

分担研究課題



抗HIVタンパク質アクチノヒビンの実用化研究

抗HIVタンパク質アクチノヒビンのHIV/AIDS 感染予防薬・治療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薬学科 教授

研究協力者

大林 尚美 いわき明星大学薬学部薬学科 研究助手

抗HIVレクチン・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、HIVgp120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、安全性の優れた薬剤として期待されている。

本研究では、HIV感染予防薬のみならず安全なHIV/AIDS治療薬の開発を目指して下記の成果を得た。

(1) 従来法で調製したAHのサンプルには、N末にシグナルペプチドとAHの間のリンカー部位が残存した未成熟型AHが含まれていることが分かったので、114アミノ酸からなる成熟型AHの調製法を確立し、カニクイザルを用いるSHIV感染予防実験及びポリエチレングリコール (PEG) 修飾に用いる1グラムのサンプルを調製した。

(2) 成熟型AHを用いて5kPEG-AH、10kPEG-AH及びAH-5kPEG-AHを調製した。

(3) AH及びAH-5kPEG-AHは各種のプロテアーゼに対してほとんど分解されないことがSDS-PAGEで確認された。

(4) 5kPEG-AH及び10kPEG-AHでは生理食塩水に対する溶解性は上昇するも、合胞体形成阻害活性、抗SHIV活性は大幅に低下した。一方、AH-5kPEG-AHでは溶解性は改善されなかったが、数倍高い活性を示すことが確認された。

(5) マウスを用いる急性毒性試験で、尾静注 (25 mg/kg) 及び腹腔内投与 (59 mg/kg) で急性毒性が認められないことが確認された。

さらに、抗HCV活性を測定した結果、AH及びAH-TEV dimer/RTB-L (AH2量体) の IC_{50} はそれぞれ300 nM及び60~70 nMであり、HCVの外殻糖タンパク質にも多数のHMの存在が示唆されると共に抗HCV薬としての可能性が示された。

A. 研究目的

HIVの感染者は3,400万人を数え、毎年新しく200万人以上が感染し、200万人近くが死亡している。新しい感染者数を減らすのが喫緊の課題である。一方、HIVに特異的に存在する逆転写酵素、インテグラーゼ、又はプロテアーゼを阻害する抗HIV薬 (図1) の多剤併用療法により、HIV感染者の発症予防とエイズ患者の延命が可能になってきている。しかし、この療法ではウイルスの複製は抑制できるが、細胞から細胞への感染を阻止できず、そのためにウイルスを体内から除去できないのではないかと考えられ

ている (Sigal *et al.*, Nature, 477, 95-99, 2011)。

新属新種の放線菌 *Longispora albida* が生産する抗HIVレクチン・アクチノヒビン (AH、図2) は、3つの糖鎖結合ポケットを持ち (図3)、多くの高マンノース型糖鎖 (HM) を持つHIVgp120の3本のHMに結合することにより選択的で強い親和性 (レクチンのクラスター効果) を示す。AHはHIVの細胞への感染を阻止するだけでなく、HIVの細胞から細胞への感染をも阻止できるので、AHは体内からのHIV除去薬の可能性を秘めている。AHは他のマンノース結合レクチンとは異なり、多くのHMを持つ

糖タンパク質にのみ結合する特徴を持つことから優れた安全性を有することが期待されている。また、C型肝炎ウイルス（HCV）が糖鎖を持つとの情報があり、AHの抗HCV活性を調べることにした。

本研究の目的は下記の通りである。

(1) 114アミノ酸残基からなる成熟型AHの調製法の確立、並びに安定で免疫原性が改善された注射薬の開発を目指した、成熟型AHを用いるポリエチレングリコール（PEG）化AHの調製、(2) 得られたPEG修飾体の安定性と抗HIV、SIV、SHIV活性の確認、(3) 抗HCV活性の測定、(4) AHの急性毒性の確認。

B. 研究方法

放線菌 *Longispola albida* を用いるAHの調製

10 ml 生産培地 [2.0% glucose, 0.4% polypepton, 0.1% yeast extract, 0.4% meat extract, 0.25% NaCl, pH 7.0] を分注した50 ml容試験管に種菌液（グリセロールストック）200 μlを添加し、ロータリーシェー

カーで6日間、27℃、180 rpmで種培養を行った。本培養は、500 ml容三角フラスコに100 ml分注した生産培地に種培養液を1%植菌し、6日間、27℃、180 rpmで培養した。培養液上清に45%飽和の硫酸を加えてタンパク質を沈殿させた後、タンパク画分からハイドロキシアパタイトカラムを用いてAHを精製した。

合胞体形成阻害活性

Chiba Hら（J. Antibiot. 54, 818-826, 2001）の方法に従って測定した。

抗SHIV活性

杉浦 互博士ら（（独）国立病院機構名古屋医療センター）に依頼し、HIVとSIVの両方に感染できるLuSIV細胞を用いて、抗SHIV活性を測定した。

抗HCV活性の測定

・ HuH7.5細胞へのHCVJFH1株の感染：JFH1を

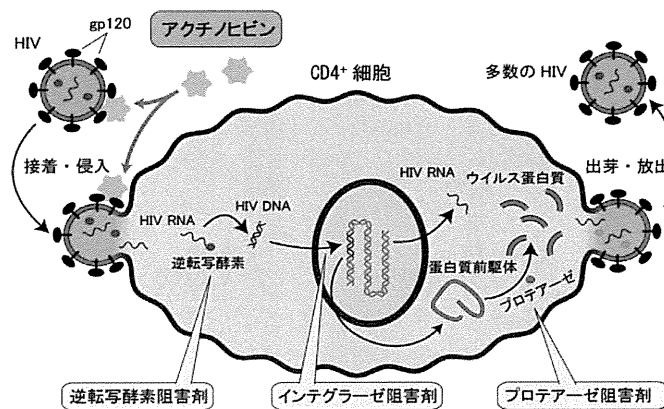


図1 HIVのライフサイクルと阻害剤

1-38 ASVTIRNAQTGRLLD SNYNGNVYTL PANGGNYQRWTGP
 39-76 GDGTVRNAQTGRCLD SNYDGA VYTLPCNGGSYQKWL FY
 77-114 SNGYIQNVE TGRVLD SNYNGNVYTL PANGGNYQK WYTG

図2 AHのアミノ酸配列（相同性の高い3つのセグメントからなる）

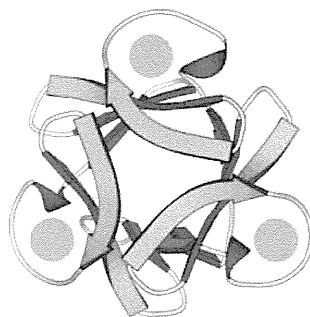


図3 AHの立体構造（3つの糖鎖結合ポケットを持つ）

moi約100で感染。

- 細胞：24穴プレートを用いて300 mlのDMEM中37℃で培養。
- 感染実験：薬剤処理の前後でウイルスを感染させ、通常はその2日後に培養上清のウイルス量を測定。
- 薬剤の添加：薬剤を含む300 mlのDMEMを加えて2日間培養。
- ウイルスの定量：培養上清のウイルス量をHCVコア蛋白質をELISAで測定。富士レビオのELISA測定キットを用いmanualに従った。実験は3回行い、値を平均化した。図8,9には薬剤を添加しない細胞上清の値を100として感染性を%で示した。

C/D. 研究結果と考察

成熟型AHの調製

従来の方法で調製したAHにはN末にシグナルペプチドとの結合部分（リンカー領域）のアミノ酸残基が残っているものが多く含まれていることが判明したので、114アミノ酸残基からなる成熟型AHの調製法を検討した。AH生産放線菌 *Longispora albida* の培養時間を延長することによりリンカー領域のアミ

ノ酸残基が切断され、成熟型AHが生成することが分かった（図4）。また、27℃で5日間培養した後、37℃で3日間培養することにより未成熟型から成熟型に変換できることが分かった。精製法についても検討し、硫酸沈殿とヒドロキシアパタイト・カラムクロマトグラフィーによる改良法を確立した。

上記の方法により、1グラムの成熟型AHを調製し、カニクイザルを用いるSHIV感染予防試験及びPEG修飾体の調製に供した。成熟型AHは未成熟型AHに比べてほぼ2倍の合法体形成阻害活性を示した。

PEG化修飾AHの調製

図5に示すように、還元剤として20 mM NaBH₃CNを用いる還元的アミノ化反応により、5kPEG及び10kPEGのアルデヒド基と成熟型AHの糖鎖結合ポケットの裏側に存在するN末Alaのアミノ基を反応させて、PEG化AHを調製した。反応液をそれぞれSuperdex 200及びSuperdex 75を用いるゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、5kPEG-AHの白色粉末12 mg（収率 21.5%）、及び10kPEG-AHの白色粉末16 mg（収率 41.1%）を得た。

さらに、両端に官能基を持つALD-5kPEG-ALDを用いて、図5に示すようにして2量体の調製を試み

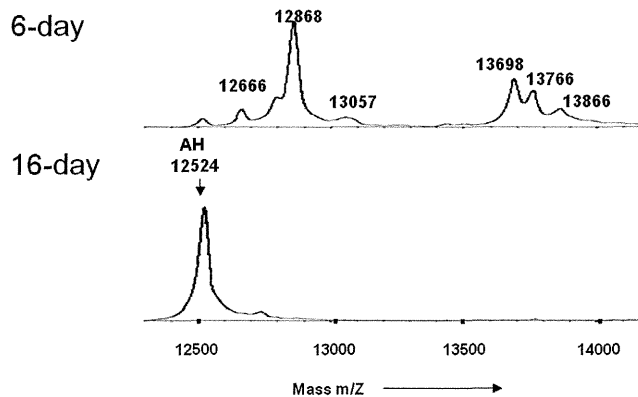


図4 AHの質量分析

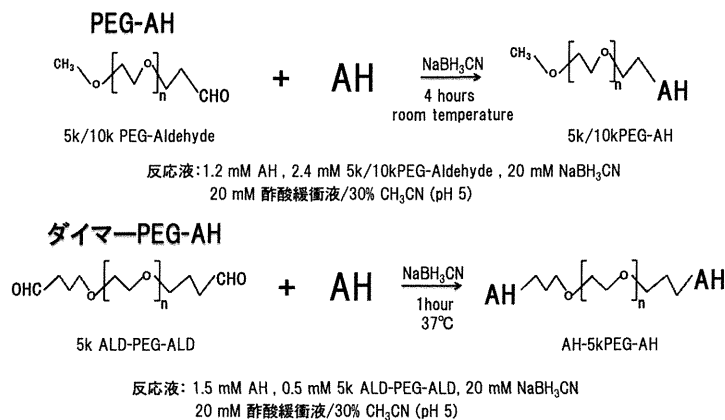


図5 PEG-AH及びAH-5kPEG-AH誘導体の調製

AH-5kPEG-AHを得ることができた。反応液をPEGASIL-300 C4Dを用いてODSカラムクロマトグラフィーにより精製し、2.8 mg (収率13.4%)の白色粉末を得た。

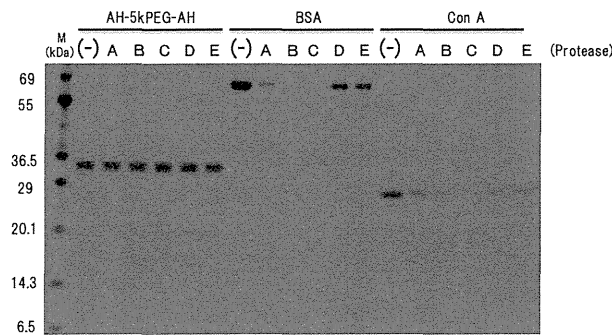
成熟型AH及び修飾体の諸性質

溶解性と安定性：成熟型AHは、pH 3以下及びpH 10以上で比較的高い溶解性を示し、中性付近では溶解性が低かったが、生理食塩水 (0.9% NaCl) に対しては9.8 mg/ml (この溶液のpHは3.4であり、pH 7.0に中和後の溶解度は2.0 mg/mlであった) の溶

解性を示した。一方、含水有機溶媒 (30% CH₃CN、20% (CH₃)₂CO及び25% MeOH) に対しては、水よりも高い溶解性を示し、しかもこれらの溶液中で長時間保存しても安定であることが、合胞体形成阻害活性が保持されていること並びに円偏光二色性スペクトル分析でも変化が認められないことから明らかとなった。AH-5kPEG-AHは生理食塩水に対して6.1 mg/ml (pH 7.0に中和後は2.0 mg/ml) の溶解性を示した。

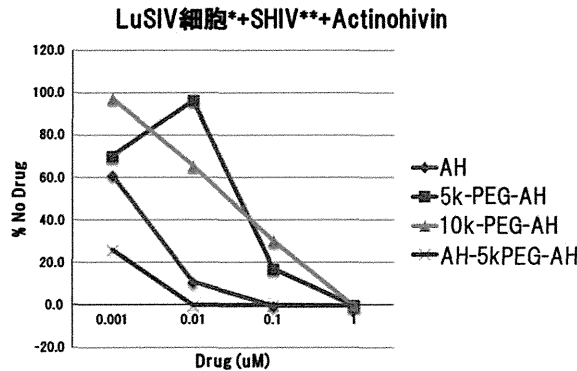
AH-5kPEG-AHのプロテアーゼに対する安定性：一般的に知られている5種類のプロテアーゼ (Glu-C、トリプシン、キモトリプシン、Asp-N、Arg-C) をAH-5kPEG-AHに添加し、3時間反応後SDS-PAGE (CBB染色) で評価した。コントロールとして、BSA (bovine serum albumin) と糖鎖結合タンパク質であるコンカナバリンAを用いた。その結果、BSA及びCoAでは分解が認められたが、AH-5kPEG-AHはAHと同様に (平成23年度報告) 3時間後でも分解産物は検出されず、安定であることが確認された (図6)。

溶解度と生物活性：合胞体形成阻害活性を調べた結果、成熟型AHのIC₅₀値が41 nMに対して、AH-5kPEG-AHでは15 nMであり、約3倍強い阻害活性を示した。5kPEG-AH及び10kPEG-AHでは、溶解性は改善されるものの合胞体形成阻害活性はAHの約



- A: α-Chymotrypsin (pH 8.0, 30°C)
- B: Proteinase K (pH 8.0, 37°C)
- C: Pepsin (pH 3.0, 37°C)
- D: Asp-N (pH 8.0, 37°C)
- E: Trypsin (pH 8.0, 37°C)

図6 AH-5kPEG-AHの各種プロテアーゼに対する安定性



* LuSIV 細胞： HIVとSIVの両方が感染できる組換え細胞
 **SHIV： HIVとSIVの組み換えウイルス
 (独)国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部 杉浦 互らとの共同研究、未発表

図7 AH及び誘導体の抗SHIV活性

表1 AH及び誘導体の溶解度と生物活性

	溶解度		生物活性	
	0.9% NaCl (mg/ml)	合胞体形成阻害活性 IC ₅₀ (nM)	抗SHIV活性* IC ₅₀ (nM)	
AH	9.8	41	1.8	
5kPEG-AH	≥ 18.6	280	85	
10kPEG-AH	≥ 29.4	330	87	
AH-5kPEG-AH	6.1	15	0.3	

* (独) 国立病院機構名古屋医療センター 杉浦らとの共同研究

1/5に低下していた。

HIVとSIVの両方に感染できる組換え細胞であるLuSIV細胞を用いて、SHIV（HIVとSIVの組換えウイルスであり、ヒトにもサルにも感染できるウイルス）に対する抗ウイルス活性を測定した結果、AH-5kPEG-AHが最も強く、次いでAHが強い活性を示した（図7、表1）。

AHの急性毒性

7周令ICR雄性マウス1群5匹（日本クレアから購入）に、AHを尾静脈注射（25 mg/kg）及び腹腔内注射（59 mg/ml）したが、注射後2時間以内においていずれも異常な行動や症状は観察されなかった。また、投与3日後においても体重減少などの症状は認められなかった。以上の結果から、上記の条件では急性毒性を示さないことが確認された。

AH及びAH誘導体の抗HCV活性

薬剤のHuH7.5細胞に対する毒性： 5×10^5 個の細胞をプレートに撒き、翌日培地を各濃度のAH又はHis-TEV-AH dimer/RTB-L（AH2量体）を含むDMEM 300 mlで置換し、4日間培養して細胞増殖をPOMEGAのCellTiter-Glo™で測定した（ATP量をルシフェラーゼ活性で測定する）。その結果、AH、AH2量体ともに3000 nMまでルシフェラーゼ活性の低

下は見られなかった（細胞毒性は観察できなかった）。

感染阻害活性：AH及びAH2量体を20～12,000 nMの濃度でウイルス粒子産生を測定した結果、AH2量体はAHの4～5倍の阻害活性を示した（図8）。

ウイルスを細胞に感染させる前に、細胞をAH2量体で12時間処理し、AH2量体を除いてからウイルスを細胞に感染させ、2日間37℃で培養した後に培養液上清のウイルス量を測定した結果、薬剤濃度を1200 nMまで上げてても、感染性の変化は見られなかった（図9）。つまり、図8に示したAH2量体による阻害は、細胞に由来するものではなく、AH2量体がウイルスに作用した結果であることが明らかとなった。

次に、感染阻害の起こる時期を調べるために下記の実験を行った。細胞にウイルスを混ぜてすぐに4℃に冷却した後、AH2量体を加えて1時間処理した（この段階ではウイルス粒子は細胞に吸着するが侵入はしないと考えられている）後、薬剤の入っていないDMEMに置き換えてから37℃に戻して、2日間培養を続け、培養上清のウイルス量を測定した。その結果、4℃で処理している過程でAH2量体が存在していても、その後薬剤を除いて37℃に戻すと阻害は図8と同じように観察された。従って、AH2量体は、ウイルス粒子が細胞に吸着する段階で阻害効果を示すものと考えられる。

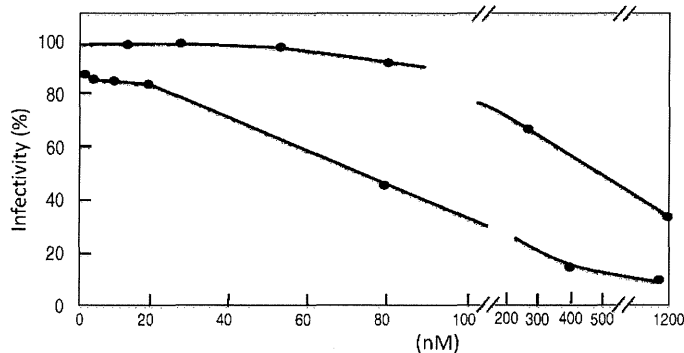


図8 AH単量体及びAH2量体の抗HCV活性（上側：AH, 下側：AH2量体）

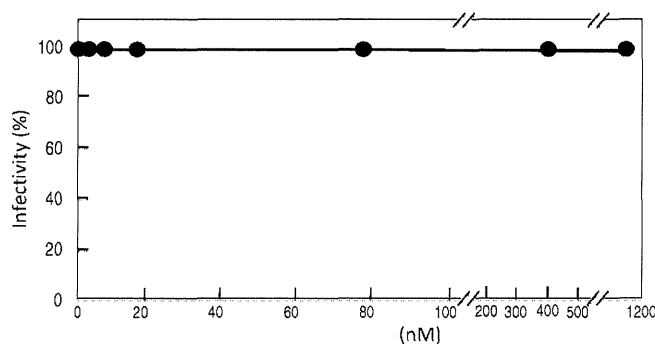


図9 AH2量体処理・洗浄後の細胞へのHCV感染性

また、細胞にウイルスを感染させると同時にAH2量体を添加して1時間保温し、その後薬剤の入っていない培地に置き換えて培養を続け、2日後に上清のウイルス量を測定した場合にも、阻害効果は図8に示したのと同様であった。

以上の結果をまとめると下記ようになる。

(1) AHおよびAH2量体はHCVに対して阻害効果を示した。AH2量体がAHに比べ高い阻害活性を示した。AH及びAH2量体のIC₅₀は、それぞれ300 nM、60~70 nMであった。

(2) 感染阻害は薬剤の細胞への効果ではなく、ウイルス粒子に働いて引き起こす。

(3) 抗HCV効果は感染の初期に働いて抗ウイルス作用を示す。特にウイルス粒子が細胞に接触する過程を阻害すると考えられる。

(4) これらの薬剤が抗HCV効果を示す容量での細胞毒性は認められなかった。

E. 結論

成熟型AH及びPEG修飾体に関して

成熟型AHの調製法を確立した後、PEG修飾体を調製することができた。調製に成功したAH-5kPEG-AHは非常に強い抗SHIV活性を示し、プロテアーゼに対して安定であることがわかったので、AH及びAH-5kPEG-AHを用いるカニクイサルにおけるSHIV感染予防試験のみならず治療実験が期待される。

抗HCV活性に関して

これまでのAHの生化学的研究並びにX線結晶構造解析の結果から、AHは多くのHMを持つ糖タンパク質に対してのみ強い特異的な親和性を示すことが分かっているので、上記の結果は、HCVの表面に存在するHMがHCVの細胞への感染に必須であることを示すものであると共に、AH及びAH修飾体を用いる抗HCV薬開発の可能性を示すものであり、今後の更なる研究が期待される。現在、AH-5kPEG-AHの抗HCV活性について検討中である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 原著論文

- 1) Hoque M. M, Suzuki K, Tsunoda M, Jiang J, Zhang F, Takahashi A, Ohbayashi N, Zhang X, Tanaka H, Omura S, and Takenaka A. Structural insights into the specific anti-HIV property of actinohivin: struc-

ture of its complex with the alpha(1-2)mannobiose moiety of gp120, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 68:1671-1679. 2012

- 2) Suzuki K, Ohbayashi N, Jiang J, Zhang X, Hoque M. M, Tsunoda M, Murayama K, Tanaka H, Takenaka A. Crystallographic study of the interaction of the anti-HIV lectin actinohivin with the alpha(1-2)mannobiose moiety of gp120 HMTG, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 68(Pt 9).1060-1063. 2012

2. 口頭発表

- 1) 下遠野久美子、高橋 淳、大林尚美、田中晴雄、下遠野邦忠：高マンノース型糖鎖を認識するレクチンによるC型肝炎ウイルスの増殖阻害、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月
- 2) 大林尚美、張曉雪、佐藤陽、金谷必、前島雅美、岩谷靖雅、杉浦 互、田中晴雄：抗HIVレクチンアクチノヒビンのペグ化誘導体の調製と諸性質、日本農芸化学会東北支部第147回大会、弘前、2012年10月
- 3) Hoque M. M, 鈴木 薫、角田 大、江建東、張放、高橋 敦、大林尚美、張曉雪、田中晴雄、竹中章郎：Structural insights of a potent anti-HIV actinohivin upon binding specifically to the target oligomannose of HMTG attached to HIV-gp120, 平成24年度日本結晶学会年会、仙台、2012年10月
- 4) Tanaka H, Takahashi A, Obayashi N, Takenaka A, Omura S. The Anti-HIV Lectin Actinohivin Specific to a Glycoprotein Having Many High-mannose-type Glycans such as HIV gp120, BIT's 2nd Annual World Congress of Molecular & Cell Biology-2012, Beijing, China. May. 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：抗HCV薬

出願：特願2012-268884、

出願日：2012年12月8日

出願人：明星学苑

発明者：田中晴雄、下遠野邦忠、高橋 淳、大林尚美、大村 智

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

分担研究課題



新規抗HIV薬剤の合成展開および安全性の評価

研究分担者

野村 伸彦 富山化学工業株式会社総合研究所第三研究部 部長

既存の抗HIV薬剤耐性を克服するための新規な阻害機序による抗HIV剤の創製を目的とし、新規抗HIV化合物の合成展開並びに安全性評価を行った。昨年度に引き続き、新たに15化合物を合成し評価したところ、3化合物に $IC_{50} < 10$ nMの抗HIV活性が認められた。また、昨年度見出した体内動態及び遺伝毒性面が改善した化合物Gについて、マウスに続きラットにて2週間の反復投与毒性試験を行ったところ、とくに重篤な毒性は認められなかった。今後、イヌを用いた安全性試験を実施する予定である。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

i) 新規化合物の合成

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

ii) 新規合成化合物の *in vitro* 抗HIV活性測定

名古屋医療センターの杉浦らが樹立したHIV-1感受性レポーター細胞R5-MaRBLE細胞を用いた。R5-MaRBLE細胞にR5ウイルスであるJRCSFを感染させた後、対象とする化合物を1, 0.2, 0.04, 0.008, 0.0016, 0.00032, 0.000064 μ Mの濃度で添加し培養し

た。感染7日後に細胞内 firefly luciferase 活性を測定し、 IC_{50} を算出した。

iii) 代表化合物の毒性評価

ラット1ヶ月反復毒性試験

0.5%メチルセルロースに懸濁させた化合物G (抗HIV活性; IC_{50} : 0.65 ng/mL、遺伝毒性陰性) を6週齢のCrI: CD (SD) 系ラットに1日1回、2週間反復投与した。投与量は、1, 3, 10, 30 mg/kg 5mL/kgで実施した。投与期間中は、一般状態他の観察を行い、投与終了翌日 (剖検日) にジエチルエーテル麻酔下で大静脈から血液を採取し、各器官重量、血液学及び血液生化学的検査を行った。

・観察項目：一般状態観察、体重、摂餌量、剖検時肉眼観察

・血液学的検査

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

検査項目：赤血球数、白血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積、平均ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、白血球分類、網赤血球数、骨髓有核細胞数

・血液生化学的検査

ヘパリン処理した血液を遠心分離して得た血漿について自動分析装置（日立7070形、株式会社日立製作所）を用いて以下の項目を測定した。

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

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

・統計処理

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

iv) 倫理面への配慮

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

C. 研究結果

今年度新たに合成した15化合物のうち、3化合物に $IC_{50} < 10$ nMの抗HIV活性が認められた（表1）。更に、化合物Gについて、ラットにて2週間反復投与したが、血液学、血液生化学検査結果含めて、とくに重篤な毒性所見は認められなかった。

D. 考察

本研究において新規合成品の評価により、より詳細な抗ウイルス活性の構造活性相関を検証できた。現在、ラット反復投与毒性試験終了した化合物については、非げっ歯類（イヌ等）の反復投与毒性試験に向けて体内動態の詳細な検討を行うと共に、試験に供じる化合物の大量合成を行っている。

E. 結論

新規な作用機序を有する化合物の合成展開並びに評価を継続してきた結果、強い抗HIV活性に加え、体内動態が改善した化合物を見出している。今後は、非げっ歯類動物を用いた反復投与毒性試験等を行いながら、候補化合物の評価並びに絞込みを行っていく予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表1 スクリーニングサンプルの *in vitro* 抗HIV活性内訳

IC ₅₀ (nM)	>1000	100 - 1000	10 - 100	1 - 10	1>
化合物数	3	1	8	3	-

分担研究課題



宿主因子を標的にした新薬開発研究 新規HIV薬剤の開発と阻害機序の解析

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

臨床研究センター感染・免疫研究部 室長

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挙げている。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は非常に重要である。本分担課題では、VifとCBF-betaとの結合を阻害する化合物の探索のための基礎的研究を行った。その結果、既存のCBF-beta機能阻害薬 (Runx結合阻害剤) によってVifのAPOBEC3分解機構が変化しないことから、CBF-beta上のVif結合部位はRunxとの結合に関与せず、CBFの本来の機能を阻害しないことが考えられた。以上のことから、抗HIV-1薬開発において、Vif-CBFの結合が新たな標的となることが示唆された。

A. 研究目的

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APOBEC3 (A3) 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、A3を細胞内より枯渇させる。そのため、HIV-1はこの宿主防御機構から逃れることができる。そこで、Vifの機能を干渉することによって、本来細胞が保持する防御機構を利用するウイルスの増殖を抑制する新規な機序の開発が有望視されている。近年、APOBEC3のVifによる分解促進機構において、細胞内因子CBF-betaが不可欠であることが報告された。本来、CBF-betaは、分子シャペロンとして、転写因子であるRunxと結合し細胞増殖制御に関与する補助因子であることが知られていた。そこで、本分担研究課題では、抗HIV阻害剤 (抗Vif阻害剤) 開発を模索するために、Vif-CBFβとの相互作用阻害が抗HIV-1薬剤開発の標的として可能性があるのか解析した。さらに、HIV-1 Vifの各ドメイン解析を行い、APOBEC3の細胞内分解を干渉する必要最小限の領域を検索し、ペプチドベースの創薬につながる基盤構築を行った。

B. 研究方法

(1) CBF-beta阻害剤によるVif依存的なAPOBEC3分解機構への影響について

細胞膜透過性のCBF-beta阻害剤 チアゾール誘導体 (5-Ethyl-4-(4'-methoxyphenyl)-thiazolyl-2-amine) はCBF-betaとRunx1との結合をアロステリックに阻害する (Chemistry & Biology 14:1186-1197, 2007)。293T細胞にHIV-1 VifはおよびAPOBEC3C/APOBEC3Gを発現するプラスミドを導入し、48時間後のAPOBEC3量をウエスタンブロット法により解析した。

(2) HIV-1 Vifのドメイン検索について

コドンを指摘化したHIV-1 Vif発現プラスミドを用いて、10アミノ酸ずつ欠損した変異型Vifタンパク質を発現するプラスミドを構築した。野生型および変異型Vifのプラスミド量比を変化させ、APOBEC3Gの分解作用の干渉効果を検討した。方法は、1) 同様に293T細胞におけるAPOBEC3Gの量をウエスタンブロット法により解析した。

C. 研究結果

(1) CBF-beta阻害剤によるVif依存的なAPOBEC3分解機構への影響について

CBF-beta阻害剤がRunx1結合阻害を示す10IC50 (40μM) を添加し、野生型APOBEC3G (A3G) とAPOBEC3C (A3C) のVif依存的な分解を解析した。図1に示すように、阻害剤添加しない場合、VifによってAPOBEC3Gが29%、APOBEC3Cでは20%の細胞内量に低下し、分解が促進された。一方、CBF-beta阻害剤添加時は、APOBEC3Gは22%、APOBEC3Cは19%まで低下していた。このことから、既存のRunx1-CBF-betaの結合を阻害する薬剤では、Vif依存的なAPOBEC3分解機構は影響されないことが分かった。

(2) HIV-1 Vifのドメイン検索について

Vifを10アミノ酸ずつC末側から欠損させた変異体Vifを発現するプラスミドを構築した。いずれの変異体もAPOBEC3Cを分解する機能は保持しなかった (図2のA)。さらに、これらの変異体の野生型Vifに対する干渉作用を検討したが、いずれの変異体によるdominant negative効果などの干渉効果は認められなかった。以上のことから、VifのAPOBEC3への結合には、フラグメントベースではなく立体構造が関与することが示唆された。一方、APOBEC3への結合に重要と考えられている領域の変異体解析を行った結果、APOBEC3Cに対しては、16番目のMetが大変重要であることが明らかになった (図2のB)。今後、この周辺のペプチドを作製し、網羅的な結合干渉実験を行いたいと考えている。

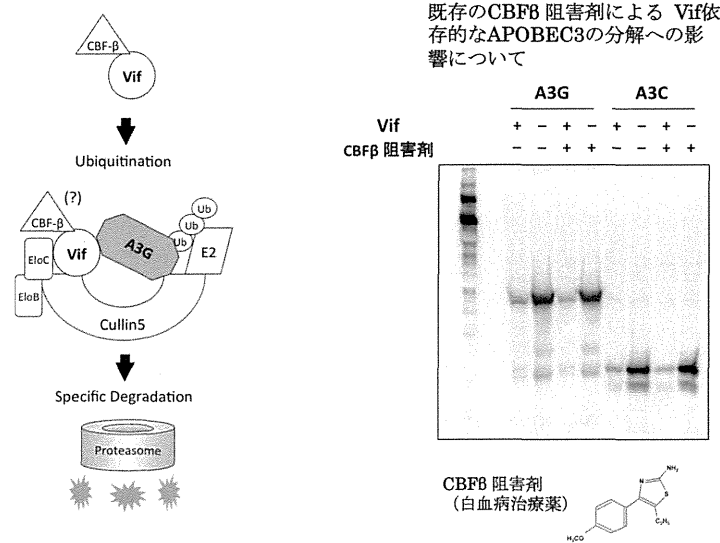


図1 チオール誘導体CBF-β阻害剤は、Vif依存的なAPOBEC3分解機構を抑制しない

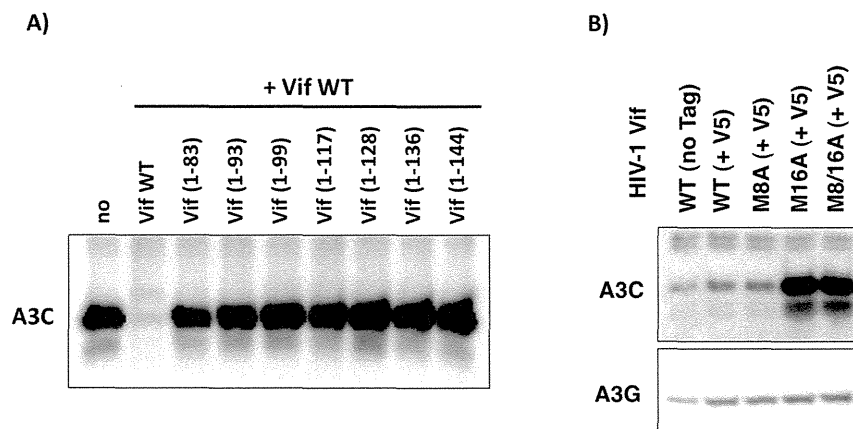


図2 Vif変異体のAPOBEC3分解効果
 A) Vifの欠失型変異体は分解効果を消失する
 B) Vif M16はA3Cの分解には重要であるがA3Gの分解には重要ではない

D. 考察

既存のRunx1-CBF-betaの結合を阻害する薬剤によって、VifのAPOBEC3分解機構に大きな影響が認められず、CBF-beta上のVif結合部位はRunxとの結合とは異なることが推測できた。このことから、もしVif-CBFの結合阻害剤を見出すことができれば、CBFの本来の機能、細胞増殖制御機能を阻害せず、Vif-CBFの結合阻害に特化した化合物つながる可能性が高いと考えられる。つまり、Vif-CBFの結合阻害は、ウイルスへの選択性がより高い魅力的な標的になりうると考えられる。今後、試験管内におけるVif-CBF結合評価系を構築して、選択性が高い低分子化合物の探索が新規抗HIV-1薬剤の開発につながる必要があると言える。

E. 結論

本研究によって、Vif-CBFの結合阻害の探索がウイルス特異的な抗HIV阻害薬剤の開発につながる可能性を提示できた。このような研究を通して、APOBEC3の本来の防御機構を活用してHIVの増殖を抑制するという新規な機序の治療薬開発の可能性を高めることができると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 原著論文

- 1) Hergott CB, Mitra M, Guo J, Wu T, Miller JT, Iwatani Y, Gorelick RJ, Levin JG: Zinc finger function of HIV-1 nucleocapsid protein is required for removal of 5'-terminal genomic RNA fragments: A paradigm for RNA removal reactions in HIV-1 reverse transcription. *Virus Res.* 171:346-355, 2013.
- 2) Jahanbakhsh F, Ibe S, Hattori J, Monavari SHR, Matsuda M, Maejima M, Iwatani Y, Memarnejadian A, Keyvani H, Azadmanesh K, Sugiura W: Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Iran: genomic evidence of CRF35_AD predominance and CRF01_AE infection among individuals associated with injection drug use. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 29:198-203, 2013.
- 3) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, Iwatani Y: The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nat Struct Mol Biol.* 19: 1005-1010, 2012.

- 4) Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsinsin T, Matsuoka K, Iwatani Y, Puthanakit T, Ananworanich J, Sophonphan J, Mahanontharit A, Naoe T, Vonthanak S, Phanuphak P, Sugiura W, On Behalf Of The Predict Study Team: Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency. *AIDS Res Ther.* 9: 34, 2012.
- 5) Li J, Hakata Y, Takeda E, Liu Q, Iwatani Y, Kozak CA., Miyazawa M: Two genetic determinants acquired late in Mus evolution regulate the inclusion of exon5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathog.* 8:e1002478, 2012.
- 6) Imahashi M, Nakashima M, Iwatani Y: Antiviral mechanism and biochemical basis of the human APOBEC3 family. *Front Microbiol.* 2:250, 2012.

2. 口頭発表

国外学会発表

- 1) Iwatani Y: Structure-based analysis of APOBEC3 on anti-HIV function: Gordon Research Conferences RNA Editing. Jan 6-11, 2013, Galveston, TX, USA (Invited talk)
- 2) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Yokomaku Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W, Iwatani Y: The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif interaction. 2012 meeting on Retroviruses. May 21-26, 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA. (talk)
- 3) Chaurasiya KR, Geertsema H, Qualley DF, Wu T, Iwatani Y, Chan D, Hertz A, Levin JG, Musier-Forsyth K, Rouzina I, Williams MC: Oligomerization of HIV-1 restriction factor APOBEC3G transforms it from a fast enzyme to a slow nucleic acid binding protein. 2012 meeting on Retroviruses. May 21-26, 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA. (talk)
- 4) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Yokomaku Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W, Iwatani Y: Conformational conservation of the HIV-1 Vif-binding interface of APOBEC3C, DE, F. 2012 meeting on Retroviruses. May 21-26, 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA. (Poster)

国内学会発表

- 1) 北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦 互、岩谷靖雅: 抗レトロウイルス因子APOBEC3Cの構造とHIV-1 Vif結合インターフェイス. 第35回日本分子生物学会、福岡、

2012年12月

- 2) 伊部史朗、横幕能行、前島雅美、松岡和弘、正岡 崇、岩谷靖雅、杉浦 互：薬剤感受性プロファイリングに裏づけされた新規HIV-2組換え流行株CRF01_AB感染例の良好な治療経過. 第26回日本エイズ学会、横浜、2012年11月
- 3) 今橋真弓、泉 泰輔、今村淳治、松岡和弘、金子典代、市川誠一、高折晃史、内海 眞、横幕能行、直江知樹、杉浦 互、岩谷靖雅：HIV-1感染伝播・病勢に対するAPOBEC3B遺伝子型の影響に関する解析. 第26回日本エイズ学会、横浜、2012年11月
- 4) 大出裕高、鈴木康二、藤野真之、前島雅美、木村雄貴、正岡崇志、服部純子、横幕能行、鈴木淳巨、渡邊信久、岩谷靖雅、杉浦 互：耐性誘導により得た高度ダルナビル耐性HIV-1プロテアーゼの構造学的解析. 第26回日本エイズ学会、横浜、2012年11月
- 5) 岩谷靖雅、前島雅美、北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、伊部史朗、横幕能行、杉浦 互：APOBEC3Gの酵素活性非依存的な抗HIV-1作用メカニズム. 第60回日本ウイルス学会、大阪、2012年11月
- 6) 大出裕高、鈴木康二、藤野真之、前島雅美、木村雄貴、正岡崇志、服部純子、横幕能行、鈴木淳巨、渡邊信久、岩谷靖雅、杉浦 互：高度ダルナビル耐性HIV-1の分子機序の解明. 第60回日本ウイルス学会、大阪、2012年11月
- 7) 北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、横幕能行、鈴木淳巨、渡邊信久、杉浦 互、岩谷靖雅：APOBEC3Cの結晶構造解析とHIV-1 Vif結合インターフェイスの同定. 第12回日本蛋白質科学会、名古屋、2012年6月
- 8) 岩谷靖雅：細胞防御因子APOBEC3を活用する抗HIV治療に向けた造学的研究. 日本学術振興会回折構造生物第169委員会研究会、東京、2012年6月
- 9) 岩谷靖雅：APOBEC3のHIV-1 Vif結合インターフェイス. 第14回白馬シンポジウム in 京都、京都、2012年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

研究成果の刊行物に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama E E, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells	Microbes Infection		(in press)	2013
Jahanbakhsh F, Ibe S, Hattori J, Monavari SHR, Matsuda M, Maejima M, Iwatani Y, Memarnejadian A, Keyvani H, Azadmanesh K, Sugiura W	Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Iran: genomic evidence of CRF35_AD predominance and CRF01_AE infection among individuals associated with injection drug use	AIDS Res Hum Retroviruses	24 (1)	198-203	2013
Hergott CB, Mitra M, Guo J, Wu T, Miller JT, Iwatani Y, Gorelick RJ, Levin JG	Zinc finger function of HIV-1 nucleocapsid protein is required for removal of 5'-terminal genomic RNA fragments: A paradigm for RNA removal reactions in HIV-1 reverse transcription	Virus Res	171	346-355	2013
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama E E, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A	Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells	Microbes Infection	15	56-65	2013
Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsinsin T, Matsuoka K, Iwatani Y, Puthanakit T, Ananworanich J, Sophonphan J, Mahanontharit A, Naoe T, Vonthanak S, Phanuphak P, Sugiura W, On Behalf Of The Predict Study Team	Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency	AIDS Res Ther	24:9(1)	34	2012
Tsuzuki T, Iwase H, Shimada M, Hirashima N, Hibino Y, Ryuge N, Saito M, Tamaki D, Kamiya A, Yokoi M, Yokomaku Y, Fujisaki S, Sugiura W, Goto H	Clinical evaluation of peginterferon alpha plus ribavirin for patients co-infected with HIV and HCV at Nagoya Medical Center	Nihon Shokakibyō Gakkai zasshi	109(7)	1186-1196	2012

Ode H, Nakashima M, Kitamura S, Sugiura W, Sato H	Molecular dynamics simulation in virus research	Front Microbiol	3	258	2012
Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, KonoK, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T	The Carboxyl-Terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Circulating Recombinant form 01_AB Capsid Protein Affects Sensitivity to Human TRIM5 α	PLoS one	7(10)	e47757	2012
Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, SakumaR, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A	Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis.	J Proteomics	75(15)	4863-4873	2012
Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, KurosawaT, Yokomaku Y, YamaneT, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, Iwatani Y	The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding	Nat Struct Mol Biol	19(10)	1005-1010	2012
Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W	Short communication: lack of correlation between UGT1A1*6, *28 genotypes, and plasma raltegravir concentrations in Japanese HIV type 1-infected patients	AIDS Res Hum Retroviruses	28(8)	776-779	2012
Hoque MM, Suzuki K, Tsunoda M, Jiang J, Zhang F, Takahashi A, Ohbayashi N, Zhang X, Tanaka H, Omura S, Takenaka A	Structural insights into the specific anti-HIV property of actinohivin: structure of its complex with the alpha(1-2)mannobiose moiety of gp120	Acta Crystallogr D Biol Crystallogr	68	1671-1679	2012
Suzuki K, Ohbayashi N, Jiang J, ZhangX, Hoque MM, Tsunoda M, Murayama K, Tanaka H, Takenaka A	Crystallographic study of the interaction of the anti-HIV lectin actinohivin with the alpha(1-2)mannobiose moiety of gp120 HMTG	Acta Crystallogr SectF Struct Biol Cryst Commun	68(Pt 9)	1060-1063	2012
Iijima S, Lee Y-J, Ode H, AroldST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, Akari H	A non-canonical mu-1A-binding motif in the N-terminus of HIV-1 Nef determines its activity to down-regulate MHC-I in T lymphocytes	J Virol	86	3944-3951	2012

Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, Akari H, Ishida T, Matano T, Kimura A	Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates	Immunogenetics	64	669-678	2012
Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H	Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (<i>Macaca fascicularis</i>)	Front Microbiol	3	314	2012
Imahashi M, Nakashima M, Iwatani Y	Antiviral mechanism and biochemical basis of the human APOBEC3 family	Front Microbiol	3	250	2012
Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T	Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication	Retrovirology	9	3	2012
Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE	Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (<i>Macaca fascicularis</i>)	J Gen Virol	93	594-602	2012
Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A	Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques	Immunogenetics	64	131-141	2012
Li, J., Hakata, Y., Takeda, E., Liu, Q., Iwatani, Y., Kozak, CA., and Miyazawa, M	Two genetic determinants acquired late in <i>Mus</i> evolution regulate the inclusion of exon5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency.	PLoS Pathog	8	E1002478	2012
都築智之, 岩瀬弘明, 島田昌明, 平嶋昇, 日比野祐介, 龍華庸光, 齋藤雅之, 玉置大, 神谷麻子, 横井美咲, 横幕能行, 藤崎誠一郎, 杉浦互, 後藤秀実	当院におけるhiv、Hcv重複感染症例に対するペグインターフェロン、リバビリン併用療法の治療成績.	日本消化器病学会雑誌	109(7)	1186-1192	2012

厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業
「新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究」班
平成24年度 総括・分担研究報告書

発行日 2013年3月31日

発行者 研究代表者 杉浦 互

発行所 研究班事務局
独立行政法人国立病院機構
名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部
〒460-0001 名古屋市中区三の丸4丁目1番1号

