

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670467

研究課題名(和文) HIVインテグラーゼの多量体化と細胞側因子相互作用の阻害剤の創成と構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of HIV integrase multimerization and development of inhibitors of integrase interactions with cellular cofactors

研究代表者

満屋 裕明(Mitsuya, Hiroaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部科・教授

研究者番号：20136724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：BiFC-IN assayシステムを用いて細胞内におけるINの多量体化メカニズムの解析と薬剤によるINの多量体促進能を評価した。またある薬剤がINの多量体化を促進することを同システムで解析し、その濃度と実際の抗HIV効果を発揮する濃度がほぼ同じになる事実が確認された。これらの薬剤は多量体を制御することにより抗ウイルス効果を発揮している可能性が示唆された。このような作用を有する新規の薬剤の開発を継続し、そのような薬剤の開発は、薬剤耐性ウイルスを標的とした今後のHIVの治療戦略に光明を与えることになるだろう。

研究成果の概要(英文)：In the present study period, we analyzed the dynamics of IN multimerization and attempted to elucidate the mechanism of the inhibition of the multimerization by drugs using a newly generated quantitative bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay system. We found that such drugs cause over-multimerization of IN subunits and that EC50 of IN multimerization of the drugs was quite similar to that of their anti-HIV-1 EC50. Continuation of the drug discovery efforts on agents with such unique activity should not only shed lights to the understanding of IN's multimerization mechanism and but also help develop novel HIV treatment strategies for combating multi-drug resistant HIV-1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：HIVインテグラーゼ(IN) IN多量体阻害 BiFC法 新規薬剤の開発

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の酵素蛋白であるインテグラーゼ (IN) は HIV 増殖に必須であり、その機能を発揮する為に多量体 (tetramer) を形成している。感染細胞内では、HIV 遺伝子産物の単分子 (monomer) として産生されるが、その後、細胞因子やウイルス DNA と相互作用することによって、2 量体化 (dimerization) 及び 4 量体化 (tetramerization) が起こり多量体が形成される。そのような IN の多量体化のダイナミクスは試験管内の実験や結晶構造解析を用いて少しずつ明らかにされつつあるが、未だその全容は明らかにされていない。しかも、多量体化の過程において、種々の宿主因子と相互作用が必要とされることが次第に明らかにされ、その事実が IN の多量体化に関する構造的または機能的な理解を一層困難にしている。しかし、そのような複雑な IN の多量体形成に変容を起こす薬剤は、IN の機能を失活させ、抗 HIV 効果を発揮するユニークな薬剤となる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、新規の抗 HIV 薬開発へ向けて IN の細胞内多量体化機序の定量的な解析を行う事を第一の目的とし、さらに多量体形成を調整 (阻止又は促進) する新しい機序を有する化合物の探索・デザイン・合成・同定へと進めることである。その過程で細胞内 IN が相互作用する宿主因子との関係を解析・評価することによって、その相互作用をも阻害する新しい化合物の探索・デザイン・合成・同定も同時に進める。

### 3. 研究の方法

本研究では、すでに樹立に成功している BiFC-IN 法を用いて、IN の多量体化を制御する薬剤として報告された Compound 6, 7, CX14442 の IN 多量体調整 (促進) 能を評価した。同時に、*in silico* (docking・simulation) を用いて、既存の薬剤の中に IN の疎水性ポケットに結合し、IN の多量体化阻止能を有する可能性のある薬剤を選定した。その選定された薬剤の抗 HIV-1 活性を MTT assay や P24 assay を用いて評価した。それらの薬剤中から抗 HIV 効果を認める薬剤をリード化合物として選定し、新規化合物の設計及び合成を進めた。さらに、そのような化合物の抗 HIV-1 活性を再度 MTT assay や P24 assay で評価し、抗 HIV 効果の高い化合物へと合成展開した。

このような過程を IN と相互作用する宿主因子 (LEDGF/p75, INI, Nup62 など) との相互作用を阻害するような新規の薬剤についても応用し、ユニークな阻害剤の開発へとつなぐ事を目的とする。

最終的には、IN の多量体化を調整し、細胞

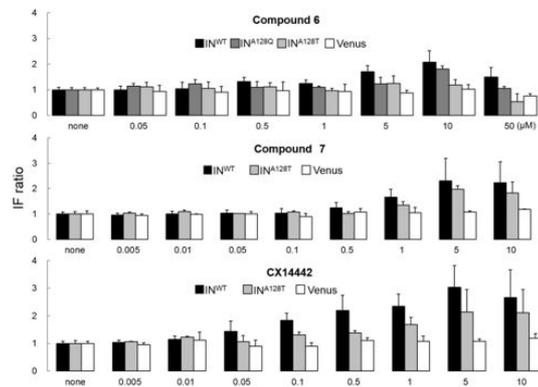
因子との相互作用を阻害する機能を併せ持つ、1 剤で様々な抗ウイルス効果を有するより強力な新規の抗ウイルス薬の開発を推進して行く。

### 4. 研究成果

IN の多量体化阻害薬の評価及び薬剤の検索

まず、IN の細胞内ダイナミクス及び多量体形成を評価する BiFC (bi-molecular fluorescent complementation) -IN assay system で、IN の多量体化を制御する薬剤と報告された Compound 6, 7, CX14442 を評価した。

それぞれの薬剤が濃度依存的に IN の多量体促進効果を有し、耐性誘導実験で得られた薬剤耐性変異を付加された IN を使用した system では、その効果が減弱した。Venus 単独を発現させることによって、それらの薬剤による細胞毒性や蛍光に悪影響を認めない結果が得られた (図 1)。



(図1) それぞれの薬剤濃度と使用された IN (黒: 野生株、黒灰色: A128Q、灰色: A128T) 及び、白色: Venus単独、の IF ratioの関係

これらの定量化されたデータから得られた  $EC_{50}$  が MT2 細胞および HIV<sub>LAI</sub> 株を用いた MTT assay から得られた  $EC_{50}$  とほぼ同等の値を示しており、多量体化形成の阻害 (促進) が抗 HIV 効果を発揮している事実が示唆された (図 2)。

BIFC-IN assayから得られた INの多量体化促進効果(野生株及びA128T)

drug	IN multimerization $EC_{50}$ ( $\mu$ M)		fold resistance
	WT	A128T	
Compound 6	2.01 $\pm$ 0.39	> 10	> 4.96
Compound 7	0.79 $\pm$ 0.36	2.11 $\pm$ 0.36	2.68 (1.22-4.90)
CX14442	0.15 $\pm$ 0.10	1.63 $\pm$ 0.08	10.94 (4.69-19.62)

MTT assayから得られた 薬剤の抗ウイルス効果及び細胞毒性

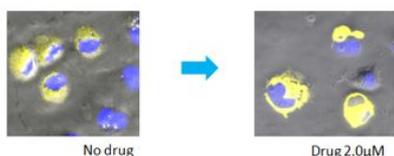
drug	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)		$CC_{50}$ ( $\mu$ M)	
	MT2	HEK	HEK	MT4
Compound 6	2.29 $\pm$ 1.19	34.26 $\pm$ 4.19	>100	42.23 $\pm$ 9.44
Compound 7	0.77 $\pm$ 0.13	>100	>100	66.59 $\pm$ 1.70
CX 14442	0.029 $\pm$ 0.0026	>100	>100	45.67 $\pm$ 6.17

(図2) 薬剤の抗ウイルス効果 ( $EC_{50}$ ) 及び IN 多量体化効果 ( $EC_{50}$ )

現在、このような薬剤をリード化合物として合成展開を推進している。さらに、*in silico* (docking・simulation) を用いて、既存の薬剤

の中に IN の多量体形成に重要と思われる疎水性ポケットに結合し、IN の多量体化阻止または促進を有する可能性のある薬剤を選定した。その選定された薬剤の抗 HIV-1 活性を MTT assay や P24 assay を用いて評価し、その後、BiFC-IN assay にて IN の多量体調整能を評価している、現在もさらに効果の高い薬剤の選定を継続中である。

IN は細胞側因子である LEDGF/p75、Nup62 等と相互作用することが知られており、その IN との相互作用阻害やそれらのノックダウン細胞における HIV の複製は、十分に阻害されることが知られている。我々は、BiFC-IN-IBD (LEDGF/p75) assay や BiFC-IN-Nup62 assay を作成し、実際に IN との相互作用を確認し、それらの蛋白と IN の細胞内での局在を明らかにし、ある薬剤が IN の局在や蛍光輝度を変化させる (IN と LEDGF/p75 の相互作用を阻害し、IN の局在を変化させる) 現象も確認した (図 3)。



(図3) 左図は薬剤なし、右図は薬剤存在下でのINの局在、薬剤によるINの局在の変化を示している。

現在もこのような薬剤の抗 HIV-1 活性を MTT assay や P24 assay を用いて評価し、リード化合物としてさらに抗ウイルス効果が高い化合物の合成展開し、同時に再度 IN の多量体調整能も評価している。現在もこのような方法でさらに抗ウイルス効果、IN と細胞因子阻害及び IN 多量体調整効果の高い薬剤の選定を継続中である。

#### 総括

本研究で得られたデータは、ウイルス蛋白の多量体化機構や宿主因子との相互作用機序、新規阻害薬の開発に付与する事が期待できる。今後も継続して研究することによって、新規抗 HIV 剤のデザインや酵素学的・ウイルス学的解析が強化され、国内外の研究者との人的交流により新世代の抗 HIV 剤の開発が強力に推進されると思われる。

#### 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0件)

[学会発表](計5件)

中村朋文、満屋裕明 「HIV-1 インテグラーゼ多量体形成を制御する薬剤の BiFC 法による評価」 第 15 回 白馬シンポジウム、2013 年 7 月 19 日～20 日、国立病院機構名古屋医療センター

② 中村朋文、満屋裕明 「Dynamics of IN multimerization and a potent modulation by allosteric HIV-1 integrase inhibitors in living cells using BiFC」 14<sup>th</sup> Kumamoto AIDS Seminar (H25.10.29-H25.10.31) Kumamoto Hotel Casstle, and Aso Resort Grandvrio

Amber R. Moore、満屋裕明 「Evaluation of HIV-1 reverse transcriptase(RT) heterodimerization within living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC).」 第27回日本エイズ学会学術集会、2013年11月20日～22日 熊本市民会館、熊本市

Joseph R. Campbell、満屋裕明 「Studying HIV-1 integrase LEDGF binding inhibitors using bimolecular fluorescence complementation.」 第27回日本エイズ学会学術集会、第27回日本エイズ学会学術集会、2013年11月20日～22日 熊本市民会館、熊本市

中村朋文、中田浩智、満屋裕明 「HIV-1 インテグラーゼ多量体形成を制御する薬剤の BiFC 法による評価。」 第 27 回日本エイズ学会学術集会、2013 年 11 月 20 日～22 日 熊本市民会館、熊本市

[図書](計0件)

[産業財産権]  
○出願状況(計0件)

○取得状況(計 件)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

満屋 裕明 (MITSUYA HIROAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20136724

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし