

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460055

研究課題名(和文) ウイルス由来酸性プロテアーゼにおける薬剤耐性の分子機構機構の解明

研究課題名(英文) Study on Molecular Mechanism in Drug Resistance of Virus Acid Protease

研究代表者

安達 基泰 (Adachi, Motoyasu)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員(定常)

研究者番号：60293958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性ウイルスの出現は、現代の重要な医療問題の一つである。A17株由来の薬剤耐性HIVプロテアーゼ(A17-HIVPR)は酵素活性を保持したまま、阻害剤に対する親和性を減少させるという難解な特徴をもつ。本研究では、野生型HIVPRおよびA17-HIVPRにおいて、基質および阻害剤との相互作用を、i) 精密な立体構造解析(超高分解能X線および中性子構造解析)およびii) 等温滴定型カロリメトリーという2つの手法を用いて比較することにより、薬剤耐性獲得の分子機構を解明に向けて研究をすすめた。本研究で得られる知見は、薬剤耐性HIVPRに対する効果的な医薬品創製に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Emergence of drug resistant virus is one of the serious medical issues. Human immune deficiency virus protease (HIVPR) derived from A17 virus strain exhibits the complicated characteristics in decreasing affinity to inhibitors of Ritonavir (RTV), Lopinavir (LPV). In this study, interactions of protease with substrates and inhibitors were investigated by i) high resolution X-ray and neutron crystallography, and ii) isothermal titration calorimetry to reveal molecular mechanism in drug resistance of a virus Acid protease, HIVPR. The designed HIV-PR will be useful to design the new effective inhibitors and medicines.

研究分野：タンパク質工学、構造生物学

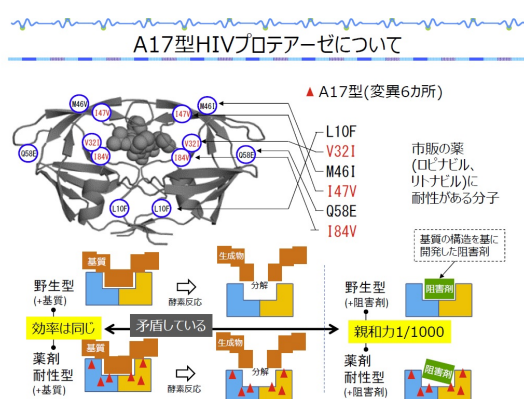
キーワード：HIVプロテアーゼ 薬剤耐性 不活性化酵素 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

後天性免疫不全症候群 AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) の患者は、全世界に 3500 万人以上いると推定されている。HIV プロテアーゼ (HIVPR) 阻害剤は、立体構造情報を駆使して医薬品が開発された最初の例であり、現在では、逆転写酵素阻害剤と並び主要な抗 HIV 薬として多剤併用療法に利用されている。これまでに 10 種類以上の HIVPR 阻害剤が上市されており、その中で Ritonavir (RTV) と Lopinavir (LPV) は、過去に第一選択薬として用いられてきた代表的な薬剤である。一方、これらの薬剤に対する耐性を獲得したウイルスの出現が大きな重要な医療問題の一つとなっている。

HIVPR は、アミノ酸 99 残基のサブユニット 2 つから成るホモ 2 量体を形成している。HIVPR の二量体間に一つの基質結合部位があり、そこに 2 つの触媒残基 (Asp25, Asp125) が存在する。阻害剤 RTV や LPV は、この基質結合部位に結合して、プロテアーゼ活性を拮抗阻害する。これまで、様々な薬剤耐性ウイルスの DNA 配列が決定され、HIVPR に必須な触媒残基等を除く様々な部位で変異が生じ、阻害剤に対する結合が低下していることが報告されている。薬剤耐性変異株 A17 (A17 型-HIVPR) の場合には、基質結合部位を含めた合計 6 箇所の変異 (L10F, V32I, I46M, V47I, Q58E, I84V) が生じているが、他の薬剤耐性 HIVPR と同様に基質に対する酵素活性 (KM, kcat) を大きく変化させずに阻害剤の親和性を 100~1000 倍に顕著に低下させている。阻害剤は、基本的に基質の構造を基に開発しているにも関わらず、阻害剤の親和性のみを低下させるという巧妙なメカニズムが存在する (図 1)。薬剤耐性ウイルスに対応した薬剤を開発するためには、まず、この巧妙な耐性メカニズムを解明する必要がある。

図 1



2. 研究の目的

本研究では、HIVPR の代表的な阻害剤 RTV と LPV に耐性をもつ新規な薬剤耐性変異株 A17 由来の HIVPR の薬剤耐性獲得機構の解明を行うことを目的とした。具体的には、野生型の HIVPR (WT-HIVPR) および A17-HIVPR に

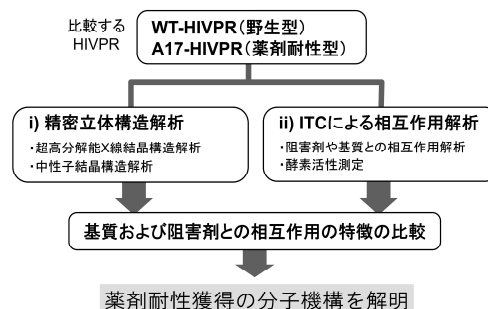
いて、基質および阻害剤との相互作用の特徴を、i) 精密な立体構造解析および ii) 等温滴定型カロリメトリー (ITC) という 2 つの手法を用いて解析し、両者の性質を比較することにより、薬剤耐性獲得の分子機構を解明することを目指した。精密立体構造解析については、放射光 X 線による超高分解能解析と中性子構造解析を併用した。

3. 研究の方法

A17-HIVPR の薬剤耐性獲得機構の解明を行うために、阻害剤あるいは基質との複合体形成における相互作用を、まず、精密立体構造解析した。迅速な測定・構造決定が可能な X 線結晶回折法と水素原子の検出に優れた中性子結晶回折法を併用して行った。これらの解析に必要なタンパク質試料や高品質結晶の作製には、これまでに申請者らが技術開発してきたタンパク質リフォールディング技術や結晶核形成制御技術を用いた。次に、滴定型等温カロリメトリー (ITC) を熱力学的に解析した。両解析によって得られる相互作用の特徴を野生型と薬剤耐性酵素で比較し、薬剤耐性獲得機構を考察した。概要を下の図 2 に示す。

図 2

薬剤耐性獲得の分子機構解明に向けて実施した研究手順



4. 研究成果

阻害剤が基質の構造を基に開発しているにも関わらず、阻害剤の親和性のみを低下させるという巧妙なメカニズムが存在することから、HIVPR と基質との相互作用解析が非常に重要となる。しかし、通常、活性型酵素をそのまま使うと基質が分解されて解析が困難である。そこで、HIVPR の触媒基の一つを非解離性の Asn 残基に置換し不活性化した酵素を設計し、発現プラスミドを作製後にタンパク質試料の調製を試みた。また、HIVPR は、ホモ 2 量体であるため、通常の方法で変異導入を実施すると 2 量体に 2 カ所変異が入ってしまう。これまでに進んでいる HIVPR と遷移状態アナログの中性子結晶構造解析の結果から、基質複合体解析にはプロトン化を観測した Asp25 のみを Asn に置換すべきであると考えられる。それを実現するため、HIVPR をコードする遺伝子 2 つを様々なリンカーで繋げることにより 2 量体を 1 本鎖化 (single

chain化)した不活性型 HIVPR (scHIVPR D25N) を作製し、試料の調製を実施した。さらに調製した試料と阻害剤 RTV との複合体を作製し、1.2Åの高分解能 X 線結晶構造解析に成功した。

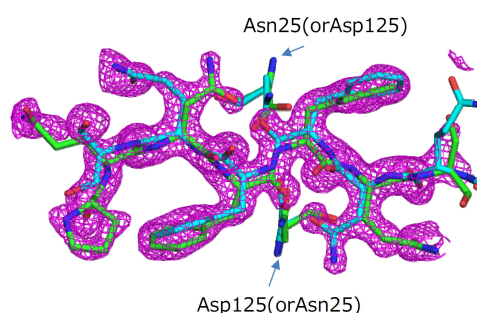
阻害剤 RTV との複合体で結晶を作製し、高分解能の解析に成功したことから、次に、基質との複合体の結晶構造解析をすすめた。変異体 scHIVPR D25N で活性が消失しているも、少ない残存活性で基質を分解する可能性がある。そこで、結晶化実験時において、温度を 4°C に下げることとタンパク質濃度を高く設定することで、結晶化の核形成の速度を早め、結晶析出までの基質の分解をできるだけ抑えた。その結果、HIVPR と基質との複合体結晶の作製に成功し、1.5Åの高分解能 X 線結晶構造解析に世界で初めて成功した。得られた回折データの統計値を表 1 に、HIVPR に結合する基質の電子密度マップを図 3 に示す。これまで、基質との複合体の報告がいくつかの報告があるが、いずれの場合も明瞭な電子密度マップは得られていない。今回、図 3 に示すように精度の高い解析に成功したことは、今後の研究展開においてブレイクスルーをもたらすだろう。

表 1

Protein	scHIVPR D25N
Ligand	Peptide (RPGNFFQSRP)
Source	X-Ray
Facility	KEK-PF
Beam Line	BL17A
Solvent	H2O
Temperature (K)	100K
Space group	P21212
Unit cell parameters (Å)	58.7, 86.3, 46.5
Resolution (Å)	1.50
No. of measured reflections	329589
No. of unique reflections	37772
Redundancy	8.7
R-merge (%)	6.9
Completeness of data (%)	97.9
I / sigI	27.9

図 3

マゼンダ色のメッシュが電子密度を表している。基質は結合方向が反対の 2 つのパターンで観測された。



次にさらに精密構造解析を行うため、中性子結晶構造解析をすすめた。中性子結晶構造解析では、X 線を使うと観測ができない水素原子の観測が可能になる。薬剤耐性 A17 は、野生型の HIVPR に比較して、V32I, V47I, I84V という変異があり、メチル基の立体構造が重要な情報となる。しかし、それらメチル基の構造決定するためには、水素原子の構造情報が必要であるため、中性子結晶構造解析を行うことが非常に効果的で直接的である。薬剤耐性の発現機構の解明に向けて、水素原子を観測するために、HIVPR と阻害剤複合体の中性子回折データの収集をすすめた。野生型 HIVPR および薬剤耐性 A17-HIVPR と阻害剤 RTV との複合体の大型結晶を作製後、ドイツ研究用原子炉でのビームタイムを取得し、分解能 2.1 および 1.5Å の中性子回折データを収集した(図 4、)。このことにより、水素原子を含めた立体構造解析が可能となった。予備的に精密化を進めた結果、統計値(R 値)が十分に下がり、十分な回折データが収集できたことが示された。今後、水素原子も含めた立体構造モデルを構築し、精密化を完了させる。さらに、野生型 HIVPR および薬剤耐性 A17-HIVPR との構造を緻密に比較することで、薬剤耐性機構の解明に鍵となる構造情報を明らかにする。

図 4

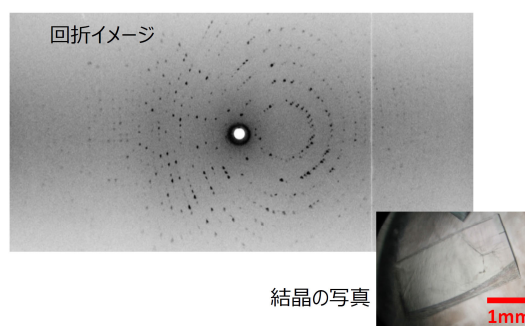


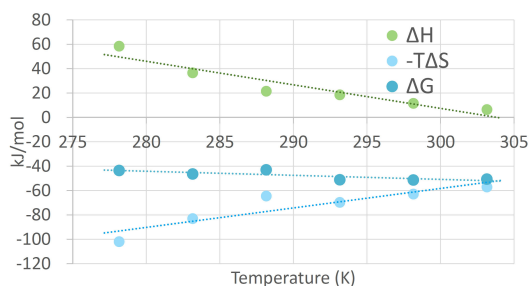
表 2

Protein	WT-HIVPR	A17-HIVPR
Ligand	RTV	RTV
Source	neutron	neutron
Facility	FRMII	FRMII
Diffractometer	BioDIFF	BioDIFF
Solvent	D2O	D2O
Temperature (K)	100K	100K
Space group	P21212	P21212
Unit cell parameters (Å)	60.2, 86.1, 46.5	60.3, 86.4, 46.6
Resolution (Å)	2.10	1.50
Measured reflections	27220	112461
Unique reflections	12833	35898
Redundancy	2.1	3.1
R-merge (%)	17.4	18.0
Completeness (%)	87.3	90.6
I / sigI	4.8	5.4

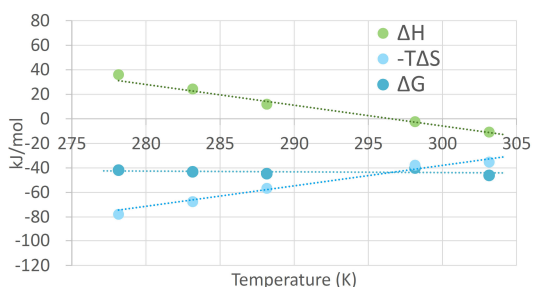
また、ITC を用いて薬剤耐性型 HIVPR の熱力学的解析を実施した。装置は、VP-ITC を用いた。阻害剤としては RTV を、HIVPR は、野生型 HIVPR および薬剤耐性 A17-HIVPR を用いて測定した。温度は、5°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C の 6 点で測定した。得られた実験結果を図 5 に示す。

図 5

A. 野生型 HIVPR と阻害剤 RTV との相互作用解析結果 1



B. A17 型 HIVPR と阻害剤 RTV との相互作用解析結果 1



本実験から明らかになった最も重要なことは、野生型の HIVPR に比較して、A17 型は、阻害剤の結合によって、比較的大きく構造変化しているということである。ΔS_{total} の値を比較すると、顕著に A17 型の方が大きい。このことは、A17 型の立体構造に阻害剤の結合を不安定化する原因が含まれることを示す。これまでの X 線結晶構造解析では、野生型と薬剤耐性型の間には顕著な違いは見つけれられていない。中性子を利用した精密構造解析によって、水素原子の構造情報を得ることが、薬剤耐性機構の解明に必要であると、改めて示された。

<今後の課題と方針>

本研究によって、i) 等温滴定型カロリメトリー (ITC) および ii) 精密な立体構造解析という 2 つの手法を用いて解析をすすめた。その中で、立体構造解析において、基質との複合体の高分解能結晶構造解析に成功したことは、非常に意義がある。今後、様々な基質や変異型 HIVPR を用いることで、これまで得られなかった多くの構造情報を得ることができるだろう。一方、中性子結晶構造解析については、大型結晶を作製し、期間内にデータ収集まで成功した。今後、精密構造解析をさらにすすめて行く。そして、最終的には、ITC による熱力学的パラメーターと立体構造

の相関から、HIVPR の薬剤耐性機構を解明し、薬剤耐性に効果的な薬の設計に貢献する。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

安達 基泰、HIV-1 プロテアーゼの薬剤耐性機構解明に向けた中性子解析、中性子生命科学研究会、2016 年 5 月 7 日、いばらき量子ビーム研究センター (茨城県東海村)

[その他]

ホームページ

<http://www.qubs.qst.go.jp/resinfo/Biofunction.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 基泰 (ADACHI Motoyasu)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子ビーム科学研究部門・高崎量子応用研究所・東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員

研究者番号：60293958

(2) 研究協力者

清水 瑠美 (SHIMIZU Rumi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子ビーム科学研究部門・高崎量子応用研究所・東海量子ビーム応用研究センター・主任技術員

(3) 研究協力者

柴崎 千枝 (SHIBAZAKI Chie)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子ビーム科学研究部門・高崎量子応用研究所・東海量子ビーム応用研究センター・任期付研究員

(4) 研究協力者

籠谷 勇児 (KAGOTANI Yuji)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子ビーム科学研究部門・高崎量子応用研究所・東海量子ビーム応用研究センター・派遣職員