

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4月1日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659024

研究課題名（和文） VifによるAPOBEC3Gのプロテアソーム分解を阻害する
抗エイズ薬の設計と合成研究課題名（英文） Design and synthesis of anti-HIV agents that inhibit the
Vif-mediated proteasome degradation of APOBEC3G

研究代表者

大塚 雅巳 (OTSUKA MASAMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：40126008

研究成果の概要（和文）：APOBEC3Gはヒトの持つ抗ウイルス性因子であり、HIV-1が感染するとウイルスの持つ蛋白質VifがAPOBEC3Gの分解を引き起こす。研究代表者らは人工化合物MF1、MF2、MF3を設計、合成し、それらが細胞内でAPOBEC3Gの分解を阻害するか検討した。その結果、化合物MF2およびそれに還元剤DTTを加えて生成させたMF1がAPOBEC3Gの発現量を顕著に上昇させることがわかった。さらに、化合物MF2、MF3およびそれらにDTTを加えて生成したMF1はAPOBEC3Gを発現させた細胞内でHIV-1の感染価を低下させた。本研究は新規抗HIV-1薬創製の基礎になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：APOBEC3G is a human antiviral protein that blocks HIV-1 replication. However, the antiviral activity of A3G is overcome by the HIV-1 protein Vif that degrades APOBEC3G. We designed and synthesized artificial compounds MF1, MF2, and MF3 to examine the Vif-inhibitory activity. We found that MF2 and MF1 (generated by adding DTT to MF2) increase the expression of APOBEC3G to a level much higher than that observed in the absence of Vif, without affecting the level of Vif expression. Furthermore, MF2, MF3, and MF1 (generated by adding DTT to MF2 or MF3) significantly inhibited the MAGI cell infectivity of wild-type HIV-1. These findings may contribute to the development of a novel anti-HIV-1 drug.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,600,000	360,000	2,960,000

研究分野：医薬品化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：抗エイズ薬・Vif・APOBEC3G

1. 研究開始当初の背景

APOBEC3Gはヒトのもつ抗ウイルス性蛋白質で、ウイルスの複製を阻害する機能をもつ。ところがHIV-1はVif蛋白質を持ち、ヒト細胞に感染すると、Vifが宿主のもつCul5などの蛋白質とユビキチンリガーゼ複合体を形成し、APOBEC3Gをユビキチン化してプロテアソーム分解してしまう。こうして

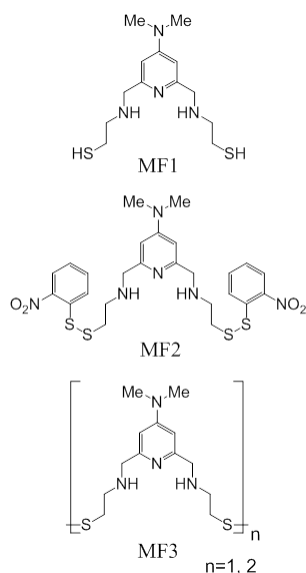
HIV-1はAPOBEC3Gの抗ウイルス性から免れる。Vifを介するAPOBEC3Gの分解を阻止する化合物を得ることができれば、新しいメカニズムによる抗エイズ薬となると考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者と研究分担者はさきに重鉛蛋

白質の阻害活性をもつ亜鉛結合性化合物 MF1 およびその関連化合物 MF2、MF3 を合成開発した。Vif は亜鉛蛋白質であるので、化合物 MF1、MF2、MF3 により有効な阻害が可能と考え、本研究に着手した。MF1 は MF2 または MF3 に還元剤 DTT で処理することにより生成させることができる。

本研究は化合物 MF1、MF2、MF3 の Vif および APOBEC3G に対する作用を明らかにし、HIV-1 の感染価に対する影響を検討することを目的とした。



3. 研究の方法

(1) APOBEC3G 分解阻害実験

HIV-1 の感染性クローン pNL4-3 の Vif 欠損体 pNL-Nd を、Vif-FLAG を発現させるベクターとして pNL-ASCF-fWT を用いた。これらの mock として pUC または pNL-A1 Vif(-) (NIH, USA, Strebel Klaus 博士から供与) を用いた。APOBEC3G-myc を発現させるベクターとして pcDNA-APO3G (NIH, USA, Strebel Klaus 博士から供与) を、その mock として pcDNA 3.1(-) を用いた。

遺伝子導入はリン酸カルシウム法で行い、定法に従った。まず、遺伝子発現用プラスミド計 10 μg を用い、超純水で全量を 220 μl とした。この混合液に CaCl_2 水溶液 (2.5 M) 25 μl を加え、2 \times Hebs (42 mM HEPES, 290 mM NaCl, pH 7.1) 250 μl と Na_2HPO_4 (70 mM) 5 μl との混合溶液に滴下した。30 min 室温でインキュベートした後、細胞培養用シャーレ (6.0 cm) でサブコンフルエント状態にある 293T 細胞に添加した。37 $^\circ\text{C}$ にて 6 hr 培養後、D-MEM で置換した。遺伝子導入開

始 48 hr 後に細胞を回収した。遺伝子発現用プラスミドの組成を下表に示した。

	2.50 mg	6.25 mg	1.25 mg
mock	pNL-Nd	pUC	pcDNA 3.1(-)
Δ Vif	pNL-Nd	pNL-A1-Vif(-)	pcDNA APO3G
WT	pNL-Nd	pNL-ASCF-fWT	pcDNA APO3G

293T 細胞に各種プラスミドベクターを用いてトランスフェクションを行った。この際、遺伝子導入より 6 hr 後上清を D-MEM で置換した時に、DTT は 15 μM 、MG132 は 10 μM 、化合物 MF2、MF3 および TPEN は最終濃度が 5 μM となるように各種化合物を添加した。遺伝子導入より 48 hr 後、スクレーパーにより細胞を剥離して 15 ml チューブに移し、PBS (-) で洗浄した。細胞に PBS (-) 150 μl と 2 \times sample buffer 150 μl を加え、ヒートブロックにより加熱 (100 $^\circ\text{C}$, 1 hr) した後、遠心 (14,000 rpm, 1 min, r.t.) して上清をウエスタンブロッティング用のサンプルとした。ウエスタンブロッティング法は常法に従った。

(2) MAGI アッセイ

ヒト子宮頸癌由来細胞である HeLa 細胞に CD4, CXCR4, LTR- β -gal 遺伝子を導入した MAGI-CXCR4 細胞を 10%FCS, 0.2 mg/ml G418, 0.1 mg/ml Hygromycin B, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin 含有 D-MEM (以下 MAGI-CXCR4 用 D-MEM) に懸濁し、細胞培養用シャーレに播種して CO_2 インキュベーター中 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 下で静置培養した。コンフルエントに達した細胞をトリプシン-EDTA 法によりディッシュから剥離し、MAGI-CXCR4 用 D-MEM を加えてピペッティングした。計算板で細胞数を計測し必要量だけ 15 ml チューブに移し、遠心後上清をすて細胞数が 2×10^4 個/300 μl となるように 10%FCS 含有 D-MEM を加えてピペッティングした。96 穴プレートに細胞懸濁液を 300 μl ずつ播種し 48 hr 静置培養した細胞を MAGI アッセイに用いた。

HIV-1 の感染性クローン pNL4-3 を、その Vif 欠損体 pNL-Nd を用いた。これらの mock として pUC を用いた。APOBEC3G の発現ベクターとして pcDNA-APO3G (NIH, USA, Strebel Klaus 博士から供与) を用いた。

遺伝子導入はリン酸カルシウム法で行い、定法に従った。まず、遺伝子発現用プラスミド計 3.3 μg を用い、精製水で全量を 73.3 μl とした。この混合液に CaCl_2 水溶液 (2.5 M) 8.3 μl を加え、2 \times Hebs (42 mM HEPES, 290 mM NaCl, pH 7.1) 83.3 μl と Na_2HPO_4 (70 mM) 1.7 μl との混合溶液に滴下した。30 min 室温でインキュベートした後、細胞培養用シャーレ (3.5 cm) でサブコンフルエント状態にある 293T 細胞に添加した。37 $^\circ\text{C}$ にて 6 hr

培養後、D-MEM で置換した。遺伝子導入開始 48 hr 後に細胞を回収した。遺伝子発現用プラスミドの組成を下表に示した。

	3 mg	0.3 mg
mock	pUC	pcDNA APO3G
Δ Vif	pNL-Nd	pcDNA APO3G
WT	pNL-432	pcDNA APO3G

293T 細胞に各種プラスミドベクターを用いてトランスフェクションを行った。遺伝子導入より 6 hr 後上清を D-MEM で置換した時に、DTT は 15 μ M、化合物 MF2、MF3 および TPEN は最終濃度が 5 μ M となるように各種化合物を添加した。遺伝子導入より 48 hr 後、上清を回収し、遠心 (3,000 rpm, 10 min, r.t.) した後、上清をウイルス液として得た。この溶液 5 μ l に RT カクテル (50 mM Tris-HCl, pH7.8, 75 mM KCl, 2.0 mM DTT, 5.0 mM MgCl₂, 0.5 μ g/ml Poly A, 6.3 μ g/ml Oligod(T)₁₂₋₁₈, 0.05% NP40 25 μ l, [α ³²P]-TTP を適量(1日目: 0.025 μ l)加え 37°C で 3 hr 静置培養した。これを 10 μ l ずつクロマトグラフィーパーパーにしみ込ませ、2 \times SSC (300 mM NaCl, 30.0 mM Sodium citrate) で洗浄した後乾燥させ、シンチレーションカウンターで β 線を検出した。得られた値を HIV-1 の放出量とした。

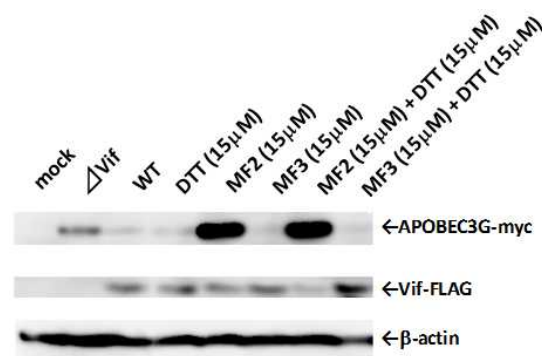
ウイルス液を D-MEM で 10 分の 1、100 分の 1、1000 分の 1 に希釈し、DEAE-dextran を最終濃度 20 μ g/ml となるように加えた。96 穴プレートにて培養した MAGI 細胞の上清を除き、調整したウイルス液を 100 μ l ずつ加えていった。37°C で 12 hr インキュベーションした後、D-MEM を 100 μ l ずつ加えた。さらに 36 hr 静置培養した後、上清を除去し、固定液を加え 5 min インキュベートし、PBS (-) で洗浄した後、染色液 (4.0 mM K₃[Fe(CN)₆], 4.0 mM K₄[Fe(CN)₆], 2.0 mM MgCl₂, 0.4 mg/ml X-Gal) を加え 37°C で 50 min インキュベートした。PBS (-) で洗浄後、青く染色された細胞数を計測し、得られた値を HIV-1 の感染価とした。

4. 研究成果

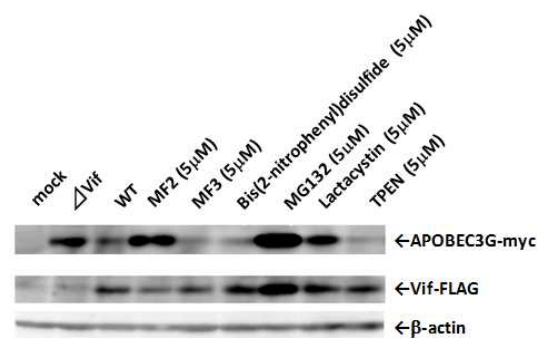
合成した化合物が細胞内で APOBEC3G の分解を抑制するか検討した。

その結果、予想通り Vif 非存在下では APOBEC3G の発現が見られたが、Vif 存在下で発現量は低下した。そこに DTT、MF3、MF3+DTT を添加しても、発現量の回復は見られなかった。意外なことに MF2 および MF2+DTT を加えたものの存在下では、APOBEC3G の発現量が顕著に上昇した。その発現量は Vif 非存在下よりも高いことから、APOBEC3G がこの実験系では Vif 以外の因子により分解を受けており、それが MF2 および MF2+DTT を加えたものにより分解阻

害されることが示唆された。



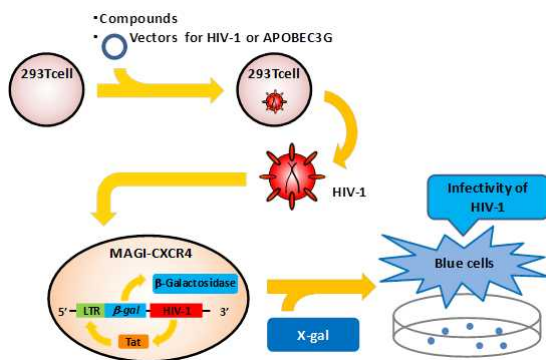
次に、この分解がプロテアソーム分解であるかどうか調べるために、プロテアソーム阻害剤である MG132 および Lactacystin と活性を比較した。また、同時に Bis(2-nitrophenyl)disulfide についても同様の実験を行った。



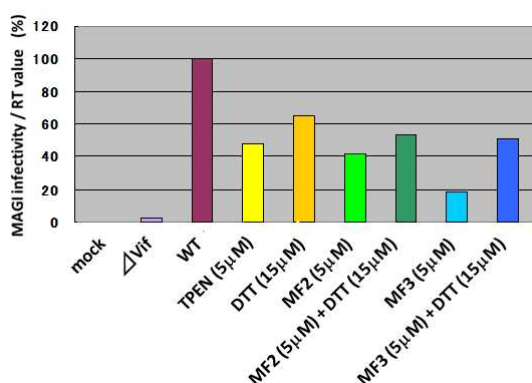
その結果、MG132 および Lactacystin でも MF2 と同様 APOBEC3G の発現量上昇が見られ、この分解がプロテアソーム分解であること、MF2 や MG132 または Lactacystin によりプロテアソーム分解が阻害されることが示された。また、Bis(2-nitrophenyl)disulfide は APOBEC3G の発現量を上昇させなかった。実際、化合物の *in vitro* におけるプロテアソーム阻害活性を調べた結果、MF2、MF3、MF3+DTT はプロテアソーム分解阻害活性を示し、その中でも MF2 の活性が最も高いことがわかった。

次に、実際に化合物群が APOBEC3G を発現した細胞内で HIV-1 の感染を抑制するか検討するため MAGI アッセイを行った。

ウイルス液をあらかじめ培養した MAGI-CXCR4 に添加し感染させた。MAGI-CXCR4 には CD4、CXCR4、LTR- β -gal が導入されている。HIV-1 が感染すると HIV-1 の転写活性化タンパク質 Tat が発現し、これが LTR 領域にある TAR に結合し、その下流にある β -gal 遺伝子の転写を促進する。生じた β -ガラクトシダーゼに基質である X-Gal を加え、青く染まった細胞を数えることで HIV-1 感染価を測定した。



結果 (RT 活性で補正) を下に示す。これより、各化合物により HIV-1 の感染価が低下することが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Yosuke Kanemaru, Yumi Momiki, Saori Matsuura, Tatsufumi Horikawa, Jin Gohda, Jun-ichiro Inoue, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka, An Artificial Copper Complex Incorporating a Cell-penetrating Peptide Inhibits NF- κ B Activation. *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, 59, 2011, 1555-1558.
 - ② Kensaku Anraku, Teruhiko Inoue, Kenji Sugimoto, Kota Kudo, Yoshinari Okamoto, Takashi Morii, Yasuo Mori, Masami Otsuka, Design and synthesis of biotinylated inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate targeting Grp1 Pleckstrin Homogy domain. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 19, 2011, 6833-6841.
 - ③ Tomohiko Ejima, Mayuko Hirota, Tamio Mizukami, Masami Otsuka, Mikako Fujita, An anti-HIV-1 compound that increase steady-state expression of apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme-catalytic polypeptide-like
- 3G. *Int. J. Mol. Med.*, 査読有, 28, 2011, 613-616.
 - ④ Kensaku Anraku, Ryota Fukuda, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Highly Sensitive Analysis of the Interaction between HIV-1 Gag and Phosphoinositide Derivatives Based on Surface Plasmon Resonance. *Biochemistry*, 49, 査読有, 2010, 5109-5116.
 - ⑤ Mikako Fujita, Masami Otsuka, Masako Nomaguchi, Akio Adachi, Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology*, 20, 査読有, 2010, 68-76.
- 〔学会発表〕 (計 8 件)
- ① 肥田知浩、金丸陽亮、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳、新規チオール化合物の合成と機能解析、第 28 回日本薬学会九州支部大会、2011. 12. 10.、福岡大学薬学部 (福岡)
 - ② Takeshi Masuda, Kensaku Anraku, Kaori Sato, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Systematic Synthesis of all Regioisomers of Inositol Phosphates、2011. 12. 1.、京王プラザホテル (東京)
 - ③ Kensaku Anraku, Mikako Fujita, Masami Otsuka, Design and Synthesis of Anti-HIV-1 Agent that Targets Pr55Gag Protein、8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium、2011. 11. 30.、京王プラザホテル (東京)
 - ④ 安楽健作、藤田美歌子、大塚雅巳、酸性脂質類による HIV-1 増殖の抑制、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011. 11. 30.、ハイアットリージェンシー東京 (東京)
 - ⑤ 藤田美歌子、安楽健作、大塚雅巳、PH ドメイン分子による HIV-1 放出の制御、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011. 11. 30.、ハイアットリージェンシー東京 (東京)
 - ⑥ Takashi Masuda, Kensaku Anraku, Kaori Sato, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Systematic synthesis of all regioisomers of inositol phosphates、2010. 12. 19.、PACIFICHEM 2010、Convention Center, (Honolulu)
 - ⑦ 安楽健作、福田亮太、藤田美歌子、大塚雅巳、Pr55^{Gag} を標的とした抗 HIV-1 薬開発のための基礎的研究、2010. 11. 18.、第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム、京都テルサ (京都)
 - ⑧ 安楽健作、福田亮太、大塚雅巳、藤田美歌子、HIV-1 MA 蛋白質と強く結合する低

分子化合物の探索、2010. 11. 8.、第 58 回
日本ウイルス学会学術集会、徳島あわぎ
んホール（徳島）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：APOBEC3 発現向上剤及び抗 HIV 剤

発明者：藤田美歌子、大塚雅巳、江島智彦

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：2010-103182

出願年月日：平成 22 年 4 月 28 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/
bunsigouseiHP/index.html](http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunsigouseiHP/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 雅巳 (OTSUKA MASAMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：40126008

(2) 研究分担者

藤田 美歌子 (FUJITA MIKAKO)

熊本大学・薬学部附属創薬研究センタ

ー・准教授

研究者番号：00322256