

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15382

研究課題名(和文) 結晶・質量・熱力学解析による新規で強力なHIV-1プロテアーゼ二量体化阻害剤開発

研究課題名(英文) Development of Novel HIV-1 Protease Dimerization Inhibitors Using Crystal Structure, Thermal Stability and Mass Spectrum Analyses

研究代表者

満屋 裕明(Mitsuya, Hiroaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20136724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本萌芽研究は、HIV-1野生株及び多剤耐性株(HIV-1MDR)の両方に高い阻害活性を有する新規の二量体化阻害剤の開発を行う事を目的し、研究期間を通して、(1)新規化合物(GRL-015, -085及び-097)の作用機序と、(2)極めて強力な抗HIV-1活性を有するKU-241の二量体化阻害機構を解明する事に成功した。本研究成果は、新規二量体化阻害剤の設計に資するデータである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project was the development of novel HIV-1 protease dimerization inhibitors (PDIs), which were potent against both wild type HIV-1 (HIV-1WT) and multiple drug-resistant HIV-1 variants (HIV-1MDRs). During the study period, we obtained two important results. (i) Using the crystal structural analysis, we identified key functional groups of novel protease inhibitors (GRL-015, -085, and -097). The functional groups in such protease inhibitors interacted with the flap region of HIV-1 protease and enabled such novel inhibitors to block the replication of HIV-1MDRs. (ii) Using electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MS), we demonstrated the mechanisms of the most potent PDI termed as KU-241. KU-241 inhibited PR dimerization by binding PR monomer in the same way as darunavir, which was approved by FDA in 2006. The present results should shed light on designing further novel PDIs, which would inhibit both HIV-1WT and HIV-1MDRs.

研究分野：医学、ウイルス学、感染症学、創薬化学

キーワード：AIDS/HIV-1 二量体化阻害剤 結晶構造解析 熱安定性 質量分析

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type 1; HIV-1) に対する多剤併用療法 (antiretroviral therapy: ART) は、長足の進歩を遂げた。ART に使用する HIV-1 プロテアーゼ阻害剤 (PI) の第一選択薬である darunavir (DRV) は耐性株出現が極めて低い PI であり、HIV-1 プロテアーゼ (PR) の酵素活性だけでなく二量体化をも阻害する効果を持つ。しかし近年、この DRV 含む複数の PIs に耐性を獲得した多剤耐性 HIV-1 (HIV-1^{MDR}) の出現が問題となっており、HIV-1 の薬剤耐性獲得により抵抗性を示し、新たな作用機序を有する化合物の開発が急務である。

現在米国 FDA に認可された PIs は、PR の二量体 (dimer) に結合し酵素活性を阻害する事が知られている。一方、PIs の一つである DRV は PR の酵素活性阻害の他に PR の二量体化を阻害する機能を有している事が明らかとなっており、その詳細な作用機序に関しても既に我々のグループが報告している (Koh & Mitsuya, *J Biol Chem*, 282: 28709-28720, 2007; Hayashi & Mitsuya, *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 12234-12239, 2014)。

2. 研究の目的

本研究は、結晶構造解析、質量分析、熱力学的解析を行い、HIV-1 プロテアーゼ (PR) の二量体化阻害について詳細な解析を行い、DRV 以上に耐性株の出現に抵抗性を示し、HIV-1 野生株及び多剤耐性株の両方に高い阻害活性を有する新規の二量体化阻害剤 (PDI) の開発を行う事を目的とする。

3. 研究の方法

抗 HIV 活性の測定:

HIV-1 由来のタンパク質 p24 の量を測定する事に依り HIV-1 の増加を検出する p24 アッセイ及び、MTT アッセイを用いて各化合物の抗ウイルス効果を測定した。

PR の発現・精製:

HIV-1 由来の PR をコードしたプラスミドを形質転換した大腸菌株 Rosetta (DE3)pLysS を用いて PR の大量発現を行った。発現させた PR を、液体クロマトグラフィーを用いて精製後、一旦ギ酸 (pH2.8) で変性させた状態で -80 に保存した。

質量分析:

酢酸アンモニウム (pH6.0) を用いて、精製後の PR を、pH2.8 の状態から pH5.0 へと調整する事で再構築 (Refold) させた。Refold により生じる析出物を遠心操作により取り除く。薬剤存在下又は非存在下で Refold の操作を行い、Refold 後の PR を electrospray ionization mass spectroscopy (ESI-MS) により測定した。

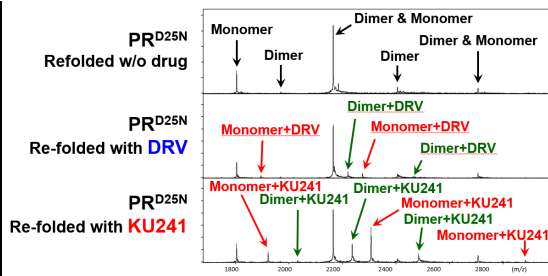


図1 KU-241 の結合特性: ESI-MS を用いた測定を行った結果、KU-241 は DRV と同様に PR monomer 及び dimer の両方に結合する事が明らかとなった。(未発表データ)

結晶構造解析:

精製後の PR を Refold させた後、限外濾過法を用いて buffer を 10 mM 酢酸アンモニウム (pH5.0) へと置換、更に PR 濃度が 1 mg/mL 以上になるように濃縮した。濃縮後の PR に化合物を添加し、hanging drop vapor diffusion 法を用いて結晶化を行った。得られた結晶の X 線回折を行い、回折データを基に三次元構造の同定を行った。X 線回折操作は、創薬等支援技術基盤プラットフォームの支援の下、兵庫県播磨市にある放射光施設 SPring8 で行った。

熱安定性試験:

精製後の PR を Refold させた後、PR 阻害活性を有する新規化合物及び SYPRO Orange を添加し、7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems 社) を用いて温度変化に伴う蛍光強度の増減を測定した (Differential scanning fluorimetry; DSF)。

4. 研究成果

平成 27 年度までに、申請者の研究グループは、DRV 高度耐性 HIV-1 変異株 (HIV-1^{DRV^RS}) に対して効果的な阻害効果を発揮する化合物群 (GRL-015, -085 及び -097) 及び過去に例を見ない程強力な抗 HIV-1 作用を有する化合物 KU-241 を同定、結晶構造解析を行った。

1. 種々の新規化合物の相互作用様式の解明:

平成 27 年度は、GRL-015, -085 及び -097 の相互作用形式を解析、HIV-1^{DRV^RS} を効果的に阻害する為には PR の flap 領域に存在するアミノ酸 Gly48 との水素結合が重要な役割を示す事を明らかにし、得られた成果を国際雑誌に発表した (Aoki & Mitsuya, *J. Virol*, 90, 2180-94, 2015)。また、KU-241 は、非常に多くの水素結合を形成するだけでなく、KU-241 の化学構造中に含まれるフッ素原子が周辺のアミノ酸残基と形成するファンデルワールス (VdW) 相互作用が重要な役割を果たす事を明らかにした。更に、KU-241 のフッ素原子が、PR の flap 領域に存在する Gly49 とハロゲン結合を形成している事を明らかにした。GRL-015, -085 及び -097 の研究成果からも明らかのように、この flap 領域に存在

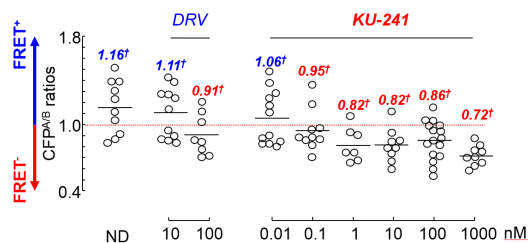


図2 KU-241の二量体化阻害能: CFP及びYFPが融合したPRを有するHIV-1を作成、細胞内で発現させた。縦軸CFP^{A/B} ratiosの値が1以上の場合はFRETが起こっている(PRが二量体を形成している事を、1以下の場合にはFRETが起こっていない(PRが二量体を形成していない)事を示す。KU-241は0.1 nM存在下で、DRVは100 nM存在下でPRの二量体形成を阻害する事が示された。^{*}各測定値の中央値を表す。(未発表データ)

するGly49とKU-241のフッ素原子との相互作用は、KU-241がHIV^{DRV}Rsに対して強い阻害効果を発揮する機序の一つであると考えられる。また、KU-241はHIV-1のPR領域に存在するVal32がIleに変異した変異株に対してHIV-1野生株以上に強力な阻害活性を発揮する事が既に明らかとなっているが、結晶構造解析と分子モデリングを用いた解析結果から、Val32がIleに変異する事で、KU-241とのVdW結合が著しく増加する事が明らかとなり、このVdW結合の増加が親和性の増加に結果している事が示唆された。

2. KU-241の二量体化阻害機構の解析:

PRの二量体化阻害に関しては、KU-241は、DRVの約1000倍強力な阻害効果を発揮する事がFRETを用いた二量体化阻害試験の結果から既に明らかとなっている(図2)。平成27年度は、ESI-MSを用いた結合特性の解析及び、熱安定性試験を行い、KU-241の持つ二量体化阻害作用の機序の解明を試みた。ESI-MSの結果、KU-241は、DRV以上に強力にPR monomerにもdimerにも結合する事を示した(図1)。これらの結果から、DRV同様にKU-241はPRの二量体形成過程で生じる不安定な二量体(transient dimer)の形成を阻害する事が示唆された。更に、ESI-MSを用いて種々のPR変異体とKU-241の結合特性を測定、KU-241及びDRVとmonomer状態でしか結合しない変異体(TFR-PR^{D25N})の同定に成功、現在、KU-241のPR monomerとの相互作用様式を解析する為に、TFR-PR^{D25N}とKU-241を用いた共結晶の作成を進めている。

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5件)

1. Aoki, M., Hayashi, H., Yedidi, R., Martyr, C., Takamatsu, Y., Aoki-Ogata, H., Nakamura, T., Nakata, H., Das, D., Yamagata, Y., Ghosh, AK. and Mitsuya, H.

The C5-substituted tetrahydro-pyrano-tetrahydrofuran-derived protease inhibitors (PIs) exert potent inhibition of the replication of HIV-1 variants highly resistant to various PIs including darunavir. *J Virol.* 90, 2180-94, 2015.

2. Ghosh, AK., Martyr, CD., Osswald, HL., Sheri, VR., Kassekert, LA., Chen, S., Agniswamy, J., Wang, YF., Hayashi, H., Aoki, M., Weber, IT., and Mitsuya, H. Design of HIV-1 Protease Inhibitors with Amino-bis-tetrahydrofuran Derivatives as P2-Ligands to Enhance Backbone-Binding Interactions: Synthesis, Biological Evaluation, and Protein-Ligand X-ray Studies. *J Med Chem* 58: 6994-7006, 2015.
3. Amano, M., Tojo, Y., Gómez, PMS., Parham, GL., Nyalapatla, PR., Das, D., Ghosh, AK., and Mitsuya, H. A Novel Tricyclic Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor, GRL-0739, Effectively Inhibits the Replication of Multidrug-Resistant HIV-1 Variants and Has a Desirable Central Nervous System Penetration Property In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 2625-2635, 2015.
4. Ghosh, AK., Takayama, J., Kassekert, LA., Ella-Menye, JR., Yashchuk, S., Agniswamy, J., Wang, YF., Aoki, M., Amano, M., Weber, IT., and Mitsuya, H. Structure-based design, synthesis, X-ray studies, and biological evaluation of novel HIV-1 protease inhibitors containing isophthalamide-derived P2-ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 25: 4903-4909, 2015.
5. Ghosh, AK., Yashchuk, S., Mizuno, A., Chakraborty, N., Agniswamy, J., Wang, YF., Aoki, M., Gomez, PMS., Amano, M., Weber, IT. and Mitsuya, H. Design of gem-Difluoro-bis-Tetrahydrofuran as P2 Ligand for HIV-1 Protease Inhibitors to Improve Brain Penetration: Synthesis, X-ray Studies, and Biological Evaluation. *ChemMedChem.* 10, 107-115, 2015.

[学会発表](計6件)

1. 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、新規 HIV-1 プロテアーゼ阻害剤開発と構造解析、第17回白馬シンポジウム、2015年6月20日、鳥取
2. Hironori Hayashi, Manabu Aoki, Ravikiran S. Yedidi, Hiroto Nakata, Debananda Das, Teruya Nakamura, Kazuya Hasegawa, Yuriko Yamagata, Arun K. Ghosh and Hiroaki Mitsuya,

- Novel protease inhibitors, which bind to the flap region of HIV-1 protease, strongly inhibit multi-drug resistant HIV-1 variants including darunavir-resistant variants. 第 16 回熊本エイズセミナー、2015 年 10 月 9 日、熊本
3. Masayuki Amano and Hiroaki Mitsuya, Modified P1-Moiety Enhances Antiviral Activity against Drug-Resistant HIV-1 Variants and Central Nervous System (CNS) Penetration Effectiveness of Newly-Generated HIV-1 Protease Inhibitors In Vitro. 第 16 回熊本エイズセミナー、2015 年 10 月 9 日、熊本
4. Hironori Hayashi、Manabu Aoki、Ravikiran S. Yedidi, Hirotomo Nakata, Debananda Das、Teruya Nakamura Kazuya Hasegawa、Yuriko Yamagata、Arun K. Ghosh、Hiroaki Mitsuya、Novel protease inhibitors, which bind to protease's flap region, strongly inhibit multi-drug resistant HIV-1 variants including darunavir-resistant variants、第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、2015 年 11 月 30 日、東京
5. Nobuyo Higashi-Kuwata、Manabu Aoki、Shinichiro Hattori、Hiromi Ogata-Aoki、Hironori Hayashi、Kenji Maeda、Arun K. Ghosh、Hiroaki Mitsuya、In vitro evaluation of the genotoxic potential of the novel anti-HIV protease inhibitor, KU-241, which is potent against multi-PI-Resistant HIV-1 variants、第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、2015 年 11 月 30 日、東京
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、新規 HIV-1 プロテアーゼ阻害剤 KU-241 の同定と抗 HIV 活性の検討、第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会、2015 年 11 月 30 日、東京

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : HIV-1 PROTEASE INHIBITORS AND USES THEREOF

発明者 : GHOSH, Arun K.; (US). RAO, Venkateswara Kalapala; (IN). MITSUYA, Hiroaki; (JP)

権利者 : GHOSH, Arun K. (West Lafayette, IN, US) , RAO, Venkateswara Kalapala (Lingampally Hyderabad, Andhra, IN), MITSUYA Hiroaki (Shimasaki, Kumamoto, JP)

種類 : 国際特許

番号 : US61/994,462

出願年月日 : 15.05.2015

国内外の別 : PCT (国際出願)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

満屋 裕明 (Mitsuya Hiroaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号 : 20136724

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし