

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05742

研究課題名(和文) MAドメインとカルジオリピンとの結合を基軸とした抗エイズ薬の創製

研究課題名(英文) Development of HIV drugs based on the binding of HIV-1Gag MA domain to cardiolipin

研究代表者

安楽 健作 (Anraku, Kensaku)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：80389543

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)：カルジオリピン(CL)は、HIV-1Gag MAドメインに結合する。本研究はCL-MAドメイン結合のウイルス学的意義の解明と本結合に基づく抗エイズ薬の開発を目的とする。

HIV-1増殖評価系において、リポソーム剤形として投与したCLはウイルスの侵入を防ぐ一方、放出を増強した。また、SPRを用いた結合解析から、CLの短鎖誘導体(Tetra-C7-CL)とウイルス形成に重要とされる短鎖PI(4,5)P2誘導体(Di-C7-PIP2)は、それぞれ異なる結合様式で、同様の結合親和性でMAドメインに結合した。さらに、本結合に関連するアミノ酸を同定した。本成果は、新たな抗エイズの創製につながるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗エイズ薬開発は人類とエイズウイルスとの戦いであるが、多剤併用療法(ART)に使用されるプロテアーゼ阻害剤「バキロビッド」がCOVID-19の重症患者に適応されるように、その開発過程には、エイズに限らず他のウイルスの脅威から人類を守るためにも重要な研究要素が含まれる。

本研究は「HIV-1Gag MAドメインがカルジオリピンと結合する」という知見をもとに、この結合の意義をHIV-1増殖評価系ならび結合解析系をもとに解析し、抗エイズ薬創製への礎を築いた。先にイノシトールリン脂質を標的とした抗エイズ薬リードを創製したが、カルジオリピンはこれに次ぐ標的脂質として有望と考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is known that the viral protein HIV-1Gag is one of the products produced by hijacked host cells and mediates HIV-1 virion budding. We found that one of the host cell phospholipids, cardiolipin (CL), binds to the N-terminal MA domain of HIV-1Gag and that the injection of CL prepared in liposomal form prevented viral entry but enhanced viral release. A short-chain derivative of CL (Tetra-C7-CL) and a short-chain PI(4,5)P2 derivative (Di-C7-PIP2), considered important for viral assembly, were bound to the MA domain in a distinct binding mode and with a similar binding affinity by using surface plasmon resonance (SPR) sensor analysis. We will develop the lead compounds and also elucidate the significance of MA-CL binding.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：HIV-1 Gag MAドメイン カルジオリピン 抗エイズ薬 PI(4,5)P2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスとして知られる。現在、ウイルス複製のいくつかの過程を標的とした治療薬が多数存在し、多剤併用療法により AIDS の発症を抑えることが可能となった。しかし、既存の治療薬に対する耐性獲得などの問題を解決するために、またエイズウイルスを体内から完全に排除することを目指す上でも、新たな治療標的の必要性が挙げられている。そこで、これまで研究代表者はウイルスの粒子形成段階に着目し、HIV-1Gag MA ドメインの膜移行を阻害する抗 HIV 薬の開発を目指した研究を精力的に進めてきた。

ウイルスの粒子形成は HIV-1 構造タンパク質 Gag の膜結合ドメインである MA を介した細胞膜内側への集積により始まる。その標的がホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PI(4,5)P₂) である^{1,2)}。先に、研究代表者はこの PI(4,5)P₂ と MA ドメインとの結合を抑制する抗エイズ薬リード (L-HIPPO) を創出した^{3,4)}。そして、この PI(4,5)P₂-MA ドメイン結合メカニズムを解明していく中で、PI(4,5)P₂ 以外の脂質ではどうかを考慮し、様々な脂質を用いたスクリーニングを行ったところ、CL やその部分構造であるホスファチジン酸 (PA) が他の脂質よりも MA ドメインに強く結合することを突き止めた。さらに、CL が HIV-1 の増殖を抑制するという知見も得られた。よって、これらの知見もとに抗エイズ薬へと展開する新薬創出戦略の提供が可能となった。

2. 研究の目的

カルジオリピン (CL) と MA ドメイン複合体における結合解析をもとに MA ドメイン変異体を作製することで、MA ドメインと CL との結合部位を決定する。さらに、HIV-1 増殖実験をもとに CL の HIV-1 阻害メカニズムを解明する。その上で、CL の構造をより強く MA ドメインに結合するように改変した化合物を設計合成すれば、それは、強力な抗ウイルス活性を有すると予測され、新規のメカニズムに基づく抗エイズ薬に発展するものとして期待される。

すなわち、CL は、HIV-1Gag MA ドメインに強く結合するが、本研究は CL-MA ドメイン結合のウイルス学的意義の解明ならびに本結合に基づく抗エイズ薬の開発を目的とした。

3. 研究の方法

はじめに、侵入、放出、および複製過程を観察できる HIV-1 増殖阻害評価系に、天然体に近い炭素側鎖をもつカルジオリピン (CL) をリポソーム剤形とした投与方法を用いて評価した。次に、表面共鳴プラズモン (SPR) を使用して CL と MA ドメインとの定量的結合解析系を、CL の代わりにビオチン化ホスファチジン酸 (PA) を用いて構築した。研究協力者である熊本大学薬学部の立石 大 特任助教が合成した炭素鎖の短い CL 誘導体をもとに、各 CL 誘導体と MA ドメインとの結合親和性 (K_d) を、競合実験法を用いて算出した。このとき市販の短鎖 PI(4,5)P₂ も同時に測定した。一方、研究を進めて行く中で CL と MA ドメインとの結合には仲介蛋白質の存在が示唆されたことから、LC/MS/MS を用いて、電気泳動後の哺乳細胞由来精製 MA ドメインにおいて観察されたバンドをもとに蛋白質同定を試みた。さらに、創薬へと展開するために、研究開始当初は、短鎖 CL 誘導体と MA ドメインとの X 線結晶構造解析を計画していたが、COVID-19 流行に伴い、共同研究を思うように進められず、大腸菌由来の MA ドメインの発現まで完了することとなった。そこで、短鎖 CL と MA ドメインにおける結合シミュレーション (MOE) の結果をもとに CL との結合に関与するアミノ酸残基を変異させた発現ベクターを作製し、哺乳細胞で発現させた後、変異体蛋白質を精製した。精製した各種変異体を用いてプルダウ

ン試験法をもとに CL との結合強度を比較した。

4. 研究成果

研究開始当初、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したカルジオリピン (CL) は HIV-1 の逆転写酵素阻害が観察された。しかし、侵入、放出、および複製過程を観察できる HIV-1 増殖阻害評価系に CL をリポソーム剤形として投与すると、侵入過程においては抑制するが、放出過程においては逆に増強する結果となった。この結果は、CL がウイルスの複製に影響することは示しているが、予想とは反する結果であり、その理由として動物から抽出した CL と人工的に合成した CL とでは、作用機序が異なる可能性が示唆されたため、現在詳細を検討している。

次に、表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析を用い、短鎖 CL 誘導体と MA ドメインとの結合解析を実施した。同時にウイルス粒子形成に重要である PI(4,5)P₂ 誘導体との結合親和性も観察した。結果として短鎖 CL 誘導体 (Tetra-C7-CL) と短鎖 PI(4,5)P₂ 誘導体 (Di-C7-PIP₂) は、それぞれ異なる結合様式で、同様の結合親和性で MA ドメインに対して結合することがわかった。一方で、本結合解析において哺乳細胞と大腸菌細胞由来の MA ドメインとでは、結合親和性に差異が生じることも分かった。そこで LC/MS/MS を用いて MA ドメインと結合しうる蛋白質の同定を実施したところ、宿主細胞由来の tRNA リガーゼがヒットした。現在 MA-CL 結合に tRNA リガーゼが関与するか否かにおいて検討している。

創薬へと展開するために、CL 誘導体を MA ドメインにさらに強く結合する構造に改変することを目的とし、分子シミュレーション (MOE) をもとに作製した変異体を用いて、CL と MA ドメインの結合に関与するアミノ酸の同定解析を実施した。CL と MA ドメインとでは R22, K27, R76, S77 が、PI(4,5)P₂ と MA ドメインとでは K27, K32 が近接するが、これらの MA 変異体においてプルダウン試験をもとに CL との結合強度を比較した。結果として R22, K27 変異体において野生型よりも CL への結合が減少したことから、本結合モデルに基づいた抗エイズ薬設計が可能となった。すでに分子設計を完了し、現在合成進行中である。

本成果は、CL-MA ドメイン結合に基づいたウイルス学的意義の解明ならびに、先に述べたような L-HIPPO に次ぐ新たな抗エイズ薬のリード創製につながるものと考えられる。

[参考文献]

- 1) Ono A, Ablan S. D, Lockett S. J, Nagashima K, Freed E. O. (2004) Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 14889-14894.
- 2) Anraku K., Fukuda R., Takamune N., Misumi S., Okamoto Y., Otsuka M. and Fujita M. (2010) Highly sensitive analysis of the interaction between HIV-1 Gag and phosphoinositide derivatives based on surface plasmon resonance, *Biochemistry* 49, 5109-5116.
- 3) Tateishi H., Monde K., Anraku K., Koga R., Hayashi Y., Ciftci H.I., DeMirci H., Higashi T., Motoyama K., Arima H., Otsuka M., Fujita M. (2017) A clue to unprecedented strategy to HIV eradication: "Lock-in and apoptosis", *Sci. Rep.* DOI: 10.1038/s41598-017-09129-w.
- 4) Tateishi H*, Anraku K.*, Koga R., Okamoto Y., Fujita M., and Otsuka M. (2014) Design and synthesis of lipid-coupled inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis-phosphate derivatives exhibiting high-affinity binding for the HIV-1 MA domain, *Org. Biomol. Chem.* 12, 5006-5022.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Matsushima-Nagata Kazumi, Matsumura Takeshi, Kondo Yuki, Anraku Kensaku, Fukuda Kazuki, Yamanaka Mikihiro, Manabe Masahiro, Irie Tetsumi, Araki Eiichi, Sugiuchi Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Significance of Circulating Remnant Lipoprotein Cholesterol Levels Measured by Homogeneous Assay in Patients with Type 2 Diabetes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 468 ~ 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13030468	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 Kawashima Kanako, Hirota Tsukimachi Mayuko, Toma Tsugumasa, Koga Ryoko, Iwamaru Kana, Kanemaru Yosuke, Yanae Misato, Ahagon Ami, Nakamura Yurine, Anraku Kensaku, Tateishi Hiroshi, Gohda Jin, Inoue Jun ichiro, Otsuka Masami, Fujita Mikako	4. 巻 99
2. 論文標題 Development of chimeric receptor activator of nuclear factor kappa B with glutathione S transferase in the extracellular domain: Artificial switch in a membrane receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Biology & Drug Design	6. 最初と最後の頁 573 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cbdd.14002	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 -
1. 著者名 Ciftci Halilibrahim, Tateishi Hiroshi et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural insight into host plasma membrane association and assembly of HIV-1 matrix protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95236-8	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 Kazumi Matsushima-Nagata, Hiroyuki Sugiuchi, Kensaku Anraku, Takako Takao, Yuki Kondo, Yoichi Ishitsuka, Mitsuru Irikura, Tetsumi Irie, Takeshi Matsumura, Eiichi Araki, Mizuki Sumida, Yuki Katayama, and Norihiko Kayahara	4. 巻 613
2. 論文標題 A homogeneous assay to determine high-density lipoprotein subclass cholesterol in serum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 114019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.114019	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 知念拓磨、立石大、島垣和功、福田亮太、Mohamed O Radwan、坂本亜里紗、三隅将吾、大塚雅巳、藤田美歌子、安楽健作
2. 発表標題 MAドメインとカルジオリピンとの結合を基軸とした抗HIV化合物の創製
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジ 学会第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 知念拓磨、立石大、島垣和功、福田亮太、坂本亜里紗、大塚雅巳、藤田美歌子、安楽健作
2. 発表標題 創薬を指向したHIV-1 Gag MAドメインとカルジオリピンとの結合解析および結合に関与するアミノ酸の同定
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 立石大、知念拓磨、島垣和功、福田亮太、坂本亜里紗、三隅将吾、大塚雅巳、藤田美歌子、安楽健作
2. 発表標題 MAドメインとカルジオリピンとの結合を基軸とした抗エイズ薬の創製
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジ 学会第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 知念拓磨、立石大、島垣和功、福田亮太、坂本亜里紗、三隅将吾、大塚雅巳、藤田美歌子、安楽健作
2. 発表標題 HIV-1 Gag MAドメインとCL誘導体との結合解析
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kensaku Anraku, Hiroshi Tateishi, Kazuaki Monde, Ryota Fukuda, Ryoko Koga, Kotaro Koiwai, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Shogo Misumi, Masami Otsuka, Mikako Fujita
2. 発表標題 Design and synthesis of phospholipid derivatives exhibiting high-affinity binding for the HIV-1 MA domain
3. 学会等名 Retroviruses (Cold Spring Harbor, USA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立石大、門出和精、安楽健作、古賀涼子、チップチハリルイブラヒム、小祝孝太郎、湯本史明、千田俊哉、大塚雅巳、藤田美歌子
2. 発表標題 人工イノシトールリン脂質誘導体を用いた新規HIV-1根絶法の開発
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 坂本亜里紗、立石大、門出和精、古賀涼子、小祝孝太郎、湯本史明、田辺幹雄、千田俊哉、三隅将吾、大塚雅巳、藤田美歌子、安楽健作
2. 発表標題 カルジオリピンとHIV-1 Gag MAドメインとの結合解析と創薬への展開
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田 和美、杉内 博幸、安楽 健作、近藤 悠希、石塚 洋一、入倉 充、入江 徹美、住田 瑞季、片山 有基、栢原 典彦
2. 発表標題 血清高密度リポ蛋白質亜分画コレステロール直接測定法の開発
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立石大、門出和精、安楽健作、古賀涼子、チップチハルルイブラヒム、小祝孝太郎、湯本史明、田辺幹雄、千田俊哉、大塚雅巳、藤田美歌子
2. 発表標題 IP6によるHIV制御メカニズムの解明とその誘導体L-HIPPOを用いたHIV根治薬の開発
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

教員紹介 トップページ https://www.acoffice.jp/khsuhp/KgApp?resId=S000011 教員紹介 トップページ https://www.acoffice.jp/khsuhp/KgApp?kyoinId=yddygyigy
--

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	湯本 史明 (Yumoto Fumiaki) (30360150)	大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任准教授 (82118)	
研究分担者	坂本 亜里紗 (Sakamoto Arisa) (70792084)	熊本保健科学大学・保健科学部・講師 (37409)	
研究分担者	田辺 幹雄 (Tanabe Mikio) (00716871)	大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任准教授 (82118)	

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
---------	---------