

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：31603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570147

研究課題名(和文) HIV-gp120の糖鎖と新規高活性抗HIVレクチンとの結合様式の解明

研究課題名(英文) Structural basis on a new potent anti-HIV lectin in complex with oligomannoses of HIV-gp120

研究代表者

竹中 章郎 (Takenaka, Akio)

いわき明星大学・薬学部・研究員

研究者番号：80016146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗HIVレクチンのアクチノヒビン(AH)とHIVの表面糖鎖HMTGとの結合様式の詳細を解明し、創薬の構造基盤を確立するために、AHと標的オリゴマンノースとの複合体結晶のX線解析を行った。AHは水素結合に加えて多数の疎水性相互作用による鍵と鍵穴のドッキング方式で標的を特異的に認識し結合することを解明した。また、AH分子同士間で粘着し易い性質があり、これがAHの高い標的結合能の要因となっていることも見出した。これらの特徴から、AHは抗HIV薬剤として開発するに値する極めて有望な分子素材である事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lectin actinohivin (AH) is expected as a new drug candidate that blocks entry of HIV-1 into human susceptible cells. In order to reveal the structural details of AH in the specific interaction with HMTG protruded from HIV-1 surface, several crystal structures of AH in complex with the targets alpha(1-2)mannobiose and alpha(1-2)mannotriose have been determined by X-ray crystallography. These structures show that alpha(1-2)mannotriose of the principal target adopts a double bracket-shape conformation as a rigid structure, to which AH binds to recognize the target strictly in a Lock-and-Key fashion with so many hydrophobic interactions in addition to the hydrogen bonds. These structural features are useful for developing AH as a more effective antiretroviral drug to suppress the infectious expansion of HIV/AIDS and help expedite an end to the HIV/AIDS pandemic in the near future.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析 抗HIVレクチン オリゴマンノース

1. 研究開始当初の背景

(1) 後天性免疫不全症候群(AIDS)は、1981年に原因不明の病気として報告されたが、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タンパク質(gp120)が多く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、HIVのライフサイクルに必須のタンパク質を標的とする戦略に沿って、逆転写酵素、プロテアーゼおよびインテグラーゼを阻害する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り、単剤では容易に耐性株が出現して効かなくなるため、複数の薬剤を用いた多剤併用療法が実施されている。しかし、この方法では強い副作用の問題がある上に、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、感染者からウイルスを駆除できた例は皆無である。現在、毎年新たに300万人がHIVに感染し、その内エイズによる死亡者は年間200万人にも及ぶと報告されている。日本でも1万人を超える勢いで増加しており、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。

(2) このような状況の下、北里大の田中晴雄らは、HIVがヒト細胞に結合することを防止し、さらに薬剤耐性を発症しにくく、現在の抗HIV薬とは全く異なる作用機構を持ったタンパク質レクチン(アクチノヒビンと命名、以後AHと略記)を微生物から検索する以下の方法を考案した。HIVのヒト細胞への感染では、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の細胞内への侵入が可能となる。gp120の表面に密集した高マンノース糖鎖(HMTG)を標的として、この糖鎖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てHIVの感染を阻害できれば、糖鎖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ので、多剤耐性を克服する新薬の開発が期待できる。そこで田中ら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た結果、新種の放線菌 *Longispora albida* が目的のレクチンを産生することを見いだした。

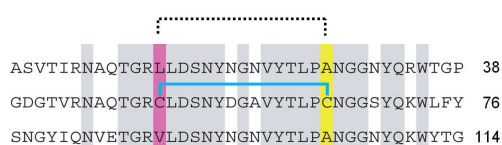


図1. 類似の配列が3回繰り返すAHのアミノ酸配列

(3) 我々のグループはその立体構造を解析することで協力し、先行実験でAHのapo型のX線結晶解析に成功した。その結果、以下の構造的長が明らかになった。図1が示すように、AHの立体構造は38個のアミノ酸残基でできた構造モジュールを3回タンデムに繰り返して、円筒状に閉じることによって構築されている。各モジュールにはポケット状の窪みがあり、マンノース結合部位であることを示唆している。各ポケットには1個のHMTGが結合するので、AHの3個のポケットに3個のHMTGが同時に結合することになり、AHのgp120への結合はかなり特異的で、結合力も強いと考えられる。この結果を記した論文は、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15633-15638 (2009)に掲載された。一方、対抗馬として競争相手の米国NCIで発見されたシアノピリン-Nも同様にHMTGに結合することが知られている。しかし、シアノピリン-Nは1個のHMTGを持つ糖タンパク質に結合する点で異なっている。さらに、シアノピリン-Nは、マイトジェン活性や粘膜刺激性があることが原因で薬剤としての開発は頓挫している。AHではマイトジェン活性が検出されず、粘膜刺激性もないなど、きわめて優れた特性を持っている。最近、同様にNCIで発見されたグリフィシンも、特異的に糖鎖を認識する構造であると報告されており、糖鎖を標的とした薬剤開発では本研究と競争に当たっている。

2. 研究の目的

上記の経緯から、AHがもつ優れた抗HIV活性を活かして、より効果的な薬剤として改良するためには、AHの構造改変に必要な構造基盤を解明する必要がある。本研究では、(1) AHとHMTGやHMTGを構成する種々のオリゴマンノースあるいはgp120との複合体のX線解析によって、これらの分子とAHとの結合様式を解明し、(2) 種々のマンノース糖鎖との特異な相互作用の特徴を明らかにし、(3) AHをタンパク質性HIV/AIDS予防・治療薬として改変するための構造基盤を確立することを本研究の目的としている。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、次の実験内容を実施した。

(1) まずAHの結晶化の再現性を高めるために、結晶化条件だけでなく産生菌の培養法も含めてAHの精製法を検討した。またAHの溶解度を上げるために種々の有機溶媒やpHの効果を調べた。

(2) 図2に示すように、標的HMTGの分岐した3個の糖鎖D1、D2、D3の先端部位に共通して存在するα(1,2)マンノビオース(MB)に特異的に結合するが、3種類の糖鎖間(3番目のMan残基の結合が、D1ではα(1,2)、D2ではα(1,3)、D3ではα(1,6)と異なる)では、AHはD1「α(1,2)マンノトリオース」にもつ

とも強く結合し、D3 に弱く結合することが分かっているため、この特異性を解明することに主眼を置いて、(AH と MB)の複合体ならびに(AH と D1)および(AH と D2)の複合体

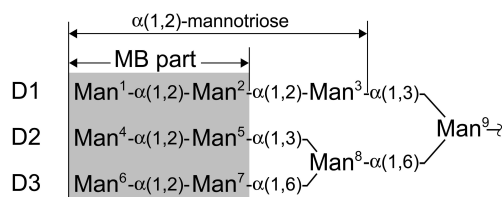


図2. 高マンノース糖鎖 HMTG の化学構造.

の結晶化条件の検索を行った。さらに、(AH と HMTG)や(AH と gp120)の複合体の結晶化にも挑戦した。

(3) 得られた3種類の(AH:MB)単結晶と1種類の(AH:D1)単結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構のPFでX線回折データを測定した。構造決定はCCP4の解析ソフトを用いて行った。

4. 研究成果

(1) タンパク質精製法の改良

先行実験において成功したAHの結晶化が再現できなくなる原因を解明できた。

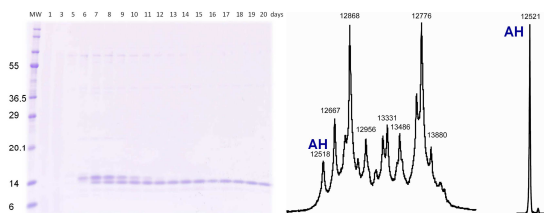


図3. 菌体培養日数を1~20日と変化させた産生タンパク質の変性PAGE(左)と培養期間7日(中央)と20日(右)の質量分析結果.

図3に示すように、①産生菌の培養日数を20日にすることによってAHのシグナルペプチドが完全に消失して均一なAHが得られることが明らかになった。この純度の改善により結晶化の再現性を高めることができ、構造研究を促進する上で大きな原動力となった。また、②pHを酸性にすることや、少量のアセトニトリル、アルコールあるいは糖類を添加することでAHの溶解度が上昇することも明らかになった。これらの成果を記した論文を2012年のIUCr学術雑誌Acta Cryst. Sect. F68に発表した。

(2) AH-MB複合体結晶のX線解析

結晶化条件を変化させることにより、3種類の結晶(AH-MB-1, AH-MB-2, AH-MB-3)を得た。まず、高分解能のX線回折データは、①表に示すように、AH-MB-1の空間群がP2₁3で非対称単位に1/3個のAH分子が存在する

ことを示唆した。しかし、AH分子のアミノ酸配列を均等に3分割することができない。

Crystal form	AH-MB-1	AH-MB-2	AH-MB-3
Resolution(Å)	1.59	1.90	1.57
R_{merge}	0.080	0.089	0.111
R_{pim}	0.034	0.029	0.068
Space group	$P 2_1 3$	$P 2_1 2_1 2$	$P 2 2_1 2_1$
Unit cell			
a (Å)	56.2	27.8	54.8
b (Å)	56.2	67.1	66.9
c (Å)	56.2	66.8	66.9
Molecules/AU	1/3	1	2

実際に空間群をP2₁3として解析しても合理的な正解を得られなかった。空間群P2₁3から3回回転対称を除けば、空間群はP2₁2₁2₁に低下し、非対称単位のAHは1分子となり、上述の矛盾を解消できるが、a軸とb軸とc軸の長さが等しくなり、斜方晶系では通常有り得ない結晶となる。それでも空間群をP2₁2₁2₁として解析すると、AH全体が分子の重心の周りで120°回転した3種類の等価な解が得られた。これらの結果は、3種類の構造が1個の結晶の中でランダムに乱れていることを示唆している。そこで、空間群をP2₁3に戻して、3回回転操作による3種類の乱れに対して1/3の占有率を仮定して結晶構造を精密化することにより、立体構造の詳細を決定することができた。この結晶構造は、タンパク質分子内部の局所的乱れではなく、図4に示すように、分子全体が大きく乱れて低分子結晶で見られる分子パッキングの乱れによる空間群対称の上昇がタンパク質

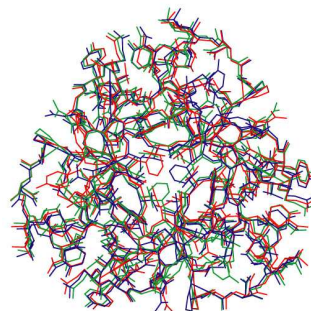


図4. 120°毎回転したAH分子(赤, 青, 緑)が同一場所を占有.

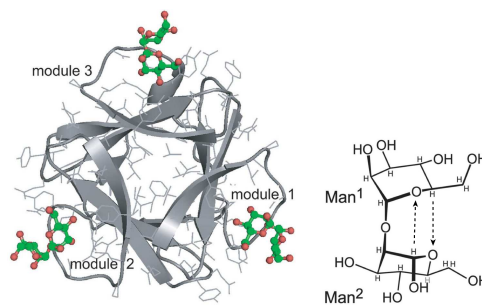


図5. AH分子と結合した3個のMB分子. 各MB分子はCH...O型の水素結合によってブラケット(カタカナのコの字)型のコンフォメーション(右図)を採っている。

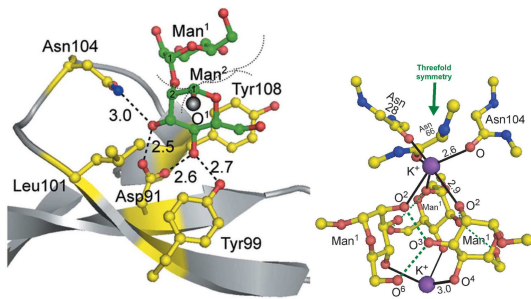


図6. AH分子のアミノ酸配列.

結晶でも起こりえることを示しており、同様の理由により諦めていた他のタンパク質の構造解析を可能にした。

②図5に示すように、3個のモジュールで構成されたAHはモジュール間で高い3回回転対称を有し、各モジュールに存在するポケットにMBが結合している様子を明らかにした。Man残基間で二重のCH \cdots O型水素結合によってコの字型のコンホメーションを採り、安定した硬い構造を保持するMB分子は、図6に示すように、Asp残基のカルボキシル基とマンオースの3位と4位の水酸基との間でOH \cdots O型の強い水素結合によって認識されていることも明らかになった。また、2個のカリウムイオンのうち1個はAH分子内の3回対称に従って結合し、残りは3分子のAHを集合させて結晶の空間群対称の上昇に関与していることも判明した。

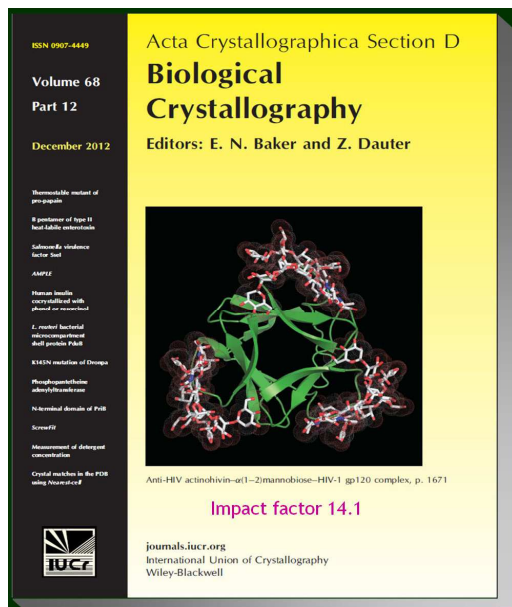


図7. 2012年の国際学術雑誌 *Acta Crystallogr. Sect. D* の表紙絵として採択され、第68巻の表紙を飾ったAHの立体構造

以上の結果をまとめた論文をIUCrが発行する高IFの国際学術雑誌 *Acta Crystallogr. Sect. D* 68に投稿したところ、内容が極めて高度なため、③即座に受理され、その構造図が

図7に示すように、論文掲載号の表紙絵として採択された。また、これらの研究成果は新聞紙上でも報道された。

次に、④カリウムイオンを使わずに得られた2種類の結晶AH-MB-2とAH-MB-3では、AH-MB-1とは異なる奇妙な結晶構造を見出した。前頁の表に示したように、どちらの結晶も空間群は同じP22₁2₁で、軸長はa \neq b \approx cの関係にあり、AH-MB-3のa軸長がAH-MB-2のa軸長のほぼ2倍になっているが、どちらも結晶もb \approx cであるが、両結晶の強度分布は正方晶系の4回対称を示さない。AH-MB-3の回折データを使ってhが奇数と偶数の反射の平均強度を比較すると、奇数の強度が弱いことが判明した。このことは、平面状に並んだ分子層が積相するときの生じる特徴であり、タンパク質結晶でははじめての例である。解析結果の結晶構造は、予想通りで、図8に示すように、AH-MB-2では単一層Aがa軸方向に積層しているが、AH-MB-3では、互いに少しずれた2層AとA*が交互に積層していることを明らかにした。

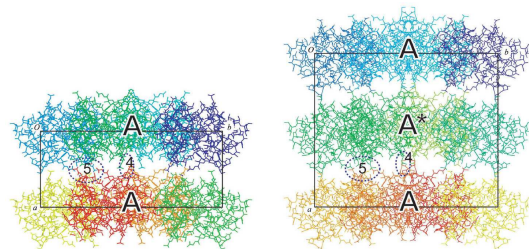


図8. AH-MB-2とAH-MB-3の積層構造

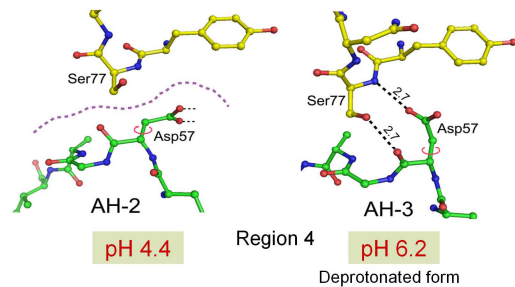


図9. AH-MB-2とAH-MB-3の積層の相違

⑤層間の接触は、図8に示す領域<4>と<5>で生じているが、接触の仕方は5では同じである。<4>では図9に示すように、AH-MB-2とAH-MB-3でAsp57の水素結合がpHによって変化していることが分かった。この小さな動きが結晶内での層構造の積層に変化をもたらしたものと考えられる。

⑥層内ではAH分子同士が横方向に接触している。その方法はAH-MB-2とAH-MB-3で全く同じである。このようなAH同士の相互作用は、AHが標的HIV-gp120から突き出た多数のHMTGに集団的に連携して結合することを示唆している。この集団的相乗効果はAHを薬剤として改良する上で極めて重要

な構造基盤となる。実際に2個のAH分子をリンカーで連結させた二量体型のAH2は活性が大幅に上昇することが分かった。

⑦AH-MB-2とAH-MB-3においても、MBはAH-MB-1結晶の場合と同様に、Man残基間で二重のCH \cdots O型水素結合によってコの字型の安定なコンホメーションを採り、その形状をAHが認識している。以上の成果をまとめた論文も2013年の*Acta Crystallogr. Sect. D69*に掲載された。

(3) AH-D1 複合体結晶のX線解析

AHはHMTGのD1にもっとも強く結合する。D2およびD3との違いは第3番目のMan残基の結合がD1鎖では $\alpha(1,2)$ である点である。この特異性を発現するためには、各ポケットに3残基を識別するサイトが存在すると考えられた。それを確定するためにX線解析を行ったのが、AH-D1複合体の結晶構造である。

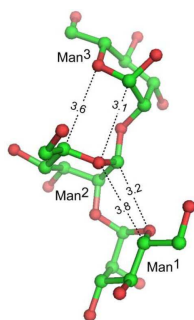


図 10. D1 の分子構造

結晶内では、図10に示すように、①D1の3個のMan残基はダブル・ブラケット型のコンホメーションを保持し、図11に示すように、②Man¹、Man²、Man³残基が順にAHのポケット内の3個のサイト(1, 2, 3)に結合していることが判明した。

Man¹とMan²のAHとの結合は、MBの場合と同じように、Asp残基が水素結合でMan²の第3および第4水酸基が認識しているが、さらに、③ループ内に閉じ込められた水分子

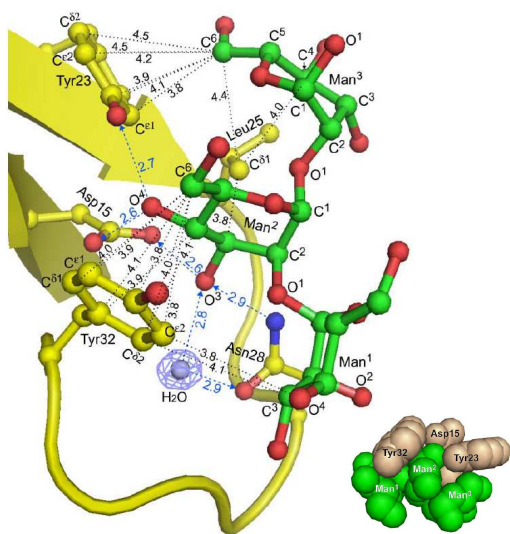


図 11. D1 認識に関与する水素結合と疎水性相互作用。H₂O を取り囲む籠はオミットマップ法による水分子の電子密度を表す。右下図は鍵と鍵穴の関係にあるAHとD1(緑)のドッキングの様子を示す。

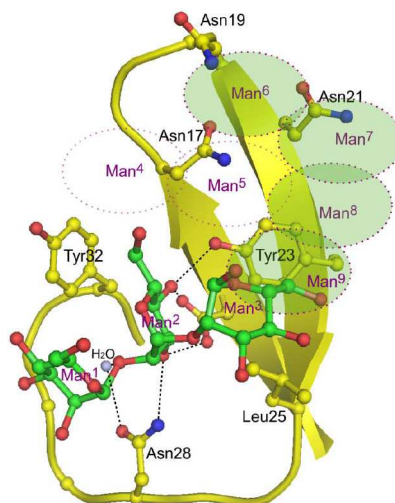


図 12. 予測される D3 鎖の結合サイト。

も認識に関与していることが明らかになった。この水分子はAH-MB結晶でも見出されており、 $\alpha(1,2)$ 結合で保持されたMan¹とMan²残基を識別する重要な役割を担っていると考えられる。これらの親水性相互作用に加えて、④図11に示すように、Tyr残基の疎水性部分と、Man¹とMan²の疎水性部分の間で多くの疎水性相互作用が見つかった。また、Man³と別のTyr残基の間にも疎水性相互作用が働き、Man³の水酸基は溶媒領域に露出していることが分かった。これらの疎水性接触面は広範囲に広がり、通常の酵素と基質の間に見られる鍵と鍵穴による形状認識がAHでも成立していることを示している。この事実はAHの溶解度が低くアルコール類等の添加で溶解しやすくなる性質と関係しており、AHを薬剤として応用するときの投与方法にヒントを与えるものと期待できる。

④D1鎖をAHに固定してD3鎖の末端(Man⁶)に達する経路を予測すると、図12に示すように、モジュール間で保存されたアミノ酸が待機するサイト4に至る。この窪みには親水性のアミノ酸残基が存在していて、小さなAH分子の表面上に残された唯一のサイトであり、その大きさはD3の先端が接するには適した部位である。このサイトはAH-MB-1の解析直後に分子モデルを使って推定したものの矛盾しないことが分かった。以上の成果を記した論文を2014年の*Acta Crystallogr. Sect. F70*に投稿した。

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13件)

(1) Fang Zhang, Mominul M. Hoq, Jiandong Jiang, Kaoru Suzuki, Masaru Tsunoda, Yoichi

Takeda, Yukishige Ito, Haruo Tanaka and Akio Takénaka, "The characteristic structure of anti-HIV actinohivin in complex with three HMTG-D1 chains of HIV-gp120", *Acta Crystallogr. Sect. F*, **70**, submitted (2014), 査読有

- (2) Kaoru Suzuki, Masaru Tsunoda, M. Mominul Hoque, Fang Zhang, Jiandong Jiang, Xiaoxue Zhang, Naomi Ohbayashi, Haruo Tanaka and Akio Takénaka, "Peculiarity in crystal packing of anti-HIV lectin actinohivin in complex with $\alpha(1-2)$ mannobiose", *Acta Crystallogr. Sect. D*, **69**, 1818–1825, (2013), 査読有, IF=14.1, doi:10.1107/S0907444913017812,
- (3) M. Mominul Hoque, Kaoru Suzuki, Masaru Tsunoda, Jiandong Jiang, Fang Zhang, Atsushi Takahashi, Naomi Ohbayashi, Xiaoxue Zhang, Haruo Tanaka, Satoshi Omura and Akio Takénaka, "Structural insights into the specific anti-HIV property of actinohivin; Crystal structure of its complex with the $\alpha(1-2)$ mannobiose moiety of gp120", *Acta Crystallogr. Sect. D*, **68**, 1671–1679 (2012), 査読有, IF=14.1, doi:10.1107/S0907444912040498
- (4) Kaoru Suzuki, Naomi Ohbayashi, Jiandong Jiang, Xiaoxue Zhang, M. Mominul Hoque, Masaru Tsunoda, Kazutaka Murayama, Haruo Tanaka and Akio Takénaka, "Crystallographic study of the interaction of the anti-HIV lectin actinohivin with the $\alpha(1-2)$ mannobiose moiety of gp120 HMTG", *Acta Crystallogr. Sect. F*, **68**, 1060–1063 (2012), 査読有, IF=0.6, doi:10.1107/S1744309112031077,

[学会等発表] (計9件)

- (1) F. Zhang, M.M. Hoque, K. Suzuki, M. Tsunoda, Y. Takeda, Y. Ito, H. Tanaka and Akio Takénaka, "Structure insight of anti-HIV actinohivin in complex with $\alpha(1,2)$ mannotriose", ヨーロッパ結晶学国際会議ECM28, 2013年8月25-28日, Warwick, United Kingdom
- (2) M. Tsunoda, M.M. Hoque, J. Jiang, K. Suzuki, N. Ohbayashi, X. Zhang, T. Sekiguchi, H. Tanaka and Akio Takénaka, "アクチノヒビンが示す標的 $\alpha(1-2)$ マンノピオースとの複合体の結晶構造における奇妙な性質", 平成25年度日本結晶学会年会CrSJ-2013, 2013年10月11-13日, 熊本, 日本
- (3) Akio Takénaka, "Structural insight of anti-HIV lectin actinohivin specifically bound to HMTG of gp120", 瀋陽薬科大学セミナー, 2013年5月6-11日, 瀋陽, 中国
- (4) Akio Takénaka, "The peculiar property in crystal packing of anti-HIV-1 lectin actinohivin (AH) complexed with the target $\alpha(1-2)$ mannobiose (MB)", IGBMC-CNRSセミナー, 2013年9月2日, Strasbourg, France
- (5) M.M. Hoque, J. Jiang, K. Suzuki, M. Tsunoda, N. Ohbayashi, X. Zhang, T. Sekiguchi, H.

Tanaka and Akio Takénaka, "Structural evidence of anti-HIV lectin actinohivin specific to HMTG of gp120", ヨーロッパ結晶学国際会議ECM27, 2012年8月6-11日, Bergen, Norway

- (6) M.M. Hoque, K. Suzuki, M. Tsunoda, J. Jiang, F. Zhang, A. Takahashi, N. Ohbayashi, X. Zhang, H. Tanaka and A. Takénaka, "Structural insights of a potent anti-HIV actinohivin upon binding specifically to the target oligomannose of HMTG attached to HIV-gp120", 日本結晶学会年会CrSJ2012, 2012年10月25-26日, 仙台, 日本
- (7) M.M. Hoque, K. Suzuki, M. Tsunoda, J. Jiang, F. Zhang, A. Takahashi, N. Ohbayashi, X. Zhang, H. Tanaka and Akio Takénaka, "Structural insights of a potent anti-HIV actinohivin upon binding specifically to the target oligomannose of HMTG attached to HIV-gp120", アジア結晶学国際会議AsCA12, 2012年12月2-6日, Adelaide, Australia
- (8) M.M. Hoque, J. Jiang, K. Suzuki, M. Tsunoda, A. Takahashi, T. Sekiguchi, H. Tanaka and Akio Takénaka, "Specificity and efficiency in activity of anti-HIV actinohivin for sugar binding", 国際結晶学連合大会IUCr-2011, 2011年8月22-30日, Madrid, Spain
- (9) J. Jiang, M.M. Hoque, K. Suzuki, M. Tsunoda, A. Takahashi, T. Sekiguchi, H. Tanaka and Akio Takénaka, "Structure determination (2) of anti-HIV actinohivin in complex with mannobioses", 国際結晶学連合大会IUCr-2011, 2011, 年8月22-30日, Madrid, Spain

[図書] (計1件)

竹中章郎・藤井保彦, "X線・中性子の散乱理論入門"(和訳), 211頁, 森北出版(2014)

[その他(新聞報道)]

- (1) 福島民報, 平成24年12月21日(金), "抗HIVタンパク質アクチノヒビン, C型肝炎にも効果, いわき明星大 研究チーム発見"
- (2) 福島民友, 平成24年12月21日(金), "C型肝炎治療へ一歩, HIV研究で解明, タンパク質に抑制機能"
- (3) いわき民報, 平成24年12月21日(金), "明星大学の研究グループ, C型肝炎への効果も発見アクチノヒビン"

ホームページ等

<http://www.xtal.jp/BioSC/reports/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中章郎 (いわき明星大学, 千葉工業大学)

研究者番号: 80016146