

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659302

研究課題名(和文) エイズウイルスの変異と薬剤耐性を識別する検査法の開発

研究課題名(英文) Development of the discrimination method for mutation and drug resistance of an AIDS virus

研究代表者

甲斐 雅亮 (Kai, Masaaki)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00160953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)： 後天性免疫不全症候群(AIDS)はHIV感染によって発症し、最も深刻な感染症の1つである。さらに、薬剤耐性を示す変異HIVの出現と拡散は、深刻な問題となっている。そのため、新たな薬剤耐性HIVの治療法や識別法が求められている。

これまでに、代表者は、ペプチドに特異的な蛍光誘導体化反応をもとに、新規のHIVプロテアーゼ活性測定法を開発している。本研究では、この活性測定法を、さらに発展させた薬剤耐性HIVプロテアーゼ識別法への応用を試みた。その結果、本識別法によって、薬剤耐性を示す変異型HIVプロテアーゼを直接識別することができた。

研究成果の概要(英文)： Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is caused by HIV infection, and one of the most serious infectious diseases. Moreover, the emergence and transmission of drug resistance strains of HIV are the most serious problem in the world. Thus, new treatments and discrimination methods for drug resistance HIV are still in great need.

A noble assay method for HIV protease activity was developed, basing on a specific fluorescence derivatization reaction for peptides, previously. In this research, I tried to apply this HIV protease assay to discrimination for drug-resistant HIV proteases.

Consequently, mutant HIV proteases with drug-resistant could be directly discriminated by the present discrimination method.

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：エイズ検査 HIV 変異 薬剤耐性 プロテアーゼ 基質特異性 蛍光反応 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

エイズは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染により発症し、結核やマラリアとともに三大感染症に数えられている。HIVは、HIVプロテアーゼや逆転写酵素など、ウイルス特有の酵素群を持ち、このなかでもHIVプロテアーゼは、宿主細胞内で、ウイルスRNAより転写、翻訳されたウイルス由来の未成熟な前駆体タンパク質を切断し、HIVの増殖に必要な様々な酵素や構造タンパク質を成熟化させるという、HIVのライフサイクルにおいて極めて重要な役割を担っている。そのため、HIVプロテアーゼは、HIV治療における重要な標的分子となっている。

これまでに、様々なHIVプロテアーゼ阻害剤が開発され、その中のいくつかは実際にエイズ治療薬として臨床現場で使用されている。しかしながら、現在のところ、HIV感染を根治する治療法はないため、HIV感染の治療には、長期間の薬の服用が必要であり、さらに、HIVゲノムは容易に変異するため、薬剤耐性をもつ変異ウイルスの出現が問題となっている。

特に、HIVプロテアーゼ遺伝子における変異は、薬剤耐性と密接に関係しており、したがって、薬剤耐性を獲得した変異ウイルスを識別する検査法は、HIV感染の診断や治療だけでなく、新規治療薬の開発においても重要である。

2. 研究の目的

現在、変異ウイルスの識別法として、ウイルスゲノムの塩基配列を調べる方法が用いられている。しかし、塩基配列決定法では、配列決定用のプライマーが、変異によってHIVゲノムにハイブリダイズできない可能性があり、また、新規の変異の場合、どのような薬剤耐性を示すか判定できない。

そこで本研究では、代表者が見出したペプチドに特異的な蛍光誘導体化反応とHPLCを組み合わせた、変異ウイルス識別法の開発を目的とした。

この蛍光誘導体化反応は、N末端が修飾されたペプチドやペプチド結合を有しない他の生体物質に対しては蛍光を与えず、極めて選択性が高い。したがって、N末端が保護されたペプチドをHIVプロテアーゼの基質として用いた場合、酵素反応によって切断されたペプチド断片のみが蛍光を発するため、蛍光強度を測定することでHIVプロテアーゼの活性を測定することができる。また、この活性測定法は、HPLCと組み合わせることによって、様々な種類のペプチドを基質として使用できるという特徴を有している。

変異によって薬剤耐性を獲得したHIVプロテアーゼは、野生型と比較して、基質特異性が変化していると考えられる。そこで、本研究で開発する変異ウイルス識別法は、複数のペプチドを基質として用い、HPLCによって基質分解パターンを解析することで、薬剤耐性

と関連する変異を識別するものである。

3. 研究の方法

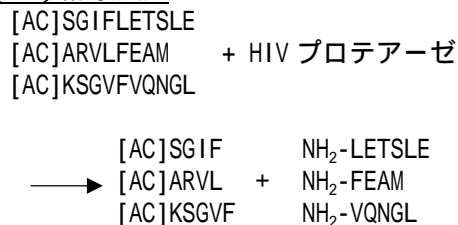
HIVプロテアーゼの基質として、3種類のアセチル化ペプチド ([AC]SGIFLETSLE、[AC]ARVLF EAM、[AC]KSGV FVQNGL)を合成した。また、HIVプロテアーゼ遺伝子を組込んだプラスミドをもとに、変異型HIVプロテアーゼMaおよびMb(表1)を作製した。これら野生型および2種類の変異型HIVプロテアーゼを発現している大腸菌抽出液を酵素試料として使用した。

表1 作製した変異型HIVプロテアーゼ

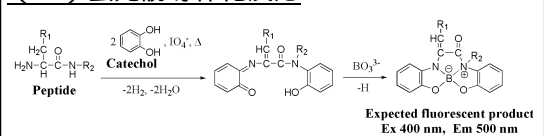
	変異アミノ酸	薬剤耐性
野生型	-	-
変異型 Ma	48Gly Val	サキナビル
変異型 Mb	32Val Ile	インジナビル

本測定法の原理を図1に示す。それぞれの酵素試料と3種類の基質を、阻害剤存在下または非存在下で37℃、4時間、酵素反応し、生成したペプチド(LETSLE、FEAM、VQNGL)を酸化剤存在下、カテコールと反応させ蛍光誘導体化した後、HPLCによって分離・蛍光検出(励起波長400nm/蛍光波長490nm)した。蛍光ピークをもとに、HIVプロテアーゼの活性を算出し、さらに阻害剤による野生型および変異型HIVプロテアーゼの活性に及ぼす影響について調べた。

(1) 酵素反応



(2) 蛍光誘導体化反応



(3) 蛍光誘導体の解析

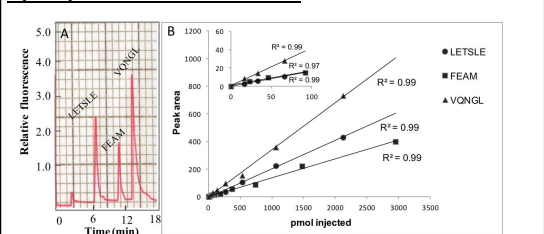


図1 変異型HIVプロテアーゼ識別法の原理

#### 4. 研究成果

野生型 HIV プロテアーゼと各アセチル化ペプチドをそれぞれ反応させ、蛍光誘導体化反応を行ったのち、蛍光スペクトロメーターによって測定したところ、蛍光が測定できた。また、蛍光誘導体化後のペプチドを HPLC によって分離検出したところ、予想される分解ペプチドが検出され、これらの分解ペプチドは HPLC によって分離できることが分かった。これらの結果は、使用した 3 種類のアセチル化ペプチドは、HIV プロテアーゼによって予想される位置で分解され、さらに、分解されたペプチドは蛍光誘導体化したのち、HPLC によって分離・蛍光検出可能であることを示している。

そこで、これら 3 種類のアセチル化ペプチドを基質として、HIV プロテアーゼと同時に酵素反応を行い、蛍光誘導体化したのち、HPLC によって分離・蛍光検出した。その結果、本測定法では、複数の基質を同時に使用でき、それぞれの分解ペプチドを一度の測定で検出できることが確認できた (図 2)。

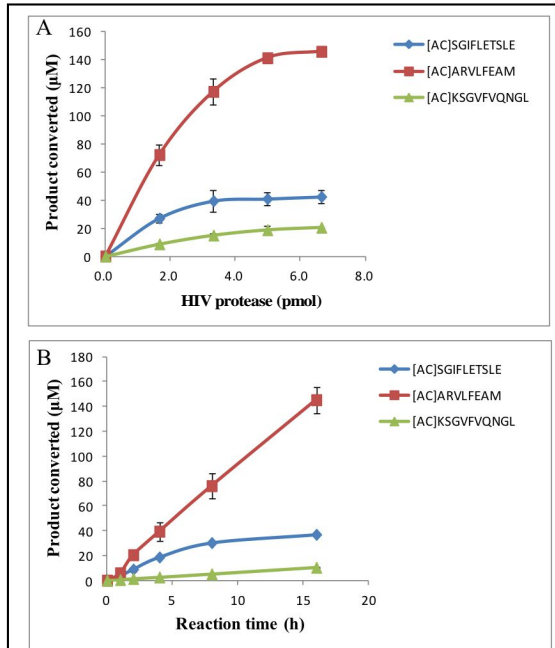


図 2 3 種類の基質に対する (A) HIV プロテアーゼ活性の用量依存性、(B) 酵素反応時間の影響

次に、薬剤耐性 HIV の情報を収載したデータベースに登録されている変異型 HIV プロテアーゼ Ma および Mb を、HIV プロテアーゼ遺伝子をもとに作製し、それぞれ大腸菌で発現させた。発現の確認は、抗 HIV プロテアーゼ抗体を用いた免疫検出により行った。その結果、変異型 HIV プロテアーゼ Ma および Mb は、野生型と同様に大腸菌中で発現しているのを確認した (図 3)。

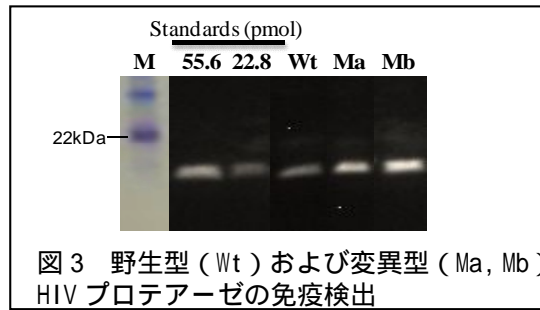


図 3 野生型 (Wt) および変異型 (Ma, Mb) HIV プロテアーゼの免疫検出

次に、3 種類の基質を同時に酵素反応に使用し、野生型および変異型 HIV プロテアーゼによる基質分解パターンを HPLC によって調べた。その結果、[AC]SGIFLETSL E に対する活性が、野生型と比べて、変異型 Ma では低く、変異型 Mb では高くなっていた (図 5、表 2)。

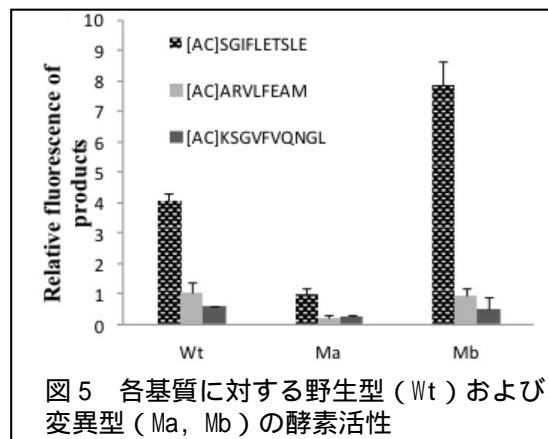


図 5 各基質に対する野生型 (Wt) および変異型 (Ma, Mb) の酵素活性

表 2 各基質に対する野生型および変異型の  $K_m$  値の比較

	Apparent $K_m$ ( $\mu M^{-1}$ )		
	Sub1	Sub2	Sub3
野生型	131	146	488
変異型 Ma	858	145	1908
変異型 Mb	170	477	7591

Sub1: [AC]SGIFLETSL E, Sub2: [AC]ARVLF EAM, Sub3: [AC]KSGV FVQNG L.

また、抗 HIV 薬として臨床使用されている HIV プロテアーゼ阻害剤 (サキナビルおよびインジナビル) の野生型および変異型に対する 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) を調べた (表 3)。

表 3 野生型および変異型に対する  $IC_{50}$

	$IC_{50}$ (nM)					
	サキナビル			インジナビル		
	Sub1	Sub2	Sub3	Sub1	Sub2	Sub3
野生型	62	61	55	3.5	4.6	3.5
変異型 Ma	128	115	179	1.1	4.7	2.9
変異型 Mb	53	44	65	25	25	12

Sub1: [AC]SGIFLETSL E, Sub2: [AC]ARVLF EAM, Sub3: [AC]KSGV FVQNG L.

その結果、サキナビルの  $IC_{50}$  は、野生型と変異型 Mb において、ほぼ同じであったが、変

異型 Ma では、野生型と比較して約 2 倍高くなっていた。一方、インジナビルの IC<sub>50</sub> は、野生型と比較して、変異型 Ma はほぼ同じであったのに対して、変異型 Mb では 3-7 倍高い値を示した。

これらの結果は、変異型 Ma は、インジナビルによって阻害されるが、サキナビルに対して阻害を受け難い耐性を持ち、一方、変異型 Mb は、インジナビルによって阻害を受け難く、サキナビルで阻害され易いという、これまでの報告と一致していた。

これらの結果は、今回開発した 3 種類の基質を同時に使用する方法は、変異に関する塩基配列の情報がなくとも、薬剤（阻害剤）耐性を持つ変異型を直接識別できることを示している。また、基質ペプチドを変更することで、他のウイルスプロテアーゼ識別にも適応できることから、薬剤耐性 HIV を含めたウイルス性疾患の治療・診断や治療薬開発に有用と考える。

#### 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 12 件)

El-Mahdy AF, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Dendrimer-like polymeric DNAs as chemiluminescence probes for amplified detection of telomere DNA on a solid-phase membrane, Chem. Commun., 査読有、2014、50、859-861. DOI:10.1039/c3cc47454b.

Dragusha S, Shibata T, Yin S, Fujita JY, Kabashima T, Kai M, Selective, sensitive and fluorometric determination of urinary cytosine with 4-trifluoromethylbenzamidoxime and N,N-dimethylformamide, Clin. Chim. Acta, 査読有、2014、429、123-128. DOI: 10.1016/j.cca.2013.11.027.

Rahman MS, Kabashima T, Yasmin H, Shibata T, Kai M, A novel fluorescence reaction for N-terminal Ser-containing peptides and its application to assay caspase activity, Anal. Biochem., 査読有、2013、433、79-85. DOI: 10.1016/j.ab.2012.10.018.

Smanmoo S, Kawasaki S, Tangboriboonrat P, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Selective FL quenching or enhancing of diimine ligands by guanine, J. Fluoresc., 査読有、2013、23、853-857. DOI: 10.1007/s10895-013-1216-8.

Wang X, Lau C, Kai M, Lu J, Hybridization chain reaction-based instantaneous derivatization technology for chemiluminescence detection of specific DNA sequences, Analyst, 査読有、2013、138、2691-2697. DOI: 10.1039/c3an36885h.

Zhu Q, Shibata T, Kabashima T, Kai M,

Inhibition of HIV-1 protease expression in T cells owing to DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA, Eur. J. Med. Chem., 査読有、2012、56、396-399. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.07.045.

Park KH, Park HJ, Shin KS, Choi HS, Kai M, Lee MK, Modulation of PC12 cell viability by forskolin-induced cyclic AMP levels through ERK and JNK pathways: an implication for L-DOPA-induced cytotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons, Toxicol. Sci., 査読有、2012、128、247-257. DOI:10.1093/toxsci/kfs139.

Yasmin H, Shibata T, Rahman MS, Kabashima T, Kai M, Selective and sensitive determination of peptides using 3,4-dihydroxyphenylacetic acid as a fluorogenic reagent, Anal. Chim. Acta, 査読有、2012、721、162-166. DOI:10.1016/j.aca.2012.01.035.

Azam MG, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Alkaline phosphatase-labeled macromolecular probe for sensitive chemiluminescence detection of proteins on a solid-phase membrane, Anal. Bioanal. Chem., 査読有、2011、401、1211-1217. DOI: 10.1007/s00216-011-5196-8

Azam G, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Sensitive chemiluminescence detection of prion protein on a membrane by using a peroxidase-labeled dextran probe, Anal. Sci., 査読有、2011、27、715-720.

Yamasuji M, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Chemiluminescence detection of telomere DNA in human cells on a membrane by using fluorescein-5-isothiocyanate-labeled primers, Anal. Biochem., 査読有、2011、413、50-54. DOI:10.1016/j.ab.2011.01.047.

Shibata T, Wainaina MN, Miyoshi T, Kabashima T, Kai M, A manual sequence method of peptides and phosphopeptides using 4-(1'-cyanoisindolyl)phenylisothiocyanate, J. Chromatogr. A, 査読有、2011、1218、3757-3762. DOI:10.1016/j.chroma.2011.04.040

〔学会発表〕(計 37 件)

椋島力、ペプチド特異的蛍光誘導体化反応を用いた変異型 HIV-1 プロテアーゼの識別、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27-30 日、熊本市総合体育館

Ahmed El-Mahdy、Dendrimer-like polymeric DNAs as a chemiluminescence probe、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7-8 日、長崎国際大学

和田怜、FITC 修飾を施した二本鎖核酸の細胞膜透過性、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7-8 日、長崎国際大学

永本佳菜子、プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質の酵素分解を促進する薬剤の探

索、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7-8 日、長崎国際大学

甲斐雅亮、タンパク質及び核酸の蛍光・化学発光検出法の開発と病態診断への応用、2013 年度日本分析化学会九州支部講演会、2013 年 11 月 8 日、九州大学

椋島力、薬剤耐性を示す HIV-1 プロテアーゼの新規蛍光識別法の開発、第 54 回日本熱帯医学会大会、2013 年 10 月 4-5 日、長崎ブリックホール

Valon Ejupi, Fundamental Conditions for assay of collagenase activity using a novel fluorescence reaction、日本分析化学会第 62 年会、2013 年 9 月 10-12 日、近畿大学

Qinchang Zhu, A multi-substrate fluorometric assay for HIV-1 protease activity and its application in drug resistance detection、2013 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry (CJK 2013)、2013 年 8 月 23-24 日、Abstracts P44-45、九州大学

Sheng Yin, A novel and specific fluorescence reaction for orotic acid、The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XII)、2013 年 8 月 22-24 日、九州大学

Ahmed El-Mahdy, Chemiluminescence detection of telomere DNA by using dendrimer-like polymeric DNAs、第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2013 年 8 月 2-3 日、昭和大学

川島歌織、新規蛍光反応を用いたウイルス識別法の開発、第 50 回化学関連支部合同九州大会、2013 年 7 月 6 日、北九州国際会議場

坂元謙太、核酸輸送のための蛍光物質の細胞膜透過性、第 50 回化学関連支部合同九州大会、2013 年 7 月 6 日、北九州国際会議場

Takayuki Shibata, Inhibition of the expression of HIV-1 protease in CD4<sup>+</sup> T cells owing to DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA、The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium、2012 年 12 月 10-12 日、長崎大学

中村祐介、真核細胞発現系を用いたプリオンタンパク質の発現と精製、第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8-9 日、熊本大学

松木勝仁、マイクロチップ電気泳動を用いた迅速なペプチド検出法の開発、第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8-9 日、熊本大学

Qinchang Zhu, DNA aptamer-mediated siRNA delivery inhibits the expression of HIV-1 protease in T cells、2012 China-Japan-Korea symposium on analytical chemistry、2012 年 10 月 16-18 日、上海市

Masaaki Kai, Highly selective and

sensitive method for the determination of collagen in mammalian tissue by a novel fluorescence reaction、The 6th Shanghai international symposium on analytical chemistry、2012 年 10 月 16-18 日、上海市

Dragusha Shpend, A novel fluorescence derivatization reaction specific for cytosine、日本分析化学会第 61 年会、2012 年 9 月 19-21 日、金沢大学

永本佳菜子、真核細胞における組換え HIV-1 プロテアーゼの発現と検出法の開発、日本分析化学会第 61 年会、2012 年 9 月 19-21 日、金沢大学

室田紗由美、プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質の酵素分解の促進、第 25 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2012 年 8 月 8-10 日、慶応義塾大学

②Qinchang Zhu, The potential application of DNA aptamer-mediated specific delivery of siRNA in anti-HIV therapy、第 25 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2012 年 8 月 8-10 日、慶応義塾大学

②永本佳菜子、HIV-1 プロテアーゼの発現プラスミドの作製と真核細胞での発現、第 30 回九州分析化学若手の会 夏季セミナー、2012 年 7 月 27-28 日、休暇村指宿

③尹晟、A fluorescence reaction for the sensitive quantification of orotic acid、第 30 回九州分析化学若手の会 夏季セミナー、2012 年 7 月 27-28 日、休暇村指宿

④Yasmin Hasina, A highly sensitive and quantitative assay for collagen in biological sample by a novel fluorescence reaction、第 72 回 分析化学討論会、2012 年 5 月 19-20 日、鹿児島大学

⑤室田紗由美、プロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク質のプロテアーゼ分解における界面活性剤の効果、第 72 回 分析化学討論会、2012 年 5 月 19-20 日、鹿児島大学

⑥Rahman Mohammed Shafikur, A novel fluorescence reaction for N-terminal serine-containing peptides and its application to assay of caspase activity、第 72 回 分析化学討論会、2012 年 5 月 19-20 日、鹿児島大学

⑦Shpend Dragusha, 4-Trifluorobenzamidoxime as a specific fluorogenic reagent for cytosine、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学

⑧尹晟、A fluorescence reaction for the sensitive quantification of orotic acid、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学

⑨朱欽昌、Inhibition of HIV-1 Protease Expression in T cells Using CD4 aptamer-siRNA Chimeras、第 28 回日本薬学会九州支部大会、2011 年 12 月 10-11 日、福岡大学

⑩西村沙也加、タンパク質マルチラベル化高分子の合成及び化学発光検出プローブとし

での応用、生物発光化学発光研究会第 28 回  
学術講演会、2011 年 10 月 8 日、長崎大学

③1Rahman Mohammed Shafikur、カスパーゼ 3  
および 8 活性の新規蛍光測定法の開発；日本  
分析化学会第 60 年会、2011 年 09 月 14-16 日、  
愛知

③2Yasmin Hasina、Determination of collagen  
in mammalian tissue by a novel  
fluorescence reaction；日本分析化学会第  
60 年会、2011 年 09 月 14-16 日、名古屋大学

③3藤田順也、3-メチルベンズアミドオキシム  
を用いた尿中ウラシル定量法およびジヒド  
ロピリミジン脱水素酵素欠損症診断への応  
用；日本分析化学会第 60 年会、2011 年 09 月  
14-16 日、名古屋大学

③4松木勝仁、蛍光誘導体化反応と電気泳動を  
組み合わせたペプチドの迅速な分離；第 24  
回バイオメディカル分析科学シンポジウム、  
2011 年 8 月 31-9 月 2 日、大山口イタルホテ  
ル

③5中村祐介、酵素分解に抵抗性を示すプリオ  
ンタンパク質 (PrP) の作製と真核細胞での  
PrP の発現；第 24 回バイオメディカル分析科  
学シンポジウム、2011 年 8 月 31-9 月 2 日、  
大山口イタルホテル

③6小代昌平、siRNA の分解及び核酸塩基の修  
飾による分解抵抗性の獲得；第 29 回九州分  
析化学若手の会 夏季セミナー、2011 年 7 月  
28-29 日、国民宿舎めかり山荘

③7和田怜、2 環状デオキシシチジンを有する  
人工 siRNA の合成研究；第 29 回九州分析化  
学若手の会 夏季セミナー、2011 年 7 月 28-29  
日、国民宿舎めかり山荘

〔図書〕(計 2 件)

甲斐雅亮、丸善出版、改定 6 版 分析化学  
便覧 (第 2 章 2.1.3 有機定性分析) 2011、  
17-20

甲斐雅亮、椛島力、廣川書店、薬学物理化  
学演習 [第 3 版] (第 5 章 電解質溶液) 2011、  
53-62

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：ペプチドの検出方法

発明者：甲斐雅亮、椛島力、柴田孝之

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2011-187969

出願年月日：2011 年 8 月 30 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/function/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 雅亮 (KAI, Masaaki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教  
授

研究者番号：00160953

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

椛島 力 (KABASHIMA, Tsutomu)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准  
教授

研究者番号：20274673

柴田 孝之 (SHIBATA, Takayuki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助  
教

研究者番号：10448491