

201226019A

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
H24-エイズ-一般-005

抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規 HIV 戦略の開発・確立
に向けた系統的研究

平成 24 年度総括・分担研究報告書

平成 25 年 3 月

研究代表者 足立昭夫

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授)

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
H24-エイズ-一般-005

抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規 HIV 戦略の開発・確立
に向けた系統的研究

平成 24 年度総括・分担研究報告書

平成 25 年 3 月

研究代表者 足立昭夫

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授)

研究組織

研究者名	分 担	所 属	役 職
足立昭夫	研究代表者	徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
岩谷靖雅	研究分担者	国立病院機構 名古屋医療センター	室長
大塚雅巳	研究分担者	熊本大学 大学院生命科学研究部	教授
徳永研三	研究分担者	国立感染症研究所 感染病理部	主任研究官
中山英美	研究分担者	大阪大学 微生物病研究所	准教授
藤田美歌子	研究分担者	熊本大学 薬学部	准教授

目 次

I. 総括研究報告書

- 抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規 HIV 戦略の開発・確立 1
に向けた系統的研究
研究代表者: 足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

II. 分担研究報告書

1. Vpx 関連宿主因子の抗ウイルス機序の解析 7
足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)
2. APOBEC3G の発現制御モジュレーターと分解阻害剤の探索 11
岩谷靖雅(名古屋医療センター 臨床研究センター)
3. 宿主因子に対する制御物質の探索と創製: 抗ウイルス宿主因子を 15
擬似・制御する低分子化合物の創製
大塚雅巳(熊本大学大学院生命科学研究部)
4. Tetherin と Vpu の分子機序の解析: HIV-1 Vpu による抗 tetherin 19
作用機序の解析
徳永研三(国立感染症研究所感染病理部)
5. TRIM5 α による脱殻機序の解明とモジュレーターの探索 23
中山英美(大阪大学微生物病研究所)
6. インターフェロン誘導性新規 Vpx 関連宿主因子の探索と宿主因子 27
制御物質の評価: HIV-2 Vpx の SAMHD1 非依存的機能の解明
藤田美歌子(熊本大学薬学部)

III. 業績一覧(2012) 31

IV. 研究論文(抜粋)

I. 総括研究報告書

研究課題：抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立に向けた系統的研究

課題番号：H24-エイズ一般-005

研究代表者：足立 昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

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 室長）、大塚 雅巳（熊本大学大学院生命科学研究部 教授）、徳永 研三（国立感染症研究所 主任研究官）、中山 英美（大阪大学微生物病研究所 准教授）、藤田 美歌子（熊本大学薬学部 准教授）

1. 研究目的

多剤併用療法の進歩によって HIV 感染者の予後は改善されつつある。しかし、未だ根治(eradication)には至っておらず終生にわたって服薬を継続しなければならない。HIV 感染治療が長期化するが故の懸念も増大している。これらを克服するためには、根治に繋がる戦略を見出さなければならない。既存の抗 HIV 薬はウイルスの複製を阻害するものであり、体内からウイルスは駆逐されない。特に、HIV のように慢性に持続感染するウイルスの eradication は、最終的には免疫系などの宿主のシステムに頼らざるを得ない。しかし、従来のワクチンあるいは免疫学的治療概念では、この問題をクリアすることは非常に困難であると考えられている。最近、レトロウイルスに対する細胞内宿主因子が次々と同定され、ヒトは進化の過程で多くのレトロウイルスを排除してきたという証拠が見出されている。一方で、HIV はこれらの宿主防御因子の働きを解除する遺伝子産物をコードしている。そこで、本研究班では、宿主防御因子を活用した治療戦略への基盤を創出することを目的とし、HIV 感染・増殖に関与する宿主防御因子(SAMHD1、BST-2/tetherin、TRIM5、APOBEC3、未同定因子)の抗 HIV 作用機序とウイルス遺伝子産物による解除機構の分子基盤を明らかにする研究に取り組む。これにより、従来の免疫学とは異なる抗 HIV 防御システムの全体像を明らかにし、宿主因子を利用した次世代型治療戦略や病態解明への新たな知見が輩出できると考えられる。

2. 研究方法

3年間の計画で宿主因子を利用した治療法の開発や病態解明につながる新たな知見を輩出する。三つの軸に沿って各研究分担者が各論を展開し、成果

や手法を共有することで研究班全体として研究を強力に推進していく。研究目的により各種の研究手法（ウイルス学、分子生物学、生化学、有機化学、計算科学、構造生物学等）を用いる。（1）宿主因子とウイルスの増殖阻止の分子機序を明らかにする。（2）抗ウイルス宿主因子の発現制御機構と分解機構について解明し、ウイルス感染による変化もしくは個体差に関する研究を行う。（3）抗ウイルス宿主因子／解除因子の相互作用を阻害、あるいは抗ウイルス宿主因子の発現制御をコントロールする分子モジュレーターや低分子化合物を探索する。さらに、各研究者の知識・経験あるいは研究材料及び班研究のメリットを最大限に生かすため、研究代表者のもとで積極的な議論を重ねるインターラクティブな研究体制をとる。

（倫理面への配慮）

本研究は、遺伝子組換え実験を含むため「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多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 を用いた実験を含むため、実験を実施する研究機関の承認を得て行う。ヒト由来臨床材料を使う研究が行われる場合は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行う。

3. 研究結果

研究代表者及び研究分担者は緊密な協力関係のもとに研究を行った。初年度の研究は順調かつ着実に進捗し、主要な成果として要約以下の成績を得た。（1）既報の宿主因子（SAMHD1及びAPOBEC3A）以外にもHIV-2 Vpxの標的分子があることを分子遺伝学的解析から明らかにした（足立、藤田）。マイクロアレー法などにより、

その候補を15に絞り、候補分子の発現細胞を用いて効果を検証中である（足立）。また、Vpxの発現調節に重要なモチーフ（poly-proline motif: PPM）を同定し、翻訳過程を促進する機能を持つことを明らかにした（足立）。（2）APOBEC3の立体構造の解明に成功し、Vifとの相互作用部位を同定した（岩谷）。これにより新たな抗HIV薬開発への道が拓かれた。また、定量RT-PCR法によりAPOBEC3（A、B、C、DE、F、G及びHの7種類）の発現量を増加させるモジュレータを複数同定した（1型インターフェロン等）（岩谷）。

（3）Vpuに作用しBST-2/tetherinの抗ウイルス活性を増強させる宿主因子SCYL2を同定した（足立）。これとは逆に、Vpuと結合しその機能を補助する宿主因子の候補として、HaloLink Resin免疫沈降法を用いて3種類の細胞因子を同定した（徳永）。ジーンサイレンシング実験によりその効果を検証中である（徳永）。さらに、BST-2/tetherinの発現レベルが病態進行と逆相関の関係にある可能性を見出した（徳永）。（4）カニクイザルにおけるTRIM5遺伝子型の分布や抗ウイルス機能について明らかにした（中山）。また、TRIM5とは無関係にウイルス増殖を増強するHIV Gag-CA変異を同定した（足立、中山）。さらに、センダイウイルスベクターを用いたTRIM5評価系を確立し、HIV Gag-CAの試験管内アセンブリー系の構築にも成功した（足立、中山）。センダイウイルスの系を用いて低分子化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、50%以上の感染阻止効果を示す化合物が複数あった（中山）。

（5）TRIM5機能を擬似化する化合物BMMPを合成し、抗HIV-1活性を持つことを確認した（大塚、藤田）。また、APOBEC3の発現量を有意に増加させる低分子化合物SN-2を得た（大塚、藤田）。

4. 考察

本研究の目標を達成するためには、宿主細胞内防御因子（抗HIV因子）とこれを無効にするウイルス解除因子（HIVがコードするGag、Vif、Vpx及びVpu）との相互作用を分子レベルで詳細に解析・解明する必要がある。また、ウイルス複製に関与する未同定因子についての探索も活発に行う必要がある。これらに鑑みると、本年度の研究により各ウイルス解除因子とその標的である宿主防御因子について、

重要な学術的知見が蓄積しつつあることがわかる。HIVの複製や感染病態における宿主因子の重要性は明らかであるので、治療戦略の基盤を構成するウイルス蛋白質との相互作用機序の分子レベルでの解析を継続していく必要がある。具体的には次のようにまとめられる。（1）15種類の候補分子からVpxの細胞内標的因子（SAMHD1とAPOBEC3A以外）を同定する。Vpx PPMに結合する細胞因子を同定する。（2）APOBEC3の発現調節ではインターフェロン刺激を中心としたJAK-STAT系の活性化が深く関与することが明らかになった。APOBEC3の過剰発現がHIV複製にどの程度の抑制効果を持つか検証する。（3）Vpu機能を補助する細胞因子を同定する。（4）試験管内HIV Gag-CAアセンブリー系やセンダイウイルスベクター系を用い、微弱なヒトTRIM5活性を増強させる低分子化合物を探索する。（5）BMMP及びSN-2の作用機序を解明し、これに基づいてnMオーダーの活性を持つ選択的なHIV阻害剤の創製を試みる。

5. 自己評価

1) 達成度について

班研究を効果的・効率的に進めるために初年度は班会議を二回開催し、充分時間をかけて研究計画と研究成果の共有化を図った。これにより、研究代表者及び研究分担者間の有機的な協力体制（共同研究等）が構築され、予想以上の成果が得られた。研究班の成立時に想定していた研究テーマの全てについて明確な進展が見られ、さらなる発展を目指した実験計画が具体的に策定可能となった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

Eradicationを目標とした次世代型治療戦略に宿主細胞因子を総合的に活用するというアプローチは世界的にも極めてユニークである。この目標の基盤をなす宿主因子・ウイルス蛋白質相互作用の分子機序の解明には様々な先端的研究手法や先駆的情報が必須である。それぞれの研究テーマの目標は世界的にも高レベルに設定されている。したがって、本研究の学術的・国際的・社会的意義は明らかであり、当初の方向性に基づいて着実に研究を進展させることが肝要であると思われる。

3) 今後の展望について

既知の宿主防御因子 (TRIM5、APOBEC3、BST-2/tetherin 及び SAMHD1) とウイルス解除因子 (Gag、Vif、Vpx 及び Vpu) については本研究班においても精力的に研究が行われ顕著な成果が得られている。これらの研究課題の目標遂行に努めるとともに、今後は、未同定宿主防御因子及び未同定宿主補助因子 (既知の宿主防御因子とウイルス解除因子の相互作用に関与する未同定の宿主因子) の探索も極めて重要であると考え。これに関しては、本年度の成果により具体的な課題設定が可能となったので、実験解析による検証作業を行っていく。

6. 結論

HIV感染・増殖に関与する宿主細胞防御因子の抗ウイルス作用機序とウイルス遺伝子産物による解除機構の解明に取組み、新たな学術的知見を得た。同定した因子や因子内領域は、Vpxの発現増強に関

わる Vpx 内 PPM (poly-proline motif) 配列、APOBEC3とVifの相互作用部位、APOBEC3の発現量を増加させるモジュレーター及びBST-2/tetherinの抗ウイルス活性を増強させる宿主因子SCYL2である。探索中の宿主因子は、Vpxの標的分子 (15種類) 及びVpu機能補助因子 (3種類) である。構築した評価系はTRIM5の標的であるGag-CAの試験管内アセンブリー系である。この他、創薬に繋がり得る抗ウイルス宿主因子を擬似・制御する低分子化合物として、TRIM5機能を擬似化するBMMP 及びAPOBEC3の発現量を有意に増加させるSN-2を得た。

7. 健康危険情報

該当事項なし。

8. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

該当事項なし。

研究発表

研究代表者

足立昭夫

- 1) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., and Adachi, A. 2013. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection*, in press.
- 2) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 56-65, 2013.
- 3) Miyakawa, K., Sawasaki, T., Matsunaga, S., Tokarev, A., Quinn, G., Kimura, H., Nomaguchi, M., Adachi, A., Yamamoto, N., Guatelli, J., and Ryo, A. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Science Signaling* 5: ra73, 2012.
- 4) Fujita, M., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Otsuka, M. SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3: 297, 2012.
- 5) Nomaguchi, M., Fujita, M., Miyazaki, Y., and Adachi, A. Viral tropism. *Frontiers in Microbiology* 3: 281, 2012.
- 6) Nomaguchi, M., Doi, N., Matsumoto, Y., Sakai, Y., Fujiwara, S., and Adachi, A. Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins. *Frontiers in Microbiology* 3: 267, 2012.

研究分担者

岩谷靖雅

- 1) Hergott, C.B., Mitra, M., Guo, J., Wu, T., Miller, J.T., Iwatani, Y., Gorelick, R.J., and Levin, J.G. 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 Research*, in press.
- 2) Jahanbakhsh, F., Ibe, S., Hattori, J., Monavari, S.H.R., Matsuda, M., Maejima, M., Iwatani, Y., Memarnejadian, A., Keyvani, H., Azadmanesh, K., and 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 Research and Human Retroviruses*, in press.
- 3) Bunupuradah, T., Imahashi, M., Iampornsri, T., Matsuo, K., Iwatani, Y., Puthanakit, T., Ananworanich, J., Sophonphan, J., Mahanontharit, A., Naoe, T., Vonthanak, S., Phanuphak, P., and 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 Research and Therapy* 9: 34, 2012
- 4) Kitamura, S., Ode, H., Nakashima, M., Imahashi, M., Naganawa, Y., Kurosawa, T., Yokomaku, Y., Yamane, T., Watanabe, N., Suzuki, A., Sugiura, W., and Iwatani, Y. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nature Structural & Molecular Biology* 19: 1005-1010, 2012
- 5) Imahashi, M., Nakashima, M., and Iwatani, Y. Antiviral mechanism and biochemical basis of the human APOBEC3 family. *Frontiers in Microbiology* 3: 250, 2012

大塚雅巳

- 1) Sharma, R.K., Otsuka, M., Gaba, G., and Mehta, S. Inhibitors of transcription factor nuclear factor-kappa beta(NF- κ B)-DNA binding. *RSC advances* 3: 1282-1296, 2013.
- 2) Suemasu, S., Yamakawa, N., Ishihara, T., Asano, T., Tahara, K., Tanaka, K., Matsui, H., Okamoto, Y., Otsuka, M., Takeuchi, K., Suzuki, H., and Mizushima, T. Identification of a unique nsaid, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochemical Pharmacology* 84: 1470-1481, 2012.
- 3) Fujita, M., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Otsuka, M. SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3: 297, 2012.
- 4) Abe, M., Eto, M., Yamaguchi, K., Yamasaki, M., Misawa, J., Yoshitake, Y., Otsuka, M., and Harano, K. Clathrate formation of Diels-Alder adduct of phencyclone and acenaphthylene. Key role of CH/ π and bidentate CH/O interactions of the phenanthrene ring in construction of host framework. *Tetrahedron* 68: 3566-3576, 2012.
- 5) Yamakawa, N., Suemasu, S., Okamoto, Y., Tanaka, K., Ishihara, T., Asano, T., Miyata, K., Otsuka, M., and Mizushima, T. Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-{2-fluoro-4-[(2-oxocyclophenyl)methyl] phenyl}propanoic acid: nonsteroidal anti-inflammatory drugs with low gastric ulcerogenic activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 55: 5143-5150, 2012.

徳永研三

- 1) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes and Infection*, in press.
- 2) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y. DNA damage aids HIV-1 infection

of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10: 21, 2013.

- 3) Zheng, Y.-H., Jeang, K.-T., and Tokunaga, K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology* 9: 112, 2012..
- 4) Arias, J.F., Koyama, T., Kinomoto, M., and Tokunaga, K. Retroelements versus APOBEC3 family proteins: No great escape from the magnificent seven. *Frontiers in Microbiology* 3: 275, 2012.
- 5) Fujita, H., Fujimoto, K., Tokunaga, K., and Tanaka, Y. Intracellular Logistics of BST-2/Tetherin. *Current HIV Research* 10: 321-326, 2012.
- 6) Arias, J.F., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. Sites of action of HIV-1 Vpu in BST-2/tetherin downregulation. *Current HIV Research* 10: 283-291, 2012.
- 7) Tokunaga, K. HIV-1 Vpu and BST-2/tetherin: Enemies at the Gates. *Current HIV Research* 10: 275-276, 2012.

中山英美

- 1) 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 genome occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection*, in press.
- 2) Nakayama, E.E., Nakajima, T., Kaur, G., Mimaya, JI., Terunuma, H., Mehra, N., Kimura, A., Shioda, T. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 α linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.
- 3) Likanonsakul, S., Rattanatham, T., Feangvad, S., Uttayamakul, S., Prasithsirikul, W., Srisopha, S., Nitiyanontakij, R., Tengtrakulcharoen, P., Tarkowski, M., Riva, A., Nakayama, E.E., and Shioda, T. Polymorphisms in *Fas* gene is associated with HIV-related lipotrophy in Thai patients. *AIDS Research and Human Retroviruses* 29: 142-150, 2013.
- 4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 56-65, 2013.
- 5) Miyamoto, T., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Ibe, S., Takehara, S., Kono, K., Yokomaku, Y., Pizzato, M., Luban, J., Sugiura, W., Sato, H., and Shioda, T. The cauboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5 α . *PLoS One* 7: e47757, 2012
- 6) Saito, A., Kawamoto, Y., Higashino, A., Yoshida, T., Ikoma, T., Suzaki, Y., Ami, Y., Shioda, T., Nakayama, E.E., and Akari, H. Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3: 314, 2012
- 7) Bozek, K., Nakayama, E.E., Kono, K., and Shioda, T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Frontiers in Microbiology* 3: 206, 2012

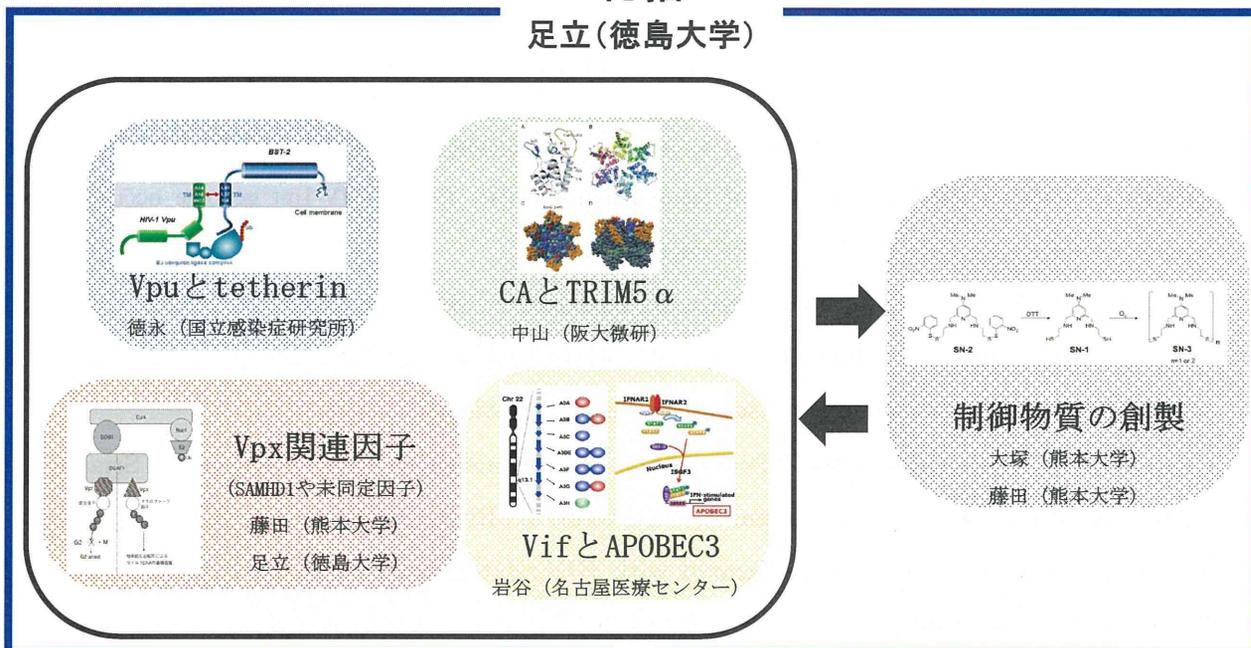
藤田美歌子

- 1) Fujita, M., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Otsuka, M. SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3: 297, 2012.
- 2) Nomaguchi, M., Fujita, M., Miyazaki, Y., and Adachi, A. Viral tropism. *Frontiers in Microbiology* 3: 281, 2012.

抗ウイルス宿主因子を基盤とする 新規抗HIV戦略の開発・確立に向けた系統的研究

総括

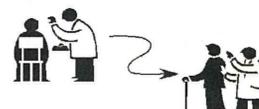
足立(徳島大学)



抗HIV宿主因子とHIV感染に関する学術的知見を輩出



**Eradicationを目標にした
次世代型治療戦略の基盤創出**



Ⅱ. 分担研究報告書

分担研究課題：Vpx 関連宿主因子の抗ウイルス機序の解析

研究分担者：足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

研究協力者：野間口雅子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授）

宮崎恭行（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 助教）

三宅在子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 助教）

研究要旨

分子遺伝学的機能領域解析に基づき、ウイルス学/分子生物学的手法による HIV-2 Vpx の基盤的研究を行なった。主要な研究プロジェクトは Vpx の生化学、Vpx の標的細胞因子の探索及びウイルス蛋白質（特に、Gag-CA と Pol-RT）の試験管内アッセイ系の構築である。その結果、本年度は要約次の成果を得た。（1）Vpx の C 末端に存在する特殊なモチーフ（poly-proline motif; PPM）が Vpx の翻訳過程に関わっていることを明らかにした。（2）Vpx の標的細胞因子の候補を 15 に絞った。（3）HIV-1 及び HIV-2 の Gag-CA 試験管内アセンブリー系の構築に成功した。

A. 研究目的

HIV-2や各種SIVがコードするVpxはHIV-1が持たないウイルス蛋白質であることもあって研究が遅れていた。一昨年、Vpxにより分解される標的細胞蛋白質としてSAMHD1とAPOBEC3Aが報告されると、新しいウイルス蛋白質/抗ウイルス蛋白質として一躍注目されるようになった（特に、SAMHD1）。足立はHIV基礎研究のパイオニアの一人として、分子遺伝学的手法によるVpx研究にも精力的に取り組む、その機能について情報を蓄積してきた（足立らの総説参照。Rev. Med. Virol. 20: 68-76, 2010）。Vpxはマクロファージや樹状細胞だけでなく、T細胞におけるHIV-2/SIVmacの複製に重要であり（上記総説）、ウイルスゲノムの逆転写・核移行に関与していることを明らかにしてきた（Microbes Infect. 5: 387-395, 2003; J. Virol. 82: 7752-7756, 2008）。また、Vpx PPMがVpxの機能そのものではなくVpx発現レベルの制御に関わっている可能性も指摘した（Microbes Infect. 10: 1387-1392, 2008）。VpxがHIV-1とHIV-2のウイルス学的特性（特に病原性や伝播能）の差に関与している可能性もある。本研究では、これらの成果に基づき、Vpxを新しい創薬ターゲットとして捉え、その基本的性状を詳細に解明することを目的とする。

B. 研究方法

Vpx の発現にはN末あるいはC末にFLAG タグを持つ発現ベクター（pEF1）を用い、293T 細胞での発現をウェスタンブロット法で解析した。

Vpx の標的細胞因子の探索は各種細胞株等を用いたマイクロアレー法により行った。使用した細胞は、初代 DC 細胞、未分化及び分化 THP-1（マクロファージ様細胞株）、H9（ヒトリンパ球細胞株）、HSC-F（カニクイザルリンパ球細胞株）、M1.3S（アカゲザルリンパ球細胞株）、MK.P3(F)

（カニクイザル腎臓細胞株）及び LLC-MK2（アカゲザル腎臓細胞株）である。選択した細胞因子は pcDNA3.1(-)-cFLAG にクローニングし、その恒常発現にはネコ CRFK 細胞を用いた。HIV Gag-CA はバクテリアの系で発現させ Ni カラムを用いて精製した。その他、常用される分子生物学的手法や生化学的手法を用いた。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

(1) Vpx-PPM 変異プロウイルスクローンの増殖特性と発現ベクターを用いた Vpx の発現量は良く相関していた。この結果から、PPM は Vpx の発現を制御していることが明らかとなった。PPM 変異体の発現量低下は蛋白質分解阻害剤によっても回復せず、プロテアソーム分解やリソソーム分解によるものではないことが示された。また、変異体の細胞内 mRNA 量には異常が認められなかった。各種試験管内転写/翻訳系（ウサギ網状赤血球抽出液及び大腸菌抽出液）を用いた解析から、変異体の発現量の低下は翻訳過程に起因するものであることがわかった。さらに、この低下はアミノ酸配列に依存するものでありコドン（核酸）依存性はなかった。SIVmac239 由来の Vpx についても PPM による同様の発現制御があることが確認された。

Vpr と Vpx は立体構造的に良く類似していることが知られている。しかし、PPM は HIV-2 Vpr には存在しない。Vpx と同様に発現ベクターを構築し、Vpr について検討したところ、極めて低レベルの発現しか確認されなかった。

(2) Vpx のターゲット候補細胞因子 15 を発現ベクターにクローニングした。そのうちの 2 種類については恒常的にその因子を発現し得る CRFK 細胞

を得た (G418 による選択)。現在、マーカー付き HIV-2 クローンとその Vpx 変異体を用いたシングルサイクル感染性アッセイで、これらの細胞株が変異体に対して抗ウイルス活性を示すか否かを検討中である。

(3) 精製した HIV-1 (NL4-3) 及び HIV-2 (GL-AN) の Gag-CA は適当な条件下 (NaCl, Ficoll 在下) で効率良くアセンブリーした。しかし HIV-1 と HIV-2 の CA には大きな条件の差 (CA 濃度や NaCl 濃度) が認められた。両 CA 間でキメラを構築し解析した結果、ヘリックス 7 が NaCl 依存的アセンブリー能の差の原因であることがわかった。CA アセンブリー機構の解明を目指し、現在、構造学的予測に基づくさらに詳細な分子遺伝学的解析が進行中である。

D. 考察

Vpx PPM の機能について、翻訳過程を介して Vpx の発現量制御に関与することを解明した。本年 1 月のサイエンス誌に、バクテリアの系において PPM が翻訳効率の制御に重要であることが初めて示された (二報同時報告。Science 339: 82-85, 2013; Science 339: 85-88, 2013)。ウイルスに関しては我々のものが初めての報告である。シーケンズバンクには PPM を持つ蛋白質が多数登録されており、PPM 研究は今後大きな発展が予想される。我々は現在、各種 HIV/SIV Vpx/Vpr の発現と PPM との関連性を詳細に解析中である。また、サイエンス誌の報告から、PPM には特定の細胞因子が結合することが予想される。現在、このバクテリア因子の動物オルソログを試すと共に、リコンビナント Vpx を用いた免疫共沈法により、将来の抗ウイルス薬の開発を念頭に細胞因子の同定作業を進めている。

Vpx のターゲット候補である 15 種類の細胞因子は全て恒常発現細胞を樹立し、変異体を用いてウイルス学的に確実に抗ウイルス因子を同定する。新たな因子 (複数の可能性もある) が同定されれば、各種 HIV/SIV に対する抗ウイルス効果を系統的に検証していく。これにより、各種 HIV/SIV の特性も明らかになり、基礎研究だけでなく臨床応用研究にも貢献できると考えられる。

本研究で構築した in vitro CA アセンブリー実験系 (HIV-1 及び HIV-2) は宿主細胞因子 (及びウイルス蛋白質) と主要ウイルス蛋白質 CA の相互作用の研究に極めて有用である。特に、細胞レベルで定量的解析が困難な場合に有効である。抗 HIV 細胞因子の代表の一つである TRIM5 は CA に結合してその抗ウイルス作用を発揮する。ウイルス複製を増強する因子の多くも CA に結合する。CA はウイルス複製の全般に亘り中心的役割を果たすので、in vitro 系の確立の意義は大きい。この試験管内実験系は各種薬剤の検証にも適している。

E. 結論

本年度の成果により、HIV に関する次の研究が進展し、また、近い将来の可能性が提示された。

(1) Vpx の PPM は Vpx 翻訳過程に作用することで発現量を著しく増強させ、ウイルス複製を亢進させる。PPM の作用を減弱させればウイルス複製は減少する。PPM 結合因子の同定が喫緊の課題である。(2) Vpx の試験管内大量発現系及び HIV-1 と HIV-2 の両者に関する試験管内 Gag-CA アセンブリー系が確立された。これらは様々な研究プロジェクトに利用可能である。

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) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., and Adachi, A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection*, in press.
- 2) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Doi, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 56-65, 2013.
- 3) Miyakawa, K., Sawasaki, T., Matsunaga, S., Tokarev, A., Quinn, G., Kimura, H., Nomaguchi, M., Adachi, A., Yamamoto, N., Guatelli, J., and Ryo, A. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Science Signaling* 5: ra73, 2012.
- 4) Fujita, M., Nomaguchi, M., Adachi, A., Otsuka M. SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3: 297, 2012.
- 5) Nomaguchi, M., Fujita, M., Miyazaki, Y., Adachi, A. Viral tropism. *Frontiers in Microbiology* 3: 281, 2012.
- 6) Nomaguchi, M., Doi, N., Matsumoto, Y., Sakai, Fujiwara, S., and Adachi, A. Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins. *Frontiers in Microbiology* 3: 267, 2012.

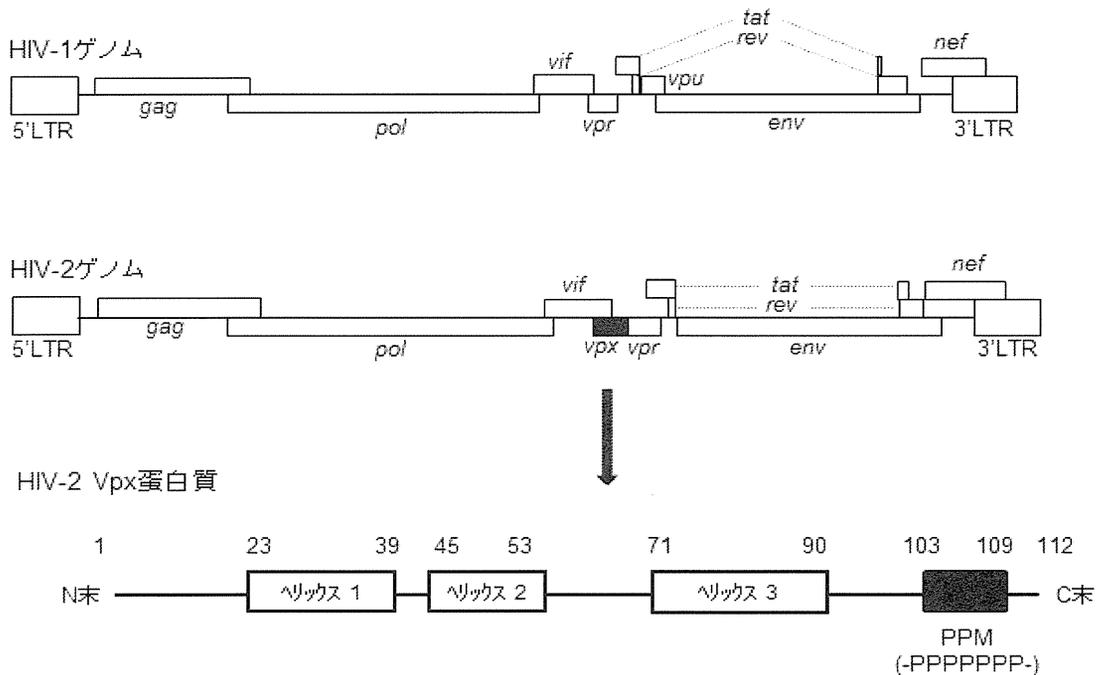
2. 学会発表等

- 1) 宮崎恭行、三宅在子、野間口雅子、内山恒夫、足立昭夫: in vitro 再構築系を用いた HIV-2 CA アセンブリーの安定性に関する解析。第 60 回日本ウイルス学会。2012 年 11 月 13 日 (火)、大阪。

- 2) 土肥直哉、藤原佐知、酒井遥介、松本 唯、足立昭夫、野間口雅子：R5-tropic HIV-1mt NL-DT562 の Env 適応変異による増殖促進機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会. 2012 年 11 月 13 日 (火)、大阪.
- 3) 三宅在子、藤野悠那、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、藤田美歌子、宮崎恭行：Vpx 発現における C 末端ポリプロリンモチーフの機能の解析. 第 60 回日本ウイルス学会. 2012 年 11 月 14 日 (水)、大阪.
- 4) 藤田美歌子、野間口雅子、古賀涼子、藤野悠那、大塚雅巳、足立昭夫：SAMHD1 非依存的な HIV-2 Vpx の機能. 第 60 回日本ウイルス

- 学会. 2012 年 11 月 14 日 (水)、大阪.
- 5) 野間口雅子、三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、宮崎恭行、足立昭夫：HIV-1 インテグラーゼ C 末端領域の 1 塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会. 2012 年 11 月 14 日 (水)、大阪.
- 6) 藤野悠那、三宅在子、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、宮崎恭行、藤田美歌子：HIV-2 Vpx 富プロリン領域の機能. 第 26 回日本エイズ学会. 2012 年 11 月 24 日 (土)、横浜.

HIV-2 Vpx の構造



分担研究課題：APOBEC3G 発現制御モジュレーターと分解阻害剤の探索

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 室長)

研究要旨

宿主防御因子である APOBEC3 ファミリータンパク質の発現制御の個体差は、病態進行の差に影響を与えることが知られている。本研究では、未だ明らかになっていない APOBEC3 ファミリーの発現制御機構について解析し、発現に影響を与える化合物あるいは生理活性物質を見出すことを目的とする。本年度は、MDM 細胞を用いた生理活性物質の探索と様々な培養細胞における APOBEC3 ファミリー、特に APOBEC3G の発現制御機構についての解析を行った。その結果、APOBEC3G 発現誘導には JAK-STAT シグナル伝達系が重要であるとともに、未同定の他の制御機構が存在する可能性があることが明らかになった。

A. 研究目的

HIV 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ている。しかし、治療が長期化するが故の多くの問題も浮き上がっている。既存薬の作用点と異なる新規薬剤の実現は多剤耐性症例の救済のみならず、治療の選択の幅を広げ、副作用の回避や薬剤耐性ウイルス出現のチャンスを低下させることが期待される。その中で、根治療法の新たな模索も絶えず推進していく必要がある。本研究では、宿主防御因子である APOBEC3 ファミリータンパク質を活用した新規治療薬を目標に、未だ明らかになっていない APOBEC3 ファミリーの発現制御機構について解析し、発現に影響を与える化合物あるいは生理活性物質を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

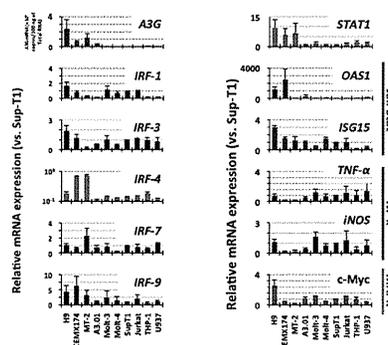
APOBEC3 ファミリー (A、B、C、DE、F、G、Hの7種)の発現量として、定量 RT-PCR (RT-qPCR) 法を用いて各 mRNA の量を定量した。各種培養細胞あるいは CD14+ MDM (Monocyte-derived Macrophage) 細胞に、生理活性物質あるいは化合物を添加することにより、発現量の変化を解析した。活性化マーカーは RT-qPCR により検出した。STAT1 の活性化は抗リン酸化 (抗 pStat1 Y701) 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により解析した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

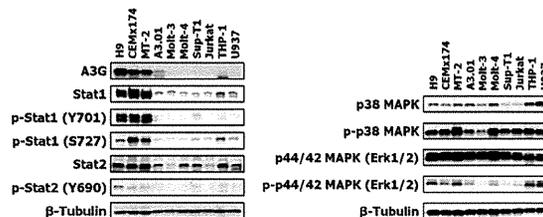
初年度では、MDM 細胞における APOBEC3 の発現量上昇させる生理活性物質として 1 型および 2 型インターフェロンと Toll-like Receptor リガンドのみ見出し、残念ながら新たな生理活性物質を見出すことには至っていない。一方、培養細胞における APOBEC3G (A3G) の恒常的発現で

図1 RT-qPCRにより培養細胞においてA3Gの発現制御に関与する因子を検索した。A3Gの恒常的発現レベルはSTAT1 mRNAの発現と相関していた。



は、Jak-STAT1系の恒常的活性化が重要であることを見出した (図1)。Stat1はリン酸化を受けて活性化し転写を促進するため、ウェスタンブロット法でリン酸化状態を確認した。非許容細胞においてStat1タンパク質の高発現が確認され、さらにアミノ酸701番目のチロシン残基および727番目のセリン残基が非許容細胞特異的にリン酸化を受けていることが確認された。ISGF3を構成するStat2の発現は許容細胞でも発現が確認されたが、690番目のチロシン残基のリン酸化は非許容細胞でみられた (図2)。一方、MAP系キナーゼの活性化とは相関性は認められなかった。

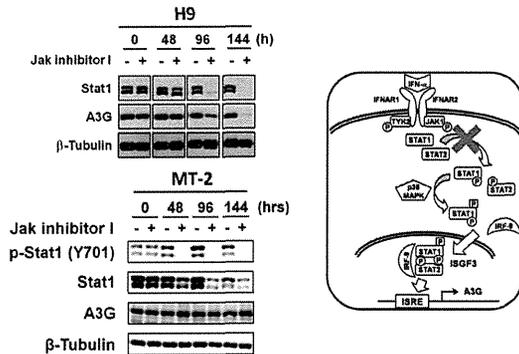
図2 STAT1の活性化と相関しているが、MAP系の活性とは相関性が低い。



これらの結果から、A3Gの発現はIFN誘導性の遺伝子で、Stat1も発現に関与していることが示唆された。CD4+リンパ球である H9 細胞では、JAK1 阻害剤によって A3G のタンパク質量を抑制することを見出した (図3)。しかし、MT-2 細

胞においては、今回用いた JAK1 阻害剤では A3G の発現を抑制することができず、この JAK1 阻害剤で阻害されない他の機序も存在することが示唆された (図 3)。

図 3 H9 細胞における A3G の発現制御には、Jak-STAT1 系が重要である。



D. 考察

APOBEC3 の発現制御では、細胞・組織特異的な発現パターンから、今回明らかになった JAK-STAT 系以外のシグナル伝達系も関与することが考えられる。一方、感染病態におけるセットポイント時の A3G 発現量が感染予後 (血中ウイルス量など) に大きく影響を与えるという報告がなされているが、急性期におけるインターフェロンの産生量がセットポイント時の A3G 発現量に個体差を生じる可能性が考えられ、更なる解析が必要である。

E. 結論

APOBEC3 の発現制御には、JAK-STAT のシグナル伝達系が重要であり、培養細胞レベルでは恒常的な発現制御の分子機序を明らかにすることができた。今後、感染急性期の個体において、インターフェロンの感染予後に対する影響について解析する必要があると考える。さらに、JAK-STAT シグナル伝達系以外で、かつ創薬あるいは病態解明につながる新たな発現誘導機序を解明したいと考えている。

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) 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, Iampornsin 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) Imahashi M, Nakashima M, Iwatani Y. Antiviral mechanism and biochemical basis of the human APOBEC3 family. *Front Microbiol.* 2: 250, 2012.

2. 学会発表等

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
- 木淳巨、渡邊信久、岩谷靖雅、杉浦互. HIV-1 プロテアーゼによるダルナビル耐性の分子機構の解明. 第 50 回日本生物物理学会、2012 年 9 月、名古屋
- 2) 中島雅晶、北村紳悟、大出裕高、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、横幕能行、山根隆、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅. APOBEC3 間における HIV-1 Vif 結合インターフェイスの違い. 第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月、大阪
- 3) 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. APOBEC3C の構造解析と HIV-1 Vif 結合インターフェイスの同定. 第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月、大阪 (日本ウイルス学会ポスター賞受賞)
- 4) 松田昌和、服部純子、今村淳治、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互. Plasma RNA と Proviral DNA による HIV 指向性遺伝子型の比較解析. 第 26 回日本エイズ学会、2012 年 11 月、横浜
- 5) 鬼頭優美子、松田昌和、服部純子、伊部史朗、大出裕高、松岡和弘、今村淳治、岩谷靖雅、杉浦互、横幕能行. 臨床検体由来 *env* 全長組み換え HIV-1 による指向性検査法の確立. 第 26 回日本エイズ学会、2012 年 11 月、横浜
- 6) 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、2012 年 12 月、福岡

国内ポスター発表

- 1) 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

分担研究課題：宿主因子に対する制御物質の探索と創製：抗ウイルス宿主因子を擬似・制御する低分子化合物の創製

研究分担者：大塚 雅巳（熊本大学大学院生命科学研究部 教授）

研究要旨

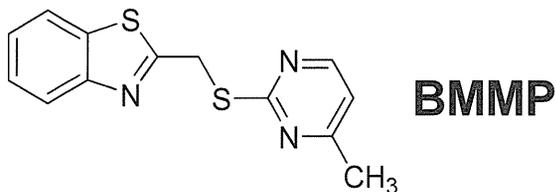
既に報告されている、TRIM5 の擬似化合物 BMMP を合成し、抗 HIV 活性を持つことを確認した。さらに、BMMP の誘導体 2 種類を合成した。現在は、BMMP の作用機序を明らかにするために、ビオチン化 BMMP の合成を行っている。また、APOBEC3G の発現量を増やす化合物 SN-2 の作用機序を調べるために、ビオチン化 SN-2 の合成も行っている。

A. 研究目的

これまでに、多くの抗エイズ薬が開発されてきた。その結果、それらを用いた多剤併用療法 (ART 療法) によって血中のウイルス量を測定感度以下まで抑えることができるようになり、エイズの発症進行を大幅に抑えることが可能になってきた。しかし、長期服用による既存薬の毒性や、薬剤耐性ウイルスの発現が問題となっている。そこで、新しいターゲットを持つ薬の開発が望まれている。

一方、近年、抗ウイルス宿主因子 APOBEC3G の発見がきっかけとなり、BST-2/tetherin、TRIM5、SAMHD1 など抗ウイルス宿主因子の実態が次々と明らかになってきた。これらの因子は、抗エイズ薬のターゲットとなり得る。本研究では、新規抗エイズ薬開発の礎となるような、抗ウイルス宿主因子を擬似・制御する低分子化合物の創製を創製を目指した。

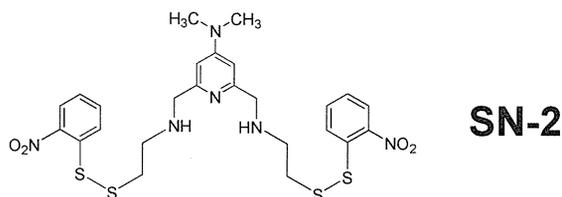
2011年、北里大学北里生命科学研究所 森川裕子と国立感染症研究所 駒野 淳らは、化合物 BMMP が異常な HIV-1 の脱殻を惹起することを報告した (Urano et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4251, 2011)。



BMMP は TRIM5 の擬似化合物であると考えられる。しかし、その活性は高くない (IC₅₀: 25 μM 程度)。また、BMMP の標的蛋白質は Gag CA であることが示されているが、CA のどの部位に作用するかは明らかになっていない。そこで本研究において、BMMP の作用機序を明らかにしつつ、活性を向上させることを目指した。

また、2011年、筆者らのグループは、化合物 SN-2 が APOBEC3G の発現量を増やすことを報告した

(Ejima et al. *Int. J. Mol. Med.* 28, 613, 2011)。



しかし、その作用メカニズムは明らかになっていない。そこで本研究において、SN-2 の作用機序を明らかにしながら、より選択的で強い活性を持つ化合物へと発展させることを目指した。

B. 研究方法

有機合成化学的手法により、化合物を合成した。抗 HIV-1 活性の測定は以下の方法で行った。pNL4-3 を 293T 細胞にトランスフェクションし、その培養上清を NL4-3 ウイルスとした。M8166/H1 luc 細胞を化合物で処理した後、NL4-3 を感染させ、インキュベーションした。細胞をライシスしてルシフェラーゼアッセイを行うとともに、培養上清のウイルス量を RT アッセイにより調べた。

(倫理面への配慮)

本研究において、倫理面の配慮が必要な研究は行っていない。

C. 研究結果

(1) 2-ホルミルベンゾチアゾールを出発原料とし、3工程、総収率37%でBMMPを合成した。化合物の構造はNMR、Massスペクトルなどにより確かめた。

(2) M8166/H1 luc 細胞を用いてBMMPの抗HIV活性を調べた。その結果、25 μMのBMMPがHIV-1増殖をほぼ完全に抑制した。この結果は、文献 (Urano et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4251, 2011) とほぼ一致する。

(3) BMMPの誘導体2種類 (ピリミジン環にメチル基がないものと、メチル基を2つ持つもの) を合成した。活性は現在検討中である。

(4) BMMPの標的蛋白質はHIV-1 Gag CAであることが示されているが、CAのどの部位に作用するかは明らかになっていない。一方BMMPはSIVmacには作用しない。そこで、BMMPをBIACOREのセンサーチップに固定し、種々のHIV-1/SIVキメラCA蛋白質を流して、CAのどの部位にこの化合物が結合するのか調べようと考えた。また、このBIACORE解析で競合阻害を行えば種々の化合物とGag CAの結合力を求めることができ、アッセイ系としても使用することができる。そこで、ビオチン化BMMPの合成を行うことにした。N-(6-ブロモペンチル)フタルイミドを出発原料とした、7工程での合成法をデザインした。現在3工程まで合成を進めている。

(5) SN-2は細胞内で還元されてSH体(SN-1)に変化し、SN-1がAPOBEC3Gの亜鉛フィンガー部位の亜鉛部位に結合すると予想している(SN-1が亜鉛フィンガー型転写因子の機能を抑制することは既に報告している)。その結合による蛋白質の構造変化で、APOBEC3Gがプロテアソーム分解を受けづらくなると考えている。プレリミナリーな実験では、SN-2の存在により、APOBEC3Gが異常なユビキチン化を受けることを示唆するデータを得ている。詳細については現在検討中である。

(6) SN-1がAPOBEC3Gの亜鉛フィンガー部位の亜鉛部位に結合することを確かめるために、SN-1をBIACOREのセンサーチップに固定し、亜鉛を含有するAPOBEC3Gと、亜鉛を除いたAPOBEC3Gを流し、結合力を比較しようと考えた。また、このBIACORE解析で競合阻害を行えば種々の化合物とAPOBEC3Gの強さを求めることができ、アッセイ系としても使用することができる。そこで、ビオチン化SN-2の合成を行うことにした。ジメチルアミノピリジンを出発原料とした多工程の合成に現在取り組んでいるところである。

D. 考察

現在合成を行っているビオチン化BMMPやビオチン化SN-2を合成して、ピアコア解析ができれば、BMMPやSN-2の作用機序の解明が可能になると考えている。明らかにした作用機序に基づいて、できるだけ合理的に化合物の最適化を進めたいと考えている。

E. 結論

(1) BMMPを合成し、BMMP 25 μ MでHIV-1増殖をほぼ完全に抑制することを確かめた。

(2) BMMPの誘導体2種類を合成した。現在活性を検討中である。

(3) ビオチン化BMMPを合成中である。合成後はこれをBIACOREのセンサーチップに固定してBIACORE解析を行うことでBMMPの作用機序を調べる予定である。

(4) ビオチン化SN-2を合成中である。合成後は、(3)に述べたのと同様の手法によりSN-2の作用機序を調べる予定である。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Abe, M., Eto, M., Yamaguchi, K., Yamasaki, M., Misawa, J., Yoshitake, Y., Otsuka, M., Harano, K. Clathrate formation of Diels-Alder adduct of phencyclone and acenaphthylene. Key role of CH/ π and bidentate CH/O interactions of the phenanthrene ring in construction of host framework. *Tetrahedron* 68: 3566-3576, 2012.

2) Yamakawa, N., Suemasu, S., Okamoto, Y., Tanaka, K., Ishihara, T., Asano, T., Miyata, K., Otsuka, M., Mizushima, T. Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-{2-fluoro-4-[(2-oxocyclophenyl)methyl]phenyl}propanoic acid: nonsteroidal anti-inflammatory drugs with low gastric ulcerogenic activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 55: 5143-5150, 2012.

3) Fujita, M., Nomaguchi, M., Adachi, A., Otsuka M. SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3: 297, 2012.

4) Suemasu, S., Yamakawa, N., Ishihara, T., Asano, T., Tahara, K., Tanaka, K., Matsui, H., Okamoto, Y., Otsuka, M., Takeuchi, K., Suzuki, H., Mizushima, T. Identification of a unique nsaid, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochemical Pharmacology* 84: 1470-1481, 2012.

5) Sharma, RK., Otsuka, M., Gaba, G., Mehta, S. Inhibitors of transcription factor nuclear factor-kappa beta (NF- κ B)-DNA binding. *RSC Advances* 3: 1282-1296, 2013.

2. 学会発表等

1) 三宅在子、藤野悠那、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、藤田美歌子、宮崎恭行: Vpx 発現における C 末端ポリプロリンモチーフの機能の解析. 第60回日本ウイルス学会. 2012年11月14日(水)、大阪.

2) 藤田美歌子、野間口雅子、古賀涼子、藤野悠那、大塚雅巳、足立昭夫 : SAMHD1 非依存的な HIV-2 Vpx の機能. 第60回日本ウイルス学会. 2012年11月14日(水)、大阪.

3) 立石 大、安楽健作、大塚雅巳、藤田美歌子 :