

2008300J8A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

Vif/APOBEC3Gの相互作用を標的とした新規抗HIV-1薬の開発

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 高折 晃史

平成21(2009)年 3月

研究報告書

Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発

研究代表者 高折晃史 京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学 講師  
研究分担者 錦織桃子 京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学 助教

研究要旨 Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発へ向け、複数の低分子化合物ハイスループットスクリーニング系の確立をめざした。種々の試行錯誤の末、ひとつのスクリーニング系が確立された。今後、本スクリーニング系を用いて、低分子化合物のスクリーニングを行う予定である。また、APOBEC3G のリン酸化がその抗 HIV 活性調節に重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて報告した。

A. 研究目的

HIV-1 感染は、HAART の出現によりウイルス複製をある程度制御可能になったとはいえ、一方でその長期服用による副作用、また薬剤耐性の出現が大きな問題となっており、これらの克服に向け、新規作用機序の抗 HIV-1 薬の早期開発が待たれている。HIV-1 Vif は、ウイルス複製および AIDS 発症に必須の蛋白であるが、その機能の本態は、本来 HIV-1 の標的細胞が有する抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G を中和することであることが近年明らかにされた。Vif がウイルス複製にとって必須の蛋白であること、および Vif/APOBEC3G の相互作用の分子機構が詳細に明らかにされたことにより、これらの分子およびその相互作用は、新規の抗 HIV-1 薬の絶好の標的と考えられる。そこで、本研究では、Vif/APOBEC3G 両分子およびその相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 の開発を目指した研究を行う。

B. 研究方法

本研究の特色は、何よりもまず Vif/APOBEC3G という新規の分子が標的となる創薬研究である点である。またさらに、これら分子に関する申請者ら自身のこれまでの研究により集積された科学情報をもとに、想定可能な複数の標的候補に対し多角的

にアプローチを計ることにより、その実現の可能性を高める点が独創的な点である。具体的には、①Vif による APOBEC3G のユビキチン依存性分解を阻害する化合物

②APOBEC3G の発現および活性を調節する化合物

③Vif のユビキチン依存性分解を促進する化合物に関する複数のスクリーニングを行う。

全体の研究計画としては、上記の課題に対し、

- 1) ハイスループットアッセイ系の確立と低分子化合物のスクリーニング
- 2) リード化合物の選択と二次スクリーニング、in vitro における抗 HIV-1 活性の確認
- 3) in vivo における抗 HIV-1 活性の確認を行う。

（倫理面への配慮）

特に存在しない。

C. 研究結果

昨年度の研究結果として、前述の三つの柱のうち特に「①VifによるAPOBEC3Gのユビキチン依存性分解を阻害する化合物」にしばって研究を展開した。当初、初年度はスクリーニング系の確立とスクリーニングの施行

を目標としていたが、残念ながらスクリーニング系として数種類の安定発現細胞株の樹立、およびKusabira-Greenを用いた蛋白質断片コンプリメンテーション法等を試みたが成功しなかった。しかしながら、昨年度、Nathansらが我々と基本的に同様のスクリーニング系を用いてVifによるAPOBEC3Gの分解を阻害する低分子化合物を同定したことを報告した(*Nat Biotech* 26:1187,2008)。その報告では一過性発現を用いてスクリーニングを行い成功していることから、その系の確立を試み、それに成功した。さらに、低分子化合物ライブラリーを入手し、スクリーニングを開始するところまで来ている。さらに、今回報告された低分子化合物のうち代表的なRN-18の合成を、京都薬科大学 木曾良明先生にお願いし、これを入手した。今後のスクリーニングのコントロールとして使用する予定である。

また、昨年度、我々は、APOBEC3Gのリン酸化がその抗 HIV 活性調節に重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて報告した(Shirakawa, *Nat Struct Mol Biol* 15:1184, 2008)。従って、APOBEC3Gのリン酸化調節を視野にいたしたスクリーニングも計画している。

#### D. 考察

Vif/APOBEC3Gの相互作用は、新規の抗 HIV-1 薬の絶好の標的と考え、本研究を提案した。実際、昨年度に我々が計画したのと同様の方法を用いて候補物質が同定され報告された(Nathans, *Nature Biotech* 26:1187,2008)ことは、本アプローチの方向性の妥当性を示しているといえる。残念ながら、当初計画した何種類かのスクリーニング系の確立はならなかったが、同報告と同様の一過性発現を用いたスクリーニング系の樹立に成功し、低分子化合物ライブラリーおよびポジティブコントロールとなる低分子化合物 RN-18 の合成も終了しており、本アッセイ系を用いて候補化合物を同定できると考えている。さらに、それ以外のアッセイ系

の確立も計画しており、よりよりリード化合物の選択に結び付けたいと考えている。

#### E. 結論

Vif/APOBEC3Gの相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発に関する研究が順調に進んだ。残り2年間で、適当なリード化合物の候補を選択できるところまで、研究を展開したい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-kondo, Kotaro Shirakawa, Hiroaki Higashitsuji, Katsuhiko Itoh, Katsuhiko Io, Masashi Matsui, Kazuhiro Iwai, Hiroshi Kondoh, Toshihiro Sato, Mitsunori Tomonaga, Satoru Ikeda, Hirofumi Akari, Yoshio Koyanagi, Jun Fujita, and Takashi Uchiyama: MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 6(1):1, 2009.

2) Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-kondo, Masaru Yokoyama, Taisuke Izumi, Masashi Matsui, Katsuhiko Io, Toshihiro Sato, Hironori Sato, and Takashi Uchiyama: Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nature Structural & Molecular Biology* 15(11):1184-91, 2008.

3) Taisuke Izumi, Kotaro Shirakawa, and Akifumi Takaori-Kondo: Cytidine deaminases as a weapon against retroviruses and a new target for antiviral therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8(3):231-238, 2008.

4) 高折 晃史: APOBEC3 ファミリー蛋白。「日本エイズ学会誌」第10巻 第1号 19項~24項、2008年

5) 高折 晃史: APOBEC3G による HIV の感染制御。「血液フロンティア」第18巻 第5号 749項~757項、2008年

##### 2. 学会発表

1) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-Kondo, Kotaro Shirakawa, Kazuhiro Io, Masashi Matsui, and T Uchiyama: HIV-1 Vif Causes G2 Cell Cycle Arrest via the p53 Pathway. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, Feb 3-6, 2008. (Young Investigator Award 受賞)

2) Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-kondo,

Taisuke Izumi, and Takashi Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation antagonizes APOBEC3G degradation by Vif. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, Feb 3-6, 2008. (Young Investigator Award 受賞)

3) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-Kondo, Kotaro Shirakawa, and T Uchiyama: HIV-1 Vif causes G2 cell cycle Arrest via the p53 Pathway. The 2008 meeting on RETROVIRUSES, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, May 19-24, 2008.

4) Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-kondo, Taisuke Izumi, and Takashi Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation antagonizes the degradation of APOBEC3G by HIV-1 Vif. The 2008 meeting on RETROVIRUSES, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, May 19-24, 2008.

5) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-Kondo, Kotaro Shirakawa, Masashi Matsui, Katsuhiko Io, and Takashi Uchiyama: HIV-1 Vif causes G2 cell cycle Arrest via the p53 Pathway. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, September 7-11, 2008.

6) Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-kondo, Masaru Yokoyama, Taisuke Izumi, Masashi Matsui, Katsuhiko Io, Hironori Sato, and Takashi Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation regulates the interaction between APOBEC3G and HIV-1 Vif. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, September 7-11, 2008.

7) 高折 晃史: HIV-1 Vif と p53/MDM2 との機能的相互作用。第 10 回白馬シンポジウム in 金沢、金沢、平成 20 年 2 月 8 日-9 日 (invitation)

8) 泉 泰輔、高折 晃史、白川 康太郎、井尾克宏、松井道志、内山 卓: HIV-1 Vif は

p53 依存的経路で感染細胞の細胞周期を G2/M 期に停止させる。第 22 回近畿エイズ研究会学術集会、奈良、平成 20 年 6 月 14 日 (学会賞受賞)

9) 松井道志、白川 康太郎、高折 晃史、泉 泰輔、内山 卓: Protein Kinase A によるリン酸化は APOBEC3G と Vif の相互作用を調節する。第 22 回近畿エイズ研究会学術集会、奈良、平成 20 年 6 月 14 日

10) 高折 晃史: シンポジウム 7 実験室からの発信「APOBEC3G/Vif による HIV-1 複製制御」第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、平成 20 年 11 月 26~28 日

11) 泉 泰輔、高折 晃史、白川 康太郎、松井 道志、井尾 克宏、内山 卓: HIV-1 Vif は p53 依存的経路で感染細胞の細胞周期を G2/M 期に停止させる。第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、平成 20 年 11 月 26~28 日

12) 白川 康太郎、高折 晃史、横山 勝、松井 道志、井尾 克宏、泉 泰輔、佐藤 裕徳、内山 卓: Protein Kinase A によるリン酸化は APOBEC3G と Vif の相互作用を調節する。第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、平成 20 年 11 月 26~28 日

13) 高折 晃史: リン酸化による APOBEC3G の抗 HIV-1 活性制御。第 11 回白馬シンポジウム in 長崎、長崎、平成 20 年 12 月 5-6 日 (invitation)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし。