

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）

塩田達雄（大阪大学 微生物病研究所 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。H26 年度は、HIV-1 CA 部分ペプチドライブラリーを作製し、それらの抗 HIV-1 活性と細胞毒性を評価した。その結果、細胞膜透過性を付与することにより 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として、fragment 1、6、8、15 を特定できた。興味深いことに、fragment 15 は細胞膜透過性を付与しなくても弱いながら抗 HIV-1 活性を有していた（玉村先生との共同研究の成果）。次に、HIV-1 複製前期過程に障害を有することが推定されている Gag MA 領域の変異体（V6R）を用いて、前期過程の詳細な解析（VSV-G シュードタイプ HIV-1 の HeLa 細胞への感染系において種々の段階のウイルス DNA 合成を real-time PCR で解析）を行った。その結果、V6R 変異体は、逆転写の過程に障害を有することが明らかになった（共同研究者の塩田先生の研究から、V6R 変異体はその脱殻速度が亢進しているという結果も同時に得た）。

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) 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。

(2) MA 変異体 V6R の HIV-1 複製前期過程における障害がどこに存在するかを明らかにするために、VSV-G シュードタイプ HIV-1 (NL4-3) を HeLa 細胞に感染させた。経時的にウイルス

DNA を抽出し、各種プライマーを用いた real-time PCR によって、後期逆転写産物、2-LTR、宿主 DNA に組み込まれたウイルス DNA を定量した。

(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) CA 部分ペプチドの抗 HIV-1 活性および細胞毒性測定試験：Octa-Arg を C 末に付与し、細胞膜透過性を付与することにより 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は、fragment 1、6、8、15 の 4 つであった (表 1)。興味深いことに、fragment 15 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においても弱いながら X4、R5 HIV-1 に対して抗ウイルス活性を有していた。

(2) MA 変異体 V6R の HIV-1 複製前期過程における障害部位を real-time PCR によって特定する実験：V6R 変異によって逆転写の過程に障害が生じ (図 1)、それが組み込まれる DNA 量やウイルスの感染価の低下につながっていることが明らかになった。

D. 考察

(1) 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。

(2) 共同研究者の塩田先生の研究から、V6R 変異体はその脱殻速度が亢進しているという結果も同時に得ており、これまでの報告のように、脱殻と逆転写は相互に関連して進行していることが示唆された。

E. 結論

(1) CA 部分ペプチド fragment 1、6、8、15 の4つは新規抗 HIV 薬のためのシードと考えられる。

(2) MA 蛋白質の N 末の変異(V6R)によって、ウイルス複製前期過程におけるウイルス DNA の逆転写の過程に障害が生じることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 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，横浜，2014 年 11 月 10 日-12 日

2) 引地優太、武田英里、藤野真之、Eric O. Freed、中山英美、塩田達雄、俣野哲朗、村上 努。HIV-1 マトリックス(MA)変異体を用いた複製前期過程の解析。第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪，2014 年 12 月 3 日-5 日

3) 野村 涉、水口貴章、大橋南美、Mathieu Metifiot、藤野真之、Yves Pommier、駒野 淳、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 28 回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪，2014 年 12 月 3 日-5 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。

表1. CA部分ペプチドの抗HIV-1活性および細胞毒性				
CA 部分ペプチド	抗HIV-1活性		細胞毒性	
	MT-4/NL4-3	PM1/CCR5/NL(AD8)	MT-4	PM1/CCR5
	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
1L	4.5	6.2	>50	>50
6L	8.1	13	>50	>50
8L	14	14% inh. (50 μM)	>50	>50
15L	6.6	1.2	9.3	18
15C	47	27	>50	>50
AZT	0.066	5.3	>100	>100
AMD3100	0.033	>50	>50	>50
Vicriviroc	>5	0.0081	>5	>5

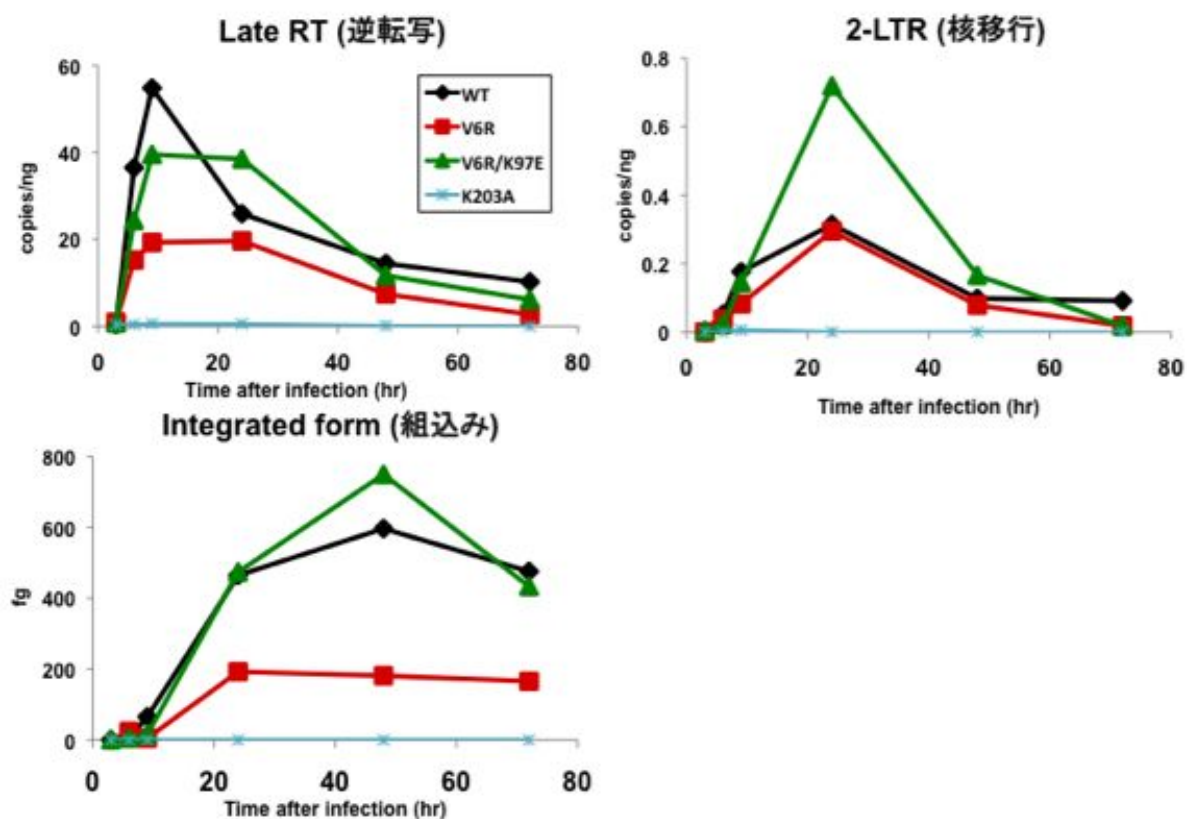


図1. MA変異体(V6R)、復帰変異体(V6R/K97E)、CA変異体(K203A)のウイルスDNA合成の経時変化