

令和元年6月19日現在

機関番号：31603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07898

研究課題名(和文) 構造化学的アプローチによる抗多剤耐性HIV薬の開発

研究課題名(英文) Development of anti-multidrug resistant HIV drugs by structural chemical approach

研究代表者

角田 大 (TSUNODA, Masaru)

いわき明星大学・薬学部・准教授

研究者番号：10347974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：より有効な新規HIV感染防止薬として、HIVがヒトの細胞に感染するのを防ぎ、薬剤耐性を発現しない作用機序を持つ、新しいレクチン(アクチノヒビン)を改良するための構造基盤を確立することを目的として、X線結晶構造解析を用いて、HIV外套タンパク質の複合体の結晶解析に取り組んだ。アクチノヒビンの立体構造は3つのセグメントが対称的に配置した環状の構造を形成しており、それぞれには、糖鎖に結合するポケットがあることが明らかとなった。各ポケットには1個の高マンノース型糖鎖が結合するので、3個の糖鎖が同時に結合することになり、アクチノヒビンのHIV外套タンパク質への結合はかなり特異的で強いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIVがヒト細胞へ感染することを阻止し、さらに薬剤耐性を発症しない作用機構を持った、新しいレクチン(アクチノヒビンと命名)をより効果的な新しいHIV感染予防薬として改良するための構造基盤を確立することを目的に、X線結晶構造解析を進め、アクチノヒビンとHIV外套糖タンパク質との複合体の結晶解析に取り組んだ。その結果、HIV表面を覆う糖タンパク質から突き出た高マンノースの先端部位にある糖との複合体の構造解析から、AHと糖鎖との結合様式を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：We used X-ray crystallography to analyze the crystal of the complex of HIV coat protein as an objective to establish a structural basis to improve a new lectin (actinohivin) that prevents HIV from infecting human cells and has a mechanism of action that does not develop drug resistance as a more effective novel HIV infection prevention agent. The three-dimensional structure of actinohivin forms a cyclic structure in which three segments are arranged symmetrically, and it has become clear that each has a pocket that binds to a sugar chain. Since one high-mannose type sugar chain is bound to each pocket, three sugar chains are simultaneously bound, and the binding of actinohivin to the HIV coat protein was considered to be quite specific and strong.

研究分野：構造生物化学

キーワード：抗HIV薬 タンパク質 レクチン

1. 研究開始当初の背景

後天性免疫不全症候群(AIDS)は、1983年には原因ウイルス(HIV)が発見され、ウイルス感染症であることが明らかとなった。HIVはRNAウイルスであるために変異速度が非常に速く、インフルエンザに代表されるように人に感染した後も変異を起こすため、またワクチンの抗原候補である糖タンパク質(gp120)が多数の高マンノース糖鎖(HMTG)で覆われているために、いまだにワクチン開発の見通しは立っていない。1990年代以降、約20種類以上の抗HIV薬が登場してエイズの発症予防とエイズ患者の延命に用いられるようになったが、これらの単剤では容易に耐性株が出現して効かなくなることから、複数の薬剤を用いた多剤併用療法が一般的となっているが、この療法では強い副作用がある上に、どの薬剤を使用しても効かない症例が増えつつある。また、感染者から完全にウイルスを駆除できた例は無い。先進国の中においては日本でもHIV感染・AIDS発症の患者数が増えていることから、HIV感染を防止する緊急対策の実施の必要性が叫ばれている。このような現状を打開すべく、我々はHIVがヒト細胞へ感染することを阻止し、さらに薬剤耐性を発症しない作用機構を持った、これまでに無いタンパク質性の新しいHIV感染予防薬の開発について検討してきた。

HIVのヒト細胞への感染は、HIVの表面から突き出た糖タンパク質(gp120)がヒト細胞表面のタンパク質CD4⁺に結合することでHIVの細胞内への進入が可能となる。そこでgp120の表面に密集した高マンノース糖鎖、(HMTG)に着目し、このHMTGに特異的に結合するレクチンあるいは類似体を結合させれば、HIVの感染を阻害できるのではないかと考えた。糖鎖(HMTG)を変化させた耐性株の出現はHIVにとって容易ではなく、タンパク質に比べるとはるかに遅いと考えられるため、多剤耐性を克服する新薬の開発が期待できる。

2. 研究の目的

HIV感染・AIDS発症の患者数は世界的規模で増加している。現行のHIV/AIDSの予防・治療薬は感染後に増殖を抑えるものであり、副作用が強いことや変異するHIVに対して効き目が無く、その為に新薬の開発が追い付かないなどの問題がある。増加するHIV感染を阻止するためには、感染予防薬の開発が必要である。我々は多くの微生物の中からHMTGに特異的に結合するタンパク質を産出する微生物を検索し、その結果、新種の放線菌が目的のレクチンを産生することを見出した。アクチノヒピン(AH)と命名したこのレクチンは、gp120のHMTGに特異的に結合することで、ウイルスの細胞への接合と進入を低濃度で阻害することが分かった。しかし、実際にこのタンパク質を薬剤として利用するには、どのような仕組みでHIVの働きを抑制するのか、詳しく調べる必要がある。

本研究では、AHが標的とするgp120および関連糖鎖との複合体の構造解析によって、AHと糖鎖との結合機構を解明し、AHをより効果的な新しい感染予防薬として改良するための構造基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

新規抗HIV/AIDS予防・治療薬としてAHを改良するために、AHとHMTGを構成する種々の高マンノース糖鎖およびgp120との糖結合様式を解明し、構造的知見を得る。本研究内容を(1)~(3)に分けて記載する。

(1) AHの培養と高純度精製

放線菌は約1週間培養したものを、集菌して菌体として使用した。放線菌内で産生されたAHは、硫酸アンモニウムでの分画を行い、その後ハイドロキシアパタイトカラムおよびゲル濾過カラムクロマトを行って、電気泳動的に均一な標品として得た。

放線菌のAHは、培養期間によってはN末端の配列が不均一になっていることが判明した。そこで、培養を1日から20日までと期間を変えて行い、20種類の菌体を集菌した。得られた菌体から精製したAHを全て電気泳動および質量分析装置にかけて、AHが均一に精製されているかどうかを確認した。AHのN末端のアミノ酸配列が均一と確認できたサンプルは、さらにゲル濾過カラムクロマトによって精製し、高純度のサンプルとしてAHを調製した。

(2)AHと各種マンノース糖鎖およびgp120との複合体の結晶化

HIV表面を覆う糖タンパク質(gp120)から突き出た高マンノース糖鎖(HMTG)の先端部位にある二糖体マンノピオース(Man2)、三糖体マンノトリオース(Man3)、HMTGのマンナイン(Man9)、gp120とAHとの複合体の結晶化を行った。AHは結晶化の際には、沈殿しないように溶液のpHを細かく変えて調製した。初期結晶化条件の検索は結晶化スクリーンキットを用いて広範囲に行った。また、溶解すると沈殿しやすいMan9とgp120については、サンプル溶液のpHや沈殿剤などの条件を詳細に検討すると共に、既に得られているAH単体での結晶化条件を基にして結晶析出条件の検索を行った。

(3)AH と各種マンノース糖鎖との複合体の X 線結晶構造解析および糖結合様式の検討

得られた結晶の X 線回折データの測定は、学内のタンパク質結晶解析用 X 線回折装置およびつくばの高エネルギー加速器研究機構にある放射光施設の回折装置を用いて行った。AH と各種マンノース糖鎖との複合体の構造解析は、既に明らかにした AH 単体の構造を用いた分子置換法で位相を決定し、その電子密度図を参照して糖鎖結合の立体構造を組み立て、原子パラメータの精密化を最尤推定法で行った。糖鎖結合の立体構造と AH 単体の立体構造とを比較し、マンノース結合部位の様式を検討した。

4. 研究成果

(1)AH 結晶の再現性の向上

AH 単体での結晶が得られ、X 線結晶構造解析の結果、AH は 3 つの糖鎖ポケットから成る環状の構造をしていることが明らかになった。さらに AH と各種糖鎖との複合体の結晶化を行っていたが、X 線回折実験に適した結晶生成の再現性が低く、結晶化の実験は困難になっていた。そこで、再現性低下の要因を調べた結果、AH の N 末端アミノ酸配列が不均一であることを突き止めた。放線菌での培養を 7 日間として得られた AH と、培養期間を 20 日間として得られた AH との質量分析の結果、培養期間 7 日間では、2 つの主要なピークの周りにいくつかのピークが観察された。低分子量側にある AH で示したピークは、シグナルペプチドを AH に連結するリンカーの断片が完全に除去されたことを示している。一方、培養期間が 20 日間のものでは主要なピークはほぼ 1 つとなり、溶液中の AH のアミノ酸配列が均一になっていることが分かった。すなわち、AH はそれを産生する菌体の培養期間が長くなるにつれて、AH 本体の機能には関係しない N 末端のシグナル配列部分の残基が少しずつ切断されて、菌世代間の時差で不揃いになることを、培養期間を変化させて分離精製した AH 試料の電気泳動および質量分析実験によって解明した。この結果に基づいて、培養期間を 20 日間に延ばした菌体からは均一性（純度）の高い（100%）の AH が得られ、AH と各種糖鎖との複合体の結晶が再現よく得られるようになった。

(2)AH および AH と各種マンノース糖鎖(Man2、Man3)との複合体の構造解析

既に明らかにした AH 単体の立体構造は、3 つの糖鎖結合ポケットから成る環状の構造を形成し、第一(M1)、第二(M2)、第三(M3)の糖が存在していることが確認できている。しかし、第三の糖(M3)については電子密度の確認には至っていない。これらの結晶化で使用した AH は、N 末端が不均一なサンプルを使用していたために、結晶内では AH 分子が 120 度ごとに回転するという乱れた構造を形成していた可能性がある。そこで、研究成果の(1)に記載したように、AH の培養および精製法を検討し、N 末端の配列が均一になった AH の菌体を得て、さらにゲル濾過クロマトグラフィー等によって高純度に精製した AH を用いて AH と各種マンノース糖鎖との結晶化を行った。その結果、AH と Man2 との複合体の結晶を、pH4.4 と pH6.2 の 2 種類の異なる溶液の条件下で新しいタイプの単結晶として得ることができた。得られた 2 種類の結晶は、それぞれ分解能 1.9 と 1.57 の高分解能での回折データを得ることができた。以前に得た結晶形と比較すると、以前は結晶化に数ヶ月を要し、空間群が $P2_13$ で、結晶内では AH 分子が乱れた構造であったが、今回の結晶は数日で得られ、空間群が $P2_12_1$ と大きく異なり、分子の結晶内パッキングに乱れない良質な結晶であることが分かった。本実験においては、AH と Man2 との複合体の結晶は 3 種類析出しており、その全てが AH 単体の構造と一致し、さらに糖鎖との結合においても 3 種類ともに類似の構造をしていた。

AH と Man3 との複合体の結晶は、AH と Man2 との複合体の結晶化条件とほぼ同様に、pH6.2 の溶液の条件下で析出した。得られた結晶は単結晶で、分解能 1.3 までの高分解能の回折データを得ることができたが、AH と Man3 との複合体の結晶においても、第三の糖の電子密度は確認することができなかった。本実験期間においては、新たに検討した培養法と精製法を用いて得られた AH と各種マンノース糖鎖(Man2、Man3)との複合体の結晶では、結晶内部に乱れないことから、標的糖鎖との結合様式についての構造学的知見が得られた。AH と各種糖鎖(Man2、Man3)との複合体においてもそれぞれの AH 分子は、3 つのアミノ酸配列から成る 3 つのモジュールから構成されており、AH の構造はこれら糖複合体の構造においても正確に保存されていることが分かった。さらに、AH の 3 つの糖鎖結合ポケットの立体構造は安定した構造を形成しており、これは 1 つの AH 分子が 3 つの gp120 の H.MTG に同時に結合できることを示唆している。この糖結合に関しては、米国 NCI で発見されたシアノピリン-N やグリフィシンでも同様に HMTG に結合することが知られているが、シアノピリン-N は 1 個の HMTG を持つ糖タンパク質にも結合する点で異なっている。グリフィシンは、特異的に糖鎖を認識する構造であると報告されているが、AH では 3 つの分子が同時に結合するため、AH の gp120 への結合はかなり特異的で、強いものと考えられる。また、AH と Man3 の複合体の構造解析においても第三の糖の電子密度が確認されなかったことから、AH が高マンノース糖鎖に結合する際に、その結合能をさらに向上させる方法として、2 つの AH 分子を結合させた二量体型の AH 改変体を調製して結晶構造を明

らかにする必要がある。また、より効果的な抗 HIV 薬を作成するための構造基盤を得るために、AH と HIV の標的分子である gp120 との複合体の単結晶を得て、結晶構造解析を進める必要がある。

(3)AH と高マンノース糖鎖(HMTG)の Man9 との結晶化と構造解析

AH と Man9 との複合体の結晶化は、AH と Man9 のサンプルがともに沈殿を生じない結晶化溶液の条件を詳細に検討した。その結果、結晶析出までに数ヶ月かかるが、単結晶が得られるようになった。高分解能での X 線回折データが得られるように回折データでの解析を進めている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Structural Analyses of Actinohivin with Glucan for Development of HIV Preventer, Masaru Tsunoda, Kaoru Suzuki, Yoichi Takeda, Yukishige Ito and Haruo Tanaka, Photon Factory Activity Report, 33, 229 (2016)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 薫

ローマ字氏名：SUZUKI, Kaoru

所属研究機関名：いわき明星大学

部局名：薬学部

職名：客員研究員

研究者番号(8桁): 90382788

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。