

分担研究報告書

APOBEC3Gの調節過程を標的とする新たなHIV複製制御法の研究

分担研究者 高折晃史 京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学 講師

研究要旨 APOBEC3G/Vif分子の機能調節およびその相互作用に関し、①APOBEC3GのL1ループのVif結合における役割、②VifによるG2期停止誘導の分子機構として、p53の活性化の役割を明らかにした。今後、さらにAPOBEC3G/Vifシステム調節のより詳細な分子機構を明らかにし、これらの科学情報に立脚した新しいHIV複製制御法を提案したい。

A. 研究目的

本研究では、抗HIV-1宿主因子APOBEC3Gとそれに拮抗するHIV-1 Vif蛋白によるHIV-1の複製制御に関し、これら分子の機能調節、および相互作用に焦点を当てて研究をすすめる。また、得られた科学情報をもとに、新たなHIV-1複製制御法を提案する。

B. 研究方法

APOBEC3Gは新規に同定された抗HIV-1宿主因子であり、一方HIV-1 Vifは本分子をユビキチン-プロテアソーム系を用いて分解、中和することによりHIV-1複製を助けている。このAPOBEC3G/VifシステムによるHIV-1複製制御に関して、昨年度までに得られた①リン酸化によるAPOBEC3Gの機能調節、②ユビキチン化によるVifの機能調節の知見をさらに展開させ、下記の2点に関し研究を進めた。

- 1) APOBEC3G L1ループのVifとの結合における役割
- 2) VifによるG2期停止の分子機構

(倫理面への配慮)
特に存在しない。

C. 研究結果

- (1) APOBEC3G L1ループのVifとの結合

における役割：昨年度、PKAによるリン酸化がAPOBEC3Gの抗HIV-1活性を制御していることおよびその分子機構を報告した

(Shirakawa et al. *Nat Struct Mol Biol* 15:1184, 2008)。その中で、APOBEC3GのN端のコンピューター構造解析により(当研究班の班長である国立感染研の佐藤裕徳先生との共同研究)、PKAによるThr32のリン酸化は、Thr32-Arg24間の相互作用に影響を与え、Vifとの結合親和性を変えることを示した。

Thr32-Arg24は、 $\alpha 1$ - $\beta 1$ ループ(L1ループ)の基部に位置していることから、Vif結合におけるL1ループの意義に関して検討した。具体的には、同部位の種々の変異体を作製し、Vifとの結合性、Vifによる分解感受性、重合体形成能、ウイルス粒子中への取り込み能、抗HIV-1活性を比較検討した。

①R24AはVifと結合しVifによる分解感受性であったが、R24EはVifと結合せず分解抵抗性であった。

②R24Aはhomodimerを形成したが、R24Eはしなかった。

③R24A、R24E、いずれもウイルス粒子中への取り込み能がなく、抗HIV-1活性を有しなかった。

以上より、APOBEC3G Arg24は、Vifとの結合に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。これは、従来Vifとの相互作用に重要と考えられていたAsp128以外で初めての報告である。

(2) VifによるG2期停止の分子機構：昨年度、Vifの新規E3リガーゼとしてMDM2を同定し報告した。一方、近年、Vifの新規機能として、感染細胞の細胞周期をG2期で停止することが報告された。MDM2は、p53の活性を調節する分子としてよく知られているが、Vifがその活性調節に重要な部位に結合することより、Vifがp53の活性を調節し、G2期停止を起こす可能性に関して検討した。

①Vifは、p53蛋白を安定させ、p53による転写活性を上昇させた。

②Vifは、p53に結合し、そのユビキチン化を阻害した。

③p53、p21を欠損した細胞株を用いた検討により、Vifは、p53およびp21依存性にG2期停止を誘導した。

④Vifは、p53依存性に細胞死を誘導した。
以上より Vifはp53経路を介して細胞周期をG2期に停止させることを明らかにした。

D. 考察

APOBEC3G/Vifに関する研究は、近年の抗HIV-1宿主因子とウイルス蛋白の相互作用に関する研究の先陣をきるものであり、その科学的な意義はきわめて高い。また、APOBEC3蛋白による広範な抗ウイルス作用は、細胞内に存在する抗ウイルス自然免疫として「内因性免疫」という新たな概念をも創出した。APOBEC3Gの抗ウイルス活性機構、およびVifによるAPOBEC3G中和機構に関して多くの知見が集積されたが、昨年度我々が明らかにしたように、それぞれの分子はさらに翻訳後修飾による機能調節を受けており、その調節機構は当初予想したより極めて複雑であり、いまだその詳細な分子機構に関して未知の部分が多く残っている。これらの分子機構の解明は、新たなHIV-1複製制御法、ひいては、新規抗HIV-1薬の開発へとつながると考えられる。

今年度、我々は、APOBEC3G L1ループのVifとの結合における役割、およびVifによるG2期停止の分子機構を明らかにしたが、これらは、APOBEC3G/Vifシステムの複雑な分子機構をさらに明らかにし、これらを用いた新たなHIV-1複製制御法の開発へつなが

る科学情報を提供できたと考えている。今後、これらを標的とした薬剤開発の可能性についても検討を加えていきたい。

E. 結論

APOBEC3G/Vifシステムの機能調節、および相互作用に関する研究が順調に進み、そのより詳細な分子機構を明らかにし、いずれも論文投稿準備中である。これらは、いずれも我々が世界に先駆けて提唱した分子機構であり、将来的にはこれらの科学情報に立脚した新しいHIV複製制御法にむけてさらに研究を進めたい。

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) Yamamoto R, Nishikori M, Tashima M, Sakai T, Ichinohe T, Takaori-Kondo A, Ohmori K, and Uchiyama T: B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer Science* 100(11):2093-100, 2009.

3) Sakai T, Nishikori M, Tashima M, Yamamoto R, Kitawaki T, Takaori-Kondo A, Suzuki T, Tsuzuki S, and Uchiyama T: Distinctive cell properties of B cells carrying the BCL2 translocation and their potential roles in the development of lymphoma of germinal center type. *Cancer Science* 100(12):2361-2367, 2009.

4) 泉 泰輔、高折 晃史：APOBEC3G/VifシステムによるHIV-1の複製制御。「実験医学」増刊 第27巻 第10号 135項～144項、2009年

2. 学会発表

1) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-Kondo, Masashi Matsui, Kazuhiro Io, and T Uchiyama: HIV-1 Vif Causes G2 Cell Cycle Arrest and

Apoptosis via the p53 Pathway. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009. (Young Investigator Award 受賞)

2) Kotaro Shirakawa, A Takaori-Kondo, M Yokoyama, T Izumi, M Matsui, K Io, H Sato, and T Uchiyama: P Phosphorylation of APOBEC3G by Protein Kinase A Regulates its Interaction with HIV-1 Vif. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009. (Young Investigator Award 受賞)

3) Taisuke Izumi, Kotaro Shirakawa, Masashi Matsui, Katsuhiko Io, Takashi Uchiyama, and Akifumi Takaori-Kondo: HIV-1 Vif causes G2 cell cycle Arrest and apoptosis via the p53 Pathway. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, September 8-11, 2009.

4) 泉 泰輔、白川 康太郎、松井 道志、井尾 克宏、内山 卓、高折 晃史: HIV-1 Vif は p53 を介してその機能を発揮する。第 23 回近畿エイズ研究会学術集会、京都、平成 21 年 6 月 6 日

5) 松井 道志、泉 泰輔、井尾 克宏、篠原 正信、高折晃史: Vif/APOBEC3G を標的とした創薬スクリーニング。第 23 回近畿エイズ研究会学術集会、京都、平成 21 年 6 月 6 日

6) 井尾 克宏、泉 泰輔、松井 道志、篠原 正信、内山 卓、高折 晃史: HIV-1 Vif はリン酸化により p53 を安定化し、細胞を G2/M 期に停止させる。第 23 回近畿エイズ研究会学術集会、京都、平成 21 年 6 月 6 日

7) 泉 泰輔、白川 康太郎、松井 道志、井尾 克宏、篠原 正信、内山 卓、高折 晃史: HIV-1 Vif は p53 を介してその機能を発揮する。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

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

厚生労働省科学研究補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV-1 ゲノムの逆転写および組み込み過程の新規制御機構

分担研究者：増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 免疫治療学分野 准教授）

研究要旨

本研究では、逆転写無細胞アッセイ系を確立し、HIV-1 インテグラーゼおよび宿主因子 SIP1/Gemin2 の逆転写過程への直接関与の有無を検討した。本研究結果から、インテグラーゼが逆転写酵素活性を直接増強することを確認した。この IN の逆転写促進効果は、IN:RT 比が 10:1 以上必要であったが、SIP1/Gemin2 存在下では IN/RT 比=1:1 でも IN の逆転写酵素活性を促進しうることが示された。さらに、この逆転写過程の促進効果は、インテグラーゼおよび SIP1/Gemin2 は逆転写酵素のウイルス RNA への結合能を安定化させることがその機序のひとつであることが示された。

A. 研究目的 HIV-1 インテグラーゼはウイルスゲノムの組み込み過程以外にも、逆転写過程、核内輸送にも関与している。我々は、逆転写過程に寄与するインテグラーゼ結合宿主因、SIP1/Gemin2 を同定したが、本研究では、インテグラーゼおよび Gemin2 の逆転写酵素活性への直接的な機能関与とその詳細な分子機構ならびにウイルス複製における意義を明確にすることを目的とした。

B. 研究方法

① T7-in vitro 転写系により調整した HIV-1 ゲノム RNA を擬似した鋳型 RNA、*pbs* に相補的な合成オリゴ RNA をプライマーにリコンビナント逆転写酵素 (RT) を dNTPs 存在下で反応させ、合成された cDNA をリアルタイム PCR 法により定量解析する in vitro RT アッセイ系を樹立し、インテグラーゼおよび Gemin2 の RT 活性における影響を直接評価した。

② oligo (dT) セファロースカラムに HIV-1 RNA をトラップさせ、リコンビナントインテグラーゼおよび Gemin2 存在下、非存在下で RT と反応させ、RT-RNA 相互作用における影響を評価した。

③ インテグラーゼと Gemin2 の結合を阻害

するインテグラーゼ配列由来の合成ペプチドを用いて、インテグラーゼと Gemin2 相互作用の逆転写過程およびウイルス複製における意義を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮：該当事項無し。

C. 研究結果

1) RT:鋳型 RNA 比が約 1:~1:1000 の条件下において、インテグラーゼは RT 活性を濃度依存的に増強させた。また、RT:IN が 1:1 の条件下で SIP1/Gemin2 はインテグラーゼ依存性 RT 活性を濃度依存的に増強させた (図 1A~D)。

2) インテグラーゼおよび Gemin2 は RT のウイルス RNA への結合能を安定化させた(図 1E)。

3) インテグラーゼと Gemin2 の結合を阻害するインテグラーゼ配列由来の合成ペプチドは (図 2A~C)、インテグラーゼ依存性 RT 活性を濃度依存的に阻害し(図 2D)、さらに、HIV-1 複製も抑制し (図 2E) その作用点は、逆転写過程であった (図 2F)。

D. 考察

HIV-1 インテグラーゼがウイルス粒子内に

パッケージされている RNA ゲノムと RT および IN 比に近い条件下で、逆転写酵素活性を直接増強することを確認した。さらに、ペプチド阻害実験からインテグラーゼ依存的 RT 活性促進効果は HIV-1 複製においても重要であることを明確にした。今後の新規作用点をもつ抗 HIV 薬剤開発への基盤となる結果と考える。

E. 結論 HIV-1 インテグラーゼが宿主因子 SIP1/Gemin2 をコファクターとし、逆転写酵素活性を促進することを直接しました。また、このインテグラーゼの逆転写過程の促進効果は、ウイルス感染の効率の良い逆転写過程にも重要であることを明らかにした。よって、インテグラーゼと Gemin2 の相互作用を阻害しする、新規阻害剤開発にも応用可能である。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishitsuji, H., Hayashi, T., Takahashi, T., Miyano, Kannagi, M. & Masuda, T. Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 is critical for HIV-1 infection. PLOS One 4 (11): e7825, 2009.
- 2) Obitsu, S., Ahmed, N., Nishitsuji, H., Hasegawa, A., Nakahama, K., Morita, Nishigaki, K., Hayashi, T., Masuda, T., & Kannagi, M. Potential enhancement of osteoclastogenesis by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 protein. Arch. Virol 154, 1457-1464, 2009.
- 3) Takatsuka, N., Hasegawa, A., Takamori, A., Shimizu, Y., Kato, H., Ohashi, T., Amagasa, T., Masuda, T., & Kannagi, M. Induction of IL-10- and IFN-g -producing T-cell responses

by autoreactive T-cells expressing human T-cell leukemia virus type I Tax. Int. Immunol. 21, 1089-1100, 2009.

4) Kinpara, S., Hasegawa, A., Utsunomiya, A., Nishitsuji, H., Furukawa, H., Masuda, T. & Kannagi, M. Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon. J Virol 83, 5101-5108, 2009.

5) Shimizu, Y., Takamori, A., Utsunomiya, A., Kurimura, M., Yamano, Y., Hishizawa, M., Hasegawa, A., Kondo, F., Kurihara, K., Harashima, N., Watanabe, T., Okamura, J., Masuda, T. & Kannagi, M. Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. Cancer Sci 100, 481-489, 2009.

2. 学会発表

- 1) Masuda T., Nishitsuji H., Kannagi M. Augmentation of reverse transcriptase (RT) activity by HIV-1 integrates through interaction with a host factor, Gemin2, is critical for HIV-1 infectivity. The 4th GERMAN-JAPANESE AIDS SYMPOSIUM. 2009 (ボッフム、ドイツ).
- 2) 増田貴夫, 西辻裕紀, 高橋卓也, 林隆也, 宮野正史, 長谷川温, 彦神奈木真. HIV-1 インテグラーゼと宿主因子 HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程への直接関与とその作用機序第. ワークショップ “ウイルスゲノム複製” 第 57 回 日本ウイルス学会 2009 (東京)
- 3) 鈴木陽一, 山元誠司, 大川克也, 増田貴夫, 森川裕子, 小柳義夫, レトロウイルスインテグラーゼ結合性因子 Huw1 の同定と HIV-1 感染における役割. 第 57 回 日本ウイルス学会 2009 (東京)
- 4) Ahmed, N., Obitsu, S., Nishitsuji, H., Hasegawa, A., Nakahama, K., Morita, Nishigaki,

K., Hayashi, T., Masuda, T., & Kannagi, M. Enhancement of osteoclastogenesis by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 protein. 第 57 回 日本ウイルス学会 2009 (東京)

5) 金原秀一、長谷川温彦、宇都宮興、西辻裕紀、古川裕之、増田貴夫、神奈木真理. 生体内における HTLV-I 発現抑制機序への自然免疫応答への関与. 第 57 回 日本ウイルス学会 2009 (東京)

6) 増田貴夫、西辻裕紀、高橋卓也、林隆也、宮野正史、長谷川温彦、神奈木真理. HIV-1 インテグラーゼと宿主因子 HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程への直接関与とその作用機序第 23 回日本エイズ学会 2009 (名古屋)

7) 山元誠司、大川克也、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫、鈴木陽一 HIV-1 インテグラーゼ相互作用因子 Huw1 による HIV-1 の感染抑制. 第 23 回日本エイズ学会 2009 (名古屋)

8) Ahmed, N., Hayashi, T., Hasegawa, A., Furukawa H., Noboru O., Chida T., Masuda, T., & Kannagi, M. Effects of commensal organisms on HIV-1 replication in macrophage-like cells. 第 23 回日本エイズ学会 2009 (名古屋)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 出願中：インテグラーゼ N-末端領域を標的としたウイルス感染阻害剤 (特願 2006-239627)

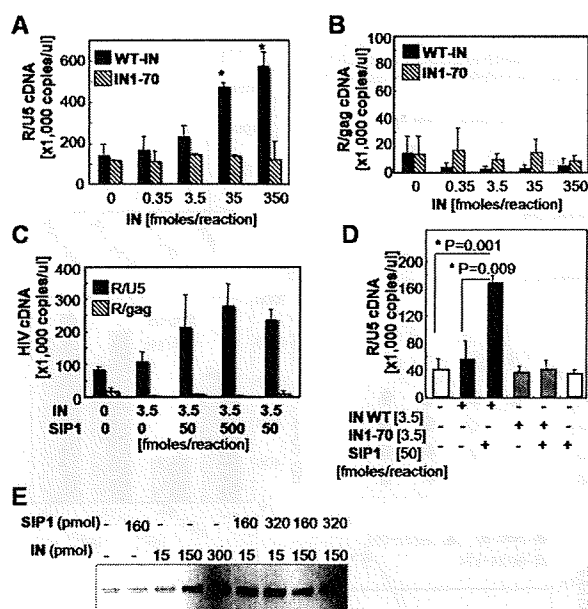


図 1 Augmentation of reverse transcription by HIV-1 IN and SIP1 *in vitro*. (A, B) The *in vitro* RT assay was carried out with 35 fmol of HIV-1 RT (GST-RTp66) in the absence or presence of different amounts of full-length rIN (WT-IN). The truncated form of IN (IN1-70) that lack SIP1 binding domains was also tested in apparet as a control. The amount of HIV-1 cDNA was measured by real-time PCR using the HIV-1 R/U5 (A) or R/gag (B) primer pair. Significant augmentation ($p < 0.05$) by WT-IN in the levels of HIV-1 cDNA compared with the level without IN (0 fmole) was indicated by asterisks. (C) The *in vitro* RT assay was carried out as described in (A) in either the absence or presence of 3.5 moles of WT-IN, together with different amounts of rSIP1. (D) The *in vitro* RT assay was carried out with 3.5 fmol of WT-IN (black bar) or IN1-70 (slash bar), in either the absence (-) or presence (+) of 50 fmol of rSIP1. (E) The oligo(dT) cellulose resin was incubated with *in vitro* transcribed HIV-1 RNA for 1 h. After incubation, 10 μ g of GST-RT in either the absence or presence of His-IN or rSIP1 was added and incubated for 2 h. After four washes with the IN storage buffer, precipitates were analyzed by immunoblot analysis using an anti-GST antibody.

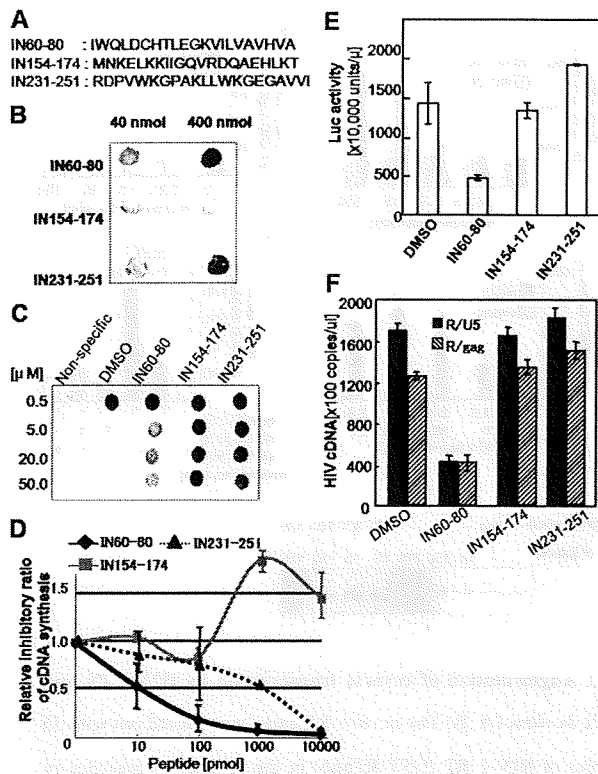


Fig 2 IN-derived peptide inhibits reverse transcription *in vitro* and *in vivo*. (A) Amino acid sequences of IN-derived peptides are indicated. (B) 40 or 400 nmol of each peptide bound to nitrocellulose filter was incubated with rSIP1 (5 μg). The rSIP1 bound to the peptide was detected using an anti-SIP1 antibody. (C) His-IN (10 μg) was bound to nitrocellulose and reacted with 5 μg of rSIP1 in the presence of each peptide at the indicated concentration. The rSIP1 bound to the peptide was detected as described in (B). (D) The *in vitro* reverse transcription assay was performed with 35 fmol of RT, 3.5 fmol of His-IN, and 50 fmol of rSIP1 in either the absence (control) or presence of IN-derived peptide at the indicated concentration. The values (mean ± SE) plotted are the levels of HIV-1 cDNA relative to that the control, taken as 1.0. (E, F) PMA-stimulated THP-1 cells were treated with 100 μM of IN-derived peptide for 16 h. Cells were infected with HIV_{NL4.3-luc}/VSV-G pseudotypes in the presence of 100 μM of IN-derived peptide for 6 h. At 24 h post-infection, levels of viral gene expression were determined by measuring the luciferase activity (E) or the level of viral cDNA synthesis for early (R/U5, left) and late (R/gag, right) products of reverse transcription (F) in cells.

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

Histone H3 Lys9 (H3K9) ジメチル化酵素 G9a による HIV 潜伏感染の維持機構

分担研究者：岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学）

研究協力者：今井健一（同上）

研究要旨：HIV の潜伏感染の成立と破綻にヒストンの生化学的修飾が重要な役割を担っている。本研究では、HIV 潜伏感染における H3K9 のメチル化とその責任酵素である H3K9 メチル化酵素 G9a の役割を解析した。その結果、G9a は HIV プロウイルス DNA 周辺のヒストンメチル化を介して HIV の転写を負に制御しており、潜伏感染の成立と維持に深く関与していることがわかった。G9a の強発現により HIV の遺伝子発現が抑制された一方で、G9a のノックダウンにより HIV 転写とウイルスの複製が誘導された。G9a 特異的阻害剤である BIX01294 は、HIV 潜伏感染細胞の H3K9 ジメチル化を抑制することにより潜伏 HIV の複製を促進した。この結果は、今後 HIV 感染細胞を除去するための治療法開発において重要な視点を提供する。

A. 研究目的

抗 HIV 化学療法によりエイズ患者の寿命は格段に伸びたが、薬剤に対する耐性ウイルスの出現や重篤な副作用のため、近年その限界が明白になってきた。エイズの治療を困難にしている理由のひとつに HIV の潜伏感染がある。HAART 薬剤はウイルス転写に無効であり HIV 潜伏感染は転写に依存するため、現行の治療法では HIV を完全に除去することはできない。従って、エイズを撲滅するためには、既存の薬物療法に加えて潜伏感染細胞からのプロウイルス発現を効率よく抑制する新しい治療戦略が必要であるが、その前に潜伏感染の分子機構を明確にしなければならない。しかし、HIV 潜伏感染には不明な点が多い。

また、HIV の転写活性化機構が転写因子レベル、あるいはクロマチンレベルで明らかとなった一方で、HIV 転写抑制のメカニズムに関しては不明な点が多い。これまでに、抑制性の転写因子 YY-1 や NF- κ B p50 homodimer が HDAC を LTR に呼び込み、近傍のヒストンの脱アセチル化をひきおこすことによりクロマチンレベルで HIV の転写を抑制することが報告されている。われわれも、LTR の TATA box 近傍に転写因子 AP-4 の結合部位が存在し、AP-4 が HDAC を介し HIV 発現の抑制因子として機能していること (Imai et al., J. Biol. Chem. 2006, 281, 12495) を明らかにした。

他方、成人の多くが罹患している歯周病の原因菌が HDAC 阻害作用を有する酪酸を介して潜伏感染 HIV を再活性化することを見出した (Imai, et al., J. Immunol. 2009, 182, 3688)。しかし、継続的な遺伝子発現抑制には、ヒストンの脱アセチル化に加えてヒストンのメチル化も重要であることが示されている。HIV 潜伏感染は数年から 20 年と長期間にわたるため、HIV の遺伝子発現の負の制御機構においても同様のメカニズムが推察されるが、潜伏感染の成立と維持におけるヒストンメチル化の関与については未だ明らかになっていない。

これまでの研究から、ヒストン 3 (H3) のリジン (K) とアルギニン (R) 残基のメチル化は、遺伝子発現をクロマチンレベルで正と負の両方向に制御していることが明らかになっている。興味深いことに H3 の K4 (H3K4) と K36 (H3K36) のメチル化は遺伝子発現の活性化につながる一方、H3K9 と H3K27 のメチル化は遺伝子発現を負に制御する。特に H3K9 のメチル化はクロマチンレベルでの転写抑制に最も重要とされ、H3K9 メチル化酵素である G9a や Suv39h1、SETDB1/Eset などより特異的にメチル化される。なかでも、G9a による H3K9 のメチル化作用は最も強く、G9a 欠損細胞では H3K9 のジメチル化が消失していること、さらに G9a が細胞分化やがん化に関連する多くの遺伝子の発現を負に制御してい

ることが報告されている。従って、G9a によるヒストンメチル化が HIV の転写抑制にも関与している可能性が強く示唆される。

本研究では、HIV 潜伏感染における H3K9 のメチル化、特にその責任酵素である G9a の役割を解析した。その結果、G9a は HIV LTR の H3K9 ジメチル化を介して HIV の転写をクロマチンレベルで負に制御し HIV の潜伏感染の成立と維持に深く関与していることが明らかとなった。

(倫理面への配慮)

本研究は現時点ではすべて培養細胞を用いた実験であり、倫理的規定の対象には該当しない。

B. 方法と結果

1. HIV-1 遺伝子発現に及ぼす G9a の作用：

G9a が HIV 遺伝子発現に及ぼす影響は CEM T cell に G9a 発現プラスミドと HIV LTR を導入した Luciferase assay にて検討した。その結果、G9a は basal レベル、および TNF α と Tat による HIV 転写活性化レベルを濃度依存的に同程度に抑制した。すなわち G9a による転写抑制は関連する転写活性化因子とは独立に起こっていると考えられた。

G9a は C 末領域にヒストンをメチル化する酵素活性中心を含む SET ドメインを有する。G9a による HIV の転写抑制がヒストンのメチル化に依存しているか否かを調べるために、SET ドメインを除いた G9a 変異プラスミドを用いて検討した。その結果、SET ドメインを欠損した G9a では basal レベル、および TNF α による HIV の活性化ともに抑制効果が認められなかった。

以上の結果から、G9a による HIV 転写の抑制は、G9a による H3K9 のメチル化が必須であることが示唆された。

2. 内在性の G9a が HIV-1 の転写と複製に及ぼす影響：

次に、細胞の持つ内在性 G9a が実際に HIV 転写の抑制因子として機能しているか否かを調べるために、si RNA を用いて G9a のノックダウン実験を行った。その結果、G9a siRNA を導入した細胞では、対照の siRNA を導入した細胞と比較して 2.3 倍の HIV 転写活性の上昇がみられた。さらに、G9a が HIV の

複製に及ぼす影響を検討するために、HIV-1 pNL4-3 を細胞に導入し p24 Antigen ELISA assay を行った。その結果、G9a ノックダウン細胞においては、control siRNA 導入細胞に比べ、basal レベルと TNF α 刺激時においてウイルス複製の増強が認められた。

以上の結果から、内在性の G9a は HIV の転写と複製を負に制御していることが明らかとなった。

3. G9a 特異的阻害剤 BIX01294 が HIV 潜伏感染細胞に及ぼす影響：

G9a が HIV 転写とウイルス複製に及ぼす負の作用をさらに別の角度から確認するために、G9a 特異的阻害剤 BIX01294 を用いた実験を行った。BIX01294 は世界で初めて報告されたヒストンメチル化酵素阻害剤であり、G9a による H3K9 ジメチル化を低濃度で阻害する (Kubicek, et al. Mol Cell 25: 473-481, 2007)。まず、BIX01294 が HIV 転写に及ぼす効果を Luciferase assay にて検討した結果、BIX01294 は HIV の転写を濃度依存的に誘導した。次に、BIX01294 が HIV の潜伏感染からのウイルス複製に及ぼす影響を見た。HIV 潜伏感染細胞である ACH-2 (T 細胞系) と OM10.1 (単球系) を用いて p24 ELISA assay とエイズ患者の抗血清を用いたウェスタンブロットにてウイルス複製量を調べた。その結果、BIX01294 はこれらの潜伏感染細胞からの HIV の複製を強く誘導した。この時の H3K9 のメチル化の状態を種々の H3K9 特異的メチル化抗体にて調べた結果、BIX01294 処理により H3K9 ジメチル化のみが減少していた。

以上の結果から、G9a が HIV の抑制因子として機能していることが確認でき、BIX01294 は G9a を阻害することで HIV の転写と潜伏感染細胞からのウイルス複製を誘導していることが明らかとなった。

4. HIV-1 潜伏感染細胞 LTR 上での G9a と H3K9 の動態：

そこで、HIV 潜伏感染細胞内の HIV プロウイルス DNA の LTR 領域での実際の G9a と H3K9 の動態を調べるため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) assay を行い検討した。その結果、未刺激状態の ACH-2 細胞の HIV LTR には G9a と

H3K9 のジメチル化が認められ、BIX01294 で細胞を刺激すると G9a の遊離とともに H3K9 ジメチル化が消失した。また、転写を実行する RNA ポリメラーゼ II 型が HIV LTR 上に誘導されることも認められた。以上の結果から、潜伏感染状態の HIV LTR には G9a が結合しており、G9a により近傍の H3K9 がジメチル化されていると考えられた。すなわち、BIX01294 は「非活性化型」状態にある HIV LTR のクロマチン構造を解除することにより潜伏感染 HIV の複製を誘導していることが示唆され、G9a が HIV 潜伏感染の維持と破綻に深く関与していることが明らかとなった。

5. BIX01294 と他の阻害剤との相乗効果：

近年、SAHA や valproic acid (VPA) などの HDAC 阻害剤を用いて潜伏感染 HIV を再活性化させた後、HAART 療法を行うという新たな治療法が試されている (Lehrman et al., *Lancet* 366: 549-555, 2005)。BIX01294 が潜伏感染 HIV の再活性化を強く誘導したことから、ヒストンメチル化とアセチル化阻害剤という作用の違う 2 種類の薬剤を併用した場合の潜伏感染 HIV に及ぼす効果について検討した。その結果、ACH-2 細胞に BIX01294 と SAHA を単独で作用させた場合の HIV 複製は未刺激状態と比べそれぞれ 4.9 倍と 13.5 倍であったが、両薬剤を併用した場合には BIX01294 の濃度に依存して 22.3 倍から 47.1 倍へと HIV 複製が著明に亢進し、SAHA と BIX01294 の間に相乗効果がみられた。同様な結果は、DNA メチル化酵素阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine と BIX01294 を併用した時にも認められた。

以上の結果から、HIV 潜伏感染の維持においてヒストンのアセチル化とメチル化が独立して機能していることが推察され、両阻害剤を併用することにより強い潜伏 HIV の活性化が起こることがわかった。

D. 考察

近年、細胞増殖や分化・発生等の高次生命現象において、ゲノム情報に規定されないエピジェネティックな制御機構が明らかになってきた。なかでも、ヒストンはエピジェネティック制御で中心的役割を担うクロマチン構造の重要な構成因子であり、その N 末端

はアセチル化やメチル化などの様々な化学修飾を受け、ダイナミックに遺伝子発現を制御している (Strahl and Allis, *Nature* 403: 41-45, 2000)。遺伝子発現のサイレンシング成立には、HDAC によるヒストンの脱アセチル化とヒストンメチル化酵素によるヒストン H3K9 のメチル化と、さらに後者に付随する周辺領域 DNA のメチル化が重要であることが示されており、HIV の潜伏感染においても同様のメカニズムが示唆される。そこで、本研究では代表的なヒストンメチル化酵素である G9a が HIV 潜伏感染維持にどのように関わっているのかを検討した。その結果、G9a は HIV LTR の H3K9 ジメチルを介して HIV の転写を抑制することで潜伏感染の成立と維持において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

これまでに H3K9 トリメチル化酵素である Suv39h1 が HIV LTR に結合し、近傍のヒストンをメチル化することで HIV の潜伏感染に関与していることが他のグループから報告されている (Marban et al., *EMBO J.* 26: 412-423, 2007)。しかし、この報告は強制発現とノックダウンを用いた研究成果であり、実際に Suv39h1 が HIV の潜伏感染維持に関与しているか否かは不明である。われわれは、HIV 潜伏感染における G9a の役割を明らかにするために、分子生物学的な実験に加えて、G9a 特異的阻害剤 BIX01294 を使用して G9a の関与をより直接的に証明することを試みた (Imai et al., 投稿中)。その結果 BIX01294 が潜伏感染細胞からの HIV 複製を強く誘導したことから、G9a が潜伏感染維持に関与していることが強く推察された。G9a の H3K9 のメチル化作用は Suv39h1 のメチル化より 10~20 倍強いこと、H3 のメチル化カスケードにおいて G9a が Suv39h1 の上流に位置することも報告されており (Gazzar et al., *J Biol Chem.* 285: 1259-1271, 2010)、これらの事実は HIV の転写抑制における G9a の重要性を支持している。さらに、G9a は DNA メチル化酵素と結合し、DNA のメチル化にも関与している。HIV LTR のメチル化が HIV の転写抑制に関与していることは既に報告されているが、G9a は LTR 上で DNA メチル化酵素と複合体を形成し、ヒストンのメチル化のみならず LTR のメチル化にも関与していることが推察できる。

HIV の転写制御機構の解明は潜伏感染を分子レベルで理解することにつながり、次世代の抗HIV薬開発に重要な情報を提示するものと考えられる。すでに HDAC を介するクロマチンレベルでの潜伏感染維持に関する研究成果が基盤となり、潜伏感染細胞を標的として、VPA を使用した新たな” flush out” (軍隊用語で「建物などに隠れている敵兵を外におびき出す」戦法のこと)エイズ治療法の可能性が提示された(Lehrman et al., Lancet 366: 549-555, 2005)。しかしながらその後の研究で、HDAC 阻害剤のみでは潜伏 HIV 活性化効果が弱いことが報告され、新たな薬剤標的が模索されている。潜伏感染のメカニズムが転写レベルでより明らかとなれば、エイズ患者における潜伏ウイルスの再活性化を HDAC 阻害剤や本研究で使用した G9a 特異的阻害剤 BIX01294 を用いて人為的にコントロールできる可能性が期待出来る。本研究で、われわれは HDAC 阻害剤または DNA メチル化阻害剤と BIX01294 を併用することにより潜伏感染 HIV が強く再活性化されることを見出した。ただし、flush out 戦法自体の有効性については批判も多く、例えば HAART 薬剤のサンクチャーリーである脳や生殖器などでは逆にこの戦法によって HIV による病変が増強される可能性があるなど、治療戦略としての詳細な検討と改良が必須である。

本研究で G9a が HIV 潜伏感染の成立に重要な役割を担っていること、またその特異的阻害剤である BIX01294 が潜伏感染ウイルスの複製を強く誘導することを初めて見出した。この結果は、新しい抗 HIV 治療戦略に重要な情報をもたらすものと考えられる。

E. 結論

H3K9 メチル化酵素 G9a は HIV の感染細胞内での潜伏感染の維持に重要な役割を演じている。この事実は今後 HIV 感染細胞を除去するための治療法を開発するための重要な視点を提供する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cueno ME, Hibi Y, Karamatsu K, Yasutomi Y, Imai K, Laurena AC, Okamoto T. : Impaired plant growth and

development caused by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *Transgenic Res.* 2010. (in press)

- 2) Cueno ME, Hibi Y, Karamatsu K, Yasutomi Y, Imai K, Laurena AC, Okamoto T. : Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 2010. (in press)
- 3) Imai K, Asamitsu K, Victoriano AF, Cueno ME, Fujinaga K, Okamoto T. : Cyclin T1 stabilizes expression levels of HIV-1 Tat in cells. *FEBS J.* 276:7124-33. 2009.
- 4) Tsuchiya A, Imai K, Asamitsu K, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T, Okamoto T. : Inhibition of Inflammatory Cytokine Production from Rheumatoid Synovial Fibroblasts by a Novel I{kappa}B Kinase Inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010. (in press)
- 5) Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Aina A, Sata T, Okamoto T., Hall WW, Sawa H, Hasegawa H. : Inhibition of the SDF-1alpha-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. *Blood.* 114:2961-8. 2009.
- 6) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T., Terashima K, Yamamoto N. : Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol.* 183:524-32. 2009.
- 7) Teranishi F, Takahashi N, Gao N, Akamo Y, Takeyama H, Manabe T, Okamoto T. : Phosphoinositide 3-kinase inhibitor (wortmannin) inhibits pancreatic cancer cell motility and migration induced by hyaluronan in vitro and peritoneal metastasis in vivo. *Cancer Sci.* 100:770-7. 2009.
- 8) Imai K, Ochiai K, Okamoto T. : Reactivation of latent HIV-1 infection by the periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* involves histone modification. *J Immunol.* 182:3688-95. 2009.

2. 学会発表 海外

- 1) Marni E Cueno, Antonio C Laurena and Takashi Okamoto : Vaccines in the light of immune therapeutic antibodies. Semminaring Vaccine Symposium, Apr

- 23-26, 2009, Vienna, Austria (poster)
- 2) Kotaro Fujimoto, Kwok-Hung Chan, Kazuhiro Takeda, Kam-Fai Lo, Raymond H. K. Leung, and Takashi Okamoto: Development of ELISA-based laboratory test for sensitive and specific SARS virus detection. Jul 18-20, 2009. Beijing, China
 - 3) Marni E Cueno, Takashi Okamoto: Potential plant-based HIV-1 Tat vaccine: preferential expression and immunogenicity Vaccine 3rd Global Congress, Oct 4-6, 2009, Singapore

国内

- 1) 金澤 智、岡本 尚: 関節リウマチモデルマウス (DICC マウス) における炎症初期における滑膜細胞に関する研究. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 18 回国際リウマチシンポジウム、4 月 23 日～26 日、東京
- 2) Marni E Cueno, Yurina Hibi, Katsuo Karamatsu, Yasuhiro Yasutomi, Antonio C Laurena and Takashi Okamoto: Immunization against HIV-1 Tat using a plant system. 1st International Kishimoto Foundation Symposium, Immune Regulation: Present and Future. 5 月 25 日～27 日、大阪
- 3) 金澤 智, 岡本 尚: Inflammatory Arthritis in CIITA Transgenic (DICC) Mouse. 1st International Kishimoto Foundation Symposium, Immune Regulation: Present and Future、5 月 25 日～27 日、大阪
- 4) 今井健一、岡本 尚、落合邦康: 歯周病原細菌による潜伏感染 HIV-1 の活性化. 日本歯学保存学会 2009 年度春季学術大会、6 月 11 日～12 日、札幌
- 5) 今井健一、落合邦康、岡本 尚: 歯周病原菌の代謝産物・酪酸による潜伏 HIV-1 プロウイルス活性化の分子機構. 第 52 回秋季日本歯周病学会学術大会、10 月 11 日、宮崎
- 6) 今井健一、戸上博昭、岡本 尚: Histone H3 Lysine 9 ジメチル化酵素 G9a による潜伏感染 HIV の維持と G9a 阻害剤 BIX01294 によるその破綻機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、10 月 25 日～27 日、東京
- 7) 朝光かおり、日比悠里名、小林雄祐、岡本 尚: HIV の Tat によるウイルス転写活性化機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、10 月 25 日～27 日、東京
- 8) 今井健一、戸上博昭、岡本 尚: 潜伏感染 HIV の維持における Histone H3 Lysine9 ジメチル化酵素 G9a の役割. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、11 月 26 日～28 日、名古屋
- 9) 朝光かおり、日比悠里名、小林雄祐、岡本 尚: HIV-1 Tat と CyclinT1 の相互作用の解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、11 月 26 日～28 日、名古屋
- 10) 金澤 智, 岡本 尚: Inflammatory Arthritis and Interstitial Pneumonitis in CIITA Transgenic (DICC) Mouse. 第 32 回日本分子生物学会年会、12 月 9 日～12 日、横浜
- 11) 戸上 博昭, 今井 健一, 岡本 尚: Histone H3 Lys9 ジメチル化酵素 G9a による HIV-1 転写抑制機構. 第 32 回日本分子生物学会年会、12 月 9 日～12 日、横浜
- 12) 朝光かおり、石橋貴宏、田中清隆、日比悠里名、小林雄祐、岡本 尚: Identification of an active ingredient on *Inula helenium* extracts for NF- κ B inhibition. 第 32 回日本分子生物学会年会、12 月 9 日～12 日、横浜
- 13) 大和永佳, Marni Cueno, 岡本 尚: インフルエンザウイルスの普遍的なエピトープを用いた植物ワクチン. 第 32 回日本分子生物学会年会、12 月 9 日～12 日、横浜
- 14) 浦西宏明、Andrei S. Zolotukhin, Susan Lindtner, Soren Warming, Gen-Mu Zhang, Jenifer Bear, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins、岡本 尚、George N. Pavlakis, Barbara K. Felber: The RNA binding motif protein 15B (RBM15B/OTT3) acts as co-factor of the nuclear export receptor NXF1. 第 32 回日本分子生物学会年会、12 月 9 日～12 日、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1) 岡本 尚、朝光かおり、日比悠里名
HIV 増殖抑制剤（特願 2009-254740）
2009 年 11 月 6 日出願

HIV-1Vpr 機能の調節過程を標的とする新たな HIV-1 制御法の研究

分担研究者 間陽子 独立行政法人理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニットリーダー

研究要旨

HIV-1Vpr は HIV-1 ゲノムの核移行、細胞周期の G2 期 arrest および apoptosis を引き起こしウイルス複製およびエイズ発症に大きく関与する。これまで、Vpr は核輸送アダプター因子 Importin α (Imp α) との結合を介して核移行する新規核移行能を有すること、Vpr と Imp α の結合がマクロファージへのウイルス複製に必須であることを報告してきた。さらに、Vpr と Imp α との結合を阻害する低分子化合物を同定し、その化合物がマクロファージにおけるウイルス複製を核移行過程で Vpr 依存的に阻害することを立証した。また、この化合物は Vpr の機能の中でアポトーシス能を阻害するが、G2 期停止能、Vpr のウイルス粒子への取り込みおよび安定性には影響しないこと、一般的な細胞周期、核移行およびアクチノマイシン誘導性 apoptosis に影響しないことを明らかにした。

そこで、今年度は得られたヒット化合物の基本構造に基づいた構造活性相関により、細胞毒性が著しく低く、ウイルス複製阻害効果が nmol レベルの 2 種類のリード最適化化合物を得る事に成功した。これらの誘導体は Vpr と結合することが示された。さらに、サルおよびラット個体での PET プローブの体内動態解析および蛍光プローブの細胞内動態解析により、誘導体は細胞内での浸透性・局在および固体での動態が良好であることが示された。

A. 研究目的

HIV-1 の特徴の一つが他のレトロウイルスとは異なりマクロファージなどの非分裂細胞に感染できる点である。それは、HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr が Pre-integration complex (PIC) を核内に移行させるためと考えられる。

最近我々は Vpr が核輸送アダプター Imp α のみを介して核移行する新規核移行機序を有することを発見した。immunodepletion および siRNA を用いて Vpr の核移行に Imp α が必須である事、Imp α との結合能が消失した Vpr 変異体は核移行能を失い、それを組み込んだウイルスは複製が阻害されることを見出した。以上の結果は、Vpr と Imp α の結合が核移行とウイルス複製に必須であること、そして、その結合を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発への可能性を強く示唆している。

そこで、Vpr と Imp α との結合を阻害する低分子化合物の検索を行ったところ、Vpr と Imp α の結合を阻害する低分子化合物 49 種を選択した。その内 11 種の化合物が、Glutathione S Transferase (GST) pull down 法において Vpr と Imp α の結合を、2 種類が *in vitro* 核移行解析において Vpr の核移行

を、1 種類がマクロファージにおけるウイルス感染を阻害した。

さらに、Real time PCR 法を用いて、ヒット化合物のマクロファージにおけるウイルス複製の阻害の標的が核移行過程であることを立証した。また、このヒット化合物は Vpr の機能の中でアポトーシス能を阻害するが、G2 期停止能、Vpr のウイルス粒子への取り込みおよび安定性には影響しないこと、一般的な細胞周期、核移行およびアクチノマイシン誘導性 apoptosis に影響しないことを明らかにした。

今年度は、HIV-1 感染を阻害する低分子化合物の最適化研究を行った。27 種類の誘導体を合成し、基本骨格に比較してより低い細胞障害活性と非常に高い感染阻害活性を有するリード最適化化合物の創製に成功した。また、ヒット化合物誘導体の Vpr との結合、細胞内動態および体内動態および Vpr の核移行以外の機能への効果を解析した。

B. 研究方法

1. 抗ウイルス活性：健常人由来の血液から末梢血単核球 (PBMCs) を分画し、抗-CD14 抗体ビーズを用いて CD14 陽性細胞である

単球を分離し、Macrophage colony stimulation factor (M-CSF)を加えて1週間培養し、最終分化マクロファージとした。化合物の抗ウイルス活性はHIV-1感染マクロファージの上清を用いたp24ELISA法により測定した。また、TZMbl 細胞および健常人由来の血液から末梢血単核球 (PBMCs) を分画し、Con A およびサイトカイン IL2 で活性化した細胞に、HIV-1NL432を感染させ、感染二日間後に、細胞lysateのルシフェラーゼ活性を測定した。

2. セファロースビーズによる化合物の結合実験：光親和性リンカーのついたセファロースビーズにUV照射により、化合物を結合させる。Cos7細胞で発現・精製したFlag-mono red fluorescent protein (mRFP) 融合Vprを混合し、遠心により化合物に結合した蛋白を沈殿させ、SDS-PAGEにより泳動後にCoomassie Brilliant Blue (CBB) 染色により検出した。

3. SPR imaging：光親和性リンカーのついたガラスチップに化合物を固定させ、精製Flag-mRFP融合Vprとの結合を確認した。

4. Vprの機能解析：Flag-vpr/pME18neoベクターをHeLa細胞へ導入し、化合物のVprのアポトーシス誘導能への影響をcaspase-3活性を指標に、G₂期arrestへの影響をflow cytometry法により解析した。Vprの核移行能への影響は*in vitro* nuclear import assayにより解析した。

5. 細胞傷害試験：化合物の細胞傷害性活性をMTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド) 法により測定した。

6. Positron Emission Tomography (PET) イメージングによる動態解析：高速メチルカ反応により化合物に放射性炭素を導入し、健常なラットに投与し、体内動態解析した。

7. 蛍光標識プローブによる細胞内動態解析：化合物の1つの官能基に、蛍光色素 (fluorescein) を共有結合させて合成し、蛍光化合物を細胞に添加して培養後、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を用いていない。

C. 研究結果

1. 構造活性相関による誘導体の創製：

基本構造 H 化合物の最適化を進める目的で、構造活性相関解析に 27 種類の誘導体を創製した。

2. 誘導体の抗ウイルス効果：

まず、誘導体の細胞毒性を CD4 陽性 T 細胞株 Molt4 を用いてミトコンドリアの酵素活性を指標とした MTT 法により調べた。その結果、誘導体 9 種類 7-10, 12, 16, 17, 23, 27 は基本構造 H 化合物より細胞傷害性が低いことが明らかとなった。

次に、感染阻害効果のある薬剤をスクリーニングするために、まず、細胞株である TZMbl 細胞に HIV-1NL432 ウイルスを感染させ、各化合物を 100 μ M から 2 倍階段希釈し、トリプルに加え、二日間培養後、細胞 lysate のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、化合物 17、18、20、23 及び HemF-001 は基本構造 H 化合物より抑制効果が高かった。同様の結果は HIV-1IIIIB ウイルスでも得られた。

そこで、TZMbl 細胞で阻害効果の認められた化合物 H、17、18、20、23 及び HemF-001 に的を絞って、健常人由来の PBMCs を Con A およびサイトカイン IL2 で活性化し、HIV-1NL432 を感染させ、感染阻害効果を調べた。HemF-001、17、18 および 20 は高濃度で弱い阻害効果が認められた。

最終的に、健常人由来の血液から PBMCs を分画し、抗 CD14 抗体ビーズを用いて CD14 陽性細胞である単球を分離し、M-CSF を加えて 1 週間培養し、最終分化マクロファージとした。HIV-1NF462 を感染させ multiple round assay を行い、化合物 H、7、8、9、10、12、16~23 を加えて培養し、感染後 4 および 8 日後にそれぞれ培養上清を回収し、ELISA 法により HIV-1 構造タンパク質である p24 量を測定した。その結果、2 種類のリード最適化化合物 17 および 23 が基本構造 H 化合物に比較してマクロファージにおける著しく感染阻害効果が高いことが明らかとなった。これらの誘導体の IC⁵⁰ は nM レベルであった。

3. 誘導体の Vpr の機能に対する効果：

さらに、誘導体 17 と 23 の Vpr の機能に及ぼす効果を調べた。誘導体の Vpr の核移行阻害活性を、核移行再構築系である *in vitro* nuclear import assay により調べた。誘導体 17 および 23 は基本構造 H 化合物より強く Vpr の核移行を阻害した。次に、Vpr が誘導する G₂期 arrest 能への影響を flow cytometry により調べた。誘導体 17 と 23 はいずれの濃度 (1、5 および 10 μ M) におい

ても H 化合物と同様に、G₂期 arrest 能への効果は見られなかった。さらに、Vpr が誘発するアポトーシス能への影響を解析した。Vpr 発現ベクターを導入した HeLa 細胞に低分子化合物 1、5 および 10 μM 添加し 36 時間後に caspase-3 の活性を測定したところ、誘導体 17 の添加により濃度依存的に caspase-3 活性の低下が認められたが、誘導体 23 では変化が認められなかった。

4. 誘導体の Vpr との相互作用：

構造活性相関による最適化により得られた基本構造 H 化合物に比較して低い細胞障害活性と著しく高い阻害効果を有する 2 種類のリード最適化化合物 17 および 23 が Vpr と結合するかどうかを調べた。まず、光親和性リンカーのついたガラスチップに化合物 (7~12 及び 16~27) を固定化させ、精製 Flag-mRFP 融合 Vpr を添加して化合物との結合を調べた。その結果、化合物 11、18、23、26 と Vpr との結合が認められた。コントロールの mRFP との結合は全く見られなかった。次に、光親和性リンカーのついたセファロースビーズに誘導体 17 と 23 をそれぞれ導入し、精製 Flag-mRFP 融合 Vpr との結合の有無を調べた。その結果、Flag-mRFP 融合 Vpr はリンカーのみのビーズとは全く反応せず、誘導体 17 および 23 とより強く結合した。一方、コントロールの mRFP タンパク質は誘導体 17 および 23 と非常に弱い結合が認められた。

5. 誘導体の *in vitro* および *in vivo* における動態解析：

H 化合物が薬剤に適しているかどうかを調べるために、PET イメージングによる動態解析を行った。化合物に高速メチル化反応を用いて、放射性炭素を導入し、健康なラットに投与し、体内動態解析を行った。この化合物は若干肝臓への吸着が見られたが、特異的な吸着部位はなく腎臓から速やかに排泄された。

さらに、蛍光色素標識プローブの細胞内動態解析を試みた。化合物の 1 つの官能基に、細胞毒性の低い fluorescein を共有結合させて合成した。まず、蛍光化合物が H 化合物と同様に Vpr と Imp α の結合を阻害する活性を維持していることを、GST pull down 法を用いて確認した。次に、10 μM の濃度で HeLa 細胞の培養上清中に加えたところ、添加後 30 分から観察した最大の時間である 30 時間まで、主に細胞内と核膜に観察された。さらに、蛍光蛋白 Red Fluorescence Protein (RFP)

融合 Vpr を HeLa 細胞に発現させ、Vpr が核内に発現した 24 時間後に蛍光化合物を添加して 30 分間培養後に、Vpr の検出を試みた。Vpr 発現細胞における蛍光化合物の局在は Vpr の局在する核に変化していた。以上の結果は特異的に Vpr に結合する蛍光化合物によって、細胞内に発現した Vpr を検出できることを示唆している。

D. 考察

27 種類のリード最適化化合物の感染阻害実験を行った結果、IC⁵⁰ が 1 nmol 以下レベルの誘導体 2 種類が得られた。その SI は 80,000 以上および 51,400 以上であった。さらに、これらの誘導体は Vpr と結合することが立証された。今後はこの誘導体を基に最適化を目指す予定である。そのためには、Vpr/化合物複合体共結晶および光標識化 Vpr 研究を同時並行で行い、効率的に最適化を進めるようにすることが必要と思われる。

Vpr-Imp α の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬は、PET プローブおよび蛍光標識プローブを用いた *in vitro* および *in vivo* イメージングにより、細胞内への浸透性、安定性、局在性、さらに固体での動態が良好であることが明らかとなった。この結果は、同定された化合物は最適化研究により、医薬品候補化合物になるうる可能性を示唆している。

E. 結論

(A) Vpr と Imp α の結合を阻害するヒット化合物の基本骨格に基づき、構造活性相関により 27 種類の誘導体を合成し、その感染阻害実験を行った結果、IC⁵⁰ が数 nmol レベルのリード最適化化合物が得られた。

(B) PET プローブおよび蛍光標識プローブを用いた *in vitro* および *in vivo* イメージングにより、誘導体は細胞内への浸透性、安定性、局在性が良く、さらに健康な動物では特異的な吸着は認められず速やかに排泄されることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aida Y and Matsuda G. : Role of Vpr in HIV-1 nuclear import; therapeutic implications, *Current HIV-1 Research*, 7; 136-143, 2009

- 2) Zhang X and Aida Y. : HIV-1 Vpr: a novel role in regulating RNA splicing, *Current HIV-1 Research*, 7: 163-168, 2009
 - 3) 間陽子: インポートイン α を介したヒト免疫不全ウイルス 1 型 Vpr の核移行, *生科学*, 81: 720-725, 2009
 - 4) Suzuki T, Yamamoto N, Nonaka M, Takeshima S-n, Hashimoto Y, Matsuda G, Matsuyama M, Igarashi T, Miura T, Tanaka R, Kato S and Aida Y.: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin α interactions as a novel HIV-1 therapy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380: 838-843, 2009
 - 5) Nonaka M., Hashimoto Y., Takeshima S., and Aida Y.: The human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein and its carboxy-terminally truncated form induce apoptosis in tumor cells, *Cancer cell international*, 20, 2009
2. 学会発表
- 1) 間陽子: ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1)Vpr を標的にした抗ウイルス薬の創製、微生物分科会シンポジウム「低分子化合物による難治性疾患克服—ケミカルバイオロジーから創薬—」、第 147 回日本獣医学会学術集会、宇都宮、4 月 (2009)
 - 2) H. Miyatake, A. Sanjyo, N. Dohmae and Y. Aida, Crystal Structure of Human Importin α (Rch1): 15th International Conference Applications of Computer Algebra ACA 2009, Montréal, Québec, Canada, June 25-28, 2009
 - 3) 松田剛、橋本祥江、間陽子 : Human immunodeficiency virus 1(HIV-1)Vpr の構造変化による核膜結合と核移行の制御、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 10 月 (2009)
 - 4) 竹嶋伸之輔、野中瑞穂、橋本祥江、間陽子: ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1)Vpr の C 末欠変異体 C81 および野生型によって誘導されるヒト癌細胞に対するアポトーシスおよび細胞周期の制御の解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 10 月 (2009)
 - 5) 村上知行、萩原恭二、近藤恭光、薛光愛、武田英里、清水康夫、斉藤雄雄、長田裕之、間陽子: ヒト免疫不全ウイルス Vpr を標的とした新規抗ウイルス薬の開発、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、10 月 (2009)
 - 6) 三城明、辰巳祐子、宮武秀行、堂前直、松田剛、間陽子: 組み換え HIV-1Vpr 蛋白質の大腸菌を用いた大量発現と精製、日本ウイルス学会学術集会、東京、10 月 (2009)
 - 7) 間陽子、武田英里、石井英樹、北原玄太、鈴木正昭: HIV-1 アクセサリータンパク質の Vpr の核移行を阻害する小分子化合物の開発と評価、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、10 月 (2009)
 - 8) 間陽子、石井英樹、萩原恭二、鈴木辰徳、北原玄太、橋本祥江、野中瑞穂、松田剛、武田英里、薛光愛、山本典生、三浦智行、鈴木正昭: ヒト免疫不全ウイルス 1 型 HIV-1Vpr の新規核移行機序を標的とする創薬開発、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、10 月 (2009)
 - 9) 石井英樹、鈴木辰徳、松田剛、三浦智行、武田英里、間陽子、鈴木正昭: ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) アクセサリータンパク質 Vpr 検出用試薬の開発、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10 月 (2009)
 - 10) 間陽子 : ウイルス感染症への取り組み、第 16 回理事長ファンドワークショップ「創薬・医療技術基盤プログラムの始動に向けて」—創薬研究を支える基盤構築と創薬・医療技術シーズの戦略—岐阜、11 月 (2009)
 - 11) 間陽子: HIV-1□Vpr を標的にした新規抗エイズ薬の開発、文部科学省・日本大学学術研究高度化推進事業、オープン・リサーチ・センター整備事業公開シンポジウム「病原体抑制遺伝子の解明と感染症の制御」東京、2 月 (2010)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) 特許出願中
- 出願人: 独立行政法人理化学研究所
 発明者: 間陽子、鈴木正昭、石井英樹、鈴木辰徳、松田剛
 発明の名称: Vprタンパク質の検出方法及び検出用試薬
 出願番号: 特願 2009-158179号

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV-1 CA を標的とするアセンブリー阻害剤

分担研究者 森川裕子（北里大学 大学院感染制御科学府）

研究要旨

酵母 CytoTrap Two Hybrid 法を利用した Gag-Gag 相互作用反応系を阻害した低分子化合物 172A6 の抗 HIV 活性とその作用機序について解析した。HIV 感染 MT4 細胞および末梢血単核球に 172A6 を添加したところ、濃度依存的な HIV 複製抑制が認められた。HIV 複製の後期過程について解析するため、pNL43 あるいは gag-pol 発現プラスミドを 293T および HeLa 細胞にトランスフェクションして調べたところ、172A6 は Gag 蛋白の細胞内発現や形質膜輸送、また粒子産生を阻害しないことが判明した。しかし、精製 HIV CA 蛋白を用いた試験管内アセンブリー反応系に添加したところ、濃度依存的な抑制が認められた。前期過程について解析する目的で、シュードタイプの HIV, SIVmac239, MLV を作製し MT4 あるいは 293T 細胞に感染させたところ、172A6 は濃度依存的に HIV 複製を抑制したが、SIV や MLV を抑制しなかった。HIV/SIV の Gag ドメインキメラを用いて調べたところ、172A6 は SIV の CA ドメインをもつ SHIV の複製を抑制しないことが判明した。172A6 は HIV の脱殻過程を標的とする可能性が考えられた。

A. 研究目的

現在、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬、プロテアーゼ阻害薬が抗 HIV 薬として用いられている。しかし、これらの薬剤に対する交差耐性や多剤耐性ウイルスの出現が問題となっており、作用点の異なる抗 HIV 薬の開発が望まれる。我々は新たな抗 HIV 薬の標的として Gag 蛋白に注目し、酵母 CytoTrap Two Hybrid 法を利用して Gag-Gag 相互作用反応系を構築した。その反応系を用いて低分子化合物ライブラリー（20,000 化合物）を探索し、抗 HIV 活性を示した候補化合物 172A6 を見いだした。本研究では、その抗 HIV 活性を確認するとともに、作用機序の解析を行った。

B. 研究方法

1) 抗 HIV 活性

MT4 Luc 細胞に HIV-1 (HXB2 株) を感染させ、化合物 172A6 を添加した。細胞を可溶化し、Luc 活性を測定した。

CD8(+)細胞を除去したヒト末梢血単核球に HIV-1 (HXB2 株) を感染させ、化合物 172A6 存在下で培養した。経時的に培養上清中の HIV-1 p24CA 量を ELISA (Zeptomatrix 社) で定量した。

293T および HeLa 細胞に pHXB2 あるいは

pNL43 をトランスフェクションし、化合物 172A6 を添加した。細胞内 Gag 蛋白と培養上清中の精製 HIV 粒子を Western blotting で検出した。

MT4 および 293T 細胞に Luc reporter をもつシュードタイプの HIV, SIVmac239, MLV を感染させ、化合物 172A6 を添加した。細胞を可溶化し、Luc 活性を測定した。HIV(sMA) (MA を SIV 由来に置換した HIV)、HIV(sMACA) (MACA を SIV 由来に置換した HIV) のシュードタイプも同様に解析した。

2) 共焦点レーザー顕微鏡

HeLa 細胞に Gag-GFP を発現する pNL43 をトランスフェクションし、化合物 172A6 を添加した。

3) 試験管内 CA アセンブリー反応

精製 p24CA 蛋白（単量体）（20mM Tris (pH8), 500mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA) に化合物 172A6 を添加し、37°C で 1 時間加温した。遠心して反応産物と未反応産物と分画した。

（倫理面への配慮）

臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。遺伝子組換え実験については二種省令・二種告示に従った。

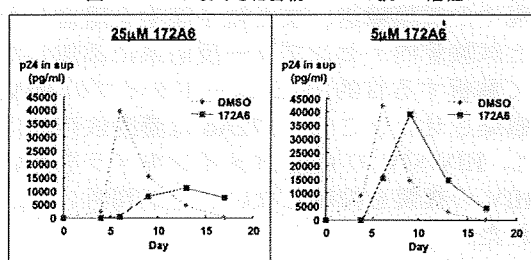
C. 研究結果

1) 化合物 172A6 の抗 HIV 活性

MT4 Luc 細胞 (Luc 恒常発現細胞で、HIV 感染により Luc 値が低下する) に HIV-1 (HXB2 株) を感染させ、化合物 172A6 を添加して培養したところ、濃度依存的な HIV 複製抑制が認められた。その IC50 は 25-50 μ M と高かった。

末梢血単核球に HIV-1 (HXB2 株) を感染させた化合物 172A6 を 5, 25 μ M で添加して培養したところ、5 μ M では HIV の増殖遅延が、25 μ M では HIV の顕著な増殖抑制が認められた (図 1)。

図 1. PBMCにおける化合物172A6の抗HIV活性

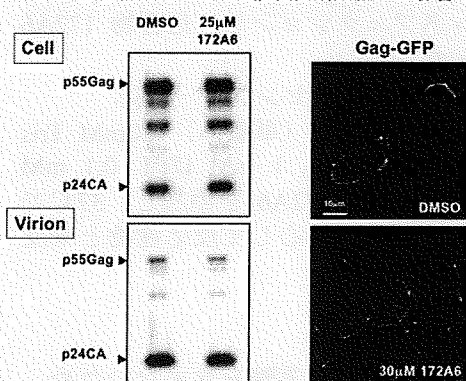


2) HIV 複製後期過程に対する化合物 172A6 の効果

293T および HeLa 細胞に pNL43 あるいは pNL43 をトランスフェクションし、化合物 172A6 を添加して培養した。子孫 HIV 粒子を精製し Western blotting で調べたところ、産生量に差はなかった (図 2)。

Gag-GFP を発現する pNL43 をトランスフェクションし、共焦点顕微鏡で Gag-GFP の細胞内局在を調べた。Gag-GFP は形質膜に観察され、化合物 172A6 添加による細胞内局在の変化はなかった (図 2)。

図 2. 化合物172A6のHIV複製後期過程への影響



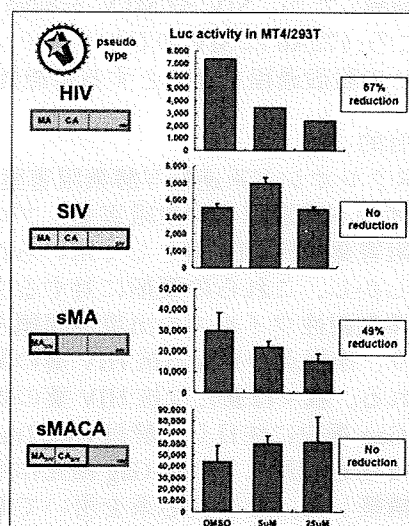
membrane flotation 法で調べたところ、化合物 172A6 添加による膜親和性の違いはなかった。

3) HIV 複製前期過程に対する化合物 172A6 の阻害活性

MT4 および 293T 細胞に Luc reporter をもつシールドタイプの HIV, SIVmac239, MLV を感染させ、化合物 172A6 を添加して培養した。細胞を可溶化し、Luc 活性を測定したところ、化合物 172A6 は濃度依存的に HIV 複製を抑制したが、SIV や MLV 複製は抑制しなかった (図 3)。

そこで、HIV/SIV の Gag ドメインキメラ SHIV、すなわち、HIV(sMA) (MA を SIV 由来に置換した HIV), HIV(sMACA) (MACA を SIV 由来に置換した HIV) を用いて調べたところ、化合物 172A6 は HIV(sMA) の複製を濃度依存的に抑制したが、HIV(sMACA)SIV の複製は抑制しないことが判明した (図 3)。

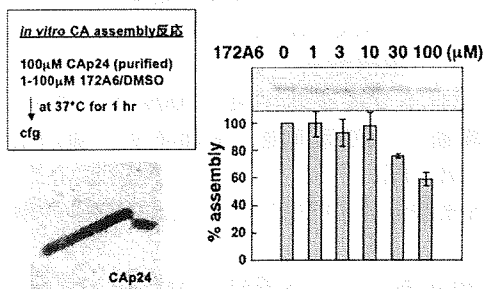
図 3. 172A6のHIV複製前期過程における阻害活性



4) 化合物 172A6 の CA-CA 相互作用の阻害活性

試験管内 CA アセンブリー反応系を用いた。100 μ M 精製 CA 蛋白に化合物 172A6 を添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間加温した。アセンブリー反応産物を遠心回収し Western blotting で調べたところ、172A6 濃度依存的な抑制が認められた (図 4)。

図4. 化合物172A6のCA-CA相互作用阻害

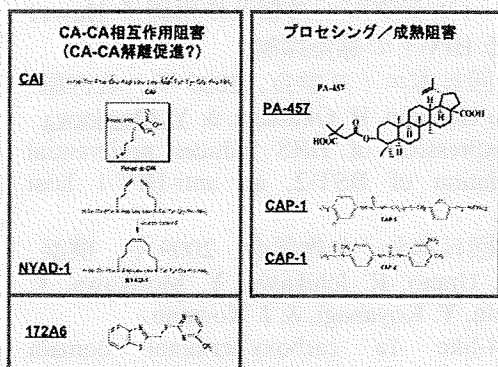


D. 考察

化合物 172A6 はその IC₅₀ は 25-50 μM と高かったが、PBMC や MT-4 細胞での HIV 複製を阻害した。作用点を調べたところ、HIV 複製の後期過程すなわち粒子形成過程に対する阻害活性はなかったが、前期過程を阻害した。予備実験では、逆転写反応産物や組込み産物の減少を確認している。化合物 172A6 の阻害活性は HIV 特異的であり、SIV や MLV に対してはなかった。この HIV/SIV 感受性の差を利用し、化合物 172A6 が標的とする領域を調べたところ、CA 蛋白領域であることが判明した。化合物 172A6 は精製 CA 蛋白を用いた試験管内 CA アセンブリー反応を濃度依存的に抑制したことから、化合物 172A6 は CA-CA 相互作用を弱める、すなわち脱殻を促進する可能性が考えられた。

HIV Gag 蛋白を標的とした阻害剤はいくつか (CAI, CAP1, 2, PA-457) 報告されている (図 5)。

図5. 化合物172A6と既報のGag阻害剤



CAP-1 は CA の N 末端ドメインと C 末端ドメインの interface に結合し、6 量体形成部位の構造を変化させ CA-CA 相互作用を阻害する (CAP-1: Kd=820 μM、CAP-2: Kd=52 μM)。PA-457 (分子量 584) は Gag 蛋白の CA-SP1 から CA への切断を阻害する (IC₅₀=10 nM)。これらの化合物は HIV 成熟

過程を作用点とするプロセッシング阻害剤である。一方、CAI は 12 残基のペプチドで CA の C 末端ドメインに結合し 2 量体形成部位を変化させ試験管内でのアセンブリー反応を阻害する (Kd=15 μM)。近年、この CAI に透過性ペプチドを付加した NYAD-1 (Kd<1 μM) を用いて作用点が調べられ、HIV の細胞内侵入後の段階であることが報告された。本研究の化合物 172A6 も試験管内 CA アセンブリー反応を抑制し、かつ HIV 複製の前期過程を作用点とすることから、類似の作用機序、恐らく CA キャプシドの脱殻過程を標的とする可能性が考えられた。化合物 172A6 の IC₅₀ 値は高いが、ペプチドではなく低分子化合物であること、また脱殻過程を標的とする可能性が高いことから、新規作用点をもつ抗 HIV 阻害化合物のリード化合物となるかもしれない。

E. 結論

低分子化合物 172A6 は IC₅₀ 値は高いが、HIV 複製の前期過程を阻害する活性、おそらく脱殻過程を標的とする抗 HIV 活性がある。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

論文発表

1) F. Mizukoshi, T. Yamamoto, Y. Mitsuki, K. Terahara, A. Kawana-Tachikawa, K. Kobayashi, A. Iwamoto, Y. Morikawa, and Y. Tsunetsugu-Yokota.

Activation of HIV-1 Gag-specific CD8⁺T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen.

Microbes Infect. 11 (2): 191-197 (2009)

2) Hideyoshi Fujii, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Mikiko Hamatake, Junko Tatsumi, T. Hoshino, Y. Morikawa, N. Yamamoto, and J. Komano.

Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamylmethyl ester inhibit RNaseH activity associated with HIV-1 reverse transcriptase.

J. Med. Chem. 52 (5): 1380-1387 (2009)

3) M. Nishi, A. Ryo, N. Tsurutani, K. Ohba, T. Sawasaki, R. Morishita, K. Perrem, I. Aoki, Y. Morikawa, and N. Yamamoto.

Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag.

FEBS Let 585 (8): 1243-1250 (2009)