

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2023

課題番号：17K08638

研究課題名(和文) HIV転写制御メカニズムの解析と新規薬剤開発

研究課題名(英文) The analysis of HIV transcriptional regulation and development of new HIV drugs

研究代表者

朝光 かわり (Asamitsu, Kaori)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：20381783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症は、副作用や薬剤耐性ウイルス、潜伏感染ウイルスからの再活性化など、未だ克服すべき問題を抱えている。それらを解決する標的の一つが主に宿主転写因子NF- $\kappa$ Bとウイルス由来の転写活性化因子Tatにより制御されているHIV転写活性化過程である。本申請課題では、それらについて解析した。特に、TatによるHIV転写活性化に注目し、転写活性化時にTatとともに複合体を形成するP-TEFbの構成因子CDK9を標的とした新規HIV阻害剤候補を見出すことができた。今後、特異性の向上など、さらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tatによる転写活性化は、Tatが宿主の転写伸長因子P-TEFbと複合体を形成することで開始される。本研究課題では、Tat特異的に形成されるCDK9上のファーマコフォアCDK9 hidden cavityを用いたin silicoスクリーニングから、CDK9活性を阻害する化合物を同定した。本知見の学術的意義として、CDK9阻害剤の有用なファーマフォアを提供できたことがあげられる。また、HIV転写過程は特に潜伏感染状態を制御する重要な過程にも関わらず、それを標的としたHIV治療薬は現在開発されていない。これを克服する手段を提供できたことが、社会的意義としてあげられる。

研究成果の概要(英文)：Antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus (HIV) has advanced to the point where combinations of anti-HIV drugs have shown considerable therapeutic efficacy. However, there is still the problem of activation from latently infected viruses to be overcome, along with the side effects of drugs and the problem of controlling drug-resistant viruses. One of the best targets is the HIV transcriptional activation process, which is mainly regulated by the host transcription factor NF- $\kappa$ B and the virus-derived transcriptional activator Tat. In this project, we analyzed these factors. In particular, we focused on Tat-mediated HIV transcriptional activation and found a novel HIV inhibitor candidate that targets CDK9, a component of P-TEFb, which forms a complex with Tat during transcriptional activation. Further studies are needed to develop anti-HIV drugs.

研究分野：分子生物学

キーワード：HIV 転写 P-TEF b

## 1. 研究開始当初の背景

2022 年において、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症/AIDS の感染者数は全世界で約 3900 万人、毎年 130 万人の新規感染者と約 63 万人の死亡者が推定されている (UNAIDS FACT SHEET; <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>)。その治療法は根治療法ではなく、生涯にわたり治療を受けることが要求される。その為、耐性ウイルスの出現や重篤な副作用が問題となっており、これらを克服する新しい HIV 治療薬の開発が切望されている。

新規 HIV 治療薬として最適な標的の一つが、HIV プロウイルスからウイルス RNA が産生される HIV 転写活性過程である。本過程は、主に宿主転写因子 NF $\kappa$ B とウイルス由来の転写活性化因子 Tat により制御されており、特に HIV 潜伏感染を制御する過程として重要であるが、これを標的とした有効な抗 HIV 治療薬は開発されていない。

## 2. 研究の目的

これらを標的とする抗 HIV 薬を開発するためには、それらの分子の制御メカニズムと理解し、キーとなる分子の活性を制御できる化合物を見出すことが肝要である。本研究では、特に後者の Tat による HIV 転写活性化制御機構を詳細に検討した。

Tat は、宿主に存在する転写伸長因子 P-TEFb (cyclin dependent kinase (CDK) 9 とサイクリン T1 で構成される) と複合体(Tat/P-TEFb)を形成し、TAR と呼ばれるウイルス遺伝子のプロモーター近傍に結合する。最終的には CDK9 が RNA ポリメラーゼ II をリン酸化することで、ウイルスの mRNA の発現を大幅に増加し、HIV 複製の増幅に至る。この過程を標的とした HIV 薬の作用機序としては、Tat/P-TEFb の複合体形成を制御するものと、CDK9 リン酸化活性を制御するものが想定される。この中でも特に、CDK9 活性調節については、特に潜伏感染細胞における HIV-1 の複製と遺伝子発現に不可欠であり、CDK9 阻害剤が HIV 複製を効率的に抑制することが実際に示されている。

われわれは以前、Tat/P-TEFb と P-TEFb (Tat が結合していない P-TEFb) の分子動力学(MD) 計算を行い、Tat 特異的に形成される CDK9 上の cavity である CDK9 hidden cavity を見出した(文献 1)。これは Tat 特異的に誘導されることから、Tat による CDK9 活性制御に関与するポケットであることが考えられた。そこで、本研究では、この cavity をファーマコフォアとし、in silico スクリーニングを行い、抗 HIV 薬となりうる化合物を見出すこととした。

## 3. 研究の方法

**(1) in silico スクリーニング:** ファーマコフォアとして CDK9 hidden cavity を用い、Namiki HTS ライブラリーセット ver. 201508 を対象に in silico スクリーニングを行った。スクリーニングは、HTVS、SP、XP の 3 つの Glide ドッキングプログラムを用いて、候補化合物を段階的に絞り込んだ。5,431,536 種類の化合物から、HTVS モードで 121,763 種、SP モードで 121,395 種、最終的に XP モードで 23,039 種に絞り込んだ。

**(2) CDK9 in vitro kinase assay:** 50 種類の小分子化合物を選び、CDK9 活性に対する阻害効果を評価した。In vitro kinase アッセイは、CDK9 と CycT1 の組換えタンパク質を用いて、化合物による CDK9 活性を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) CDK9 hidden cavity を標的とする in silico スクリーニングと化合物#127 の同定(文献 2)

CDK9 hidden cavity は、CDK9 ATP 結合領域に近接する continuous cavity (CC) I, Tat/サイクリン T1 結合接触面近傍に存在する CCIII, それらをつなぐ CCII に分割される。その CDK9 hidden cavity をもとに in silico スクリーニング

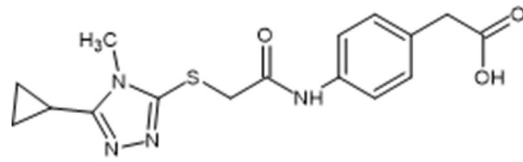


図 1 ) 化合物#127 の構造

を行い、最も強力に CDK9 活性を抑制する化合物#127 を見出した(図 1)。この化合物は、CDK9 hidden cavity の CCII, CCIII を標的とするものだった。さらに、特異性を確認するために他の CDKs に対する効果を in vitro キナーゼアッセイで確認したところ、CDK6 に対しても阻害効果を示すことが分かった。その原因を探るために、CDK9 hidden cavity と他の CDKs の相同性と構造特性を解析した。その結果、CDK9 hidden cavity の中心に位置する Ile 61 が化合物#127 の CDK9 キナーゼ活性阻害に重要であることが示唆された。また化合物#127 の類縁体について検討したところ、CDK9 阻害活性を示す CCIII を標的とする部分化合物(#1804, #1805)を見出した。

### (2) 化合物#127 の部分化合物と ATP competitor の併用効果について

さらに、CCII まで標的とする#1804 の類縁体のスクリーニングを行い、CDK9 阻害活性を示すものを見出した。この化合物と ATP competitor との併用効果を調べたところ併用により CDK9 阻害に対して協調的に働くことが確認された。さらに、分子ドッキングシミュレーションにより、これらの化合物が CDK9 の hidden cavity 内に干渉なしに配置されることを確認した。これらの結果は、これらの化合物を連結することにより CDK9 阻害剤が効率的に開発できることを示している。

### (3) まとめ

本研究では、CDK9 hidden cavity を用い新規 CDK9 阻害剤#127 を見出した。今後、#127 の特異性向上や、安全性・有効性評価のための in vivo 実験が必要である。

また、今回 CDK9 hidden cavity からそれを標的とする阻害剤が得られたことは、これが有用なファーマコフォアであることを意味する。今後、同等の方法で得られたファーマコフォアを用いた in silico スクリーニングにより他のキナーゼに対しても有効な阻害剤が開発されることが期待される。さらに、この成果は HIV-1 治療だけでなく、CDK9 はがんや白血病においても重要な役割を果たしており、他の CDK9 を標的とする疾患の治療法としても応用可能である。今後さらなる研究が必要である。

### (参考文献)

- (1) MD simulation of the Tat/Cyclin T1/CDK9 complex revealing the hidden catalytic cavity within the CDK9 molecule upon Tat binding. Asamitsu K, Hirokawa T, Okamoto T. PLoS One 2017 12: e0171727.
- (2) Identification of a novel CDK9 inhibitor targeting the intramolecular hidden cavity of CDK9 induced by Tat binding. Asamitsu K, Hirokawa T, Okamoto T. PLoS One. 2022 17: e0277024.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kaori Asamitsu, Takatsugu Hirokawa, Takashi Okamoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of a novel CDK9 inhibitor targeting the intramolecular hidden cavity of CDK9 induced by Tat binding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PloS One	6. 最初と最後の頁 e0277024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0277024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sheriah Laine M de Paz-Silava, Ann Florence B Victoriano-Belvis, Nina G Gloriani, Yurina Hibi, Kaori Asamitsu, Takashi Okamoto	4. 巻 38
2. 論文標題 In Vitro Antiviral Activity of Mentha cordifolia Plant Extract in HIV-1 Latently Infected Cells Using an Established Human Cell Line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 AIDS Res Hum Retroviruses	6. 最初と最後の頁 64-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/AID.2021.0053.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato H, Asamitsu K, Sun W, Kitajima S, Yoshizawa-Sugata N, Okamoto T, Masai H, Poellinger L	4. 巻 39
2. 論文標題 Cancer-derived UTX TPR mutations G137V and D336G impair interaction with MLL3/4 complexes and affect UTX subcellular localization.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene.	6. 最初と最後の頁 3322-3335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-020-1218-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Asamitsu K, Fujinaga K, Okamoto T	4. 巻 17
2. 論文標題 HIV Tat/P-TEFb Interaction: A Potential Target for Novel Anti-HIV Therapies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 E933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules23040933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Asamitsu K, Okamoto T.	4. 巻 23
2. 論文標題 The Tat/P-TEFb Protein-Protein Interaction Determining Transcriptional Activation of HIV.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Pharm Des.	6. 最初と最後の頁 4091-4097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1381612823666170710164148.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 朝光かおり、広川貴次、岡本 尚
2. 発表標題 Tat特異的に誘導されるCDK9の局所構造 (CDK9 hidden cavity) の構造特性と新規CDK阻害剤の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝光かおり、岡本 尚、広川貴次
2. 発表標題 特異的CDK9ポケット構造を標的とした新規HIV治療薬の開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 朝光かおり、日比悠里名、岡本 尚
2. 発表標題 HIV-1 Tat enhances the stabilization of the HIV transcriptional activator complex by modifying its local structure.
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	岡本 尚  (Okamoto Takashi)  (40146600)	名古屋市立大学・薬学総合研究院(医学)・名誉教授   (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------