

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590117

研究課題名(和文) HIV治療薬を指向した核酸アプタマーの開発

研究課題名(英文) Development of the nucleic acid aptamer for anti HIV drug

研究代表者

椋島 力 (KABASHIMA, Tsutomu)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20274673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：エイズは、HIVによるウイルス感染症であり、免疫不全による日和見感染や悪性腫瘍などを発症してくる症候群である。また、HIVは突然変異を起こしやすいため、薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっており、別の観点からの治療薬(阻害剤)開発が求められている。

そこで本研究では、HIVプロテアーゼと特異的に結合する核酸アプタマーを開発し、これを抗HIV治療薬として適応することを目的とした。

本研究において、野生型および2種類の変異型HIVプロテアーゼが作製でき、また、これらを用いたSELEX法によってHIVプロテアーゼに親和性を有するアプタマーの開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) is infectious disease caused by HIV (human immunodeficiency virus). AIDS is the syndrome that developed the opportunistic infection or malignant tumor by immunodeficiency. Because HIV is easy to cause mutations, the appearance of the drug-resistant virus is the serious problem. Thus, the development of the new anti HIV drug from a different point of view is demanded.

In this research, I tried to develop a nucleic acid aptamer, which specifically binds to HIV protease, and apply it to an anti HIV drug.

I could construct a wild type and 2 kinds of mutant HIV proteases in this research. And the possibility of the development of aptamer, which has affinity to HIV proteases, was suggested by using purified enzymes and SELEX method.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：HIV アプタマー プロテアーゼ 阻害剤 薬剤耐性 変異 ウイルス 感染症

1. 研究開始当初の背景

エイズ (acquired immuno deficiency syndrome) は、HIV (human immunodeficiency virus) によるウイルス感染症で、免疫不全を起こし、日和見感染や悪性腫瘍などを発症してくる症候群である。エイズは、結核、マラリアとともに三大感染症に数えられており、感染者数は世界中で 4000-5000 万人と推定されている。また、日本でも HIV 感染者数は、横ばい傾向のまま高止まりしている状態であり社会問題化している。

HIV は、ウイルス粒子内に 2 本の RNA とプロテアーゼ、逆転写酵素、リボヌクレアーゼ H、インテグラーゼなどのウイルス酵素群を含んでおり、これらの酵素は HIV の増殖に必須である。そのため HIV 感染症治療薬として、これら酵素の立体構造や反応機構を基に、基質アナログや酵素阻害剤が開発され、臨床の現場で使用されている。現在、HIV 感染症の治療は、HIV プロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼの阻害剤を複数組み合わせた多剤併用療法によって行なわれているが、HIV 感染を完治するまでには至っていない。そのため、HIV 感染では治療薬の使用歴が一般的に長く、さらに、HIV は突然変異を起こしやすいため、薬剤耐性ウイルスの出現や副作用などが問題となっており、別の観点からの治療薬 (阻害剤) 開発が求められている。

2. 研究の目的

これまでに代表者は、特定の塩基配列と特異的に結合する転写因子の研究など、タンパク質-核酸間の結合に関連した研究を行ってきた。また最近では、HIV プロテアーゼの新規活性測定法や、これをさらに発展させた変異型 HIV プロテアーゼの識別法の開発を行なっている。この過程において、申請者は、分子認識能を持つ核酸 (アプタマー) に興味を持ち、本研究のアプタマーを HIV 感染症治療薬に適用する着想に至った。アプタマーは、一本鎖 RNA や DNA がとる 3 次元構造により、特異的に標的分子と結合する能力を持った核酸分子であり、標的分子としては、タンパク質複合体のような高分子から金属イオンのような低分子まで、様々な物質を対象とする。これまでも、多くのタンパク質に対するアプタマーが報告されており、この中のいくつかは医薬品への応用も試みられている。

現在までに、HIV の逆転写酵素と結合し、酵素活性を阻害するアプタマーが報告されている。そのため、HIV プロテアーゼと特異的に結合するアプタマーは、HIV プロテアーゼ活性を阻害する可能性が高いが、HIV プロテアーゼに対するアプタマーは、現在のところ報告されていない。そこで本研究では、HIV プロテアーゼと特異的に結合するアプタマーを見出し、これを抗 HIV 治療薬として適用することを目的とした。

3. 研究の方法

HIV プロテアーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させた。このとき、検出および精製を容易にするために、HIV プロテアーゼは、マルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として大腸菌中で発現させた。発現した融合タンパク質は、アミロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。また、融合タンパク質からの MBP タグの除去は、Factor Xa による酵素分解によって行った。

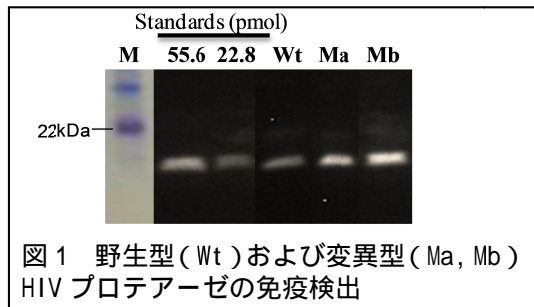
変異型 HIV プロテアーゼの作製は、HIV プロテアーゼ遺伝子を鋳型に、 $MnCl_2$ 存在下での PCR (error-prone PCR) および site-directed mutagenesis によって行った。これら野生型および変異型 HIV プロテアーゼの確認は、酵素活性の測定および抗 HIV プロテアーゼ抗体による免疫検出によって行った。

HIV プロテアーゼを認識するアプタマーの作製は、SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法によって行った。

4. 研究成果

アプタマーを作製するためには、標的分子である HIV プロテアーゼが大量に必要である。そこでまず、HIV プロテアーゼの大量調製を試みた。HIV プロテアーゼと MBP の融合タンパク質を大腸菌中で発現させ、アミロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。その後、Factor Xa による酵素分解によって mg 単位の HIV プロテアーゼを精製できた。このとき、HIV プロテアーゼと MBP の連結部分のアミノ酸配列を EFGS にした場合、酵素活性が検出できなかったが、HIV 遺伝子本来の SFSF に変更したところ、酵素活性が検出できた。このことから、HIV プロテアーゼの酵素活性には、HIV プロテアーゼだけでなく、その直前の領域も重要であると考えられた。

次に、変異型 HIV プロテアーゼの作製を試みた。error-prone PCR を行い、塩基配列を調べたところ、多数の変異型 HIV プロテアーゼが得られた。しかし、これら変異型の酵素活性を調べたところ、活性を検出することはできなかった。そこで、データベースをもとに、48Gly Val (変異型 Ma) および 32Val Ile (変異型 Mb) の 2 種類の変異型 HIV プロテアーゼを、site-directed mutagenesis によって作製し、大腸菌中で発現させた。大腸菌抽出液を用いて、これらの酵素活性および阻害剤に対する抵抗性 (薬剤耐性) を調べたところ、既報と同様に、Ma は、HIV プロテアーゼ阻害剤 (HIV 治療薬) であるサキナビルに対して抵抗性を示し、Mb は、インジナビルに対して抵抗性を示すことを確認した。また、変異型 Ma および Mb は、野生型同様、抗 HIV プロテアーゼ抗体によって検出されることを確認した (図 1)。



次に、HIVプロテアーゼのアプタマーを開発するにあたり、まず、HIVプロテアーゼの代わりに、HIVプロテアーゼとほぼ分子量が等しいヘモグロビンを用いて、 10^6 種類の本鎖DNAの中から、SELEXによってヘモグロビンに親和性を持つ核酸が得られるか試みた。その結果、相同性のある配列を持つ数種類のDNAが得られた。

このことから、SELEXによってHIVプロテアーゼに親和性を持つアプタマーが開発できると考えられる。引き続き、HIVプロテアーゼに親和性を持つ核酸のスクリーニングを行い、得られたアプタマーの野生型および変異型HIVプロテアーゼの阻害活性を検討する予定である。

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](計11件)

El-Mahdy AF, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Dendrimer-like polymeric DNAs as chemiluminescence probes for amplified detection of telomere DNA on a solid-phase membrane, *Chem. Commun.*, 査読有、2014、50、859-861. DOI:10.1039/c3cc47454b.

Dragusha S, Shibata T, Yin S, Fujita JY, Kabashima T, Kai M, Selective, sensitive and fluorometric determination of urinary cytosine with 4-trifluoromethylbenzamidoxime and N,N-dimethylformamide, *Clin. Chim. Acta*, 査読有、2014、429、123-128. DOI: 10.1016/j.cca.2013.11.027.

Rahman MS, Kabashima T, Yasmin H, Shibata T, Kai M, A novel fluorescence reaction for N-terminal Ser-containing peptides and its application to assay caspase activity, *Anal. Biochem.*, 査読有、2013、433、79-85. DOI: 10.1016/j.ab.2012.10.018.

Smanmoo S, Kawasaki S, Tangboriboonrat P, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Selective FL quenching or enhancing of diimine ligands by guanine, *J. Fluoresc.*, 査読有、2013、23、853-857. DOI: 10.1007/s10895-013-1216-8.

Zhu Q, Shibata T, Kabashima T, Kai M,

Inhibition of HIV-1 protease expression in T cells owing to DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA, *Eur. J. Med. Chem.*, 査読有、2012、56、396-399. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.07.045.

Yasmin H, Shibata T, Rahman MS, Kabashima T, Kai M, Selective and sensitive determination of peptides using 3,4-dihydroxyphenylacetic acid as a fluorogenic reagent, *Anal. Chim. Acta*, 査読有、2012、721、162-166. DOI:10.1016/j.aca.2012.01.035.

Azam MG, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Alkaline phosphatase-labeled macromolecular probe for sensitive chemiluminescence detection of proteins on a solid-phase membrane, *Anal. Bioanal. Chem.*, 査読有、2011、401、1211-1217. DOI: 10.1007/s00216-011-5196-8

Azam G, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Sensitive chemiluminescence detection of prion protein on a membrane by using a peroxidase-labeled dextran probe, *Anal. Sci.*, 査読有、2011、27、715-720.

Yamasuji M, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Chemiluminescence detection of telomere DNA in human cells on a membrane by using fluorescein-5-isothiocyanate-labeled primers, *Anal. Biochem.*, 査読有、2011、413、50-54. DOI:10.1016/j.ab.2011.01.047.

Shibata T, Wainaina MN, Miyoshi T, Kabashima T, Kai M, A manual sequence method of peptides and phosphopeptides using 4-(1'-cyanoisindolyl)phenylisothiocyanate, *J. Chromatogr. A*, 査読有、2011、1218、3757-3762. DOI:10.1016/j.chroma.2011.04.040

Shibata T, Kawasaki SY, Fujita JY, Kabashima T, Kai M, A novel and specific fluorescence reaction for uracil, *Anal. Chim. Acta*, 査読有、2010、674、234-238. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.028.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/26/6/26_6_645/_pdf

[学会発表](計49件)

椋島力、ペプチド特異的蛍光誘導体化反応を用いた変異型HIV-1プロテアーゼの識別、日本薬学会第134年会、2014年3月27-30日、熊本市総合体育館

Ahmed El-Mahdy、Dendrimer-like polymeric DNAs as a chemiluminescence probe、第30回日本薬学会九州支部大会、2013年12月7-8日、長崎国際大学

和田怜、FITC修飾を施した二本鎖核酸の細胞膜透過性、第30回日本薬学会九州支部大会、2013年12月7-8日、長崎国際大学

永本佳菜子、プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質の酵素分解を促進する薬剤の探索、第30回日本薬学会九州支部大会、2013

年 12 月 7-8 日、長崎国際大学

椋島力、薬剤耐性を示す HIV-1 プロテアーゼの新規蛍光識別法の開発、第 54 回日本熱帯医学会大会、2013 年 10 月 4-5 日、長崎ブリックホール

Valon Ejupi, Fundamental Conditions for assay of collagenase activity using a novel fluorescence reaction、日本分析化学会第 62 年会、2013 年 9 月 10-12 日、近畿大学

Qinchang Zhu、A multi-substrate fluorometric assay for HIV-1 protease activity and its application in drug resistance detection、2013 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry (CJK 2013)、2013 年 8 月 23-24 日、Abstracts P44-45、九州大学

Sheng Yin、A novel and specific fluorescence reaction for orotic acid、The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XII)、2013 年 8 月 22-24 日、九州大学

Ahmed El-Mahdy、Chemiluminescence detection of telomere DNA by using dendrimer-like polymeric DNAs、第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2013 年 8 月 2-3 日、昭和大学

川島歌織、新規蛍光反応を用いたウイルス識別法の開発、第 50 回化学関連支部合同九州大会、2013 年 7 月 6 日、北九州国際会議場

坂元謙太、核酸輸送のための蛍光物質の細胞膜透過性、第 50 回化学関連支部合同九州大会、2013 年 7 月 6 日、北九州国際会議場

Takayuki Shibata、Inhibition of the expression of HIV-1 protease in CD4⁺ T cells owing to DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA、The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium、2012 年 12 月 10-12 日、長崎大学

中村祐介、真核細胞発現系を用いたプリオンタンパク質の発現と精製、第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8-9 日、熊本大学

松木勝仁、マイクロチップ電気泳動を用いた迅速なペプチド検出法の開発、第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8-9 日、熊本大学

Qinchang Zhu, DNA aptamer-mediated siRNA delivery inhibits the expression of HIV-1 protease in T cells、2012 China-Japan-Korea symposium on analytical chemistry、2012 年 10 月 16-18 日、上海市

Masaaki Kai、Highly selective and sensitive method for the determination of collagen in mammalian tissue by a novel fluorescence reaction、The 6th Shanghai international symposium on analytical chemistry、2012 年 10 月 16-18 日、上海市

Dragusha Shpend、A novel fluorescence derivatization reaction specific for cytosine、日本分析化学会第 61 年会、2012 年 9 月 19-21 日、金沢大学

永本佳菜子、真核細胞における組換え HIV-1 プロテアーゼの発現と検出法の開発、日本分析化学会第 61 年会、2012 年 9 月 19-21 日、金沢大学

室田紗由美、プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質の酵素分解の促進、第 25 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2012 年 8 月 8-10 日、慶応義塾大学

Qinchang Zhu、The potential application of DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA in anti-HIV therapy、第 25 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2012 年 8 月 8-10 日、慶応義塾大学

⑳永本佳菜子、HIV-1 プロテアーゼの発現プラスミドの作製と真核細胞での発現、第 30 回九州分析化学若手の会 夏季セミナー、2012 年 7 月 27-28 日、休暇村指宿

㉑尹晟、A fluorescence reaction for the sensitive quantification of orotic acid、第 30 回九州分析化学若手の会 夏季セミナー、2012 年 7 月 27-28 日、休暇村指宿

㉒Yasmin Hasina、A highly sensitive and quantitative assay for collagen in biological sample by a novel fluorescence reaction、第 72 回 分析化学討論会、2012 年 5 月 19-20 日、鹿児島大学

㉓室田紗由美、プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質のプロテアーゼ分解における界面活性剤の効果、第 72 回 分析化学討論会、2012 年 5 月 19-20 日、鹿児島大学

㉔Rahman Mohammed Shafikur、A novel fluorescence reaction for N-terminal serine-containing peptides and its application to assay of caspase activity、第 72 回 分析化学討論会、2012 年 5 月 19-20 日、鹿児島大学

㉕Shpend Dragusha、4-Trifluorobenzamidoxime as a specific fluorogenic reagent for cytosine、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学

㉖尹晟、A fluorescence reaction for the sensitive quantification of orotic acid、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学

㉗朱欽昌、Inhibition of HIV-1 Protease Expression in T cells Using CD4 aptamer-siRNA Chimeras、第 28 回日本薬学会九州支部大会、2011 年 12 月 10-11 日、福岡大学

㉘西村沙也加、タンパク質マルチラベル化高分子の合成及び化学発光検出プローブとしての応用、生物発光化学発光研究会第 28 回 学術講演会、2011 年 10 月 8 日、長崎大学

㉙Rahman Mohammed Shafikur、カスパーゼ 3 および 8 活性の新規蛍光測定法の開発、日本分析化学会第 60 年会、2011 年 09 月 14-16 日、

名古屋大学

③① Yasmin Hasina, Determination of collagen in mammalian tissue by a novel fluorescence reaction, 日本分析化学会第60年会, 2011年09月14-16日, 名古屋大学

③② 藤田順也, 3-メチルベンズアミドオキシムを用いた尿中ウラシル定量法およびジヒドロピリミジン脱水素酵素欠損症診断への応用, 日本分析化学会第60年会, 2011年09月14-16日, 名古屋大学

③③ 松木勝仁, 蛍光誘導体化反応と電気泳動を組み合わせたペプチドの迅速な分離, 第24回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2011年8月31-9月2日, 大山ロイヤルホテル

③④ 中村祐介, 酵素分解に抵抗性を示すプリオンタンパク質 (PrP) の作製と真核細胞でのPrPの発現, 第24回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2011年8月31-9月2日, 大山ロイヤルホテル

③⑤ 小代昌平, siRNAの分解及び核酸塩基の修飾による分解抵抗性の獲得, 第29回九州分析化学若手の会 夏季セミナー, 2011年7月28-29日, 国民宿舎めかり山荘

③⑥ 和田怜, 2環状デオキシシチジンを有する人工siRNAの合成研究, 第29回九州分析化学若手の会 夏季セミナー, 2011年7月28-29日, 国民宿舎めかり山荘

③⑦ Hasina Yasmin, 3,4-dihydroxyphenyl acetic acidを用いたペプチドの蛍光検出法, 日本薬学会第131年会, 2011年3月29日, ツインメッセ静岡

③⑧ Rahman Md. Shafikur, ペプチド選択的な蛍光反応のカスパーゼ活性測定への応用; 日本薬学会第131年会, 2011年3月29日, ツインメッセ静岡

③⑨ 藤田順也, ウラシル特異的蛍光誘導体化反応を用いた尿中ウラシルのハイスループット定量法, 日本薬学会第131年会, 2011年3月29日, ツインメッセ静岡

④⑩ 山筋睦美, TMPG反応を用いた膜上テロメアDNAの高感度検出法の開発, 第27回日本薬学会九州支部大会, 2010年12月11日, 長崎大学

④⑪ 藤田順也, 特異的蛍光誘導体化反応による尿中ウラシルの定量, 第27回日本薬学会九州支部大会, 2010年12月11日, 長崎大学

④⑫ 唐辰虹, Assay method for caspase activity with a selective fluorescence reaction for peptides, 第27回日本薬学会九州支部大会, 2010年12月11日, 長崎大学

④⑬ Md. Golam Azam, Alkaline phosphatase-labeled chemiluminescent probe for sensitive immunoassay of proteins on a solid-phase membrane, 第27回日本薬学会九州支部大会, 2010年12月11日, 長崎大学

④⑭ 吉村裕紀, ルミノールを基本骨格とする新規化学発光ラベル化剤, 第27回日本薬学会九州支部大会, 2010年12月11日, 長崎大学

④⑮ 河井健真, HIVプロテアーゼを認識するア

プタマーの探索, 第27回日本薬学会九州支部大会, 2010年12月11日, 長崎大学

④⑯ 長谷康志, 人工siRNAによるHIVプロテアーゼの発現阻害, 第27回日本薬学会九州支部大会, 2010年12月11日, 長崎大学

④⑰ 室田紗由美, プリオンタンパク質の溶解性における銅イオンの影響, 第27回日本薬学会九州支部大会, 2010年12月11日, 長崎大学

④⑱ Hossain Md. Towhid, Aptamer-mediated chemiluminescence detection of prion protein using trimethoxyphenylglyoxal on membrane, 第23回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2010年7月22日, ホテル松島大観荘

④⑲ 椛島力, 新規ペプチド蛍光誘導体化反応を基にしたウイルス識別法の開発, 第23回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2010年7月22日, ホテル松島大観荘

〔図書〕(計2件)

甲斐雅亮, 椛島力, 廣川書店, 薬学物理化学演習 [第3版] (第5章 電解質溶液), 2011, 53-62

甲斐雅亮, 椛島力, 廣川書店, 薬学物理化学 [第5版] (第5章 電解質溶液), 2010, 78-98

〔産業財産権〕

出願状況 (計2件)

名称: ペプチドの検出方法

発明者: 甲斐雅亮, 椛島力, 柴田孝之

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-045491

出願年月日: 2011年3月2日

国内外の別: 国内

名称: 2環状シトシン誘導体含有人工二本鎖核酸

発明者: 甲斐雅亮, 椛島力, 柴田孝之

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-045485

出願年月日: 2011年3月2日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/function/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椛島 力 (KABASHIMA, Tsutomu)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 20274673