

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390142

研究課題名（和文） ヒト免疫不全ウイルスの転写調節機構を標的とする
新規治療法に関する研究研究課題名（英文） Development of novel therapy against the transcriptional regulatory
mechanism of human immunodeficiency virus (HIV).

研究代表者

岡本 尚 (OKAMOTO TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40146600

研究成果の概要（和文）：

本研究計画では、分子レベルで HIV の転写制御機構を明らかにし、新たな治療戦略を探った。当該研究の中で、HIV 特異的転写活性化因子 Tat が HIV 転写を特異的に活性化する分子機構を探求し、Tat と宿主因子 Cyclin T1 (CycT1) の結合様式の詳細を明らかにした。我々は、近年解明され公開された Tat、CycT1 および P-TEFb の触媒サブユニットである Cdk9、との蛋白分子複合体の3次元立体構造の情報を用いて Tat と CycT1 の分子間相互作用をそれぞれの分子上のアミノ酸残基およびその側鎖の原子レベルまで解明した。これらの成果は Tat 阻害剤を開発するための重要な科学的基盤を提供した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have been exploring the step of viral transcription that is the rate-determining step of viral replication in order to provide vital information for the development of novel anti-HIV strategy. We have clarified the interaction between Tat and CycT1 at the AA side chain level by creating a number of CycT1 mutants in which critical AA residues were substituted by Ala based recently published 3D structure of Tat-CycT1 molecular complex. These findings have provided scientific basis for the development of Tat inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HIV-1, NF- κ B, Tat, Cyclin T1

1. 研究開始当初の背景

HIV 治療は、ART などの抗 HIV 化学療法など著名に進歩したが、近耐性ウイルスの高頻度の出現や重篤な副作用、本療法は潜伏感染に対して無力であるなど、その限界が一層明らかになりつつある。

そこで、新たな作用機序をもつ HIV 阻害剤が求められている。その候補として、HIV プロウイルスの転写活性化過程があげられる。HIV ウイルス遺伝情報量は『転写』の過程で種々の転写因子によって正と負に制御されているが、この過程はウイルスゲノム情報量の最大の増幅過程であるとともに潜伏感染の律速段階でもあり、耐性ウイルス出現の温床ともなっている。そこで、本研究課題では HIV の転写活性化過程に注目し、新しい抗 HIV 戦略の構築を目指した。具体的な進め方としては、最近著しく蓄積されてきた構造生物学的な情報を元に、分子生物学の手法と計算化学の手法を組み合わせた。タンパク質立体構造から創薬に至る戦略は電算機を用いた手法が開発され、近年になってその具体的な方法論が確立されつつあるが、本法が転写をターゲットとした過程に応用された例はこれまでになかった。

2. 研究の目的

HIV プロウイルスからの転写過程は、HIV 由来の転写活性化因子 Tat と細胞内の転写伸長因子 P-TEFb (Cyclin T1 と CDK9 の複合体) によって担われている。この活性制御は Tat と直接結合する Cyclin T1 (CycT1) が担う。両者の結合様式については CycT1 の中央部に存在する領域と N 末の領域が重要であることが実験より示唆されるが、詳細はまだ明らかではない。そこで、本研究では近年明らかにされた P-TEFb/Tat 立体構造をもとに Tat-CycT1 の詳細な結合様式について解析を進め、Tat の転写活性調節機構についてさらに追求した。これらの情報は、Tat を

標的とした HIV 阻害薬の開発に有用な情報をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

P-TEFb/Tat 立体構造をもとに Tat 転写活性制御に関与するアミノ酸を推定し、その妥当性を以下に示す 2 種類のルシフェラーゼアッセイで実験的に検証した。

アッセイ①: Tat と CycT1 を別々に細胞内に導入する方法。2 者が別々に発現するため転写活性化に至るには、まず Tat と CycT1 が結合する必要がある。

アッセイ②: Tat と CycT1 が融合したキメラ蛋白を発現させる方法。融合しているため、両者が結合している状態をミミックしている。主に Tat と CycT1 が結合した後の活性について検討することができる。

4. 研究成果

以下の 4 点に分けて列記する。

(1) Tat/P-TEFb 立体構造における CycT1Q50 残基の周辺構造の解析

Tat の転写活性化には CycT1 の 50 番目の Gln 残基 (CycT1 Q50) と 176 番目の Phe 残基 (CycT1 F176) が重要である。その周辺構造を近年明らかにされた Tat/P-TEFb 立体構造をもとに解析した。その結果、CycT1 Q50 は、Q46、Q56 と分子内水素結合を、TatQ17 と TatC34 と分子間水素結合を形成していることが明らかになった。また、CycT1 F176 は、TatF36 と Ch- π 水素結合を形成していること示唆された。

(2) Gln (Q) 水素結合ネットワークが Tat 活性に与える影響

CycT1 Q56 が Tat 活性制御に関与しているかどうか、ルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結果、CycT1 Q56 も Q46、Q50 と同様に Tat の転写活性制御に関与していることが明らかになった。それぞれの Q 残基の Tat 活性に与える

影響は、CycT1 Q56 の関与は部分的であるものの、他のアミノ酸残基の変異を加えることにより、完全に活性を欠損した。さらに、Tat と CycT1 を融合したキメラ蛋白を用いたところ、Q46、Q56 変異においてはほぼ WT と同等の活性を示すが、Q50A 変異体は活性を部分的に欠損することが明らかになった。さらに変異を加えると、Q46/50A ダブル変異体では活性がほぼなくなるのに対し、Q46/56A ダブル変異体では活性は WT と同等であった。このことは、Q46 と Q56 は CycT1 と Tat 初期結合のみに関与し、Q50 は Tat の転写活性調節など Tat との結合以降の過程にも関与していることを示唆している。

また、CycT1 Q50 と水素結合を形成すると考えられる Tat C34 について変異体を作成し検討した。その結果、C34 変異により Tat の転写活性化能は失われ、C34 残基は Tat の転写活性に重要であることが明らかになった。キメラ蛋白においても変異により活性が劇的に抑制され、このアミノ酸残基は Tat と CycT1 の相互作用のみならず、転写活性調節に関与することが示唆された。

(3) CycT1 F176-TatF36 間の Ch- π 結合

CycT1 F176 と TatF36 の間で Ch- π 結合を形成している。Tat F38 に変異を導入することにより Tat の転写活性化が失われることから、この結合は重要であると考えられる。Tat-CycT1 キメラ蛋白においては、活性が特に Tat F48A において阻害されており、Ch- π 結合は CycT1-Tat が相互作用した後の過程にも関与していると考えられる。

(4) CycT1 の立体構造からみた Tat 相互作用ネットワーク

Q 水素結合ネットワークと Ch- π 結合がどのように形成されるか、現在まで知られている3種の CycT1 の構造(CycT1 単独構造 (2pk2)、CycT1/CDK9 複合体構造(3BLH)、CycT1/CDK9/Tat 複合体構造(3MI9))をもとに検討した。まず、Q

水素結合ネットワークは、2pk2 においては形成されていないが、3BLH、3MI9 において形成されていることから CDK9 の結合によってこのネットワーク形成が誘導されると示唆される。Ch- π 結合については、Phe 残基のフェニル基の方向性が3者で異なることから、Tat F38 残基が近傍に位置することにより誘導されると考えられた。

以上述べたように、我々は本研究計画を通して、CycT1 が Tat と相互作用に重要な新規相互作用ネットワークを立体構造解析から同定した。CycT1 の Q46、Q50、Q56 から構成される Gln 水素結合ネットワークは Tat との相互作用に、CycT1-Tat で形成される Ch- π 結合は Tat-CycT1 の相互作用以後の過程に関与し Tat の転写活性能の調節を行っていることを示唆された。

Tat は、それ自体では特定の構造を持たない天然変性蛋白(naturally disordered protein)である。したがって、Tat と CycT1 の結合は、まず水素結合ネットワークにより構造が安定している CycT1 Q50 周辺構造が認識し、次いで Ch- π 結合が両者の結合の特異性を決定していると考えられる。2つの相互作用により Tat/P-TEFb 構造は安定化し、HIV 遺伝子の転写を最大限に活性化できる構造を取ると考えられる。現在、これらの情報を活かし、in silico スクリーニング等を経て特異的な Tat 活性阻害効果を持つ薬剤の開発を進めている。

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) Victoriano AF and Okamoto T. Transcriptional control of HIV replication by multiple modulators and

their implication for a novel anti-viral therapy. AIDS Res Hum Retroviruses. 28:125-38. 2011. 査読有

- 2) Okamoto T. Positive and negative regulation of transcription from HIV provirus. Uirusu. 61:81-89. Japanese. 2011. 査読有
- 3) Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Victoriano AF, Kurimoto E, Kato K, Okamoto T. Functional characterization of human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation. J Mol Biol. 410:887-895. 2011. 査読有
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283611004943>

[学会発表] (計2件)

- 1) Okamoto T, Victoriano AF, Asamitsu K, Imai K.: Epigenetic Control of the HIV Latent Infection. 6th German-Japanese HIV-Symposium. 2011/11/20-22 Bochum(German)
- 2) Asamitsu K, and Okamoto T.: Involvement of the N-terminal region of human Cyclin T1 for the trans-activation of Human Immunodeficiency Virus-1 transcription by Tat. Transcription Elongation in Health and Disease. 2011/9/11-16 Lucca(Italy)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: HIV 複製阻害剤

発明者: 岡本 尚、朝光 かおり、宮田 直樹、鈴木 孝禎

権利者: 岡本 尚、朝光 かおり、宮田 直樹、鈴木 孝禎

種類: 特許

番号: 特許公開 2012-36124

出願年月日: 2012年2月23日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 尚 (OKAMOTO TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 40146600

(2) 研究分担者

朝光 かおり (ASAMITSU KAORI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 20381783

(3) 連携研究者

該当者なし