

第22回日本エイズ学会シンポジウム記録

シンポジウム7 実験室からの発信

Message From Laboratory

座長：高折 晃史，塩田 達雄

Chairman : Akifumi TAKAORI-KONDO, Tatsuo SHIODA

発表者：玉村 啓和，高折 晃史，梁 明秀，武内 寛明

Speakers : Hirokazu TAMAMURA, Akihumi TAKAORI-KONDO,
Akihide RYO, Hiroaki TAKEUCHI

1. はじめに

第22回エイズ学会において企画されたシンポジウム7「実験室からの発信」の概要について報告する。

本シンポジウムは、HIV感染の病態解明、さらには治療戦略の開発にむけて、現在日本で行われている基礎研究の面から発信できる内容を目指した。なかでも、近年、HIV複製を制御する様々な宿主因子が同定され、ウイルス複製を従来のウイルス蛋白からのみならず、宿主蛋白との相互作用からみることが重要となってきた。本シンポジウムでは、これら宿主因子とウイルス蛋白の相互作用という観点を中心として、HIV複製制御の理解と、さらにはそれに基づく新たな治療戦略や検査法の開発等に関して、各シンポジストの最新の知見を交えて発表していただいた。さらにパネリストによる討論と会場との活発な議論を通じて、その理解がより深まった。

2. 各シンポジストの発表内容

- 1) 種々の作用点をターゲットとした抗HIV剤の創製
東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 玉村啓和

現在のHIV感染症およびAIDSの治療法としては逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を2, 3剤用いるhighly active anti-retroviral therapy (HAART)が一般に用いられており、多大な成功を収めている。しかし、副作用がある、耐性ウイルスが生じる等の問題点もあり、他の作用点の薬も米国では徐々に臨床に登場してきている。いずれの作用機序を持つ抗HIV剤も根治に至るものではないので、創薬化学者には薬剤のレパートリーを増やすことが求められている。我々は以前からコレセプターCXCR4阻害剤を中

心に抗HIV剤を創製しており、本シンポジウムではその研究内容について述べた(図1)。

コレセプターCXCR4を抗エイズ薬のターゲットとすることは、もう一つの主要なコレセプターであるCCR5の阻害剤Maravirocが臨床使用されたことより妥当であると考えられ、CXCR4阻害剤も早急な開発と安全性の確認が期待される。以前の所属機関である京都大学薬学研究科の藤井信孝教授のもとでCXCR4阻害剤のリードを見つけており、現在さらに研究を進めている。HIVのコレセプター指向性を考えると、HIV感染直後の前期からエイズを発症する後期に移行するに従って、CCR5指向性の株からCXCR4指向性の株が主流になっていく。このことから、CCR5阻害剤だけでなく、片手落ちにならないようにCXCR4阻害剤も必要と思われる。また、以前からの既存の抗エイズ薬の重要なターゲットであるプロテアーゼに関して、コンビナトリアル設計に基づくプロテアーゼ阻害剤の創製を行っている。既存の作用点をターゲットとする場合、以前の薬剤とは違うアドンバンテージが要求される。我々の場合、既存のプロテアーゼ阻害剤の構造に含まれる各ユニット部分を組み合わせるコンビナトリアル設計により、それぞれの阻害剤の長所のみを取りあげて融合した新たな阻害剤を産み出すことができた。この阻害剤は多剤耐性株にも有効であり、また、in vitroでの本阻害剤に対する耐性株の出現を顕著に抑制した。このようにコンビナトリアル設計のような一見変わった概念も既存の薬剤をリファインするのに有効であることがある。演者は東京医科歯科大学に移ってから、さらに抗エイズ薬のターゲットを増やした。そのひとつは、HIV侵入の動的超分子機構をターゲットとし、他の侵入阻害剤や中和抗体等との併用を考えたCD4 mimicの創製を行っている。これら今まで述べたものはすべて標的分子設定型のリバースケミカルジェネティクス的手法により創出されたものである。さらに、ランダムライブラリーから抗HIV活性を指標にスクリーニングするという

著者連絡先：高折晃史(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54 京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学)

2009年4月21日受付

Life Cycle of HIV

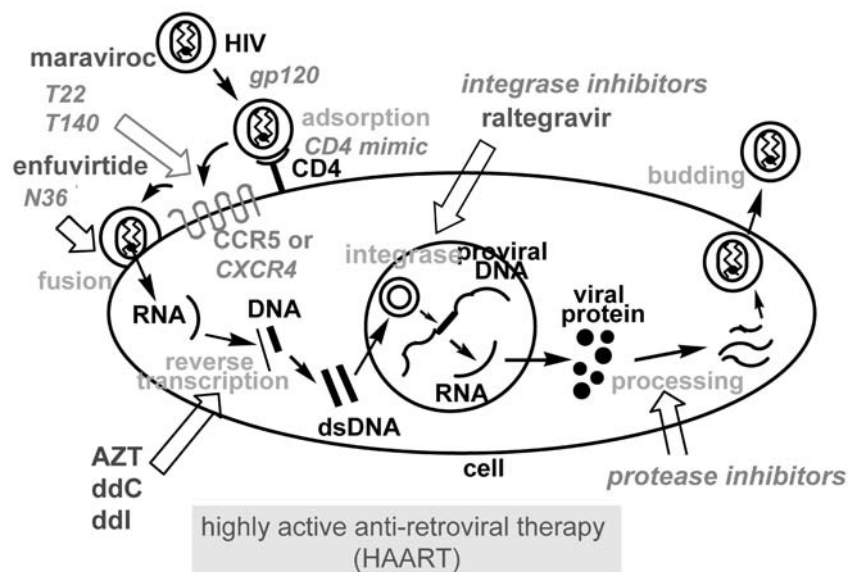


図 1 HIV のライフサイクルと抗 HIV 薬

これまでの標的は逆転写酵素とプロテアーゼであり、これらの薬剤の組合せは、HAART として AIDS の予後を劇的に改善した。さらに、侵入過程も新たな標的として、薬剤の開発が進んでいる（融合阻害薬 N36、我々の標的はコレセプターである）。

フォワードケミカルジェネティクス的手法を用い、有用なリード化合物を見つけ出そうとした。その一環研究のひとつとして、Vpr の部分ペプチドからインテグラーゼの阻害活性を有するリード化合物を見出すことができた。元の Vpr 蛋白質にはインテグラーゼ阻害活性がないので、本来の蛋白質では内に秘められた活性ペプチドを見出すことができたことになる。このようなペプチドは京都薬大の向井博士らが提唱している criptide (criptic peptide 神秘的なペプチド) の概念にもつながると思われる。このようにケミカルバイオロジー的方法も取り入れ、いろいろな視点観点からリード化合物を探索し、これらをもとに種々の抗 HIV 剤の創製研究を行っている。また、最近再度注目されてきたエイズワクチンについても、HIV 侵入の動的超分子機構が明らかになる以前はターゲットになっていなかった 3 箇所をターゲットとし、また、ペプチドミメティックの合成技術を活用し、抗原分子を作製している。阻害剤およびワクチンの両方に力を入れており、これらはカクテル療法を視野にいたした抗エイズ薬の創製研究に有用であると思われる。以上述べた研究は、CXCR4 に関して藤井教授の下で始めたものであり、共同研究として国立感染症研の山本先生、村上博士、駒野博士、熊本大学の満屋教授、松下教授、吉村博士にお世話になりました。

2) APOBEC3G/Vif による HIV-1 複製制御

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学
高折晃史

近年、HIV-1 複製を制御する重要な宿主因子が次々と同定され、ウイルス複製はこれら宿主因子とウイルス蛋白の相互作用によりより巧妙に制御されていることが明らかになりつつある。APOBEC3G は、それら宿主因子のさきがけとなって発見された分子であり、逆転写の際に、ウイルス 1 本鎖 DNA に dC から dU への変異を導入することにより HIV-1 の複製を阻害する。一方、ウイルス蛋白として、HIV-1 Vif (Virus infectivity factor) は、本分子と結合しユビキチン-プロテアソーム系を介してこれを分解することでその抗ウイルス活性を中和し、ウイルス複製を助けている。HIV-1 複製は、これら分子間の相互作用によって制御されているのであるが、本シンポジウムにおいては、さらにこれらの分子それぞれが、ユビキチン化やリン酸化によって機能調節を受けていることを示す我々の最新の知見を紹介すると同時に、これらを標的とした新規抗 HIV-1 薬開発の可能性に関して議論した。

具体的には、APOBEC3G のリン酸化修飾による機能調節の分子機構に関する我々の最新の知見を紹介した。APOBEC3G と同じ APOBEC3 蛋白に属する AID が、

Protein kinase A (PKA) によるリン酸化により、そのクラススイッチリコンビネーション能を調節されているという報告に基づき、APOBEC3G も同様に PKA によるリン酸化モチーフを有することより、その調節を受ける可能性に関して検討した。予想通り、APOBEC3G は PKA と結合し、Thr-32 のリン酸化をうけることが示された。次に、PKA によるリン酸化が APOBEC3G の抗 HIV 活性にどのような影響を与えるかを検討した。PKA によるリン酸化は、抗 HIV 活性そのものには影響を与えないが、Vif による分解を抑制した、すなわち、Vif に対する感受性を低下させ、抵抗性を付与していることが示された。その機序は、リン酸化 APOBEC3G の Vif への結合性の低下により、Vif によるユビキチン化が阻害されることであった。さらに、PKA によるリン酸化が如何に Vif との結合に影響を与えるかを、APOBEC3G の N 端の構造予想モデルをコンピュータシミュレーションにより解析した(国立感染症研究所 佐藤裕徳先生との共同研究)。その結果、Thr-32 のリン酸化は、Arg-24 との水素結合に影響を与え、これらアミノ酸間の相互作用に影響を与えている可能性が示唆された。さらに、Arg-24 の変異体を作製して検討したところ、本仮説が正しいことが示された。以上より、PKA による APOBEC3G のリン酸化は、Thr-32/Arg-24 間の相互作用に影響を与え、Vif との結合親和性を低下させること、さらにこれが Vif によ

るユビキチン化依存性分解を抑制し、APOBEC3G に Vif 抵抗性を付与するという分子機構が示された(図2)。これらの研究成果は、Vif/APOBEC3G 相互作用におけるリン酸化調節の役割を明かにしたのみならず、Vif/APOBEC3G の結合様式に新たな知見を加えた。これらは、将来 Vif/APOBEC3G 相互作用を標的とした新たな HIV 複製制御法の開発へとつながる可能性がある点も非常に意義があると考えられた。さらに最後に、現在我々が行っている Vif/APOBEC3G を標的とした低分子化合物スクリーニングに関して簡単に紹介した。

- 3) 無細胞タンパク質合成系を用いた HIV/AIDS 研究の新たな展開～新規 HIV-1 プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発
 国立感染症研究所エイズ研究センター
 第1研究グループ 梁 明秀

HIV-1 感染症の予後は HAART の導入により大きく改善され、全世界的に AIDS および合併症による死亡者数は顕著に減少した。しかし一方で、長期間にわたる複数の薬剤の継続的投与は、薬剤耐性 HIV の発生と蓄積を引き起こす原因となり、これらは HIV 感染症治療における新たな障害となっている。そのため薬剤耐性検査は、新規感染

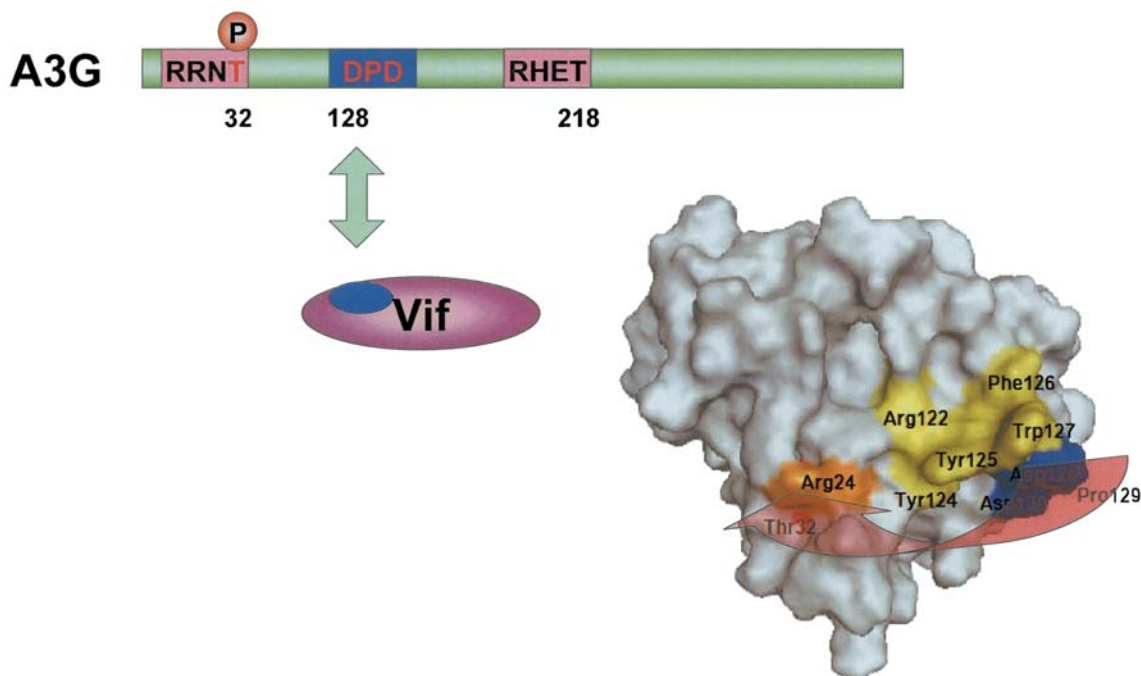
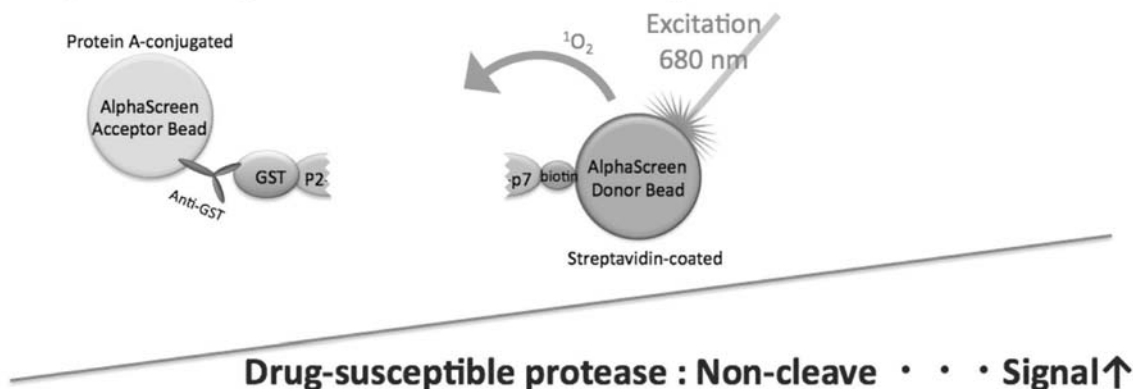


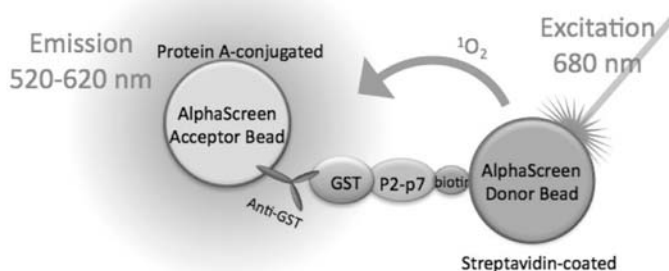
図 2 APOBEC3G と Vif との相互作用

青色が従来報告されていた Vif との結合部位 (Asp-128, Asp-130)。Thr-32/Arg-24 は、これらのアミノ酸と同じ分子表面を形成し、Vif との結合親和性を調節している。黄色は、ウイルス粒子中への取り込みに重要なアミノ酸。

(A) Drug-resistant protease : Cleave . . . Signal ↓

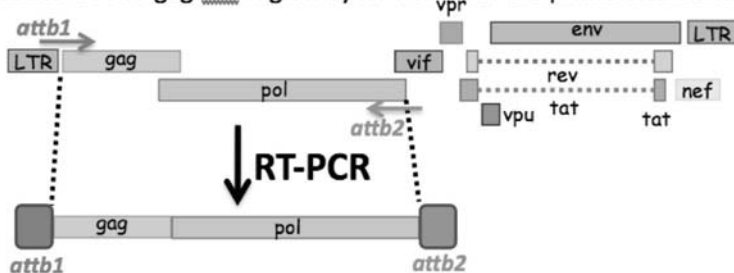


Drug-susceptible protease : Non-cleave . . . Signal ↑

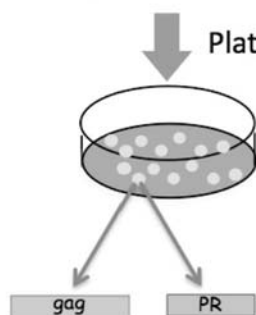


(B)

1) Amplification of HIV gag-pol region by RT-PCR with the primers containing the sequence for Gateway cloning.



2) Cloning into Entry Vector by using Gateway System.



3) Amplification of gag and PR region from the same colony by Colony PCR (~20 clones)

4) Generation of Transcriptional templates by colony PCR

5) Cell-free protein production and AlphaScreen detection for protease activity.

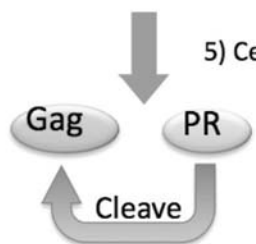


図 3 AlphaScreen を用いた HIV プロテアーゼ活性検出方法
(A) AlphaScreen の原理
(B) 実際のプロテアーゼ活性検出方法

者に適切な薬剤を選択する場合のみならず、長期治療経験者の治療予後を改善する上でも極めて重要なプロセスであると考えられる。

今日行われている薬剤耐性検査は、PCR とシーケンシングによりウイルス遺伝子の変異を解析し耐性を推定する「遺伝子型検査」と、培養細胞に抗 HIV 薬を加えて抑制力の有無と程度 (IC₅₀) を測定する「感受性検査」に分けられる。前者は短期間で結果がわかり、再現性のよい検査法であるが、間接的評価であるため定性的であり複数の変異が加わると解釈が難しく、耐性の推定には経験と知識が必要である。一方、後者は細菌検査の感受性検査と同様に直接的評価であるため結果がわかりやすいが、検査結果が出るまでに時間と経費がかかる上に、高度な技術と BSL3 などの特殊な施設が必要であるため、現時点では特定の検査機関のみが行っているだけである。これらのことから、簡便、迅速かつ安全に直接的評価の得られる新規の HIV-1 薬剤耐性検査法の開発が望まれている。

プロテアーゼはタンパク質であり、特定の基質タンパク質を切断するという“酵素活性”をもつため、酵素活性を指標に薬剤耐性スクリーニングを行うことがより直接的で定量的な検査結果を得るためには望ましいと考えられるが、現時点でこのような検査法の臨床レベルでの実用化例は皆無である。その原因としては、1) 大腸菌や昆虫細胞系において HIV-1 プロテアーゼタンパク質が強い細胞毒性を示すため発現が困難である、2) プロテアーゼ遺伝子を発現ベクターに組換える必要がある、3) 発現を誘導後、細胞を破壊してタンパク質を精製しなければならない、4) 精製したプロテアーゼの活性測定に適したハイスループットアッセイ法が開発されていない、などの問題があり、必要とされる時間・費用・労力からとても臨床検査に用いる事の出来るレベルではなかった。

我々はコムギ無細胞タンパク質合成系と AlphaScreen システムを用いることで、上記の問題のいくつかを克服し、新規薬剤耐性検査法の基盤技術開発に成功した。本研究におけるプロテアーゼ活性の検出原理を図 3A に示す。まず基質として、HIV-1 Gag タンパク質の内部切断部位 p2-p7 領域の N 末端に GST タグ、C 末端にビオチン化配列を付加して無細胞合成する。ここへ抗 GST 抗体と Alphascreen 検出用ビーズを加えることで、N 末端にプロテイン A がコートされたアクセプタービーズが、C 末端にストレプトアビジンコートされたドナービーズが結合した、ビーズが近接した複合体を形成する (図 3A 下)。この複合体へ 680 nm の励起光を照射することで、ドナービーズ周囲の酸素分子が一重項酸素に変換され 200 nm の範囲で溶液中を拡散し、アクセプタービーズを発光させシグナルが検出される。プロテアーゼが基質を切断すると、ビーズ同士が近接

できないため (図 3A 上)、シグナルは低下する。本手法は、1) 薬剤耐性患者血清中 HIV-1 プロテアーゼ遺伝子を鋳型として、PCR 法によって転写用鋳型の準備ができるため、発現ベクターへの組み替えを必要としない、2) 384 種類のタンパク質を一晩で全自動生産できる、3) 未精製のプロテアーゼをアッセイに使用できる、4) 384 検体の検出がわずか数分で完了する、という安全面とスループット性において非常に優れた特性を持ち、また創薬スクリーニングにも応用可能である。これまでに、約 10 種類の分子クローンを用いて解析を行ったが、我々のアプローチは従来のジェノタイプ法による解析結果と 80-90% の相関を示していた (正岡ら、未発表データ)。

臨床分離株のウイルスゲノム内にはプロテアーゼ領域のみならず、基質となる Gag タンパク質の切断部位周辺に変異が挿入される例がしばしば見られることから、本手法を応用し、変異 HIV の同一ウイルスゲノム内でプロテアーゼと基質をハイスループットに調製し、薬剤耐性を評価できる検査法の構築に現在取り組んでいる (図 3B)。

本手法は遺伝子検査法と感受性検査法を結ぶ全く新しいタンパク質レベルの薬剤耐性検査法として位置づけられ、本検査法が確立されれば、短期間で安価かつ適切な薬剤耐性情報を提供できることが期待される。

- 4) エイズウイルスの異種間感染メカニズム
 東京大学医科学研究所感染症国際研究センター
 感染制御部門微生物学分野 武内寛明

以前から、HIV はチンパンジーを除くヒト以外の生物種において感染増殖することが出来ないことが知られており、そのため、HIV の宿主域は限定されていると理解されている。その宿主域の決定にはいろいろな宿主因子が関与していると考えられているが、近年の分子生物学的手法の発展により HIV 感染と宿主細胞との相互作用の解析が進んだ結果、様々な宿主因子が報告されてきた。その中で非常に興味深いのは、宿主細胞には、ウイルス増殖に必要な増殖必須因子だけでなく、ウイルス増殖を阻止する、すなわち増殖抑制因子をも備えていることが明らかとなってきたことである。本シンポジウムでは、これまでの我々の研究により明らかとなったヒト APOBEC3G およびヒト Cyclophilin A (CypA) の抗 SIV 作用だけでなく、Cyclophilin family の酵素活性阻害剤である Cyclosporine A (CsA) の SIV 感染増殖に対する宿主特異的効果について報告した。

まず、ヒト APOBEC3G に関しては、HIV Vif 蛋白がこの分子の抗ウイルス活性を抑制することで、粒子感染性を保持することは既に知られているが、このメカニズムは宿主に依存する、すなわち宿主特異的なものであると考えら

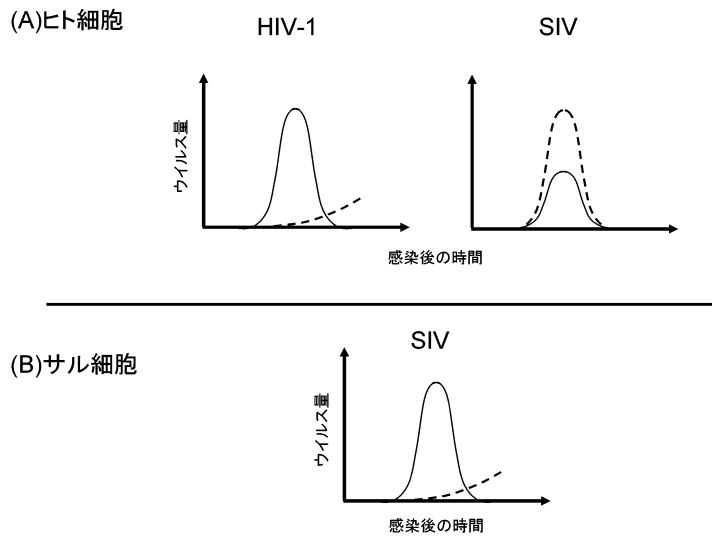


図 4 CsA の HIV および SIV への作用

- (A) ヒト細胞において、CsA は HIV に対して増殖抑制効果を示す一方、SIV に対しては、その増殖効率を上昇させる。
 (B) サル細胞において、CsA は SIV に対して増殖抑制効果を示す。
 実線は CsA 非存在下を、点線は CsA 存在下における各ウイルス増殖曲線を示している。

れていた。しかしながら、ヒト細胞における SIV 感染増殖においても SIV Vif 蛋白が必須であり、その機能はヒト APOBEC3G の抗ウイルス作用を抑制する事により発揮されていることを明らかにした。

次に、ヒト CypA は、HIV 感染に必要なヒト宿主因子であるが、Vif 欠損型 SIV の粒子感染性および増殖能の低下に対し、SIV Vif 蛋白がヒト CypA の SIV 複製抑制効果を低下させることで、野生型 SIV のヒト細胞への感染増殖能を維持していることを明らかにした。このことは、SIV がヒトへ感染伝播する際には、CypA がその増殖抑制因子として機能していることを示している。さらに、この効果は HIV に対しては認められなかったことから、SIV がヒトへ感染する際にのみ発揮される宿主特異的な増殖抑制メカニズムであることを示唆している。

そこで、CypA の更なる機能解析を行うために、Cyclophilin family の酵素活性阻害剤である CsA を用いて、サルおよびヒトへの野生型 SIV 感染増殖に対する影響を解析した結果、サル細胞では、CsA 存在下において増殖抑制側に作用し、ヒト細胞ではその粒子感染性および増殖効率をさらに上昇させることから、サル CypA は SIV 増殖に必須であり、ヒト CypA は野生型 SIV の増殖抑制因子として更に機能していることが示唆された (図 4)。近年、宿主標的細胞側に存在する CypA がウイルス粒子感染性に大きく影

響していることが報告されたことから、SIV 感染における CsA の効果が、ウイルス産生細胞側およびウイルス標的細胞側のどちらに規定されているかを検討したところ、サル細胞とヒト細胞における CsA の効果の違いは、SIV 感染標的細胞側に規定されていることが明らかとなった。ところが、CypA 遺伝子をノックダウンしたヒト細胞を用いて SIV 感染実験を行ったところ、粒子感染性が上昇する結果が得られたが、CsA 処理によって更に上昇することが認められた。更には、ヒト CypA とサル CypA のアミノ酸配列差異が認められなかったことから、CypA は、単独で SIV 感染に対する抑制機能を発揮しているのではなく、CsA の影響を受ける他の宿主因子との相互作用によって発揮されていると考えられる。また、HIV を骨格としたキメラウイルスを用いた感染実験により、CypA と相互作用する Capsid 領域 (CypA binding loop) を SIV 由来の配列に置き換えただけでは、野生型 SIV のヒトへの感染に対する CsA の効果が認められなかったことから、CsA の影響を受ける CypA 以外のヒト細胞内因子の存在が示唆されており、この因子 (群) が、種間感染の差異を規定するものである可能性があると考えられる。これらの研究成果は、エイズのみならず、新興および再興感染症、更には人畜共通感染症に対するヒト宿主防御機構に対する理解を深めるものと考えられる。