

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 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：2016～2016

課題番号：16K15520

研究課題名(和文)結晶解析・熱力学的手法を用いたプロテアーゼ阻害剤に対するHIVの耐性発現機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of HIV-1's drug resistance against protease inhibitors using crystal structure and thermodynamic analyses

研究代表者

満屋 裕明(MITSUYA, Hiroaki)

熊本大学・医学部附属病院・特別招聘教授

研究者番号：20136724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Darunavir耐性HIV-1変異株(HIVDRVs)に高い阻害効果を発揮する化合物GRL-015, -085, -097及びKU-241の同定、結晶構造解析を行いその阻害機構の解明を行った。平成29年度は、更に詳細な分子機構を明らかとする為に新たに同定されたGRL-001の抗ウイルス活性の測定と構造解析を行った。解析の結果、HIVDRVsを効果的に阻害する為に化合物に必須の結合様式を同定する事に成功、今後の新規化合物の開発に資する成果を得た。また、HIV-1の耐性変異の獲得によるPRのflap領域の不安定化を詳細に検討する目的でSPR法を用いた解析手法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：We previously identified multiple protease inhibitors (PIs) including GRL-015, -085, -097 and KU-241, which exert extremely potent activity against wild type HIV-1 (H1VWT) and a wide spectrum of drug-resistant HIV-1 variants such as darunavir-resistance HIV-1 strains (HIVDRVs). We also analyzed the relationships between the conformations of HIV protease (PR) and the activity of PIs using crystal structure examination and demonstrated that the interactions between PIs and the flap region of PR is important in blocking the replication of HIVDRVs at IC50 values ranging 10⁻⁹ to 10⁻⁸ molar concentrations. In the present study, we evaluated the activity of novel PI, GRL-001, and solved the crystal structure of GRL-001-bound PR. The structural data showed that the PIs' interactions with both-side flap regions are essential for the potent activity of GRL-001 against drug-resistant HIV-1 variants including HIVDRVs.

研究分野：血液内科・免疫学・ウイルス学・分子生物学

キーワード：HIV-1 薬剤耐性 プロテアーゼ阻害剤 作用機序

1. 研究開始当初の背景

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) は、複製の際に不断に突然変異を来すという生物学的な特徴を有し、薬剤に対する耐性を容易に獲得する。耐性株出現が極めて低いとされていた HIV-1 プロテアーゼ (PR) 阻害剤、darunavir (DRV) に対する耐性を有する多剤耐性 HIV-1 株 (HIV-1^{DRV_R}) の出現も確認され既に大きな課題となっている事から、HIV-1 が薬剤耐性を獲得しない、又は、薬剤耐性獲得が極めて遅延する薬剤の開発が急務である。しかし、HIV-1 の PR 阻害剤 (PIs) に対する耐性獲得メカニズムの詳細は未だ明らかとなっていない。

これまでに申請者等は、HIV-1^{DRV_R} に対して高い効果を発揮する化合物、GRL-015、-085 及び KU-241 の開発に成功、結晶構造解析を用いてこれらの化合物が HIV-1 プロテアーゼ (PR) の flap 領域に存在するアミノ酸 Gly48 と水素結合を形成する事で HIV-1^{DRV_R} に対して高い阻害効果を発揮している事を示唆する結果を得た (Aoki & Mitsuya, *J Virol.* 90, 2180-94, 2015)。また、HIV-1^{DRV_R} 由来の PR (PR^{DRV_R}) の apo 体の構造解析を行い、PR^{DRV_R} は、PR^{WT} に比して flap 領域が不安定化している可能性を示す結果を得た。これらの結果からは、『HIV-1 はアミノ酸変異を獲得し PR の flap 領域が不安定化、基質の進入に伴う flap 領域の「閉鎖」が不完全になる事で PR から PI が離脱・解離する事を促進し、結果的に薬剤耐性が獲得される』という事を示唆すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、結晶構造解析と共に熱力学的手法、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) 等の解析手法を用いて HIV-1 プロテアーゼが多剤耐性を獲得する機構をより詳細に解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

・**抗 HIV-1 活性の測定:** MTT アッセイや p24 アッセイを用いて新規化合物の HIV-1 増殖阻害効果 (IC₅₀ 値) の評価し、HIV-1^{WT} に対して高い阻害効果を発揮した化合物に関しては、種々の多剤耐性 HIV-1 変異株 (HIV-1^{MDR_S}) 及び HIV-1^{DRV_R} に対する抗 HIV-1 活性の測定を行った。本研究における新規化合物の合成は、米国 Purdue 大学の Arun K. Ghosh 教授と共同で行った。

・**結晶構造解析:** 大腸菌を用いて大量発現・精製を行った HIV-1 プロテアーゼ (PR^{WT}) に対して大過剰の化合物を添加、hanging drop vapor diffusion 法を用いて PR^{WT} と各化合物の複合体を結晶化した。得られた結晶に X 線を照射し、回折画像を基に三次元構造の導出を行った。本研究における X 線回折実験は、創薬等支援技術基盤プラットフォームの助力の下、兵庫県にある放射光施設 (SPring8) を使用して行い、三次元構造の導

出は米国 NIH の Deb 博士、Haydar 博士と共に行った。

・**熱安定性測定 (differential scanning fluorimetry; DSF):** 精製した PR に各化合物と検出用の発光試薬として SYPRO Orange を添加した溶液を調整、この溶液をリアルタイム PCR (7500Fast) を用いて徐々に加熱、PR の構造が崩壊する温度 (T_m 値) を検出した。

本手法で用いた SYPRO Orange は、タンパク質表面に露出した疎水性アミノ酸に非特異的に結合する事で強い蛍光を発する蛍光色素である。タンパク質を含む溶液を加熱する事で、三次元構造が崩壊し、本来タンパク質内部に収納されている疎水性のアミノ酸残基が溶媒面に露出する。この露出した疎水性残基に SYPRO Orange が結合する事で徐々に蛍光強度が増加する。この蛍光強度の増加を継続的にモニタリングする事によって T_m 値を求めることが出来る。基質が結合する事によりタンパク質が安定化されるため、T_m 値は化合物添加前よりも増加する傾向にある。この化合物添加時と非添加時の T_m 値の差 (ΔT_m 値) を比較する事でタンパク質に対する各化合物の親和性の強弱を推察する事が可能となる。

・**表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon resonance 法; SPR 法):** 精製した PR をアミンカップリング法によりチップ表面に固定化した。チップ内の流路に化合物を流す事でチップ表面の PR に化合物が結合し、チップ表面のタンパク質と溶媒の界面に変化が生じる (図 1)。この界面の変化を Biacore3000 によって検出した。

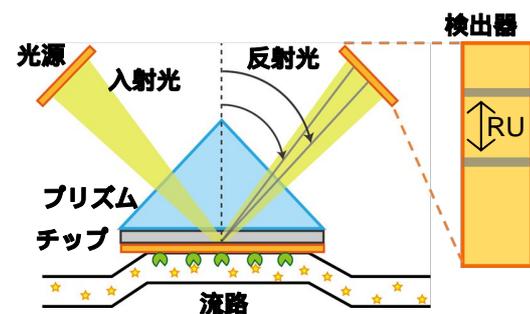


図 1. SPR 法の模式図: 表面プラズモン法は入射光によって誘導される個体あるいは液体中の電子の振動の事である。入射した光の振動数が電子の振動数と一致する場合、入射光は吸収され“光の谷”が生じる。SPR 法はこの原理を利用した手法である。チップ表面に固定化したタンパク質に流路内を流れる基質が結合する事で、センサーチップ表面の密度変化が起こり光の屈折率が変化、“光の谷”の検出位置が移動する。この移動した値を resonance units (RU) として評価する事でタンパク質と基質の結合をリアルタイムで検出する事が出来る。

表 1. HIV^{WT} 及び HIV_{DRV}^Rs に対する各化合物の抗 HIV 活性

Compounds	IC ₅₀ nM (fold change)		
	HIV _{NL4-3}	HIV _{DRV} ^R _{P30}	HIV _{DRV} ^R _{P51}
DRV	2.8	222 (80)	2,800 (1,000)
GRL-015	3.3	16 (4.7)	220 (68)
GRL-085	3.3	2.8 (0.9)	42 (13)
KU-241	0.017	0.0018 (0.1)	1.2 (72)
GRL-001	0.005	2.6 (47)	28 (811)

GRL-015, -085 及び -142 は HIV_{DRV}^R に対して効果を発揮するが、DRV 及び GRL-001 は大きく活性が低下する。

4. 研究成果

【概要】 これまでに HIV_{DRV}^R に高い阻害効果を発揮する化合物 GRL-015, -085, -097 及び KU-241 の同定、結晶構造解析を行いその阻害機構の解明を行った。平成 29 年度は、更に詳細な分子機構を明らかとする為に新たに同定された GRL-001 の抗ウイルス活性の測定と構造解析を行った。GRL-001 は KU-241 の誘導体であり、KU-241 が化学構造中に有する 2 つのフッ素原子の内、1 つを欠損させた化合物である。解析の結果、HIV_{DRV}^R を効果的に阻害する為に化合物に必須の結合様式を同定する事に成功、今後の新規化合物の開発に資する成果を得た。また、HIV-1 の耐性変異の獲得による PR の flap 領域の不安定化を詳細に検討する目的で SPR 法を用いた解析手法の開発を行った。

【研究結果】 抗 HIV-1 活性の試験及び DSF による解析の結果から、GRL-001 は HIV-1^{WT} に対して KU-241 に匹敵する抗ウイルス活性と PR する強力な結合力を有していたが、HIV-1_{DRV}^Rs に対しては抗 HIV-1 活性が低下する事が明らかとなった (表 1 及び図 2)。過去に行った結晶構造解析の結果から、KU-241 の持つフッ素原子は PR の flap 領域に位置するアミノ酸 Gly49 および活性中心近傍部位に位置する Arg8 とハロゲン結合と呼ばれる双極子間相互作用を形成している事が既に結晶構造から明らかとなっていたが、GRL-001 に関しては、フッ素が 1 つ欠損する事によって Arg8 との相互作用が欠損、flap 領域に位置するアミノ酸 Gly49 との相互作用は維持されているという事が新たに明らかとなった。これらの結果から申請者等は、PIs が HIV_{DRV}^R の様な高度薬剤耐性 HIV-1 変異株を効果的に阻害する為に必要な条件を検討する為、高度薬剤耐性 HIV-1 に高い活性を有する GRL-015, -085 及び KU-241 の結晶構造及び GRL-001 の相互作用様式を詳細に比較・解析を行った。HIV-1 の治療に用いられる PIs の構造は、PR の活性中心を構成するアミノ酸 Asp25 に結合する基本構造と P1, P1', P2, P2' と呼ばれる部分構造に大別される (図 3)。この P1,

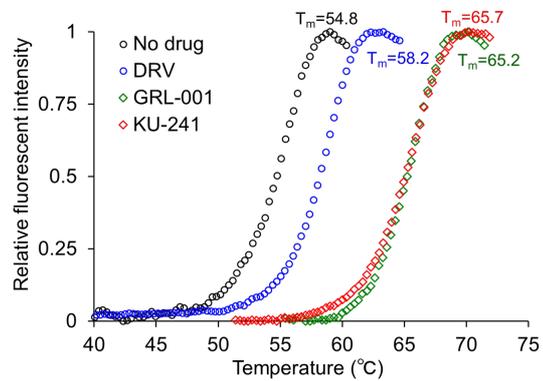


図 2. 熱安定試験の結果: GRL-001 は HIV^{WT} 由来の PR (PR^{WT}) に対して DRV 以上、KU-241 と同等の結合能を示す事が明らかとなった。

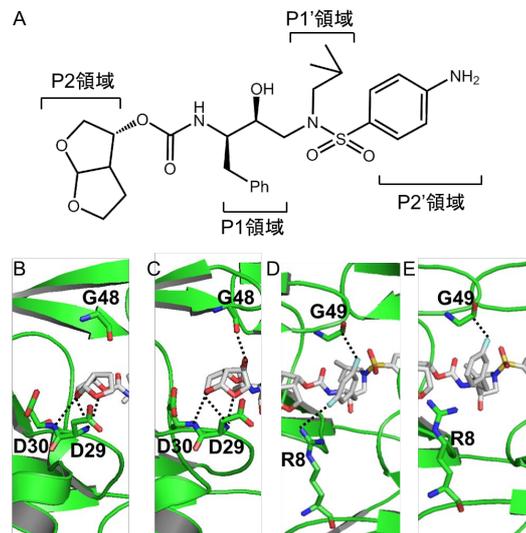


図 3. プロテアーゼ阻害剤の各部位の名称と各化合物に特徴的な相互作用: A) DRV の構造を示す。HIV プロテアーゼ (PR) 阻害剤は化学構造の各部位に P1, P1', P2, P2' という名称がつけられている。B) DRV の P2 領域と PR, C) GRL-085 の P2 領域と PR, D) KU-241 の P1 領域と PR 及び、E) GRL-001 の P1 領域と PR の相互作用様式を示す。HIV_{DRV}^R を効果的に阻害する GRL-085 及び KU-241 は PR の flap 領域 (G48 又は G49) と相互作用を形成すると共に、その対面に存在するアミノ酸 (D29&D30 又は R8) とも相互作用を形成していた。

P1', P2, P2' 領域に其々固有の部分構造を導入する事で種々の特性を持つ PIs が開発されてきた。GRL-015, -085 は P2 領域に、KU-241 及び GRL-001 は P1 領域に flap と相互作用する置換基が配置されている。各 PIs と PR の結晶構造を比較した結果、GRL-015, -085 及び KU-241 は、flap 領域と結合する置換基が存在する各領域と同じ領域に、flap 領域と反対側、すなわち PR の Arg25 が位置する側との相互作用が存在している事が明らかとなった (図 3)

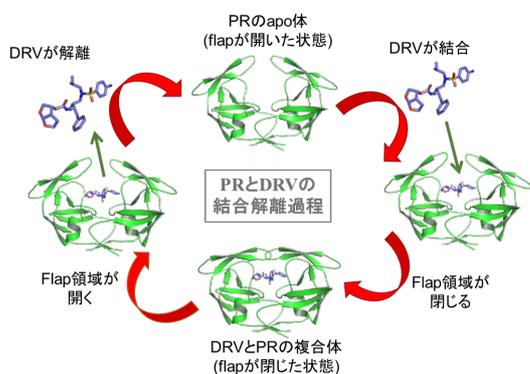


図4. Darunavir (DRV) の HIV-1 プロテアーゼ (PR) に対する結合と解離の過程: PR は DRV と結合する事で flap が開いた状態から閉じた状態へと移行する事が知られている。PR は薬剤変異を獲得する事で flap 領域が不安定化し閉じた状態へと移行しづらくなると考えられる。

PR は、基質が結合すると共に、flap 領域の構造変化 (flap が開いた状態から閉じた状態へ移行) が起こる事が知られている (図 4)。GRL-015, -085, KU-241 は flap 領域 (Gly48 or Gly49) 及びその反対側に位置するアミノ酸 (Asp29, Asp30, and/or Arg8) と其々相互作用を形成する事で、flap が閉じた状態に移行し易くしていると考えられる。これらの結果は、冒頭の研究背景の欄にも記載した仮説を支持する結果であり、GRL-015, -085, KU-241 は HIV-1 が PR 領域に薬剤耐性変異を獲得し、flap 領域に構造変化を来したとしても、其々の PIs が有する部分構造が Gly48 及び Gly49 と Asp29, Asp30 及び Arg8 等と相互作用する事で閉じた状態に移行し辛くなった flap 領域を閉鎖状態に移行し易くする為、強力な阻害効果を発揮できると考えられる。

本年度は更に、薬剤耐性変異の導入による flap の構造変化と PIs の部分構造の違いが PIs と PR の結合過程に及ぼす影響を解析する為に SPR 法を用いた手法の開発を行った。研究方法欄に記載したように PR の固定化には、まずアミンカップリング法を用いた。平成 27 年度の段階で不活性型の PR (PR^{D25N}) を用いて DRV 及び KU-241 の結合を検出できる事を確認した。本年度は、活性型の PR^{WT} 及び変異体 PR_{DRV}^Rs を用いて各化合物の結合特性の検出を試みた。PR^{WT} と DRV の結合に関しては PR^{D25N} 測定時と同様の溶液条件で濃度依存的なシグナルを検出することが出来た (図 5)。一方で、PR_{DRV}^R に関しては、同様の溶媒ではチップへの固定化量が低下し、DRV 又は KU-241 を結合させた際に得られるシグナルの強度が著しく低下もしくは検出できないという結果であった。これらの結果を受けて、現在 PR の固定化方法をアミンカップリングから、His-tag を用いる手法に変更、併せて PR の C 末端にアミンリッチな tag を導入しアミンカップリングを用いた場合でもチップ表面に固定化する際に PR の向きをある程度制御で

きる手法の開発に取り組んでいる。SPR 法に

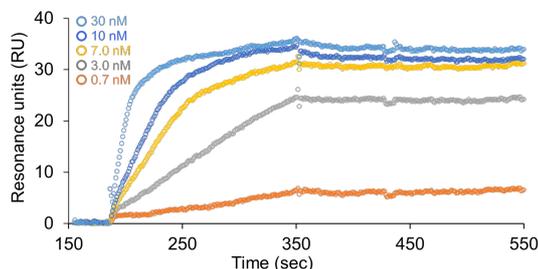


図5. SPR 法を用いて測定した PR と DRV の結合: DRV の濃度を 0.7, 3.0, 7.0, 10, 30 nM と変化させる事で濃度依存的なシグナルの変化を観測する事に成功した。この結果から、DRV の PR に対する強い結合力は、非常に速い結合速度と極めて遅い解離速度によるものである事が明らかとなった。

関しては、今後も継続してこの実験を進める予定にしている。

【まとめ】 これまで HIV_{DRV}^R を効果的に阻害する為には化合物と PR の flap 領域との結合が重要である事を示唆する成果を得ていたが、本研究により flap 領域との結合だけでなく、flap 領域とその対面に位置するアミノ酸の両方に相互作用を形成する事が重要であることが明らかとなった。これらの成果は、『HIV-1 はアミノ酸変異を導入する事により PR の flap 領域を不安定化、PR と化合物の結合時に起こる flap 領域の構造変化を来して (基質の進入に引き続く flap 領域の「閉鎖」が不完全になる事で) PR から PI が離脱・解離する事を促進し、結果的に薬剤耐性が獲得される』という申請者等の仮説を支持する結果であると共に、今後の新規化合物の設計・開発に資する成果である。

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〕(論文は全て査読有)(計 7 件)
《2016 年》

1. Ghosh AK, Rao KV, Nyalapatla PR, Osswald HL, Martyr CD, Aoki M, Hayashi H, Agniswamy J, Wang YF, Bulut H, Das D, Weber IT, and Mitsuya H. Design and Development of Highly Potent HIV-1 Protease Inhibitors with a Crownlike Oxotricyclic Core as the P2-Ligand To Combat Multidrug-Resistant HIV Variants. *J Med Chem.* (in press), DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00172.
2. Higashi-Kuwata N, Ogata-Aoki H, Hattori S, Hayashi H, Danish M, Aoki M, Shiotsu C, Kawamura T, Ihn H, Kobayashi H, Okada S and Mitsuya H. Early phase dynamics of traceable mCherry fluorescent protein-carrying HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells-transplanted

- NOD/SCID/Jak3-/- mice. Antiviral Res. 2017 (in press) DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.03.027
3. Ghosh AK, Brindisi M, Nyalapatla PR, Takayama J, Ella-Menye JR, Yashchuk S, Agniswamy J, Wang YF, Bulut H, Okada S and Mitsuya H. Design of novel HIV-1 protease complex. Bioorg Med Chem. 2017 (in press) DOI: 10.1016/j.bmc.2017.4005
 4. Amano M, Gómez PMG, Zhao R, Yedidi RS, Das D, Bulut H, Delino NS, Reddy SV, Ghosh AK and Mitsuya H, A Modified P1 Moiety Enhances in vitro Antiviral Activity against Various Multi-Drug-Resistant HIV-1 Variants and in vitro CNS Penetration Properties of a Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor, GRL-10413, Antimicrob. Agents Chemother. (in press)
 5. Salie ZL, Kirby KA, Michailidis E, Marchand B, Singh K, Rohan LC, Kodama EK, Mitsuya H, Parniak MA, and Sarafianos SG, Structural basis of HIV inhibition by translocation-defective RT inhibitor 4-ethynyl-2-fluoro-2-deoxyadenosine (EFdA), Proc Natl Acad Sci. 113, 9274-9279, 2016.
 6. Ghosh AK, Osswald HL, Glauninger K, Agniswamy J, Wang YF, Hayashi H, Aoki M, Weber IT, and Mitsuya H, Probing Lipophilic Adamantyl Group as the P1-Ligand for HIV-1 Protease Inhibitors: Design, Synthesis, Protein X-ray Structural Studies, and Biological Evaluation, J Med Chem. 59, 6826-6837, 2016
 7. Nakamura T, Campbell JR, Moore AR, Otsu S, Aikawa H, Tamamura H, and Mitsuya H, Development and validation of a cell-based assay system to assess human immunodeficiency virus type 1 integrase multimerization, J. Viro Met, 236, 196-206, 2016.
- [学会発表](計 9 件)
《2016 年》(口頭)
1. 林 宏典, 青木 学, Debananda Das, 服部 真一郎, 青木 宏美, 鎌田 伸好, 高松 悠樹, Yedidi Ravikiran, 長谷川 和也, Arun K Ghosh and 満屋 裕明. KU-241 が前例を見ない程強力な抗 HIV 活性を發揮する機序の解析. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2016/11/24-26, 鹿児島.(口頭・国内)
 2. 林 宏典, 青木 学, Debananda Das, 鎌田 伸好 1, 青木 宏美, 服部 真一郎, 高松 悠樹, Yedidi Ravikiran, 長谷川 和也, Arun K Ghosh and 満屋 裕明. 前例を見ないほど強力な抗 HIV 活性を示す KU-241 の作用機序の解析. 白馬シンポジウム in 山梨. 2016/10/7-8, 山梨.(口頭・国内)
 3. Hayashi H., Aoki M., Hattori S., Higashi-Kuwata N., Yedidi RS., Ogata-Aoki H., Das D., Hasegawa K., Ghosh AK. and Mitsuya H. Mechanism of unprecedentedly potent activity of KU-241 against various HIV-1 variants, 第 15 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2016/09/06-09, 兵庫, 日本 (口頭・国内)
 4. 林 宏典, 青木 学, Yedidi Ravikiran, 中田 浩智, Debananda Das, 中村 照也, 長谷川 和也, 山縣 ゆり子, Arun K Ghosh, 満屋 裕明. HIV-1 プロテアーゼの flap 領域と相互作用する化合物は darunavir 高度耐性 HIV-1 を強力に阻害する. 第 26 回抗ウイルス療法学会総会, 2016/5/13-15, 名古屋.(口頭・国内)
 5. 林 宏典, 青木 学, Debananda Das, 服部 真一郎, 高松 悠樹, Yedidi Ravikiran, 長谷川 和也, Arun K Ghosh, 満屋 裕明. KU-241 が前例を見ない程強力な抗 HIV 作用を發揮するメカニズムの解析. 第 26 回抗ウイルス療法学会総会, 2016/5/13-15, 名古屋.(口頭・国内)
 6. 服部 真一郎, 青木 学, 鎌田 伸好, 青木 宏美, 林 宏典, Arun K. Ghosh, 前田 賢次, 満屋 裕明. 前例を見ない程強力な活性を有する新規 HIV-1 プロテアーゼ阻害剤 KU-241 の同定. 第 26 回抗ウイルス療法学会総会, 2016/5/13-15, 名古屋.(口頭・国内)
 7. 鎌田 伸好, 青木 学, 服部 真一郎, 青木 宏美, 林 宏典, 前田 賢次, Arun K. Ghosh, 満屋 裕明. 新規抗 HIV 薬候補化合物 KU-241 の in vitro 遺伝毒性・体内動態・脳組織内濃度. 第 26 回抗ウイルス療法学会総会, 2016/5/13-15, 名古屋.(口頭・国内)
 8. 服部 真一郎, 青木 学, 鎌田 伸好, 林 宏典, 青木 宏美, 前田 賢次, Arun K. Ghosh, 満屋 裕明. 極めて強力な抗 HIV 活性を有する新規 HIV-1 プロテアーゼ阻害剤、KU-241. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2016/11/24-26, 鹿児島.(口頭・国内)
 9. 鎌田 伸好, 青木 学, 服部 真一郎, 青木 宏美, 林 宏典, 前田 賢次, Arun K. Ghosh, 満屋 裕明. DRV 耐性株を含む種々の多剤耐性変異株にも有効な新規抗 HIV 薬候補化合物 KU-241 の体内動態・脳組織内濃度・2 週間反復投与毒性 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2016/11/24-26, 鹿児島.(口頭・国内)
- 《2016 年》(ポスター)
1. Hayashi H., Aoki M., Hattori S., Higashi-Kuwata N., Yedidi RS.,

Ogata-Aoki H., Das D., Hasegawa K., Ghosh AK. and Mitsuya H. Mechanism of unprecedentedly potent activity of KU-241 against various HIV-1 variants, 第 15 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2016/09/06-09, 兵庫, 日本 (口頭・国内)

2. 服部 真一郎, 青木 学, 鎌田 伸好, 林 宏典, 青木 宏美, Arun K. Ghosh, 満屋 裕明. 前例を見ない程強力な抗HIV活性を有する新規HIV-1プロテアーゼ阻害剤, KU-241. 白馬シンポジウム in 山梨. 2016/10/7-8, 山梨. (ポスター・国内)

〔図書〕(計 1 件)

《2016 年》

1. 服部 真一郎、服部 京子、満屋 裕明、HIV/AIDS 最近の治療. 臨牀と研究. 大同学館出版部. Vol.93 (9 月), p20 ~ 26, 2016.

〔産業財産権〕

無し

〔その他〕

無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

満屋 裕明 (MITSUYA, Hiroaki)

(熊本大学・医学部附属病院・特別招聘教授)

研究者番号 : 20136724