Study on Novel Anti-HIV siRNA and Phenotypic Drug Resistance Assay Targeting HIV-1 Protease
（HIV-1 プロテアーゼを標的とした新規抗 HIV siRNA と薬剤耐性識別法に関する研究）

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻　　朱　欽昌

［目的］

後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因であるヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、ゲノムとして RNA を持つため、変異を起こしやすく、薬剤耐性を示す変異ウイルスの出現が社会問題となっている。そのため、新たな HIV/AIDS 治療法や薬剤耐性ウイルスの識別法が求められている。

HIV は、T 細胞表面に発現している糖タンパク質である CD4 に結合し、細胞内に侵入する。感染細胞内において、HIV-1 プロテアーゼ（HIV-1 PR）は、未成熟な前駆体ポリタンパク質を切断して、HIV の構成タンパク質を成熟化させるため、抗 HIV 薬の標的分子となっている。

本研究では、HIV-1 PR を標的とする small interfering RNA (siRNA)の抗 HIV 薬への応用を目的として、$CD4^+$ T 細胞へ選択的に siRNA を輸送できる DNA aptamer-siRNA chimera (DAS)を開発した (Fig. 1)。

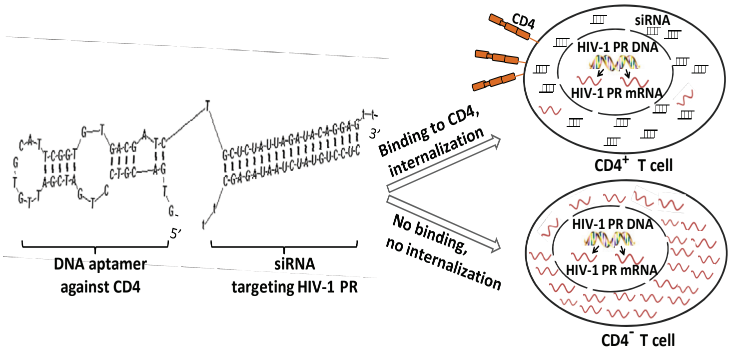

Fig. 1. Schematic inhibition of expression of HIV-1 PR by DAS.

これまでに、当研究室では、ペプチドに特異的な蛍光誘導体化反応をもとに、HIV-1 PR の活性測定法を開発している。この測定法は、酵素反応によって生成した N 末端にアミノ基を持つペプチドを、酸化剤存在下、カテコールと反応させ、蛍光誘導体化し、その蛍光強度より酵素活性を測定するものである。そこで今回、この活性測定法を、さらに発展させた薬剤耐性 HIV-1 PR 識別法へ応用した。

［結果および考察］

<u>DNA aptamer による $CD4^+$ T 細胞への選択的な siRNA の輸送</u>

CD4 を認識して結合する RNA aptamer を参考に、DNA aptamer を設計した。この DNA aptamer の 3’末端に、HIV-1 PR を標的とする siRNA を連結させた DAS を作製した。また同時に、RNA aptamer-siRNA chimera (RAS)、および、green fluorescent protein (GFP)の mRNA を標的とする siRNA を結合させた non-specific DNA aptamer-siRNA

chimera (NS-DAS)も作製した。

蛍光標識した DAS、RAS、siRNA を用いて、これらの CD4^{+} T 細胞への細胞内輸送を調べたところ、DAS および RAS は、選択的に CD4^{+} T 細胞に結合又は侵入していることが分かった (Fig. 2)。

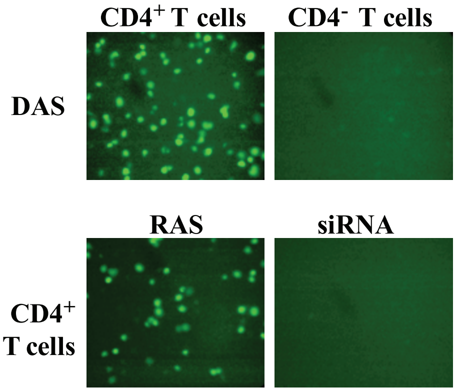

Fig. 2. Cellular uptake of DAS.

次に、DAS の HIV-1 PR 発現抑制効果を調べた。HIV-1 PR を発現するプラスミドを、CD4^{+}および CD4^{-} T 細胞に、それぞれトランスフェクションした後、培地中に DAS を添加し、48 h 培養した。培養後の細胞内の HIV-1 PR の mRNA は、real-time RT-PCR によって、また、HIV-1 PR のタンパク質は免疫化学発光検出によって、それぞれ測定した。その結果、DAS は選択的に CD4^{+} T 細胞内に輸送され、HIV-1 PR の発現を抑制できることが分かった (Fig. 3)。

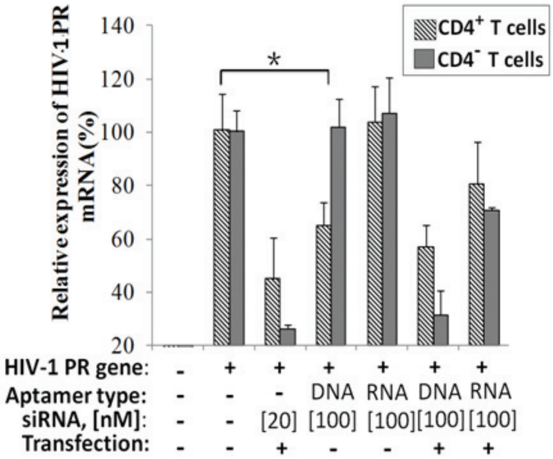

Fig. 3. The silencing effect of DAS on the expression of HIV-1 PR mRNA. (*P<0.01, independent *t*-test).

また、血清中における安定性を調べた結果、RAS と比較して DAS は、高い安定性を示した。これらの結果は、siRNA の細胞内輸送において、DNA aptamer は輸送分子として高い可能性があることを示しており、また、CD4^{+} T 細胞へ選択的に siRNA を導入できる本手法は、新規の抗 HIV 治療薬の開発に有用であると考えられる。

薬剤耐性 HIV-1 PR 識別法の開発

HIV-1 PR 遺伝子を組込んだプラスミドをもとに、2 種類の変異型 HIV-1 PR Ma およ

び Mb を作製し、それぞれを大腸菌中で発現させた。野生型および変異型 HIV-1 PR を発現している大腸菌抽出液を酵素試料とし、3 種類のアセチル化ペプチド（[AC]SGIFLETSLE, [AC]ARVLFEAM, [AC]KSGVFVQNGL）を基質として使用した。それぞれの酵素試料と 3 種類の基質を、阻害剤存在下または非存在下で 37℃、4 h 酵素反応し、生成したペプチド（LETSLE, FEAM, VQNGL）を蛍光誘導体化した後、HPLC によって分離・蛍光検出（励起波長 400 nm/蛍光波長 490 nm）した。蛍光ピークをもとに、HIV-1 PR の活性を算出し、さらに阻害剤による HIV-1 PR 活性に及ぼす影響について調べた。

3 種類の基質を同時に酵素反応に使用し、野生型および変異型 HIV-1 PR による基質分解パターンを HPLC によって調べた。その結果、[AC]SGIFLETSLE に対する活性が、野生型と比べて、変異型 Ma では低く、変異型 Mb では高くなっていた (Fig. 4A)。

また、抗 HIV 薬として臨床使用されている HIV-1 PR 阻害剤、サキナビルの野生型および変異型 HIV-1 PR に対する 50%阻害濃度（IC50）を調べたところ、野生型 : 62.0 nM、変異型 Ma : 127.9 nM、変異型 Mb : 52.5 nM であった (Fig. 4B)。この結果は、変異型 Ma は、サキナビルに対して阻害を受け難い耐性を持ち、変異型 Mb は、サキナビルで阻害され易いという、これまでの報告と一致していた。

これらの結果は、今回開発した 3 種類の基質を同時に使用する方法は、変異に関する塩基配列の情報がなくとも、薬剤（阻害剤）に対する変異型を識別できることを示しており、薬剤耐性ウイルスの診断や治療薬開発に有用と考えられる。

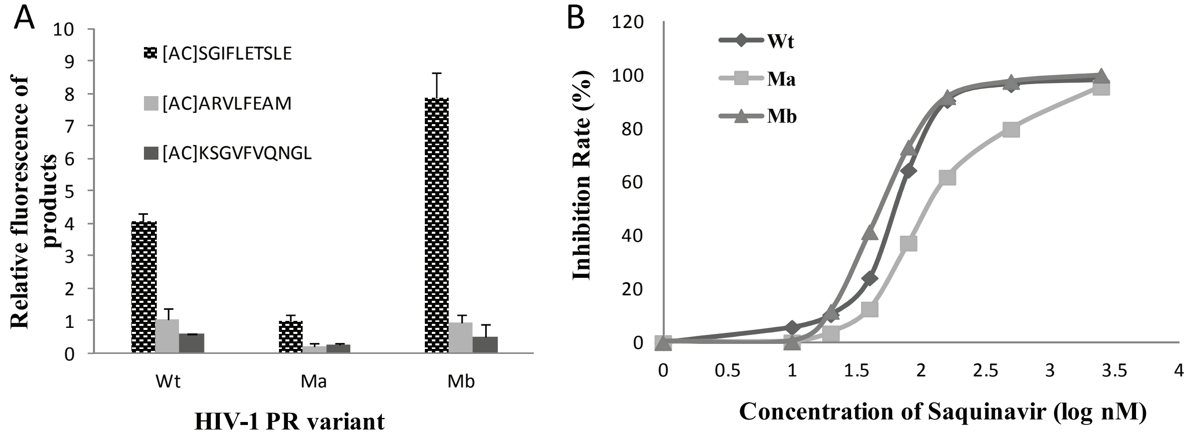

Fig. 4. (A) Activity assay and (B) drug resistance of HIV-PR variant. (A): Activity assay for HIV-1 PR variants with three substrates. (B): Drug resistance of Wt, Ma and Mb to Saquinavir inhibitor based on the enzyme activity assay using the substrate of [AC]SGIFLETSLE. The IC50s for them are 62.0, 127.9 and 52.5 nM, respectively.

［基礎となった学術論文］

1. Zhu, Q., Shibata, T., Kabashima, T. and Kai, M. Inhibition of HIV-1 protease expression in T cells owing to DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA. *Eur. J. Med. Chem*. **56**, 396-399 (2012)