

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590116

研究課題名（和文） HIV-Tat 宿主 cofactor P-TEFb を標的とするエイズ治療薬開発研究

研究課題名（英文） Development of AIDS therapeutics targeting the HIV-Tat host cofactor P-TEFb

研究代表者

深澤 秀輔 (FUKAZAWA HIDESUKE)

国立感染症研究所・生物活性物質部・室長

研究者番号：10218878

研究成果の概要：HIV-1 Tat 及び Tat の宿主 cofactor P-TEFb を標的とした薬剤の研究を行った。Cyclin K は Tat-responsive motif を欠くため、Tat/P-TEFb/TAR 複合体形成を阻害する可能性がある。Cyclin K を HIV-1 と 293T 細胞に発現させると Cyclin K の発現量に応じて HIV-1 産生は低下し、Cyclin K はレンチウイルス複製の負の調節因子であることがわかった。また MT-4 細胞を HIV-1 耐性にする cDNA を探索し、BRD4 C 末端領域 (BRD4-CTD) を得た。BRD4-CTD は Tat 依存性の LTR からの転写を選択的に抑制した。以上は HIV-1 複製が Cyclin T1 を含む P-TEFb に強く依存すること、また Cyclin T1 の BRD4 結合領域が抗 HIV 薬の新規標的となることを示す。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	0	2,600,000
2008 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：HIV-1、P-TEFb、Tat、Cyclin T、CDK9、Cyclin K、BRD4

## 1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染者の予後は多剤併用療法 (HAART, highly active antiretroviral therapy) により、大きく改善した。しかし、

HAART には HIV-1 の逆転写酵素、プロテアーゼ、あるいは侵入を阻害する薬剤が使用されているが、いずれも耐性出現が避けられず、重大な問題となっている。既存薬剤とは標的

が異なる新規治療薬を迅速に開発することは、現在の HAART に対する耐性出現を抑制し、その耐用年数を延長するために極めて重要である。HIV Tat による HIV LTR から転写活性化は、ウイルスの生活環に不可欠であり、その阻害剤には抗ウイルス作用があると予想される。ウイルスの転写過程は HAART の標的になっておらず、また宿主側の機能を標的とすることから、新しい、耐性出現の少ない治療薬開発につながることを期待できる。

## 2. 研究の目的

HAART に対する耐性出現を抑制し、その耐用年数を延長するために、新しい機序を持つ治療薬の開発は急務である。HIV Tat による HIV LTR から転写活性化は、ウイルスの生活環に不可欠であり、その阻害剤は抗ウイルス作用が期待できる。そこで HIV-1 Tat 及び Tat の宿主 cofactor である P-TEFb (positive transcription elongation factor b) を標的とした薬剤の開発研究を行うことを目的に研究を行う。P-TEFb は CDK9 (cyclin dependent kinase 9) と cyclin T1、cyclin T2、もしくは cyclin K との複合体である。HIV-1 感染細胞において Tat は Cyclin T1 と直接結合し、P-TEFb を HIV-1 の transactivation-responsive element (TAR) に誘導する。形成された Tat/P-TEFb/TAR 複合体が RNA pol II の carboxy-terminal domain (CTD) をリン酸化することにより HIV-1 RNA の転写伸長の効率が上がる。HIV-1 RNA が効率よく伸長するためには、Tat/P-TEFb/TAR 複合体による RNA pol II CTD のリン酸化が不可欠であるため、この一連の過程は新規 HIV-1 治療薬の有効な標的となると考えられている。P-TEFb は宿主の転写伸長過程にも重要であるが、P-TEFb の減少に対しては HIV-1 プロモーターの方が宿主のプロモーターよりも感受性が高いことが示されており、P-TEFb の阻害は HIV-1 複製を抑制すると考えられる。そこで新規 HIV-1 治療薬を目指し、Cyclin T1 と Tat の結合の阻害を指標に薬剤開発研究を行う。ウイルスの転写過程は HAART の標的になっておらず、また宿主側の機能を標的とすることから、新しい、耐性出現の少ない治療薬開発につながることを期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) Cyclin K は Tat-responsive motif を欠

くため、Tat/P-TEFb/TAR 複合体形成を阻害する可能性がある。そこで Cyclin K の N 末に FLAG もしくは、GFP タグを付加した発現ベクターを構築し、HIV-1 proviral DNA と HEK293T 細胞に一過性に発現させ、HIV-1 の産生に対して及ぼす影響を、p24 の enzyme-linked immunosorbent assay、Western blotting、real-time PCR により調べた。さらにより生理的な条件で Cyclin K が HIV-1 複製に及ぼす影響を解析するため、Cyclin K を恒常的に高発現する T 細胞株を MOLT-4、MT-4、M8166 に FLAG-Cyclin K-IRES-GFP を導入することにより樹立した。

(2) また、細胞増殖を損なうことなく MT-4 細胞を HIV-1 耐性にするヒト cDNA をスクリーニングした。ヒト末梢血リンパ球の cDNA ライブラリーを、GFP カセットを持つレンチウイルスベクターに組み込み、MT-4 細胞に安定導入した。GFP 陽性細胞を集め、複製可能な HIV-1 を感染させた。生存した細胞をクローニング、増殖させ、導入された cDNA を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 作製した Cyclin K 発現プラスミドを用いて、Cyclin K と転写調節因子である HEXIM1 と HIV-1 tat の結合を解析した。その結果 Cyclin K は HEXIM1 と HIV-1 tat とともに結合せず、P-TEFb 複合体を形成する他の Cyclin とは異なる性質を持つことが示された。次に Cyclin K が転写レベルで HIV-1 産生を抑制するかどうかを調べるため、FLAG-Cyclin K 発現プラスミドの量を変えて、HIV-1 proviral DNA と共に 293T 細胞に導入し、一過性に発現させた。p24 の enzyme-linked immunosorbent assay、Western blotting、ウイルス mRNA の real-time PCR、いずれの方法を用いた解析においても Cyclin K の発現量に応じて HIV-1 産生は低下した。コントロールとして用いた Bip 蛋白量、cyclophilin mRNA 量には変化はなかった。また Simian immunodeficiency virus (SIV) の産生も低下した。これらの結果は、Cyclin K が Tat に依存した LTR からの転写を選択的に抑え、HIV-1 産生を阻害することを強く示唆する。

さらに Cyclin K を恒常的に高発現する T 細胞を 3 株 (MOLT-4、MT-4、M8166 由来) 樹立して、Cyclin K が HIV-1 複製に及ぼす影響を調べた。Cyclin K 高発現 T 細胞株は

Cyclin T1、CDK9、HEXIM1、Bip など他の細胞内蛋白質や、HIV-1 の細胞表面レセプター (CD4、CXCR4) のレベルはコントロール細胞と同等であった。また細胞増殖速度も変わらなかった。しかしこれらの細胞株における HIV-1 および SIV-1 複製はいずれも著しく低下した。この結果は Cyclin K がレンチウイルス複製の負の調節因子として機能することを直接示すものである。

以上の結果から、Cyclin K は Cyclin T1 と競合して CDK9 に結合するため、Tat と反応する Cyclin T1 を含む P-TEFb 複合体の量を減少させ、霊長類レンチウイルスの複製を制限することが示された。

(2) 細胞増殖を損なうことなく MT-4 細胞を HIV-1 耐性にするヒト cDNA をスクリーニングを行い、65 の独立クローン (43 遺伝子) を得た。他の遺伝子と同時に導入された可能性が高いものを除くと 26 の遺伝子が内在性の HIV-1 調節遺伝子の候補として残り、そのうちの 7 遺伝子について、機能解析を行った。その結果 4 遺伝子 (BRD4 の C 末端領域; BRD4-CTD、C9orf86、NSM CE1、C1orf142) が HIV-1 の調節機能の表現形質を示した。その中の BRD4-CTD についてさらに調べた。

BRD4 はアセチル化リジンと結合する bromodomain を 2 個有する BET family に属する核蛋白質で、活性型 P-TEFb の構成成分である。また papilloma virus E2 や HHV-8 LANA 等のウイルス蛋白質と結合することが知られている。最近 BRD4 の aa 1209 ~ 1264 断片が Cyclin T1 と結合し、Tat に依存した LTR からの転写を阻害することが報告されている。得られた BRD4-CTD は 2 種類でアミノ酸 (aa) 1260 ~ 1362 と 1209 ~ 1362 である。BRD4-CTD (aa1209-1362) を Tat 及びレポーター遺伝子と共に 293T 細胞に一過性に導入したところ、Tat 依存性の LTR プロモーターからのレポーター遺伝子の発現は BRD4-CTD により減少したが、CMV プロモーターからの転写は影響されなかった。転写レベルで HIV-1 産生を抑制するかどうかを調べるため、BRD4-CTD と HIV-1 proviral DNA を共に 293T 細胞に導入した。BRD4-CTD 発現ベクターの量を増やすと、それに応じてウイルス産生が減少し、また細胞中のウイルス蛋白質と mRNA も同様に減少した。以上の結果は BRD4-CTD がウイルスの転写を阻害することによって HIV-1 産生を低下させていることを示す。さらに確認するため、ウイルスベクターを用いて

GFP-BRD4-CTD を MT-4 細胞と Jurkat 細胞に導入した。Cyclin T1、CDK9、HEXIM1、Bip など他の細胞内蛋白質や、HIV-1 の細胞表面レセプター (CD4、CXCR4) のレベル、細胞の形態、増殖速度は GFP-BRD4-CTD の導入により変化しなかったが、HIV-1 複製の効率は両方の細胞で低下し、BRD4-CTD が HIV-1 耐性の形質を付与することが再確認された。ウイルスゲノムのインテグレーションの効率を Alu-LTR PCR で調べると、BRD4-CTD 導入細胞とコントロール細胞の間に差はなく、HIV-1 生活環の初期過程は BRD4-CTD によって阻害されないことが示された。

BRD4-CTD と Tat は共に Cyclin T1 と結合するが、その結合は互いに排他的であり、片方が結合すると、もう一方は結合できない。BRD4-CTD と Tat の結合領域は重なっていないので、BRD4-CTD は Tat-Cyclin T1 相互作用をアロステリック阻害していると考えられる。以上からレンチウイルス複製は Cyclin T1 を含む P-TEFb に強く依存すること、Cyclin T1 の BRD4 結合領域が抗 HIV 薬の新規標的となりうる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Urano, E., Kariya, Y., Futahashi, Y., Ichikawa, R., Hamatake, M., Fukazawa, H., Morikawa, Y., Yoshida, T., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., and Komano, J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells., **FEBS Letters** 582:4053-4058, 2008. 査読有
- ② Urano, E., Shimizu, S., Futahashi, Y., Hamatake, M., Morikawa, Y., Takahashi, N., Fukazawa, H., Yamamoto, N., and Komano, J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription., **AIDS** 22:1081-1083, 2008. 査読有

- ③ Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y., Takahashi, N., Yamagoe, S., and Uehara, Y. Gamma-herpesviruses and cellular signaling in AIDS-associated malignancies., **Cancer Science** 98:1288-1296, 2007. 査読 有

6. 研究組織

(1)研究代表者

深澤 秀輔 (FUKAZAWA HIDESUKE)  
国立感染症研究所・生物活性物質部・室長  
研究者番号：10218878