子である A3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び生化学的解析により両者の結合特性を解明し、新規抗 HIV-1 薬開発への新たな道を模索している。平成 20 年度は 2 期目として、A3G と Vif との結合阻害剤スクリーニングに向けた ELISA 系の確立を行った。さらに、二次スクリーニングに必要な A3G 発現細胞系も作製した。最終年度のケミカルス

クリーニングに向けて前進することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田哲、杉浦互. AP OBEC3GのHIV-1 Vif に依存したユビキチン化サイトに関する研究.第22回日本エイズ学会. 2008. 大阪
2. 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田哲、杉浦互. HIV-1 Vif 依存的な APOBEC3G のユビキチン化サイトの同定. 第56回日本ウイルス学会. 2008 岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし