

2009J20J8B

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

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

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 武田 哲

平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

総合研究報告

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

武田 哲

総合研究報告書

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

研究代表者：武田 哲（国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員）

研究要旨

HIV-1感染症の完全治癒が不可能な現在、多剤併用療法が定着し、疾病予後の改善に大きな成果をあげている。その反面、長期的治療ゆえに、長期的副作用や薬剤耐性ウイルスの出現に常に危惧しなければならない。このような困難を克服するためには、一つでも多く選択可能な、かつ既存のものとは異なった標的となる治療薬剤を開発することは非常に重要なことである。

我々の体には、本来レトロウイルスの増殖を抑制する生体宿主因子APOBEC3G（以下A3G）が発現している。しかし、HIV-1の場合、ウイルスタンパクVifを感染細胞で発現し、A3Gを細胞内より枯渇させる。そこで、私はVifのA3Gへの結合を阻害する（あるいはA3GをVifから保護する）化合物を見つけ出し、本来存在するA3Gの宿主防御機構を回復させる新規な作用機序の抗HIV-1薬剤の開発に結びつくような基礎研究を行う。

A. 研究目的

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

患者を救済することも重要な課題である。このような問題を打破するためにも、より多く選択可能な治療薬を開発することが必要である。さらに、作用点が異なる新規薬剤は併用することにより既存薬の投与量を抑えることができるため、薬剤耐性ウイルス出現のチャンスを低下させることができる。このようなことから、作用機序が既存のメカニズムと異なる新規抗HIV薬の開発を強力に推進することは重要であると考えられる。

HIVの宿主であるリンパ球には、本来、レトロウイルスの増殖を抑制する生体宿主因子APOBEC3G（以下、A3G）が発現している。しかし、HIV-1は、ウイルスタンパクVifを感染細胞で発現し、A3Gを細胞内より分解除去させ、宿主防御機構から逃れることができる。

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

B. 研究方法

(1) A3GとVifタンパクの結合における生化学的解析

A3Gタンパクをバキュロウイルスの発現系を利用して発現し、酵素活性をもつ野生型A3GとVifに結合しない変異型A3Gを精製した。A3Gと核酸あるいはVifへの結合実験には Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) を、核酸結合特性の解析には Fluorescence Polarization Binding Assay (FPBA) と Single-Molecule DNA Stretching Assay

(SMDSA) を行った。

(2) A3GとVifタンパクの結合阻害剤スクリーニング系の構築

バキュロウイルスの発現系を利用して、野生型A3GとVifに結合しない変異型A3G(D128K)タンパク、Vif(GSTタグつき)タンパクの3種を発現し、精製した。一方、A3GのC末端17アミノ酸に対する抗ウサギ血清を作製し、アフィニティーカラムにより抗A3G IgG抗体を精製・濃縮を行った。精製した抗A3G抗体を96穴プレートに固層化し、ELISA系を作製した。A3Gに結合したGST-Vifの検出は、HRP conjugated 抗GST-Tag mAbを用いて化学発光により定量化した。

(3) A3G/Vif発現細胞を用いたスクリーニング系の確立

細胞を用いたVif阻害剤をスクリーニングする系は、内在性のA3Gが発現していないHeLa細胞をもとに作製した。まず、A3Gを安定発現する細胞クローンを作製し、さらにHIV-1vif遺伝子を導入してVifタンパクも安定発現する細胞株を作製した。Vifの発現に関しては、細胞内発現量を調節する目的でTet-Off (Retro-X Tet-Off Advanced Inducible Expression System, Invitrogen) を用い、安定クローンの選別

中は Doxycycline を添加し Vif の発現を抑制した。

(4) 変異型 A3G(D128K)を導入した iPS 細胞の樹立

遺伝子組換えレンチウイルスを用い、iPS 細胞に変異型 A3G を導入する。変異型 A3G を発現する iPS 細胞を作製し、*in vivo* および *in vitro* でリンパ球あるいは樹状細胞に分化させ、HIV-1 に対して抵抗性を獲得するか確認する。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) A3G と Vif タンパクの結合における生化学的な特性の決定

A3G タンパクと核酸の結合は塩濃度に強く影響され、500 nM 以上の NaCl では解離反応が増加した。一方、Vif と A3G の結合には塩濃度による強い影響が認められなかった。

EDTA による A3G の核酸への影響や Deaminase 活性への影響は認められなかったが、1,10-Phenanthroline (Zn キレーター) は両活性を強く阻害した (IC₅₀ = 3 mM)。このことから、A3G の Zn 配位は A3G の生化学的活性をもつための構造維持に重要であることが推測された。Mg 濃度と pH の影響は A3G の核酸および Vif に対する結合に関して認められなかった。これらの一連の結果よりライブラリスクリーニング用の *in vitro* 結合実験用 ELISA 系に必要な至適条件が分かった。

(2) A3G と Vif の *in vitro* 結合 ELISA 系の確立とライブラリスクリーニング

生化学的な実験の結果を踏まえて、96 穴プレートスケールの ELISA 系を改良し確立した。原理は、固層化した A3G 抗体で A3G と GST-Vif タンパクの複合体をキャプチャーし、Horse Radish Peroxidase (HRP)-conjugated 抗 GST 抗体でサンドイッチした後、化学発光を用いて定量する。もし、結合を阻害する化合物 (ヒット化合物) が存在する場合、A3G/GST-Vif 複合体形成が阻害され GST-Vif がプレートにキャプチャーされず、化学発光量の減少が認められるという系を確立した。

(3) Vif の発現細胞系を用いた候補化合物の検索

A3G と Vif を発現する培養細胞系を確立した。まず、ドキシサイクリン(Dox)を細胞培養液に添加することにより、濃度依存的に HIV-1 Vif 発現量が調節し、かつ A3G (恒常的に発現)を同時に発現する細胞クローンを作製した。細胞クローン樹立中に添加していた Dox を除くことにより、経時的に Vif の発現が上昇し、A3G の発現の減少することがウエスタンブロットにより確認された。

(4) 変異型 A3G 発現 iPS 細胞の樹立

レンチウイルスベクターに変異型 A3G、IRES 配列および puromycin 耐性遺伝子を導入した物を作製した。このプラスミドを 293T 細胞に HIV の gag/pol 発現プラスミド、及び Rev 発現プラスミド、VSV-G 発現プラスミドとともに遺伝子導入し遺伝子組換えレンチウイルスを作製した。

iPS 細胞の準備ができ次第、感染させる予定である。

D. 考察

in vitro の結合実験系に関しては、使用する Vif の調製ロット間の違いが問題となったことが判明した。このため、単一ロットの Vif タンパク大量発現・精製の必要性が生じ、候補化合物のスクリーニング実験が遅延した。ロット間

の反応性の違いは、精製の際混在してくる微量の核酸断片(OD260/280 がロットごとに違っていた根拠から)などが原因であると考察された。細胞ベースのスクリーニング系に関しては、独自の系を構築することに成功した。これらの系を用いて、低分子化合物および放線菌・真菌ライブラリから候補化合物を見つけ出したいと考えている。また、変異型 A3G を導入した iPS 細胞の HIV-1 抵抗性についても検討したいと考えている。

E. 結論

ウイルスの構成因子(逆転写酵素など)やその複製に必須な生体因子(ケモカインレセプターなど)を阻害する既存の抗 HIV-1 薬剤とは全く異なり、生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発するための基礎研究を行っている。宿主の抗ウイルス因子である A3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び生化学的解析により両者の結合特性を解明し、新規抗 HIV-1 薬剤開発への新たな道を模索している。開発した系を用いてケミカルスクリーニングを行い、候補化合物を見出すことはできなかったが、スクリーニング系を学術論文などで広く公開することで情報を提供し将来の薬剤開発に繋がら

れると期待している。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田哲、杉浦互. AP
OBEC3GのHIV-1 Vif に依存したユビキチン
化サイトに関する研究.第22回日本エイズ学会.
2008. 大阪

2) 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田哲、杉浦互. HIV-1
Vif 依存的な APOBEC3G のユビキチン化サイ
トの同定. 第 56 回日本ウイルス学会. 2008 岡山

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

