

研究課題：HIV Gag 蛋白質と関連因子の治療標的構造の解明に向けた統合的研究

課題番号：H25-エイズ-一般-003

研究代表者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長）

研究分担者：塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所 教授）、増田 貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授）、梁 明秀（横浜市立大学医学部、教授）、櫻木 淳一（大阪大学微生物病研究所 助教）、間 陽子（理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット ユニットリーダー）、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）、蝦名 博貴（京都大学ウイルス研究所 助教）、村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、玉村 啓和（東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 教授）

## 1. 研究目的

HIV 感染症に苦しむ患者は現在も 3,000 万人を超える。治療法は格段に進歩し、感染者のエイズ発症を阻止できるようになった。しかし、現在の方法では HIV を完全に制御すること（治癒：cure）はできず、エイズを発症しなくても様々な問題が生じうる。引き続き、より良い制御法の開発に向けて基盤的研究を継続する必要がある。そこで本研究では、まだ治療標的となっていない HIV 「Gag」蛋白質に着目し、その構造、機能、変化能の理解を深め、新しい HIV 制御法を開発するための基盤を作る。

Gag 蛋白質は、HIV 粒子の主要な構造蛋白質として、ウイルス粒子形成と感染性維持、および細胞におけるウイルス複製の進行、など HIV 生活環全般に重要な役割を果たす。また自然免疫と獲得免疫の標的となる。有力な治療標的候補だが、この分子を標的とする HIV 制御法は確立していない。生細胞内における Gag の多彩な機能を評価する実験系の構築が難しいこともあり、一般には、機能部位を標的とする分子の論理的な設計、あるいは抗 HIV 分子の作用点や特異性の評価は難しい。

そこで本研究では、生命科学、及び異分野の先端技術を取り入れながら新たな Gag 解析プラットフォームを構築し、Gag 蛋白質の構造、機能、変化能に関わる新知見を集積し、得られた成果を基に抗 HIV 分子候補の設計、合成、改変を進め、低分子化合物等を利用した新しい HIV 制御法を開発するための情報・技術基盤を作る。

## 2. 研究方法

研究代表者の *in silico* 構造解析を軸に異種研究グループが連携して Gag 解析プラットフォームを構築する。これを用いて機能部位を同定し、構造特性と可変性を明らかにする。有力な弱点部位が見つかればこれを標的とする分子を設計・合成し、抗 HIV 活性を評価する。

柱 1 . 構造解析研究 ( 計算科学 ) : コンピュータを用いる分子シミュレーションと数理解析の解析基盤を構築し、Gag 機能部位の保存される構造特性や相互作用を明

らかにする ( 佐藤 . 研究協力者 : 横山勝 ) 。

柱 2 . HIV 複製研究 ( ウィルス学 ) : ライブイメージング等を活用して細胞内 Gag 前駆体の局在、ゲノム RNA との会合の場、細胞内動態、あるいは細胞に侵入した HIV コアの動態等を解析する実験系を構築し、変異導入解析や宿主因子の発現制御実験により、細胞における Gag 機能を制御するシス・トランス因子を明らかにする。研究代表者と共同で、Gag の機能を司る構造特性を明らかにする ( 塩田、蝦名、増田、野間口、間、梁、櫻木、佐藤 ) 。

柱 3 . 創薬シード探索 ( ケミカルバイオロジー ) : 有機合成化学の技術を用いて細胞内に導入可能な Gag 部分ペプチド誘導体のライブラリーを作製し、抗 HIV 活性を評価する。柱 1、2 の研究者と共同で、抗 HIV 分子候補の設計、合成、改変を進め、抗 HIV 活性を評価する ( 玉村、村上、佐藤 ) 。

( 倫理面への配慮 )

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、所属機関の承認を得て、「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」を遵守して行なった。

## 3. 研究結果

( 1 ) Gag カプシド ( CA ) 蛋白質の治療標的候補部位の選定 : 有力な治療標的候補部位として CA 蛋白質  $\alpha$  ヘリックス 9 ( h9 ) を選別した。 h9 由来ペプチド誘導体が抗 HIV 活性をもつ ( 玉村、村上 ) 。 h9 内に HIV/SIV で高度に保存されるトリプトファン残基 ( W184 ) が存在し、疎水性相互作用のネットワークを形成することで CA 二量体の安定化に寄与する ( 佐藤 ) 。 h9 近傍の変異は、CA 二量体の不安定化、自然免疫エフェクター TRIM5 $\alpha$  への感受性亢進、感染者ウイルス量の低下につながる ( 塩田、佐藤、Vaccine. 2010, 28 Suppl 2: B60-7 ) 。 ( 2 ) HIV コア脱殻・逆転写の分子機序 : HIV コア脱殻の動態解析系の構築に成功し、TRIM5 $\alpha$  は侵入してきたコアを細胞質内で認識して破壊することで感染を阻害すること、Gag マトリクス蛋白質 ( MA ) の N 末変異が脱殻を促進し、同時にゲノム逆転写障害をも

たらずこと、等がわかった(塩田、村上)。HIV ゲノム逆転写の素過程の効率を定量解析する無細胞再構築系の樹立に成功し、逆転写反応の律速段階がストランド転移過程であること、Gagヌクレオカプシド(NC)は1stストランド転移効率を上昇させることがわかった(増田)。(3)感染後期過程の分子機序:細胞内のGag前駆体とHIV RNAを観測するライブイメージング系の構築に成功し、CAアミノ酸残基134と149がGag前駆体の細胞質膜での集合、細胞質輸送の制御部位であることがわかった(蝦名、野間口)。HIVゲノムパッケージングの独自解析系を構築し、HIVゲノムLTR SL1領域は未報告のバルジ・ループ・ステム機能構造をとることがわかった(櫻木)。Gag翻訳後修飾を司る宿主蛋白質を包括的に同定する実験系を構築し、Gag p6 Ser487がaPKCによりリン酸化されること、aPKC阻害剤がp6リン酸化の減弱を介してウイルス粒子感染性の低下に結びつくことがわかった(梁)。(4)創薬シード探索:Tsg101-Gag p6結合阻害分子を同定した。これらの化合物はマクロファージでのウイルス複製を阻害した(間)。MAおよびCA部分ペプチドライブラリーの中から、抗HIV活性をもつものを特定した、二次構造を維持するように共有結合で架橋したステーブルペプチドは、細胞膜を透過することができ、細胞で抗HIV活性を示した(玉村、村上)。

#### 4. 考察

柱1-3の異なるアプローチで得られた結果は、全て、CA蛋白質のh9がHIV/SIVの急所の一つであることを強く示唆した。W184を介する疎水性相互作用ネットワークを破綻させる分子を設計・合成できれば、ウイルス粒子形成や細胞内コア脱殻を阻害するHIV複製阻害剤のリード化合物が得られると期待される。

HIVの発見後30年を経たが、生細胞におけるGagの機能については未解決課題が多く残されている。Gagを標的とする制御法開発の蓋然性を高めるには、Gagの弱点となる機能の理解が不可欠となる。本研究の実施により、ライブイメージング等の技術を取り入れた細胞内Gag観察系の構築が進み、班員の共同研究でHIV複製制御機構の新知見が集積した。いずれも、今後の解析結果次第で、治療標的部位の同定に結びつく。本研究の継続により、異種分野が連携する新たなGag解析プラットフォームの構築が進み、Gag機能を制御するシス・トランス制御因子の新たな新知見が蓄積し、Gagを標的とする新しいHIV制御法の開発・情報基盤が形成されると期待される。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

当初計画は順調に達成された。*in silico*構造解析を軸に異種研究グループが有機的に連携するGag解析プラットフォームの構築が順調に進み、HIV複製におけるGagの機能と自然免疫エフェクターの作用機構に関する新知見が集積し、治療標的部位候補の構造特性と変化能の解析が進んだ。特にGag CA蛋白質について、HIVの弱点候補が特定された。これらの研究活動により、Gagを標的とする創薬シード探索の情報・技術基盤の構築が進んだ。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究では、異種分野連携によりHIV複製研究に新たな道を開き、成果をHIV制御戦略の構築に活用する。この試みは、世界的にも極めてユニークである。研究を通じて種々の新しいGag解析手法が創成され、Gagの構造・機能・進化の特徴とHIV複製機構の理解が深まる。これによりGagを標的とするHIV制御法を論理的に開発する新しい技術・情報基盤が構築される。すでに種々の新たなGag機能アッセイ系の構築に成功し、有力な治療標的候補を同定する、などの成果を得ている。ウイルス学の進展を通じて科学と技術の進展と普及に寄与することから、学術的、国際的な意義が高い。さらに、新たなHIV制御戦略の構築に貢献する点から社会的意義も高い。

##### 3) 今後の展望について

異種分野連携基盤の構築も順調に進み、HIVの弱点と目されるGag CA蛋白質の相互作用を明らかにしていることから、新しいHIV制御法の開発基盤を作るとの当初目標の達成は可能と考えられる。最終年度は、柱1-3のGag CAの成果を基に創薬シード探索を行う。一方、依然としてGagの機能に不明な点が多く、未同定の治療標的部位が存在する可能性も高い。このため引き続き柱1-3の研究を継続し、HIVの弱点候補を探索する。

#### 6. 結論

ウイルス学・計算科学・ケミカルバイオロジーが有機的に連携する独自性の高いGag解析基盤の構築が順調に進み、Gag機能を制御するシス・トランス制御因子の構造と可変性の知見が順調に蓄積した。また、Gag CAの有力な弱点部位候補が判明し、その構造特性も明らかになった。これらの研究成果により、Gagを標的とするHIV制御法を開発する蓋然性が高まった。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

該当無し。

## 研究発表

### 研究代表者

#### 佐藤裕徳

- 1) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., and Adachi, A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 $\alpha$ . *Microbes Infect.* Nov; 16(11) : 936-944, 2014.
- 2) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J Virol.* Apr; 88(8) : 4145-4160, 2014.
- 3) 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., and Sacha, J. Tertiary mutations stabilize CD8<sup>+</sup> T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* Mar; 88(6) : 3598-3604, 2014.
- 4) 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., and Ryo, A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* Jan 22; 11(1) : 9, 2014.
- 5) Motozono, C., Yokoyama, M., Sato, H., and Ueno, T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect.* Apr; 16(4) : 320-327, 2014.

### 研究分担者

#### 塩田達雄

- 1) Hayasaka, H., Kobayashi, D., Yoshimura, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., and Miyasaka, M. The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. *PLoS One* 2014 Accepted.
- 2) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., and Adachi, A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 $\alpha$ . *Microbes infect.* 16(11) : 936-944, 2014.
- 3) Taya, K., Nakayama, E.E., and Shioda, T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 9(3) : e90969, 2014.

### 増田貴夫

- 1) Kinpara, S., Itoh, S., Takahata, T., Saitoh, Y., Hasegawa, A., Kijiyama, M., Utsunomiya, A., Masuda, M., Miyazaki, Y., Matsuoka, M., Nakamura, M., Yamaoka, S., Masuda, T., and Kannagi, M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NF $\kappa$ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leukemia* (in press).
- 2) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J Virol.* 88:4145-4160, 2014.

### 野間口雅子

- 1) Doi, N., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Growth properties of macaque-tropic HIV-1 clones carrying vpx/vpr genes from simian immunodeficiency viruses in place of their vpr regions. *Journal of Medical Investigation* 61: 374-379, 2014.
- 2) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., and Adachi, A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 $\alpha$ . *Microbes and Infection* 16: 936-944, 2014.
- 3) Nomaguchi, M., Doi, N., and Adachi, A. Virological characterization of HIV-2 vpx gene mutants in various cell systems. *Microbes and Infection* 16: 695-701, 2014.
- 4) Miyake, A., Miyazaki, Y., Fujita, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Frontiers in Microbiology* 5: 24. doi: 10.3389/fmicb.2014.00024, 2014.
- 5) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Yokoyama, M., Tsunetsugu, Y., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *Journal of Virology* 88: 4145-4160, 2014.
- 6) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient

translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.

## 梁 明秀

- 1) Watashi, K., Sluder, A., Daito, T., Matsunaga, S., Ryo, A., Nagamori, S., Iwamoto, M., Nakajima, S., Tsukuda, S., Borroto-Esoda, K., Sugiyama, M., Tanaka, Y., Kanai, Y., Kusuhara, H., Mizokami, M., and Wakita, T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Hepatology* 59:1726-1737, 2014.
- 2) Kurotaki, D., Yamamoto, M., Nishiyama, A., Uno, K., Ban, T., Ichino, M., Sasaki, H., Matsunaga, S., Yoshinari, M., Ryo, A., Nakazawa, M., Ozato, K., and Tamura, T. IRF8 inhibits C/EBP $\alpha$  activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nat Commun.* 5:4978, 2014.
- 3) Nishi, M., Akutsu, H., Kudoh, A., Kimura, H., Yamamoto, N., Umezawa, A., Lee, S.W., and Ryo, A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget* 5:8665-8680, 2014.
- 4) Okayama, A., Miyagi, Y., Oshita, F., Nishi, M., Nakamura, Y., Nagashima, Y., Akimoto, K., Ryo, A., and Hirano, H. Proteomic Analysis of Proteins Related to Prognosis of Lung Adenocarcinoma. *J Proteome Res.* 13:4686-4694, 2014.
- 5) 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., and Ryo, A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* 11:9, 2014.
- 6) Furukawa, A., Sugase, K., Morishita, R., Nagata, T., Kodaki, T., Takaori, A., Ryo, A., and Katahira, M. Quantitative analysis of the location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 53:2349-2352, 2014.
- 7) Nishi, M., Sakai, Y., Akutsu, H., Nagashima, Y., Quinn, G., Masui, S., Kimura, H., Perrem, K., Umezawa, A., Yamamoto, N., Lee, S.W., and Ryo, A. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene.* 33:643-652, 2014.

## 岡陽子

- 1) Hagiwara, K., Ishii, H., Murakami, T., Takeshima, S-n., Chutiwitoonchai, N., Kondo, Y., Honda, K., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., Suzuki, M., and Aida, Y. Synthesis of a Vpr-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor. *Antivirus Res.*, in press.
- 2) Murakami, T., and Aida, Y. Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PloS ONE* 9(1):e86840, 2014.
- 3) Zahoor, M. A., Xue, G., Sato, H., Murakami, T., Takeshima, S-n., and Aida, Y. Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PloS ONE* 9(8):e106418, 2014.
- 4) Miyatake, H., Sanjoh, A., Unzai, S., Matsuda, G., Tatsumi, Y., Miyamoto, Y., Dohmae, N., and Aida, Y. Crystal structure of human importin- $\alpha$ 1 (Rch1), revealing a potential autoinhibition mode involving homodimerization. *PloS ONE* 9(8):e106418, 2014.

## 玉村善和

- 1) Masyuk, M., Abduemula, A., Morosan-Puopolo, G., Ödemis, V., Rehimi, R., Khalida, N., Yusuf, F., Engele, J., and Tamamura, H. Carsten Theiss & Beate Brand-Saberi, Retrograde Migration of Pectoral Girdle Muscle Precursors Depends on CXCR4/SDF-1 Signaling. *Histochem. Cell. Biol.* 142(5) : 473–488, 2014.
- 2) Yamamoto, J., Maeda, N., Komiya, C., Tanaka, T., Denda, M., Ebisuno, K., Nomura, W., Tamamura, H., Sato, Y., Yamauchi, A., Shigenaga, A., and Otaka, A. Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker. *Tetrahedron* 70(34) : 5122–5127, 2014.
- 3) Takano, H., Narumi, T., Ohashi, N., Suzuki, A., Furuta, T., Nomura, W., and Tamamura, H. Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups. *Tetrahedron* 70(29) : 4400–4404, 2014.
- 4) Yamamoto, J., Denda, M., Maeda, N., Kita, M., Komiya, C., Tanaka, T., Nomura, W., Tamamura, H., Sato, Y., Yamauchi, A., Shigenaga, A., and Otaka, A. Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins. *Org. Biomol. Chem.* 12(23) : 3821–3826, 2014.
- 5) Narumi, T., Tsuzuki, S., and Tamamura, H. Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level ab Initio Calculations. *Asian J. Org. Chem.* 3(4) : 497–503, 2014.
- 6) Narumi, T., Takano, H., Ohashi, N., Suzuki, A., Furuta, T., and Tamamura, H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org. Lett.* 16(4) : 1184–1187, 2014.