

エイズウイルスタンパク質の分子機能に関する研究

藤田美歌子

Study on Molecular Function of Proteins of Human Immunodeficiency Virus

Mikako Fujita

Research Institute for Drug Discovery, School of Pharmacy, Kumamoto University;
5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan.

(Received July 2, 2013)

Human immunodeficiency virus (HIV) has no more than nine genes expressing approximately twenty proteins. When T lymphocytes and macrophages in a body are infected with HIV, these proteins work in turn at specific time and location, causing acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), a disease yet to be overcome. Since the elucidation of molecular mechanism of HIV proteins should lead to remedy of AIDS, the author has been engaged in the study of HIV protein in the past decade. Described herein are viral protein X (Vpx), uniquely found in HIV-2, and its homologous protein Vpr found both in HIV-1 and -2. We found that Vpx enhances genome nuclear import in T lymphocytes, and is critical for reverse transcription of viral RNA in macrophages. This finding on the function in macrophages corrected long-term misleading belief. Furthermore, functional region mapping of Vpx was performed. In 2011, the protein SAMHD1 was identified as the host restriction factor counteracted by Vpx, by foreign researchers. After that, our independent study demonstrated the presence of SAMHD1-independent functions of Vpx in T cells, in addition to its SAMHD1-dependent functions in macrophages. Another topic of this review is Gag protein. Recently, it has reported by overseas researchers that PI(4,5)P2 (one of phosphoinositide) regulates Pr55^{Gag} localization and assembly. In this study, we determined the binding affinity between N-terminal MA domain of Pr55^{Gag} and various phosphoinositide derivatives using surface plasmon resonance. The results suggested that both negatively charged inositol phosphates and hydrophobic acyl chain are required for the MA binding.

Key words—human immunodeficiency virus; viral protein X (Vpx); Gag; acquired immunodeficiency syndrome; SAMHD1; PI(4,5)P2

1. はじめに

エイズウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) は、後天性免疫不全症候群 (エイズ) の原因ウイルスである。HIV には、世界中に感染が広まっている 1 型 HIV (HIV-1) と、西アフリカに感染が広がっている 2 型 HIV (HIV-2) がある。HIV-1 は *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* と名付けられた遺伝子を持つ。一方 HIV-2 は *vpu* を持たず、*vpx* と呼ばれる遺伝子を持つ (Fig. 1)。どちらの HIV も、たった 9 個の遺伝子しか持たない。ヒトは 2 万個以上の遺伝子を持ち、大腸菌でも 4 千個程度の遺伝子を持つことと比べて、HIV はなんとコ

ンパクトなのであろうか。そして、HIV の 9 個の遺伝子から、20 種類程度のタンパク質が発現する (*gag*, *pol*, *env* はタンパク質発現後にいくつかのタンパク質に開裂するため、遺伝子数よりもタンパク質数は多い)。HIV がヒト体内のマクロファージや T 細胞に感染した後、これらのタンパク質は決められたタイミングと局在でヒト由来の因子と相互作用しながら機能し、HIV は増殖する。その結果、HIV-1 感染者が治療を受けなければ、ほとんどの場合 (HIV-2 感染者においてはある一定の割合において) 免疫不全が引き起こされ死に至る。HIV は実に巧妙であり、かつ恐ろしいものである。2011 年末の世界の統計では、HIV 感染者は 3400 万人、エイズによる年間死亡者数は 170 万人にも上るとされている。

それに対して人類は、ただ手をこまねいていたわけではない。30 年前に HIV が発見されて以来、多

The author declares no conflict of interest.

熊本大学薬学部附属創薬研究センター (〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1)

e-mail: mfujita@kumamoto-u.ac.jp

本総説は、平成 24 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

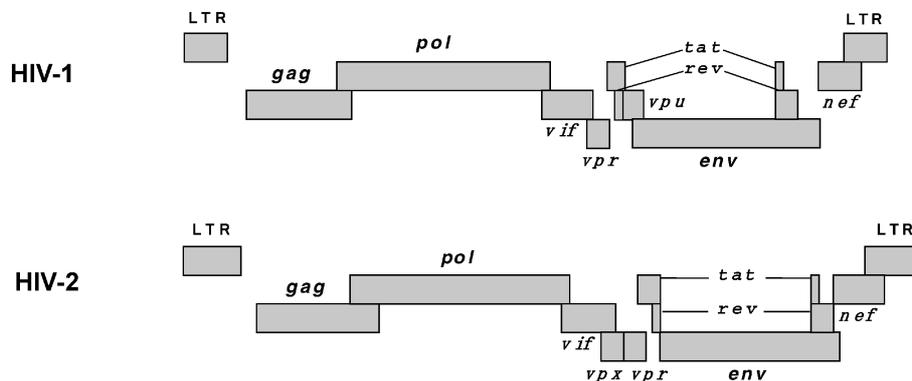


Fig. 1. Viral Genome Structure of HIV-1 and HIV-2

くの研究者が HIV タンパク質の機能解明に参加し成果を挙げてきた。そのいくつかの知見は抗 HIV 薬の開発につながった。HIV が薬剤耐性を持つことに対抗して、これまで多くの種類の薬が開発されてきている。現在、適切な化学療法を続ければ免疫不全による死を回避することができるまで、治療法は進歩した。しかしながら、それは体内の HIV を完全に除去するものではなく、化学療法を成功させるためには、HIV 感染者は一生涯にわたって薬を飲み続けなければならず、副作用に苦しむを得ない。また経済的な問題で、感染者の多くが化学療法を受けることができない国も多い。

筆者は、エイズの克服に少しでも貢献したいと考え、過去 10 年以上にわたって HIV タンパク質の分子機能解明に取り組んできた。本総説では、研究の最近の進歩について紹介したい。

2. Vpx タンパク質に関する研究

HIV の持つ *vif*, *vpr*, *vpx*, *vpu*, *nef* 遺伝子はアクセサリ遺伝子と呼ばれ、これらから発現されるタンパク質はアクセサリタンパク質と呼ばれる。発見当初、これらの遺伝子を欠損させた変異 HIV が野生株と同様に培養細胞で増えることから、増殖に必須の遺伝子ではないとされアクセサリという名前が付けられた。しかしその後、体内の細胞に近い初代培養細胞を用いた実験から、これら遺伝子の重要性が明らかにされた。アクセサリタンパク質は、「アクセサリ」という名が付くが、決して「飾り」ではない。さらに、その他の HIV タンパク質と比べてアクセサリタンパク質には謎が多く、いまだに明らかにされていない点が多くある。1999 年、筆者はアクセサリタンパク質研究をスタート

させ現在に至るまで続けている。そのうち、Vpx に関する研究について述べたい。

HIV-1 はアクセサリタンパク質 Vpr を持つが、HIV-2 は Vpr に加えて Vpx も持つ。HIV-2 の Vpr タンパク質と Vpx タンパク質の間には約 20% の相同性がある。¹⁾ 極めて限られたゲノム情報の中で、おそらく無駄なものなどないであろう HIV が、似たタンパク質の遺伝子を 2 つも持っているということは不思議なことに思えた。HIV-2 は西アフリカという限られた地域に感染が広まっているウイルスであり、かつ HIV-1 より病原性が低いと考えられていたため詳細な研究がなされてこなかった。しかし、HIV-2 タンパク質の機能を明らかにすることは HIV-1 の理解にもつながると考え、Vpx タンパク質の機能解析を開始した。その頃 (2000 年代初め)、Vpx タンパク質について以下のようなことが理解されていた。

- 112 個程度 (株間でのバリエーションがある) のアミノ酸からなるタンパク質である。
- マクロファージにおいてウイルス増殖性を付与する。その機能は、ウイルスゲノムの核移行を促進することにより発現される。
- T 細胞においてウイルス増殖を促進する。
- HIV-2 の仲間である SIVmac を感染させたサル個体内で、ウイルス増殖を 10 倍程度促進する。

この中の b) についてもう少し詳しく説明すると、HIV-1 Vpr は細胞周期において G₂ アレストを惹起する。また、マクロファージ中でウイルスゲノム核移行を促進すると言われていた (これは現在でも信じられているようであるが、筆者は今では再検討が

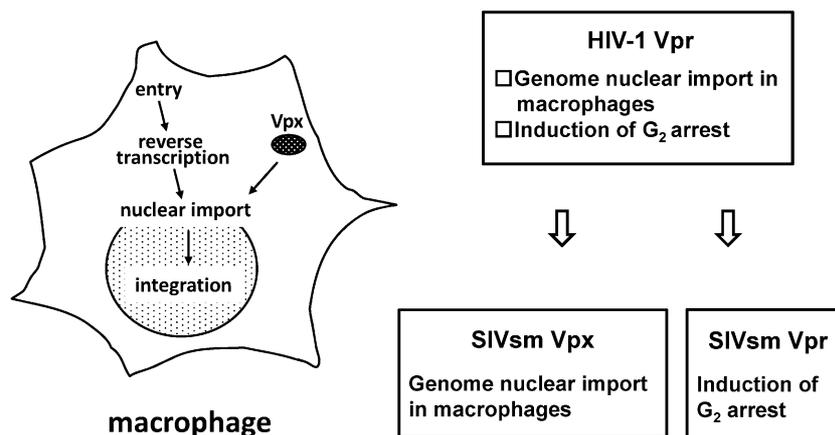


Fig. 2. Functions of Vpr/Vpx of HIV-1 and SIVsm (HIV-2 lineage) Reported on 1996²⁾
This concept had been generally accepted until 2008.^{7,10)}

必要ではないかと考えている). このような2つの機能を, SIVsm (HIV-2グループウイルスの一種)においてVprとVpxが分担していると考えられていたのである (Fig. 2).²⁾ この理解はわかり易いため広く受け入れられており, 筆者もこの論文を読んだるほどと思ったものである.

このような状況の中, T細胞におけるウイルス増殖促進のメカニズムを調べることから研究をスタートさせた. まず HIV-2の感染性クローン pGL-AN (全長の HIV-2をコードするプラスミドベクターであり, 細胞に導入すると HIV-2が生じる), その Vpx 欠損体 (Δ Vpx 体), 及びその Vpx と Vpr の二重欠損体 (Δ Vpx \cdot Δ Vpr 体)を 293T 細胞に導入した. 得られたウイルスを健康人由来 PBMC (末梢血単核球)に感染させ, 日にちをおいて細胞上清のウイルス量を RT アッセイにより調べることで感染実験を行った. その結果, Δ Vpx 体の増殖性は野生株に比べてかなり低く, Δ Vpx \cdot Δ Vpr 体においては, Δ Vpx 体よりもさらに低くほとんど増殖しなかった.³⁾ この傾向は既に報告されていた Vpx/Vpr 欠損 SIVmac (HIV-2グループウイルスの一種)のアカゲザル由来 PBMC における感染実験の結果⁴⁾と一致していた. ちなみに, マクロファージ中では Δ Vpx 体も Δ Vpx \cdot Δ Vpr 体も全く増殖しない.³⁾ それではサル個体内ではどうかというと, PBMC における感染性を反映しているように見える. すなわち, SIVmac Δ Vpx 体のアカゲザル体内での増殖性は野生株に比べて明らかに低い, それでもエイズを発症する. 一方, SIVmac Δ Vpx \cdot Δ Vpr 体は体内

でさらに増殖性が低く, エイズの発症がみられない.⁵⁾ このことから, 個体におけるウイルス増殖において T細胞が重要な役割を果たしていると考えられ, Vpx/Vpr の T細胞における機能を詳細に検討することにした.

そのためには, PBMC のモデルとなる培養細胞が必要となった. PBMC ではプラスミドベクターの導入が難しい上に, プレップの違いによるデータのばらつきが予想されるからである. そこで, 初代培養細胞に性質が近い HSC-F 細胞 (カニクイザル由来 T細胞を *Herpesvirus saimiri* により不死化したもの)⁶⁾を用いることにした. HIV-2 (GL-AN 株) Δ Vpx 体, 及びその Δ Vpx \cdot Δ Vpr 体を HSC-F 細胞に感染させたところ, 野生株, Δ Vpx 体, Δ Vpx \cdot Δ Vpr 体の順序で増殖が遅れ, HSC-F 細胞は PBMC のモデルとなり得ることが示された. そこで, HSC-F 細胞を用いて Vpx/Vpr の機能を調べることにした.³⁾ 感染性クローン pGL-AN のエンベロープをコードしている遺伝子に変異を導入し, いったん放出されたウイルス粒子が二度と感染しないようにした. このクローンの Vpx/Vpr 変異体を HSC-F 細胞に導入して放出されたウイルス量を測定し, 感染後期過程 (転写からウイルス粒子放出まで)における Vpx/Vpr の影響を調べた. その結果, Δ Vpx 体では野生株と同様にウイルスが放出されるが, Δ Vpx \cdot Δ Vpr 体の放出量は野生株の約半分に減っていることが判明した. この減少は Vpr 欠損体 (Δ Vpr 体)でもみられ, Vpr は T細胞において感染後期過程を促進するが, Vpx は促進しないこと

が示された。さらに pGL-AN の Rev をコードしている遺伝子に変異を導入したものと Rev の発現ベクターを 293T 細胞に共導入し、いったん感染はするもののプロウイルスに *rev* 遺伝子を持たないため感染サイクルが回らないようなウイルスを作製した。このウイルスの Vpx/Vpr 変異体を HSC-F 細胞に感染させ、生成した DNA を PCR 解析することで、感染前期過程（侵入から染色体へのインテグレーションまで）における Vpx/Vpr の影響を調べた。その結果、今度は Δ Vpx 体、 Δ Vpx・ Δ Vpr 体の両方においてウイルスゲノム逆転写反応生成物の量が野生株に比べて若干少なく、さらに核移行が阻害されていた。 Δ Vpr 体は野生株と同じ挙動を示した。なお、当初、PCR は半定量的方法により行ったが、後に定量的 PCR によってもこのことを確認している。⁷⁾ 結果として、Vpx は T 細胞においてウイルスゲノム核移行を促進するが (Fig. 3), Vpr はそのような作用を持たないことを明らかとした。これらの Vpx/Vpr の T 細胞における機能をまとめて論文に掲載したが、³⁾ Vpx が存在しても T 細胞でのウイルス感染に影響を与えないと信じている研究者もいる。^{8,9)} それは、力価の高いウイルスを使ったため Vpx の機能が隠れてしまったためと考えられるが、Vpx の T 細胞での機能は重要でないと思われるようである。しかし筆者は、Vpx/Vpr の T 細胞における機能は重要であると考えている。

次に、マクロファージでの機能に目を向けた。マクロファージにおいては HIV-2 Δ Vpr 体は野生株と同様に増殖する一方、 Δ Vpx 体や Δ Vpx・ Δ Vpr 体は全く増えない。Vpx のマクロファージでのウ

イルス増殖における役割は非常に重要なのである。それでは、どのようなメカニズムで Vpx はウイルス増殖性を付与しているのだろうか。これについては先述したように、HIV-1 Vpr と同様、ウイルスゲノムの核移行を促進すると広く信じられていた。まず、これを確認しようと考え、健康人由来マクロファージ（モノサイトを GM-CSF で分化させたもの）を調製し、GL-AN Δ Vpx 体のシュードウイルス（HIV-2 エンベロープの代わりに VSV、すなわち水疱性口内炎ウイルスのエンベロープを持つもの。これにより力価が上がり、感染しづらいマクロファージでも実験が容易になる）を感染させて PCR 解析を行った。その結果、驚いたことに、HIV-2 Δ Vpx 体では逆転写反応の進行が抑えられていた。⁷⁾ 実は、Vpx はマクロファージにおいてウイルスゲノム逆転写反応に必須だったのである。この結果を筆者らが論文に掲載したのとほぼ同時に、筆者らと全く関係のなかったアメリカのグループからも予期せず同じ結果が報告された。¹⁰⁾ なお、マクロファージでなく樹状細胞において Vpx がウイルスゲノム逆転写反応に必須であることは、その少し前に報告されていた。¹¹⁾ これらの結果は、すぐに受け入れられ、新しいコンセンサスとなった。振り返ってみると、それまでなぜ Vpx はマクロファージで核移行を促進すると信じられてきたのであろうか。これを提唱した論文は 2 つある。1 つの論文²⁾ では SIV_{SM}PBj1.9 の Vpx という、特殊なウイルス（ブタオザルに感染して短い期間で死を引き起こす）を用い、もう 1 つの論文¹²⁾ ではマクロファージの代わりにモデル細胞として薬剤で細胞周期を止めた

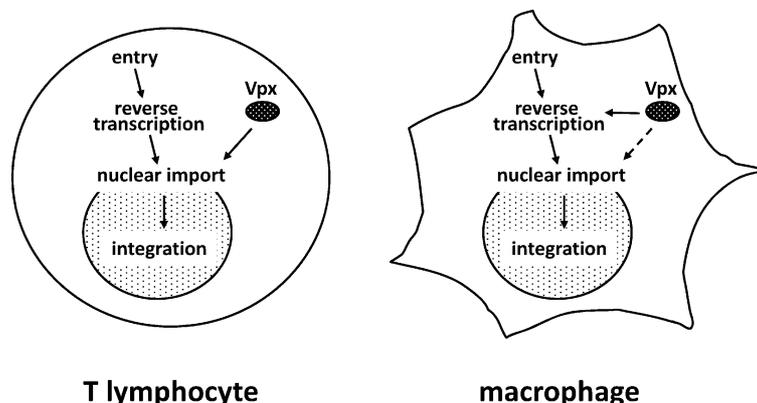


Fig. 3. Revised Functions of Vpx in T Lymphocytes and Macrophages Demonstrated by Our Study^{3,7)}

U937 細胞が用いられていた。また、どちらの実験も定量的 PCR でなく、半定量的 PCR が用いられていた。このようなことが原因だったと思われる。なお新しいコンセンサスは、それまで信じられてきた、Vpx がマクロファージで核移行を促進する、ということ否定するものではない。筆者らの実験データからは、おそらく Vpx はマクロファージ中でウイルスゲノム逆転写反応とともに核移行を促進する働きがあると考えている (Fig. 3).¹³⁾

筆者らはこのように、Vpx のマクロファージと T 細胞における機能を明らかにしたが、次に Vpx タンパク質のどのアミノ酸がこれらの機能発現に係わっているのか調べたいと思った。そのために、徹底的な変異導入を行った。HIV-2 とその仲間の SIV-mac や SIVsmm の様々な株のシーケンズデータベースを眺め、おおよそ 5 つおきくらいのよく保存されているアミノ酸を変えた (基本的にはアラニンに変え、前半の *vif* 遺伝子と重なっている部分は発現する Vif タンパク質のアミノ酸が変わらないように工夫した)。全部で 19 個の変異体のシリーズを構築した (Fig. 4)。まず、感染性クローン pGL-AN にこれらの変異を導入し、マクロファージと T 細胞である HSC-F 細胞において感染実験を行った。^{7,14)} その結果マクロファージでの増殖には必須であるが HSC-F 細胞での増殖では必須でないアミノ酸 (E15G, W24L, Q76A)、その逆 (H82A, C87A,

H94A)、どちらの細胞での増殖にも必須であるアミノ酸 (H39L, W49L) が存在することがわかった。先に述べたように Vpx のマクロファージと T 細胞における機能は異なるわけなので、増殖に重要なアミノ酸が異なることも当然かもしれない。

話は前後するが、2002 年に HIV の基礎研究の流れを変えるようなブレークスルー的成果である APOBEC3G の発見が、Malim のグループにより報告された。¹⁵⁾ その後たちまちのうちに多くの研究者が APOBEC3 研究に参入し、ウイルスの持つアクセサリータンパク質とヒトの持つ抗ウイルス宿主因子の驚くべき攻防が明らかにされた。¹⁶⁾ すなわち HIV Vif タンパク質がない場合、抗ウイルス宿主タンパク質 APOBEC3G はウイルス粒子の中に取り込まれる。そして感染細胞内での逆転写反応において生成する cDNA に変異を導入するなどして、ウイルスの感染性をなくす。しかし、Vif は APOBEC3G をプロテアソーム分解するなどして、ウイルス粒子内の APOBEC3G の量を減らす。さらに 2008 年には、アクセサリータンパク質 Vpu の標的分子が別の抗ウイルスタンパク質 BST-2/tetherin であることが報告された。^{17,18)} その 2008 年は、筆者らや海外のグループが Vpx はマクロファージにおいてウイルスゲノム逆転写反応に必須であることを報告した^{7,10)} 年でもある。このとき、海外から、Vpx は未知の抗ウイルス宿主因子を分解することで逆転写反応を進

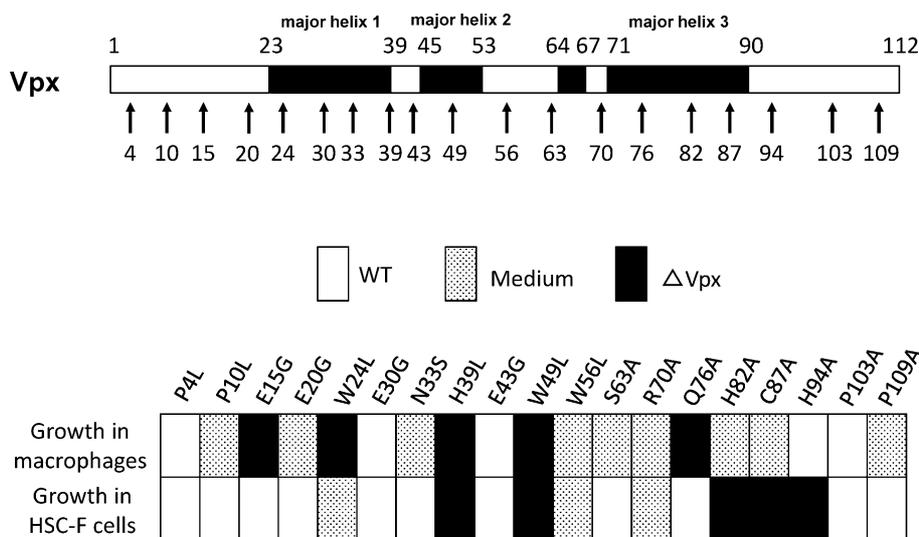


Fig. 4. Functional Region Mapping of Vpx in Macrophages and HSC-F Cells¹⁴⁾

In upper structure of HIV-2 Vpx [GL-AN clone (GenBank accession no. M30895)], black areas represent the four predicted helices.¹⁾ Positions of point mutations are indicated by arrows. For example, mutant P4L has L instead of P⁴ on Vpx.

行させていることを示唆するデータも出された。^{10,19)} すなわち、Vpx は Vif や Vpr と同様、抗ウイルス宿主因子に対抗するために HIV が持つ武器であることが示されたのである。それでは、「Vpx が拮抗する宿主因子は何か」というのが次の問題であった。この答は、2011 年に報告された。^{20,21)} すなわちその宿主因子は、SAMHD1 という dNTP をヌクレオシドとトリリン酸に分解する酵素であった。ウイルスゲノム逆転写反応において cDNA が生成するが、その部品となるものが dNTP である。SAMHD1 は細胞内の dNTP 量を減らすことで逆転写反応の進行を止めているのに対し、Vpx が SAMHD1 をプロテアソーム分解することで拮抗すると説明された。²²⁾ 新しい抗ウイルス宿主因子の出現に、世界の HIV 研究者は再び興奮した。ただし最近の研究²³⁾ では、SAMHD1 の機能はそれほど単純ではなさそうである。

残念ながら、筆者らは SAMHD1 の発見そのものには参加することはできなかったのであるが、既に行った変異体解析の結果を SAMHD1 タンパク質分解の惹起という観点から見直した。²⁴⁾ Vpx が SAMHD1 とユビキチンリガーゼ錯体を形成する際、Vpx の 15 番目のグルタミン酸で SAMHD1 と結合し、76 番目のグルタミンで DCAF1 と結合することが知られている (Fig. 5)。Vpx のこれらの 2 つのアミノ酸の変異体 (E15G, Q76A) は、マクロファージにおける増殖活性をなくしていた (Fig. 4)。このことは、マクロファージで Vpx が SAMHD1 依存的機能を発現することを示唆する。一方、HSC-F ではこれらの変異体が増殖した。もっとも HSC-F 細胞はカニクイザル由来の細胞であり、カニクイザルの SAMHD1 や DCAF1 と結合するアミノ酸がこれらの 2 つであるかどうかは不明である。しかしそれにしても HSC-F 細胞での増殖における変異体解析の結果を眺めると、SAMHD1 (カニクイザル由来) と結合しそうなアミノ酸の変異体も増殖活性を持っているように思われる。さらに、この 2 種類の変異体 (E15G, Q76A) は、PBL で明らかに Vpx 欠損体よりも増殖していた (投稿準備中)。T 細胞において、Vpx が SAMHD1 非依存的機能を発現することは明らかである。

現在、SAMHD1 非依存的機能がマクロファージにおいても発現されるのか、またその実態は何であ

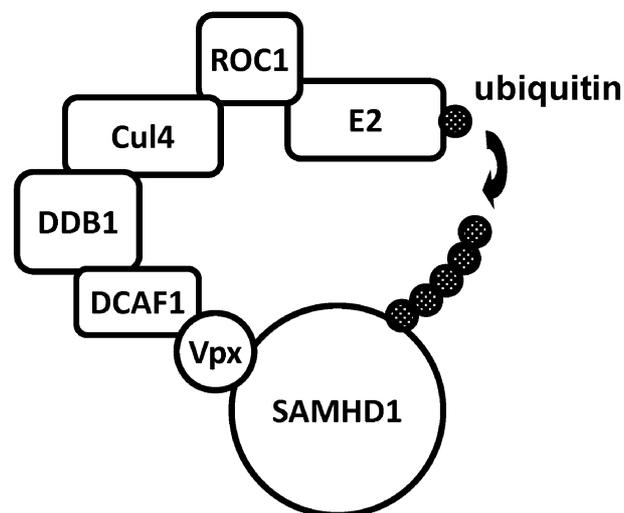


Fig. 5. Ubiquitin Ligase Complex for Proteasome Degradation of SAMHD1 by Vpx

るのか明らかにしようと検討中である。そして最終的には、112 個程度のアミノ酸からなるコンパクトな Vpx の構造と機能の関係の全貌を明らかにし、Vpr との相違を議論したいと思っている。

3. Gag タンパク質に関する研究

筆者は元々化学を学んでいたため、いつか化学の知識や技術をエイズ研究に活かしたいと思っていた。2006 年に現在の研究室に移ったが、そこではイノシトールリン脂質の合成研究が行われていた。そこで開始したのが、この Gag タンパク質に関する研究である。

HIV の *gag*, *pol*, *env* は構造遺伝子と呼ばれ、それぞれ構造タンパク質 Gag, Pol, Env をコードする。先述したアクセサリタンパク質と異なり、構造タンパク質はすべてのレトロウイルスに共通して存在する。そして、感染性ウイルス粒子の形成やウイルス遺伝子発現といったウイルスの基本的な営みに関与する。それでは、感染性粒子はどのようにして形成されるのだろうか。古くから理解されていたことは、簡単に述べると次のようなことである。Pr55^{Gag} (Precursor of Gag) と呼ばれる 55 kDa の Gag 前駆体タンパク質と、Pr160^{Gag-Pol} (Precursor of Gag-Pol) と呼ばれる 160 kDa の Gag-Pol 前駆体タンパク質 (フレームシフトにより 5-10% は Gag 前駆体タンパク質と Pol 前駆体タンパク質がつながった Gag-Pol 前駆体タンパク質となる) が発現する。Pr55^{Gag} は細胞膜に移行してウイルス粒子が

出芽する。その際、Pr160^{Gag-Pol} も取り込まれる。出芽と同時に直後に Pr160^{Gag-Pol} が開裂してプロテアーゼを生じ、そのプロテアーゼによってこれらの前駆体タンパク質が開裂する。開裂によって未成熟粒子は成熟し、感染性を持つようになる。

Pr55^{Gag} の膜移行に着目すると、Pr55^{Gag} の MA ドメインの N 末端のミリスチル基と塩基性領域が必須であることが知られていた。ミリスチル基は疎水性相互作用により細胞膜に挿入し、タンパク質は細胞膜に弱く結合すると考えられる。しかし、この相互作用だけでは十分でない。それでは「MA ドメインの塩基性領域は膜移行にどんな役割を果たしているのか」という疑問があったが、これに答えたのが 2004 年の小野らによる報告である。²⁵⁾ すなわち、細胞膜に存在する PI(4,5)P₂ (イノシトールリン脂質分子の一種) が MA の塩基性領域の標的であることが明らかにされた。さらに、MA と PI(4,5)P₂ の複合体の NMR 解析が行われ、次のような興味深い結合様式が示された。²⁶⁾ すなわち、PI(4,5)P₂ のイノシトールリン酸部位が MA の塩基性領域と結合し、2'-アシル基が MA の疎水性領域に入り込む。そうすると疎水性領域に元々収まっていたミリスチル基は露出し、そのミリスチル基と

1'-アシル基が細胞膜に挿入する (Fig. 6)。

これを見て筆者らは、イノシトールリン脂質に基づいた抗 HIV 薬の創製を目指そうと思った。すなわち MA の塩基性領域と疎水性領域に PI(4,5)P₂ よりも強く結合する化合物を創って、これらの領域を塞げば、MA ドメインは PI(4,5)P₂ と結合することができなくなり、Pr55^{Gag} は膜移行できず HIV 粒子は放出されない、と考えたのである (Fig. 7)。そこでまず、阻害剤設計に役立てるため、MA と種々のイノシトールリン脂質関連物質との結合の強さを求めることにした。方法として、感度のよい表面プラズモン共鳴法 (BIACORE) を用いることにした。この場合、イノシトールリン脂質類をセンサーチップにリガンドとして固定化して MA タンパク質をアナライトとして流すやり方と、その逆で MA タンパク質をリガンドとして用いイノシトールリン脂質を流すやり方が考えられる。分子量の大きいものをアナライトとして用いた方が、感度が上がると考えられることから、前者のやり方を用いることにした。リガンドとして、リンカーを介したビオチンを持つビオチン化 IP₄ (安樂が合成)²⁷⁾ を用い、アビジンを持つセンサーチップに固定化した。アナライトとして、MA と様々な濃度のイノシトールリン

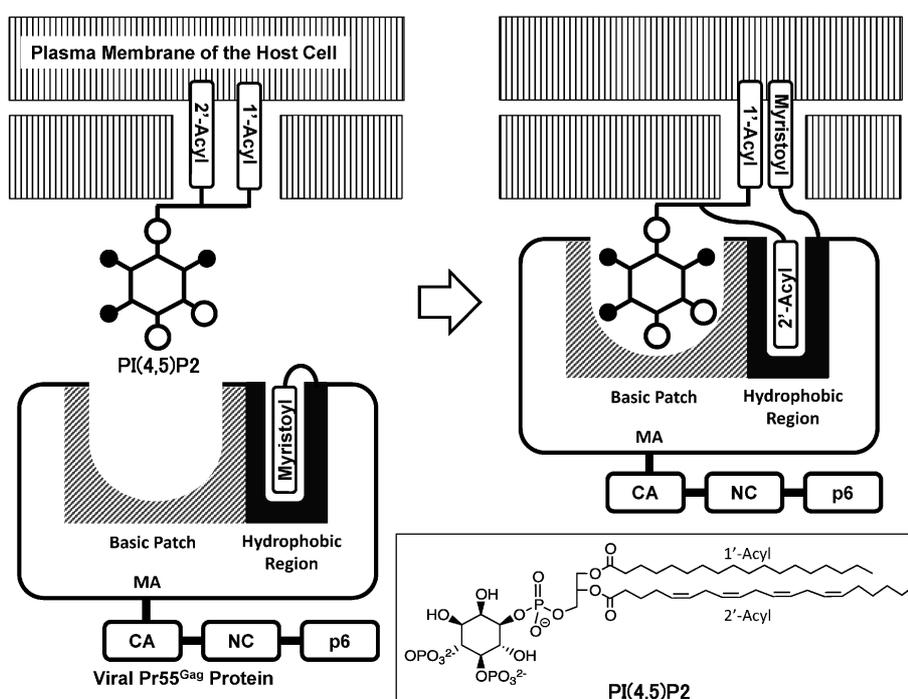


Fig. 6. Regulation of Membrane Localization of Pr55^{Gag} by PI(4,5)P₂
Structure of PI(4,5)P₂ is shown.

脂質類（競合剤）を混ぜたものを流し、競合阻害実験を行って解離定数を求めた。

その結果いくつかの知見を得た²⁸⁾が、最も重要であると考えられる結果を以下に示す（Fig. 8）。二価リン酸基を持ち疎水性基を持たない 1,4,5-IP3 と MA の解離定数は $568 \pm 52 \mu\text{M}$ であった。また、二価リン酸基を持たず疎水性基を持つ di-C₈-PI と MA の解離定数は $178 \pm 29 \mu\text{M}$ であった。これに対し

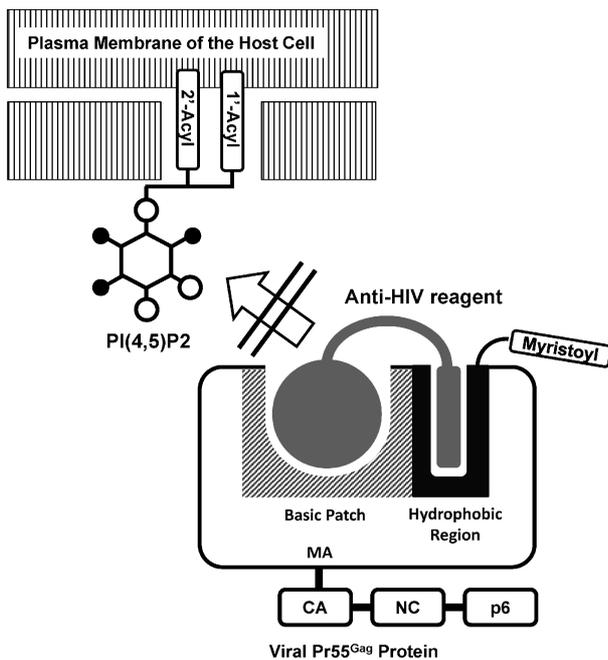


Fig. 7. Design of New Anti-HIV Reagent

The compound carrying basic patch-binding moiety and hydrophobic region-binding moiety in MA domain of Pr55^{Gag} might inhibit membrane localization of Pr55^{Gag}.

て、二価リン酸基も疎水性基も持つ di-C₈-PI(4,5)P2 (PI(4,5)P2 の疎水性基が短いモデル化合物) と MA の解離定数は $5.64 \pm 1.43 \mu\text{M}$ であった。解離定数は値が小さい方が強い結合を示すため、イノシトールリン脂質類が MA と強く結合するためには、その二価リン酸基と疎水性基の両方が必要であることがわかった。詳細はここでは省くが、これらの知見を基に新規イノシトールリン脂質分子を設計、合成した。その結果、天然分子のモデル化合物を超えた機能を持つ、人工イノシトールリン脂質分子を創製することができた（投稿準備中）。現在、これらの分子の抗エイズ薬への展開を検討している。

4. おわりに

このように筆者は、HIV-2 Vpx タンパク質の機能を追求するとともに、HIV-1 Gag タンパク質を標的とした抗 HIV 薬の創製を目指してきた。得られた成果がなんらかの形でエイズの克服につながれば、望外の喜びである。

謝辞 本研究を遂行するにあたりご指導を頂きました。足立昭夫教授（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）と大塚雅巳教授（熊本大学大学院生命科学研究部）に深謝致します。Gag タンパク質に関する研究は、安楽健作博士（熊本保健科学大学保健科学部）との共同研究であり、深く感謝致します。研究にご協力頂きました、徳島大学足立研究室、熊本大学大塚研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

Dissociation constants (K_D values)		
	Pr55 ^{Gag}	MA
1,4,5-IP3	$2170 \pm 260 \mu\text{M}$	$568 \pm 52 \mu\text{M}$
di-C ₈ -PI	$186 \pm 22 \mu\text{M}$	$178 \pm 29 \mu\text{M}$
di-C ₈ -PI(4,5)P2	$47.4 \pm 6.5 \mu\text{M}$	$5.64 \pm 1.43 \mu\text{M}$

Fig. 8. Dissociation Constants of the Binding of Pr55^{Gag}/MA and Phosphoinositides²⁸⁾
Divalent phosphate groups and lipophilic moieties are marked.

REFERENCES

- 1) Khamsri B., Murao F., Yoshida A., Sakurai A., Uchiyama T., Shirai H., Matsuo Y., Fujita M., Adachi A., *Microbes Infect.*, **8**, 10–15 (2006).
- 2) Fletcher T. M., Brichacek B., Sharova N., Newman M. A., Strivahtis G., Sharp P. M., Emerman M., Hahn B. H., Stevenson M., *EMBO J.*, **15**, 6155–6165 (1996).
- 3) Ueno F., Shiota H., Miyaura M., Yoshida A., Sakurai A., Tatsuki J., Koyama A. H., Akari H., Adachi A., Fujita M., *Microbes Infect.*, **5**, 387–395 (2003).
- 4) Gibbs J. S., Regier D. A., Desrosiers R. C., *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **10**, 607–616 (1994).
- 5) Gibbs J. S., Lackner A. A., Lang S. M., Simon M. A., Sehgal P. K., Daniel M. D., Desrosiers R. C., *J. Virol.*, **69**, 2378–2383 (1995).
- 6) Akari H., Nam K.-H., Mori K., Otani I., Shibata H., Adachi A., Terao K., Yoshikawa Y., *Clin. Immunol.*, **91**, 321–329 (1999).
- 7) Fujita M., Otsuka M., Miyoshi M., Khamsri B., Nomaguchi M., Adachi A., *J. Virol.*, **82**, 7752–7756 (2008).
- 8) Bergamaschi A., Ayinde D., David A., Le Rouzic E., Morel M., Collin G., Descamps D., Damond F., Brun-Vezinet F., Nisole S., Margottin-Goguet F., Pancino G., Transy C., *J. Virol.*, **83**, 4854–4860 (2009).
- 9) Belshan M., Kimata J. T., Brown C., Cheng X., McCulley A., Larsen A., Thippeshappa R., Hodara V., Giavedoni L., Hirsch V., Ratner L., *Retrovirology*, **9**, 32 (2012).
- 10) Srivastava S., Swanson S. K., Manel N., Florens L., Washburn M. P., Skowronski J., *PLoS Pathog.*, **4**, e1000059 (2008).
- 11) Goujon C., Riviere L., Jarrosson-Wuilleme L., Bernaud J., Rigal D., Darlix J.-L., Cimarelli A., *Retrovirology*, **4**, 2 (2007).
- 12) Pancio H. A., Heyden N. V., Ratner L., *J. Virol.*, **74**, 6162–6167 (2000).
- 13) Fujita M., Otsuka M., Nomaguchi M., Adachi A., *Rev. Med. Virol.*, **20**, 68–76 (2010).
- 14) Fujita M., Otsuka M., Nomaguchi M., Adachi A., *Microbes Infect.*, **10**, 1387–1392 (2008).
- 15) Sheehy A. M., Gaddis N. C., Choi J. D., Malim M. H., *Nature*, **418**, 646–650 (2002).
- 16) Goila-Gaur R., Strebel K., *Retrovirology*, **5**, 51 (2008).
- 17) Neil S. J., Zang T., Bieniasz P. D., *Nature*, **451**, 425–430 (2008).
- 18) Van Damme N., Goff D., Katsura C., Jorgenson R. L., Mitchell R., Johnson M. C., Stephens E. B., Guatelli J., *Cell Host Microbe*, **3**, 245–252 (2008).
- 19) Sharova N., Wu Y., Zhu X., Stanska R., Kaushik R., Sharkey M., Stevenson M., *PLoS Pathog.*, **4**, e1000057 (2008).
- 20) Hrecka K., Hao C., Gierszewska M., Swanson S. K., Kesik-Brodacka M., Srivastava S., Florens L., Washburn M. P., Skowronski J., *Nature*, **474**, 658–661 (2011).
- 21) Laguette N., Sobhian B., Casartelli N., Ringgaard M., Chable-Bessia C., Segéral E., Yatim A., Emiliani S., Schwartz O., Benkirane M., *Nature*, **474**, 654–657 (2011).
- 22) Lahouassa H., Daddacha W., Hofmann H., Ayinde D., Logue E. C., Dragin L., Bloch N., Maudet C., Bertrand M., Gramberg T., Pancino G., Priet S., Canard B., Laguette N., Benkirane M., Transy C., Landau N. R., Kim B., Margottin-Goguet F., *Nat. Immunol.*, **13**, 223–228 (2012).
- 23) White T. E., Brandariz-Nunez A., Valle-Casuso J. C., Amie S., Nguyen L. A., Kim B., Tuzova M., Diaz-Griffero F., *Cell Host Microbe*, **13**, 441–451 (2013).
- 24) Fujita M., Nomaguchi M., Adachi A., Otsuka M., *Front. Microbiol.*, **3**, 297 (2012).
- 25) Ono A., Ablan S. D., Lockett S. J., Nagashima K., Freed E. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14889–14894 (2004).
- 26) Saad J. S., Miller J., Tai J., Kim A., Ghanam R. H., Summers M. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11364–11369 (2006).
- 27) Anraku K., Inoue T., Sugimoto K., Morii T., Mori Y., Okamoto Y., Otsuka M., *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 1822–1830 (2008).
- 28) Anraku K., Fukuda R., Takamune N., Misumi S., Okamoto Y., Otsuka M., Fujita M., *Biochemistry*, **49**, 5109–5116 (2010).