

## D. 考察

平成19年度から21年度にかけての解析により我々が開発を進める化合物の作用箇所はHIV複製サイクルの前期過程でpre-initiation complex for transcription (PICT)に作用しているとの結論に至った。このことから本化合物をPICT阻害剤と仮称することとした。まだ、どのタンパクが直接の分子標的であるかは確定していない。現時点における実用化の最有力化合物である化合物T-Y類縁化合物の抗HIV活性についてはレポーター細胞では0.25nM、PBMCでも6.5nMと極めて強く、既存の薬剤との相乗効果も確認されている。既に小動物を用いた毒性試験もクリアしており、次年度はサルを用いたSIV感染モデルでの評価を検討している。新たな抗HIV薬の標的としてAPOBEC3について、その発現分布や、発現機序について詳細な解析を行った。

## E. 結論

現時点における解析結果から、我々が開発を進める化合物をPICT阻害剤とした。また実用化の最有力候補である化合物の最適化に取り組んだ。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

英文

- Shiro Ibe, Yoshiyuki Yokomaku, Teiichiro Shiino, Rie Tanaka, Junko Hattori, Seiichiro Fujisaki, Yasumasa Iwatani, Naoto Mamiya, Makoto Utsumi, Shingo Kato, Motohiro Hamaguchi, and Wataru Sugiura. HIV-2 CRF01\_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. JAIDS in press
- Matsuyama S, Shimizu A, Ode, H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T. Structural and Energetic Analysis on the Complexes of Clinically-isolated Subtype C HIV-1 Proteases and Approved Inhibitors by Molecular Dynamics Simulation. The Journal of Physical Chemistry. 114(1):521-30
- 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. 2009 Aug;159(2):185-93.
- 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. 2009 Oct 29;10(1):360.
- 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. 2009 Nov 17;106(46):19539-44. Epub 2009 Nov 3.
- Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y. Interleukin-4-transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for the screening of antiviral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. J Infect Dis. 2008 Jan 1;197(1):134-41.
- Furuya K, Omura M, Kudo S, Sugiura W, Azuma H. Recognition profiles of microsporidian Encephalitozoon cuniculi polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. Parasite Immunol. 2008 Jan;30(1):13-21.
- Satoh E, Li XK, Hara Y, Ogata K, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima-Fuji N, Satoh T, Miyagi T, Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Arii S, Kimura H. Sensitization to enhanced green fluorescence protein minor histocompatibility antigen by gene transduction into dendritic cells and peritoneal exudate macrophages. Transpl Immunol. 2007 Nov;18(2):73-84.
- S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Sugiura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.:Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. Antiviral Therapy. 13(3):A162, 2008
- Rajintha M Bandaranayake, Moses Prabu-Jeyabalan, Junko Kakizawa, Wataru Sugiura, and Celia Schiffer. :Structural Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF01\_AE Protease in Complex with the Subtype p1-p6.Journal of Virology, 82(13),2008
- H Suzuki, M Fujino, M Matsuda, H Yan, Y Iwatani, W Sugiura.: Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases. Antiviral Therapy. 12(1):S4, 2007
- J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W Sugiura.: Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D. Antiviral Therapy. 12(1):S143, 2007
- Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y.: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs

- and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis.* Jan 1;197(1):134-41, 2008
14. Saeng-Aroon S, Yoshida LM, Ariyoshi K, Taguchi M, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Matsuda M, Kannagi M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W.: An Efficient Tool for Surveying CRF01\_AE HIV Type 1 Resistance in Thailand to Combined Stavudine-Lamivudine-Nevirapine Treatment: Mutagenically Separated PCR Targeting M184I/V. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Dec;23(12):1461-8, 2007
  15. Satoh E, Li XK, Hara Y, Ogata K, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima-Fuji N, Satoh T, Miyagi T, Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Arii S, Kimura H.: Sensitization to enhanced green fluorescence protein minor histocompatibility antigen by gene transduction into dendritic cells and peritoneal exudate macrophages. *Transpl Immunol.* Nov;18(2):73-84, 2007
  16. Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, Rouzina I, Williams MC, Musier-Forsyth K, Levin JG.: Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* 35(21):7096-108, 2007
  17. Seiichiro Fujisaki, Saeko Fujisaki, Shiro Ibe, Tsukasa Asagi, Toshihiro Itoh, Shigeru Yoshida, Takao Koike, Masayasu Oie, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Mami Nagashima, Hiroyuki Gatanaga, Masakazu Matsuda, Mikio Ueda, Aki Masakane, Mami Hata, Yasushi Mizogami, Haruyo Mori, Rumi Minami, Kiyomi Okada, Kanako Watanabe, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Suigura and Tsuguhiro Kaneda.: Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. *Jpn. J.Infect. Dis.*,60:113-117, 2007
  18. Ode H, Matsuyama S, Hata M, Hoshino T, Kakizawa J, Sugiura W.: Mechanism of drug resistance due to N88S in CRF01\_AE HIV-1 protease, analyzed by molecular dynamics simulations. *J Med Chem.* 19;50(8):1768-77. 2007
  19. Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N, Sugiura W.: Use of new T-cell-based cell lines expressing two luciferase reporters for accurately evaluating susceptibility to anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs. *J Clin Microbiol.* 45(2):477-87. 2007
  20. Makiko Hamatake, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Shingo Kato, Wataru Sugiura.: A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-BRNA in plasma. *J Virol Methods.* 142:113-7. 2007
  21. Hiroyuki Gatanaga, Shiro Ibe, Masakazu Matsuda, Shigeru Yoshida, Tsukasa Asagi, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Hiroki Tsukada, Aki Masakane, Haruyo Mori, Noboru Takata, Itsuhiro Nakagiri, Rumi Minami, Masao Tateyama, Takao Koike, Toshihiro Itoh, Mitsunobu Imai, Fumitake Gejyo, Mikio Ueda, Motohiro Hamaguchi, Yoko Kojima, Takuma Shirasaka, Akiro Kimura, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Shinichi Oka, and Wataru Sugiura.: Nationwide Survey of Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Research,* 75(1):75-82. 2007
  22. Afework Kassu, Masayuki Fujino, Masakazu Matsuda, Masako Nishizawa, Fusao Ota, Wataru Sugiura.: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment Naïve Patients in North Ethiopia, *AIDS Research and Human Retroviruses,* 23(4):564-568. 2007
  23. Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigid LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM. Bayesian network analysis of resistance pathways against protease inhibitors. *Infect Genet Evol.* 7(3):382-90, 2007

#### 和文

1. 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄 司、伊藤俊広、吉田 繁、小池隆夫、大家正泰、渡邊香奈子、正兼亜季、上田幹夫、湯永博之、松田昌和、貞升健志、長島真美、岡田清美、近藤真規子、奏 真美、溝上泰司、森 治代、南 留美、白阪琢磨、岡 慎一、杉浦 互、金田次弘: 日本における HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ. *日本エイズ学会誌 (The Journal of AIDS Research)* .9(2):136-146,2007

#### レビュー等:

1. 杉浦 互: HIVの薬剤耐性獲得の分子機構、日本臨床 Vol.6 No1 2009
2. 服部純子、杉浦 互: 薬剤耐性の現状、Pharma Medica Vol.27 No.4 2009
3. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、杉浦 互: 抗HIV療法を受けている患者における薬剤耐性 HIVの現状と問題点、The Journal of AIDS Research Vol.11 No.2 2009
4. 伊部史朗、杉浦 互: HIVの薬剤耐性検査と使い方、治療学 Vol.42 No.5 2008
5. 今井光信、中瀬克己、小島弘敬、加藤真吾、杉浦 互、栗原 健、白阪琢磨: HIV検査および検査体制-技術の進歩と今後の課題-. 第20回 日本エイズ学会 シンポジウム記録. 9(3):202-208,2007

6. 松田昌和、杉浦 互: HIV薬剤耐性検査. モダンメディア別冊53 (11) :319-322, 2007
  7. 西澤雅子、杉浦 互: 薬剤耐性HIVの抱える諸問題: Considerable Issues of Drug Resistance. The Journal of AIDS Research. 9(3):197-201, 2007
  8. 杉浦 互: 抗ウイルス薬耐性獲得のメカニズム-HIV. 月刊薬事. 49(11):31-36, 2007
  9. 岩谷靖雅、杉浦 互: DNAマイクロアレイ法. (増刊号) 臨床と微生物. 34:479-481, 2007
  10. 杉浦 互: 薬剤耐性化と対策. 薬剤耐性化. HIVの耐性化機序. 日本臨床65増刊号2. 487-492, 2007
  11. 杉浦 互: 感染症の治療と薬剤耐性. 生体防御医学辞典. 朝倉書店. 66-71, 2007
  12. 杉浦 互: 薬剤耐性検査の方法と検査時期. 治療. 88, 2006
2. 国際学会
1. Yasumasa Iwatani, D Chan, L Liu, H Yoshii, J Shibata, J Levin, A Gronenborn, and W Sugiura: Structure-guided Mutagenesis of APOBEC3G Reveals Critical Lysine Residues for HIV-1 Vif-mediated Ubiquitination/Degradation. 17th CROI San Francisco, 2010
  2. Takashi Masaoka, T Sawasaki, S Matsunaga, W Sugiura, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, and A Ryo. Novel High-throughput HIV-1 Protease-resistance Phenotypic Assay Using Cell-free Protein Production System. 17th CROI San Francisco, 2010
  3. Shiro Ibe, Y Yokomaku, T Shiino, R Tanaka, J Hattori, S Fujisaki, Y Iwatani, S Kato, M Hamaguchi, and W Sugiura. HIV-2 CRF01\_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. 17th CROI San Francisco, 2010
  4. M Fujino, H Miura, J Hattori, S Ibe, S Fujisaki, M Matsuda, M Nishizawa, Y Iwatani and W Sugiura: Mechanism of darunavir resistance acquisition in multi-protease inhibitor resistant HIV-1, XVIII international HIV Drug Resistance Workshop, June 9-13 2009, Fort Myers, Florida
  5. Junko Shibata, Fengrong Ren, Yasumasa Iwatani, Hsiny Tsang, Masakazu Matsuda, Naoki Hasegawa, Hiroshi Tanaka, and Wataru Sugiura: Within-Host Coevolution of Gag P453L and Protease D30N/N88D Demonstrates virological Advantage in a Highly Protease Inhibitor-Exposed HIV-1 Case, 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov 15-18 2009, Richmond, VA
  6. Iwatani 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov 15-18 2009, Richmond, VA
  7. Masaoka, 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov 15-18 2009, Richmond, VA
  8. S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. XVII International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 10-14, 2008, Barbados, West Indies.
  9. Rajintha Bandaranayake, M Prabu-Jeyablab, J Kakizawa, W Sugiura and C Schiffer.: The Effect of Sequence Polymorphisms on CrF01\_AE Protease Structure. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb. 3-6, 2008, Boston, USA.
  10. S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. XVII International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 10-14, 2007, Barbados, West Indies.
  11. Rajintha Bandaranayake, M Prabu-Jeyablab, J Kakizawa, W Sugiura and C Schiffer.: The Effect of Sequence Polymorphisms on CrF01\_AE Protease Structure. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb. 3-6, 2008, Boston, USA.
  12. H Suzuki, M Fujino, M Matsuda, H Yan, Y Iwatani, W Sugiura: Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases. XVI International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 12-16, 2007, Barbados, West Indies.
  13. J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W Sugiura: Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D. XVI International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 12-16, 2007, Barbados, West Indies.
  14. J Shibata, F Ren, M Nishizawa, H Tsang, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka, W Sugiura: Gag and Protease Interference Affect Acquisition and Selection of Resistance Viruses in Antiretroviral Treatment Failure Case. 8th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov. 11-14, 2007, USA.
  15. Wataru Sugiura: Drug Resistance assays. International Conference on Molecular and Cellular Biology of Therapeutics of HIV and Associated Viral Infections. Jan. 12-14, 2007, Hyderabad, India.
3. 国内学会
1. 伊部 史朗、横幕 能行、服部 純子、間宮 均人、杉浦 互: 東海地域における HIV-2 感染疑い症例の遺伝子学的解析、第 83 回日本感染症

- 学会総会、2009年4月23日～24日、東京
2. 岩谷 靖雅、吉居 廣朗、柴田潤子、杉浦 互：APOBEC3Gのユビキチン化部位と抗レトロウイルス作用、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25日～27日、東京
  3. 星野忠次、藍壇 愛、原田壮一郎、杉浦 互：ウイルス酵素の構造変形に関する系統解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  4. 正岡崇志、梁 明秀、巽 正志、杉浦 互、松永智子、森下 了、澤崎達也、山本直樹：酵素活性を指標とした新規のHIVプロテアーゼ阻害剤耐性検査法の基盤技術の開発、第23回日本エイズ学会学術集会・総会2009年11月26日～28日、名古屋
  5. 柴田潤子、杉浦 互、岩谷靖雅、Hsinyi Tsang、松田昌和、長谷川直樹、任 鳳蓉、田中 博：宿主内HIV-1の共進化変異の解析：Protease阻害剤耐性変異D30N/N88Dとp1/p6切断領域のP453変異の相互干渉の意義、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  6. 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦 互：インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  7. 服部純子、湯永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元康之、福武勝幸、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原 健、小島洋子、中桐、逸博、森 治代、中桐、逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀 成美、杉浦 互：003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  8. 須藤弘二、杉浦 互、加藤真吾：PCR-MS法を用いた新規感染者血漿中の薬剤耐性微小団の定量、23) 重見 麗、服部純子、保坂真澄、伊部史朗、藤崎誠一郎、横幕能行、濱口元洋、内海真、岩谷靖雅、杉浦 互：BEDアッセイを用いた名古屋医療センターにおける新規HIV感染者の動向調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  9. 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦 互：国内感染者集団の大規模塩基配列データから推測されるHIV集団サイズの経時的変化、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  10. 藤崎誠一郎、横幕能行、服部純子、伊部史朗、濱口元洋、岩谷靖雅、杉浦 互：HIV/HBV重複感染者におけるHBV genotype解析および薬剤耐性アミノ酸変異の検出、第23回日本エイズ学会学術集会・総会2009年11月26日～28日、名古屋
  11. 伊部史朗、横幕能行、椎野禎一郎、田中理恵、服部純子、藤崎誠一郎、岩谷靖雅、間宮均人、内海 真、加藤真吾、濱口元洋、杉浦 互：日本におけるHIV-2感染症の分子疫学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  12. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、岩本愛吉、杉浦 互：多剤耐性症例治療を目的とした新規抗HIV薬使用症例に対する緊急全国調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  13. 石川晃一、山本典生、杉浦 互、服部純子、山岡昇司、：ガーナにおける抗レトロウイルス治療（ART）中HIV感染者のウイルス定量と薬剤耐性解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  14. 西澤雅子、Jeffery Johnson, Walid Heneine、山本直樹、杉浦 互：高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微小集族薬剤耐性HIVの検出と依存比率に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  15. 横幕能行、大出裕高、藤崎誠一郎、服部純子、濱口元洋、杉浦 互：HIVプロテアーゼ阻害剤耐性関連変異蓄積症例の薬剤感受性評価に対するVLP ELISA法およびコンピューターシミュレーション法の有用性の検討、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  16. 岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦 互：Vif依存的なAPOBEC3Gのユビキチン化部位と抗ウイルス作用、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  17. 吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦 互：抗HIV-1宿主因子APOBEC3Gファミリーの発現調節に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  18. 杉浦 互：薬剤耐性HIVの現状と課題、第82回日本感染症学会総会2008年4月17日～18日、島根
  19. 岩谷 靖雅、吉居 廣朗、武田 哲、杉浦 互：HIV-1Vif依存的なAPOBEC3Gのユビキチン化サイトの固定、第56回日本ウイルス学会学術集会2008年10月26日～28日、岡山
  20. 吉田 いずみ、任 鳳蓉、柴田 潤子、杉浦 互、岩谷 靖雅、田中 博：HIV-1env遺伝子の多様性進化とその様式に関する解析、第56回日本ウイルス学会学術集会2008年10月26日～28日、岡山
  21. 柴田 潤子、岩谷 靖雅、任 鳳蓉、田中 博、



- 杉浦 互：HIV-1ゲノムRNAにおけるpoly(A)付加部位に関する研究、第56回日本ウイルス学会学術集会2008年10月26日～28日、岡山
22. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、岩本愛吉、杉浦 互：既治療患者における薬剤耐性（多剤耐性）HIVの現状調査、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  23. 巽 正志、梅木優子、竹川奈穂、松田昌和、橋本 修、西澤雅子、石古博昭、杉浦 互、山本直樹：薬剤耐性ウイルスの感染性分子クローンを軸にしたGenotypeとPhenotypeをつなぐ実験解析系、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  24. 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田 哲、杉浦 互：APOBEC3G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回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  25. 柴田潤子、岩谷靖雅、任 鳳蓉、田中 博、杉浦 互：HIV-1ゲノムRNAにおけるpoly(A)付加部位に関する研究、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  26. 大出裕高、横山 勝、佐藤裕徳、伊部史朗、藤崎誠一郎、間宮均人、濱口元洋、杉浦 互、
  27. 横幕能行：HIV-1プロテアーゼにおける耐性変異L89Vの立体的影響、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  28. 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、杉浦 互：HIV-1薬剤耐性変異の感染者集団における固定/消失時間の解析、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  29. 正岡崇志、梁 明秀、巽 正志、杉浦 互、森下 了、澤崎達也、山本直樹：酵素活性を指標とした新規HIVプロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  30. 星野忠次、辰巳絢子、篠原祐子、大出裕高、杉浦 互：コンピュータによる薬剤耐性HIV-1に対する薬効予測の試み、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  31. 横幕能行、大出裕高、間宮均人、濱口元洋、伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、金田次弘、杉浦 互：Enfuviritide (T-20) raltegravir(RAL) darunavir(DRV) etravirine(TMC125)lamivudine (3TC)の多剤高度耐性HIV-1感染症に対する治療効果、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  32. 杉浦 互、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、岡 慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、高田昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日～28日、大阪
  33. 栗原 健、吉野宗宏、佐野俊彦、小島賢一、日笠聡、杉浦 互、白阪琢磨：拠点病院における抗HIV療法と薬剤関連アンケート調査結果（第4報）、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  34. 中里俊文、高村 斉、大出裕高、清水 愛、杉浦 互、星野忠次：L90M変異体に阻害作用をもつ抗HIV薬の設計・合成、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  35. 羽生勇一郎、山本紀生、日吉真照、黒崎直子、石川晃一、松田昌和、岡田誠治、杉浦 互、山本直樹、高久 洋：shRNA, decoy RNA 共発現レンチウイルスベクターによるHIV-1複製阻害効果の検討、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  36. 田中理恵、栗原 健、杉浦 互、加藤真吾：HPLCによるダルナピルの血中濃度測定法の開発、
  37. 岩谷靖雅、杉浦 互：HIV-1 NCとAPOBEC 3 Gの逆転写反応への作用、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  38. 松山 翔、大出裕高、柿澤淳子、杉浦 互、星野忠次：臨床検体由来Subtype C HIV-1 protease の薬剤耐性機構に関する構造化学的研究、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  39. 柿澤淳子、松山 翔、大出裕高、星野忠次、大高泰靖、岩谷靖雅、西澤雅子、Rajintha Bandaranayake、Celia A Sciffer、杉浦 互：CRF01\_AEとサブタイプBのプロテアーゼの構造解析、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  40. 長谷川直紀、杉浦 互、任 鳳蓉、松田昌和、柴田潤子、田中 博：HARRT下における連続サンプルを用いた経時的なHIVの宿主内進化解析、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  41. 柴田潤子、任 鳳蓉、西澤雅子、藤野真之、松田昌和、岩谷靖雅、杉浦 互、田中 博：抗HIV薬剤投与下におけるproteaseとGagの共進化に関する研究、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  42. 吉田いづみ、西澤雅子、藤野真之、仲宗根 正、岩谷靖雅、長谷川直紀、柴田潤子、杉浦 互、任 鳳蓉、田中 博：HIV-1 env 遺伝子の多様性進化、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  43. 近藤真規子、宮崎裕美、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、相楽裕子、岩室紳也、杉浦 互、武部豊、今井光信：日本で流行しているHIV-1サブタイプBのdiversity、第21回日本エイズ学会学術集会、2007.11.28-30、広島
  44. 藤野真之、三浦秀佳、西澤雅子、松田昌和、鈴

木寿子、杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性HIV-1株に対するダルナビルの有効性についての解析. 第21回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

45. 杉浦 互、潟永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真紀子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根 正、巽 正志、椎野禎一郎、岡 慎一、林田庸聡、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口基洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡邊香奈子、白阪琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎: 2003-2006年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向. 第21回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

## H. 知的所有権の出願・取得状況

特願2010-012557：アリール基を有する複素環化合物



## 分担研究課題



# Vif機能を標的とした新規創薬に関する研究 カニクイザルを用いた新規抗HIV薬剤の 評価研究

研究分担者

明里 宏文 京都大学霊長類研究所 教授

Vif蛋白は細胞内A3G/Fをプロテアソーム分解に誘導することにより、A3G/Fのウイルス粒子取り込みを阻害する。ところでVif蛋白はその一定量がウイルス粒子に取り込まれるがその機能的意義は不明であった。我々はHIV-1粒子内Vif蛋白(v-Vif)がGag前駆体と結合することにより、その第一切断部位であるp2/NCにおけるプロセッシングを特異的に制御することでGag中間体(Gag<sup>p33-INT</sup>)を形成すること、この機能はVif N末端11、12アミノ酸残基を含む領域が規定すること、そしてこのGag<sup>p33-INT</sup>がHIV-1感染性を有意に増強することを見出した。この知見は新規な機序による創薬標的として有用な情報と考えられた。

他方、当研究班で開発を進めてきた新規抗HIV-1化合物およびAHについて、これらの臨床応用を目指しカニクイザルを用いた有効性、安全性評価ならびに薬剤動態研究を行なった。本研究の結果、前臨床試験実施のための準備が整ったことから、今後霊長類モデルを用いた感染阻止実験や治療効果評価実験等を行なう予定である。また、これまで困難であったHIV-1に選択性の高い薬剤の前臨床試験実施に向けて、第二世代サル指向性HIV-1を用いたカニクイザル感染実験を行なった。その結果、カニクイザルで良好なHIV-1感染増殖が認められたことから、SIVには無効なHIV-1特異的薬剤の有効性評価試験が本霊長類モデルにより可能となったものと判断された。今後、本研究を含む抗HIV-1薬剤開発における臨床試験への「橋渡し研究」がこれまでと比較し格段に迅速化されるものと期待される。

## ■ A. 研究目的

### 1. Vifを標的とした新規創薬に関する研究

本研究班開発グループにおいて、低分子化合物ライブラリースクリーニングにより抗HIV阻害活性を有する化合物探索が進行中である。この中よりVifをターゲットとした化合物を同定するにあたり、その作用機序を明らかにすることが求められる。ApoBec3G/3F (A3G/F) は生体内におけるHIV標的細胞であるCD4陽性T細胞で発現しウイルス粒子に取り込まれることで抗HIV作用を有しており、Vif蛋白はこのA3G/F粒子取り込みを阻害することでHIV-1感染性を維持する。一方Vif蛋白は感染性HIV-1粒子あたり30-100分子程度取り込まれることが知られているが、その機能的意義は不明であった。そこで我々はこのHIV-1粒子内Vif蛋白(v-Vif)に着目しその分子機構を解明することにより新たな創薬標的の開発を目指した。

### 2. カニクイザルを用いた新規抗HIV-1薬剤の評価研究

本研究班開発グループにおけるこれまでの抗HIV-1阻害活性を有する化合物探索の結果、その有効性が明らかな候補化合物が見出された。またそれと平行して、HIV-1 Env蛋白の糖鎖に結合することによりHIV-1感染を協力に阻害するアクチノヒピン(AH)二量体の開発が進んでいる。これらの*in vitro*における有効性ならびに小動物を用いた安全性や薬物動態については昨年度及び今年度の他の分担研究者により確認されている(分担研究者の報告書を参照)。そこでこれら薬剤の臨床応用を目指し、本研究ではカニクイザルを用いた有効性、安全性評価ならびに薬剤動態研究を行なった。ところで、更なる探索により想定される、HIV-1特異的かつオルソログであるサル免疫不全ウイルス(SIV)には無効な新規化合物はこれまでサルエイズモデルでは評価できないといった問題があった。そこで本研究では



サル指向性HIV-1を用いたカニクイザル感染実験を行ない、果たしてHIV-1特異的薬剤がサル類により評価可能となりうるかを検討した。

## ■B. 研究方法

1. HIV-1 VifおよびGag p2/NC cleavage欠失変異体 pNL43-CA2.Vif(-)を基に、HIV-1 Vif、Envと Gag p2/NC cleavage機能の欠失、さらにNef領域に luciferase 遺伝子を導入した変異体 pNL43-CA2.Vif(-)Env(-)-Lucを構築した。VSV-G発現ベクターは pCMV-G、A3G/F発現ベクターは pcDNA3.1-A3G、pcDNA-A3F-V5HRPをそれぞれ用いた。Vif発現ベクターである pNL-A1を基に、Vif N末端側にアラニンへの置換変異を導入した。これらを293T細胞に遺伝子導入し、得られたウイルスについて標的細胞に感染24時間後のルシフェラーゼ活性を測定することにより感染価を定量した。同時に遺伝子導入した細胞におけるウイルス蛋白の発現をウエスタンブロット法により解析した。
2. 2種類の新規抗HIV-1化合物 (T-41655、T-41668) について、健康なカニクイザル (雄、2歳齢) 2頭に30mg/kgで経口投与を行なった。その後経時的に採血を行ない、臨床的变化について観察を行なうとともに、血液細胞数、血清生化学値 (AST、ALT、ALP、LDH、TG、CK、BUN、Creatinine、Chol、A/G) および血中薬物濃度について測定を行なった。  
SIVmac (アカゲザル由来免疫不全ウイルス; 1000TCID<sub>50</sub>) を2頭のカニクイザル (雄、2歳齢) の直腸にバルーンカテーテルを用いて接種した。その後経時的に採血を行ない、血中ウイルス値をreal-time PCR法にて、血中CD4陽性T細胞数をFACSにてそれぞれ解析を行なった。  
第2世代サル指向性HIV-1であるMN4-5Sに関して、接種実験用ウイルスストックをカニクイザル由来CD8(-) PBMCへの感染実験により得た。カニクイザルへのウイルス接種及び採血は、ケタミン麻酔下で行った。plasma viral RNAをリアルタイムRT-PCR法により血中CD4陽性T細胞数をFACSにてそれぞれ解析を行なった。

### (倫理面への配慮)

医薬基盤研究所および国立感染症研究所の動物実験倫理規定に従い、動物実験委員会の承認を受けて実施した。

## ■C. 研究結果

1. 過剰量のVif蛋白をウイルス粒子内にパッケージさせると、用量依存性にGag p2/NCプロセッシングを特異的に抑制することでウイルス成熟過程を阻害し、その結果としてHIV-1の感染性を抑制する。他方、感染性HIV-1粒子を解析すると少量のVif蛋白が常に存在する。従って、v-VifにはHIV-1ライフサイクルにおいて何らかの生理的意義があることが予想される。我々はこれまでHIV-1粒子内Vif蛋白 (v-Vif) に着目し解析を行なって来た。その結果、v-Vifがウイルス粒子コア内に特異的に取り込まれ、Gag前駆体の第一切断部位 (p2/NC) におけるプロセッシングを特異的に制御することでGag中間体 (Gag<sup>p33-INT</sup>) を形成すること、過剰量のGag<sup>p33-INT</sup>により未成熟型の非感染性HIV-1を生じること、またアミノ酸置換変異による検討により本機能はVif N末端11、12アミノ酸残基 (Trp11、Gln12) を含む領域が規定することが示された。これらのことから、v-VifにはHIV-1ライフサイクルにおいて何らかの生理的意義があることが想定される。さらに我々の予備的データでは、v-Vif機能はHIV-1のみならずHIV-2、SIVでも保持していることが示唆されたことから、霊長類エイズウイルス共通の本質的機能であると考えられる。そこで我々はv-Vifにより産生されるGag<sup>p33-INT</sup>に機能的意義があるとの仮説に基づき、Vif非存在下で少量のGag<sup>p33-INT</sup>を有するHIV粒子の感染性を解析した。その結果、Vif依存性細胞であるH9細胞およびHIV-1自然宿主細胞であるPBMCにおいて有為な感染性増強効果が認められた。以上の結果より、v-VifはGag<sup>p33-INT</sup>を形成することによりHIV-1感染性を増強することが明らかとなった。
2. 本研究班開発グループにおける探索の結果見出された新規化合物を基に、その細胞毒性と抗ウイルス活性を高めた2種類の誘導体について、その単回投与による短期毒性と薬物動態をカニクイザルを用いて検証した。2種類の化合物 (T-41655、T-41668) について、カニクイザル2頭へ経口投与し投与24時間後まで経時的に血液を採取し検討した。その結果、血液細胞数や血清生化学値に有為な変動は認められなかった。また薬物投与による臨床的な影響は特に見られなかった。  
AHは田中らが発見、開発した高マンノース型糖鎖結合性レクチンであり、高マンノース型糖

鎖修飾蛋白である HIV-1 Env に強い親和性を示すことにより HIV-1 のリセプターへの結合を阻害する。また二量体化 AH はその親和性、*in vitro* における HIV-1 感染阻害活性が共に格段に向上することを見出した（本研究班の他の報告書を参照）。従って AH は HIV-1 感染予防薬（microbicide）としての臨床応用が期待される。そこで HIV-1 の主要感染ルートである経粘膜感染における AH の感染阻害活性を検討するため、本研究ではその評価系としてのサルモデル確立を目指した。HIV-1 と同様に AH により感染が阻害されることを確認した SIVmac をを2頭のカニクイザル（雄、2歳齢）の直腸にバルーンカテーテルを用いて接種した。その後経時的な血中ウイルス値および CD4 陽性 T 細胞数を測定中である。

本研究班では、上述の新規化合物に加え、異なる機序で HIV-1 感染を阻害する化合物の探索を進めている。この際、HIV-1 特異的かつオルソログであるサル免疫不全ウイルス（SIV）には無効な新規化合物に関しては、これまでサルエイズモデルでは評価できないといった問題があった。そこで本研究では、果たして HIV-1 特異的薬剤がサル類により評価可能となりうるかを検討する目的で、足立らのグループが初めて報告した（PNAS、2006）サル指向性 HIV-1（monkey-tropic HIV-1; HIV-1mt）DT-5R と比較してサル細胞における感染複製能が向上した第二世代 HIV-1mt である MN4-5S クローン（本研究班の他の報告書を参照）を用いてカニクイザル感染実験を行なった。カニクイザル3頭に 10ng p27 Core 相当のウイルスを経静脈にて接種し、その後のウイルス動態を解析した。その結果、すべてのサル個体において MN4-5S ウイルスの増殖が確認され、感染2週後で  $10^4$  copies/ml 以上のウイルス RNA が検出された。また同じく感染2週後に、感染ザルにおける CD4 陽性 T 細胞数の一過性減少が認められた。

#### ■ D. 考察

1. 本研究では、HIV-1 ライフサイクルにおける v-Vif の意義について解析を行ない、v-Vif が形成誘導する生理的レベルの Gag<sup>p33-INT</sup> が HIV-1 感染性を有意に増強することを新たに見出した。従って、Vif は本作用と抗 apobec 作用の両方によって HIV-1 感染性増強に寄与していると考えられた。ところで今回の Vif 変異体解析において、Vif N 末端側 Trp11 および Gln12 が Gag<sup>p33-INT</sup> 形成

を規定する領域であることが示された。この領域は、pol における integrase 遺伝子領域と重複（1 frame-shift）していること、各種 HIV-1 サブタイプ間で非常に良く保存されていること、HIV-1 のみならず HIV-2、SIV でも同様な機能が保持されていることを併せて考えると、この v-Vif 機能は霊長類エイズウイルスの本質的な役割を担っていることが示唆された。これらの知見は Vif 機能を標的とした新規な機序による抗 HIV 薬剤開発において、その分子機序を明確に出来た点で有意義な知見であると考えられた。

2. 新規抗 HIV-1 化合物（T-41655、T-41668）は昨年度の小動物における結果と同様に良好な体内動態を示し、また少なくとも今回の単回投与と実験ではカニクイザルに与える副作用等は認められなかった。今後は、中長期連続投与による安全性の検討とともに、カニクイザル/SIVmac もしくは HIV-1mt による霊長類モデルを用いた感染阻止実験や治療効果評価実験等を行なう予定である。一方 AH は、特に二量体化により高い抗 HIV-1 活性を示すことが明らかとなっている。HIV-1 の主要感染ルートである経粘膜感染を阻害出来る HIV-1 感染予防薬（microbicide）はまだ実用化されていないことから、AH の臨床応用が期待される。今回の検討により経直腸による感染条件設定が確立した後は、カニクイザル/SIVmac 霊長類モデルを用いた感染阻止実験を行なう予定である。今回の検討により、第二世代 HIV-1mt である MN4-5S クローンがカニクイザル接種で良好に増殖することが示された。ピーク時での血中ウイルス量（感染2週後で  $10^4$  copies/ml 以上）は、ウイルス定量系の検出限界（ $10^2$  copies/ml）を考慮すれば充分薬剤による抗ウイルス効果を判定できるものと考えられる。現在、さらに第3世代 HIV-1mt 開発がほぼ完了し、カニクイザルへの接種実験を開始するところであるが、更なるウイルス増殖効率の向上が期待される場所である。以上のことから、SIV には無効な HIV-1 特異的薬剤の前臨床試験（有効性評価試験）は本霊長類モデルにより可能となったものと判断された。

#### ■ E. 結論

本研究では、HIV-1 粒子内 Vif 蛋白（v-Vif）による HIV-1 感染増強効果に係る分子機構を明らかにした。この知見は新規な機序による創薬標的として有



用な情報と考えられた。一方、当研究班で開発を進めてきた新規抗HIV-1化合物およびAHについて、本研究により前臨床試験実施のための準備が整った。今後霊長類モデルを用いた感染阻止実験や治療効果評価実験等を行なう予定である。さらに今回新たに確立されたサル指向性HIV-1/霊長類モデルにより、これまで困難であったHIV-1に選択性の高い薬剤の前臨床試験が可能となった。今後、本研究を含む抗HIV-1薬剤開発における臨床試験への「橋渡し研究」がこれまでと比較し格段に迅速化されるものと期待される。

## ■ F. 健康危険情報

特になし

## ■ G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Hohjoh H, Akari H, 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, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T: Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. **Retrovirology** 6, 1, 2009.
- Akari H, Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S: Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. **Microbiology and Immunology** 53, 53-57, 2009.
- Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -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, Akari H, 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, Akari A, 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.
- Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S: Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. **Blood** 111, 243-250, 2008.
- Sato H, Leo N, Katakai Y, Takano J, Akari H, Nakamura S, Ueno Y: Prevalence and molecular phylogenetic characterization of *Trypanosoma* (Megatrypanum) minasense in the peripheral blood of small neotropical primates (*Saimiri sciureus* and *Saguinus midas*) after a quarantine period. **Journal of Parasitology** 94, 1128-1138, 2008.
- Kawada M, Tsukamoto T, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T: Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based viral containment in a macaque AIDS model. **Journal of Virology** 82, 10199-10206, 2008.
- Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H, Ishida T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. **Immunogenetics** 60, 727-735, 2008.
- Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee Y-J, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H: GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. **Microbes and Infection** 9, 515-521, 2007.
- Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K, Mukai R. Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. **Virus Genes** 35, 281-288, 2007.
- Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen Y, Lee Y-J, Unno N, Nishina K, Iwasaki Y, Maki N, Mizusawa H, Akari H: Efficient regulation of viral replication by systemically administered siRNA with cationic liposome in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 361, 294-300, 2007.

### 2. 学会発表

- 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回ウイルス学会(東京)平成21年10月25-27日
2. 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、明里宏文 第2世代サル指向性HIV-1クローンはカニクイザル個体において効率良く増殖する 第23回日本エイズ学会学術集会(名古屋)平成21年11月26-28日
  3. Lee Y-J, Abudu A, Iijima S, Iwasaki Y, Strebel K, Akari H: HIV-1 Vif Protein Packaged in Virions Augments Viral Infectivity by a Novel Mechanism: Implication of p33 Gag Intermediate. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, May 2008 (ポスター発表)
  4. 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、海津雅彦、明里宏文 マカクザル感染性新規HIV-1クローンの解析 第146回日本獣医学会学術集会(宮崎)平成20年9月24日
  5. 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、海津雅彦、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 サルPBMCおよびサル個体内における新規サル細胞指向性HIV-1クローンの増殖 第56回日本ウイルス学会学術集会(岡山)平成20年10月26日
  6. 飯島沙幸、李永仲、明里宏文 HIV-1 NefのMHC-I発現抑制機能: AP-1A mu subunitとの相互作用と機能発現 第22回日本エイズ学会学術集会(大阪)平成20年11月26日
  7. 海津雅彦、齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 サルPBMCおよびサル個体内における新規サル細胞指向性HIV-1クローンの増殖 第22回日本エイズ学会学術集会(大阪)平成20年11月26日
  8. 明里宏文、李永仲、飯島沙幸、アブドアルキン HIV-1粒子内Vif蛋白の生理的機能に関する解析 第21回日本エイズ学会学術集会、平成19年11月

## ■ H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし





## 分担研究課題



# 抗HIVタンパク質アクチノヒビンの高活性化と抗HIV/AIDS薬としての開発研究

研究分担者

田中 晴雄 いわき明星大学薬学部 教授

抗HIVタンパク質アクチノヒビン(AH)は、114アミノ酸残基で構成され、分子内に3つの糖鎖結合ポケットを持つレクチンである。AHは、HIVエンベロープタンパク質gp120の高マンノース型糖鎖(HM)と結合することで、HIVの細胞への接着・侵入を低濃度( $IC_{50}=2-110$  nM)で阻止する。AHは、gp120のように多数のHMを持つ糖タンパク質にのみ強い親和性を示すことから、選択性の優れた薬剤として期待できる。AHの抗HIV活性はgp120上の糖鎖数に依存する傾向が見られ、低糖鎖数株(AH非感受性株)に対する活性は弱い。AH誘導体(His-TEV-AHdimer/RTB-L、AH2量体)は、天然型AHと比べ20倍強い合胞体形成阻害活性を示し、天然型AH非感受性株の克服にも成功した。また、これらの高活性AH誘導体は各種薬剤耐性HIV株に対しても強い抗HIV活性を示すことが明らかとなっている。

高活性AH誘導体の臨床応用を目的とし、(1)AH誘導体を大量生産するため生産宿主の検討を行った。そして、酵母にてAH誘導体を生産できることを見出した。(2)AH誘導体の精製方法を再検討した。これまでは、AH誘導体を宿主の菌体内で発現させ、宿主細胞の破碎後、グアニジン塩酸存在下Niカラムで精製し、ODSカラムでグアニジン塩酸を除去させていた。しかし、この方法では試料の収率が5割程度であり、AH2量体の活性上昇も天然型AHの5~20倍とぶれが大きく再現性が低い。そこで、グアニジン塩酸除去法をODSカラム法から、30%アセトニトリル/1mM HClを用いた透析法に変更したところ、収率が8割程に改善され、天然型AHと比べ、常に20倍強い合胞体形成阻害活性を示すことが確認できた。(3)天然型AH及びAH誘導体の安全性試験を行った。代表的なレクチンであるコンカナバリンA、フィトヘマグルチニン及びHIV感染予防薬として開発が進められているシアノピリン-Nでは強いミトジェン活性が認められたが、天然型AH及びAH誘導体では高濃度でも見られないことを確認した。また、ウサギの膣に対する安全性を調べた結果、天然型AHでは1mg/ml、AH誘導体では、10 mg/mlでも炎症効果などの副作用は認められなかった。(4)血中半減期延長及び免疫原性低下を目的として、AHを化学修飾(ポリエチレングリコール化; PEG化及びスチレン・マレエート化; SMA化)した結果、活性が保持されたPEG化AH及びSMA化AHを得た。(5)AHのX線結晶構造解析の結果、AHの立体構造が明らかとなり、AHの3つの糖鎖結合ポケットとそれを維持する立体的な構成を明示することができた。これによりAHのHIVとの結合の選択性の解明並びにさらなる改良の基盤が確立された。

## ■ A. 研究目的

新属新種の放線菌 *Longispora albida* が生産するアクチノヒビン(AH、図1)は、HIVgp120の高マンノース型糖鎖(HM)と結合することにより、HIVの細胞への接着・侵入を阻害し、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤耐性株を含む臨床分離HIV株に対して、強い抗HIV活性を示すことが明らかになっている。

AHは114アミノ酸残基で構成されるマンノース結

合レクチンの一種であり、分子内に38アミノ酸残基で構成される3つのセグメント(糖鎖結合ポケット)を持つ。それらが3つ葉のクローバー様に配置されている。AHのポケット1つと糖鎖1本の親和性は弱いものであるが、多くのHMを持つgp120に対する親和性は非常に強い。これは、AH1分子がgp120上のHM3本を捕らえることで、いわゆるレクチンのクラスター効果が働き、gp120への親和性が相乗的に高まることによると考えられる。そして、gp120

と強く結合することで、強力な抗 HIV 活性を示すと考えられている。AH は gp120 のように多数の HM を持つ糖タンパク質のみに作用することから、gp120 に対する選択性が非常に優れており、副作用の少ない薬剤として期待できる。また、HIV 感染予防薬として期待されているシアノピリン-N(CV-N) は HM 1 本のみでも強い親和性を示すため、CV-N より AH の方が選択性において遥かに優れていると考えられる。

AH の抗 HIV 活性は、gp120 上の糖鎖数に依存する傾向が見られ、低糖鎖数株 (AH 非感受性株) に対する AH の抗 HIV 活性は弱い。AH を 2 量体 (His-TEV-AH dimer/RTB-L、図 2) とすることにより、抗 HIV 活性を 2~20 倍上昇させ、AH 非感受性株 (1 株の例外を除いて) を克服することに成功した (表 1)。

本研究では、His-TEV-AH dimer/RTB-L を HIV 感

染予防薬として開発するため、(1) AH 誘導体の生産宿主の検討、(2) 大量調製系確立、(3) 安全性試験及び (4) AH の化学修飾による血中投与可能な HIV/AIDS 治療薬開発の検討を行った。さらに、(5) 長年成功しなかった AH の結晶化に成功したので結晶構造解析結果を併せて報告する (図 7、8)。

## B. 研究方法

### < AH 誘導体生産系に関する検討 >

天然型 AH 及び AH 誘導体遺伝子を PCR で増幅し、酵母発現ベクター pPICZ-B に連結した。このプラスミドで *Pichia pastoris* KM71H 株を形質転換し、各種 AH 発現酵母株を作成した。

### < AH 誘導体の大量調製系確立に関する検討 >

AH 誘導体発現宿主細胞を超音波又はフレンチブ

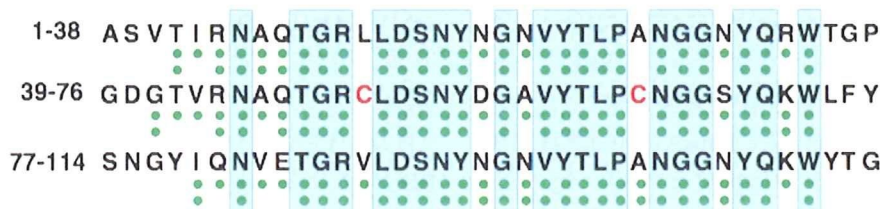


図 1 AH のアミノ酸配列

Protein	Structure	IC <sub>50</sub> (nM) (fold)
His-TEV-AH	His tag - TEV*1 - Segment 1 - Segment 2 - Segment 3	127 (1.0)
His-TEV-AH dimer /RTB-L	His tag - TEV*1 - Segment 1 - RTB*2 - Segment 2 - Segment 3 -Q-K-W-L-P-T-N-N-T-Q-P-F-V-T-T-I-R-N-A-	7 (18.6)
Recombinant AH	Segment 1 - Segment 2 - Segment 3	113 (1.0)
AH dimer/RTB-L	Segment 1 - RTB*2 - Segment 2 - Segment 3	14 (8.9)

\*1TEV : TEV protease recognition sequence

\*2RTB : residues 132-143 of ricin B chain

図 2 AH 及び AH 二量体の模式図とそれらの合胞体形成阻害活性

表 1 His-TEV-AH dimer/RTB-L の臨床分離 HIV 株に対する抗 HIV 活性

HIV strain	IC <sub>50</sub> (nM)		fold	number of N-glycosilation
	AH	His-TEV-AH dimer/RTB-L		
37	>10000	>1000	-	14
307	620	35	18	15
36	>10000	4	>2500	16
Bal	34	4	8	17
214	44	6	8	17
251	23	7	3	17
NL	34	2	16	18
182	30	9	3	18
242	140	76	2	19
158	10	2	5	20



レスで破碎後、菌抽出液を遠心分離した。不溶性画分をグアニジン塩酸で可溶化し、Niカラムで精製した。Niカラム溶出液のpHを7~8に調整し、10 mM DTTを加え42℃で2時間保温した。その後、42℃にて、30%アセトニトリル/1mM HClで透析し、不要な塩類を除いた。透析終了後、凍結乾燥して白色粉末を得た。白色粉末を1mM HClに溶解させ、HIVの接着・侵入の過程をモデル化した合胞体形成系を用いて活性を評価した。

<安全性試験>

- (1) マイトジェン活性化試験：ヒトPBMCを無血清RPMI培地で懸濁し、各試料存在下、96穴プレートに5×10<sup>5</sup> cells/100 μlずつ蒔いた。42時間培養し、<sup>3</sup>H-チミジンを加えさらに6時間培養し、シンチレーションカウンターにより細胞のラジオアクティビティーを測定した。また、顕微鏡にて細胞塊を観察した。
- (2) ウサギの臍に対する安全性試験：実験には約1.8 kgの雌性日本白色ウサギ（日本SLC）を使用した。1週間の予備飼育後実験に供した。AHは0.5% carboxymethylcellulose(CMC)溶液に懸濁後、ソニケーション処理により均一化した。

投与は、イソフラン吸入麻酔下にウサギを固定し、ソフトゾンデで臍口から約10 cmの深さに挿入して行った。各濃度のAH溶液1.0 mlを10日間連続投与した。飼料および飲水は自由摂取とした。

投与終了後、ウサギは吸入麻酔下に頸部皮膚を切開し頸動脈を露出し、放血致死した。腹部を正中線に沿って切開し、臍、子宮を摘出した。摘出した組織は10%中性緩衝ホルマリン液に浸して固定した。定法に従いパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色し組織標本を作製した。尚、動物実験はいわき明星大学実験動物倫理規定に従って行われた。

<AHの化学修飾>

[ポリエチレングリコール(PEG)化]

PEG化反応液 (100 mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)、20 mM水素化ホウ酸ナトリウム、12.3 mM AH、12.3 mM10 kDa/20 kDa m-PEG aldehyde、30%アセトニトリル)を25℃で6時間インキュベートした。反応液をODSカラム及びゲル濾過でPEG化AHを精製した。AH及びPEG化AHの合胞体形成阻害活性を比較し、PEG化による活性への影響を検討した。

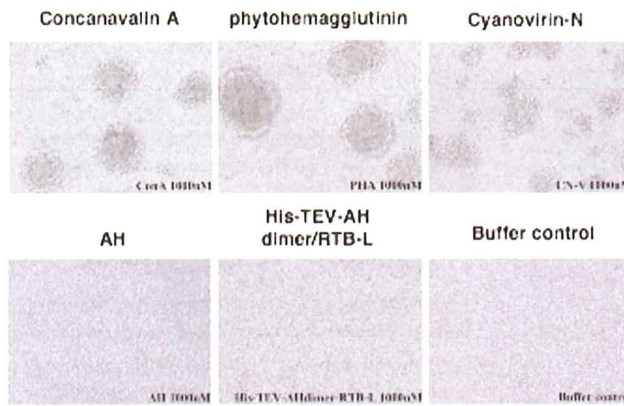


図3 AH及び種々レクチンによる細胞凝集塊の顕微鏡観察

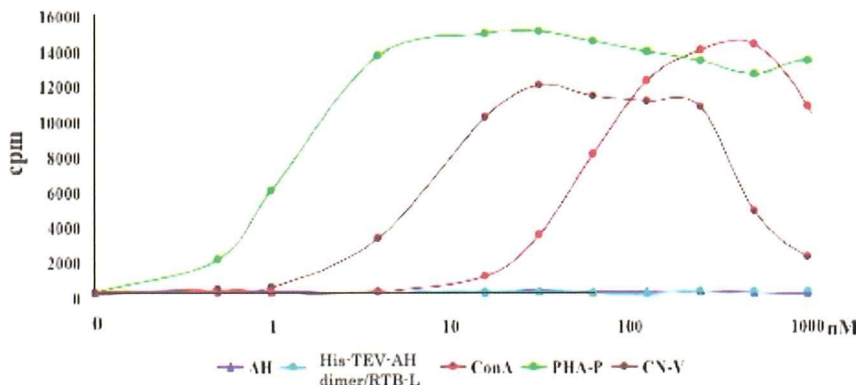


図4 AH及び種々レクチンによる<sup>3</sup>H-チミジン取り込み量の計測



### [スチレン-無水マレイン酸共重合 (SMA) 化]

AHを0.8 M NaHCO<sub>3</sub>、pH 8.1に溶解後、等量のSMAを添加し攪拌しながら一晩反応した。その反応液を限外濾過し高濃度まで濃縮した。再度、濃縮液にSMAを5回に分けて添加し、一晩反応させた。さらに、反応液から未反応SMAを除去するため透析し、ゲルろ過クロマトグラフィーでSMA修飾AHを精製した。得られたSMA化誘導体の活性を合胞体形成系を用いて評価した。

### <AHの結晶化>

AHの単結晶は数ヶ月で得られた。結晶構造を単波長不規則散乱法によって決定した。

## ■C/D. 研究結果と考察

### <AH誘導体の生産宿主及び大量調製系確立に関する検討>

既存のAH生産系として、天然型AHは放線菌で、AH誘導体はHis Tagとの融合タンパク質として大腸菌で生産する系が存在する。大腸菌においてはHis-TEV-AH dimer/RTB-Lをはじめとする種々の誘導体の調製が簡便かつ迅速にできるが、大腸菌を宿主として調製した試料には、LPSが混入している恐れがあるため、医薬品としての活用は難しい。そこで、医薬品用の生産系として酵母における発現系の確立を検討した。その結果、酵母由来のAH誘導体は大腸菌由来AH誘導体と同等の活性を示し、酵母においてもAH誘導体を調製できることを確認した。AH誘導体の生産量は20~30 mg/l / cultureと見積もられ、大腸菌における生産量(~80mg/l / culture)を下回っていた。今後は、生産量向上を目的とした、培養条件の改良(培地組成や培養温度)を検討する予定である。

以上のことから、*in vitro*の各種試験に用いる試料は大腸菌生産系にて迅速に調製し、選別された優良品は、酵母生産系を用いて調製し、*in vivo*での各種試験に供することとした。

高活性を示すHis-TEV-AH dimer/RTB-Lは大腸菌或いは酵母の菌体内で不溶性タンパク質として発現される。従って、不溶性画分をグアニジン塩酸で可溶化させ、グアニジン塩酸存在下Niカラムで精製し、ODSカラムでグアニジン塩酸を除去することで、His-TEV-AH dimer/RTB-Lを取得していた。しかし、この方法では、ODSカラムでの脱塩時にHis-TEV-AH dimer/RTB-Lの回収率は、50%以下となり、大量調製は不向きであることがわかった。また、合胞体形成阻害活性も天然型AHと比べ5~20倍の上昇と

なり再現性が低い。原因として、タンパク質発現時のS-S結合に由来するinclusion body及びNiカラムでの精製後、グアニジン塩酸除去時に起こるリフォールディングの不具合が考えられた。そこで、Niカラム溶出液にジチオスレートを加えて、S-S結合を切断し、また、30%アセトニトリル/1mM HClを用いた透析法でグアニジン塩酸の除去によるリフォールディングを行った結果、His-TEV-AH dimer/RTB-Lの収率が8~9割程にまで改善され、天然型AHと比べて常に20倍程強い合胞体形成阻害活性を示すことが確認された。以上のようにして、His-TEV-AH dimer/RTB-Lの再現性のある大量調製法が確立された。また、今後His-TEV-AH dimer/RTB-Lをはじめとする種々のAH誘導体を調製する場合、宿主によってはinclusion body及び精製方法が問題となるが、上記調製法を用いることで、いずれの宿主で発現させた場合でも、効率良く正確な試料が調製できると考えられる。

### <安全性試験>

コンカナバリンA(Con A)やフィトヘマグルチニン(PHA)をはじめとする糖鎖結合性タンパク質は、マイトジェン活性を示すことが知られている。また、HIV感染予防薬として開発が進められているシアノピリン-N(CV-N)は、AH同様HIVgp120の高マンノース型糖鎖に結合し、強い抗HIV活性を示すが、マイトジェン活性を有することが報告されており、医薬品としての開発が困難であると考えられる。そこで、AHにおいてもマイトジェン活性が見られるかどうかを検討した。その結果、ConA、PHA及びCV-Nでは1.0 μMにおいて顕著な細胞凝集塊が観察された(図3)。また、シンチレーションカウンターにて、<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量の増大も計測された。一方、AH及びHis-TEV-AH dimer/RTB-Lでは、1.0 μMでも凝集塊と<sup>3</sup>H-チミジン取り込み量の増大は観察されず(図4)、AHはマイトジェン活性を示さないと考えられた。

また、ウサギ膣に対する安全性試験に関して、摘出した膣並びに子宮についての外部観察及び投与部位に近い膣外陰部側についての組織標本の観察を行った(図5)。膣/子宮の外部観察では、無処置正常群でわずかに肥厚が観察されたが、他のいずれの群でも炎症反応を示す腫脹、発赤、充血・肥厚、紅斑は観察されなかった。組織標本観察では、多くの例に共通した所見として、膣腔内に好塩基性の顆粒状結晶物質が見られ、一部は粘膜表面に付着するように認められた。膣実質では、炎症性細胞浸潤と粘膜上皮の重層化が主な所見であった。炎症性細胞浸潤

は粘膜固有層～粘膜下組織（組織学的には両者の境界は不明瞭）において瀰漫性に観察され、リンパ球ないし形質細胞が主体の偽好酸球も見られた。さらに、多数の例において粘膜上皮内（上皮細胞間）にも炎症性細胞浸潤が認められた。これら一連の炎症性細胞浸潤は、AH 0.3、1 mg/ml投与群、無処置正常群で軽度～中等度に認められたが、AH 0.1mg/ml投与群ではごく僅かしか観察されなかった。子宮側と外陰部側の2か所の標本を比べると、外陰部側の病変がやや目立つ傾向にあったため、組織観察は外陰部側について行った。無処置正常群、vehicleである0.5% CMC単独投与群、AH 0.1、0.3、1 mg/ml投与群のいずれにおいても軽度～中等度の炎症性細胞浸潤、粘膜上皮重層化、水腫性変化が認められた。ま

た、外部観察では著明な炎症は観察されなかった。以上の結果より、AHを投与していない無処置正常群、0.5% CMC単独投与群でもこのような結果が得られたことから、これらの炎症様反応はウサギ膣では常在的なものであり、AH投与による影響ではないことが示唆される。

His-TEV-AH dimer/RTB-L 10 mg/ml投与群の子宮頸部は(図6)、移行上皮あるいは粘膜上皮内の炎症性細胞浸潤が観察された。ごく一部の例では、リンパ球集簇巣も観察された。しかし、いずれも軽微であり、0.5% CMC投与群でも観察されたので、特定の試験群に目立つことはなく、性周期に伴う粘膜の生理変化の範疇の組織像だと判断された。

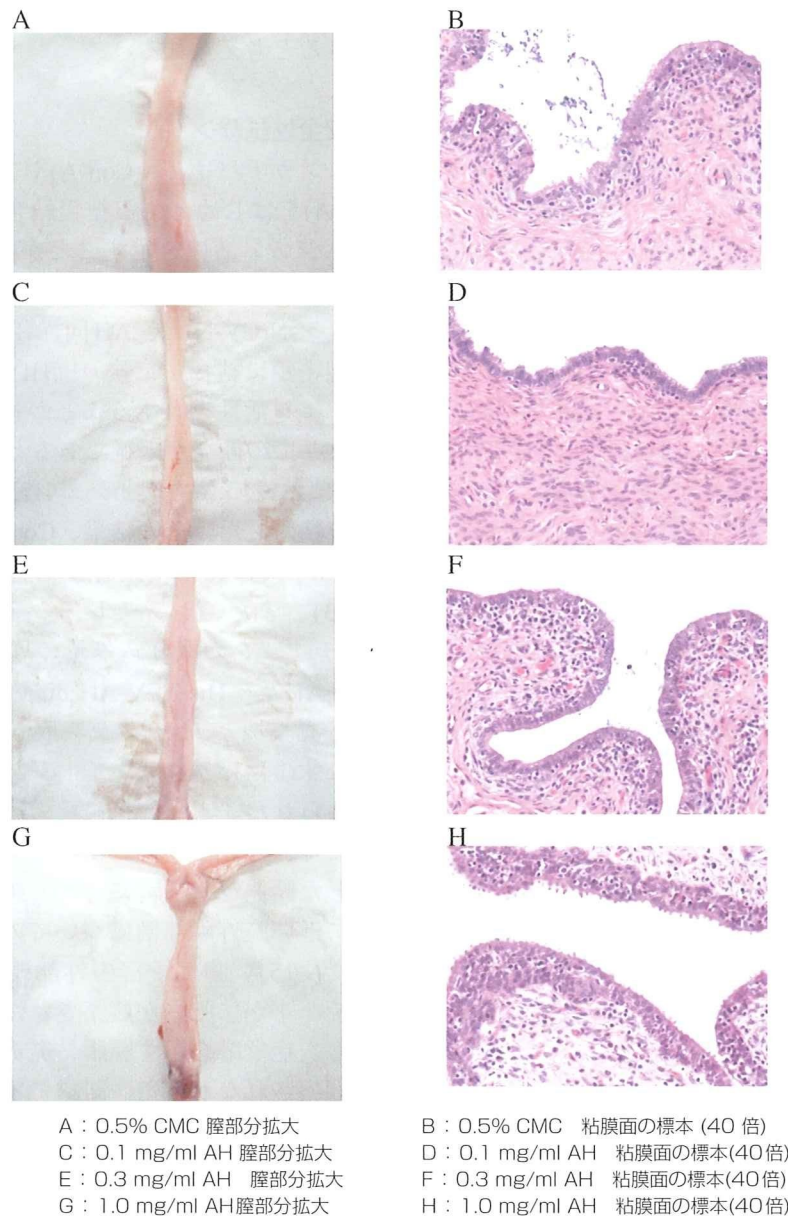


図5 ウサギ子宮及び膣に対する AH の影響



<AHの化学修飾>

AHをHIV/AIDS治療薬として血中投与する場合、血中半減期や免疫原性が問題となる。しかし、PEG-インターフェロンやSMANCSでは、タンパク質をポリエチレングリコール(PEG)又はスチレン-無水マレイン酸共重合(SMA)で修飾することで、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。そこでAHを各種化学修飾し、HIV/AIDS治療薬としての実用化について検討することにした。まず、PEG化及びSMA化によりAHの活性がどのように変化するかを検討するため、放線菌由来天然型AHを用いて各種化学修飾を施した。PEGは、10 kDa及び20kDaのm-PEG aldehydeを用い、N末端アミノ酸のアミノ基に特異的に結合するように設計されている。SMAは、平均分子量が1 kDaで、N末アミノ酸残基及びリジン残基のアミノ基に結合するように設計されている。PEG化AH及びSMA化AHを各種カラムクロマトグラフィーで精製し、合胞体形成阻害活性を測定したところ、10 kDa-PEG-AHは870 nM、20 kDa-PEG-AHは1200 nMとなり、天然型AH(IC<sub>50</sub> =125 nM)の1/7～1/9程度の活性を保持していた。SMA-AHは、天然型AHと同等の活性を示した。また、質量分析によりPEG化AHは、AH：PEG=1：1で、SMA化AHは、AH：SMA=1：1～3

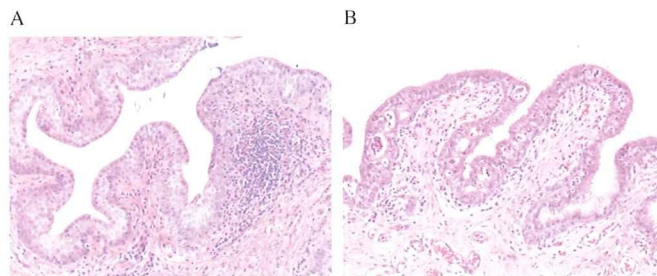
のモル比で結合していることが確認された。

今後は、各種化学修飾AHをマウスに血中投与し、血中半減期の延長効果及び免疫原性の抑制効果を評価する。

<AHの立体構造>

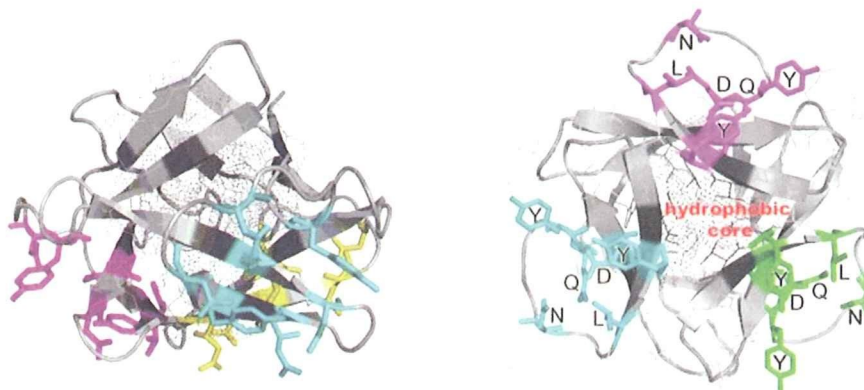
数ヶ月かかって得られた結晶の立体構造を解析した結果、図7に示すような立体構造が明らかになった。すでにタンパク質モデリングソフトFAMSを用いる解析から3つの糖鎖結合ポケットの配置が推定されていたが、図7の結果により、それが証明された。また、糖鎖結合ポケット以外の構造は3つ葉のクローバー状に配置された3つの糖鎖結合ポケットの立体配置を維持するのに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

Segment 1の糖鎖結合ポケット(LD15-QXW35)内のアミノ酸をAlaに置換した変異AHの解析により表2に示したように、D15A、Y23A、L25A、N28A、Y32A、Q33AがHM結合に必須であることが示されたが、X線結晶構造解析により得られた立体構造は、糖鎖結合ポケットの比較的狭い位置に集中していることが明らかになった。今後これらの結果を基に、AH-gp120結合の選択性についても解析できるものと期待される。なお、すでにAHの活性発現には3



A : His-TEV-AH dimer/RTB-L 10 mg/ml 粘膜面の標本(20倍)  
B : 0.5% CMC 粘膜面の標本(20倍)

図6 ウサギ膺に対する His-TEV-AH dimer/RTB-L の影響



糖鎖結合ポケット側面から見た図

糖鎖結合ポケット前面から見た図

図7 AHの立体構造

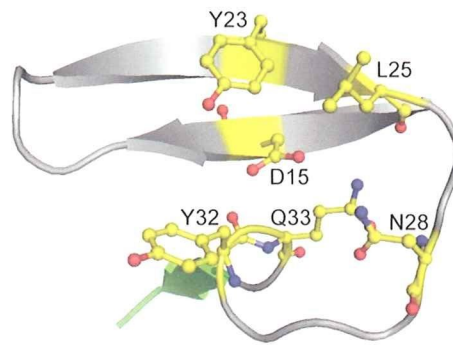


図8 AH segment 1 の糖鎖結合ポケット内の糖鎖結合に関与するアミノ酸の配置

表2 AH segment 1 のアミノ酸置換変異体の合胞体形成阻害活性

1 10 20 30 38  
 ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYTL PANGGN YQRW TGP

Protein	IC <sub>50</sub> (μM)
His-AH	0.54 ± 0.02
His-AH (D15A)	7.21 ± 0.45
His-AH (N17A)	0.78 ± 0.10
His-AH (Y18A)	0.93 ± 0.09
His-AH (N19A)	0.61 ± 0.13
His-AH (N21A)	0.95 ± 0.20
His-AH (Y23A)	12.2 ± 0.73
His-AH (L25A)	2.32 ± 0.20
His-AH (N28A)	6.32 ± 0.21
His-AH (N31A)	0.74 ± 0.24
His-AH (Y32A)	7.29 ± 0.57
His-AH (Q33A)	9.04 ± 0.81

つのセグメントが必要であることがすでに分かっていたが、3つのセグメントがそろふことによって糖鎖結合ポケットの構造が維持されていることが図8の立体構造から示された。即ち、例えば2つのセグメントでは糖鎖結合ポケットは成立しないことが明らかになった。

## ■ E. 結論

AH誘導体を使用目的に応じ、大腸菌又は酵母にて調製できる系を構築した。AH誘導体を効率良く調製するためには、不溶性タンパク質として菌体内に発現されたAH誘導体を、グアニジン塩酸で可溶化し、Niカラムで精製した後、ODSカラムでグアニジン塩酸を除去するのではなく、30%アセトニトリル/1mM HClを用いる透析法によりグアニジン塩酸を除去するのが良いことが分かった。これにより、どのような宿主を用いようとも再現性のある試料調製が可能であると考えられる。特にHis-TEV-AH dimer/RTB-Lでは、常にAHの20倍の活性を示す試料を得ることができた。また、今後、サルを用いた経直腸及び経膈ウイルス感染阻害実験を予定してい

る。

PEG化に関しては、PEG-AHをマウスへ血中投与し、抗体産生抑制効果を調べると共に、AH誘導体のPEG化も検討し、血中投与可能な薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための治療薬としての開発を目指す。

AHの結晶化に成功し、AHの立体構造が解明されたことにより、3つの糖鎖結合ポケットと結合に必須なアミノ酸の配置が明らかとなり、今後さらに抗HIV活性、安定性及び溶解性が改善された変異体のコンピュータグラフィックによるシミュレーションが可能となった。

## ■ 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