

令和元年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15710

研究課題名(和文)結晶構造解析を用いた、HIV-1のEFdA耐性獲得機序の解明

研究課題名(英文)The study for elucidating the mechanisms of HIV-1's EFdA resistance.

研究代表者

林 宏典 (Hayashi, Hironori)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00752916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EFdA耐性HIV-1由来の逆転写酵素(RT-EFdA-R)の発現・精製方法の確立を行った。また、分子動力学的手法を用いた解析により、(1) RTの184番目のアミノ酸MetがValに変異がEFdAとRTの間で形成されるファンデルワールス力の低下させること(薬剤耐性化機序の解明)、(2) HIV-1が変異を導入しにくいアミノ酸であるF160とEFdAが相互作用を形成しているため、EFdAがHIV-1の薬剤耐性獲得に高い抵抗性を示し、耐性を獲得したHIV-1にさえ抗HIV-1活性をある程度維持できる事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EFdAは、HIV-1に対する抗ウイルス療法を1日1回から1週間又は1か月に1回へと変える可能性を有している。また、このような化合物はHIV-1の二次感染を予防する為にも非常に有用でありその社会貢献度は計り知れない。この様に医療、社会、国民衛生に重要な化合物に対してHIV-1が耐性を獲得する機序を詳細に解析する事は、医療の面からも重要であり、また、EFdAがハイジエネティックバリアを発揮する機序は新規化合物の開発に資するため学術的にも非常に有用である。

研究成果の概要(英文)：EFdA was developed as a HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibitor and has been under the clinical trial. In this study, we purified the reverse transcriptase from EFdA resistant HIV-1 variants (RT-EFdA-R) and screened the crystallization conditions. Additionally, we employed the analysis by molecular dynamics to determine the EFdA resistant mechanisms of RT. As the result, an amino acid mutation (M184V) would decrease Van der Waals (VdW) interactions between EFdA and RT-EFdA-R. Thus, the M184V would decrease binding affinity of EFdA. However, EFdA keep strong interactions with F160, which is an amino acid locating at the cavity close to the active center of RT with and without M184V substitution. Notably, the introduction of amino acid mutation, F160A, eliminate growth ability of HIV-1. Thus, HIV-1 hardly introduced the mutation. This was the reason for the high genetic barrier of EFdA. These data shed light on developing the novel RT inhibitors.

研究分野：ウイルス学 分子生物学

キーワード：HIV 逆転写酵素 EFdA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA/MK-8591; 図1) は、これまでの HIV-1 核酸系逆転写酵素阻害剤 (nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI) に比べ高い抗 HIV 効果を発揮する化合物である。また、メルク社が行った Phase Ia 臨床試験の結果から、EFdA/MK-8591 は一回の服用で、抗 HIV 作用が1週間以上持続する事が明らかとなった。すなわち、EFdA/MK-8591 は HIV-1 に対する抗ウイルス療法 (antiretroviral therapy; ART) の投薬プロトコルを1日1回 (QD) の内服から1週間に1回 (QW) または1カ月に1回 (QM) の内服へと方向転換する "game changer" の役割を果たす事が強く期待できる。

EFdA/MK-8591 は過去の研究により11種類の薬剤耐性 HIV-1 変異株を混合した HIV_{11MIX} を出発株として *in vitro* で耐性誘導が行われており、誘導された EFdA/MK-8591 耐性 HIV-1 変異株 (HIV-1_{EFdA^R}) が、M41L, D67^R, T69G, K70R, L74I, V75T, M184V, T215F 及び K219Q というアミノ酸変異を有している事が明らかとなっている。しかし、これらのアミノ酸変異が RT の構造に及ぼす変化や、EFdA 耐性にどのように寄与しているかは明らかとなっていない。

申請者は、これまで結晶構造解析や質量分析等を用いて、HIV-1 のプロテアーゼ (PR) に関する分子生物学的な解析を行ってきた (引用文献 及び)。これらの成果は、より抗 HIV-1 活性が高く、HIV-1 の薬剤耐性獲得に高い抵抗性を示す新規化合物の設計・開発だけでなく PR が薬剤耐性を獲得するメカニズムの解明に資する重要な結果である。

2. 研究の目的

本研究では、HIV_{EFdA^R} 由来の RT (RT_{EFdA^R}) の結晶構造および分子動力学的解析を行い、EFdA/MK-8591 及びその他の治療薬との相互作用様式を検討、RT_{EFdA^R} が NRTI に対して耐性を獲得する機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) RT の発現: 大腸菌発現用ベクター (pET 及び pCDF ベクター) に RT_{EFdA^R} を導入した RT 発現ベクターを用いて BL21(DE3) codon plus RIL を形質転換し、IPTG 誘導により RT を発現させた。
- (2) RT の精製: RT を発現させた菌体を超音波破砕し、His-Tag カラムと陰イオン交換カラムを用いて精製した。精製後の RT の純度は95%以上であった。
- (3) RT の結晶化: 市販の結晶化条件スクリーニング用のキットを用いて結晶化のバッファー条件を検討した。結晶化方法は、ハンギングドロップ法を用いた。
- (4) HIV-1 変異株増殖実験: HIV-1 の RT 領域に変異を含むウイルス発現ベクターを構築し、このベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションした。72 時間後に上清を回収しウイルスストックとした。回収したウイルスを MT-4 に感染させ p24 を測定する事でウイルスの増殖能を調べた (引用文献)。
- (5) 分子動力学計算: プロテインデータバンク (PDB) に保存されている RT の結晶構造 (PDB ID: 5J2M) を使用し、専用の分子動力学計算ソフトウェアを用いて解析した (引用文献)。

4. 研究成果

EFdA の HIV-1 野生株 (HIV_{WT}) に対する EC₅₀ 値は 0.001 μM であり、EFdA は HIV_{WT} に対して非常に高い阻害効果を示すが、HIV_{EFdA^R} に対する EC₅₀ 値は 0.15 μM となり活性が低下する。一方で、その他の NRTI の HIV_{EFdA^R} に対する EC₅₀ 値は、Ed4T, AZT, 3TC, FTC で 10 μM 以上、TDF で 8 μM と EFdA に比して非常に高い値を示す。すなわち、EFdA は EFdA に耐性を獲得した HIV_{EFdA^R} に対してさえ、最も効果的な NRTI であると言える。11 種類の薬剤耐性 HIV-1 変異株を混合した HIV_{11MIX} を出発株としなければ耐性を誘導できない点、耐性を獲得した変異株にさえある程度の抗ウイルス活性を維持できている点などから、EFdA は HIV が耐性を獲得し難い薬剤であり、そのメカニズムは非常に興味深い。

平成 29 年度は、RT_{EFdA^R} の C 末端を削除した変異体 RT52A_{EFdA^R} のクローニングを行い、発現・精製方法を確立する事に成功した。一方で、300 種以上の溶媒条件を用いて精製した RT52A_{EFdA^R} の結晶化条件を検討したが、RT52A_{EFdA^R} の結晶を得る事は出来ていなかった。また、RT52A_{EFdA^R}

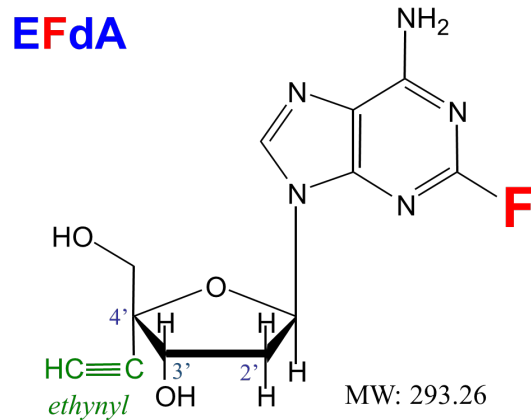


図1. EFdA/MK-8591 の化学構造: EFdA は糖の 4' の位置に ethynyl 基を、塩基の 2 位の位置にフッ素を有している。また、既存の核酸系 HIV-1 逆転写酵素阻害剤 (NRTI) に比べ EC₅₀ 値 (ウイルスの増殖を 50% 阻害する濃度) が低い事から、HIV-1 に対して高い阻害活性を発揮する。

結晶化以外に新たな試みとして上述の様に 2016 年に Sarafianos SG のグループによって発表された HIV-1 野生株由来の RT (RT_{WT}) と EFdA の複合体の結晶構造解析を基に米国 NIH の Debananda Das 博士、国立国際医療研究センター (NCGM) の前田賢次博士と協力し分子動力学的手法を用いた薬剤耐性化機構の検討を実施、M184V の変異が EFdA と RT の結合に及ぼす影響を明らかにした。M184V は RT が核酸系抗 HIV 剤に対して耐性を獲得する為の重要な変異であり、EFdA に関しても RT に M184V が導入されることによって 10 倍以上抗 HIV 活性が低下することが知られている。当初の計画では、平成 29 年度に発現・精製方法の確立と RT52A_{EFdA}^Rs の結晶化条件の決定までを予定していたが、実際には結晶化条件の検討までしか到達せず最適な結晶化条件を決定する事が出来なかった。一方で、分子動力学的手法を用いた解析により RT の 184 番目のアミノ酸 Met が Val に変異する事により、EFdA と RT の間で形成されるファンデルワールス力の低下が起こる事を明らかにするなど、HIV-1 が EFdA に対して耐性を獲得する機構の一端を明らかにした。

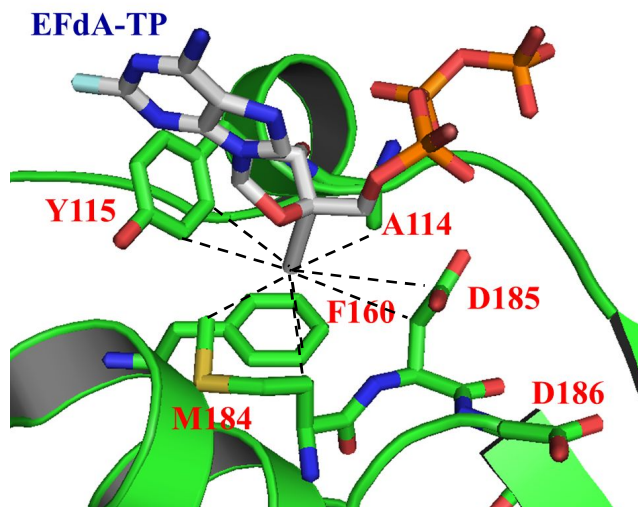


図 2. RT^{WT} と EFdA の複合体の結晶構造解析： Sarafianos 等が報告した結晶構造 (PDB ID code; 5J2M) の EFdA 周辺の相互作用様式。A114, Y115, F160, M184 及び D185 と EFdA の ethynyl 基が相互作用している事が明らかとなった。また、本研究により M184V の変異が RT と EFdA のファンデルワールス相互作用を減弱させること、F160 と EFdA の相互作用が EFdA のハイジェネティックバリアに重要な事が明らかとなった

平成 30 年度は、RT の活性中心近傍に存在するアミノ酸の中でも EFdA に特徴的な部分構造である ethynyl 基と相互作用しているアミノ酸 (A114, Y115, M184, D185 及び F160) に着目して解析を進め、HIV-1 の薬剤耐性化機構だけでなく上述の様に、EFdA が HIV_{EFdA}^R に対してさえ、抗 HIV 活性を発揮できるメカニズムに関して解析を進めた。結果、EFdA は F160 と強く結合する事で耐性を獲得した RT に対してもある程度の抗ウイルス活性を発揮する可能性が明らかとなった。また、F16A の変異導入によりウイルスが増殖できなくなる事が明らかとなった。すなわち、HIV-1 は RT の F160 への変異導入が困難であり、EFdA はこの F160 と相互作用しているため HIV_{EFdA}^Rs に対しても活性を維持できる事が示唆された。この解析内容に関しては、米国 NIH の Debananda Das 博士、国立国際医療研究センター (NCGM) の前田賢次 博士等と共著で平成 30 年度に国際雑誌に発表された (引用文献)。

当初の計画では、平成 29 年度に発現・精製方法の確立と RT52A_{EFdA}^Rs の結晶化条件の決定までを予定していたが、実際には結晶化条件の検討までしか到達せず、平成 30 年度においても最適な結晶化条件を決定する事が出来なかった。一方で、分子動力学的手法を用いた解析により、(1) RT の 184 番目のアミノ酸 Met が Val に変異が EFdA と RT の間で形成されるファンデルワールス力の低下させること (薬剤耐性化機構の解明)、(2) HIV-1 が変異を導入しにくいアミノ酸である F160 と EFdA が相互作用を形成しているため、EFdA が HIV-1 の薬剤耐性獲得に高い抵抗性 (ハイジェネティックバリア) を示し、耐性を獲得した HIV-1 にさえ抗 HIV-1 活性をある程度維持できる事を見出した。HIV-1 が EFdA に対して耐性を獲得する機構の一端を明らかにした。上述の様に、本研究課題に掲げている RT_{EFdA}^Rs の結晶構造解析という点では目標到達点に達しなかったが、本来の目的である耐性機構の解明に関しては分子動力学的手法を用いてその一旦を明らかにし、更に、EFdA がハイジェネティックバリアを示すメカニズムも解明する事が出来た。この様な点から、本研究課題の目的は 100%達成できたと考えている。

< 引用文献 >

- Hayashi H, Takamune N, Nirasawa T, Aoki M, Morishita Y, Das D, Koh Y, Ghosh AK, Misumi S, Mitsuya H, Dimerization of HIV-1 Protease Occurs through Two Steps Relating to the Mechanism of Protease Dimerization Inhibition by Darunavir. Proc Natl Acad Sci USA. 2014, Vol.111, 12234-12239
DOI:10.1073/pnas.1400027111
- Aoki M, Hayashi H, Yedidi RS, Martyr CD, Takamatsu Y, Aoki-Ogata H, Nakamura T, Nakata H, Das D, Yamagata Y, Ghosh AK, Mitsuya H, C-5-Modified Tetrahydropyrano-Tetrahydrofuran-Derived Protease Inhibitors (PIs) Exert Potent Inhibition of the Replication of HIV-1 Variants Highly Resistant to Various PIs, including Darunavir, J Virol., 2016, Vol.90, 2180-2194

DOI:10.1128/JVI.01829-15

Takamatsu Y, Das D, Kohogo S, [Hayashi H](#), Delino NS, Sarafianos SG, Mitsuya H, Maeda K, The High Genetic Barrier of EFdA/MK-8591 Stems from Strong Interactions with the Active Site of Drug-Resistant HIV-1 Reverse Transcriptase, *Cell Chem Biol.*, 査読有り, 2018, Vol.25, 1-11

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Ghosh AK, Williams JN, Ho RY, Simpson HM, Hattori S, [Hayashi H](#), Agniswamy J, Wang YF, Weber IT, Mitsuya H, Design and Synthesis of Potent HIV-1 Protease Inhibitors Containing Bicyclic Oxazolidinone Scaffold as the P2 Ligands: Structure-Activity Studies and Biological and X-ray Structural Studies., *J Med Chem.*, 査読有り, 2018, Vol.61, 9722-9737

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01227

Takamatsu Y, Das D, Kohogo S, [Hayashi H](#), Delino NS, Sarafianos SG, Mitsuya H, Maeda K, The High Genetic Barrier of EFdA/MK-8591 Stems from Strong Interactions with the Active Site of Drug-Resistant HIV-1 Reverse Transcriptase, *Cell Chem Biol.*, 査読有り, 2018, Vol.25, 1-11

DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.07.014

Delino NS, Aoki M, [Hayashi H](#), Hattori S, Chang SB, Takamatsu Y, Martyr CD, Das D, Ghosh AK, Mitsuya H, GRL-079, a novel P2-Tp-THF-1 C5-alkylamine- and P2'-Abt-containing HIV-1 protease inhibitor, is extremely potent against multi-drug-resistant HIV-1 variants including HIV_{DRV}^R_{p51} and has a high genetic barrier against the emergence of resistant variants, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 査読有り, 2018, Vol.62, e02060-17

DOI:10.1128/AAC.02060-17

Aoki M, Das D, [Hayashi H](#), Aoki-Ogata H, Takamatsu Y, Ghosh AK, Mitsuya H, Mechanism of Darunavir (DRV) 's High Genetic Barrier to HIV-1 Resistance: A Key V32I Substitution in Protease Rarely Occurs, but Once It Occurs, It Predisposes HIV-1 To Develop DRV Resistance. *mBio.*, 査読有り, 2018, Vol.9, e02425-17

doi: 10.1128/mBio.02425-17

Yasutake Y, Hattori S, [Hayashi H](#), Matsuda K, Tamura N, Kohgo S, Maeda K, Mitsuya H, HIV-1 with HBV-associated Q151M substitution in RT becomes highly susceptible to entecavir: structural insights into HBV-RT inhibition by entecavir, *Scientific Reports*, 査読有り, 2018, Vol.8, 1624-1635

DOI:10.1038/s41598-018-19602-9

Ogata-Aoki H, Higashi-Kuwata N, Hattori S, [Hayashi H](#), Danish M, Aoki M, Shiotsu C, Hashiguchi Y, Hamada A, Kobayashi H, Ihn H, Okada S, Mitsuya H, Raltegravir blocks the infectivity of red-fluorescent-protein (mCherry)-labeled HIV-1_{JR-FL} in the setting of post-exposure prophylaxis in NOD/SCID/Jak3^{-/-} mice transplanted with human PBMCs, *Antiviral Research*, 査読有り, 2018, Vol.149, 78-88

DOI:10.1016/j.antiviral.2017.09.003

Aoki M, [Hayashi H](#), Rao KV, Das D, Higashi-Kuwata N, Bulut H, Aoki-Ogata H, Takamatsu Y, Yedidi RS, Davis DA, Hattori S, Nishida N, Hasegawa K, Takamune N, Nyalapatla PR, Osswald HL, Jono H, Saito H, Yarchoan R, Misumi S, Ghosh AK, Mitsuya H, A novel central nervous system-penetrating protease inhibitor overcomes human immunodeficiency virus 1 resistance with unprecedented aM to pM potency, *eLife*, 査読有り, 2017, Vol.6, e28020
DOI:10.7554/eLife.28020 (総ページ数 25 ページ)

Higashi-Kuwata N, Ogata-Aoki H, Hattori S, [Hayashi H](#), Danish M, Aoki M, Shiotsu C, Kawamura T, Ihn H, Kobayashi H, Okada S, Mitsuya H, Early phase dynamics of traceable mCherry fluorescent proteincarrying HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells-transplanted NOD/SCID/Jak3^{-/-} mice. *Antiviral Research*, 査読有り, 2017, Vol.144, 83-92

DOI:10.1016/j.antiviral.2017.03.027

Ghosh AK, Rao KV, Nyalapatla PR, Osswald HL, Martyr CD, Aoki M, [Hayashi H](#), Agniswamy J, Wang YF, Bulut H, Das D, Weber IT, Mitsuya H, Design and Development of Highly Potent HIV-1 Protease Inhibitors with a Crown-Like Oxotricyclic Core as the P2-Ligand To Combat Multidrug-Resistant HIV Variants., *J Med Chem.* 2017, 60, 4267-4278.

DOI:10.1021/acs.jmedchem.7b00172

〔学会発表〕(計 0件)

該当なし

〔図書〕(計 0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。