

201319025A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H25-エイズ-一般-006

HIV エンベロープの治療標的構造に関する研究

-平成25年度 総括・分担研究報告書-

研究代表者 吉村 和久

平成26(2014)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H25-エイズ-一般-006

HIV エンベロープの治療標的構造に関する研究

-平成25年度 総括・分担研究報告書-

研究代表者 吉村 和久

平成26（2014）年 3月

研究組織

研究者氏名		研究者氏名	職名
吉村 和久	研究代表者	国立感染症研究所 エイズ研究センター	室長
横山 勝	研究分担者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	主任研究官
武内 寛明	研究分担者	東京医科歯科大学 ウイルス制御学分野	助教
細谷 紀彰	研究分担者	東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター	特任助教
井上 誠	研究分担者	ダイナベック株式会社	部長
鳴海 哲夫	研究分担者	静岡大学大学院工学研究科	准教授
桑田 岳夫	研究分担者	熊本大学エイズ学研究センター	助教

目次

I. 総括研究報告書

- HIV エンベロープの治療標的構造に関する研究..... 1
吉村 和久 国立感染症研究所エイズ研究センター・室長

II. 分担研究報告書

1. Env の薬剤逃避メカニズムと抗体免疫誘導に関する研究..... 5
吉村 和久 (国立感染症研究所 エイズ研究センター・室長)
2. Env の変異が立体構造及び動的性質 (揺らぎ) に与える影響の研究..... 9
横山 勝 (国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官)
3. HIV の吸着・侵入過程を制御する宿主因子の研究..... 13
武内 寛明 (東京医科歯科大学 ウイルス制御学・助教)
4. Env 変異と細胞融合能の変化に関する研究..... 17
細谷 紀彰 (東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター・特任助教)
5. Env 変異体および変異誘導蛋白の作製に関する研究..... 20
井上 誠 (ディナベック株式会社 遺伝子創薬事業部・部長)
6. 新規侵入阻害剤に関する研究..... 22
鳴海 哲夫 (静岡大学大学院工学研究科・准教授)
7. Env の立体構造変化を捉える抗体の研究..... 27
桑田 岳夫 (熊本大学エイズ学研究センター・助教)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷..... 37

I. 総括研究報告書

HIV エンベロープの治療標的構造に関する研究

研究代表者

吉村 和久 国立感染症研究所エイズ研究センター・室長

研究分担者

横山 勝 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官
武内 寛明 東京医科歯科大学ウイルス制御学分野・助教
細谷 紀彰 東京大学医科学研究所感染症国際研究センター・特任助教
井上 誠 ディナベック株式会社・遺伝子創薬事業部長
鳴海 哲夫 静岡大学工学部工学研究科・准教授
桑田 岳夫 熊本大学エイズ学研究センター・助教

研究要旨

本研究班の初年度は、新規に作製した Env 三量体の構造変化を制御するケミカルプローブおよびその誘導体からの逃避ウイルスを誘導後（鳴海、桑田、井上、吉村）、それらの逃避変異 Env を持つ多数の感染性クローンを作製し、それぞれの薬剤の耐性責任部位の同定を行った。その結果、耐性度と変異の入る順番に関係性があるということがわかった。また、横山らにより得られた HIV-1 gp120 全長分子モデルは、最近報告されたクライオ電子顕微鏡の結果、および X 線結晶構造解析の結果とほぼ一致したことから、特定のアミノ酸変異が gp120 の立体構造および動的性質に与える影響を解析するための、基盤となる構造が構築できたと考えられる。これらのデータをもとに、Env の立体構造および動的性質の影響をコンピュータシミュレーションにより比較し解析を行ったところ、耐性を獲得する順番とそれにより次に出現する変異部位の関係がシミュレーション上でも証明できる事がわかってきた。横山らによるシミュレーションは桑田らによる SIV の Env の中和抗体からの逃避研究にも有用であり、耐性変異と構造予測の基礎データを SIV と HIV の両方から解析中である。細谷らは変異 Env と受容体との関係、迅速かつ様々な組み合わせで調べるため、分割タンパク質を用いた新規アッセイ系を構築し、臨床分離株の Env を用いて多数検討を行った。その結果、これまで単純に R5 と X4 で分けていた HIV のフェノタイプの分類をより実態に沿った分類へと進めていける可能性が示された。また、武内らは受容体の発現や、感染効率を変化させ得る細胞内因子を独自の shRNA の系を用いて探索し、これまでにいくつかの候補因子を同定している。現在、Env との関連を詳細に検討中である。

A. 研究目的

HIV の同定以来、治療薬の開発は HIV 特異的酵素を標的とするものが主流であった。ところが近年、より感染初期の段階での阻害を目的とする薬剤の開発が進んで来た。また、現在開発中の薬剤には、HIV の主要受容体である CD4 や CCR5 に対するモノクローナル抗体や、CD4-IgG のようなものも含まれる。このように、新たな抗 HIV 薬は標的細胞への侵入をブロックするものが主流の一つとなっている。また、近年開発が盛んになって来たマイクロビサイドとの関わりも重要といえる。これらのことは、Env の構造を中心とした感染の侵入過程の基礎的研究の遂行が、新たな HIV 治療標的及び免疫原の発見において、また新規治療法の開発において必要

不可欠な課題であることを示している。

この研究班では、Env が薬剤もしくは中和抗体から逃避する過程で誘導される立体構造が、新たな免疫原として、もしくは薬剤のターゲットとしてどのように形成されているかをウイルス学的側面と構造シミュレーションの面から検討し、かつ対応する標的細胞からのアプローチもあわせて行い、その過程で判明する Env の立体構造上の脆弱性の発見を目指す。

そこで本研究では、(1) 変異 Env の立体構造変化と薬剤及び抗体感受性の関係の研究と、(2) 変異 Env と受容体の関係を 2 つの柱として研究を進め、相互にデータを参照し、新規治療法の確立を Env の立体構造のダイナミズムを解き明かしつつ目指す。これまで、それぞれの研究者

が、独立して行って来たEnv研究を、吸着・侵入時の構造変化解析を縦系にし、各自の研究成果を横系に組み合わせて、これまで不明な点が多かったEnv構造変異解析と新たな治療法の開発を進めていく。

B. 研究方法

平成25年度は、柱(1)では新規薬剤開発とそれらの薬剤や抗体からの逃避ウイルスを誘導し解析をした(吉村、鳴海、井上、桑田)。また、逃避変異Envの立体構造および動的性質の影響を解析するため、HIV-1 gp120全長分子モデルおよびV1/V2を除いたHIV-1 gp120分子モデルを、ホモロジーモデリング法と分子動力学計算を組み合わせるにより構築を試みた(横山)。柱(2)では、変異Envと受容体との関係を、迅速かつ様々な組み合わせで調べるため、分割タンパク質を用いた新規アッセイ系の構築を試みた(細谷)。また、受容体の発現や、感染効率を変化させ得る細胞内因子を独自のshRNAの系を用いて探索した(武内)。(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、当該研究機関の承認および、必要な場合は文部科学大臣認証を得た上で行われた。ヒト検体を用いた研究は当該施設の研究倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

(1) 変異 Env の立体構造変化と薬剤及び抗体感受性の関係の研究 :

これまで我々が行ってきた Env 三量体の構造変化を誘起するケミカルプローブ候補化合物は主に CD4 類似低分子化合物(CD4MC)であり、これらを用いて多くの耐性誘導を行ってきた。その結果、各CD4MCに共通した3つの耐性変異(V255M, T375I, M426I)が同定できた(吉村、鳴海)。組み換えウイルスの作製により、これらの変異と耐性発現が密接に関与している事が確認された。耐性誘導により得られたこれらの耐性 Env と CD4MC との結合様式をシミュレートするための基礎実験として、横山らは、V1/V2の有無によるゆらぎの変化を調べた。V1/V2が無い場合、全体的にゆらぎは増加した。特に V3 のゆらぎは4倍増加していた。また、V1/V2を有する V3 の動きは、V1/V2 stem、V2 ループ、β20-β21 ループ、N 末端、C 末端の動きとそれぞれ強い相関を示した。一方、V1/V2をはずすと N 末端、C 末端の動きとのみ相関した。これらの基礎データを用い、現在 NBD 耐性 Env と薬剤との結合様式のシミュレーションを行っている(横山)。

CD4MC とは全く構造の異なる Env 三量体の構

造変化を誘起するケミカルプローブ候補化合物としてベツリン酸誘導体の IC9564 の構造活性相関及び構造変化誘起能を明らかにした。IC9564 は大きく分けて三つのフラグメント(ベツリン酸、アミドオクチルリンカー、スタチン)からなり、化学修飾が容易なベツリン酸の3位ヒドロキシ基およびスタチンのカルボキシル基について誘導体化研究を行い、これら二つの官能基の構造活性相関を明らかにした(鳴海)。また、これまでサブタイプが変わると効果が減少する傾向のあった CD4MC とは異なり、多くの Env に結合可能と考えられている sCD4 domain 1 分子の合成を試みている(井上)。

In vivo モデルとしても重要な SIV 感染サルから抗 Env 抗体のスクリーニングを行い、SIV に対する抗体としては初めての broadly neutralizing antibody である B404 を分離した。B404 は Env の V3 及び V4 ループを含む立体構造を認識しており、B404 の Env への結合は、CD4 の結合によって促進された。in vitro のウイルス継代によって B404 からの逃避ウイルスを分離し、Env gp120 の C2 領域に特徴的な変異があることや、gp41 の cytoplasmic tail を短くする変異の重要性を示した(桑田)。

(2) 変異 Env と受容体に関する研究 :

HIV-1 の co-receptor usage を迅速簡便に測定可能な細胞膜融合を用いた検出系(DSP-Pheno assay)を樹立した。HIV 実験室株および HIV 感染者の血漿から env 遺伝子を増幅し、co-receptor usage が測定可能であった。(細谷)。

武内らにより既に得られている HIV-1 感染制御候補因子群のうち、細胞膜近傍に局在している候補因子群の遺伝子発現抑制細胞を作製し、ウイルス侵入経路の異なる2種のウイルスエンベロープを用いて作製したルシフェラーゼ発現レポーターHIV-1(NL43-luc delta env/nef)を用いて HIV-1 侵入過程に依存的な感染制御に関わるかどうかを検討した。その結果、細胞膜近傍に局在している HIV-1 感染制御因子候補群のうち、アクチン結合タンパク質(Actin-binding protein: ABP)およびイオンチャネル分子の候補因子2種が HIV-1 感染制御因子であることが分かった。特に ABP については、HIV-1 侵入過程を特異的に制御する細胞内因子であることが分かった(武内)。

D. 考察

(1) 変異 Env の立体構造変化と薬剤及び抗体感受性の関係の研究 :

本研究により得られた HIV-1 gp120 全長分子モデルは、最近報告されたクライオ電子顕微鏡の結果や、X 線結晶構造解析の結果とほぼ一致したこ

とから、変異が gp120 の立体構造および動的性質に与える影響を解析するための、基盤となる構造が構築できたといえる。今後この成果をもとに CD4MC 耐性変異の解析を進めていく予定である。IC9564 のベツリン酸の3位ヒドロキシ基およびスタチンのカルボキシル基は抗 HIV 活性発現と Env との相互作用に大きく寄与しており、これらに構造変化誘起能を付与することでケミカルプローブの創製が期待できる。SIV 中和抗体 B404 は、これまでに報告されている抗 HIV-1 抗体とは異なるエピトープを認識していた。よって Env の機能を阻害して感染を阻止するための、新たな標的部位となる可能性が期待されている。

(2) 変異 Env と受容体に関する研究：

DSP-Pheno assay は P3 や生ウイルスを使用せず安全に最短5日で co-receptor usage を測定可能である。また大量検体が処理でき、今後阻害薬などのスクリーニングなどにも応用可能であると考えられる。ゲノムワイドスクリーニング法により ABP およびイオンチャネル分子が細胞膜近傍に局在する新規 HIV-1 感染制御因子であることが判明した。この結果により HIV-1 感染過程における吸着・侵入過程メカニズムの理解を深めることが可能となるだけでなく、新たな治療標的となる可能性が示唆された。

E. 結論

HIV-1 gp120 の中和抗体逃避において、V1/V2 は重要な役割を果たすと考えられる。今後、多くの逃避ウイルス変異との比較検討を行う事で、モデリングの精度をより上げて行く事が可能となる。また、Env 三量体の構造変化を制御する新規のケミカルプローブの創製を目指して、IC9564 の

誘導体化研究を行い、ベツリン酸の3位ヒドロキシ基およびスタチンのカルボキシル基の構造活性相関を明らかにすることで HIV 侵入阻害剤の創製研究を一步前に進めることができた。SIV に対する抗体としては初めての広範囲中和抗体である B404 を分離し、その結合や逃避に重要な Env 部位を絞り込むことができた。今後は、B404 逃避ウイルスや B404 結合部位の解析を進め、感染を阻止するための新たな標的を探索していく。HIV で行っている研究との比較により、感染モデルとしてのサルの有効性の議論が可能となるといえる。

新たなフェノタイプ検査系として DSP-Pheno assay を樹立する事に成功し、HIV 実験室株および臨床分離株を用いて薬剤などの阻害能を評価する事が可能となった。また、HIV-1 感染過程における HIV-1 侵入過程を制御する新規細胞内因子を2種見出すことができ、新たな治療標的となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各研究分担者の頁参照

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告書

Env の薬剤逃避メカニズムと抗体免疫誘導に関する研究

研究代表者 吉村 和久 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長

研究要旨

HIV-1 エンベロープの立体構造を変化させて、中和抗体の感受性を増強させる 5 つの CD4 類似低分子化合物(CD4MC) (NBD-556, YYA-021, HAR-171, JRC-II-19, HAR-431)を用いて耐性に関する研究を行った。sCD4 および 5 つの CD4MC を HIV-1 R5 primary isolate (KP-5) の bulk と infectious clone を用いて in vitro 耐性誘導を行い、誘導された CD4MC 耐性ウイルスの Env gp120 領域のシーケンスを行い、化合物の構造と結合部位及び活性の相関を調べた。得られたそれぞれの耐性ウイルスは、すべての CD4MC に対して交差耐性を示した。Bulk ウイルスの耐性誘導の結果 3 つのアミノ酸変異 (V255M, T375I, M426I) が耐性付与に重要である事が分かった。クローン化した KP-5 ウイルスを用いて再度耐性誘導を行ったところ、同じ 3 つの変異が獲得された。耐性クローンウイルスのシーケンスを誘導体ごとに比較検討したところ、誘導体の側鎖の違いによりそれぞれの変異の重要度に違いがある事が分かった。

A. 研究目的

我々は、中和抗体の感受性を増強させる NBD-556 およびその誘導体の研究をこれまで行ってきた。現在、効果を維持しつつ、より細胞毒性の低い低分子化合物の検索をおこなっている。その一方、候補化合物による in vitro 耐性誘導をクローンウイルスで行う事により、予想される結合部位と立体構造変化誘導活性の相関を調べ、Env の変異と立体構造の関係を詳細に検討する。

B. 研究方法

東京医科歯科大学生体材料工学研究所機能分子部門分子認識分野の玉村啓和教授および、静岡大学工学部工学研究科の鳴海哲夫准教授に HIV-1 のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物(CD4MC)の合成を行っていただいた。それらの化合物で HIV-1 R5 primary isolate (KP-5) の bulk と infectious clone を用いて in vitro 耐性誘導を行い、誘導された CD4MC 耐性ウイルスの Env gp120 領域のシーケンスを行い、化合物の構造と結合部位及び活性の相関を検討した。

(倫理面での配慮)

本研究における遺伝子組み換え生物等を用

いる実験については、必要に応じた国立感染症研究所の機関承認を既に取得済みである。

C. 研究結果

これまでわれわれが行った研究より、NBD-556がsCD4と同様にCD4i抗体の結合を増強することがわかっている。また、NBD-556がgp120のどの部位と結合しているかを詳細に知るために、我々が開発した in vitro耐性誘導システムを用いて、この化合物の耐性ウイルスをとり、sCD4耐性ウイルスのシーケンスと比較検討した。その結果、NBD-556とsCD4それぞれの耐性誘導で観察された変異部位をgp120の3次元結晶解析図上にプロットすると、NBD-556の変異部位はsCD4のそれと非常に似通った部位に集中していることがわかった。

そこで、われわれは、引き続き玉村啓和教授および鳴海哲夫准教授にお願いして合成していただいたNBD-556同様に立体構造変化を惹起する4個のNBD誘導体(YYA-021, HAR-171, JRC-II-19, HAR-431)を選んで、sCD4とともに、in vitro耐性誘導実験を行った(表1)。これまでは実験室株のX4ウイルスであるIIIBウイルス株

を用いて実験を行っていたが、今回はより *in vivo* に近いウイルスを使用する目的で、感染症例から樹立した臨床分離R5ウイルス株 (KP-5) を用いて行った。

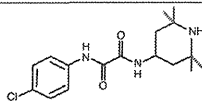
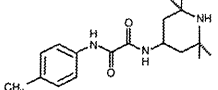
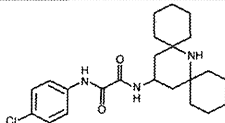
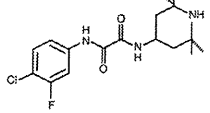
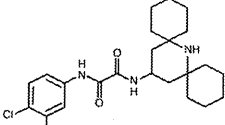
Name	Structure	IC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b
NBD-566		0.53	71
YYA-021		11	>300
HAR-171		0.35	122
JRC-II-191		0.34	91
HAR-431		0.14	10

表 1. 使用した CD4MCs の構造と KP-5 ウイルスに対する抗ウイルス能と細胞毒性

すべての化合物を5-9回パッセージし、最終濃度が20-100μM(CD4は5μg/ml)に到達するまで継代した。その結果、今回試した全ての化合物に対する耐性ウイルスを得ることができた。得られたそれぞれの耐性ウイルスは、すべてのCD4MCに対して交差耐性を示した。最終パッセージのウイルスのgp120のシークエンスを比較したところ、3つのアミノ酸変異 (V255M, T375I, M426I) が耐性誘導に重要である事が分かった (図 1)。

これらの耐性変異を持つ組み換えウイルスを作製し、ウイルスの感受性を検討した結果、これらの3つの変異と耐性発現が密接に関与している事が確認された。

次に、これらの3つの変異がbulkのマイナークローンから選択されたのか、それとも *de novo* の変異を獲得したのかを確かめるため、同じCD4MCを用いて、今度はKP-5の infectious clone で同様の *in vitro* 耐性誘導実験を行った。その結果、以下の3つのパ

ーンに分けられる事が分った。i) 低濃度ではM426I変異で対応し高濃度ではV255IかT375I変異が必要となるもの (NBD-566, YYA-021, HAR-171)。ii) 3つのどの変異も同様の耐性度のもの (JRC-II-191, HAR-431)。iii) 低濃度ではV255IかT375I変異で対応し高濃度ではM426I変異が必要となるもの (sCD4)。

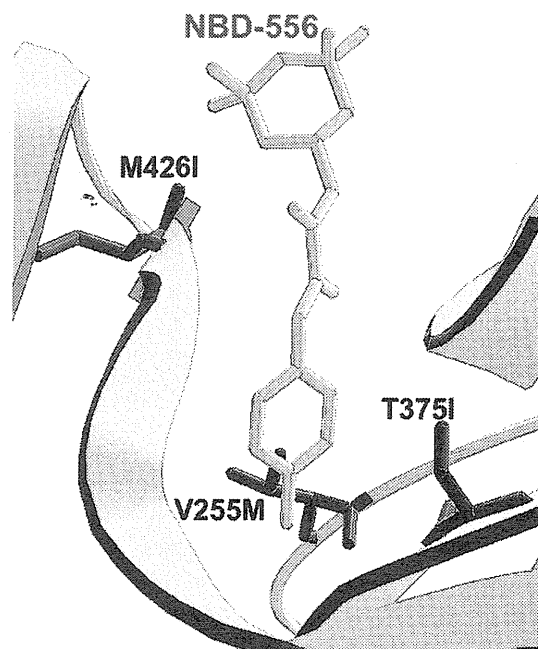


図 1. CD4MC耐性変異のCD4 cavity内における部位とCD4MCの位置関係

D. 考察

今回確認できた3つの耐性変異のうち、M426IとV255Mについて、本研究班の研究分担者の横山勝博士にお願いし、横山博士が本研究で構築したHIV-1 gp120全長分子モデルを用いてCD4MC耐性Envと薬剤との結合様式のシミュレーションを行って頂いた。その結果、それぞれの変異とEnvの構造変化と耐性度の関係が、われわれの行った *in vitro* の結果と強い相関を示した (詳細は横山博士の本年度分担報告参照)。今後、多くの逃避ウイルス変異との比較検討を行う事で、モデリングの精度をより上げて行く事が可能となる。

E. 結論

CD4MCの新規化合物を開発し、*in vitro* 耐性誘導によって、それらの結合様式を推定し、

構造と結合様式の大まかな推定ができた。これらの知見をもとに、より立体構造変化誘導能に優れた化合物の開発に努めていきたいと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表 (*corresponding author)

- 1) Harada S, Yoshimura K^{*}, Yamaguchi A, Yusa K, Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J Gen Virol*, 94:933-943, 2013.
- 2) Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov KI, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational Epitope Consisting of the V3 and V4 Loops as a Target for Potent and Broad Neutralization of Simian Immunodeficiency Viruses. *J Virol*, 87: 5424-5436, 2013.
- 3) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H.: CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorg Med Chem*, 21:2518-2526, 2013.
- 4) Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Yoshimura K, Matsushita S. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail. *Frontiers in Microbiology/Virology*, 4:1-7, 2013.
- 5) Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, and Tamamura H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg Med Chem*, 21: 7884-7889, 2013.
- 6) Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, and Igarashi T. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small

molecule CD4 mimic. *J Gen Virol*, 94: 2710-2716, 2013.

2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of CD4 mimetics-resistant mutations on susceptibilities to anti-Env nMAbs. 21th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI2014), Boston, MA, U.S.A., 2014.
- 2) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. In vitro selection of bifunctional CD4 mimic small compounds (NBD analogues) using bulk and cloned primary isolates. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
- 3) Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Analysis of relationships between Maraviroc (MVC) resistant mutations and sensitivity to antibody-mediated neutralization. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
- 4) Yuki Hirota, Tetsuo Narumi, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Tatsuhiko Igarashi, Shuzo Matsushita, Hirokazu Tamamura. Indole-type small CD4 mimic molecules targeting an HIV envelope protein gp120. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
- 5) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Analysis of interaction between gp120 and CD4 mimic small compounds that enhance the activity of anti-HIV neutralizing antibodies. *AIDS Vaccine 2013*, Barcelona, Spain, 2013.
- 6) Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi

Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. Characterization of highly neutralizing antibody sensitive HIV-1 gp120 induced under high concentrations of maraviroc (MVC) in vitro. AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain, 2013.

- 7) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at 3 amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.
- 8) Kazuhiya Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita. Impact of maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced in vitro passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.

(国内学会)

- 1) 原田恵嘉, 鳴海哲夫, Samatchaya Boonchawalit, 玉村啓和, 松下修三, 吉村和久; バルクおよびクローンウイルスを用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する in vitro 耐性ウイルス誘導 第 27 回 日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2013
- 2) 大附寛幸, 丸田泰広, 橋本智恵, 鳴海哲夫, 廣田雄樹, 原田恵嘉, 三浦智行, 吉村和久, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦; 抗 V3 抗体および低分子 CD4 ミミック曝露後投与によるアカゲザルでの SHIV 複製抑制 第 27 回 日本エイズ学

会学術集会・総会, 熊本, 2013

- 3) Samatchaya Boonchawalit, 原田恵嘉, 松下修三, 吉村和久; Analysis of relationships between Maraviroc (MVC) resistant mutations and sensitivity to antibody-mediated neutralization. 第 27 回 日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2013
- 4) 五領舞衣, 原田恵嘉, 石井洋, 吉村和久, 俣野哲朗; 細胞内ドメイン欠損 Env を有する HIV/SIV 粒子の作製 第 27 回 日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2013
- 5) 原田恵嘉, Samatchaya Boonchawalit, 松下修三, 吉村和久; インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルが MVC 耐性 HIV-1 Env 領域に与える影響 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013
- 6) 原田恵嘉, Samatchaya Boonchawalit, 松下修三, 吉村和久; In vitro selection of bifunctional CD4 mimic small compounds (NBD analogues) using bulk and cloned primary isolates. 第 15 回 白馬シンポジウム, 名古屋, 2013
- 7) 五領舞衣, 原田恵嘉, 石井洋, 俣野哲朗, 吉村和久; Impact of deletion in cytoplasmic tail on Env incorporation into HIV/SIV particles. 第 15 回 白馬シンポジウム, 名古屋, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

Env の変異が立体構造及び動的性質（揺らぎ）に与える影響の研究

研究分担者 横山 勝 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官

研究要旨

本研究では、Env に生じる変異の意味を知るために、変異が Env の立体構造および動的性質に与える影響を、分子動力学計算により調べる。本年度は、HIV-1 gp120 全長分子モデル、および V1/V2 を除いた gp120 分子モデルの構築を行い、gp120 の V1/V2 が gp120 の中和抗体逃避に果たす役割を検討した。また、NBD 耐性 Env と薬剤との結合様式の解析も行った。V1/V2 は gp120 の安定性、V3 ループの揺らぎを制御する。その結果として、V1/V2 は V3 ループを中和抗体から避けることができる位置に導く。したがって、HIV-1 gp120 の中和抗体逃避において、V1/V2 は重要な役割を果たすと考えられる。NBD 耐性変異である M426I により、bridging sheet 内の水素結合や NBD-556 の結合位置に変化が見られた。

A. 研究目的

HIV-1 エンベロープ蛋白質（Env）は感染受容体との結合部位を持つ gp120 と、ウイルスと標的細胞との膜融合に重要な gp41 からなり、gp120 と gp41 のヘテロダイマーが三量体を形成している。Env の gp120 は変異を許容できるが機能的に重要な領域を持つ。たとえば、gp120 の V3 は高変異領域として知られるが、感染受容体との相互作用に中心的役割を担う。この変異を許容できるが機能的に重要な領域は、アミノ酸変異による安定性の変化を低減できるループ構造を形成し、機能は動的性質により制御されていると考えられる。

これまで、HIV-1 gp120 の構造は X 線結晶構造解析や NMR により、部分構造でのみ決定され、全長構造は未だ決定されていない。これは、V1/V2 などが大きく揺らいでいることにより、結晶化が困難なためである。最近、クライオ電子顕微鏡（Lyumkis et al. Science, 2013）、および X 線結晶構造解析（Julien et al. Science, 2013）による Env 三量体モデルが報告された。これらは、変異により三量体構造の安定化を図り、さらに抗体と複合体を形成することにより安定な構造を得ている。このように、実験的に gp120 の構造を決定するためには、何らかの細工が必要である。さらに、X 線結晶構造解析では結晶化が必要であるため、生理的条件化における構造の決定は原理的に不可能である。したがって、得られた構造が本来の gp120 の構造と一致するかどうかは不明である。

計算科学は理論、実験に次ぐ第三の科学であり、実験が難しい現象や紙と鉛筆だけでは理論計算できないような難しい問題をコンピュータを使って解明する方法である。その計算科学の手法の一つとして、分子動力学計算がある。分子動力学計算は、個々の原子の運動をニュートンの運動方程式を解くことにより、物質の性質や運動を明らかにする。蛋白質は機能発現するための最適な温度がある。温度とは物質を構成する分子運動のエネルギーの統計値のことである。蛋白質は最適な温度における分子運動により動的に揺らぎ、この揺らぎが機能発現に重要である。そのため、分子動力学計算は構造と機能を結びつける情報を得ることができる。

本研究では、Env に生じる変異の意味を知るために、変異が Env の立体構造および動的性質に与える影響を、分子動力学計算により調べる。本年度は、HIV-1 gp120 全長分子モデル、および V1/V2 を除いた gp120 分子モデルの構築を行い、gp120 の V1/V2 が gp120 の中和抗体逃避に果たす役割を考察した。また、NBD 耐性 Env と薬剤との結合様式の解析も行った。

B. 研究方法

(1) V1/V2 が gp120 の中和抗体逃避に果たす役割

これまで HIV-1 gp120 の X 線結晶構造解析は、構造を安定化するために抗体などとの複合体としている。そのため、決定されている構造は抗体などの影響を受けていると考えられる。本研究では、抗体などの影響を軽減した構造を得るために、ホ

モロジモデリング法と分子動力学計算を組み合わせることにより、gp120全長分子モデル、およびV1/V2を除いたgp120分子モデルを構築した。ホモロジーモデリング法では、ターゲット配列として中和抵抗性株であるJR-FLのアミノ酸配列を用いた。複数の構造を鋳型として用いた。使用した鋳型はgp120コア (PDB code: 3JWD)、V1/V2 stem (PDB code: 3IDX)、V1/V2 (PDB code: 3U4E)、V3 (PDB code: 2QAD)、V4 (PDB code: 2B4C)、C5 (PDB code: 1MEQ) である。糖鎖はGlycoprotein Builder (<http://glycam.ccruc.uga.edu/ccrc/gp/>) を用いて、High mannose型であるMan₅GlcNAc₂を付加した。得られたgp120分子モデルを初期構造に用いて、分子動力学計算により平衡構造を得た。分子動力学計算にはAmber10のpmemdモジュール、力場は蛋白質にはff99SB-ILDN、糖鎖にはGlycam06を用いた。圧力は1atm、温度は310K、塩濃度は150 mM NaCl、シミュレーション時間は50 nsとした。

解析は分子動力学計算により得られた trajectories を用いて、AmberTools の ptraj モジュールにより、RMSD (root mean square deviation: 平均二乗偏差)、RMSF (root mean square fluctuation: 根平均二乗ゆらぎ)、および DCCM (Dynamics Cross Correlated Motion: 動的相互相関運動) を計算した。

(2) NBD 耐性 Env と薬剤との結合様式の解析

分子動力学計算に用いる初期構造となる HIV-1 gp120 コアと NBD-556 の複合体は、ホモロジーモデリング法により構築した。鋳型には 3TGS を用いた。ターゲット配列には、YTApm48 および YTApm48 の変異株 2 種 (V255M、M426I) を用いた。得られた分子モデルを初期構造に用いて、分子動力学計算を行った。分子動力学計算には Amber11 の pmemd モジュール、力場は蛋白質には ff99SB-ILDN および NBD-556 には GAFF を用いた。圧力は 1atm、温度は 310K、塩濃度は 150 mM NaCl、シミュレーション時間は 50 ns とした。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

(1) V1/V2がgp120の中和抗体逃避に果たす役割

分子動力学計算のための初期構造をホモロジーモデリング法により構築した。構築したモデルは、HIV-1 gp120全長分子モデルおよびV1/V2を除いたgp120分子モデルの2つである。得られたモデルを用いて分子動力学計算を行い50 nsまで構造変化を観察した。gp120全長分子モデルでは、

20 nsまでにV1/V2が内側ドメインから外側ドメインに向かって、V3は外側ドメインから内側ドメインに向かって配置され、V1/V2はV3の近傍に位置していた。20 ns以上に大きな構造変化は見られず、初期構造からのRMSDも約20ns以上ではほぼ一定であることから、平衡構造に達していると考えられる。この平衡構造は、D. Lyumkisら(Science 342:1484-1490, 2013)のクライオ電子顕微鏡、およびJ.P. Julienら(Science 342:1477-1483, 2013)のX線結晶構造解析の結果と一致する。V1/V2を除いたgp120分子モデルでは、V1/V2 stemおよびV3がgp120 coreから伸び、大きく揺らいている。内側ドメインと外側ドメインの距離が、gp120全長分子モデルよりもやや広がっている。

次に、V1/V2がgp120の動的性質に与える影響を知るためにRMSFを調べた。gp120全長分子モデルまたはV1/V2を除いたgp120分子モデルにおける各アミノ酸残基のRMSFを図1に示す。gp120全長分子モデルでは、RMSFが大きい部位はいずれもループであり、V1/V2やV3など5つのループのRMSFが3~4 Åであった。V1/V2を除いたgp120分子モデルでは、gp120全長分子モデルと同様に、ループのRMSFが大きく、特に、V1/V2 stemやV3がRMSFが10~12 Åであった。gp120全長分子モデルとV1/V2を除いたgp120分子モデルのRMSFを比較すると、V1/V2を除くとgp120全体的にRMSFは増大し、特にV3ループの揺らぎは4倍増加していた。

HIV-1 gp120に見られる揺らぎの中で、相関運動する部位を知るために、DCCM解析を行った。gp120全長分子モデルでは、V1/V2、V3、N末端およびC末端との間に弱い正の相関運動が見られ、外側ドメインとの間に弱い負の相関運動が見られた。また、V1/V2 stemにβ20/β21ループとの間に正の相関運動が見られた。V1/V2を除いたgp120分子モデルでは、V3、N末端およびC末端との間に弱い正の相関運動が見られた。

(2) NBD耐性Envと薬剤との結合様式

NBD耐性Env-NBD-556複合体のシミュレーション時間50 nsにおける構造を図2に示す。YTApm48では、gp120のPhe43 cavityにNBD-556が結合している。近傍にはCD4結合ループ、β20-β21ループ、ループBなどがある。β20-β21ループのE429はβ2のK130と水素結合を形成している。V255M変異株では、50 nsではすでにNBD-556は結合していない。これはV255M変異によりNBD-556の結合親和性が減少しているためであると考えられる。M426I変異株では、NBD-556は結合の結合位置がYTApm48よりもループBに近

い。また、YTApm48やV255M変異株で見られたE429とK130の水素結合が消失している。

D. 考察

本研究により得られた HIV-1 gp120 全長の平衡構造の妥当性について検討する。最近報告されたクライオ電子顕微鏡の結果 (Lyumkis et al. Science, 2013)、および X 線結晶構造解析の結果 (Julien et al. Science, 2013) とほぼ一致した。ゆえに、本研究により得られた gp120 全長の平衡構造は、実際に観察される構造であり、実験的手法により決定された構造と同程度、またはそれ以上の精度を持つ分子モデルであると考えられる。したがって、変異が gp120 の立体構造および動的性質に与える影響を解析するための、基盤となる構造が構築できたと考えられる。

HIV の主要中和領域は V3 に位置する。しかしながら、V3 や gp120 の他の領域を認識する抗体は、gp120 単量体では中和感受性であるが、多量体となると低感受性であるものが多い。抗 V3 抗体からの逃避のメカニズムとして、V1/V2 によるエピトープマスキングが提案されているが、その詳細は未だ明らかではない。以下では、V1/V2 が中和抗体逃避に果たす役割を検討する。

V1/V2 が gp120 の動的性質に与える影響を知るために、gp120 全長分子モデルと V1/V2 を除いた gp120 分子モデルの RMSF を比較すると、V1/V2 を除くことにより gp120 全体的に RMSF は増大し、特に V3 ループの揺らぎは 4 倍増加していた。RMSF は揺らぎを意味するので、RMSF が増加することは、揺らぎが増加することを意味する。ゆえに、V1/V2 は gp120 の揺らぎを抑え、特に V3 ループの揺らぎを抑えると考えられる。V1/V2 が gp120 の揺らぎを抑える理由として、V1/V2 の糖鎖と gp120 コアの糖鎖の間で水素結合を形成していることが考えられる。V1/V2 が V3 ループの揺らぎを抑える理由は、V1/V2 は V3 ループの近傍に配置されているためであると考えられる。これは、gp120 全長分子モデルでは、V1/V2 と V3 の間に弱い正の相関運動が見られることから示唆される。以上より、V1/V2 は gp120 の安定性、V3 ループの揺らぎを制御する。その結果として、V1/V2 は V3 ループを中和抗体から避けることができる位置に導く。したがって、HIV-1 gp120 の中和抗体逃避において、V1/V2 は重要な役割を果たすと考えられる。

E. 結論

V1/V2 が gp120 の中和抗体逃避に果たす役割

を検討した。また、NBD 耐性 Env と薬剤との結合様式の解析も行った。V1/V2 は gp120 の安定性、V3 ループの揺らぎを制御する。その結果として、V1/V2 は V3 ループを中和抗体から避けることができる位置に導く。NBD 耐性変異である M426I により、bridging sheet 内の水素結合や NBD-556 の結合位置に変化が見られた。

F. 研究発表

- 1) 論文発表
- 1) Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops as a target for potent and broad neutralization of simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.*, 87:5424-36, 2013.
- 2) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H. *TRIM5* genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.*, 94:1318-1324, 2013.
- 3) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, Yusa K. Structure and Dynamics of the gp120 V3 Loop That Confers Noncompetitive Resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to Maraviroc. *PLoS ONE*, 8: e65115, 2013.
- 4) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J. Virol.*, 87:11447-111461, 2013. (The first two authors contributed equally)
- 5) Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, Tokunaga K. APOBEC3G Oligomerization Is Associated with the Inhibition of Both Alu and LINE-1 Retrotransposition. *PLoS ONE*, 8: e84228, 2013.
- 6) Burwitz B, Wu H, Reed J, Hammond K, Newman L, Bimber B, Nimiyongskul F, Leon E, Maness N, Friedrich T, Yokoyama M, Sato H, Matano T, O'Connor D, Sacha J. Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.*, 2013. (in press)
- 7) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect.*, 2013. (in press)

- press)
- 8) Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Akihide Ryo. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*, 11:9, 2014.
 - 9) Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J. Virol.*, 2014. (in press)

2 学会発表

- 1) 横山 勝、佐藤 裕徳. V1/V2 による HIV-1 gp120 のゆらぎに与える影響. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 1 特許取得
なし。
- 2 実用新案登録
なし。
- 3 その他
なし。

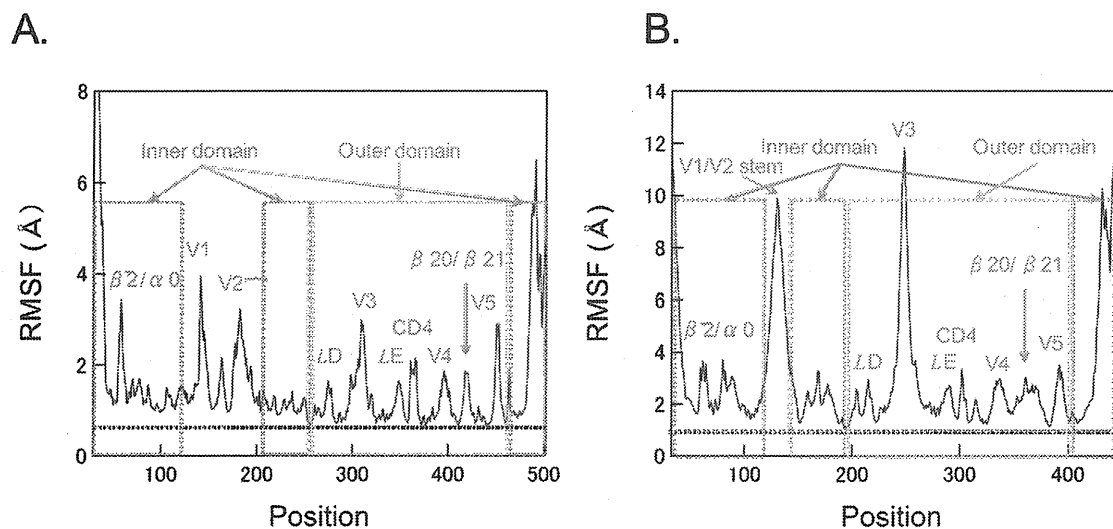


図1. HIV-1 gp120 全長分子モデル(A)または V1/V2 を除いた gp120 分子モデル(B) における各アミノ酸残基の RMSD (root mean square deviation:平均二乗偏差)。

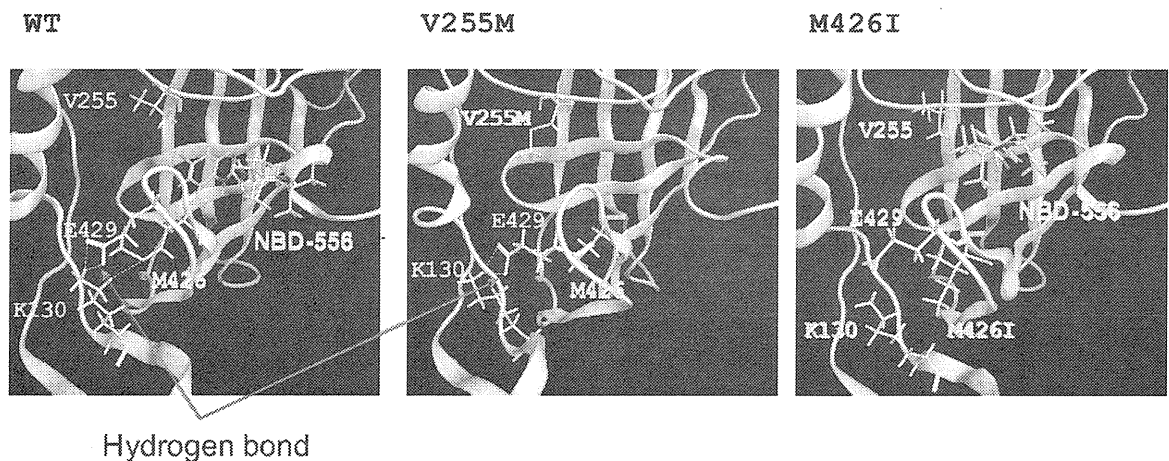


図2. NBD 耐性 Env-NBD-556 複合体の分子動力学計算の結果。シミュレーション時間 50 ns における構造。WT は YTApm48。

HIV の吸着・侵入過程を制御する宿主因子の研究

研究分担者 武内 寛明 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 ウイルス制御学 助教

研究要旨

HIV 感染症に対する薬剤併用化学療法により、効果的な HIV 複製制御が可能となってきたが、この方法をもってしても体内からウイルスを完全に排除することが出来ないのが現状である。このことから、HIV 感染症の予防および治療法を開発するにあたり、個体レベルにおける宿主免疫応答系および細胞レベルでのウイルス増殖機構の更なる解明とその制御法に関わる新たな抗 HIV 剤の開発が急務となっている。本研究では、機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーに HIV を感染させた後に生存した細胞から同定された新規 HIV 感染制御因子群のうち、HIV の吸着・侵入過程を制御する新規宿主因子（群）を同定し、新たな治療標的分子としての評価およびその制御法の基盤確立が目的である。当該年度は細胞膜近傍に局在している HIV 感染制御因子候補群のうち、アクチン結合タンパク質（Actin-Binding Protein: ABP）およびイオンチャネルタンパク質（Ion Channel Protein: ICP）の候補因子 2 種が HIV 感染制御因子であることが分かった。特に ABP については、HIV 侵入過程を特異的に制御する細胞内因子であることが分かった。このことは、HIV 感染過程における吸着・侵入過程メカニズムの理解を深めることが可能となるだけでなく、新たな治療標的分子となりうる可能性が考えられる。

A. 研究目的

世界的な医療・社会問題であるエイズの原因である HIV が感染伝播するメカニズムについて、未だ解明がなされていない部分が多く、そのため HIV 感染伝播初期における感染免疫メカニズムの詳細も不明な点が多い。また現在までに、薬剤併用化学療法により効果的な HIV 複製制御が可能となってきたが、この方法をもってしても体内からウイルスを完全に排除することが出来ないのが現状である。このことから、HIV 感染症の予防および治療法を開発するにあたり、個体レベルにおける宿主免疫応答系および細胞レベルでのウイルス増殖機構の更なる解明とその制御法に関わる新たな抗 HIV 剤の開発が急務となっている。近年、特異的な細胞間／分子間相互作用を網羅的に解析する方法として、RNA 干渉法を用いたゲノムワイドスクリーニング法が用いられるようになってきた。ウイルス感染症においてもウイルスと宿主との攻防を網羅的に解析する方法として導入されつつあるが、HIV 感染症も例外ではない。しかしながら、これまでの研究成果は、

本来の HIV 感染標的細胞である T リンパ球およびマクロファージ等を用いたものではなく、これらの成果によって得られた HIV 感染制御因子候補群から真の HIV 感染制御因子同定に至るまでに、超えなければいけない山は多い。本研究は、機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーを用いた HIV 感染制御因子群の探索から得られた候補因子群のうち、HIV の吸着・侵入過程を制御する新規宿主因子群を同定し、新たな治療標的分子としての評価およびその制御法の基盤確立が目的である。

B. 研究方法

(1) 宿主機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーの樹立および HIV 感染制御宿主因子群の探索：宿主機能遺伝子（約 1 万 5 千遺伝子）を標的とした short hairpin RNA (shRNA) ライブラリーを発現するカセットを T 細胞ゲノムへ組み込むことで、shRNA ライブラリー安定発現 T 細胞株を樹立した。次に、これら T 細胞ライブラリーを用いて、HIV 感染耐性 T 細胞

群 (semi-clonal population) を選択した。その後、各々の細胞群が保持している shRNA 配列 (群) をシーケンス解析し、shRNA 配列が標的としている宿主機能遺伝子 (群) を同定した。

(2) 機能遺伝子発現抑制 T 細胞株の樹立：HIV 感染増殖効率が著しく低下している細胞群 (semi-clonal population) から同定した HIV 感染制御候補因子群の中で、細胞膜近傍に局在する因子群を標的とした shRNA 発現カセットを、レンチウイルスベクターを用いて T 細胞株に遺伝子導入し、機能遺伝子発現抑制 T 細胞株を樹立した。

(3) HIV-1 感染効率の解析：(2) で樹立した各 T 細胞株に、HIV-1_{LAI/IIIIB} env-pseudotyped HIV-1 (HIV-1 env/luciferase-reporter HIV-1) または VSV-G-pseudotyped HIV-1 (VSV-G/luciferase-reporter HIV-1) を感染させ、24 時間後の luciferase 活性を測定した。

(4) HIV-1 増殖能の解析：各 T 細胞株に、HIV-1 (NL4-3 株) を感染させ、その後継的に培養上清を回収し、それらに含まれるウイルス由来の逆転写酵素 (RT) 活性を測定した。

(5) HIV-1 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析：(2) で樹立した各 T 細胞株に HIV-1 (NL4-3 株) を感染させ、24 時間後の感染細胞内で、逆転写反応を経て合成されたウイルス DNA 量について、*pol* および *env* の各領域におけるリアルタイム PCR 法にて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、必要に応じた東京医科歯科大学の機関承認および文部科学大臣承認を既に取得済みである。

C. 研究結果

1. 細胞膜近傍に局在する HIV 感染制御候補因子の解析 (アクチン結合タンパク質：ABP)

今年度は、申請者が既に見出している HIV-1 感染制御候補因子群のうち、細胞膜近傍に局在している 2 つの候補因子群 (アクチン結合タンパク質：ABP、イオンチャネルタンパク質：ICP) が、HIV 感染制御因子であるかを検討した。

まず ABP について、ABP を標的とした

shRNA を安定発現する T 細胞株を樹立し、ABP 発現量をタンパク質レベルで確認したところ、その発現レベルが通常細胞と比較して有意に発現抑制されていたことから、ABP 遺伝子発現抑制 T 細胞株 (ABP-KD) が樹立出来たことを確認した (図 1、上段)。

次に、HIV 特異的および HIV 非特異的吸着・侵入過程におよぼす影響について、HIV-1 エンベロープと水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 (VSV-G) との異なるウイルスエンベロープを用いて作製したルシフェラーゼ発現レポーター HIV-1 (NL43-luc delta *env/nef*) を用いて検討した。その結果、HIV 特異的吸着・侵入過程に影響をおよぼす可能性が示唆された (図 1、下段：HIV-1 envelope と VSV-G envelope との比較)。

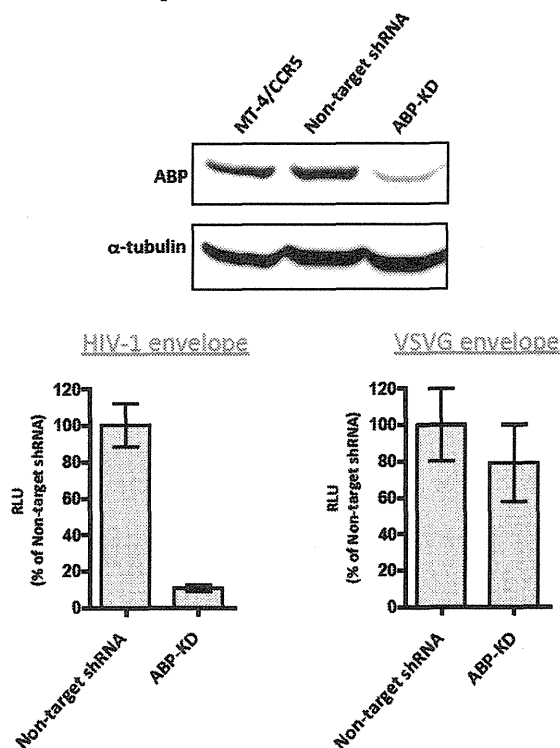


図 1. HIV 感染効率に対する ABP の影響. ABP-KD T リンパ球 (上段) に HIV-1 または VSV-G エンベロープを用いたシュードタイプ HIV を感染させた。感染 24 時間後の感染細胞内のルシフェラーゼ活性を測定する事で感染効率を検討した (下段)。

次に、ABP が HIV-1 吸着・侵入過程以降の HIV-1 感染過程に影響をおよぼすのか否かについて、HIV-1 が感染標的細胞内に侵入後に起こる逆転写反応過程への影響を解析した。具体的には、リアルタイム PCR 法を用いて逆転写反応によって合成されるウイルス DNA 量を定量することで、この過程への影響を見極めた。その結果、ABP-KD 細胞において、ウイルス

DNA 合成効率が著しく低下していることが分かった (図 2)。

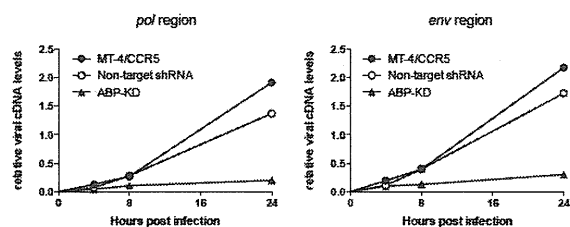


図 2. ABP の逆転写反応過程に対する影響. MT-4/CCR5、Non-target shRNA、ABP-KD 細胞に HIV-1(NL4-3 株)を感染させ、4、8、24 時間の各時間において Total DNA を抽出し、HIV-1 の *pol* および *env* 領域を特異的に増幅するリアルタイム PCR 法を用いて感染細胞内で合成されたウイルス DNA 量を定量した。

更には、MT-4/CCR5、Non-target shRNA および ABP-KD T 細胞株を用いた HIV-1 感染実験 (multi-round infection) を行った結果、ABP-KD T 細胞株における HIV-1 感染増殖伝播効率が顕著に低下することが分かった (図 3)。

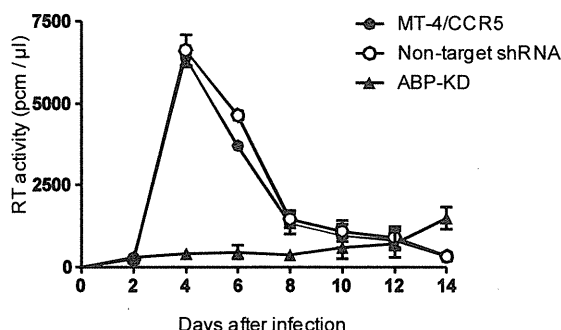


図 3. HIV 感染増殖効率に対する ABP の影響. MT-4/CCR5、Non-target shRNA、ABP-KD 細胞に HIV-1(NL4-3 株)を感染させ、経時的に培養上清中の逆転写酵素活性 (RT activity) を測定した。

2. 細胞膜近傍に局在する HIV 感染制御候補因子の解析 (イオンチャネルタンパク質: ICP)

次に、膜近傍部位に局在するもう 1 つの候補因子: ICP の異なる遺伝子領域を標的とした shRNA を安定発現する T 細胞株を樹立し、ICP 発現量をタンパク質レベルで確認したところ、その発現レベルが通常細胞と比較して様々な発現レベルであったことから、ICP 遺伝子発現抑制 T 細胞株 (ICP-KD) が樹立出来た (図 4、上段)。これらの細胞を用いて HIV 特異的および HIV 非特異的吸着・侵入過程におよぼす影響について、HIV-1 エンベロープと水疱性口内

炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 (VSV-G) との異なるウイルスエンベロープを用いて作製したルシフェラーゼ発現レポーター HIV-1 (NL43-luc delta *env/rev*) を用いて検討した。その結果、いずれの侵入経路においても影響をおよぼす可能性が示唆された (図 4、下段: HIV-1 envelope と VSV-G envelope との比較)。

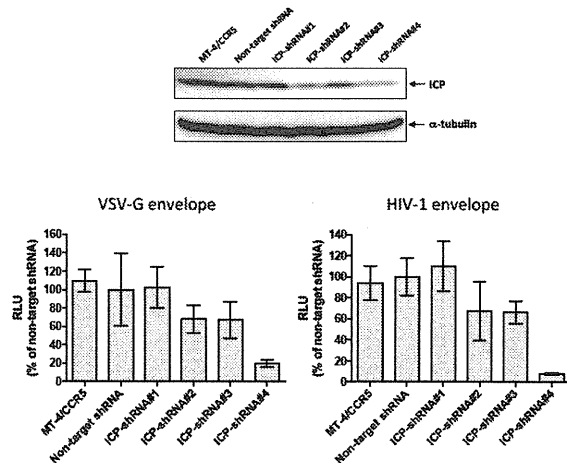


図 4. HIV 感染効率に対する ICP の影響. ICP-KD T リンパ球 (上段) に HIV-1 または VSV-G エンベロープを用いたシュドタイプ HIV を感染させた。感染 24 時間後の感染細胞内のルシフェラーゼ活性を測定する事で感染効率を検討した (下段)。

D. 考察

現段階において、HIV 感染症に対する治療薬は、HIV 特異的酵素を標的としたものを組み合わせるのが一般的であるが、近年の薬剤開発においては、HIV 感染過程における吸着・侵入過程を標的とした薬剤に焦点が当てられている。しかしながら、HIV 感染吸着・侵入過程メカニズムにおいて、宿主細胞側の要因について不明な点が多いことから、この感染過程における理解をより一層深めることが、新規治療法の開発において必須課題であると考えられる。本研究では、ゲノムワイドスクリーニング法を用いた HIV-1 感染制御宿主因子探索によって同定した HIV-1 感染制御宿主候補因子群の中で、HIV-1 吸着・侵入過程におよぼす細胞膜近傍に局在する候補因子群の機能解析を遂行することを目的としている。本年度は、細胞膜近傍局在宿主候補因子 2 種について、HIV-1 感染制御因子として機能するかどうかを見極めた。宿主因子: ABP の発現抑制 T 細胞を用いた single-round infection 実験の結果から、HIV-1 *env* を用いたシュドウイルス感染効率のみ感染