

変異ウイルスのカニクイザル TRIM5 α 感受性を検討したところ、硫黄原子（システイン、メチオニン）や芳香環等の環状構造（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、プロリン）を持つ側鎖や疎水性の側鎖（ロイシン、イソロイシン、バリン）のアミノ酸の場合はカニクイザル TRIM5 α による感染抑制を受け、側鎖の小さなアミノ酸（グリシン、アラニン）や水酸基（セリン、スレオニン）やアミド基（アスパラギン、グルタミン）を持つアミノ酸や酸性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）の場合は感染抑制を受けないことが明らかになった。また、酸性アミノ酸の場合には、野生型 HIV-2 と比較してウイルスの増殖が約 10 分の 1 に低下していた。一方、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン）を 120 番目に持つ HIV-2 は増殖能を失っていた。

2. 変異ウイルスカプシドの三次元構造

20 種類のアミノ酸のうち、カニクイザル TRIM5 α により感染抑制を受けたプロリン、フェニルアラニン、ヒスチジン、およびイソロイシンと感染抑制を受けなかったアラニン、グルタミン、アスパラギン、およびグルタミン酸の 8 種類のアミノ酸について、ホモロジーモデリングによりその変異がカプシド全体の三次元構造に及ぼす影響を検討した。その結果、三次元構造上、120 番目のアミノ酸が存在する 6 番目と 7 番目のヘリックス間のループ (L6/7) の隣に位置する 4 番目と 5 番目のヘリックス間のループ (L4/5) の形状が、TRIM5 α 感受性と相関して変化することが予測された (図 1)。カニクイザル TRIM5 α により感染抑制を受けたプロリン、フェニルアラニン、ヒスチジン、およびイソロイシンの HIV-2 の L4/5 の形状はいずれも良く似通っていたが、感染抑制を受けなかったアラニン、グルタミン、アスパラギンの HIV-2 の L4/5 は感受性ウイルスの L4/5 の形状とは異なっていた。また、感染抑制を受けるウイルスのカプシドは L6/7 上の 119 番目のアルギニンと L4/5 上の 97 番目のアスパラギン酸間の

水素結合の形成頻度が低下していることが予測された(図 2)。そこで、感染抑制を受けないグルタミンの HIV-2 の 97 番目のアミノ酸を側鎖の短いアラニンに置換して 119 番目のアミノ酸との水素結合が形成されないようにしたところ、予想どおり TRIM5 α によって感染抑制を受ける様に変化した。従って、HIV-2 のカプシドの 120 番目のアミノ酸は 97 番目と 119 番目のアミノ酸間の水素結合形成に影響して L4/5 の構造維持に重要な役割を果たしており、L4/5 も含めた領域が TRIM5 α と結合することが示唆された。

一方、グルタミン酸の HIV-2 は TRIM5 α による感染抑制を受けないが、L4/5 の形状は TRIM5 α による感染抑制を受ける HIV-2 の L4/5 に似通っており (図 1)、97 番目と 119 番目のアミノ酸間の水素結合の形成頻度も低い (図 2)。従ってグルタミン酸の HIV-2 の場合、L4/5 の形状のみでは TRIM5 α 感受性が決まらず、120 番目のアミノ酸が存在する L6/7 もやはり TRIM5 α との結合に直接関与していることが示唆された。その場合、97 番目と 119 番目のアミノ酸間の水素結合の形成を阻害しても TRIM5 α 感受性は変化しないことが考えられる。そこで、97 番目のアスパラギン酸からアラニンへの置換をグルタミン酸の HIV-2 に導入したところ、予想通り、グルタミン酸の HIV-2 はグルタミンの HIV-2 とは異なり TRIM5 α による感染抑制を受けないままであった。

D. 考察

Ylinen らは、HIV-2 の L4/5 を持つ SIVmac が野生型 SIVmac とは異なりアカゲザル TRIM5 α による感染抑制を受けることを報告した。本研究からカニクイザルの TRIM5 α 感受性の決定基も L4/5 の三次元構造であることが示唆される。しかし、アカゲザルの TRIM5 α は広範なウイルス阻害を示し、カニクイザル TRIM5 α に耐性の HIV-2 株の感染も効率良く阻害する。カニクイザルとアカゲザルの TRIM5 α のウイルス阻害の特異性は SPRY 領域の 3 アミノ酸

の違い（アカゲザルはスレオニン-フェニルアラニン-プロリンの3アミノ酸がカニクイザルではグルタミンの1アミノ酸）によることを我々は以前報告した。アカゲザルの TRIM5 α が3アミノ酸の違いにより広範な抗ウイルス活性を示す理由は不明であるが、これらの3アミノ酸により TRIM5 α はより広範なウイルスカプシドに結合できるような可塑性を獲得しているのかも知れない。いずれにせよ、TRIM5 α 側の三次元構造についての情報を得ることが TRIM5 α とカプシドとの実際の結合様式を知るためには必要である。

E. 結論

HIV-2 のカプシドタンパク質の 120 番目が疎水性残基や環状構造を持つアミノ酸の場合はカニクイザル TRIM5 α に対して感受性、水酸基、アミド基あるいは酸性の残基を持つアミノ酸は耐性と相関することが明らかになった。ホモロジーモデリングによりこれらの変異のカプシド全体の三次元構造に及ぼす影響を検討した結果、TRIM5 α 感受性のカプシドは 97 番目と 119 番目のアミノ酸間の水素結合の形成頻度が低下し、隣接するヘリックス 4/5 ループ(L4/5)の形状がより安定することが予想された。従って、HIV-2 のカプシドの 120 番目のアミノ酸は 97 番目と 119 番目のアミノ酸間の水素結合形成に影響して L4/5 の構造維持に重要な役割を果たしており、L4/5 も含めた領域が TRIM5 α と結合することが示唆された。

F. 知的所有権の取得状況

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Onyango CO, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine*.

. 28S2:B60-B67,2010

- 2) Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha). *Reviews in Medical Virology*. 20:77-92,2010
- 3) Maegawa H, Miyamoto T, Sakuragi J, Shioda T, Nakayama EE. Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 α depends on combination of host and Virus. *Virology* 399:212-220, 2010
- 4) Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, NakayamaEE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, Kimura A. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS*. 24:1625-31,2010
- 5) Uttayamakul S, Likanonsakul S, Manosuthi W, Wichukchinda N, Kalambhaheti T, Nakayama EE, Shioda T, Khusmith S. Effects of CYP2B6 G516T polymorphisms on plasma efavirenz and nevirapine levels when co-administered with rifampicin in HIV/TB co-infected Thai adults. *AIDS Research and Therapy*.7:8, 2010
- 6) Kuroishi A, Bozek K, Shioda T, Nakayama EE. A single amino acid substitution of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein affects viral sensitivity to TRIM5alpha. *Retrovirology*. 7(1):58, 2010
- 7) Sakuragi JI, Sakuragi S, Ohishi M, Shioda T. Direct correlation between genome dimerization and recombination efficiency of HIV-1. *Microbes Infect*. 12(12-13):1002-11, 2010
- 8) Kono K, Song H, Yokoyama M, Sato H, Shioda T, Nakayama EE. Multiple sites in the N-terminal half of simian immunodeficiency virus capsid protein

contribute to evasion from rhesus monkey TRIM5 α -mediated restriction. *Retrovirology*. 7(1):72,2010

- 9) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection*. 2011 in press
- 10) Ohishi M, Nakano T, Sakuragi S, Shioda T, Sano K, Sakuragi JI. The relationship between HIV-1 genome RNA dimerization, virion maturation and infectivity. *Nucleic Acids Research*. 2011 in press

2. 学会発表等

- 1) 櫻木淳一：ポストバディングに何が起きているか？ 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日

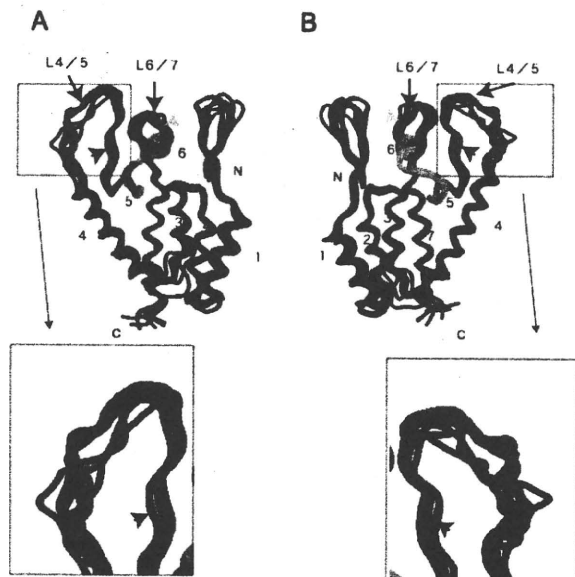


図1. TRIM5 α 感受性と相関する HIV-2 カプシドの L4/5 の形状。赤：感受性。青：耐性。紫：グルタミン酸の HIV-2。

- 2) 中山英美：TRIM5 α と HIV/SIV の種特異性 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月9日
- 3) 河野健、横山勝、佐藤裕徳、塩田達雄、中山 英美：アカゲザル TRIM5 α は HIV-2/SIVmac キャプシドの複数領域を認識する 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月8日
- 4) 黒石歩、塩田達雄、中山英美：HIV-1の TRIM5 α 感受性に影響するカプシド内の 1 アミノ酸置換 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月9日
- 5) 櫻木淳一、大石真久、中野隆史、櫻木小百合、佐野浩一、塩田達雄：HIV 粒子・ゲノム RNA の成熟ステップと感染能獲得との相関 第24回エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24日
- 6) 中山英美：HIV 感染制御因子 TRIM5 α 第24回エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24日

120th amino acid	Frequency of hydrogen bond (%)	Sensitivity to CM TRIM5 α
Pro (P)	44.6	Sensitive
Phe (F)	41.5	Sensitive
His (H)	42.99	Sensitive
Ile (I)	0	Sensitive
Ala (A)	64.47	Resistant
Gln (Q)	55.15	Resistant
Asn (N)	55.7	Resistant
Glu (E)	21.27	Resistant

図2. 各変異体の水素結合の頻度。

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 感染抑制因子とその解除因子の構造機能解析
HIV-1 Vif が結合する APOBEC3 の相互作用部位（インターフェイス）の構造を解明

研究分担者 岩谷靖雅 ((独)国立病院機構 名古屋医療センター 臨床研究センター)

研究要旨 宿主生体防御因子 APOBEC3 ファミリーを活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発につながる基礎的情報を提供するために、HIV-1 Vif が結合する APOBEC3 の相互作用部位（インターフェイス）の構造特性を解明する研究に関して取り組んだ。特に、APOBEC3 ファミリーの中で、Vif に結合し、かつ最も単純な構造（単量体ドメイン構造）をもつ APOBEC3C (A3C) を中心に研究を行った。A3C のモデル構造を構築し、Structure-Guided Mutagenesis を繰り返し行うことにより、HIV-1 Vif に対する感受性に影響を及ぼすアミノ酸（8 残基）を同定した。構造上、これらの残基は近接し、くぼみ（Cavity）を形成していることが示唆され、HIV-1 Vif のインターフェイス（少なくとも一部）であることが考えられる。さらに、このインターフェイスは APOBEC3F においても保存されていることが明らかになった。これらの結果から、Cavity に特異的に結合する化合物を見出し、A3F・Vif の結合を阻害する新規機序の薬剤開発に可能性を提示することができた。

A. 研究目的

HIV 感染症における多剤併用療法の進歩により治療の長期化が進んでいる。終生服薬の継続が求められる中、薬剤耐性ウイルスの出現や治療薬による副作用の問題を克服しなければならない。そのためには、少なくとも基礎研究レベルでは既存の薬に満足することなく、不断な薬剤開発は必要不可欠である。

今日の HIV 基礎研究および新規薬剤の開発における世界的な潮流として、ウイルスと宿主因子各々のタンパク分子間の相互作用を構造学的視点で明らかにし、さらに、そのデータをもとに各分子の相互作用部位（インターフェイス）の構造学的空間特性を捉えることによって、相互作用を阻害する薬あるいはインターフェイスに対する拮抗薬の探索が行われている。そこで、本研究班では新規作用機序による抗 HIV 治療薬の開発に繋がるタンパク相互作用のインターフェイスの探索とその構造の解明を目的に基礎的研究を行った。

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 APOBEC3 ファミリー（ヒトでは、A、B、C、DE、F、G、H の 7 種が存在し、HIV に

対しては F、G が重要であると考えられている）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、A3F や 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 APOBEC3 ファミリーの生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発につながるように、HIV-1 Vif が結合する APOBEC3 のインターフェイスの構造を解明することを目標とし、APOBEC3C を中心に HIV-1 Vif と APOBEC3 のタンパクの構造学的研究を行った。

B. 研究方法

A3C が唯一、Vif に結合し、かつ最も単純な構造（単量体 CTD 構造）をもつことから、A3C に変異導入し、HIV-1 Vif に対する感受性（細胞内分解性）について検討し、Vif の結合に重要なアミノ酸残基を検索した。具体的方法は図 1 に示す。まず、ヒト APOBEC3 ファミリーの各ドメイン（シチジンデアミナーゼドメイン CTD）に分け、全 CTD のアミノ酸配列を比較した。Vif に結合する群（APOBEC3C と、DE の 2nd CTD、F の 2nd CTD、G の 1st CTD）と、Vif が結合しない群（その他の CTD）において、各群間で共通して異

なるアミノ酸残基を見出した。さらに、A3C のモデル構造を計算科学的に構築し、タンパク表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基を検索した。構造情報を基に、変異体作製と Vif 感受性実験を繰り返し試行 (いわゆる、Structure-guided Mutagenesis) することにより、A3C の Vif 感受性に影響を及ぼすアミノ酸残基を同定した。

C. 研究結果

(1) A3C E106K 変異体の Vif 抵抗性

各 CTD の Vif 抵抗性群と感受性群間においてアミノ酸配列を比較し、Vif 感受性に差異に起因するアミノ酸を予測した。配列から予測したアミノ酸部位の変異型 A3C を作製し、Vif 感受性について図 1 の実験を行った。その結果、E106 を塩基性のアミノ酸 (リジン、アルギニン) に置換した A3C は完全な抵抗性を示した。

(2) A3C のモデル構造を利用した A3C 上のインターフェイス検索

A3C の E106 の 1 アミノ酸残基のみが HIV-1 Vif のインターフェイスである可能性が低いと考え、E106 以外の残基についても検討した。その際、モデル構造を利用した Structure-guided Mutagenesis を試行することにより、他の残基 (7 残基) に絞り込んだ (結果まとめ、図 3)。E106 と 7 残基は、モデル構造上近接していることが分かった。さらに、プルダウン法により、これらの残基の変異体が実際に Vif への結合能が低下したのか調べた。その結果、8 残基すべて、Vif への結合に重要であることが明らかになった。シチジンデアミナーゼ (酵素) 活性を測定した結果、8 残基の各変異体は野生型と同等の活性を保持していることが分かった。

(3) A3F の HIV-1 Vif インターフェイス

A3F は、A3G 同様、HIV-1 感染においては重要な細胞因子であることが知られている。A3C と A3F (2nd CTD) は、アミノ酸配列で約 80% の相同性を示す。さらに、Vif の結合様式も同じであるという他グループの結果から、A3C の結果から A3F の Vif インターフェイスについて解析した。A3C 同様、図 1 の方法により、A3C で同定した 8 残基に相当する A3F の変異体を作製し、Vif 感受性を調べた。その結果、A3F においても 8 残基

が重要であり、プルダウン法により Vif の結合に重要であることが明らかになった。I 以上のことから、同定した 8 残基が HIV-1 Vif のインターフェイスを形成していることが示唆された。さらに、これらの変異体は、野生型 HIV-1 と *vif* 欠損 HIV-1 に対して同等な抗ウイルス効果を示した。さらに、興味深いことに、A3F のモデル構造上、Vif 結合領域は、A3C のインターフェイスと似ていることが考えられた。

(4) A3C と A3F の HIV-1 Vif インターフェイスのモデル構造上の比較

A3C の Vif のインターフェイスが、モデル構造上、くぼみ (Cavity) を形成している部位とほぼ一致していることが分かった (図 2)。Cavity は、構築したモデル構造を基に、CASTp (computed atlas of surface topography of proteins) (Nucleic Acid Research, 34:W116-W118) プログラムを用いて算出した。さらに、この Cavity は、A3F 上の Vif インターフェイス上にも酷似した構造を形成していることが予測された。

D. 考察

モデル構造構築技術 (計算科学) と実際の生化学実験を駆使して、A3C と A3F の HIV-1 Vif の結合領域 (インターフェイス) を見出すことに成功した。今回同定したアミノ酸残基同定法では、側鎖の変換によって Vif への結合を判定しているため、インターフェイス近辺のペプチド鎖のバックボーンも Vif の結合に関与している可能性を調べることができない。そのため、同定した 8 残基は Vif のインターフェイスを構成しているが全てではないという可能性を考慮しなければならない。

モデル構造上、同定したインターフェイスが Cavity を形成していることから、新たな阻害剤開発の可能性が生まれた。つまり、Cavity に特異的に結合する低分子化合物をデザインし、A3C や A3F が Vif と結合することを阻害する化合物を見出すことにより、HIV 感染細胞内で Vif によって宿主防御因子である A3F の分解を抑制する化合物を探索する。このような研究を通して、A3F の本来の防御機構を利用して HIV の増殖を抑制するという新規な機序の治療薬

開発の道が開ける可能性があると考えられる。そのためにも、X線構造解析を利用したA3Cの実構造の決定をしなければならない。今年度、チャレンジし続けて達成できなかったが(図4)、次年度はA3Cタンパクの結晶化と構造決定を実現したいと強く考えている。

E. 結論

A3Cのモデル構造を構築し、Structure-Guided Mutagenesisを行うことにより、HIV-1 Vifに対する感受性に影響を及ぼすアミノ酸(8残基)を同定した。構造上、これらの残基は近接し、くぼみ(Cavity)を形成していることが示唆され、HIV-1 Vifのインターフェイス(少なくとも一部)であることが考えられる。さらに、このインターフェイスはA3Fにおいても保存されていることが明らかになった。これらの結果を基に、Cavityに特異的に結合する化合物を見出し、A3F・Vifの結合を阻害する新規機序の薬剤開発に新たな可能性を提示することができた。

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 原著論文による発表 (予定を含む)
1: Ibe, S, Yokomaku, Y, Shiino, T, Tanaka, R, Hattori, J, Fujisaki, S, Iwatani, Y, Mamiya, N, Utsumi, M, Kato, S, Hamaguchi, M, Sugiura, W. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr.* (2010) 54:241-247
- 2: Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W, Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* (2011). *in press*

2. 学会発表等

国内発表

- 1 岩谷靖雅: 宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月
- 2 松永智子、小島良績、澤崎達也、森下了、佐久間龍太、岩谷靖雅、杉浦互、山本直樹、梁明秀: コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた新規ガンマレトロウイルス XMRV プロテアーゼの解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月
- 3 吉居廣朗、北村紳悟、前島雅美、杉浦互、岩谷靖雅: リンパ球由来細胞株における vif 欠損 HIV に対する異なる感受性は Stat1 活性化状態に相関する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月
- 4 北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦互、岩谷靖雅: APOBEC3C における HIV-1 Vif に対する感受性を決定する領域の探索. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月
- 5 岩谷靖雅、北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦互: HIV-1 Vif 感受性及びウイルス粒子への取り込みに関する APOBEC3C の機能ドメインの探索. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月
- 6 吉居廣朗、前島雅美、北村紳悟、横幕能行、杉浦互、岩谷靖雅: 抗 HIV 宿主因子 APOBEC3 ファミリーの細胞依存的な発現調節機構の解明. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月
- 7 伊部史朗、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、加藤真吾、杉浦互: 抗レトロウイルス療法のモニタリングのための plasma HIV-2 viral load 測定系の確立. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月
- 8 横幕能行、今村淳治、平野淳、木下枝理、柴田雅章、服部純子、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦互: 名古屋医療センターにおける etravirine の使用状況と効果および適応に関する検討. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月
- 9 奥村かおる、横幕能行、三和治美、山田由美子、杉浦互、岩谷靖雅、平野淳、木下枝理: ベナンボックス吸入時の苦味の軽減に対するハッカ飴の使用とその効果 第 2 報-他

の有効な手段を探すためのハッカの有効性の検証- 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月

国際発表

1 Iwatani Y, Liu L, Chan DS, Yoshii H, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W: Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation. Cold Spring Harbor Laboratory 2010 Annual Meeting on Retroviruses. New York, NY. USA. 2010. May 3
 2 Yoshii H, Kitamura S, Sugiura W, Iwatani Y: Constitutive activation of Stat1 causes spontaneous APOBEC3G

expression, which determines permissive phenotype against *vif*-deficient HIV-1 replication in T-cell lines. Cold Spring Harbor Laboratory 2010 Annual Meeting on Retroviruses. New York, NY. USA. 2010. May 3
 Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W: Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation near the C-terminal end. The 5th JAPAN-GERMANY HIV/AIDS Symposium, Tokyo, Japan. 2010. May

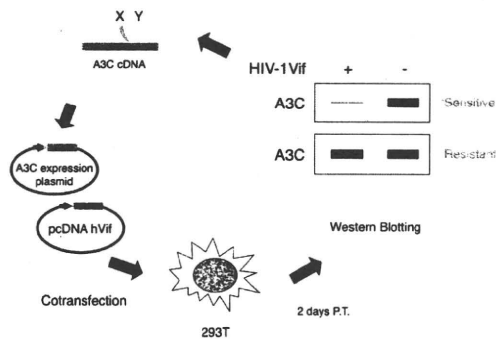


図1 Vif に対する抵抗性を示す A3C 変異体の検索方法

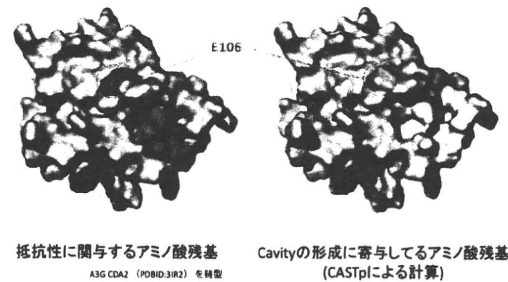


図3 HIV-1 Vif に感受性に関与するアミノ酸残基 (E106 と他7残基) はお互いに近接し、Cavity を形成するアミノ酸と一致している

WT	sensitive	Surface 30	resistant	Surface 60	sensitive
Q87R	sensitive	Surface 31	resistant	Surface 61	sensitive
E103R	sensitive	Surface 32	resistant	Surface 62	sensitive
V104L	sensitive	Surface 33	resistant	Surface 63	sensitive
A105R	sensitive	Surface 34	sensitive	Surface 64	sensitive
E106A	partial	Surface 35	resistant	Surface 65	sensitive
E106K	resistant	Surface 36	resistant	Surface 66	partial
A105R/E106A	partial	Surface 37	sensitive	Surface 67	resistant
A105S	sensitive	Surface 38	sensitive	Surface 68	sensitive
R116E/R117P	sensitive	Surface 39	sensitive	Surface 69	sensitive
R116E/R117P/R117S	sensitive	Surface 40	resistant	Surface 70	sensitive
R117R	sensitive	Surface 41	partial	Surface 71	resistant
T117R	sensitive	Surface 42	sensitive	Surface 72	sensitive
F119A	sensitive	Surface 43	sensitive	Surface 73	sensitive
T120A	resistant	Surface 44	sensitive	Surface 74	sensitive
F115S/T120A	sensitive	Surface 45	sensitive	Surface 75	sensitive
R122A	sensitive	Surface 46	partial	Surface 76	sensitive
L123A	sensitive	Surface 47	sensitive	Surface 77	sensitive
C130A	partial	Surface 48	partial	Surface 78	sensitive
C130L	sensitive	Surface 49	resistant	Surface 79	sensitive
Q132A	sensitive	Surface 50	partial	Surface 80	sensitive
Q134A	sensitive	Surface 51	resistant	Surface 81	sensitive
S137M	sensitive	Surface 52	resistant	Surface 82	sensitive
S137R	sensitive	Surface 53	sensitive	Surface 83	sensitive
Q140D	sensitive	Surface 54	resistant	Surface 84	sensitive
E141A	sensitive	Surface 55	sensitive	Surface 85	sensitive
Surface 16	sensitive	Surface 56	partial	Surface 86	sensitive
Surface 27	sensitive	Surface 57	partial	Surface 87	sensitive
Surface 28	resistant	Surface 58	partial		
Surface 29	sensitive	Surface 59	sensitive		

図2 A3C の変異体と HIV-1 Vif に対する感受性 (まとめ)

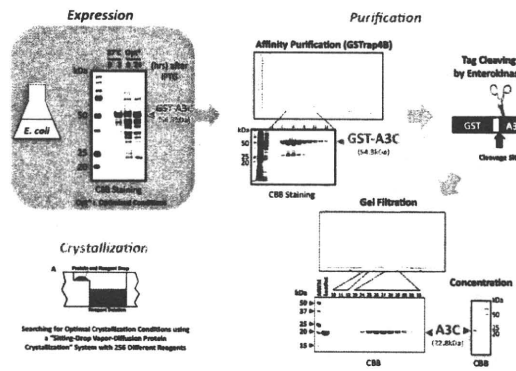


図4 A3C タンパク構造決定に向けて(A3Cの発現・精製・結晶化方法)

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 感染制御因子の構造機能解析

分担研究者 村上 努（国立感染症研究所 エイズ研究センター）

協力研究者 竹村太地郎（同上）

研究要旨: 今年度は、HIV-1 CA 部分ペプチドの細胞内導入の予備的研究として、MA 部分ペプチドの細胞内導入による抗 HIV-1 活性試験を行った。その結果、Octa-Arg を付加した細胞膜透過性ペプチドの多くは EC50 で数 uM から数十 uM の範囲で X4、また大部分の場合 R5 の HIV-1 複製を阻害した。試験したペプチドの作用点をおおまかに知るためにおこなった time of addition 実験の結果、それらの作用点は HIV-1 侵入の段階に存在することが示唆された。もう一つのテーマであるサイクロフィリン A (CypA) の HIV-1 複製における機能解明の実験では、CypA の HIV-1 複製における機能に異性化酵素活性が必要か否かを明らかにすることを目的として、CypA の異性化酵素活性部位に点変異を導入した CypA 変異体を作製した。HIV-1 粒子への取り込み量から推測される CypA 変異体と CA の結合効率は H126A > S99A, wild type > R55A, S99T であった。現在これらの CypA 変異体の恒常発現細胞株を作製中であり、今後これらの細胞株を用いて HIV-1 複製前期過程の解析を進めていく予定である。

A. 研究目的

本研究の目的は、1) HIV-1CA 部分ペプチドライブラリーのスクリーニングち部分ペプチドと相互作用する宿主因子の探索・同定、2) サイクロフィリン A (CypA) 依存性 HIV-1 感染メカニズムの解明の2つである。今年度は、1) については、HIV-1 CA 部分ペプチドの細胞内導入の予備的研究として、MA 部分ペプチドの細胞内導入による抗 HIV-1 活性試験を行った。一方、2) については、CypA の HIV-1 複製における機能に異性化酵素活性が必要か否かを明らかにすることを目的として、CypA の異性化酵素活性部位に点変異を導入した CypA 変異体を作製し、HIV-1 粒子への取り込み量から CypA 変異体と CA の結合を推定した。

B. 研究方法

- (1) 抗 HIV-1 活性測定: 標的細胞 MT-4 と X4 HIV-1 である NL4-3 の感染系もしくは、標的細胞 PM1/CCR5 と R5HIV-1 である NL(AD8)または JR-CSF の感染系で行った。
- (2) MA 部分ペプチド (東京医科歯科大玉村啓和先生合成): MA の N 末より 15 残基ずつ 5 残基ずつオーバーラップさせて合成した。Octa-Arg を C 末に付与した細胞膜透過性ペプチドと付与しないコントロールペプチドのセットを調製した。
- (3) 薬剤の time of addition 実験: MT-4 細胞を使用し、NL4-3 を MOI=0.5 で感染させて行った。コントロール薬剤として、AMD3100、AZT、SQV を使用した。
- (4) CypA 変異体発現プラスミドの作製: PCR を用いた点変異導入法を用いて、R55A (アミノ酸配列で 55 番目の Arg を Ala に置換)、H126A、S99A、S99T の各

変異 CypA 発現プラスミドを作製した。この時、CypA shRNA 非感受性 CypA (CypA5*) 発現プラスミドをテンプレートとし、この後の内在性 CypA の shRNA によるノックダウンと変異 CypA の発現を同時に行うことを可能とした。また変異 CypA には HA タグを付加し、ウエスタンブロット法で内在性 CypA との区別が可能である。

(5) CypA 変異体の発現と HIV-1 CA との結合効率の推定： 作製した変異 CypA 発現プラスミドを HIV-1 pNL4-3 とともに 293T 細胞へトランスフェクションした。48 時間後に培養上清、細胞をそれぞれ回収し両サンプルについてウエスタンブロット法による CypA、ウイルス蛋白質量の解析を行った。さらに培養上清中のウイルス量を p24 ELISA によって定量し、TZM-bl 細胞を標的細胞として用い感染価の評価を行った。

(倫理面での配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

(1) コントロールペプチドの抗 HIV-1 活性： C6 と C9 で中程度の抗 HIV-1 活性が認められた。C9 は X4, R5 に対してほぼ同程度の抗 HIV-1 活性を示したが、C6 では X4 と比較して R5 に対する活性が弱かった (表 1)。

(2) コントロールペプチドの time of addition 試験：C9 は AMD3100 とほぼ同じ阻害のタイムコースを示した。一方、C6 は温度をシフトしてからだらだらと阻害活性が落ちていた (図 1)。

(3) 膜透過型ペプチドの抗 HIV-1 活性： Octa-Arg を付加した細胞膜透過性ペプチドの多くは EC50 で数 uM から数十 uM の範囲で X4、また大部分の場合 R5 の HIV-1 複製を阻害した。中でも、L8, L9 は細胞毒性の強かったが、抗 HIV-1 活性の EC50 の X4, R5 もともに数 uM であった (表 2)。

(4) 膜透過型ペプチドの time of addition 試験：L8, L11, L13 について行った。いずれのペプチドも AMD3100 とほぼ同じ阻害のタイムコースを示した (図 2)。

(5) CypA 変異体の発現と HIV-1 CA との結合効率の推定： 生された HIV-1 粒子への変異 CypA 取り込み量より変異 CypA と CA の結合は H126A > S99A, wild type > R55A, S99T であると推定された。また、産生されたウイルス量、その感染能に大きな差異は認められず、CypA 変異体は HIV-1 の粒子形成や成熟の段階を阻害などはしなかった (図 3)。

D. 考察

1) 細胞膜透過性を付与した MA 部分ペプチドの抗 HIV-1 の作用点は予想に反して HIV-1 侵入過程に存在した。
2) H126A が CA との結合能を有し、R55A では低下することは既報の結果と一致したが、S99T では既報と異なり結合能が低下した。(S99A については報告が無い。) これは既報が基質として 4~6 アミノ酸のペプチドを用いた実験系を用いているのに対し、我々は全長の HIV-1 を用いているためと考えている。CypA が標的とするウイルス蛋白質は CA のみではないことが我々の別の研究からも推測されている。HIV-1 複製における CypA の機能の解明に、これまで盛んに行われてきた CA の変異体を用いることに加えて CypA の各種変異体を用いることは有効な手段となると考えられる。

E. 結論

1) MA の部分ペプチドに細胞膜透過性を付与することにより、HIV-1 の複製を阻害できることを明らかにした。
2) CypA の HIV-1 複製における機能に異性化酵素活性が必要か否かを明らかにするために有用な CypA の作製を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murakami, T and N. Yamamoto. The role of CXCR4 in HIV infection and its potential as a therapeutic target (Review). *Future Microbiology*, 5 (7): 1025-1039, 2010.
- 2) Nakahara, T., W. Nomura, K. Ohba, A. Ohya, T. Tanaka, C. Hashimoto, T. Narumi, T. Murakami, N. Yamamoto and H. Tamamura. 2010. Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins Leads to Synthetic Antigen Molecules Inducing Neutralizing Antibodies. *Bioconjugate Chem.*, 21(4):709-714, 2010.
- 3) Aoki, T., S. Shimizu, E. Urano, Y. Futahashi, M. Hamatake, H. Tamamura, K. Terashima, T. Murakami, N. Yamamoto, and J. Komano. Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55Gag. *Gene Therapy*, 17:1124-1133, 2010.
- 4) Yanagita, H., E. Urano, K. Mastumoto, R. Ichikawa, Y. Takaesu, M. Ogata, T. Murakami, H. Wu, J. Chiba, J. Komano, and T. Hosino. Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.* 19:816-825, 2011.
- 5) Tanaka, T., T. Narumi, T. Ozaki, A. Sohma, N. Ohashi, C. Hashimoto, K. Itotani, W. Nomura, T. Murakami, N. Yamamoto, and H. Tamamura. Azamacrocyclic-metal complexes as CXCR4 antagonists. *Chem. Med. Chem.*, In press.

2. 学会発表

- 1) 小森谷真央、村上 努、鈴木慎太郎、鳴海哲夫、野村 涉、山本直樹、玉村啓和。

HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出第 5 回ケミカルバイオロジー学会年会、横浜、2010 年 5 月 18-19 日

2) 竹村太地郎、川又美弥子、村上 努。CypA 非依存的に増殖する HIV-1 変異株の分離第 58 回日本ウイルス学会学術集会・総会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日

3) 村上 努、小森谷真央、鈴木慎太郎、橋本智恵、鳴海哲夫、野村 涉、山本直樹、玉村啓和。細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーを用いた新規抗 HIV-1 ペプチドの探索と創出 第 58 回日本ウイルス学会学術集会・総会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日

4) 竹村太地郎、村上 努、Kewal Ramani Vineet。HIV-1 感染における CypA の機能解析第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月 24-26 日

5) 小森谷真央、村上 努、鈴木慎太郎、橋本知恵、鳴海哲夫、野村 涉、山本直樹、玉村啓和。HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010 年 11 月 24-26 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし。

表1.コントロールペプチドの抗HIV-1活性

MA peptide	sequence	MT-4 cell		PM1/CCR5 cell	
		EC50 (μM)	EC50 (μM)	EC50 (μM)	EC50 (μM)
Control(C)	HAGDRAVYLSGGLDKGC-NH ₂ 1-15	>50	ND	ND	ND
C2	Ac-GELDKWEKRLRPGGGC-NH ₂ 11-25	>50	ND	ND	ND
C3	Ac-LRPGGGKQKRLKHWGGC-NH ₂ 21-35	>50	ND	ND	ND
C4	Ac-LKHWASRELERFAGC-NH ₂ 31-45	no inh. at 12.5 μM	ND	ND	ND
C5	Ac-LERFANPGLLETSEGC-NH ₂ 41-55	>50	ND	ND	ND
C6	Ac-LETSEGRGLGGLGGC-NH ₂ 51-65	41	37	34% inh. at 0.23 μM	25% inh. at 55 μM
C7	Ac-LGGLQPLGTGSEELG-NH ₂ 61-75	>50	ND	ND	ND
C8	Ac-GSEELRSLNTWALG-NH ₂ 71-85	>50	ND	ND	ND
C9	Ac-TAVLYSVHQRDHWKGC-NH ₂ 81-95	ND	28	13	2.1
C10	Ac-RDWDYKALDKKGC-NH ₂ 91-105	no inh. at 12.5 μM	ND	ND	ND
C11	Ac-LDKIEEGRKSKKGGC-NH ₂ 101-115	>50	ND	ND	ND
C12	Ac-DTGNWQGAADTGNAGC-NH ₂ 111-125	>50	ND	ND	ND
ACT	RT inhibitor	0.02	0.024	0.458	0.17
Virivac (SCH-D)	CCR5 inhibitor	ND	ND	0.028	0.0014
AMD3100	CXCR4 inhibitor	ND	ND	no inh. at 20 μM	5.5

C6とC9のみ抗HIV-1活性(ただし、C6は抗R5HIV-1活性が弱い)

図3.Co-transfection with NL4-3 & HA-CypA mt constructs into 293T cells (CypA変異体とHIV-1 CAの結合効率の推定)

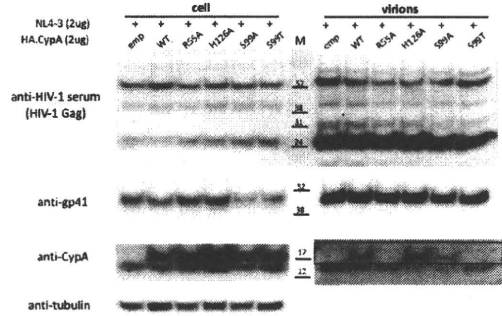
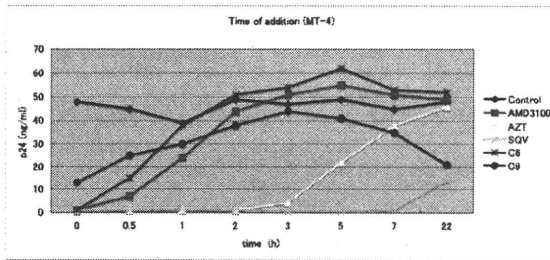


図1.Time of addition study (コントロールペプチド)

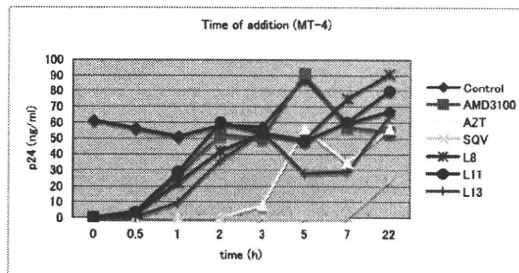


標的細胞: MT-4, MOI=0.5で感染(4°C, 1 h & wash → 37°C)
→上記のtimingで薬剤を添加 → 30 h後の培養上清中のp24 CA濃度をELISAにて測定

表2.細胞膜透過性ペプチドの抗HIV-1活性

MA peptide	sequence	MT-4 cell		PM1/CCR5 cell	
		EC50 (μM)	EC50 (μM)	EC50 (μM)	EC50 (μM)
Lipopept(L)	HAGDRAVYLSGGLDKGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 1-15	33	32	30	40
L2	Ac-GELDKWEKRLRPGGGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 11-25	no inh. at 25 μM	ND	ND	ND
L3	Ac-LRPGGGKQKRLKHWGGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 21-35	no inh. at 25 μM	ND	ND	ND
L4	Ac-LKHWASRELERFAGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 31-45	no inh. at 3.13 μM	ND	ND	ND
L5	Ac-LERFANPGLLETSEGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 41-55	40	18% inh. at 50 μM	42% inh. at 50 μM	42
L6	Ac-LETSEGRGLGGLGGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 51-65	33	37	49% inh. at 50 μM	31
L7	Ac-LGGLQPLGTGSEELG(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 61-75	54	35	37% inh. at 50 μM	35% inh. at 50 μM
L8	Ac-GSEELRSLNTWALG(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 71-85	2.0	2.2	5.8	7.8
L9	Ac-TAVLYSVHQRDHWKGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 81-95	2.2	29% inh. at 1.56 μM	45% inh. at 50 μM	0.58
L10	Ac-RDWDYKALDKKGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 91-105	37	21	42% inh. at 50 μM	27
L11	Ac-LDKIEEGRKSKKGGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 101-115	15	21	17% inh. at 25 μM	23
L12	Ac-DTGNWQGAADTGNAGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 111-125	38	41	30% inh. at 25 μM	27
L13	Ac-DTGNWQGAADTGNAGC(CH ₂) ₂ -CO-R _h -NH ₂ 121-132	18	21	0.43	11
AZT	RT inhibitor	0.02	0.024	0.458	0.17
Virivac (SCH-D)	CCR5 inhibitor	ND	ND	0.028	0.0014
AMD3100	CXCR4 inhibitor	ND	ND	no inh. at 20 μM	5.5

図2.Time of addition study (膜透過性ペプチド)



標的細胞: MT-4, MOI=0.5で感染(4°C, 1 h & wash → 37°C)
→上記のtimingで薬剤を添加 → 30 h後の培養上清中のp24 CA濃度をELISAにて測定

平成 22 年度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

研究課題：インテグラーゼの多量体形成と機能相関

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

我々は昨年度、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 Gemin2 が逆転写酵素活性を直接増強することを確認した。本年度は、インテグラーゼの Gemin2 結合責任モチーフを同定し、Gemin2 結合能を欠損する点変異体解析により、両者の相互作用がウイルス複製過程においても重要であることを確認した。また、インテグラーゼ変異体の細胞内発現系による性状解析より、逆転写過程におけるインテグラーゼの機能には 4 量体形成が重要であることを示した。さらに、monomeric-Kusabira-Green 発現系を用いた細胞内インテグラーゼ相互作用の評価系を樹立した。

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、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およびウイルス複製における意義を明確にした。本研究では、本研究では逆転写過程におけるインテグラーゼの多量体形成とその機能相関を詳細に解析し、インテグラーゼを標的とした逆転写阻害剤開発にむけた分子基盤を築くことを目的とした。

B. 研究方法

①種々の欠損をもつリコンビナント His-インテグラーゼ蛋白を調整し、Gemin2 との相互作用をニッケルカラムを用いたプルダウン法により解析した。

② Gemin2 結合能を失った IN 変異体 (V56, A57G) を HIV-1 クローンに導入後、シュドタイプウイルスアッセイ系によりその影

響を評価した

③インテグラーゼ発現ベクターを構築し、細胞内におけるインテグラーゼの多量体形成能を DDSSP 法により、また、Gemin2 との相互作用をプルダウン法により解析した。

④ monomeric-Kusabira-Green 発現系 (MBL 社) を用いた細胞内 IN 多量体形成の評価系の確立を試みた。

(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) Gemin2 結合に重要なアミノ酸配列の同定を行い、IN の中央酵素活性ドメイン (CCD) 内 (Val56, Ala57) および C 末ドメイン (CTD) 内 (Leu241, Leu242) に 2 カ所同定した (Fig. 1)。

2) 上記の Gemin2 結合に重要なアミノ酸残基に点変異を導入し、Gemin2 結合能を失った IN 変異体をシュドタイプウイルスアッセ

イ系により評価したところ、ウイルスの感染性はほぼ完全に失われ、その阻害作用点が逆転写過程であることを確認した (Fig. 2)。

3) Gemin2 結合部位以外にも、逆転写過程に致命的影響を及ぼす IN 変異体の性状解析をおこなったところいずれの変異も Gemin2 との相互作用の低下を認めた (Fig. 3)。さらに、これらの変異は IN の多量体形成能を顕著に低下させることが示された (Fig. 4 left)。また、野生体 IN でも Gemin2 をノックダウンさせた細胞では、4 量体形成能が顕著に低下することもわかった (Fig. 4, right)。

4) monomeric-Kusabira-Green とインテグラーゼの融合発現ベクターを 4 種類構築し、種々の組み合わせの検討した。CMV プロモータ下流に β グロビンイントロン配列を挿入することで有意な相互作用シグナルを得ることができた。興味深いことに、インテグラーゼの順向きおよび逆向きの組み合わせの両方で相互作用シグナルを検出した。インテグラーゼの順向きのシグナルは逆向きの 2 倍程度高い値を示した (Fig. 5)。

D. 考察

逆転写過程における IN の機能には 4 量体形成が重要であることが判明した。monomeric-Kusabira-Greenh 発現系においてインテグラーゼの順向きでのシグナルが 2 両体形成を逆向きでのシグナルが 4 両体形成を反映している可能性が示唆されたが、今後、構造学的解析に基づく変異体の導入等によりさらなる確認実験が必要である。以上、本研究結果を基盤とし、IN の多量体形成の構造と機能相関をさらに詳細に検討し、IN を標的とした逆転写過程阻害剤の探索を試みたい。

E. 結論

インテグラーゼと Gemin2 の相互作用はウイルス複製においても重要であり、さらにこの逆転写過程における IN の機能には 4 量体形成とその維持が重要である。

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. Yamamoto, S.P., K. Okawa, T. Nakano, K. Sano,

K. Ogawa; T. Masuda, Y. Morikawa, Y. Koyanagi,

Y. Suzuki. Huwel, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microbes Infect.* In press.

2. Ahmed, N., T. Hayashi, A. Hasegawa, H. Furukawa, N. Okamura, T. Chida, T. Masuda, and M. Kannagi. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages by commensal bacteria preferentially stimulating Toll-1 like receptor 4. *J Gen Virol* 91:2804-13, 2010.

3. Hayashi, T., H. Nishitsuji, A. Takamori, A. Hasegawa, T. Masuda*, and M. Kannagi. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors enhances the transcription of HIV-1 through NF-kappaB. *Microbes Infect* 12:937-47, 2010.

* corresponding author

2. 学会発表

1) 増田貴夫. HIV-1 ゲノム逆転写過程の新規制御機構。第 58 回 日本ウイルス学会 (招待講演、シンポジウム)、2010 (徳島)。

3) 宮野正史、林隆也、望月和歌菜、長谷川温彦、小柳義夫、神奈木真理、増田貴夫. HIV インテグラーゼの細胞内多量体形成能評価系の確立.

第 58 回 日本ウイルス学会、2010 (徳島) .

3) 曾、長谷川温彦、玉井洋太郎、清水由紀子、高森絢子、金原秀一、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-I 経口感染ラットを用いた Tax ペプチドパルス骨髄由来樹状細胞による Tax 特異的 CD8 陽性 T 細胞の賦活化. 第 58 回 日本ウイルス学会、2010 (徳島) .

4) Yamamoto, S.P., K. Okawa, T. Masuda, Y. Morikawa, Y. Koyanagi and Y. Suzuki. Modulation of HIV-1 infection at late phase by an integrase-interactor, Huw1. CSH meeting Retroviruses, 2010 (NY, USA).

H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 増田貴夫、神奈木真理. 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、特許第4562290号 (特許庁)、8月26日、2010.

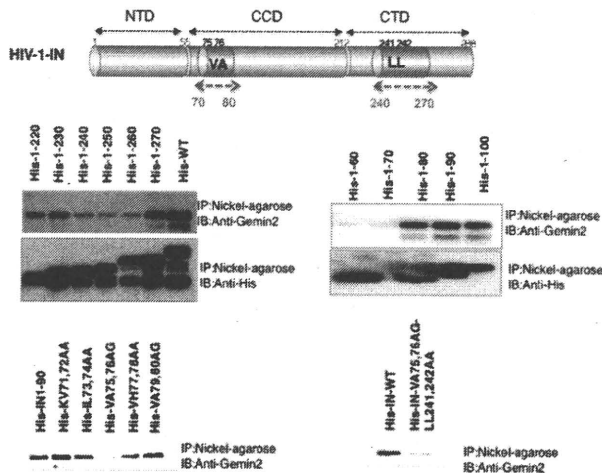


Fig 1 Residues of HIV-1 IN that are critical for specific interactions with recombinant SIP1 *in vitro*. For pull-down experiments, 10 μ g of recombinant SIP1 was

incubated with 10 μ g of each His-tagged IN (His-IN), followed by purification through a nickel agarose column. The level of SIP1 bound to each IN-nickel agarose complex was determined by Western blot analysis using an anti-SIP1 antibody.

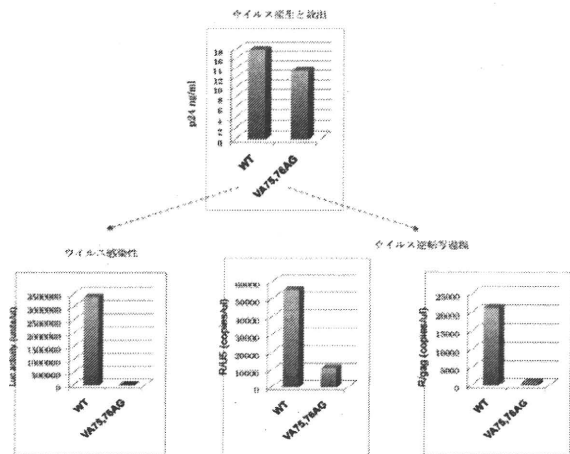


Fig. 2 Point mutations at V56, A75 abolished reverse transcription during viral infection. At 24 h post-infection, levels of viral gene expression were determined by measuring the luciferase activity (left) or the level of viral cDNA synthesis for early (R/U5, middle) and late (R/gag, right) products of reverse transcription in cells.

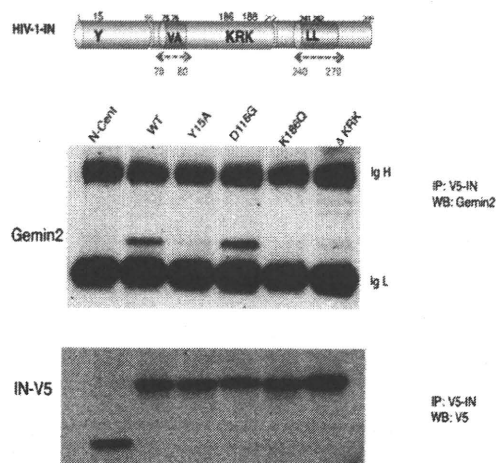


Fig. 3 Intracellular interaction between SIP1 and IN mutants resulting in a reverse transcription defective phenotype. Wild type (WT) or IN mutant

expression plasmids with a V5-tag were transfected into 293T cells. For transfection, 1.0 µg of each plasmid for WT-V5, D116G, N-ter, Cen, C-ter, N-Cen or Cen-C, and 2.5 µg for Y15A, K186Q, delta-KRK or LL241,242AA was used, respectively. At 48 h after transfection, cells were harvested and lysed with RSB-100 containing 1.0% NP-40. Cell lysate was then subjected to immunoprecipitation using an anti-V5 antibody, followed by Western blot analysis with an anti-SIP1 antibody. H and L denote heavy and light chains of immunoglobulin, respectively.

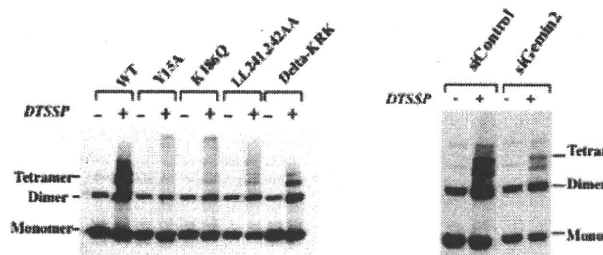


Fig. 4 Characterization of intracellular IN proteins. (Left) 293T cells transfected each IN-V5 expression vector were suspended with CSK buffer containing 0.5% NP-40. Cell lysates were incubated in either the absence or presence of 0.2 mM DTSSP at room temperature for 20 min and analyzed by Western blotting using an anti-V5 antibody. Cell lysates in were treated with 0.2 mM of DTSSP and then analyzed by Western blotting. The relative ratio of monomers, dimers, and tetramers after treatment with 0.2 mM DTSSP.

(Right) 293T cells were transfected twice with 100 pmol of siControl or siSIP1 and then with lacZ-V5 or an IN-V5 expression plasmid with MG-132 or DMSO. 48 h later, cells were lysed with CSK buffer containing 0.5% NP-40 followed by Western blotting analysis

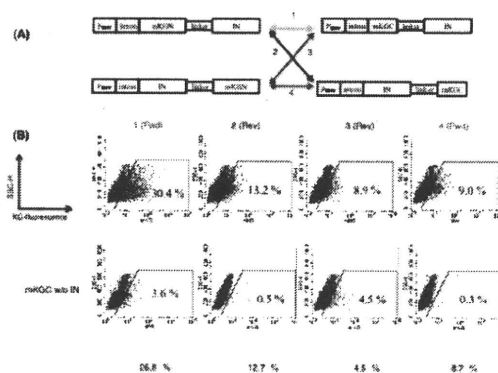


Fig 5. Analysis of IN-IN interaction by using a monomeric Kusabira-Green (mKG) fragment complementation assay. (A) Four mKG-tagged IN expression vectors were constructed by inserting entire coding sequence of HIV-1 IN to upstream or downstream of the N-terminal (mKGN) or the C-terminal fragment (mKGC) of mKG coding sequence in frame with linker. To increase the fusion protein expression level, the beta-globin intron sequence was inserted to downstream of the CMV promoter (P_{CMV}). For negative control, four mKG expressing vectors without IN sequences were used. (B) 293T cells were transfected with a pair of each mKGN and mKGC vector. At 48 hrs post transfection, mKG fluorescent was analyzed by FACS analysis. Combination of mKG vectors was shown at bottom of each panel.

分担研究報告書

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。

そこで、今年度は Vpr と特異的に結合する新規小分子化合物をケミカルアレイを用いてスクリーニングし、HIV-1 感染マクロファージにおけるウイルス複製の阻害効果を検証した。さらに構造類縁体における阻害効果も検証し良好な結果が得られた。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART 法)は単剤と比較してより強く体内のウイルス量を減少させ、エイズ発症を遅らせることを可能にした。しかし、この HAART 法は薬剤耐性ウイルスの出現と副作用といった問題点を抱えていることから、異なる作用点を標的とした抗 HIV 薬の開発が求められている。ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1) Vpr は核移行、細胞周期停止及びアポトーシス誘導などの様々な機能を通じてウイルス複製とエイズ病態を制御している。近年我々は *in vitro* 核移行解析において Vpr の核移行を阻害する小分子化合物が、マクロファージにおける HIV-1 の複製を抑制することを明らかにした。この成果は Vpr が新規抗 HIV-1 薬の標的になることを示唆している。そこで本研究では HIV-1 の生活環に「マルチターゲット」に作用する Vpr を創薬の標的蛋白質として選択し、Vpr と特異的に結合してその機構を阻害することによって HIV-1 の複製を阻害する新規化合物のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

1. Flag-mRFP 融合 Vpr の発現と精製 : Flag-mRFP 融合 Vpr 遺伝子を PCR 法で増幅し、真核細胞で発現可能な pCAGGS ベクターにクローニングした。本プラスミドを COS-7 細胞に導入し、発現タンパク質を Flag 抗体ビーズを用いて精製した。
2. ケミカルアレイによるスクリーニング : 約 8800 種の小分子化合物がチップ上に固定化されたケミカルアレイに精製タンパク質を導入し、Vpr と特異的に結合する化合物を mRFP の蛍光により検出し同定した。
3. 抗ウイルス活性 : 健康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。
4. 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。

5. 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アポトーシス小体の観察により解析した。また、G2 期arrestへの影響をflow cytometry法により解析した。

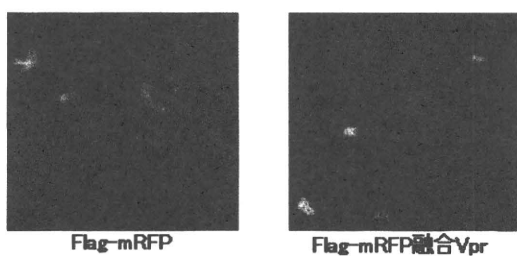
6. セファロースビーズによる化合物の結合実験：光親和性リンカーのついたセファロースビーズにUV照射により、化合物を結合させる。Cos7細胞で発現・精製したFlag-monomeric red fluorescent protein (mRFP) 融合Vprを混合し、遠心により化合物に結合した蛋白質を沈殿させ、SDS-PAGEにより泳動後に抗Flag抗体を用いたウエスタンブロット解析により検出した。

(倫理面への配慮)
ヒト由来臨床材料を用いていない。

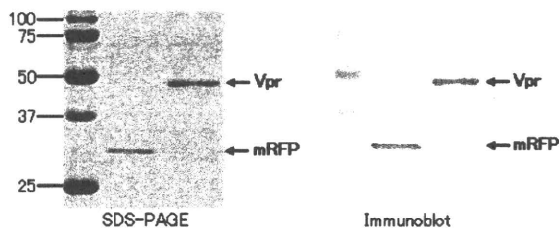
C. 研究結果

1. Flag-mRFP 融合 Vpr の発現と精製：

Flag-mRFP 及び Flag-mRFP 融合 Vpr 発現 COS-7 細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、Flag-mRFP は細胞全体に発現しており、Flag-mRFP 融合 Vpr は核に局在していた。



これらの細胞から Flag 抗体を用いてそれぞれのタンパク質を精製した結果、どちらも単一のタンパク質として精製できた。



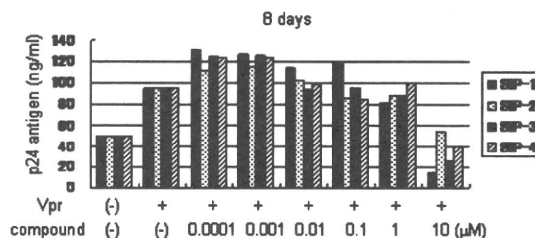
2. ケミカルアレイによるスクリーニング：
スクリーニングの結果、108種の化合物が得られ、その内の65種は構造から11種のグループに分類された。

3. 抗ウイルス効果：

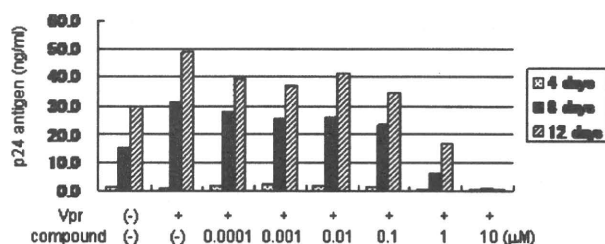
まず、11グループの代表的な化合物それぞれ1種についてマクロファージにおけるHIV-1複製阻害効果を調べた結果、1種においてのみ阻害効果が認められた。

	Groups by chemical structures											Others
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Number of derivative	6	9	15	11	4	4	3	3	4	3	3	43
Inhibition of HIV-1 replication	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	not tested

本化合物をSIP-1と命名し、本化合物の構造類縁体3種(SIP-2, SIP-3, SIP-4)を用いて同様に阻害効果を調べた結果、全てにおいて阻害効果が見られた。

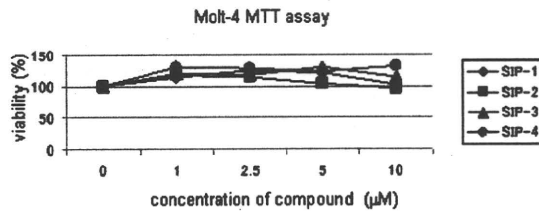


4種の中で最も強い阻害活性を示したSIP-1に関して、更に別の検体を用いてウイルス阻害試験を行った結果、IC₅₀が0.5 μMとなり、良好な結果が得られた。

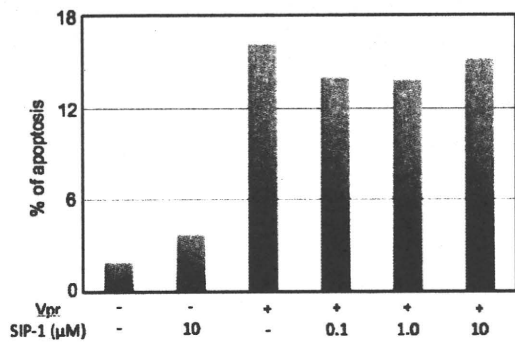


4. 細胞傷害試験：

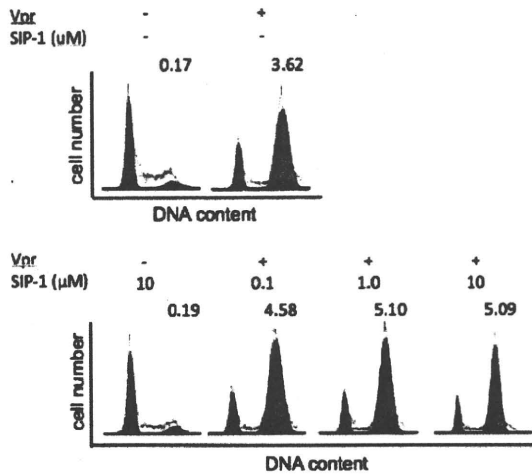
4種の化合物の細胞毒性をCD4陽性T細胞株Molt4を用いてミトコンドリアの酵素活性を指標としたMTT法により調べた。その結果、すべての化合物において細胞傷害性が低いことが明らかとなった。



5. Vprの機能解析：Flag-Vpr/pME18neoベクターをHeLa細胞へ導入し、Vprのアポトーシス誘導能に対するSIP-1の影響をアポトーシス小体の観察により調べた結果、阻害効果は認められなかった。

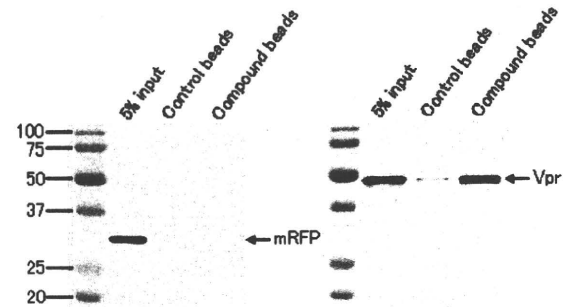
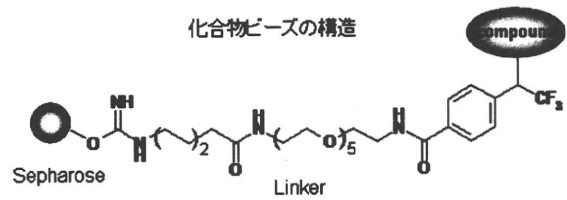


次に、上記と同様にVprを導入したHeLa細胞においてflow cytometry法によりG2期arrestへの影響を解析した。その結果、SIP-1はVprが有するG2期arrestを阻害しなかった。



6. セファロースビーズによる化合物の結合実験：

化合物ビーズを用いてSIP-1とVprの結合を調べた結果、化合物とVprは特異的に結合した。



D. 考察

ケミカルアレイを用いてスクリーニングしたSIP-1及びその構造類縁体3種全てにおいて感染阻害効果が認められた結果は、本化合物の基本骨格が感染阻害に重要であることを示唆している。最も効果の高かったSIP-1のIC₅₀は既にnmolレベルであり、リード最適化を行う事により更に阻害効果の高い化合物が得られると期待される。

本化合物は既存のVprの機能であるアポトーシス誘導やG2期arrestを抑制しなかったが、化合物ビーズを用いた実験においてもVprと特異的に結合することが立証されており、マクロファージでのウイルス感染におけるVprの未知の機能を阻害している可能性が考えられる。本化合物がVprと特異的に結合する事を利用して今後、共結晶構造解析を行い*in silico*最適化が行われることが期待される。また、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*イメージングへの活用も期待できる。

E. 結論

ケミカルアレイを用いてVprと結合する化合物をスクリーニングし、HIV-1に対する阻害効果を調べた結果、IC₅₀がnmolレベルの化合物が得られた。本化合物は既存のVprの機能であるアポトーシス誘導やG2期arrestを抑制しなかったが、細胞傷害性は少なく、細胞周期にも影響を与えなかったことから、HIV-1阻害薬として有用な候補化合物であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Xue G and Aida Y.: Discovery of a small molecule inhibitor of the interaction between HIV-1 proteins and cellular cofactors: a novel candidate anti-HIV-1 drug. *Current Chemical Biology*. 4: 188-199, 2010.
- 2) Hagiwara K, Murakami T, Xue G, Shimizu Y, Takeda E, Hashimoto Y, Honda K, Kondoh Y, Osada H, Tsunetsugu-Yokota Y and Aida Y.: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403: 40-45, 2010.

2. 学会発表

1. 村上知行、萩原恭二、近藤恭光、本田香織、武田英里、薛光愛、清水康夫、斎藤臣雄、長田裕之、横田恭子、間陽子、HIV-1

Vpr を標的とした新規抗ウイルス薬のスクリーニングと作用機序解析、第 24 回日本エイズ学会、東京 11 月(2010)

2. 武田英里、松田剛、村上知行、間陽子、ヒト免疫不全ウイルス I 型 Vpr の Importin- α を介した核移行機構解析、第 24 回日本エイズ学会、東京 11 月(2010)
3. Yoko Aida, Tomoyuki Murakami, Eri Takeda, Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Cell-Cycle Regulation by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Protein and Its Carboxy-Terminally Truncated Form, The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo December 2 (2010)
4. 武田英里、松田剛、村上知行、間陽子、Importin- α サブファミリー間におけるヒト免疫不全ウイルス I 型 Vpr の核移行機構の相違について、第 33 回日本分子生物学会、神戸 12 月(2010)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

無し

HIV プロウイルス DNA のクロマチン構造と潜伏感染に関する研究

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：アンフローレンス・ビクトリアーノ（同上、エイズ予防財団）

研究要旨：昨年度までの我々の研究により次のことが明らかになった。すなわち、細胞に潜伏感染する HIV プロウイルス DNA は転写活性が抑制されており、それが特異なクロマチン構造に依存している。またこのような抑制性クロマチンを構成するヒストンはメチル化もしくは脱アセチル化されており、ヒストンメチル化酵素 G9a 阻害剤により効率よく潜伏感染ウイルスの活性化が起こることを明らかにした (Imai et al., J Biol Chem 2010 および平成21年度当該班報告書)。そこで、今年度は新規に合成されたヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 NCH-51 により HIV プロウイルス転写抑制が解除されるか否かを詳細に解析し、その分子機構を究明した。脱アセチル化は宿主細胞の HDAC によって行われるが、我々は HIV 潜伏感染細胞を新規 HDAC 阻害剤によって処理したところプロウイルス LTR からの転写活性が誘導され、種々の LTR 内の転写制御に関わるシス・エレメント変異体を作成し、これらを用いた実験から LTR 領域内の正と負に制御する複数の多様なエレメントの中で、Sp1 結合領域がその責任を担っていることを明らかにした。さらに Sp1 蛋白が HDAC 蛋白と細胞内で複合体を形成しており、siRNA で Sp1 蛋白をノックダウンすることによって HDAC 阻害剤による HIV 転写誘導が起らなくなることを実験的に証明した。

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、エイズの治療をいまだに困難にしている理由のひとつに HIV の潜伏感染がある。HIV 潜伏感染は転写に依存するが、HAART 薬剤はウイルス転写に無効であるため、現行の治療法では HIV を完全に除去することはできない。その間に多剤耐性ウイルスが出現し、HAART 治療の有効性が損なわれるということが頻繁に起こっている。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、そのためにはウイルス潜伏感染の分子機構を明確にしなければならない。

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 LTR の TATA box 近傍に結合する転写因子 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。また、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)。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、しかし、HIV 潜伏感染の分子機構にはまだ不明なことが多い。

本研究では、HIV 潜伏感染における H3 ヒストンの脱アセチル化、特にその際に特定の転写因子結合領域が関わっているか否かを解析した。本研究の結果、HIV LTR に結合する転写因子 Sp1 が HIV の潜伏感染の成立と維持に必須であ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. 新規 HDAC 阻害剤 NCH-51 について：

すでに臨床的に用いられている HDAC 阻害剤として SAHA があるが、この化合物は生体内での安定性が悪く十分な血中濃度の維持が困難なことが問題となっている。そこで、Suzuki らは (J. Med. Chem. 48: 1019, 2005)