

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05344

研究課題名（和文）プロテアーゼを標的とするリムーバブル阻害剤の創製

研究課題名（英文）Discovery of removable inhibitors targeting proteases

研究代表者

日高 興士（Hidaka, Koushi）

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：30445960

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：プロテアーゼ阻害剤はタンパク質分解酵素としての機能解明や様々な疾患の治療薬として広く使用される。しかし、一旦結合した阻害剤はタンパク質変性や希釈を行わないと取り除くことはできないことから、抑制されたプロテアーゼの酵素活性を取り戻すことは困難である。本研究課題では、HIVプロテアーゼ、カテプシンD、トリプシンを標的に各種阻害剤にビオチンを直接的に繋ぐことにより、酵素活性を自在に制御する「リムーバブル阻害剤」を創製した。さらに、リムーバブル阻害剤をアフィニティー精製と組み合わせるHIVや癌の画期的な診断薬や、凝集ペプチドを分解するプロテアーゼ医薬品の開発に繋がる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロテアーゼを活性状態のまま阻害剤を取り除いて酵素活性を回復することができれば、それは真に制御すると言え、酵素活性を自在に調節できる。しかしながら、そのような手段はないのが現状である。本研究成果の「リムーバブル阻害剤」はその課題が解決できる。異なる2つのタンパク質相互作用を競合させて阻害剤を取り除く手法は報告はなく世界的にもユニークである。本成果のリムーバブル阻害剤は、自己消化が問題となるプロテアーゼの室温での保存、病気の解明につながる糖や脂質の修飾を受けた天然のプロテアーゼの酵素活性の解析、更に、疾患の原因となるタンパク質を分解するプロテアーゼ医薬品の新たな道を切り開くものである。

研究成果の概要（英文）：Inhibitors are widely used as tools for proteolytic enzyme functions and as therapeutic agents for various diseases. However, once bound, the inhibitor cannot be removed without protein denaturation or macro dilution, making it difficult to regain the enzymatic activity of the suppressed protease. In this research project, we created a "removable inhibitor" that freely controls enzyme activity by direct conjugation of biotin to various inhibitors targeting HIV protease, cathepsin D, and trypsin. Furthermore, we have obtained results that have led to the development of breakthrough diagnostic agents for HIV and cancer that combine removable inhibitors with affinity purification, and the development of protease drugs that degrade aggregated peptide.

研究分野：医薬品化学

キーワード：プロテアーゼ 酵素活性 リムーバブル阻害剤 ビオチン ストレプトアビジン トリプシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼ阻害剤はペプチドやタンパク質の分解を抑えることから、プロテアーゼの酵素機能の研究において重要である。また、医薬品としても高血圧、成人急性白血病、エイズ、C型肝炎、糖尿病など、様々な疾患の治療薬として用いられる。しかし、プロテアーゼ阻害剤は一度結合させると取り除くことは難しく、プロテアーゼのタンパク質変性や大量希釈をしなければならぬ。もしも、プロテアーゼを活性状態のまま阻害剤を取り除き、酵素活性を回復することができれば、それは真に制御すると言え、薬剤として効き過ぎた阻害剤を取り除き、酵素活性を調節できる。しかしながら、そのような手段はないのが現状である。

2. 研究の目的

プロテアーゼ阻害剤はタンパク質分解酵素としての機能解明や様々な疾患の治療薬として広く使用される。しかし、一旦結合した阻害剤はタンパク質変性や希釈を行わないと取り除くことはできないことから、抑制されたプロテアーゼの酵素活性を取り戻すことは困難である。筆者らは、直接的にビオチン化した阻害剤を用いて、一旦プロテアーゼに結合させた後でストレプトアビジンの添加により取り除き、酵素活性を回復することができる全く新しい制御方法を考案した。本研究では、各種プロテアーゼに対する阻害剤をビオチン化した誘導体を合成し、酵素活性のOFFからONへの制御が可能なる「リムーバブル阻害剤」を創製する。さらに、本研究のリムーバブル阻害剤を病態に関連するプロテアーゼを標的に利用し、HIVや癌などの画期的な診断薬やプロテアーゼ医薬品の開発をめざす。

3. 研究の方法

X線複合体構造情報より、KNI-10006のジメチルフェノキシ部位はHIVプロテアーゼの酵素ポケットの端に位置することから(図1)、ジメチルフェノキシ部位に4-アミノ基を有する誘導体KNI-1293にビオチンを繋いだ化合物を合成した(図2)。

ペプスタチンAとカテプシンDの共結晶構造からC末端残基は結合ポケットの外に位置することから、カルボキシ基とビオチンのカルボン酸同士をヒドラジドで連結させた化合物を合成した(図2)。

セリンプロテアーゼであるトリプシンの阻害剤OS-460について、同様の骨格構造をもつプラスミン阻害剤Y0-2とプラスミンとのX線結晶構造とトリプシン-2の結晶構造を重ね合わせ、OS-460の仮想トリプシン-2結合モデルを構築した。ビオチン化部位をOS-460のベンゾフェノン部位に決定し、アミノ基やカルボキシ基を介してビオチンを繋いだ化合物を合成した(図2)。

合成したビオチン化阻害剤の各種プロテアーゼ阻害活性を測定し、ストレプトアビジン添加後の阻害活性の添加量依存的な変化を評価した。

血清中に野生型およびロピナビル耐性変異のHIVプロテアーゼを混入させ、アフィニティー精製後、リムーバブル阻害剤で溶出し、ストレプトアビジン添加後の酵素活性を測定した。直腸癌細胞HCT116の破碎液からカテプシンDをアフィニティー精製し、洗浄後、リムーバブル阻害剤で溶出し、ストレプトアビジン添加後の酵素活性を測定した。ビオチン結合型トリプシン阻害剤とトリプシン複合体をアミロイドに加え、ストレプトアビジン添加/未添加による培養後のアミロイドをHPLC分析および質量分析により調べた。

4. 研究成果

アミノ基をビオチン化したHIVプロテアーゼ阻害剤のbPI-11を合成し、bPI-11とHIV-1プロテアーゼの共結晶構造の解析に成功した。ビオチン部位が結

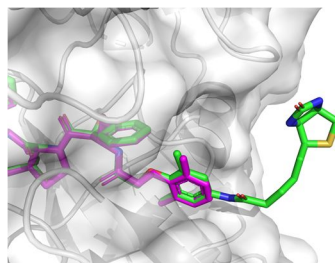
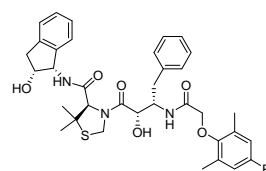
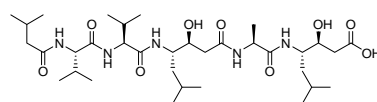


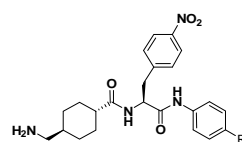
図1. HIVプロテアーゼの阻害剤結合ポケットの様子, X線構造 (KNI-10006 マゼンタ, bPI-11 黄緑)



KNI-10006 (R = H)
KNI-1293 (R = NH₂)
bPI-11 (R = NH-biotin)



pepstatin A (R = OH)
bPI-12 (R = NHHN-biotin)



OS-460 (R = C₆H₅)
bPI-14 (R = CH₂CONH-biotin)
bPI-15 (R = CH(NH-biotin)Ph)

図2. ビオチンを抱合したプロテアーゼ阻害剤の化学構造

合ポケットから溶媒の水に向かって伸びており、結合に影響することなくビオチンを導入できたことが明らかとなったことから、X線結晶構造に基づく分子設計が有用であることが示された。

bPI-11によりHIV-1プロテアーゼの酵素活性を阻害した後でストレプトアビジンを添加して酵素活性が回復し、そこへ再び阻害剤を追加して酵素反応が抑制されたことから、酵素活性のON/OFF/ON/OFFの繰り返し制御ができることを確認した(図3)。本制御はこれまでに報告がない非常にユニークな制御である。この結果を基に、血清中より結合させた野生型HIVプロテアーゼをbPI-11で溶出し、ストレプトアビジンを添加すると酵素活性が検出し、ダルナビル、ロピナビル、アタザナビルを加えて酵素活性を再び抑制した(図4)。ロピナビル耐性変異を導入したプロテアーゼを血清中に混入して、同様の操作を行ったところ、酵素活性の検出および既存薬のプロテアーゼ阻害剤による酵素活性の抑制を確認した。ダルナビル、ロピナビル、アタザナビルの阻害効果は減弱し、野生型と異なることが分かった。これらの結果は、本リムーバブル阻害剤による酵素活性の検出法が感染の検査法になりうることを示しており、また、薬剤耐性検査が問題となる既存薬の感受性試験ができることから、治療薬決定の指標へ応用されることが期待される。

bPI-11はHIVプロテアーゼに添加すると自己消化が抑えられることから、酵素活性を調べる際にストレプトアビジンを添加するまでの保存薬として用いることが考えられる。そこで、bPI-11とHIVプロテアーゼの複合体を室温で放置し、時間経過後の酵素活性の速度を測定した。その結果、bPI-11がない場合は、数日間で酵素活性が低下して消失するのに対し、bPI-11を添加した場合は、4ヶ月後も十分な酵素活性が確認された。更に、野生型に安定化変異を加えたWTm5プロテアーゼについて同様に室温で放置したところ、1年後でも酵素活性が殆ど低下しなかった(図5)。よって、bPI-11および本活性回復の手法はHIVプロテアーゼを冷却設備のない場所でも取り扱うことを可能にすることから、今後、他のプロテアーゼを標的とするリムーバブル阻害剤が開発されることにより、各種プロテアーゼの取り扱いが劇的に容易になることが期待される。本結果に伴い、bPI-11に関する技術の特許が登録され、bPI-11は「KNI-1292 biotin」として東京化成工業から販売が開始された。

bPI-11はヒトカテプシンDに対してnMレベルの阻害活性を有することから、カテプシンDの活性制御への応用が考えられる。カテプシンD酵素阻害およびストレプトアビジンによる酵素活性の回復を検討したところ、阻害活性が比較的弱い分、過剰に用いるストレプトアビジンの量は多くなるが、HIVプロテアーゼと同様に、一旦阻害した後の酵素活性の回復を確認した。そこで、bPI-11を用いてアフィニティー精製と組み合わせたと、直腸癌細胞HCT116から釣り上げたカテプシンDの酵素活性を検出した。本酵素活性はペプスタチンAの添加により抑制されたことから、細胞成分から簡便にカテプシンDの酵素活性を検出することができた。

しかしながら、bPI-11はカテプシンDとの結合がペプスタチンAと比べると弱いため、阻害剤をペプスタチンに変換して新たなビオチン接合体を設計することにした。既存のペプスタチンAとカテプシンDとの複合体のX線結晶構造データから、ペプスタチンAのC末端とビオチンのカルボン酸同士をヒドラジドで連結させた誘導体を合成したところ、pMレベルの強力なカテプシンD阻害活性を維持する化合物を得た。しかし、ストレプトアビジンの添加による酵素活性の回復が不十分であった。このことは、ペプスタチンAのビオチン抱合体の酵素阻害が非常に強く、ビオチン-アビジンの親和性との差が小さいことや、ビオチン抱合部分が比較的長いためスパーサーとして機能したことが考えられることから、今後はより短くビオチンを抱合する検討や酵素阻害を少し弱める検討が必要と考える。

トリプシン阻害剤のOS-460のベンゾフェノン部位のビオチン化について、カルボキシ基をヒドラジド化してビオチンを繋いだところ、bPI-14はヒトトリプシン-2に対してサブ μ MのIC₅₀値を示した。また、bPI-14により阻害したトリプシン-2は、ストレプトアビジンの量依存的に酵素活性が上昇し、過剰量の添加により十分に回復した。本結果から、bPI-14はトリプシン-2のリムーバブル阻害剤であることが分かった。bPI-14によりヒトトリプシン酵素活性をOFFからONへと制御できたことから、本研究のリムーバブル阻害剤の設計手法は、その原理どおりに、アスパラギン酸プロテアーゼだけでなくセリンプロテアーゼを標的とする阻害剤にも応用できることが分かった。

ベンゾフェノン構造をフェニル酢酸ヒドラジドに変換してビオチンを縮合したbPI-14はヒトトリプシン-2に対してOS-460よりも親和性が低下し、ストレプトアビジンの添加による酵素活性の回復は4割程度であった。一方、OS-460のベンゾフェノン骨格を残したbPI-15はOS-460と同程度の親和性を示し、ISAACによりトリプシン活性を阻害状態から7割回復した。セリンプロテアーゼであるトリプシンを標的としてリムーバブル阻害剤を設計し、阻害活性およびリムーバブル能力の良好なbPI-15を獲得した。bPI-14およびbPI-15はどちらもストレプトアビジン添加による酵素活性の回復が完全ではない。このことは上述のカテプシンDに対するペプスタチンの考察と同様のスパーサーとして機能した点が考えられるが、酵素活性の回復の改善を目指し

て、今後は別の部位へのビオチンの導入を検討する必要がある。

次に、ビオチン化トリプシン阻害剤を用いて凝集性の病原タンパク質の分解を検討した。bPI-15とトリプシンの複合体をアミロイドベータペプチド(1-42)に添加したところ、ストレプトアビジンを添加した場合にのみ、アミロイドベータペプチドの分解消失を確認した。しかし、分解時間が50日以上と非常に長くかかったことから標的タンパク質の分解に適した他のプロテアーゼとの併用が必要と思われる。以上の結果から、直接的ビオチン化阻害剤はトリプシンの酵素活性をOFFからONに制御して標的タンパク質を分解したことから、本複合体は細胞外に蓄積した病原タンパク質を分解して除去するプロテアーゼ医薬品の開発につながると期待される。

市販の2社のストレプトアビジンを用いて、bPI-15によるトリプシン活性の回復を検討したところ回復速度に違いが見られた。検討したところ、1社のストレプトアビジンにトリプシン様の酵素活性が混入していることが発覚した。その1社のストレプトアビジンを用いる赤血球細胞に添加実験では溶血が起こした。トリプシン様の酵素活性は、ストレプトアビジンの加熱処理により消失することがわかったことから、今後、トリプシンを標的とするリムーバブル阻害剤の実験には、使用する前にストレプトアビジンへのトリプシン様活性の混入がないことを事前に確認することが必要である。

令和2年度は新型コロナウイルスの世界規模での大流行により、本研究課題の標的をSARS-CoV-2メインプロテアーゼに変えて計画を急遽変更した。SARS-CoV-2メインプロテアーゼリムーバブル阻害剤の設計を開始し、酵素アッセイに用いる2種のアミノクマリン型の蛍光基質を合成した。今後は、既知の阻害剤をビオチン化してリコンビナント体やアフィニティー精製によるプロテアーゼの酵素活性を評価することにより治療薬開発や検査薬への展開が期待される。

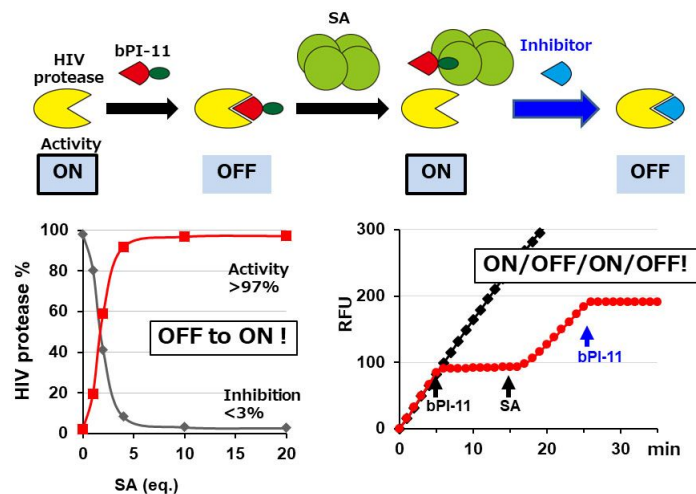


図3 . ストレプトアビジン添加による HIV プロテアーゼ活性のユニークな制御

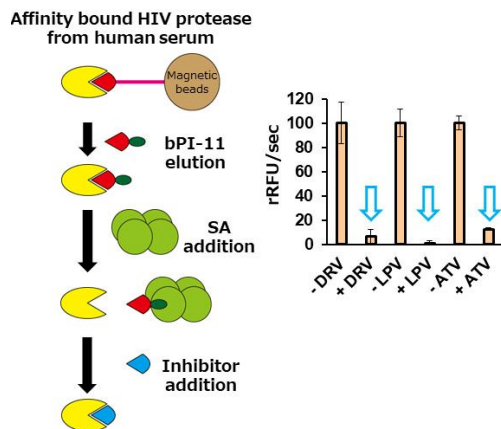


図4 . アフィニティー精製と繰り返し制御の組み合わせによる血清中 HIV プロテアーゼ活性の検出と既存薬による阻害実験

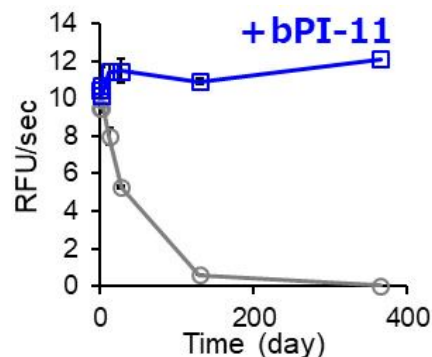


図5 . リムーバブル阻害剤存在下での安定化変異を加えたHIVプロテアーゼの室温放置後における基質切断速度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hidaka Koushi, Adachi Motoyasu, Tsuda Yuko	4. 巻 30
2. 論文標題 Acquired Removability of Aspartic Protease Inhibitors by Direct Biotinylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 1979 ~ 1985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.9b00195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Yuko Tsuda	4. 巻 -
2. 論文標題 OFF-to-ON control of trypsin activity and target protein degradation using ISAAC.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide Science 2019	6. 最初と最後の頁 125 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Yuko Tsuda	4. 巻 -
2. 論文標題 ON/OFF repetitive control of protease activity using peptidomimetic ligands through biotin-streptavidin affinity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of 35th European Peptide Symposium	6. 最初と最後の頁 173-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17952/35EPS.2018.173	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Yuko Tsuda	4. 巻 -
2. 論文標題 Removable peptidomimetic inhibitors for controlling activity of proteases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptide Science 2018	6. 最初と最後の頁 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 日高興士、安達基泰、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 直接的ビオチン化阻害剤を利用するHIVプロテアーゼの薬剤感受性評価
3. 学会等名 第33回近畿エイズ研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日高興士、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 ビオチン結合型トリプシン阻害剤の設計とヒトトリプシン2の酵素活性調節
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日高興士、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 ヒトトリプシンを標的とするリムーバブル阻害剤の設計と酵素活性の制御
3. 学会等名 第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Yuko Tsuda
2. 発表標題 OFF-to-ON control of trypsin activity using directly biotin conjugated inhibitors
3. 学会等名 The 11th General Meeting of International Proteolysis Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Yuko Tsuda
2. 発表標題 OFF-to-ON control of trypsin activity and target protein degradation using ISAAC
3. 学会等名 The 56th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日高興士、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 ISAACを利用する病原タンパク質の分解
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日高興士、安達基泰、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 リムーバブル阻害剤を用いる病態プロテアーゼの薬剤感受性の検討
3. 学会等名 第13回日本ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日高興士、安達基泰、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 リムーバブル阻害剤を利用するプロテアーゼ活性のON/OFF繰り返し制御
3. 学会等名 第23回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Yuko Tsuda
2. 発表標題 ON/OFF repetitive control of protease activity using peptidomimetic ligands through biotin-streptavidin affinity
3. 学会等名 The 35th European Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日高興士、安達基泰、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 リムーバブル阻害剤の薬剤感受性試験への新規利用法
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koushi Hidaka, Keiko Hojo, Yuko Tsuda
2. 発表標題 Removable peptidomimetic inhibitors for controlling activity of proteases
3. 学会等名 The 10th International Peptide Symposium/The 55th Japanese Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日高興士、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 トリプシンを標的とするリムーバブル阻害剤の設計と酵素活性のOFF to ON制御
3. 学会等名 日本薬学会139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

教員総覧)薬学部)日高興士
https://www.kobegakuin.ac.jp/information/public/teacher/pharmacy/hidaka.html
https://www.kobegakuin.ac.jp/gakuho-net/frontline/kenkyu/kenkyu001.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	津田 裕子 (Yuko Tsuda) (10098478)	神戸学院大学・薬学部・教授 (34509)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	安達 基泰 (Adachi Motoyasu) (60293958)	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) (82502)	
連携研究者	亀岡 正典 (Kameoka Masanori) (60281838)	神戸大学・保健学研究科・准教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------