

評価した。

■C/D. 研究結果と考察

<His-TEV-AH dimer/RTB-Lの高濃度溶解バッファの探索>

これまでの研究で種々のAH誘導体を得たが、最も抗HIV活性の強いHis-TEV-AH dimer/RTB-LをHIV感染予防薬として活用するため、His-TEV-AH dimer/RTB-Lを高濃度で溶解できるバッファを探索した。尚、10 mg/mlで溶解させることを目標とした。

グリセロール、ポリエチレングリコール、エタノールやプロピレングリコール等を用い、His-TEV-AH dimer/RTB-Lの高濃度溶解を試みた結果、50%グリセロールで、pH 5.3にて、10 mg/ml溶液を調製できることを見出した。また、pH 4.5にて、5～30% ポリエチレングリコール(平均分子量：1540)でも、10 mg/ml溶液を調製できた。

今後、これらの基剤を用いて、His-TEV-AH dimer/RTB-LのHIV感染予防薬としての開発が期待できる。また、これらの基剤は酵素反応によるHis-TEV-AH dimer/RTB-Lからの精製タグの除去、等の*in vitro*の反応にも応用できる。

<放線菌由来AHのポリエチレングリコール(PEG)化>

HIV/AIDS治療薬としてAHを血中投与する場合、pH中性付近での溶解性が低いことから血中での不溶化、また血中のプロテアーゼによる分解及び免疫原性により十分な効果が発揮できないことが考えられる。そこで、血中半減期を延長し、免疫原性を低下させることに成功しているPEG-インターフェロンに倣いPEG修飾を試みた。PEG修飾に伴い親水性が増すことも報告されており溶解性改善も期待された。すでに、PEG化誘導体の調製法は2008年度に報告済みであるが、組成と温度を一部改変して反応を

行った。組成に関しては、反応液から30%アセトニトリルを除き、温度を室温で行った。PEGは、N末へ結合するm-PEG aldehydeを用い、分子量は10kDaを用いた。得られたPEG化誘導体の分子量をMALDI-TOF massで測定し、PEG修飾部位の解析を行った。その結果、PEG化誘導体の分子量が判明し(図3)、AH分子量12520にPEG分子量約10000が1:1で結合していることが明らかになった。また、このPEG化AHは合胞体形成阻害活性を維持していることも明らかになった。

今後は、PEGがAHのN末に結合していることを確認すると共に、5 kDa-, 10 kDa-PEG-AH及び20 kDa-PEG-AHを用いてマウスに血中投与後の血中半減期の延長効果及び抗体産生の抑制効果を検討する。また、PEG化誘導体の分子量が確認できたので、確立した反応及び精製法を用いて高活性を有する2量体のPEG化誘導体調製の検討も進める予定である。

<放線菌由来AHのスチレン-無水マレイン酸共重合(SMA)化>

PEG化と同様に、AHの血中投与における問題(溶解性、血中半減期、免疫原性)の改善のため、SMA修飾を試みた。SMAによる修飾は、抗がん剤SMANCKSに倣って行った。SMAは、1)血中でアルブミンと結合し、血中半減期が延長すること、2)水溶液中で疎水部分(スチレン)と親水部分(マレイン酸)を有し、界面活性剤の効果を示すことが報告されており、溶解性改善及び半減期延長等が期待された。AHへのSMAの修飾部位は、N末アミノ酸及びリジン残基である。その部位への修飾は、X線結晶構造解析から得られた立体構造で確認したところ活性部位には影響がないと考えられた(図4、青色：リジン、赤色：アラニン(N末アミノ基)を示す)。反応は2段階で行った。まず1段階は、AHの溶解性を高めるため、AH溶液に等量のSMAを添加

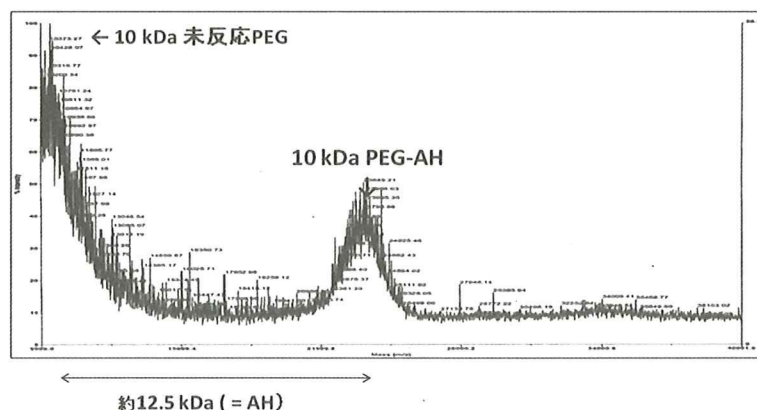
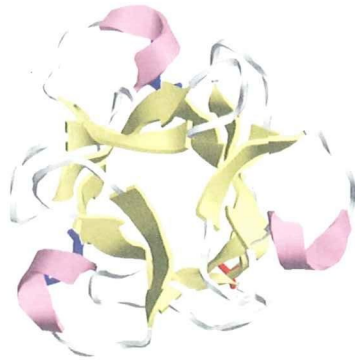


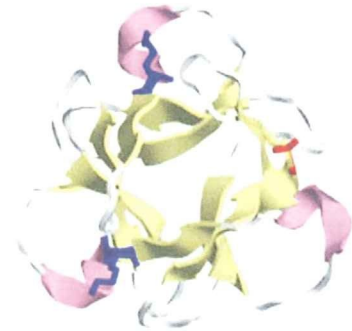
図3 MALDI-TOF 質量分析のチャート

し、一晩中攪拌しながら溶解した。AHは、0.8 M NaHCO₃, pH 8.1 溶液中に0.1 mg/ml程度の濃度でしか溶解できないが、SMAを一晩中AH共存下で攪拌し溶解することで、溶解性は約10 mg/mlの濃度まで改善した。おそらくSMAの界面活性作用により溶解性が上昇したと考えられる。次の2段階目の反応として、AHへのSMAの修飾反応を行った。高濃度AHにSMAを5回に分けて添加し、攪拌しながら反応を行った。SMA修飾率は、90%以上となる高い反応効率であった。その後、透析により未反応のSMAを除去し、ゲルろ過クロマトグラフィー (Bio-Gel P-30) で未反応AHとSMA-AHを分離することにより、SMA化誘導体を高濃度で得ることができた。精製したSMA-AH (3ロット) をSDS-PAGEで分析

した結果、図5に示すようにSMAによるAHの修飾が確認できた。さらに、得られたSMA化誘導体の合胞体形成阻害活性を測定し、それぞれのIC₅₀値を比較した(表1)。その結果、未反応AHは0.22 μM、SMA-AHは0.2 μM (Lot.1)、0.12 μM (Lot.2)、0.09 μM (Lot.3)となり、SMA化誘導体は未反応AHとほぼ同程度か又はAHより若干高い阻害活性を有することが確認された。したがって、阻害活性に影響を与えずpH中性付近の溶解性を改善したSMA化誘導体の調製法を確立することができた。このSMA化誘導体は、血中投与可能なHIV/AIDS治療薬の有力な候補になり得ると考えられる。今後、抗HIV活性を測定し、有効な結果が得られた場合、マウスに血中投与後の血中半減期の延長効果及び抗体産生の抑制効



糖鎖結合ポケット表面から見た図



糖鎖結合ポケット裏面から見た図

図4 SMA修飾に関与するアミノ酸を示したAH立体構造

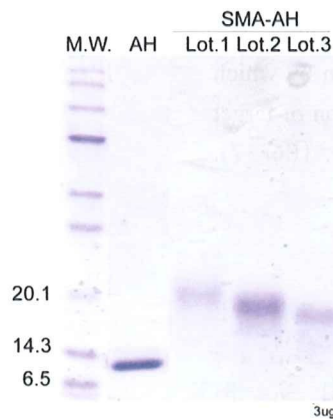


図5 AH及びSMA化誘導体(3ロット)のSDS-PAGE

表1 AH及びSMA化誘導体(3ロット)の合胞体形成阻害活性の評価

Sample	IC50 (uM)
AH control	0.22
Lot.1	0.21
Lot.2	0.12
Lot.3	0.09

果を検討する。

■E. 結論

His-TEV-AH dimer/RTB-Lを高濃度で溶解できるバッファーを見出した。今後、His-TEV-AH dimer/RTB-LによるサルにおけるSIV感染阻害実験(前臨床試験)を実施する予定である。HIV/AIDS治療薬開発を目的としたPEG化に関しては、計画通りの分子量のPEG化誘導体が調製されていることが確認でき、PEG化誘導体をマウスへ血中投与し、抗体産生抑制効果を調べる検討へと進むことが可能となった。SMA化に関しては、pH中性付近での溶解性が改善され、血中投与が可能なSMA誘導体を調製することができた。また、合胞体形成阻害活性が、未修飾AHとほぼ同程度又はそれ以上であったことから、有効なAH誘導体の候補として期待できる。今後、PEG化及びSMA化誘導体の*in vivo*における血中半減期と抗体産生の効果を検討し、薬剤耐性HIV/AIDS症例救済治療薬の実用化に向けた開発を進める予定である。

■F. 健康危険情報

該当無し

■G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka H., Chiba H., Inokoshi J., Kuno A., Sugai T., Takahashi A., Ito Y., Tsunoda M., Suzuki K., Takénaka A., Sekiguchi T., Umeyama H., Hirabayashi J. and Omura S.: Mechanism by which the lectin actinohivin blocks HIV infection of target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(37), 15633-15638, 2009

2. 学会発表

1. 新規抗HIV蛋白質アクチノヒビンのマンノビオースとの共結晶化 相良 翼、斉藤 彰浩、高橋 淳、鈴木 薫、関口 武司、角田 大、田中 晴雄、竹中 章雄 日本結晶学会年会～西宮 2009. 12. 5-6
2. 放線菌より単離した新規anti-HIV蛋白質アクチノヒビンならびにそのマンノビオースとの複合体のX線構造 角田 大、鈴木 薫、相良 翼、高橋 淳、猪腰 淳嗣、大村 智、関口 武司、田中 晴雄、竹中 章雄 第82回日本生化学会大会～神戸 2009. 10. 21-24
3. Tsunoda M., Suzuki K., Sagara T., Takahashi A., Inokoshi J., Omura S., Sekiguchi T., Tanaka H. and

Takenaka A. Crystal Structures of Actinohivin, an Anti-HIV Protein from an Actinomycete, and its Complex with Mannobiose 25th European Crystallographic Meeting ~ Istanbul 2009. 8. 16-21

■H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 特願2008--51963
発明の名称：改変アクチノヒビン、その2量体およびこれを含む抗HIV薬
発明者：田中 晴雄、東 隆親、村上 明一、高橋 淳、猪腰 淳嗣、丹野 和信、大村 智
出願人：(有)キイム・ファーマ・ラボ
2. 特願2006-323043
発明の名称：アクチノヒビン多量体を含む融合タンパク質からなる抗HIV薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子および抗HIVの製造法
発明者：田中 晴雄、猪腰 淳嗣、高橋 淳、大村 智
出願人：(有)キイム・ファーマ・ラボ
3. 日本特許：No.3962772 (2007年6月)、
U.S. Patent : 6,482,412B (2002年11月)、
Australian Patent : 750,914 (2002年11月)、
European Patent : No.1076065 (2008年7月)
発明の名称：抗ヒト免疫不全ウイルス活性を有するポリペプチド、ポリペプチドをコード化する遺伝子、ポリペプチドの製造方法
発明者：田中 晴雄、大村 智
出願人：(有)キイム・ファーマ・ラボ

分担研究課題



新規な機序による抗HIV薬剤の合成展開とその実用化

研究分担者

野村 伸彦 富山化学工業株式会社総合研究所第三研究部 主幹研究員

新しい抗HIV-1剤の創製を目的として、昨年度に引き続きヒット化合物からの誘導体合成・評価をおこなった。今年度新たに合成した48化合物のうち、14化合物に $IC_{50} < 1\text{ nM}$ の抗HIV活性が認められた。更に、これらの化合物の中で良好なマウス経口吸収性を示した4化合物につき、微生物を用いた復帰突然変異試験及びマウス小核試験並びにhERG電流に及ぼす影響について検討したところ、いずれも陰性であった。上記の化合物から1化合物を選択し、ラットに1日1回2週間反復経口投与したところ、今回検討した最高投与量で毒性所見は認められなかった。これまでの検討の中で、抗HIV活性を増強する新たな化合物群を、また、これまで見出されている反復投与毒性を改善できる新たな複数の化合物群を見出した。これらの化合物は、新規性並びに進歩性を有する化合物であり特許出願した。今後、更に抗HIV剤としての特性の見極めを行っていく予定である。

■ A. 研究目的

HIV/AIDS症は、HAART療法の確立と近年の新薬の開発により治療可能な慢性疾患と位置付けられつつある。しかし、薬剤の組み合わせやアドヒランスが悪い場合は容易に耐性ウイルスが出現することに加え、特定の薬剤に耐性となったウイルスは、同系統の薬剤に対しても交差耐性を示すことが多いため、新規な作用機序を有する新薬の開発が望まれている。

我々は、これまでに新規な作用機序と強い抗HIV活性を有し、マウスにおいて経口吸収性を示す化合物を見出している。現在、臨床可能な薬剤の開発を目標として様々な検討を行っている。

■ B. 研究方法

i) 新規化合物の合成

前年度に見出されたヒット化合物からの誘導体を、有機化学的手法を用いて合成した。

ii) 新規合成化合物の評価

① *In vitro*抗HIV活性の評価

国立感染症研究所にて実施した。

② 経口吸収性の検討

0.5%メチルセルロースに懸濁させた被験物質を6

週齢のICR系雄性マウスに25mg/kg単回経口投与し、1, 4及び12時間後に採血した。調製した血清と等量のアセトニトリルとの混合により除蛋白し、その遠心上清中の薬物濃度をHPLC（島津製作所、Prominenceシリーズ、カラム：XTerra RP18 3.5 mm 4.6 × 100 mm）にて測定した。

③ 微生物を用いた復帰突然変異試験（Ames試験）

試験菌株として、*Salmonella typhimurium* TA98を用いた。所定の用量となるように調製した各被験物質溶液0.1 mLを滅菌した小試験管に取り、直接法では0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH7.4)、代謝活性化法ではS9mixの0.5 mLを加え、さらに前培養した菌液0.1 mLを加えて37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。次いで、45℃に保温した上層軟寒天培地（塩化ナトリウム5 g/L、Bacto-agar (Difco) 6 g/L, 0.05 mM L-ヒスチジン-0.05 mM D-ピオチン）2 mLを加えて混和した後、テスメディアAN培地(オリエンタル酵母工業)上に重層した。これを37℃で42時間培養後、実体顕微鏡を用いて試験菌株に対する生育阻害及び肉眼で被験物質の沈殿の有無を調べ、復帰変異コロニー数をコロニーカウンターで測定した。

試験結果の判定に関しては、被験物質の用量にかかわらず復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍未

満であった場合に陰性と判定した。

④ マウス小核試験

用量設定試験として、0.5%メチルセルロースに懸濁した被験物質を、8週齢のICR系雄性マウスに1日1回2日間経口投与し、生存可能な最大投与量を求めた。次に、この投与量を、1群3匹のマウスに1日1回2日間経口投与し、最終投与24時間後に、頸椎脱臼にて安楽死させたマウスより大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨より骨髓細胞を牛胎児血清で遠沈管に洗い出し、遠心(190×g, 5min.)後、骨髓細胞をスライドガラスに塗抹しメタノール固定後、アクリジン・オレンジ染色を行った。

小核の観察は1個体あたり1000個の多染性赤血球について行い、小核を有する多染性赤血球(micronucleated polychromatic erythrocytes; MNPCE)の出現率を求めた。被験物質を投与した各マウスの小核を有する多染性赤血球の出現頻度がいずれも0.5%以下の場合を陰性とした。

⑤ hERG電流に及ぼす影響

hERG遺伝子(human ether-a-go-go related gene)を安定発現させたHEK293細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法(保持電位-80mV、脱分極パルス+20 mVで1.5秒間、再分極パルス-50 mVで1.5秒間)により化合物添加時のhERG電流を測定した。試験濃度は、*in vitro*抗HIV活性を踏まえて1000 nMで実施した。

⑥ ラット反復投与毒性試験

0.5%メチルセルロースに懸濁した被験物質を、6週齢のCrI:CD(SD)系雄性ラットに1日1回、2週間反復経口投与した。投与量は0.3、1、3、10 mg/kg、10 mL/kgで実施した。投与期間中は、一般状態他の観察を行い、投薬終了翌日(剖検日)にジエチルエーテル麻酔下で下大静脈から血液を採取し、各器官重量、血液学的及び血液生化学的検査を行った。

・観察項目：一般状態観察、体重、摂餌量、剖検時肉眼観察

・血液学的検査

EDTA-2Kで抗凝固処理した血液について総合血液学検査装置(ADVIA 120、バイエルメディカル株式会社)を用いて以下の項目を測定した。測定試薬は全てバイエルメディカル株式会社製を用いた。

検査項目：赤血球数、白血球数、ヘマトクリット、

ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、白血球分類、網赤血球数、骨髓有核細胞数

・血液生化学的検査

ヘパリン処理した血液を遠心分離して得た血漿について、自動分析装置(日立7070形、株式会社日立製作所)を用いて以下の項目を測定した。測定試薬はすべて和光純薬工業株式会社製を用いた。

検査項目：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、クレアチンキナーゼ、乳酸脱水素酵素、トリグリセリド、リン脂質、総コレステロール、総蛋白、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、尿素窒素、クレアチニン、血糖、総ビリルビン、無機リン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、塩素

・器官重量検査：脳、下垂体、唾液腺、胸腺、甲状腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、雄生殖器(精巣、精囊・前立腺並びに精巣上体)

・統計処理

体重、血液学的検査値及び血液生化学的検査値について媒体対照群と各投与群の平均値及び標準偏差を算出し、等分散性の検定(F検定)を行った。等分散の場合はStudentのt検定、不等分散の場合はAspin-Welchの検定を用いて比較し、両側検定で $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計ソフトには、SAS release 8.2(株式会社SASインスティテュートジャパン)を用いた。

iii) 倫理面への配慮

試験は、富山化学工業株式会社が定めた「実験動物使用管理規定」に従って実施した。

■ C. 研究結果

前年度見出されたヒット化合物から合成展開した48化合物のうち、14化合物に $IC_{50} < 1$ nMの抗HIV活性が認められた(表1)。更に、これらの化合物の中で良好なマウス経口吸収性を示した4化合物につき、微生物を用いた変異原性試験及びマウス小核試験並びにhERG電流に及ぼす影響について検討したところ、いずれも陰性であった(表2)。上記の化合物から化合物を選択し(化合物F)、ラットに1日1回2週間反復経口投与したところ、今回検討した最高投与量(10 mg/kg)で毒性所見は認められなかった。

これまでの検討の中で、抗HIV活性を増強する新たな化合物群を、また、これまで見出されている反復投与毒性を改善できる新たな複数の化合物群を見出した。これらの化合物は、新規性並びに進歩性を有する化合物であり特許出願した。

■D. 結論

既存薬の耐性変異ウイルス株に感受性を示す新規な作用機序を有する化合物の合成展開並びに評価を継続してきた結果、強い抗HIV活性に加え、体内動態及び安全性面が改善した化合物を見出した。今後は、投与期間の延長並びに別種の動物を用いた反復投与毒性試験等を行いつつ、候補化合物の評価並びに絞り込みを行っていく予定である。

■E. 健康危険情報

特記事項なし

■F. 研究発表

特に無し

■G. 知的財産権の出願・登録予定

- 1) 特願2010-012557「アリール基を有する複素環化合物」：杉浦 互、藤堂恵介、野村伸彦、淡佐口憲一郎
- 2) 特願2010-012573「アゾール基を有する複素環化合物」：淡佐口憲一郎、野村伸彦、藤堂恵介、河合兵衛、若月智未
- 3) 特願2010-012575「抗HIV活性を有する複素環化合物」：淡佐口憲一郎、野村伸彦、藤堂恵介、林宏美、久保田直子
- 4) 特願2010-012578「アルアルキル基を有する複素環化合物」：淡佐口憲一郎、野村伸彦、藤堂恵介

表1 スクリーニングサンプルの *in vitro* 抗HIV活性内訳

IC ₅₀ (nM)	>1000	100 - 1000	10 - 100	1 - 10	1>
化合物数	4	-	8	22	14

表2 抗HIV活性を示す化合物の特性

	化合物D	化合物E	化合物F	化合物G
抗HIV活性 (IC ₅₀ : nM)	0.33	1.4	0.38	0.62
経口投与時のマウス 血中濃度 (25mg/kg) (1/4/12 hr : ng/mL)	5500 / 5000 / 1300	1640 / 1380 / 630	5600 / 2900 / 840	5500 / 7300 / 2000
遺伝毒性：Ames試験* / マウス小核試験	陰性 / 陰性	陰性 / 陰性	陰性 / 陰性	陰性 / 陰性
hERG電流阻害 (1000nM)	陰性	陰性	陰性	陰性

**Salmonella typhimurium* TA98

分担研究課題



HIV-1 各種変異体を用いた薬剤標的ウイルス蛋白質の解析

研究分担者

足立 昭夫 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

研究協力者

野間口雅子 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授

新しい薬剤標的となり得る HIV-1 アクセサリー蛋白質の機能研究および抗 HIV-1 薬の評価系の確立を目的として、Vif と抗ウイルス細胞因子 APOBEC3G/APOBEC3F との相互作用の解析およびサル発症モデルの確立を目指したサル指向性 HIV-1 の改良を行なった。これらの研究には主として分子遺伝学的手法を用いた。

本年度に得られた主な成果は以下の如くである。(1) 非感染性ウイルス粒子中には全て APOBEC3G あるいは APOBEC3F が存在する。(2) Vif の N 末端側に APOBEC3G、APOBEC3F あるいは両者との結合およびそれらのウイルス粒子からの排除に必須な領域がある。(3) 細胞内 APOBEC3G には結合するが、ウイルス粒子中 APOBEC3G には結合しない Vif 変異体が存在する。また、APOBEC3F の抗ウイルス活性を抑制するが、ウイルス粒子から APOBEC3F を排除しない Vif 変異体が存在する。(4) ウイルス粒子への Vif の取込みは APOBEC3G/APOBEC3F との結合に依存する。(5) 増殖適応変異や構造解析の結果に基づいて構築した新しいサル指向性 HIV-1 (プロトタイプウイルスの Gag-CA、Pol-IN および Env-SU 領域を僅かに改変) は、カニクイザルやアカゲザル細胞株において、SIVmac239 と同等以上に効率良く増殖する。このウイルスの増殖能はカニクイザル個体に持続感染可能な旧版のサル指向性 HIV-1 をはるかに凌ぐ。

これらの成績は、(1) Vif が細胞内あるいはウイルス粒子中の APOBEC3G/APOBEC3F と機能的に結合することが感染性の維持に必須であること、および、(2) ウイルス感染急性期の評価系として HIV-1 サル感染モデルがほぼ完成の域に達していることを示している。

■ A. 研究目的

HIV-1 Vif は自然宿主細胞 (リンパ球およびマクロファージ) でのウイルス複製に必須であり、したがって、エイズ発症にも必須である。新規の抗 HIV-1 創薬研究等に向け、Vif の機能とその責任領域の解明は急務である。本年度は、詳細な変異体解析を行ない、Vif と APOBEC3G/APOBEC3F との相互作用の詳細を明らかにした。

我々が世界に先駆けて構築したプロトタイプサル指向性 HIV-1 (X4 ウイルス NL-DT5R および R5 ウイルス NL-DT5R5-1) は SIVmac239 の *vif* 遺伝子全部と *gag* 遺伝子のごく一部を持つ。NL-DT5R は種々のサル細胞だけでなく、ブタオザルやカニクイザル個体にも感染・増殖した (PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; Rev Med Virol 18: 261-275, 2008; 未発表データ)。しかし、NL-DT5R はサル病原性標準株である SIVmac239 よりサル細胞での

増殖効率が悪く (PNAS 103:16959-16964, 2006)、また、ブタオザルやカニクイザル感染個体でのウイルス血症も一過性であった (J Virol 81:11549-11552, 2007; 未発表データ)。NL-DT5R5-1 も同様にサル細胞での増殖効率が悪かった。本年度は、増殖適応変異や構造解析の結果を駆使して NL-DT5R および NL-DT5R5-1 のゲノムを改変し、SIVmac239 レベルの増殖能を示すウイルスの構築を試みた。

■ B. 研究方法

1. HIV-1 Vif (NL4-3 由来。192 アミノ酸) の点変異体 (主としてアラニン置換) のうち、H9 細胞に対する感染性が減弱あるいは消失したものを用い、主として免疫沈降/ウェスタン法により APOBEC3G/APOBEC3F との結合能を解析した (Microbes Infect 10: 1142-1149, 2008; Microbes Infect 12: 166-171, 2010)。Vif や APOBEC3G/

APOBEC3Fのウイルス粒子への取り込み量も同様に検討した(上記論文参照)。その他の手法は定法に従った。

- 細胞馴化による適応変異と構造解析に基づく試験管内改変とを組み合わせ、サル細胞での増殖能を指標にウイルスゲノムの改良を行なった。標的サル細胞にはカニクイザル由来HSC-F及びアカゲザル由来HSR5.4を使用した。ウイルスゲノムは感染細胞よりPCR法で分子クローンした(PNAS 103:16959-16964, 2006)。その他、種々の分子ウイルス学的及び遺伝子工学的手法は定法に従った。ウイルス蛋白質の構造はコンピューターによる構造モデリングにより予測した(感染症研究所/佐藤裕徳博士らとの共同研究)。
- トランスフェクションとウイルス感染実験には、それぞれ293T細胞とHSC-F細胞およびHSR5.4細胞を用いた。HSC-FおよびHSR5.4細胞の感染実験はIL-2存在下で行なった。トランスフェクションにはリン酸カルシウム法を用いた。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素(RT)活性により測定した。
- ウイルスゲノムのシーケンスはアプライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物実験あるいはヒト材料を用いた実験は行っていない。

■C. 研究結果

- 我々の実験結果および他グループの報告(J Mol Biol 381: 1000-1011, 2008)から、Vifのアミノ酸残基40-44はAPOBEC3G結合領域であり、21-38および55-72はAPOBEC3G/APOBEC3F結合領域であると結論した。同様に、アミノ酸残基11-17および74-79はAPOBEC3F結合領域であることがわかった。これらの解析に用いた感染性に異常のあるVif点変異体は細胞内APOBEC3GあるいはAPOBEC3Fと結合できずウイルス粒子からAPOBEC3GあるいはAPOBEC3Fを排除できない。ただし、変異体Y40AとH43Aはウイルス粒子からAPOBEC3Fを排除しないにもかかわらず、この抗ウイルス活性を充分中和している。また、C末端側変異体のH108Aは細胞内ではAPOBEC3Gと結合するがウイルス粒子内では結合していない。
- プロトタイプサル指向性HIV-1感染サル細胞の長期培養により得られた増殖適応変異(Gag-

CA、Pol-INおよびEnv-SU)とそれらの構造解析等から予測された増殖能向上変異(Gag-CA)を全て持つウイルスを分子構築した(X4ウイルスMN4Rh-3及びR5ウイルスMN5Rh-3)。これらはHSC-F細胞とHSR5.4細胞においてSIVmac239と同等以上に効率良く増殖した。MN4Rh-3はカニクイザルPBMCでも旧版のウイルス(カニクイザル個体に持続感染可能)よりはるかに良く増殖したが、アカゲザルPBMCではほとんど増殖不能であった(京都大学/明里宏文教授らとの共同研究)。

■D. 考察

Vifは抗ウイルス細胞因子APOBEC3蛋白質と結合して分解し、最終的にウイルス粒子中へのこれらの取り込みを著しく抑制する。本研究における詳細な分子遺伝学的解析により、VifのN末端側にAPOBEC3G結合領域、APOBEC3F結合領域およびAPOBEC3G/APOBEC3F結合領域があることが示された。また、VifとこれらのAPOBEC3蛋白質の機能的結合がウイルス感染性の維持に必須であることも明らかにした。Vifの立体構造が解明されれば、これらの結合を阻害する戦略も構築可能となり、創薬に向けた新しい展開が期待できる。

HIV-1の基礎・臨床研究を格段に進展させるためには、SIVやSHIVではなくHIV-1そのものを用いたサル感染・発症モデルが必要である。このシステムが確立できれば、長い間不可能であった(1)HIV-1の病原性発現機構の実験的解析、(2)HIV-1アクセサリ蛋白質の個体内機能の解析、(3)抗HIV-1薬/ワクチンの評価・開発研究などが実施可能となる。本研究で得られたHIV-1の分子クローンMN4Rh-3/MN5Rh-3は極めて有望であると言え、MN4Rh-3のカニクイザル感染実験がまもなく開始される。しかし、アカゲザルの系はまだ確立されておらず、更なるウイルスの改良が必要である。MN4Rh-3はアカゲザルTRIM5 α による抑制を回避できないことが判明したため、これを基にウイルスゲノムを改変する予定である。

■E. 結論

本研究により、HIV-1 VifのN末端側に抗ウイルス細胞因子APOBEC3蛋白質との結合領域が存在することが明確に示され、新しい抗HIV-1薬開発の可能性が提示された。さらに、プロトタイプサル指向性HIV-1より増殖効率等で格段に優れた分子クローンが得られたことで、HIV-1/マカクザル感染システムの確立に向け大きく前進したと考えられる。

■F. 健康危険情報

該当事項なし。

■G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagao, T., Hatcho, K., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region. *Journal of Medical Investigation* 56: 21-25.
2. Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection* 11: 164-171.
3. Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E.E. 2009. Modification of a loop sequence between α -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) *vif* and CA α -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6: 70.
4. Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection* 12: 65-70.
5. Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2010. Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity. *Microbes and Infection* 12: 166-171.
6. Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology*, in press.

2. 学会発表

1. Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E. E. Modification of a loop between α -helices 6 and 7 of virus capsid protein improves human immunodeficiency virus type 1 replication in cynomolgus monkey cells. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 10, 2009, Awaji, Japan.
2. 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 インテグラーゼ(IN) C末端領

域(CTD)における1アミノ酸変異によるウイルス増殖促進機構の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25日、東京.

3. 土肥直哉、野間口雅子、藤原佐知、三宅在子、足立昭夫 サル細胞指向性HIV-1の増殖適応変異の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、東京.
4. 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 HIV-1 Envの1アミノ酸変異による増殖促進機構の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、東京.
5. 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 SIV由来CA h6/7 loopを持つ第2世代サル指向性HIV-1クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する. 第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、東京.
6. 黒石 歩、齊藤 暁、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性HIV-1のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス6-7間のループの重要性. 第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、東京.
7. 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月27日、東京.
8. 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1増殖過程におけるインテグラーゼ(IN) C末端領域(CTD)の影響. 第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月26日、名古屋.
9. 黒石 歩、齊藤 暁、新開泰宏、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性HIV-1のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス6-7間のループの重要性. 第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月26日、名古屋.
10. 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月26日、名古屋.
11. 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞指向性HIV-1の細胞馴化による増殖適応変異の解析. 第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月28日、名古屋.

12. 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 第2世代サル指向性HIV-1クローンはカニタイザル個体において効率よく増殖する. 第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月28日、名古屋.

■H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 新案登録

なし。

研究成果の刊行物に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shou Matsuyama, Ay Aydan, Hirotoka Ode, Masayuki Hata, Wataru Sugiura and Tyuji Hoshino.	Structural and energetic analysis on the complexes of clinically isolated subtype C HIV-1 proteases and approved inhibitors by molecular dynamics simulation.	J.Phys.Chem.B	114	521-530	2010
Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K, Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law M; TAQAS Laboratory Network.	TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories.	J Virol Methods.	Aug;159(2)	185-93	2009
Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F, Tanaka H.	Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA.	BMC Bioinformatics.	Oct 29;10(1)	360	2009
Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W.	HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain.	Proc Natl Acad Sci U S A.	Nov 17;106(46)	19539-44	2009

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hohjoh H, <u>Akari H</u> , Fujiwara Y, Hirai H, Wada K	Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene.	Gene	432	60-66	2009
Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, <u>Akari H</u> , Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T	Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif	Retrovirology	6	1	2009
Iwasaki Y, <u>Akari H</u> , Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N	Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists	Cancer Science	100	778-781	2009
Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, <u>Akari H</u> , Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S	Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms.	Journal of Cellular Physiology	221	458-468	2009
Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, <u>Akari A</u> , Nakayama EE	Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells.	Retrovirology	6	70	2009
<u>Akari H</u> , Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S	Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection.	Microbiology and Immunology	53	53-57	2009

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka H., Chiba H., Inokoshi J., Kuno A., Sugai T., <u>Takahashi A.</u> , Ito Y., Tsunoda M., Suzuki K., Takéaka A., Sekiguchi T., Umeyama H., Hirabayashi J. and Omura S	Mechanism by which the lectin actinohivin blocks HIV infection of target cells.	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	106(37)	15633-15638	2009

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagao, T., Hatcho, K., Doi, N., Fujiwara, S., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region.	J. Med. Invest.	56	21-25	2009
Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, K., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells.	Microbes Infect.	11	164-171	2009
Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., <u>Adachi, A.</u> , Akari, H., and Nakayama, E.E.	Modification of a loop sequence between α -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) <i>vif</i> and CA α -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells.	Retrovirol.	6	70	2009
Jere, A., Fujita, M., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Role of HIV-1 Nef protein for virus replication <i>in vitro</i> .	Microbes Infect.	12	65-70	2010
Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and <u>Adachi, A.</u>	Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity.	Microbes Infect.	12	166-171	2010
Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and <u>Adachi, A.</u>	Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions.	Rev. Med. Virol.		in press	2010

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業
「薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための
新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究」班
総括・分担研究報告書

発行日 2010年3月31日

発行者 主任研究者 杉浦 互

発行所 研究班事務局

独立行政法人国立病院機構

名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部

〒460-0001 名古屋市中区三の丸4丁目1番1号

