

(様式 10)

【16FK0410104j0001】

平成 29 年 5 月 31 日

平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金

(エイズ対策実用化研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

補助事業課題名 : (日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の創薬
シーズ創成

(英語) Creation of new research bases of structural and evolutionary biology
of HIV Gag proteins for drug seeds discovery

補助事業担当者 (日本語) 佐藤 裕徳

所属 役職 氏名 : (英語) Center for Pathogen Genomics, National Institute of Infectious
Diseases/chief/ Hironori Sato

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名 : (日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)

所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究は、HIV の構造・相互作用・生活環・可変性のより良い理解に基づく新規創薬シーズ創出を目的とする。初年度は、(i)HIV 生活環の構造生物学研究、(ii)創薬標的同定、(iii)タンパク質立体構造情報に基づく薬剤設計（Structure Based Drug Design: SBDD）の3種の研究を連動させる分野横断的な創薬シーズ創出プラットフォームを構築した。この基盤を用いて新しい基礎ウイルス学知見を取得しながら、新しい抗 HIV 物質#1-#3 を見出した。

1. 新しい創薬シーズ創出プラットフォームの構築

- (1) 研究開発代表者（佐藤裕徳 国立感染症研究所 室長）は、研究開発分担者とともに新しい創薬研究基盤を創出した。この基盤は、*in silico* 構造解析をハブとして国内 11 か所の研究組織が連結し、HIV の構造・相互作用・生活環・可変性を研究し、その成果に基づき SBDD を推進することを可能にする。
- (2) 増田貴夫（東京医科歯科大学医歯学総合研究科 准教授）は、インテグラーゼの機能的多量体化と感染性ウイルス粒子形成に関わるアミノ酸残基（Tyr15）を見出した。Tyr15 は、HIV-1 の進化において高度に保存されており、新たな創薬標的候補と位置付けられる。
- (3) 宮川敬（横浜市立大学大学院医学研究科 講師）は、森川裕子（北里大学北里生命科学研究科 教授）、小野陽（ミシガン大学 准教授）らとともに新規 Gag 結合因子 APC を同定し、本因子が HIV の細胞-細胞間伝播の促進効果を持つことを見出した。
- (4) 野間口雅子（徳島大学医歯薬学研究部 教授）は、HIV-1 Gag カプシドリンカードメインが、霊長類レンチウイルス粒子形成におけるカプシドタンパク質の機能・構造維持に重要であることを世界で初めて見出した。
- (5) 櫻木 淳一（大阪大学微生物病研究所 助教）は、HIV-1 Gag 蛋白質の中で最も研究の進んでいない p1 (Sp2) ペプチドの機能の解析を進め、Gag 前駆体からの p1 の解離がウイルスコアの安定化に必要であることを見出した。
- (6) 森川 裕子（北里大学北里生命科学研究科 教授）は、共免疫沈降と生細胞イメージングにより、Gag 前駆体と輸送制御分子 Syntaxin の相互作用部位を同定した。粒子への取り込み実験により、Gag-GagPol 前駆体相互作用には L189, L190 が関与することを見出した。
- (7) 久保嘉直（長崎大学医歯薬学総合研究科 特任准教授）は、細胞因子 GILT がウイルスエンベロープの S-S 結合を切断することにより HIV を含む様々なウイルスの感染を抑制する活性を持つことを突き止めた。
- (8) 武内 寛明（東京医科歯科大学医歯学総合研究科 助教）は、カプシド S149E 変異が早期コア崩壊と 1 型インターフェロンの誘導を誘起することを見出した。

2. 抗 HIV 物質の同定

- (1) 研究代表者は、玉村啓和（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授）、村上努（国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長）らとともに SBDD の実施基盤を構築し、HIV-1 Gag カプシドタンパク質を標的とする抗 HIV 物質#1 を見出した（ $EC_{50} = 8.0 \mu M$ ）。
- (2) 玉村、村上らは、HIV-1 Gag カプシドタンパク質の部分ペプチドライブラリーから抗 HIV-1 ペプチド#2 を見出した（ $EC_{50} = 13 \mu M$ ）。
- (3) 間陽子（理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット ユニットリーダー）は、構造多様性を考慮した 9600 個の化合物を含むライブラリーから、Tsg101-Gag p6 結合阻害活性を持つ抗 HIV-1 物質#3 を見出した（ $EC_{50} = 0.6 \mu M$ ）。

Summary

In this study, we aim to create new drug seeds on the basis of better understanding of the structure, interaction, life cycle, and variability of HIV. In the first year, we created a new cross-sectoral collaboration network for conducting (i) structural biology of HIV, (ii) identification of new drug targets, and (iii) structure based drug design (SBDD). By using the platform, we identified new anti-HIV seeds #1~#3, with collection of novel virological information.

1. Creation of a new research platform of HIV for SBDD

- (1) In collaboration with the members of this study, Dr. Sato's group (National Institute of Infectious Diseases) created a new research platform that allows for SBDD with results of the HIV life-cycle study under the cross-sectoral cooperation among the 11 research groups, with each being integrated by *in silico* structural analysis.
- (2) Dr. Masuda's group (Tokyo Medical and Dental Univ.) demonstrated a critical contribution of evolutionally conserved Tyr15 within HIV-1 integrase to form functional multimer-complex and infectious virus particle, providing a novel target to develop HIV-1 inhibitors.
- (3) Dr. Miyakawa's group (Yokohama City Univ.), in collaboration with Drs. Morikawa (Kitasato Univ.) and Ono (Univ. Michigan Med. School), found that the tumor suppressor adenomatous polyposis coli protein is a Gag-binding protein that leads to enhancement of cell-to-cell HIV transmission.
- (4) Dr. Nomaguchi's group (Tokushima Univ.) found that HIV-1 Gag capsid linker domain, SPTSI, are important for maintaining capsid function/structure in the primate lentiviral virion assembly.
- (5) Dr. Sakuragi's group (Osaka Univ.) found that the release of Gag p1(Sp2) peptide from a NC-p1 precursor is required for the stabilization of viral core.
- (6) Dr. Morikawa's group (Kitasato Univ.) found that Gag was transported through binding of MA helix5 to Syntaxin and that The W184,M185 and L189,L190 of CA CTD helix9 in GagPol was responsible for GagPol incorporation into HIV particles.
- (7) Dr. Kubo's group (Nagasaki Univ.) found that a host factor, GILT, restricts infections of various viruses including HIV via digesting disulfide bonds on viral envelope proteins.
- (8) Dr. Takeuchi's group (Tokyo Medical and Dental Univ.) found that S149E mutation in capsid protein induced synthesis of an early type I interferon with premature capsid disassembly.

2. Identification of anti-HIV compounds

- (1) Research group of Drs. Sato, Tamamura (Tokyo Medical and Dental Univ.), and Murakami (National Institute of Infectious Diseases) constructed a SBDD platform and identified an antiviral #1 that targets HIV-1 capsid protein ($EC_{50}= 8.0\mu M$).
- (2) Research group of Drs. Tamamura and Murakami screened a Gag peptide library and identified an antiviral #2 against HIV-1 ($EC_{50}= 13\mu M$).
- (3) Dr. Aida (Riken) screened a chemical library and identified an antiviral #3 that inhibits interaction between Tsg101 and Gag p6, and thereby HIV-1 replication ($EC_{50}= 0.6\mu M$).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 6 件）

1. 佐藤裕徳. 計算・情報科学の利活用による論理的創薬の基盤開発. IASR. 2016. 37(9):10(176)-11(177).
2. Sakuragi S, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Sakuragi JI. SL1 revisited: functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. *Retrovirology*. 2016 Nov 11;13(1):79.
3. Takahata, T., Takeda, E., Tokunaga, K., Yokoyama, M., Huang, Y-L., Hasegawa, A., Shioda, T., Sato H, Kannagi, M., Masuda T. Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase. *J Virol. in press*.
4. Yokoyama, M., Nomaguchi, M., Doi, N., Kanda, T., Adachi, A., Sato, H. In silico Analysis of HIV-1 Env-gp120 Reveals Structural Bases for Viral Adaptation in Growth-Restrictive Cells. *Front Microbiol*. 7:110, 2016.
5. Alam, M., Kuwata, T., Shimura, K., Yokoyama, M., Ramirez Valdez, KP., Tanaka, K., Maruta, Y., Oishi, S., Fujii, N., Sato, H., Matsuoka, M., Matsushita, S. Enhanced antibody-mediated neutralization of HIV-1 variants that are resistant to fusion inhibitors. *Retrovirology*. 13:70, 2016.
6. Hikichi, Y., Yokoyama, M., Takemura, T., Fujino, M., Kumakura, S., Maeda, Y., Yamamoto, N., Sato, H., Matano, T., Murakami, T. Increased HIV-1 sensitivity to neutralizing antibodies by mutations in the Env V3-coding region for resistance to CXCR4 antagonists. *J Gen Virol*. 97:2427-40, 2016.
7. Miyatake, H., Sanjoh, A., Murakami, T., Murakami, H., Matsuda, G., Hagiwara, K., Yokoyama, M., Sato H, Miyamoto, Y., Dohmae, N., Aida, Y. Molecular Mechanism of HIV-1 Vpr for Binding to Importin- α . *J Mol Biol*. 2836:30140-1, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「ウイルス感染症と計算科学」、口頭、佐藤裕徳、第 374 回 CBI 学会研究講演会、感染症研究の将来 ～グローバルヘルスに貢献する創薬～、2016 年 7 月 22 日（金）、東京（東京大学山上会館）
2. 「ウイルス感染症研究への計算科学の利活用」口頭、佐藤裕徳、大塚製薬先端創薬研究所 招待講演、2016 年 10 月 7 日（金）、徳島（先端創薬研究所）
3. 「Accumulation of MHC-I-associated viral genome mutations in multiple SIV transmissions」、ポスター、Seki S, Nomura T, Nishizawa M, Yokoyama M, Sato H, Matano T、第 15 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2016 年 9 月 6 日（火）～9 日（金）、兵庫（淡路夢舞台国際会議場）
4. 「網羅的 Env 標的阻害剤ライブラリーの構築」口頭、原田恵嘉、野村渉、鳴海哲夫、横山勝、前田賢次、林宏典、萩原香澄、石田有佑、引地優太、佐藤裕徳、玉村啓和、俣野哲朗、吉村和久、第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会、2016 年 11 月 24 日（木）-26 日（土）、鹿児島（かごしま県民交流センター）
5. 「HIV-1 Env 三量体における制限された構造ゆらぎ」ポスター、横山勝、奥田 萌、中村浩美、小谷治、由良敬、佐藤裕徳、第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 11 月 30 日（水）～12 月 2 日（金）、神奈川（パシフィコ横浜）
6. 「SIV および HIV におけるアンチセンスタンパク質の進化解析」ポスター、梁田麻佳、永田祥平、富田勝、佐藤裕徳 金井昭夫、第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 11 月 30 日（水）～12 月 2 日（金）、神奈川（パシフィコ横浜）

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. H28. 7. 22 に専門家と一般人を対象に開催された「CBI 学会研究講演会」において講演し、コンピュータ科学を感染症対策に活用した事例（HIV を含む）を説明した。 佐藤裕徳 「ウイルス感染症と計算科学」、第 374 回 CBI 学会研究講演会、感染症研究の将来 ～グローバルヘルスに貢献する創薬～、2016 年 7 月 22 日（金）、東京（東京大学山上会館）。
2. H28. 7. 31 に一般人を対象に開催された「国立感染症研究所村山庁舎一般公開」において、エイズ研究センターと共同でポスターと HIV 分子模型を展示した。HIV/AIDS 問題、並びにその解決に向けた取り組みの一つとして、コンピュータ科学の活用を説明した。国立感染症研究所村山庁舎一般公開（小谷治、横山勝、佐藤裕徳、山本浩之）

（４）特許出願

該当なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名： (日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の創薬シーズ創成
(英語) Creation of new research bases of structural and evolutionary biology of HIV Gag proteins for drug seeds discovery

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人徳島大学 教授 野間口雅子
所属 役職 氏名： (英語) Tokushima University, Professor, Masako Nomaguchi

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) Gag-CA ヘリックス7とリンカードメインの機能解明に基づく創薬シード探索

開発課題名： (英語) Seed search for anti-viral drugs based on functional elucidation of the helix 7-linker region in HIV-1 Gag-CA

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 佐藤裕徳
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 5件)

1. *Yokoyama M, *Nomaguchi M, Doi N, Kanda T, Adachi A, Sato H. In silico analysis of HIV-1 Env-gp120 reveals structural bases for viral adaptation in growth-restrictive cells. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, article 11. *, Co-first author
2. Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A,

Akari H, Sato H, Shioda T. Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. *Journal of General Virology*. 2016, 97, 963-76.

3. Nomaguchi M, Doi N, Sakai Y, Ode H, Iwatani Y, Ueno T, Matsumoto Y, Miyazaki Y, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels. *Journal of Virology*. 2016, 90, 4563-78.
4. Sakai Y, Miyake A, Doi N, Sasada H, Miyazaki Y, Adachi A, Nomaguchi M. Expression profiles of Vpx/Vpr proteins are co-related with the primate lentiviral lineage. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, article 1211.
5. Sakai Y, Doi N, Miyazaki Y, Adachi A, Nomaguchi M. Phylogenetic insights into the functional relationship between primate lentiviral reverse transcriptase and accessory proteins Vpx/Vpr. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, article 1655.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Effects of mutations HIV-1 Gag-CA helix 7 and linker domain on the virion production, ポスター, Fujimoto K, Doi N, Sakai Y, Adachi A, Nomaguchi M, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
2. An ultra-low vif type of HIV-1 SA1D2prox variant can adapt and evolve under the high level of APOVEC3G. ポスター, Adachi A, Doi N, Sakai Y, Fujimoto K, Nomaguchi M, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
3. Identification of cis-elements involved in the HIV-1 vif mRNA production, ポスター, Nomaguchi M, Doi N, Fujimoto K, Sakai Y, Nakanishi S, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
4. Replication and pathogenicity of HIV-1rmt: towards evaluation of viral growth ability in gut-derived cells, ポスター, Doi N, Ishifune C, Yasutomo K, Miura T, Sakai Y, Fujimoto K, Harada S, Yoshimura K, Nomaguchi M, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
5. Studies on the adaptation process of HIV-1 Env in macaque cells, ポスター, Sakai Y, Fujimoto K, Doi N, Nomaguchi M, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
6. 中和抵抗性かつ CCR5 指向性の新規 HIV-1rmt の構築, ポスター, 川上朗彦, 姫野愛, 菊川美奈子, 石田裕樹, 野間口雅子, 足立昭夫, 三浦智行, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名：(日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の創薬シーズ創成

(英語) Creation of new research bases of structural and evolutionary biology of HIV Gag proteins for drug seeds discovery

研究開発担当者 (日本語) 横浜市立大学大学院医学研究科微生物学, 助教, 宮川 敬

所属 役職 氏名：(英語) Department of Microbiology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Assistant professor, Kei Miyakawa

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成30年 3月 31日

分担研究 (日本語) Gag 相互作用因子の包括的同定法の開発と未知の Gag 機能制御機構解明への応用

開発課題名：(英語) Identification and functional characterization of Gag-binding factors

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第二室・佐藤裕徳 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

（１）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Miyakawa K, Nishi M, Matsunaga S, Okayama A, Anraku M, Kudoh A, Hirano H, Kimura H, Morikawa Y, Yamamoto N, Ono A, Ryo A: The tumor suppressor APC promotes HIV-1 assembly via interaction with Gag precursor protein. Nature Communications. 2017, 8, 14259.
2. Kudoh A, Miyakawa K, Matsunaga S, Matsushima Y, Kosugi I, Kimura H, Hayakawa S, Sawasaki T, Ryo A: H11/HSPB8 Restricts HIV-2 Vpx to Restore the Anti-Viral Activity of SAMHD1. Frontiers in Microbiology. 2016, 7, 883.
3. Ichiyama K, Yang C, Chandrasekaran L, Liu S, Rong L, Zhao Y, Gao S, Lee A, Ohba K, Suzuki Y, Yoshinaka Y, Shimotohno K, Miyakawa K, Ryo A, Hedrick J, Yamamoto N, Yang YY: Cooperative Orthogonal Macromolecular Assemblies with Broad Spectrum Antiviral Activity, High Selectivity, and Resistance Mitigation. Macromolecules. 2016, 49 (7), 2618-2629.

（２）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Identification of a host factor that restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction, ポスター, Miyakawa K, Matsunaga S, Kudoh A, Ryo A, RAI Amsterdam, 2016/4/9, 国外.
2. NanoBRET 法を用いた生細胞内 HIV-1 Gag の多量体化解析および結合宿主因子探索, 口頭, 宮川 敬, 松山慎一郎, 村上 努, 梁 明秀, かがしま県民交流センター, 2016/11/26, 国内.
3. ケミカルバイオロジーを用いた HIV 再活性化のメカニズム解析, 口頭, 岩瀬早織, 宮川 敬, 工藤あゆみ, 梁 明秀, かがしま県民交流センター, 2016/11/25, 国内.

（３）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

（４）特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業 エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名：(日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の創薬
シーズ創成
(英語) Creation of new research bases of structural and evolutionary biology of HIV Gag
proteins for drug seeds discovery

研究開発担当者 (日本語) 微生物病研究所 助教 櫻木 淳一
所属 役職 氏名：(英語) Research Institute for Microbial Diseases・
Assistant Professor・Junichi Sakuragi

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要(総括研究報告)

研究開発代表者：国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 佐藤裕徳
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌0件、国際誌1件)

1. Sakuragi S, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Sakuragi JI. SL1 revisited: functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. Retrovirology. 2016 Nov 11;13(1):79.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. SL1 revisited: functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. Poster Presentation, Sakuragi JI., Frontiers of Retrovirology Conference 2016, 20160912-14, Erlangen, Germany. 海外
2. SL1 revisited: functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. Oral

Presentation, Sakuragi JI., 10th IRNCAS, 20160918-21, Montpellier, France. 海外

3. Functional Analysis of HIV-1 Gag p1. Oral Presentation, Sakuragi JI., 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、20161023-25、札幌、国内
4. HIV-1 Gag p1 の機能的解析、櫻木淳一、第 30 回日本エイズ学会学術集会、20161124-26、鹿児島、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 感染症実用化研究事業 エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名 : (日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の
創薬シーズ創成
(英語) Creation of new research bases of structural and evolutionary biology
of HIV Gag proteins for drug seeds discovery

研究開発担当者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授・久保嘉直
所属 役職 氏名 : (英語) Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences,
Associate Professor, Yoshinao Kubo

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) HIV の感染成立と粒子形成を抑制する新規宿主防御因子の同定に基づく
創薬シード探索

開発課題名 : (英語) Searching a therapeutic seed based on host defense factors
that inhibit HIV-1 infection and virion formation.

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・佐藤裕徳
総括研究報告を参照。

和文

インターフェロン（IFN）は抗ウイルス活性を持つサイトカインで、受容体の違いにより I、II、III 型に分けられる。I 型 IFN によるウイルス増殖抑制機構は詳細に研究されているが、II 型 IFN のそれは、ほとんど解明されていない。一方、我々は以前に、ヒト免疫不全症ウイルス（HIV）と同じレトロウイルスに属するマウス白血病ウイルス（MLV）がエンドソームを介して細胞内に侵入することを突き止めた。よって我々は、II 型 IFN 誘導性でエンドソームに局在する thiolreductase（GILT）が HIV や MLV の感染を抑制するのではないかと考えた。GILT を発現する細胞では、HIV 感染が低下した。細胞の II 型 IFN 処理は HIV 感染を抑制したが、GILT をノックダウンした細胞の II 型 IFN 処理は抑制しなかった。これらの結果は、II 型 IFN が GILT 発現を誘導することにより HIV 感染を抑制することを示している。GILT の thiolreductase 酵素活性中心であるシステイン残基をセリンに置換した変異体は、HIV 感染を抑制しなかった。この結果は、GILT の thiolreductase 活性が HIV 感染を抑制することを示している。Thiolreductase と同様に、蛋白質 S-S 結合形成を抑制する低分子化合物 4-PDS も HIV 感染を抑制することを突き止め、新規治療薬のリード化合物となる可能性を示唆した。

また GILT は HIV 感染だけでなく、ウイルス粒子形成に必須な宿主因子 CD63 の S-S 結合を切断することにより HIV 粒子形成を抑制することを突き止めた。しかし、CD63 がどのようにして HIV 粒子形成に関わっているのか解明されていない。この問題を解決するため、CD63 に結合する細胞因子の同定を試みた。我々は Rab3a が CD63 に結合し、CD63 の分解を促進することを突き止めた。また CD63 は HIV 粒子に効率良く取り込まれるが、Rab3a は取り込まれないことを見出した。これらの結果から、Rab3a が結合した CD63 は分解経路に進み、Rab3a が結合していない CD63 が HIV 粒子に取り込まれることを発見した（投稿中）。

英文

Interferons (IFNs) are anti-virus cytokines, and are divided to three types. The anti-virus mechanism of type I IFN is vigorously studied, but that of type II IFN is not. On the other hand, we previously reported that murine leukemia virus (MLV), a member of retroviruses including human immunodeficiency virus (HIV), enters into host cells via endosomes. Thus, we speculated that IFN-g-inducible, endosome-localized thiolreductase, GILT, inhibits HIV and MLV infection. HIV infection was attenuated in GILT-expressing cells. Treatment with IFN-g inhibited HIV infection in control cells, but not in GILT-silenced cells. These results showed that IFN-g restricts HIV infection by inducing GILT. A GILT mutant containing amino acid substitutions at the thiolreductase active sites of GILT did not inhibit HIV infection, indicating that the thiolreductase activity of GILT suppresses HIV infection. Like GILT, a low molecular size compound, 4-PDS, which inhibits S-S bond formation, also suppressed HIV infection. 4-PDS is the possible lead compound for development of novel therapeutic drugs.

In addition, GILT inhibited HIV virion formation by digesting the disulfide bonds of CD63 that is involved in the virion formation. However, it is not elucidated how CD63 is involved in the HIV virion formation. To understand the mechanism, we tried to identify CD63-binding

proteins. We found that Rab3a binds to CD63 and induces CD63 degradation. Although CD63 was efficiently incorporated into HIV particles, Rab3a was not detected in the virion-containing fractions. These results showed that Rab3a-bound CD63 is degraded and Rab3a-free CD63 is incorporated into HIV particles.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. KUBO Y, IZUMIDA M, YASHIMA Y, YOSHII-KAMIYAMA H, TANAKA Y, YASUI K, HAYASHI H, MATSUYAMA T. Gamma-interferon-inducible, lysosome/endosome-localized thiolreductase, GILT, has anti-retroviral activity and its expression is counteracted by HIV-1. *Oncotarget*. 2016, 7, 71255-71273.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Role of a CD63-binding protein, Rab3a, in virion formation of HIV-1、口頭、久保嘉直、泉田真生、林日出喜、松山俊文、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23、札幌

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業 エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名：(日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の創薬
シーズ創成
(英語) Creation of new research bases of structural and evolutionary biology
of HIV Gag proteins for drug seeds discovery

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ユニットリーダー 間陽子
所属 役職 氏名：(英語) RIKEN Unit Leader Yoko Aida
実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) Gag p6 蛋白質の機能を標的とする創薬シード探索
開発課題名：(英語) Exploration of a novel class of HIV-1 inhibitor targeting the Gag p6
function

II. 成果の概要(総括研究報告)

和文

近年、多剤併用療法の確立によりエイズ発症を遅らせることが可能となったが、耐性ウイルスの出現と潜伏感染細胞を完全に排除できないことがエイズの根治を不可能にしている。HIV-1 粒子の放出課程は、Gag 蛋白質の p6 領域内に存在する”Late (L) domain”モチーフと後期エンドソーム分子群 Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)との結合を通じて制御される。L domain モチーフの一つが PTAP モチーフと呼ばれ、ESCRT 蛋白質の一つである Tsg101 の UEV domain と結合することで Gag 前駆体が輸送されウイルス粒子が出芽する。事実、PTAP モチーフに変異を導入する、あるいは Tsg101 発現をノックダウンするとウイルス粒子の放出は阻害される事が明らかになっている。そこで本研究では、現行のエイズ治療である多剤併用療法とは異なる作用点を有する、そして耐性発現の低い新規 HIV 薬の開発を目指して、Gag p6 と Tsg101 との相互作用を標的とする新規阻害剤候補の創製を行った。

構造多様性を考慮した9600個の化合物を含むライブラリーから、Tsg101とGag p6の結合を定量できる酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) -based binding assay (1次評価)を構築してTsg101とGag p6の結合を10 μ M の濃度で阻害する化合物11個を取得した。次に、異なる化合物の濃度を使用して、これらの化合物のTsg101とGag p6の結合阻害効果のEC₅₀を解析したところ、5個の化合物は濃度依存的にTsg101とGag p6の結合を阻害した[EC₅₀ values : 3.37 $\pm$ 1.12 μ M (HSM1) , 4.90 $\pm$ 1.72 μ M (HSM1) , 3.37 $\pm$ 1.12 μ M

(HSM3) , $2.31 \pm 0.88 \mu\text{M}$ (HSM4) , $2.90 \pm 1.34\mu\text{M}$ (HSM1) , $3.68 \pm 0.74\mu\text{M}$ (HSM10)。続いて、5個の化合物のTsg101とGag p6の結合阻害効果を、GST-pull down法（2次評価）で確認したところ、HSM4, HSM9 およびHSM10の3個のみが濃度依存的にTsg101とGag p6の結合を阻害した。そこで、WST法による細胞毒性測定法（3次評価）およびp24ELISAによる抗ウイルス活性測定法（4次評価）を用いて解析した結果、HSM9およびHSM10が、CD4陽性CEM細胞に対して低い細胞毒性 [CC_{50} values : $11.52 \pm 0.51 \mu\text{M}$ (HSM9) と $> 20 \mu\text{M}$ (HSM10)]を示し、高い抗ウイルス活性 [IC_{50} values: 0.59 ± 0.13 (HSM9) と $9.41 \pm 2.44 \mu\text{M}$ (HSM10)]を示した。

HSM9およびHSM10化合物の抗ウイルス活性の作用機構を解析した。まず、セファローズビーズを用いた結合実験を行い、両化合物はTsg101ではなく、Gag p6に特異的に結合することが明らかとなった。そこで、Gag p6と化合物間の結合親和力をBiacoreを用いて解析した。GST-Gagをセンサーチップに固定化し、HSM9およびHSM10化合物を異なる濃度で流したところ、HSM9およびHSM10は乖離速度定数が $7.53 \mu\text{M}$ および $0.13 \mu\text{M}$ でGag p6に結合した。続いて、Gag p6と化合物のドッキングシミュレーション解析実験の結果、HSM10はPTAP モチーフ中のThr456あるいはAla457残基に、HSM9はGag p6の5カ所のポケット構造に結合する可能性が示された。さらに、これらの化合物はウイルス様粒子 (VLP) の出芽を減少させた。

本研究において、Gag p6とTsg101との結合を阻害することでウイルス複製を阻害する低分子化合物を取得することに成功した。以上の結果から、Tsg101とGag p6の結合が新しい抗HIV薬の標的になることが立証された。

英文

Since the introduction of combination antiretroviral therapy, both morbidity and mortality associated with acquired immunodeficiency syndrome caused by HIV-1 infection have fallen significantly. However, a new class of anti-HIV-1 drugs is still required to combat drug-resistant viruses and remove the need for life-long treatment. The assembly/budding of HIV-1 particles is initiated by the interaction between viral Gag and cellular tumor suppressor gene 101 (TSG101) proteins via their p6 PTAP motif and ubiquitin E2 variant (UEV) domain, respectively. Interfering with the Gag-TSG101 interaction by mutating the Gag PTAP motif and overexpression of TSG101 clearly inhibit viral release by tethering viral particles to the plasma membrane. Depleting or mutating TSG101 at sites associated with Gag PTAP motif binding also results in defective viral release. Taken together, the results of previous studies suggest that the Gag-TSG101 interaction is a promising target for a new class anti-HIV-1 drugs.

Here, we used an ELISA assay based on Gag and TSG101 to develop a high-throughput screening (HTS) system to test for candidate compounds that inhibit the Gag-TSG101 interaction. The HTS finally identified 11 compounds that inhibited the Gag-TSG101 interaction at a concentration of $10 \mu\text{M}$. Out of 11 compounds, five hit compounds that inhibited the Gag-TSG101 interaction in a dose-dependent manner were then identified as hit compound (HSM-1, HSM-3, HSM-4, HSM-9, and HSM-10 at EC_{50} values, 3.37 ± 1.12 , 4.90 ± 1.72 , 2.31 ± 0.88 , 2.90 ± 1.34 , and $3.68 \pm 0.74 \mu\text{M}$, respectively). Out of 6 compounds, HSM-4, HSM-9, and HSM-10 were verified for inhibitory effect on Gag-TSG101 interaction by pull-down and western blot analysis of bound TSG101. Furthermore, out of three compounds, two hit compounds, HSM-9 and HSM-10, inhibited HIV-1 replication with IC_{50} values of 0.59 ± 0.13 and $9.41 \pm 2.44 \mu\text{M}$, respectively, while affected cell viability at CC_{50} values of 11.52 ± 0.51 and $> 20 \mu\text{M}$, respectively.

The above results clearly demonstrate that HSM-9 and HSM-10 suppress HIV-1 replication by

targeting the Gag-TSG101 interaction. Therefore, we next examined the mechanism by which HSM-9 and HSM-10 inhibit viral replication. Photo-crosslinked small-molecule affinity binding assays and Biacore analyses suggested that both HSM-9 and HSM-10 target the Gag protein to block the Gag-TSG101 interaction. In addition, *in silico* docking studies predicted that HSM-9 bound to a region within the p6 domain of Gag, whereas HSM-10 may interact with the Thr456 or Ala457 residues within the Gag PTAP motif via hydrogen bond. VLP produced by pCAGGS/Gag-transfected HEK293T cells in the presence of HSM-9 or HSM-10 was detected by western blot analysis of VLP Gag in the culture medium. This study demonstrates that Gag-TSG101 interaction is a promising target for a new class of anti-HIV-1 drugs and provides a core structure of hit compounds.

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立感染症研究所 佐藤 裕徳 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Chutiwitoonchai N, Siarot L, Takeda E, Shioda T, Ueda M, Aida Y. HIV-1 Vpr abrogates the effect of TSG101 overexpression to support virus release. PloS ONE. 2016, 11(9): e0163100.
2. Miyatake H, Sanjoh A, Murakami T, Murakami H, Matsuda G, Hagiwara K, Yokoyama M, Sato H, Miyamoto Y, Dohmae N, Aida Y. Molecular Mechanism of HIV-1 Vpr for Binding to Importin- α . 2016, JMB. 428(13), 2744-57,.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト免疫不全ウイルス1 型（HIV-1）Gagと宿主因子TSG101との相互作用を標的とする新規HIV薬の開発、口頭、Lowela Siarot、佐藤洋隆、Nopporn Chutiwitoonchai、小谷治、横山勝、佐藤裕徳、本田香織、近藤恭光、長田裕之、間陽子、第159回日本獣医学会学術集会、2016/9/9、国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 21 世紀の感染症、間陽子、わこう街づくり NPO 講演、2016/2/19、国内
2. 浄化槽とウイルス、平成 28 年度浄化槽フォーラム in 霞ヶ浦 遊べる河川、泳げる霞ヶ浦を目指して～浄化槽による公衆衛生と生態系保全～、間陽子、2016/7/16、国内
3. 21 世紀の感染症に挑む、間陽子、第 70 回日本細菌学会東北支部総会、2016/8/18、国内

(4) 特許出願

無し

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名： (日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の創薬シード創成
(英語) Creation of new research bases of structural and evolutionary biology of HIV Gag proteins for drug seeds discovery

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授 玉村啓和
所属 役職 氏名： (英語) Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Professor, Hirokazu Tamamura

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の創薬シード創成

開発課題名： (英語) Creation of new research bases of structural and evolutionary biology of HIV Gag proteins for drug seeds discovery

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授 玉村啓和
所属 役職 氏名： (英語) Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Professor, Hirokazu Tamamura

分担研究 (日本語) インテグラーゼの Gag 集合・粒子形成における未知機能の解明

開発課題名： (英語) Elucidation of integrase during virus assembly and formation

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授 増田貴夫
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University. Associate Professor. Takao Masuda

分担研究 (日本語) HIV コア脱殻の分子機序に基づく創薬シード探索

開発課題名： (英語) Drug discovery research on the basis of the elucidation of a mechanism of HIV-1 uncoating

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 助教 武内 寛明
所属 役職 氏名: (英 語) Graduate school, Department of Molecular Virology, Tokyo Medical and
Dental University / Assistant Professor / Hiroaki Takeuchi

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者: 国立感染症研究所エイズ研究センター・病原体ゲノム解析研究センター第二室・佐藤 裕徳 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4 件、国際誌 12 件)

【玉村啓和】

1. 野村 渉、玉村啓和. 多価型 CXCR4 リガンドの創製とがん細胞イメージング・検出. 医学のあゆみ 第 5 土曜特集「GPCR 研究の最前線 2016」. 2016, 256, 5, 430-437.
2. 玉村啓和. 中分子創薬の可能性—ペプチドを創薬へと展開する—. 現代化学 . 2016, 6 月号, 543, 47-51.
3. 大橋南美、玉村啓和. ペプチドミメティックを活用した中分子創薬の研究. 化学工業 特集「ペプチド化学の最前線(I)」. 2016, 67, 10, 9-17.
4. 野村渉、玉村啓和. 細胞内タンパク質を可視化するタグ-蛍光プローブシステム. 「生化学」みにれびゅう. 2016, 89, 1, 1-6.
5. Takaaki Mizuguchi, Shigeyoshi Harada, Tomoyuki Miura, Nami Ohashi, Tetsuo Narumi, Hiromi Mori, Yu Irahara, Yuko Yamada, Wataru Nomura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura, Hirokazu Tamamura. A Minimally Cytotoxic CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016, 26, 2, 397-400.
6. Nami Ohashi, Shigeyoshi Harada, Takaaki Mizuguchi, Yu Irahara, Yuko Yamada, Misato Kotani, Wataru Nomura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura, Hirokazu Tamamura. Small Molecular CD4 Mimics Containing Mono-cyclohexyl Moieties as HIV Entry Inhibitors. ChemMedChem a joint special issue with ChemBioChem: Protein-Protein Interactions. 2016, 11, 8, 940-946.
7. Aisha Abduelmula, Ruijin Huang, Qin Pu, Hirokazu Tamamura, Gabriela Morosan-Puopolo, Beate Brand-Saberi. SDF-1 Controls the Muscle and Blood Vessel Formation of the Somite. Int. J. Dev. Biol. 2016, 60, 1-2-3, 29-38.
8. Kenichi Hiramatsu, Hirokazu Tamamura. A Mild Method for the Direct Fluorination of Pyrroles by Using a Lipophilic Anionic Phase-Transfer Catalyst. Eur. J. Org. Chem. 2016, 21, 3491-3494.
9. Kei Toyama, Takaaki Mizuguchi, Wataru Nomura, Hirokazu Tamamura. Functional Evaluation of Fluorescein-Labeled Derivatives of a Peptide Inhibitor of the EGF Receptor Dimerization. Bioorg. Med. Chem. 2016, 24, 16, 3406-3412.
10. Takuya Kobayakawa, Hirokazu Tamamura. Efficient Synthesis of Xaa-Gly Type (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres via Organocuprate Mediated Reduction. Tetrahedron. 2016, 72, 32, 4968-4971.

11. Tomofumi Nakamura, Joseph R. Campbell, Amber R. Moore, Sachiko Otsu, Haruo Aikawa, Hirokazu Tamamura, Hiroaki Mitsuya. Development and Validation of a Cell-based Assay System to Assess Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase Multimerization. *J. Virol. Methods*. 2016, 236, 196-206.
12. Takaaki Mizuguchi, Nami Ohashi, Daichi Matsumoto, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Naoki Yamamoto, Tsutomu Murakami, Hirokazu Tamamura. Development of Anti-HIV Peptides Based on a Viral Capsid Protein. *Biopolymers: Peptide Science*. in press.
13. Tomohiro Tanaka, Toru Aoki, Wataru Nomura, Hirokazu Tamamura. Bivalent 14-mer Peptide Ligands of CXCR4 with Polyproline Linkers with Anti-Chemotactic Activity against Jurkat Cells. *J. Pept. Sci.* in press.
14. Hikaru Takano, Tetsuo Narumi, Wataru Nomura, Hirokazu Tamamura. Microwave-Assisted Synthesis of Azacoumarin Fluorophores and the Fluorescence Characterization. *J. Org. Chem.* in press.

【増田貴夫】

1. Takahata, T., Takeda, E., Tokunaga, K., Yokoyama, M., Huang, Y-L., Hasegawa, A., Shioda, T., Sato H, Kannagi, M., Masuda T. Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase. *J. Virol.* 2017, 91, e02003-16.
2. Nomaguchi, M., Doi, N., Sakai, Y., Ode, H., Iwatani, Y., Ueno, T., Matsumoto, Y., Miyazaki, Y., Masuda, T., Adachi, A. Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels. *J. Virol.* 2016, 90: 4563-4578.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

【玉村啓和】

1. Mid-Size Drugs: HIV Fusion Inhibitors Based on the C34 Dimer/Trimer Derived from gp41, 口頭, Tamamura H, The 20th Korean Peptide Protein Society Symposium, Yangyang, Korea, Jun 24, 2016, 国外.
2. Protein Dynamics Imaging Using Tag-probe Systems, 口頭, Nomura W, Ohashi N, Tamamura H, The 14th Chinese International Peptide Symposium & the 5th Asia-Pacific International Peptide Symposium, Nanjing, China, Jul 6, 2016, 国外.
3. Mid-sized drugs based on peptide mimetics, 口頭, Tamamura H, 15th Surugadai International Symposium, Tokyo, Japan, Nov 29, 2016, 国外.
4. Mid-size Drugs: Peptide-lead Anti-HIV Agents, 口頭, Tamamura H, The 2nd Peptides and Proteins Symposium Singapore, Singapore, Singapore, Dec 9, 2016, 国外.
5. Development of water-soluble and highly photosensitive 8-azacoumarin-4-ylmethyl-type photolabile-protecting groups for dynamic analysis of bioactive molecules, ポスター, Takano H, Narumi T, Nomura W, Furuta T, Tamamura H, 251st American Chemical Society National Meeting, San Diego, USA, Mar 16, 2016, 国外.
6. In-cell fluorogenic tag-probe system for protein localization and dynamics imaging, 口頭, Nomura W, Ohashi N, Tamamura H, 251st American Chemical Society National Meeting,

San Diego, USA, Mar 17, 2016, 国外.

7. Tag-probe Systems for Protein Dynamics Imaging, 口頭, Nomura W, Ohashi N, Tamamura H, The 16th Akabori Conference: Japanese-German Symposium on Peptide Science, Kobe, Japan, May 24, 2016, 国外.
8. Chemically-inducible gene regulation system utilizing sequence-specificity of TALE and dCas9, 口頭, Nomura W, Sugii T, Tamamura H, FASEB SRC: Genome Engineering: Cutting-Edge Research and Applications, Lisbon, Portugal, Jun 8, 2016, 国外.
9. Development of New Fluorescein-Labeled Peptides with Inhibitory Effect on the EGF Receptor Activation, ポスター, Toyama K, Mizuguchi T, Nomura W, and Tamamura H, The 20th Korean Peptide Protein Society Symposium, Yangyang, Korea, Jun 24, 2016, 国外.
10. Synthesis of Anti-Integrase Stapled Peptides with a Soluble Linker, 口頭, Miyaki D, Mizuguchi T, Nomura T, Takahashi D, Tamamura H, The 14th Chinese International Peptide Symposium & the 5th Asia-Pacific International Peptide Symposium, Nanjing, China, Jul 6, 2016, 国外.
11. Development of synthetic methodology of chloroalkene-type dipeptide isosteres for peptidomimetics, ポスター, Kobayakawa T, Tamamura H, 252nd American Chemical Society National Meeting, Philadelphia, USA, Aug 23, 2016, 国外.
12. Mid-Size Drugs: Dimer& Trimer Mimics of HIV-gp41 Peptides as Fusion Inhibitors, 口頭, Tamamura H, 34th European Peptide Symposium 2016 & 8th International Peptide Symposium, Leipzig, Germany, Sep 5, 2016, 国外.
13. Development of a Hydrophilic Caged PKC Ligand with an 8-Azacoumarin Photolabile Protecting Group for the Precise Photocontrol of PKC Activation, Takano H, Nomura W, Tamamura H, 34th European Peptide Symposium 2016 & 8th International Peptide Symposium, Leipzig, Germany, Sep 8, 2016, 国外.
14. Functional Evaluation of Fluorescein-Labeled Peptides Based on the EGF Receptor Dimerization Arm Sequences, ポスター, Toyama K, Mizuguchi T, Nomura W, Tamamura H, 34th European Peptide Symposium 2016 & 8th International Peptide Symposium, Leipzig, Germany, Sep 8, 2016, 国外.
15. Development of Chloroalkene Dipeptide Isosteres as Peptidomimetics and Their Application, ポスター, Kobayakawa T, Matsuzaki Y, Nomura W, Hozumi K, Nomizu M and Tamamura H, The 2nd Peptides and Proteins Symposium Singapore. Singapore, Singapore, Dec 8, 2016, 国外.
16. Design of synthetic peptides mimicking dynamic supramolecular mechanisms in HIV fusion as antigens and inhibitors against trimer-form of gp41, 口頭, Nomura W, Tamamura H, Antibody Engineering & Therapeutics, San Diego, California, Dec 12, 2016, 国外.
17. ペプチド化学と創薬化学, 口頭, 玉村啓和, 東京薬科大学薬学部講義, 東京, 2016年4月6日, 国内.
18. ペプチド性医薬品を基盤とした中分子創薬, 口頭, 玉村啓和, 技術情報協会「ペプチド医薬品の最新研究と吸収性を改善する製剤の開発」, 東京, 2016年7月14日, 国内.
19. HIV envelope の構造変化をターゲットとした阻害剤の創製, 口頭, 玉村啓和, 第30回日本エイズ学会学術集会シンポジウム「HIV envelope を標的とした感染防御」, 鹿児島, 2016年11月25日, 国内.

20. ペプチドミメティックを活用した中分子創薬の研究, 口頭, 玉村啓和, システム薬学研究機構「第8回新たな創薬パラダイムの創出」, 東京, 2017年1月13日, 国内.
21. ペプチドミメティックを活用した中分子創薬, 口頭, 玉村啓和, 東京医科歯科大学 第5回医歯工連携ブレインストーミング, 東京, 2017年1月30日, 国内.
22. ペプチドミメティックを活用した中分子創薬, 口頭, 玉村啓和, 東京医科歯科大学 第5回医歯工連携ブレインストーミング, 東京, 2017年2月2日, 国内.
23. Entry Inhibitors an HIV Envelope Protein gp120:CD4 Mimics Containing Mono-cyclohexyl Moieties, 口頭, 大橋南美, 苛原 優, 原田恵嘉, 水口貴章, 小谷みさと, 石田有佑, 山田裕子, 三浦智行, 野村 渉, 松下修三, 吉村和久, 玉村啓和, 日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会, 京都, 2016年6月15日, 国内.
24. Construction of Gene Regulation System Utilizing Chemical Tools, 口頭, 野村 渉, 杉井太亮, 玉村啓和, 日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会, 京都, 2016年6月15日, 国内.
25. 細胞を用いた新規評価系の確立と HIV-Gag タンパク質を基盤とした新規抗 HIV 活性ペプチドの創出, ポスター, 水口貴章, 大橋南美, 小森谷真央, 松本大地, 野村 渉, 村上 努, 玉村啓和, 創薬懇話会 2016 in 蓼科, 蓼科, 2016年6月30日, 国内.
26. クロロアルケン骨格を基軸とするペプチドミメティックスの創製研究, ポスター, 小早川拓也, 玉村啓和, 創薬懇話会 2016 in 蓼科, 蓼科, 2016年6月30日, 国内.
27. ケミカルツールを利用した遺伝子発現調節機構の構築と応用, 松本大亮, 野村 渉, 杉井太亮, 玉村啓和, 創薬懇話会 2016 in 蓼科, 蓼科, 2016年6月30日, 国内.
28. HIV 膜融合阻害剤を指向した外被タンパク質 gp41 由来ペプチド C34 の二量体誘導体の創製, ポスター, 海老原健人, 本田柚子奈, 水口貴章, 野村 渉, 玉村啓和, 創薬懇話会 2016 in 蓼科, 蓼科, 2016年6月30日, 国内.
29. エピゲノム編集を志向した DNA 結合タンパク質融合型メチル化酵素の創製研究, ポスター, 橋本 司, 野村 渉, 大浦伊代, 玉村啓和, 創薬懇話会 2016 in 蓼科. 蓼科, 2016年6月30日, 国内.
30. 分割型人工ヌクレゼを用いた化合物誘導型ゲノム編集系の構築, 口頭, 松本大亮, 野村 渉, 玉村啓和, 第48回若手ペプチド夏の勉強会, 八王子, 2016年8月1日, 国内.
31. HIV外被タンパク質 gp41 由来ペプチドを基にした二価型膜融合阻害剤, ポスター, 海老原健人, 本田柚子奈, 水口貴章, 野村 渉, 藤野真之, 村上 努, 玉村啓和, 第48回若手ペプチド夏の勉強会, 八王子, 2016年8月1日, 国内.
32. TALE および dCas9 を利用した化合物による標的遺伝子特異的な転写活性制御技術, ポスター, 野村 渉, 杉井太亮, 玉村啓和, 第10回 バイオ関連化学シンポジウム, 金沢, 2016年9月7日, 国内.
33. 化合物による制御可能なゲノム編集を目指した分割型人工ヌクレアーゼの構築, ポスター, 松本大亮, 野村 渉, 玉村啓和, 第10回 バイオ関連化学シンポジウム, 金沢, 2016年9月7日, 国内.
34. 分割型人工DNAメチル化酵素のDNA結合様式の違いによる酵素活性への影響, ポスター, 橋本 司, 野村 渉, 大浦伊代, 玉村啓和, 第10回 バイオ関連化学シンポジウム, 金沢, 2016年9月8日, 国内.
35. クロロアルケン構造を基軸としたペプチド結合模倣体の創製研究, 口頭, 小早川拓也, 玉村啓和, 第60回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016年9月17日, 国内.
36. グアニジノ基を有する新規CD4ミミックの構造活性相関研究, 口頭, 石田有佑, 大橋南美, 原田

- 恵嘉, 水口貴章, 苛原 優, 小谷みさと, 山田裕子, 野村 渉, 松下修三, 吉村和久, 玉村啓和, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016 年 9 月 17 日, 国内.
37. HIV カプシドタンパク質の Cyclophilin A 結合部位を基にした阻害ペプチドの創製研究, 口頭, 金子萌美, 水口貴章, 松本大地, 大橋南美, 野村 渉, 村上 努, 玉村啓和, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016 年 9 月 17 日, 国内.
38. HIV カプシドタンパク質のリンカー領域に由来する阻害ペプチドに関する研究, 口頭, 倉田直幸, 水口貴章, 大橋南美, 谷田部夏香, 野村 渉, 村上 努, 玉村啓和, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016 年 9 月 17 日, 国内.
39. 末端架橋型 ZIP タグプローブペアの創製, 口頭, 斉藤 歩, 大橋南美, 野村 渉, 玉村啓和, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016 年 9 月 17 日, 国内.
40. PKC C1 ドメインを標的とする二価型リガンドの合成, 口頭, 槻木敏彦, 大橋南美, 小林亮介, 野村 渉, 玉村啓和, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016 年 9 月 17 日, 国内.
41. 標的配列上での会合様式の違いによる分割型 DNA メチル化酵素の活性への影響, 口頭, 橋本司, 野村 渉, 大浦伊代, 玉村啓和, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016 年 9 月 17 日, 国内.
42. Anti-HIV peptides derived from matrix and capsid proteins and an efficient cell-Based anti-HIV assay method using chloroquine, ポスター, Mizuguchi T, Ohashi N, Matsumoto D, Komoriya M, Nomura W, Hashimoto C, Fujino M, Murakami T, Tamamura H, 第 53 回ペプチド討論会, 京都, 2016 年 10 月 26 日, 国内.
43. Development of synthetic methodologies of chloroalkene dipeptide isosteres and their application, ポスター, Kobayakawa T, Matsuzaki Y, Nomura W, Hozumi K, Nomizu M, Tamamura H, 第 53 回ペプチド討論会, 京都, 2016 年 10 月 26 日, 国内.
44. Individual fragment peptides with HIV-1 inhibitory activity derived from HIV-1 matrix and capsid proteins, 口頭, Mizuguchi T, Fujino M, Matsumoto D, Kaneko M, Kurata N, Ohashi N, Nomura W, Murakami T, Tamamura H, 第 53 回ペプチド討論会, 京都, 2016 年 10 月 27 日, 国内.
45. Structure-Activity Relationship of Small CD4 Mimics Targeting HIV-1 gp120, ポスター, Konno K, Ishida Y, Harada S, Ohashi N, Kotani M, Irahara Y, Yamada Y, Mizuguchi T, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K and Tamamura H, 熊本エイズセミナー, 熊本, 2016 年 10 月 31 日, 国内.
46. Identification of Anti-HIV Peptides Derived from Capsid Proteins, ポスター, Kaneko M, Mizuguchi T, Matsumoto D, Yatabe N, Fujino M, Ohashi N, Nomura W, Murakami T, and Tamamura H, 熊本エイズセミナー, 熊本, 2016 年 10 月 31 日, 国内.
47. ジアシルグリセロール環化誘導体を基にした PKC 二価型リガンドの合成と機能評価, 口頭, 大橋南美, 小林亮介, 野村 渉, 玉村啓和, 第 42 回反応と合成の進歩シンポジウム, 清水, 2016 年 11 月 7 日, 松本大亮, 野村 渉, 玉村啓和. 化学誘導二量体形成法を応用したゲノム編集ツールの開発. 「細胞を創る」研究会 9.0. 東京, 2016 年 11 月 21 日, 国内.
48. 化学誘導二量体形成法を応用したゲノム編集ツールの開発, ポスター, 松本大亮, 野村 渉, 玉村啓和, 「細胞を創る」研究会 9.0, 東京, 2016 年 11 月 21 日, 国内.
49. ジアシルグリセロールラクトン誘導体を用いた protein kinase C の二価型リガンド合成, ポスター, 槻木敏彦, 大橋南美, 小林亮介, 野村 渉, 玉村啓和, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, つくば, 2016 年 11 月 30 日, 国内.

50. HIV 外皮タンパク質 gp41 由来ペプチド C34 を基にした二価型膜融合阻害剤の創製, ポスター, 海老原健人, 本田柚子奈, 水口貴章, 野村 渉, 藤野真之, 村上 努, 玉村啓和, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, つくば, 2016 年 11 月 30 日, 国内.
51. Soluble Anchor Support を用いたインテグラーゼ阻害活性を有するステーブルペプチドの合成, ポスター, 宮木大輔, 水口貴章, 野村 渉, 高橋大輔, 玉村啓和, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, つくば, 2016 年 12 月 1 日, 国内.
52. HIV カプシドタンパク質由来の部分ペプチドを基盤とした新規抗 HIV-1 阻害剤の創製, ポスター, 水口貴章, 藤野真之, 松本大地, 金子萌美, 倉田直幸, 谷田部夏香, 大橋南美, 野村 渉, 村上 努, 玉村啓和, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, つくば, 2016 年 12 月 1 日, 国内.
53. グアニジン誘導体を基盤とした新規低分子 CD4 ミミックの創製, ポスター, 石田有佑, 大橋南美, 原田恵嘉, 水口貴章, 苛原 優, 小谷みさと, 山田裕子, 野村 渉, 松下修三, 吉村和久, 玉村啓和, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, つくば, 2016 年 12 月 1 日, 国内.
54. 化合物による誘導が可能な分割型人工ヌクレアーゼの構築とその評価, ポスター, 松本大亮, 野村 渉, 玉村啓和, 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016 年 12 月 1 日, 国内.
55. 分割型メチル化酵素の会合様式が与えるメチル化効率への影響, ポスター, 橋本 司, 野村 渉, 大浦伊代, 玉村啓和, 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016 年 12 月 2 日, 国内.
56. 分割型部位特異的ヌクレアーゼを利用した化合物誘導型ゲノム編集技術の開発, ポスター, 松本大亮, 野村 渉, 玉村啓和, 日本化学会 第 97 春季年会. 横浜, 2017 年 3 月 19 日, 国内.

【増田貴夫】

1. Yu-Lun Huang, Tatsuro Takahata, Atsuhiko Hasegawa, Gota Kawai, Mari Kannagi and Takao Masuda. Role of 5' -end modification of HIV-1 RNA during reverse transcription. 第 64 回 日本ウイルス学会学術集会, ワークショップ. 2016/10/23/, 国内.

【武内寛明】

1. HIV-1 キャプシドコア構造体崩壊を制御する宿主因子群 ～それらの理解の深化から HIV-1 感染制御への展望～、シンポジウム講演、武内 寛明、第 30 回日本エイズ学会学術集会、2016/11/26、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当事項無し

(4) 特許出願

該当事項無し

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名：(日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の創薬シーズ創成
(英語) Creation of new research bases of structural and evolutionary biology of HIV Gag proteins for drug seeds discovery

研究開発担当者 (日本語) 森川裕子
所属 役職 氏名：(英語) Yuko Morikawa

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) HIV Gag 蛋白質と輸送因子の機能的相互作用解明に基づく創薬シード探索
開発課題名：(英語) Analysis of interaction functions of HIV Gag with trafficking factors for drug seeds screen

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・佐藤裕徳

総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

（１）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Miyakawa K, Nishi M, Matsunaga S, Okayama A, Anraku M, Kudoh A, Hirano H, Kimura H, Morikawa Y, Yamamoto N, Ono A, Ryo A. The tumor suppressor APC promotes HIV-1 assembly via interaction with Gag precursor protein. Nat Commun 2017, 8, 14259.
2. Takizawa N, Momose F, Morikawa Y, Nomoto A. Influenza A virus hemagglutinin tethers assembled viral genome to lipid raft and promote early step of budding process in infected cells. Viruses 2016, 8, 249.
3. Momose F, Morikawa Y. Polycistronic expression of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase by using the Thossea asigna virus 2A-like self-processing Sequence. Front Microbiol 2016, 7, 288.

（２）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Hagiwara S, Momose F, Matsuda Z, Morikawa Y. Identification of intracellular trafficking pathways of HIV-1 Env and Gag proteins by using Rab proteins. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23、札幌.
2. Kamo M, Tateishi H, Yamamoto M, Okamoto Y, Morikawa Y, Misumi S, Otsuka M, Fujita M. Elucidation of action mechanism of heterocyclic compound BMMP having anti-HIV activity. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/25、札幌.
3. Kamei F, Momose F, Morikawa Y. Co-transport mechanisms of influenza virus HA and NA for the apical plasma membrane. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23、札幌.
4. Momose F, Morikawa Y. Assessment of the potential interaction between the genome segments of influenza A virus by using reconstituted vRNP complexes. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23、札幌.
5. Sato R, Momose F, Takizawa N, Morikawa Y. Identification of the apical transport pathways of influenza virus HA and NA by using the Rab proteins. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23、札幌.

（３）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

（４）特許出願

平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金

(エイズ対策実用化研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

補助事業課題名 : (日本語) HIV Gag 蛋白質の機能と進化能の構造生物学研究に基づく次世代の創薬シーズ創成
(英語) **Creation of new research bases of structural and evolutionary biology of HIV Gag proteins for drug seeds discovery**

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長 村上努
所属 役職 氏名 : (英語) National Institute of Infectious Diseases, AIDS Research Center,
Division Chief, Tsutomu Murakami

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名 : (日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者：国立感染症研究所・病原体ゲノム解析センター・佐藤裕徳 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

（１）学会誌・雑誌等における論文一覧（国際誌 ３件）

1. Takeda S, Takizawa M, Miyauchi K, Urano E, Fujino M, Murakami T, Murakami T, and Komano J.: Conformational Properties of the Third Variable Loop of HIV-1AD8 Envelope Glycoprotein in the Liganded Conditions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016, 475(1): 113-118.
2. Hikichi, Y, Yokoyama M, Takemura T, Fujino F, Kumakura S, Maeda Y, Yamamoto N, Sato H, Matano T, and Murakami T.: Increased HIV-1 Sensitivity to Neutralizing Antibodies by Mutations in The Env V3-Coding Region for Resistance to CXCR4 Antagonists. J. Gen. Virol. 2016, 97(9): 2427-2440.
3. Mizuguchi T, Ohashi N, Matsumoto D, Komoriya M, Hashimoto C, Nomura W, Yamamoto N, Murakami T, and Tamamura H: Conjugation of cell-penetrating peptides leads to identification of anti-HIV peptides from matrix proteins. Biopolymers: Peptide Science 2016, DOI: 10.1002/bip.22920.

（２）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Characterization of Matrix Mutants that Show Post-entry Defects in the HIV-1 Replication Cycle. 口頭, Yuta Hikichi, Eri Takeda, Masayuki Fujino, Eric O Freed, Emi Nakayama, and Tsutomu Murakami. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016 年 10 月 23 日-25 日, 国内.
2. NanoBRET 法を用いた生細胞内 HIV-1 Gag の多量体化解析および結合宿主因子探索. 口頭, 宮川 敬, 松山慎一郎, 村上 努, 梁 明秀. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016 年 11 月 24 日-11 月 26 日, 国内.
3. 複製前期過程に障害を有する HIV-1 マトリックス(MA)変異体のウイルス学的解析. 口頭, 引地優太, 武田英里, 藤野真之, Eric O. Freed, 中山英美, 村上 努. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016 年 11 月 24 日-11 月 26 日, 国内.
4. 変異 HIV-1 の急速な病期進行と関連する病原体と宿主因子に関する解析. 口頭, 森 治代, 小島洋子, 川畑拓也, 中山英美, 塩田達雄, 藤野真之, 引地優太, 俣野哲朗, 村上 努, 渡邊 大, 松浦基夫, 宇野健司, 古西 満, 駒野 淳. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016 年 11 月 24 日-11 月 26 日, 国内.

（３）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

（４）特許出願