

## 研究課題： HIV Gag<sup>p24</sup> カプシド蛋白質の治療標的候補部位の絞り込み

研究分担者：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）  
研究協力者：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）  
玉村 啓和（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授）  
村上 努（国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長）  
塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所 教授）

### 研究要旨

柱1-3の連携により、HIV Gag<sup>p24</sup> カプシド蛋白質の有力な治療標的候補部位を絞り込んだ。  
-helix 9(h9)は、W184を介する疎水性相互作用により HIV コアの安定化に重要な役割を果たしている。  
W184は、HIV/SIVで極めて高度に保存されている。玉村・村上らが報告した抗 HIV ペプチド誘導体(19L; 玉村らの分担報告書参照)は、h9に合致する。Cotten、塩田、佐藤らが報告した HIV-2 CA CTD 変異(CA二量体の不安定化、TRIM5 $\alpha$ 感受性亢進、感染者血中ウイルス量の低下を誘起する変異; Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7)は、h9に近接している。以上の結果と既報のウイルス学・免疫学情報は、h9のW184が介する疎水性相互作用が HIV/SIVの急所の一つであることを強く示唆する。

### A. 研究目的

HIV 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。本研究では、Gag蛋白質の一つ「Gag<sup>p24</sup> カプシド蛋白質」の構造・機能・可変性の理解を基に、治療標的部位の論理的な特定を試みた。

### B. 研究方法

(1) 多様性解析：ロス・アラモス研究所(HIV databases <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>)より HIV-1/SIVcpz Gag全長アミノ酸配列(n=6,225)と HIV-2/SIVsmmのそれ(n=101)を取得し、既法(Yokoyama et al., Front Microbiol. 2012, 3:312など)で、個々のアミノ酸残基の Shannon情報エントロピーを計算した。

(2) 構造解析：コア安定化に寄与する相互作用は、HIV-1コア構造情報(成熟型)(Zhao G et al., Nature 497,643-646, 2013)を材料として、MOE(Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada)を用いて探索した。カプシド二量体の安定性は、二量体の結合エネルギー

( $E_{bind} = E_{dimer} - 2E_{monomer}$ )を指標として数値化した(Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7)。

(3) CA部分ペプチド誘導体の合成と抗HIV活性評価：合成は玉村らの研究グループ、活性評価は村上らの研究グループが行った。詳細は、分担研究報告書(玉村)に記載されている。

(4) HIV-2のTrim5感受性の解析：塩田らの研究グループ(柱2)が実施した。MT4にTrim5発現用センダイウイルスとHIV-2を重感染させ、培

養上清に放出されるGag CA量をELISAで測定した(Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7)。

(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。

### C. 研究結果

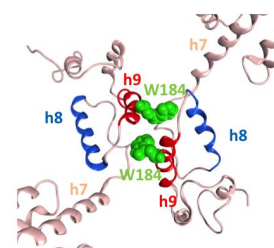
構造解析(図1;成熟コア中のCA CTDドメイン二量体境界面の構造):現時点で得られる最も精密なHIV-1コア構造情報(成熟型)を材料とし、MOEを用いてコア安定性に寄与する相互作用を探索した。その結果、当初想定していたCAヘキサマー間には強い相互作用は認められなかった。一方でCAのC末ドメイン(CTD)の-helix 9(h9)のW184が介する強い疎水性相互作用ネットワークが見出された。このネットワークを基盤としてCA二量体と六量体の安定化がおき、その後弱い相互作用でコアが安定化すると考えられる。

図1. 構造解析(柱1)

コアの安定化に重要なアミノ酸残基の探索



コアの窪み(CA CTD dimer interface)の構造

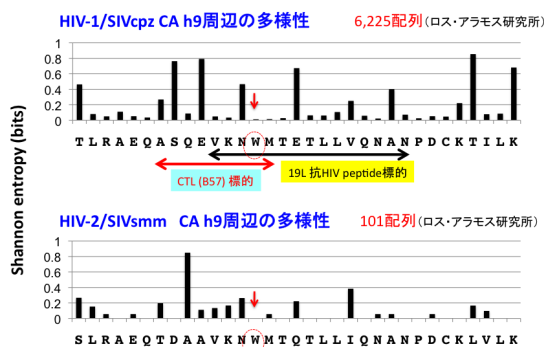


“W184”を介する「疎水性相互作用」で安定化

多様性解析 ( 図 2 ): ロス・アラモス研究所に登録されている HIV-1/SIVcpz ( n=6, 225 ) および HIV-2/SIVsmm ( n=101 ) の CA 全長配列のアライメント情報を用い、個々のアミノ酸サイトの情報エントロピーを調べた。その結果、W184 残基は情報エントロピーがほぼ 0 で、情報の揺らぎが無いことがわかった。すなわち W184 残基は HIV/SIV 集団において極めて高度に保存されている。サル、並びにヒトで感染・増殖を繰り返す過程で変化することのできないアミノ酸残基と考えられる。

図2. 多様性解析 (柱1)

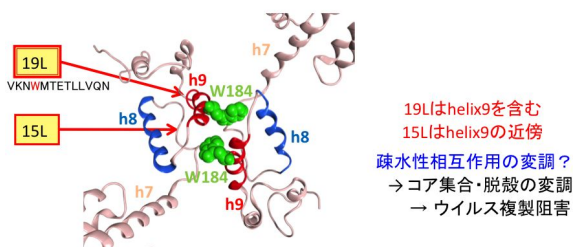
“W184” は、長期に渡る HIV/ SIV の増殖や流行の間に変化しない(できない)



ケミカルバイオロジー ( 玉村、村上らの分担研究報告書、及び図 3 ): 玉村・村上らは、 HIV-1 CA 全長を網羅する合成ペプチドライブラリーを構築し、培養細胞を用いた HIV 感染系で個々のペプチドの抗 HIV 活性を評価した。抗 HIV 活性をもつペプチドが CA の立体構造上でのどの領域に位置するのかを MOE を用いて調べた。その結果、19L は、h9 にほぼ一致することがわかった。また他の CTD 由来抗 HIV ペプチド誘導体 ( 15L ) も、h9 の近傍に位置することがわかった。これらのペプチドは、h9 が介在する疎水性相互作用の変調を誘起することで抗 HIV 活性を発現する可能性が示唆された。なお、15L は細胞障害性があることから、CA 以外の分子を標的にしている可能性もある。

図3. ケミカルバイオロジー (柱3)

CA CTD 由来抗 HIV ペプチド誘導体 (15L と 19L) は、h9 近傍に位置する

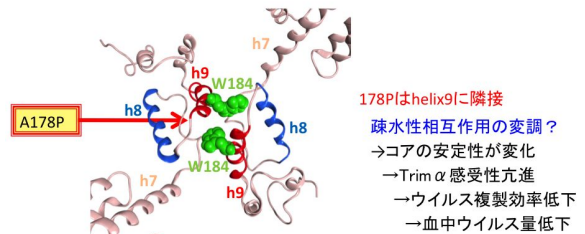


構造生物学研究 ( 図 4 ): Cotton M、塩田、佐藤らは、 HIV-2 感染者の CA 蛋白質 CTD ドメイン生じる 3 種の変異 ( A119P, S159P, A178P ) の構造生物学的意義を調べた。その結果、これらの変異が CA 二量体の不安定化、自然免疫エフェクター TRIM5 $\alpha$  への感受性亢進、感染者の血中ウイルス量の低下を誘起することを見出した ( Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7 )。今回、これらの変異の立体構造上での位置を調べた。これらは CTD 7-h9 の間に生じ、立体構造上は h9 に近接しており、その 1 つ ( A178P ) は h9 に隣接することがわかった。

また、その周辺は、感染者のウイルス量を制御する活性をもつ CTL エピトープ B57 の標的となっていることもわかった ( 図 2 )。これらの変異は感染者におけるウイルスの適応度を低下させる。それにもかかわらず一部の感染者で維持されるのは、CTL が強い選択圧として働き、 HIV はまず増殖能を犠牲にしても CTL を逃避する必要があるからかもしれない。

図4. 構造生物学 (柱1 & 2)

血中ウイルス量、Trim5 $\alpha$ 感受性、CA二量体安定性を制御する HIV-2 Gag CA 変異 (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7) は、h9 に隣接



## D. 考察

柱 1-3 の異なるアプローチで得られた結果は、 CA 蛋白質の h9 の W184 が介在する疎水性相互作用ネットワークが HIV/SIV の急所の一つであることを強く示唆する。この相互作用は、カプシド二量体の安定化を通じてコアの安定化を保障する ( 図 1 )。塩田、佐藤らは CA 二量体並びにコア安定性の変調が TRIM5 $\alpha$  感染阻害感受性を増強することを示している (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7、および塩田の分担研究報告書)。コア安定性には適切な範囲の CA 二量体安定性が必要で、この安定性の変調はウイルスの増殖能の変調や喪失につながると考えられる。W184 は、 HIV/SIV の感染と増殖の間に維持され、長期にわたって全く変化しない ( 図 2 )。W184 が介在する「適切な」相互作用ネットワークの維持は、 CA 二量体とコアの「適切な」安定性の維持に必須なため、絶対に変化できないと考えられる。

最近、海外のグループにより、感染性ウイルス粒子形成の前提となるGag前駆体の順序だった集合のしくみについて興味深い知見が報告された。(Robinson B A et al. *J. Virol.* 2014;88:5718-5741、Woodward CL et al. *J. Virol.* 2015;15:1267-1277、Schur FK et al. *Nature.* 2015;517:505-508)。これらの研究により、ウイルスコア成熟において、184Wを含むh9の疎水性アミノ酸残基が、適切なGag前駆体集合の進行に重要な働きをしていることが示された。

我々の研究班の解析結果と併せて考えると、CA CTD h9のW184は、HIV複製サイクル前期・後期の全般で一貫して重要な働きをしており、このため非常に強い「構造・機能変化の制約」がはたらくために全く変化できないと考えられる。そこで、W184を標的とし、これを介する疎水性相互作用ネットワークの変調、もしくは破綻を招く分子を設計・合成できれば、感染性ウイルス粒子の形成や細胞内での適切なコア脱殻を阻害する感染・複製阻害剤が得られると期待される。

仮にW184を標的とする阻害剤が得られたとしても、周辺の変異性部位(図2)の変異で薬剤耐性ウイルスが発生するかもしれない。しかし、同時に変異による増殖能の低下効果も期待できる。すなわち、逃避変異が生じて、その変異はCA二量体の安定化に影響を与え、HIVの感染力低下を招き、結果的に感染者のウイルス量が低下する可能性がある。例えばW184を標的とするB57をもつ感染者のウイルス量は優位に低い(*Nat Med.* 2007,13(1):46-53)。また、エリートコントローラの40%前後はB57をもつ。これらの報告は、B57によるウイルス制御は強力であると同時に、仮にCTL逃避変異が出現しても変異ウイルスの増殖能は低下していることを示唆する。上述のCotten、塩田、佐藤らの報告した3種のCA CTD変異(A119P, S159P, A178P)は、ウイルスのTRIM5 $\alpha$ 感受性亢進を招くにも関わらず、一部の感染者体内で維持される。この一見矛盾した観察結果も、CTLの関与を考えると説明できる。CTLが強い選択圧として働くため、HIVは増殖能を犠牲にしても変異する必要があると考えられる。同様に、W184を標的とする強力な選択圧となる薬剤を創成できれば、これを用いてHIVの増殖能が低下する方向に進化を誘導することで、エリートコントローラのようにHIVのより良い制御が可能となるかもしれない。

## E. 結論

柱1-3研究が連携し、HIV Gag<sup>p24</sup> カプシド蛋白質の有力な治療標的候補部位を絞り込んだ。最終年度は、CA CTD h9 W184を標的とする創薬シード探索を行う。

## F. 知的所有権の取得状況

該当無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

: Gag 論文., 無印: 計算科学

- 1) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of a large outbreak of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir in the 2103-14 influenza season in Japan. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy*** (in press)
- 2) Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimajo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. ***Sci Rep.*** 5:8185, 2015.
- 3) Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, 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.*** 16:936-44, 2014.
- 4) 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.*** 88:4145-60, 2014.
- 5) 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+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. ***J. Virol.*** 88:3598-604, 2014.
- 6) 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 and Infection*** 16:320-7, 2014.
- 7) 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, 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.

## 2. 学会発表等

: Gag., 無印: 計算科学

1. 佐藤裕徳. 病原性ウイルス研究と計算科学. MOEフォーラム2014, 7月8日(火), 2014年, 東京.
2. 佐藤裕徳. シンポジウム「抗HIV薬の移り変わりから未来を考える」指定発言者(基礎) 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日(水-金), 大阪(大阪国際会議場).
3. 佐藤裕徳. 「コンピュータ予測がHIVを追いつめる」市民公開講座・エイズ予防財団成果発表会「HIV感染症のCureは可能か? -基礎研究者の挑戦」第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日(水-金), 大阪(大阪国際会議場).
4. Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Motomura K. Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4\_2006b after the onset of outbreaks. XVI International Congress of Virology (The IUMS 2014). July 27 -August 1, 2014, Montreal, Canada.
5. Yokoyama M and Sato H. Structural dynamics and correlated motions of HIV-1 gp120 revealed by molecular dynamics simulation. XVI International Congress of Virology (The IUMS 2014). July 27 -August 1, 2014, Montreal, Canada.
6. 佐藤裕徳, 横山勝, 本村和嗣, 中村浩美, 田村務, 吉澄志磨, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田衛, 田中智之, Norovirus Surveillance Group of Japan. ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
7. 横山勝, 中村浩美, 佐藤裕徳. ノロウイルス GII.4カプシドにおける共変異部位の推定. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
8. 高下恵美, 江島美穂, 藤崎誠一郎, 横山勝, 中村一哉, 白倉雅之, 菅原裕美, 佐藤彩, 佐藤裕徳, 小田切孝人, 全国地方衛生研究所. 2013/14シーズンにおけるNA阻害剤耐性A(H1N1)pdm09ウイルスの地域流行. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
9. 引地優太, 横山勝, 竹村太地郎, 藤野真之, 熊倉成, 山本直樹, 佐藤裕徳, 俣野哲朗, 村上努. 新規CXCR4阻害剤 KRH-3955耐性HIV-1の誘導とその解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
10. 関紗由里, 野村拓志, 西澤雅子, 横山勝, 佐藤裕徳, 團塚愛, 三浦智行, 小柳義夫, 俣野哲朗. SIVの持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
11. 原田恵嘉, 横山勝, Boonchawalit Samatchaya, 佐藤裕徳, 松下修三, 吉村和久. CD4類似低分子化合物誘導体(CD4 MCs)の耐性プロファイルと分子動力的機構解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
12. 佐藤裕徳, 本村和嗣, 横山勝. 環境ウイルスとヒト集団の関わり. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25-27日(火-木), 横浜.
13. 横山勝, 佐藤裕徳. ランダム行列理論によるHIV gp120の動的性質の解析. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25-27日(火-木), 横浜.
14. 横山勝, 佐藤裕徳. HIV-1 gp120における中和逃避のためのアロステリックパス. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日(水-金), 大阪(大阪国際会議場).