

研究課題：Gag ペプチドを用いた Gag 機能部位の研究

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 室長）

共同研究者：玉村啓和（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授）

研究要旨：我々は、Gag 機能部位を明らかにするための基盤的研究として、ペプチド化学的手法によって合成した HIV-1 Gag 部分ペプチドの細胞内導入による HIV 複製制御の可能性を検討している。今年度はまず、HIV-1 MA 部分ペプチドライブラリーのスクリーニングから得られた MA 部分ペプチド 2C の抗ウイルス活性スペクトルと作用機序の検討を行った。その結果 2C は、1) MLV Env や VSV-G を介した HIV-1 コアの侵入を阻害しない、2) HIV-1 はサブタイプに関わらず一部の例外はあるがその感染を阻害する、3) HIV-2 や SIV の感染は阻害しない、4) time-of-addition 実験の結果から、その作用点は HIV-1 の CD4 結合後膜融合に至る過程である、と推定された。加えて、HIV-1 CA 部分ペプチドライブラリーの抗 HIV-1 活性を指標としたスクリーニングも実施した。その結果、X4、R5 HIV-1 のいずれのウイルスに対しても阻害活性を示す部分ペプチドが、1) 細胞膜透過性を付与しないペプチドのみ、2) 細胞膜透過性を付与したペプチドのみ、3) その両方のペプチドで阻害活性を示すという3通りの阻害パターンがあることが明らかになった。

A. 研究目的

Gag に関連する治療標的構造の解明 / 抗 HIV 活性リード化合物の開発につながる Gag 機能部位の同定と Gag 蛋白質による HIV 複製制御機構の解明を目的とする。期待される成果は、Gag 部分ペプチドの抗 HIV 活性評価およびその作用機序の解明による Gag 機能部位および治療標的候補因子の特定である。

B. 研究方法

(1) 各種 Env によるシュードタイプ HIV-1 の作製および感染実験：

293T 細胞に Env(-) の HIV-1 と HIV-1 (NL4-3) Env、A-MLV Env または VSV-G を共導入し、これらの Env によるシュードタイプ HIV-1 を作製した。得られたシュードタイプ HIV-1 を試験ペプチドまたはコントロール薬剤の存在下で TZM-bl 細胞に感染させ、感染 2 日後の luciferase 活性を測定することによって試験ペプチドの各種 Env によるシュードタイプ HIV-1 の侵入阻害活性を検討した。

(2) MA 部分ペプチド (2C) に関しては、その作用点を推定するためいわゆる "Time-of-addition" 実験を HIV-1 (NL4-3) Env を TZM-bl 細胞に感染させる系で行った。なお、コントロール薬剤として、吸着阻害剤 DS5000、

sCD4、CXCR4 阻害剤 AMD3100、HIV-1 膜融合阻害剤 T-20 (Enfuvirtide) と AZT を使用した。

(3) CA 部分ペプチド (CA 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、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) の感染系で抗 HIV-1 活性および細胞毒性を MTT 試験によって測定した。なお NL(AD8) の感染系では、一部の部分ペプチドの抗 HIV-1 活性の評価を感染細胞培養上清中の p24 (CA) ELISA によっても評価した。

(倫理面での配慮)

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律

C. 研究結果

(1) MA 部分ペプチド 2C による各種 Env によるシュードタイプ HIV-1 の感染阻害を検討実験：2C は HIV-1 (NL4-3) Env でシュードタイプした HIV-1 の TZM-bl 細胞への感染を用量依存的に阻害したが、A-MLV Env または VSV-G でシュードタイプした HIV-1 の感染を 12.5 μM においてもほ

ほとんど阻害しなかった(図1)。

(2) MA部分ペプチド2Cの抗ウイルススペクトルの検討: 2CはサブタイプA, B, Cの primary isolates に対して抗ウイルス活性を示したが、一部活性を示さない例外も認められた。興味深いことに、2CはHIV-2, Maraviroc 耐性 HIV-1 (感染研エイズ研究センター・吉村先生 data) や SIVmac239 に対して抗ウイルス活性を示さなかった。

(3) MA部分ペプチド2Cの作用点: Time-of-addition 実験の結果、2Cが抗HIV-1活性を示す作用点は、その作用点はHIV-1のCD4結合後膜融合に至る過程である、と推定された(図2)。

(4) CA部分ペプチドの抗HIV-1活性: X4, R5 HIV-1のいずれのウイルスに対しても阻害活性を示す部分ペプチドが、1)細胞膜透過性を付与しないペプチドのみ(19C)、2)細胞膜透過性を付与したペプチドのみ(1L, 6L)、3)その両方のペプチドで阻害活性を示す(15C, 15L)という3通りの阻害パターンを示す部分ペプチドがあることが明らかになった(表1、表2)。

D. 考察

(1) 予備的実験の結果も総合すると、MA部分ペプチド2Cは、標的細胞側に作用し、おそらくウイルスのCD4結合直後の過程を阻害することが推定される。

(2) CA部分ペプチドの fragment 15はCAのNTDとCTDの連結領域であり、HIV-1コアのアセンブリーなどに重要という報告もあり、このペプチドの作用機序に興味もたれる。

E. 結論

(1) MA部分ペプチド2CはHIV-1の侵入過程の解析に有用なプローブと考えられる。

(2) 抗HIV-1活性を有するCA部分ペプチドが複数得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H: CXCR4-derived synthetic peptides inducing anti-HIV-1 antibodies. *Bioorg Med Chem* 21(22):

6878-6885, 2013.

2) Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Métifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, Tamamura H: Cell-Permeable stapled peptides based on HIV-1 Integrase Inhibitors derived from HIV-1 gene products. *ACS Chemical Biology* 8(10): 2235-2244, 2013.

3) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H: Anti-HIV-1 Peptide derivatives based on the HIV-1 co-receptor CXCR4. *Chem Med Chem* 8(10): 1668-1672, 2013.

4) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H: Multimerized CHR-derived peptides as HIV-1 fusion inhibitors. *Bioorg Med Chem* 21(15): 4452-4458, 2013.

5) Takemura T, Kawamata M, Urabe M, Murakami T: Cyclophilin A-dependent restriction to capsid N121K mutant human immunodeficiency virus type 1 in a broad range of cell lines. *J Virol* 87(7): 4086-4090, 2013.

2. 学会発表

1) 林 浩司、竹村太地郎、藤野真之、百瀬文隆、森川裕子、村上 努 . HIV-1 複製過程における Rab7 の機能解析 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10 日-12 日

2) 野村 渉、鳴海哲夫、橋本知恵、藤野真之、村上 努、玉村啓和 . HIV-1 外被タンパク質 gp41-CHR の二量体構造を基盤とした膜融合阻害剤の有用性 . 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2012 年 11 月 20 日-22 日

3) 村上 努、橋本知恵、藤野真之、鳴海哲夫、野村 渉、山本直樹、玉村啓和 . HIV-1 特異的侵入阻害剤として機能する MA 部分ペプチドの抗ウイルス活性作用機序の検討 . 第 27 回日本エイ

ズ学会学術集会・総会，熊本，2012年11月20日-22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。

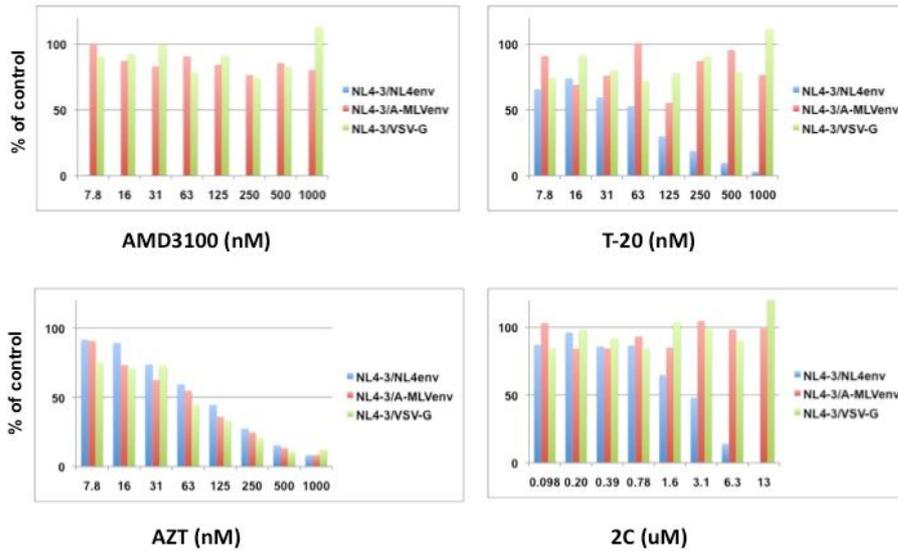
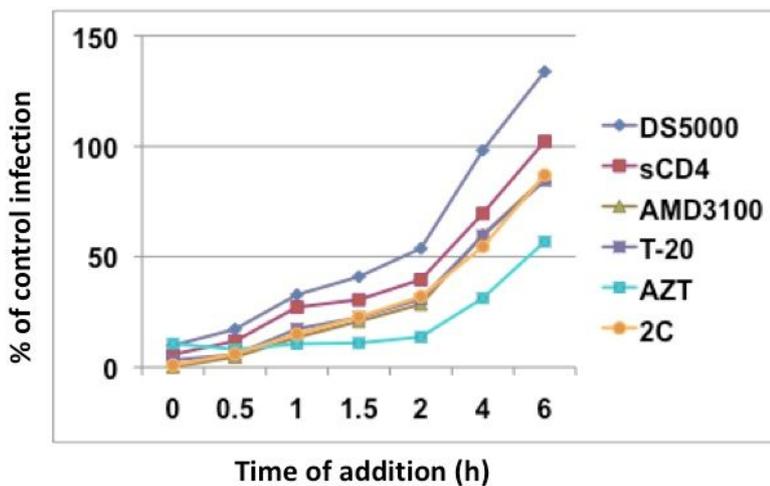


図1. MA部分ペプチド2CはHIV Env特異的にウイルスの標的細胞への侵入を阻害する



標的細胞: TZM-bl

ウイルス: NL4-3/NL4env (pseudovirion)

図2. MA部分ペプチド2CはHIV-1 侵入におけるCD4結合後膜融合に至る過程を阻害する

表1. CA部分ペプチド(コントロールペプチド)の抗HIV-1および細胞毒性

CA ペプチド	MT-4細胞		PM1/CCR5細胞	
	NL4-3 (X4 HIV-1)		NL(AD8) (R5 HIV-1)	
	EC50 (μM)	CC50 (μM)	EC50 (μM) (p24 ELISA)	CC50 (μM)
1C	>50	>50	ND	ND
2C	39% inh. at 50 μM	>50	ND	ND
3C	32	>50	ND	ND
4C	>50	>50	ND	ND
5C	>50	>50	ND	ND
6C	35	>50	ND	ND
7C	>50	>50	ND	ND
8C	23	>50	ND	ND
9C	>50	>50	ND	ND
10C	>50	>50	ND	ND
11C	>50	>50	ND	ND
12C	>50	>50	ND	ND
13C	>50	>50	ND	ND
14C	>22	22	ND	ND
15C	47	>50	27 (6.3)	>50
16C	36	>50	ND	ND
17C	>50	>50	ND	ND
18C	>50	>50	ND	ND
19C	18	>50	22 (5.0)	>50
20C	>50	>50	ND	ND
21C	>50	>50	ND	ND
22C	>50	>50	ND	ND
23C	>50	>50	ND	ND
15REC	20	>50	21(>50)	>50
CypAC	>50	>50	ND	ND
AZT	0.066	>50	0.3 (0.20)	>100
AMD3100	0.033	>50	>50 (>50)	>50
SCH-D (Viviviroc)	>5	>5	0.014 (0.0067)	>5

表2. CA部分ペプチド(細胞膜透過性付与ペプチド)の抗HIV-1および細胞毒性

CA ペプチド	MT-4細胞		PM1/CCR5細胞	
	NL4-3 (X4 HIV-1)		NL(AD8) (R5 HIV-1)	
	EC50 (μM)	CC50 (μM)	EC50 (μM) (p24 ELISA)	CC50 (μM)
1L	6.5	>50	6.2 (15)	>50
2L	8.8	>50	>50	>50
3L	50	>50	>50	>50
4L	41	>50	>50	>50
5L	35	>50	>50	>50
6L	12	>50	13 (4.3)	>50
7L	>50	>50	>50	>50
8L	15	>50	>50 (>50)	>50
9L	>50	>50	ND	ND
10L	35	>50	>50	>50
11L	>50	>50	ND	ND
12L	>50	>50	ND	ND
13L	>35	35	ND	ND
14L	>9	9	ND	ND
15L	4.6	9.3	1.2 (1.0)	18
16L	33	>50	>50	>50
17L	>25	25	ND	ND
18L	>50	>50	ND	ND
19L	>50	>50	>50	>50
20L	33	>50	>50	>50
21L	>50	50	ND	ND
22L	>50	>50	>50	>50
23L	>50	>50	ND	ND
15REL	>41	41	0.46 (0.68)	20
CypAL ¹	36	>50	>50	>50
CypAL ²	7.1	>50	>50	>50
CypAL ³	32	>50	>50	>50
AZT	0.066	>50	0.3 (0.20)	>100
AMD3100	0.033	>50	>50 (>50)	>50
SCH-D (Viviviroc)	>5	>5	0.014 (0.0067)	>5