

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：2 3 6 5 9 0 6 6

研究課題名（和文） 薬剤耐性ウイルス出現を克服するための HIV 脱殻機構を標的とした治療薬開発

研究課題名（英文） Developing an anti-HIV drugs that inhibit uncoating for overcoming drug resistance.

研究代表者

三隅 将吾 (MISUMI SHOGO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：4 0 2 6 4 3 1 1

研究成果の概要（和文）：HIV 感染症に対する抗ウイルス剤の開発と治療法はウイルス感染症治療のなかで近年最も進歩したものの1つである。しかし、多剤併用療法を受けながらも効果が十分にあがらず、ウイルスの増殖抑制に失敗する症例も数多くあり、治療薬剤に対する耐性を獲得した HIV 変異株の出現が主な理由として挙げられる。そこで、薬剤耐性変異ウイルスを標的とした新たな薬剤開発が求められている。申請者は、HIV RNA を保護している HIV カプシドコアが崩壊する過程(脱殻過程)に関与する宿主因子プロリルイソメラーゼ Pin1 を発見した。本研究では、Pin1 がカプシドコアを認識する部位に存在する Ser16 残基のリン酸化を触媒する酵素の特定とその阻害剤の探索、および Pin1 に対する阻害剤を探索することで、薬剤耐性ウイルスの出現を抑えた新規抗 HIV 剤の探索を行うことを目的としていた。その結果、申請者は Ser16 残基をリン酸化する酵素として ERK2 を見出した。この ERK2 に対する阻害剤 sc-222229 を 100 nM で HIV 持続感染細胞に処理した場合、ウイルスの産生量そのものには変化がなく、持続感染細胞そのものの増殖には影響がなかった。しかしながら、予想通りウイルス粒子内のカプシドの Ser16 残基のリン酸化が阻害され、また、qPCR を用いた逆転写過程の解析や *in vitro* 脱殻アッセイによって、sc-222229 で処理された HIV 持続感染細胞から得られたウイルスは逆転写過程および脱殻そのものがうまくいかないことで感染性が低下することを明らかにした。なお、ERK2 に対する siRNA を用いた実験でも同様の結果が得られたことから、ウイルス粒子内への ERK2 の取込みを阻害するような阻害剤は、新たな抗 HIV 剤として開発できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that Pin1 facilitates the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) uncoating by interacting with the capsid (CA) core through the phosphorylated Ser¹⁶-Pro¹⁷ motif. However, the specific kinase responsible for Ser¹⁶ phosphorylation has remained unknown. Here, we show that virion-associated extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) phosphorylates Ser¹⁶. The characterization of immature virions produced by exposing of CEM/LAV-1 cells to 10 μM saquinavir and a D25N inactive mutant of HIV-1 protease indicated that Ser¹⁶ is phosphorylated after the initiation of Pr55^{gag} processing. Furthermore, a mass spectrometry-based *in vitro* kinase assay demonstrated that ERK2 specifically phosphorylated the Ser¹⁶ residue in the Ser¹⁶-Pro¹⁷-motif-containing substrate. The treatment of CEM/LAV-1 cells with the ERK2 inhibitor sc-222229 decreased the Ser¹⁶ phosphorylation level inside virions, and the virus partially defective in Ser¹⁶ phosphorylation showed an impaired reverse transcription and an attenuated replication owing to an attenuated Pin1-dependent uncoating. Furthermore, the suppression of ERK2 expression by RNA interference in CEM/LAV-1 cells resulted in suppressed ERK2 packaging inside virions and decreased the Ser¹⁶ phosphorylation level inside virions. Interestingly, the ERK2-packaging-defective virus showed an impaired reverse transcription and an attenuated HIV-1 replication. Taken together, these findings provide insights into the as yet obscure processes in Pin1-dependent HIV-1 uncoating.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ウイルス・感染症・微生物

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症に対する抗ウイルス剤の開発と治療法はウイルス感染症治療のなかで近年最も進歩したものの1つである。しかし、多剤併用療法を受けながらも効果が十分にあがらず、ウイルスの増殖抑制に失敗する症例も数多くあり、治療薬剤に対する耐性を獲得した HIV 変異株の出現が主な理由として挙げられる。そこで、薬剤耐性変異ウイルスを標的とした新たな薬剤開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、Pin1 がカプシドコアを認識する部位に存在する Ser16 残基のリン酸化を触媒する酵素の特定とその阻害剤の探索、および Pin1 に対する阻害剤を探索することで、薬剤耐性ウイルスの出現を抑えた新規抗 HIV 剤の探索を行うことを目的としていた。

3. 研究の方法

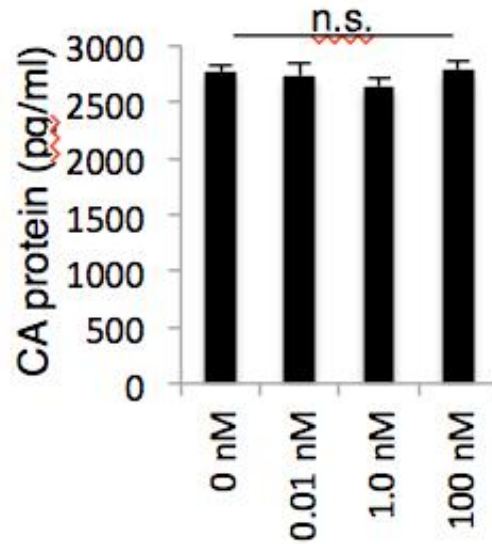
in vitro kinase assay を駆使して、Ser16 をリン酸化する酵素を特定した。なお、kinase は市販の活性型 kinase をカルナバイオサイエンス株式会社から入手し用いた。

市販のキナーゼ阻害剤のうち、*in vitro* kinase assay で特定できた kinase に対する特異的な kinase 阻害剤を HIV 持続感染細胞に処理し、得られたウイルスの感染価等をしらべ、実際に Ser16 残基のリン酸化が阻害されているのかを確認した。最後に、*in vitro* kinase assay で特定できた kinase に対する siRNA を処理することで、実際に HIV の感染価そのものがどのように影響を受けるのかを調べた。

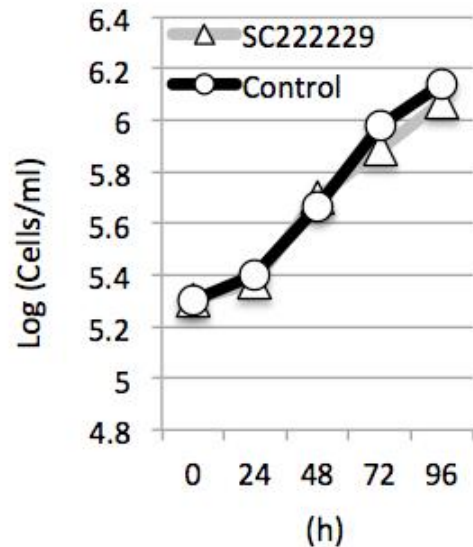
4. 研究成果

申請者は、*in vitro* kinase assay の結果 Ser16 残基をリン酸化する酵素として ERK2 を見出した。ERK2 を特定するにあたり、*in vitro* kinase assay を行った。なお、質量分析装置により ERK2 によってリン酸化を受けるとリン酸基の分だけ基質の分子量が増加することを利用して特定した。また、実際に ERK2 が活性化状態でウイルス粒子内に存在するか否かは、Ott 等の方法により CD45 抗体を利用したウイルス精製法により、ウイルスを精

製し、ERK2 が存在することを確認している。次に、この ERK2 に対する阻害剤 sc-222229 を 100 nM で HIV 持続感染細胞に処理した場合、ウイルスの産生量そのものには変化がなく、持続感染細胞そのものの増殖には影響がなかった。



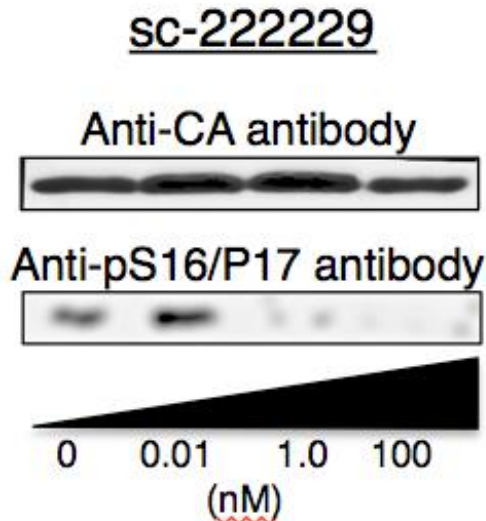
ウイルス産生量の比較



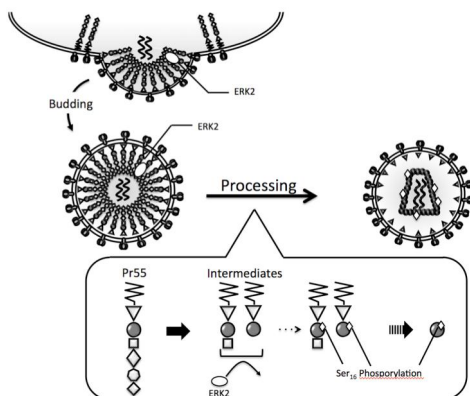
HIV 持続感染細胞の増殖に対する影響

しかしながら、予想通りウイルス粒子内のカプシドの Ser16 残基のリン酸化が阻害されていた。

Ser16 のリン酸化は阻害



また、qPCR を用いた逆転写過程の解析や *in vitro* 脱殻アッセイによって、sc-222229 で処理された HIV 持続感染細胞から得られたウイルスは逆転写過程および脱殻そのものがうまくいかないことで感染性が低下することを明らかにした。なお、ERK2 に対する siRNA を用いた実験でも同様の結果が得られたことから、ウイルス粒子内への ERK2 の取込みを阻害するような阻害剤は、新たな抗 HIV 剤として開発できる可能性がある。



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) Takamune, N. *, Irisaka, Y., Yamamoto, M., Harada, K., Shoji, S., Misumi, S. Induction of extremely low protein expression level by fusion of C-terminal region of Nef. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 59, 245-253 (2012) 査読有
- 2) Kishimoto, N., Onitsuka, A., Kido, K., Takamune, N., Shoji, S., Misumi, S.* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase negatively regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Retrovirology* 9, 107 (2012) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① HIV 脱殻過程を制御する HIV カプシドタンパク質リン酸化機構の解明
堂地 昶生、高宗 暢暁、庄司 省三、杉本 幸彦、三隅 将吾
第 85 回日本生化学会大会 プログラム号 p73, 94
2012/12/14-16
福岡国際会議場 (福岡)
- ② ERK2 による HIV CA の Ser₁₆ リン酸化を介した脱殻制御機構に関する解析
堂地 昶生、高宗 暢暁、庄司 省三、杉本 幸彦、三隅 将吾
第 26 回 日本エイズ学会学術集会・総会 総会抄録集 p379
2012/11/24-26
慶應義塾大学 日吉キャンパス (横浜)
- ③ HIV-1 脱殻素過程を制御するカプシド蛋白質 Ser₁₆ リン酸化機構に関する解析
堂地 昶生、高宗 暢暁、庄司 省三、杉本 幸彦、三隅 将吾
第 60 回 日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集 p182
2012/11/13-15
大阪国際会議場 (大阪)
- ④ HIV-1 カプシド蛋白質 Ser₁₆ リン酸化による脱殻素過程の制御機構
堂地 昶生、井上 睦美、高宗 暢暁、庄司 省三、杉本 幸彦、三隅 将吾
次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 講演要旨集 p54
2012/9/15-16
九州大学病院キャンパス (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三隅 将吾 (MISUMI SHOGO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：4 0 2 6 4 3 1 1