

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460566

研究課題名(和文) 特異的感染阻害ペプチドを用いたHIV-1の細胞侵入分子機構の解析

研究課題名(英文) Inhibition of HIV-1 by Gag peptides

研究代表者

村上 努 (Murakami, Tsutomu)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長

研究者番号：50336385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究課題において、HIV-1Gag蛋白質の構成成分であるマトリックス蛋白質(MA)とカプシド蛋白質(CA)の部分ペプチドライブラリーを作製し、これらを細胞内に導入することによってHIV-1の複製を阻害できるかを検討した。その結果、MAでは9番目の部分ペプチド、CAではCAのN末端領域とC末端領域のリンカー部分を含む15番目の部分ペプチド、C末端領域の二量体相互作用に重要な部分を含む19番目の部分ペプチドをはじめとする数カ所のCA部分ペプチドが抗HIV-1活性を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have constructed peptide libraries for matrix (MA) and capsid (CA) proteins of HIV-1 and investigated whether introduction of these peptides could inhibit HIV-1 replication in cell culture. We found that 9th fragment of the MA proteins, several fragments of the CA proteins including 15th fragment which contains the linker region of N- and C-terminal domains of CA and 19th fragment which contains the dimer interface of C-terminal domain of CA have modest anti-HIV-1 activities in vitro, suggesting that these peptides could be lead compounds for further modifications.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 ペプチド Gag蛋白質 抗HIV-1薬

1. 研究開始当初の背景

現行の cART 療法が HIV 感染者の予後を劇的に完全するようになったが、依然として薬剤の副作用や耐性ウイルスの出現の問題が残っている。したがって、これまでの抗 HIV-1 薬とは異なる作用機序の新規薬剤の開発が待たれている。

2. 研究の目的

これまでの抗 HIV-1 薬とは異なる作用機序の新規薬剤の探索方法として、我々はウイルスの粒子形成の必須因子である HIV-1Gag 蛋白質に着目した。HIV-1Gag 蛋白質の構成成分であるマトリックス蛋白質 (MA) とカプシド蛋白質 (CA) の部分ペプチドライブラリーを作製し、これらを細胞内に導入することによって HIV-1 の複製を阻害できるかを検討した。

3. 研究の方法

MA (または CA (図 1、2)) 部分ペプチド (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 (図 3)。

4. 研究成果

MA では 9 番目の部分ペプチド、CA では CA の N 末端領域と C 末端領域のリンカー部分を含む 15 番目の部分ペプチド、C 末端領域の二量体相互作用に重要な部分を含む 19 番目の部分ペプチドをはじめとする数カ所の CA 部分ペプチドが X4、R5 HIV-1 のいずれに対しても抗ウイルス活性を示すことが明らかになった (図 4-図 7)。以上の結果は、今回我々

が検討した HIV-1Gag 蛋白質部分ペプチドが新しい作用機序の抗 HIV-1 剤の候補になりうることを示している。

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 2 件)

1. Mizuguchi T, Ohashi N, Matsumoto D, Komoriya M, Hashimoto C, Nomura W, Yamamoto N, Murakami T, and Tamamura H: Development of anti-HIV peptides based on a viral capsid protein. Science DOI: 10.1002/bip.22920, 2016.

2. Mizuguchi T, Ohashi N, Nomura W, Komoriya M, Hashimoto C, Yamamoto N, Murakami T, and Tamamura H: Conjugation of cell-penetrating peptides leads to identification of anti-HIV peptides from matrix proteins. Bioorg. Med. Chem. 23(15): 4423-4427, 2015

[学会発表](計 1 件)

谷田部夏香、松本大地、橋本知恵、藤野真之、水口貴章、大橋南美、野村 涉、村上 努、玉村啓和。HIV-1 カプシドタンパク質由来ペプチドライブラリーの構築と阻害剤の創出。第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2015 年 11 月 29 日-12 月 1 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 努 (MURAKAMI TSUTOMU)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長

研究者番号：50336385

(2) 研究分担者

玉村啓和 (TAMAMURA HIROKAZU)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：80217182

図1. HIV-1CA 配列および部分ペプチドのデザイン

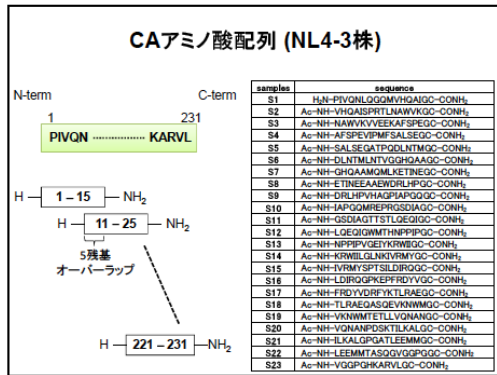


図2. HIV-1CA 部分ペプチドのデザインと細胞膜透過性付与のために修飾

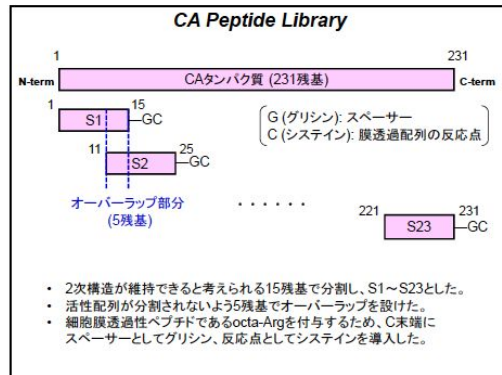


図3. 抗 HIV-1 活性および細胞毒性測定法

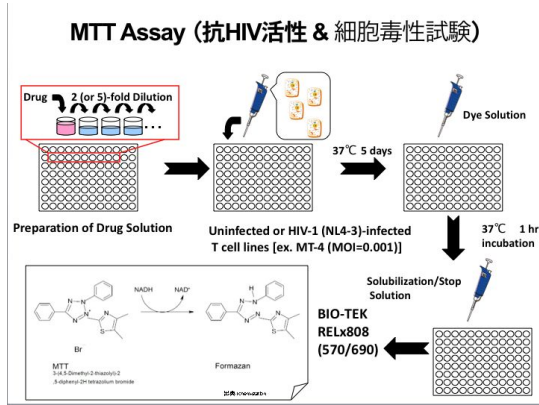


図4. HIV-1CA 部分ペプチド (コントロールペプチド) の抗 HIV-1 活性および細胞毒性

Anti-HIV-1 Active Evaluation of Control CA Peptides								
CA	MT-4	PM1/CCR5	MT-4	CA	MT-4	PM1/CCR5	MT-4	
	NL4-3	NL(AD8)	CC ₅₀ (μM)		NL4-3	NL(AD8)	CC ₅₀ (μM)	
1C	> 50	ND	> 50	14C	> 22	ND	> 50	22
2C	39% inh. ^{*)}	ND	> 50	15C	47	27	> 50	> 50
3C	32	> 50	> 50	16C	36	> 50	> 50	> 50
4C	> 50	ND	> 50	17C	> 50	ND	> 50	> 50
5C	> 50	ND	> 50	18C	> 50	ND	> 50	> 50
6C	35	> 50	> 50	19C	18	11% inh. ^{*)}	> 50	> 50
7C	> 50	ND	> 50	20C	> 50	ND	> 50	> 50
8C	23	> 50	> 50	21C	> 50	ND	> 50	> 50
9C	> 50	ND	> 50	22C	> 50	ND	> 50	> 50
10C	> 50	ND	> 50	23C	> 50	ND	> 50	> 50
11C	> 50	ND	> 50	AZT	0.066	5.3	> 50	> 50
12C	> 50	ND	> 50	AMD	0.033	> 50	> 50	> 50
13C	> 50	ND	> 50	SCH-D	> 5	0.0081	> 5	> 5

a) The concentration of CA peptide was 50 μM. ※ 活性評価を村上先生へ依頼

図5. HIV-1CA 部分ペプチド (膜透過型ペプチド) の抗 HIV-1 活性および細胞毒性

Anti-HIV-1 Active Evaluation of Cell Penetrating CA Peptides								
CA	MT-4	PM1/CCR5	MT-4	CA	MT-4	PM1/CCR5	MT-4	
	NL4-3	NL(AD8)	CC ₅₀ (μM)		NL4-3	NL(AD8)	CC ₅₀ (μM)	
1L	4.5	6.2	> 50	14L	> 6.3	ND	> 50	6.3
2L	6.8	> 50	> 50	15L	6.6	1.2	> 50	18
3L	40	> 50	> 50	16L	33	> 50	> 50	> 50
4L	35	> 50	> 50	17L	> 15	ND	> 50	15
5L	35	> 50	> 50	18L	> 50	ND	> 50	> 50
6L	8.1	13	> 50	19L	46% inh. ^{*)}	19% inh. ^{*)}	> 50	> 50
7L	39% inh. ^{*)}	> 50	> 50	20L	36	> 50	> 50	> 50
8L	14	14% inh. ^{*)}	> 50	21L	> 50	ND	> 50	> 50
9L	45	ND	> 50	22L	26% inh. ^{*)}	> 50	> 50	> 50
10L	33	> 50	> 50	23L	21% inh. ^{*)}	ND	> 50	> 50
11L	44	ND	> 50	AZT	0.069	5.3	> 50	> 50
12L	> 50	ND	> 50	AMD	0.032	> 50	> 50	> 50
13L	> 30	ND	30	SCH-D	> 5	0.0081	> 5	> 5

a) The concentration of CA peptide was 50 μM. ※ 活性評価を村上先生へ依頼

図 6。HIV-1CA 部分ペプチド 15L の最適化の試み

種々の15L誘導体と抗HIV活性					
Sequence ([GC(CH ₂ CO-R ₀)-NH ₂]) をC末に付加)		MT-4 cell		PM1 /CCR5 cell	
		NL4-3		NL(AD8)	
		EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)
CA-15L	Ac-IVRMYSP S ILDIRQ-	39%inh.(50 μ M)	>50	39	>50
15-1L	Ac- S P TSILDIRGGPK E -	30	>50	44	>50
15-2L	Ac- Y S P T SILDIRGGPK E -	30	>50	27	>50
15-3L	Ac- M Y S P T S ILDIRGGPK-	26	38	21	>50
15-4L	Ac- R M Y S P T SILDIRGG P -	>44	44	19	>50
15-5L	Ac- V R M Y S P T S ILDIRGG-	16	38	13	43
15-6L	Ac- S P T S ILDIRQ-	14	>25	39%inh.(25 μ M)	>25
15-7L	Ac- S P T S IL D -	31	>50	37%inh.(50 μ M)	>50
AMD3100		0.032	0.031	>50	>50
SCH-D (Viviviroc)		>5	>5	0.017	>5

図 7。HIV-1CA 部分ペプチド 19L の最適化の試み

