

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791140
 研究課題名（和文） HIV の薬剤耐性発現に伴う Gag 蛋白自壊の分子学的・構造学的解析
 研究課題名（英文） Mechanism of spontaneous degradation observed in the insertion-containing HIV-1 Capsid proteins
 研究代表者
 天野 将之 (AMANO MASAYUKI)
 熊本大学・エイズ学研究センター・gCOEリサーチ・アソシエイト
 研究者番号：30575080

研究成果の概要（和文）：我々は HIV Capsid (CA) 領域の挿入変異により CA 蛋白の変性によると考えられる自壊産物が出現する事を発見し、挿入変異による HIV-1 の構造学的・ウイルス学的特性の変容について詳細な検討を行った。当該年度は本知見を基盤とし、800 万個以上の低分子化合物データを基にして virtual docking simulation により解析する事で HIV-1 の CA 蛋白を標的とした新規治療法の開発につながる低分子化合物の検索を行い、実際に抗 HIV-1 活性を有する 29 種類の化合物群を同定、その内半数は高度多剤耐性株に対しても有効であった。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that amino acid (AA) insertions at certain positions of Gag Capsid proteins (CA) caused significant CA degradation, and such AA insert-containing HIV-1 variants had significantly compromised infectivity and replication capacity. We attempted to identify small compounds capable of binding to CA based on our previous data. We calculated binding scores of more than 8 million compounds with the putative target cavity on CA using virtual docking simulation and evaluating their anti-HIV-1 activity using the cell-based assay. We could find 29 compounds which can inhibit replication of HIV-1 by these methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：HIV-1・Gag 蛋白・アミノ酸挿入変異・Gag 自壊

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を組み合わせた多

剤併用療法 (HAART) に負うところが大きい。しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得し、またその多くが交差耐性である故に治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、これらに対応しうる新たな抗ウイルス薬の開発研究に加えて、HIV-1 の薬剤耐性獲得機序の検討および薬剤耐性 HIV-1

感染細胞内における proviral DNA からの耐性ウイルス複製・伝播に至る過程においての詳細な基礎的研究の重要性は増している。

2. 研究の目的

長期間の HAART 療法後に治療不応性となった患者由来の多剤耐性臨床分離 HIV-1 株を用いて、Gag 領域の開裂部位周辺に挿入変異が入る事により、薬剤耐性関連変異によって減衰した HIV PR の Gag 前駆蛋白に対する酵素活性が改善する事を以前報告したが (Tamiya & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 2004)、このような挿入変異による代償は完全ではなく、薬剤耐性株の複製能は野生株と比し依然劣ったままである事が多い。このため申請者は Gag 挿入変異が Gag 前駆蛋白の processing や変異株の感染性および複製能に対し影響を及ぼし得ると仮定、詳細な解析を行うために、Gag 領域の様々な位置にアミノ酸配列 (AA) を挿入した変異株を多数作成し、挿入変異による HIV-1 の構造学的・ウイルス学的特性の変容について検討した。まず複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 株由来の Gag 挿入変異および変異 PR を有する変異株、および transposase を用いた transposon 法で Gag 蛋白をコードする遺伝子領域のランダムな位置に 19AA を導入した変異株を後述する方法で多数作成し、各変異株を細胞に transfection (TF) した後、得られた cell/ virion lysates を用いて HIV-1 Gag p24 抗体による western blotting (WB) を行ったところ、特定の Gag Capsid 蛋白 (CA) 領域に挿入変異を有する変異株において、CA の変性によると考えられる degradation (自壊) 産物が出現する事を確認した。この結果より挿入変異を有する CA を分解の方向に進ませる何らかの機序の存在が示唆された。CA 挿入変異株での degradation の原因解析、degradation と Gag

挿入変異部位との関連、各 Gag 挿入変異株の感染性や複製能に degradation が及ぼす影響など検討を重ねていくことにより、将来的に Gag 構造蛋白の成熟化を阻害し分解方向へ進めることによる新しい HIV-1 複製阻害物質の同定、治療法の開発へとつながる可能性があり、当該年度において *in silico* docking simulation の手法を用いることで HIV-1 CA の成熟化を阻害し分解方向へ進める、もしくは CA の多量体化を阻害する事で HIV-1 の RNA を内包する成熟 HIV CA 殻の合成を抑制する新しい HIV-1 複製阻害物質の同定・開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) HIV-1 Gag CA に挿入変異が入ることにより起こる CA 自壊の原因解析や CA 自壊と挿入変異部位との関連、各 Gag 挿入変異株の感染性や複製能に自壊が及ぼす影響、挿入変異 Gag 蛋白の形態学的変化など検討する為に、以下の研究方法を用いる。①複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 株由来の Gag 挿入変異および変異 PR を有する変異株、および transposon 法で Gag 蛋白をコードする遺伝子領域のランダムな位置に 19AA を導入した変異株を多数作成し、各変異株を細胞に transfection (TF) した後、得られた cell/ virion lysates を用いて HIV-1 Gag Capsid 抗体による western blotting (WB) を行った。②挿入変異株による野生 HIV-1 の発現および複製能への影響：野生株と Gag 挿入変異株を細胞に共発現させ、各上清中の HIV-1 p24 抗原濃度を測定、一定量の p24 抗原を含む各上清と新しい MT-4 細胞を混和し over night で培養、液体培地で洗浄した感染 MT-4 細胞のみを新しい液体培地中で培養し、経時的に培養上清の p24 抗原量を測定することで複製能に及ぼす影響を解析する。また同量の p24 抗原を含む共発現

後上清を Magi 細胞に感染させる事で single-round infectivity の検討を行ない、挿入変異株による野生株の感染性や複製能への影響を検討する。CA 自壊の責任領域を N 末端アミノ酸配列解析法や、CA 領域上の異なったエピトープを認識する複数の抗 HIV-1 CA モノクローナル抗体を用いた WB により検討する。③各種阻害剤や蛍光蛋白融合 Gag 蛋白等を用いて、細胞/ウイルスの蛋白分解経路や HIV-1 複製に関与する宿主因子の関与の有無、挿入変異 Gag の感染細胞内局在等を調べる。挿入変異を有する CA 単独発現プラスミドを作成し細胞に TF したた後得られた cell lysates を使い、WB において完全長 HIV-1 と同様の CA 自壊が起こり得るか評価する。④結晶構造解析や電子顕微鏡により、挿入変異により自壊を来し得る CA や変異株の詳細な構造学・形態学的解析を行う。

(2) HIV-1 CA の成熟化を阻害し分解方向へ進める新しい HIV-1 複製阻害物質の同定・開発: *In silico* docking simulation 法を用いて 800 万個以上の化合物データより候補化合物を選定し、実際に試験管内での抗 HIV-1 活性を評価する。具体的には、結晶構造解析より得られた野生型 CA 単量体の表面構造を探索する事で、挿入変異により著しい CA の自壊をもたらすアミノ酸部位の近傍に低分子化合物が結合し得る十分な空間を有する疎水性 cavity を同定、実際に購入可能な 8,555,483 個の化合物の構造データを商用もしくはアカデミックな化合物 database より入手し、各化合物が実際に生体に投与された場合に化合物の生体内での ADME に影響を及ぼす要素 (各化合物における H-bond donor や acceptor の数、分子量、cLogP 値、回転可能軸の数等) を考慮した上で druggable な化合物 6,842,684 個を抽出、各化合物データについてエネルギー極小化計算を行い、溶媒中

における各化合物の構造を最適化した上で、*in silico* flexible docking simulation の手法を用いる事により各化合物における CA 上の標的 cavity との binding score を算定、binding score の良い化合物に関しては実際に購入し、MT2 細胞を用いた MTT assay により実験室内野生株である HIV-1_{LAI} に対する抗ウイルス活性を評価した。明らかな活性を示した化合物 (hit 化合物) について、MT4 細胞や PHA-PBM を用いた p24 assay により臨床分離株及び高度多剤耐性株に対する活性を評価した。*In silico* flexible docking simulation に使用した計算アルゴリズムにおいて、binding score は水素結合等の直接的相互作用、疎水性接触、蛋白-リガンド間の接触によるペナルティ、リガンド内の会展可能軸数の総和として算定した。

4. 研究成果

TF に用いる細胞の由来に関わらず CA の自壊は起こり、また cell lysates のみならず、TF 後の上清を遠心分離することで作成した virion lysates においても CA の自壊を認めることが判明した (図 1)。

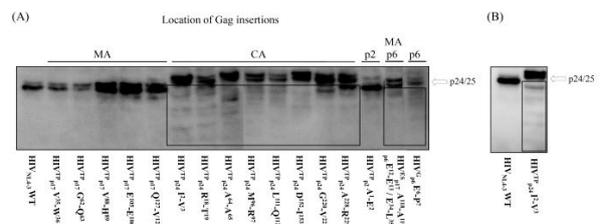


図1. 野生株 (WT) および Gag 挿入変異株における Gag processing の相違

各変異株を細胞に transfection (TF) した後、得られた cell/ virion lysates (A: cell lysates, B: virion lysates) を用いて HIV-1 Gag p24 (Capsid) 抗体による western blotting (WB) を行ったところ、黒枠で示すように野生株では認めない異常な Gag 蛋白自壊産物が出現する事を確認した。

また、作成した各変異株を細胞に TF 後の cell/ virion lysates を任意の時間 37°C で

定温静置し、ELISA 法にて lysates 中の CA 抗原量を測定、また抗 CA 抗体を用いた WB を行い、野生型及び変異 CA の経時的变化を調べた結果、CA 領域に挿入変異を有する変異株において顕著に CA 自壊の経時的な進行を認めた (図2)。挿入変異を有する CA における異常な自壊現象が、サンプルを定温静置する事により著しく進行する (野生株ではほとんど Capsid 抗原量に変化は無い) という結果は、斬新な発見であると言える。また、このように Gag 自壊現象を起こす挿入変異株は、感染性や複製能が著しく損なわれる事が各種細胞を用いた感染実験により判明した。

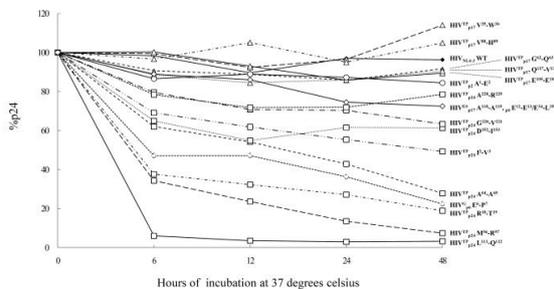


図2. Gag 挿入変異株における Gag 自壊の経時的進行
野生 HIV-1_{NL4-3} および各変異株を細胞に transfection (TF) した後、得られた cell lysates を任意の時間 37°C で培養し、HIV-1 Gag p24 抗体による ELISA および WB を行ったところ、Capsid 領域に挿入変異を有する変異株において顕著に自壊現象の経時的な進行を認めた (横軸は培養時間、縦軸は各サンプルにおける p24 値の変化を示す)。Virion lysates を用いた場合も同様の結果が得られた。

更に、挿入変異 CA を単独発現させた場合も同様に CA の著しい自壊を認める事が判明した (図3)。CA 領域上の異なったエピトープを認識する複数の抗 HIV-1 CA モノクローナル抗体を用いた WB により CA 自壊産物は CA の C 末端側由来である事が考えられた。これらの結果より、挿入変異 CA 自身が構造的変化により不安定化し自壊へと進む機序が推測され、本現象が薬剤耐性変異株における低複製能に関連していると考えられた。

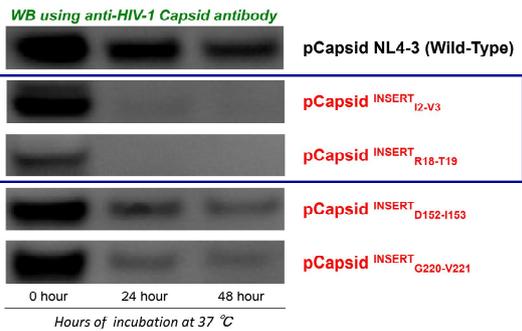


図3. 単独発現させた挿入変異Capsidにおける自壊の経時的進行

野生型および挿入変異Capsid単独発現plasmidを細胞にtransfection (TF) した後、得られた cell lysates を任意の時間37°Cで定温静置し、HIV-1 Gag Capsid抗体によるELISAおよびWBを行ったところ、特に青枠で示すN末端領域に挿入変異を有するCapsidにおいて顕著な自壊現象および著しい経時的進行を認めた (37°Cで定温静置24時間後に挿入変異Capsid蛋白は自壊し完全に消失していた)。

これまでに報告の無い、CA 阻害作用を有する化合物検索のための *In silico* および *in vitro* スクリーニングは現在進行中であるが、現時点までに 29 種類の抗 HIV 活性を有する化合物を新たに同定し、そのうち約半数の化合物は DRV を含む既存の抗 HIV-1 剤高度耐性株に対しても有効であった (図4)。本研究は CA 阻害という新しい機序による HIV-1 感染症治療法の開発に発展し得るものと考えられた。

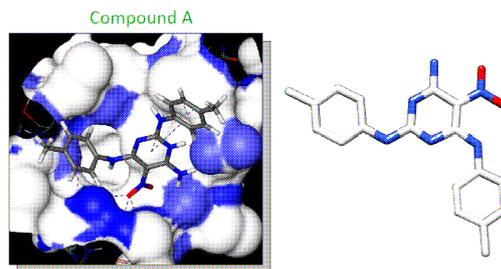


図4. 実際に購入し、試験管内薬剤感受性試験で同定した抗 HIV-1 活性を有する化合物の1例。左は図4で示した Capsid 上の標的 cavity と同化合物の結合 simulation の結果を示す。

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 3 件)

1. Masayuki Amano, Yasushi Tojo, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Joseph Richard Campbell, Debananda Das, Manabu Aoki, Chun-Xiao Xu, Kalapala Venkateswara Rao, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. GRL-0519, A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor (PI), Potently Suppresses The Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. 57:2036-2046. 査読有, doi:10.1128/AAC.02189-12
2. Manabu Aoki, Matthew L. Danish, Hiromi Aoki-Ogata, Masayuki Amano, Kazuhiko Ide, Debananda Das, Yasuhiro Koh, and Hiroaki Mitsuya. Loss of the Protease Dimerization Inhibition Activity of Tipranavir (TPV) and Its Association with the Acquisition of Resistance to TPV by HIV-1. *J. Virol.* 2012. 86:13384-13396. 査読有, doi: 10.1128/JVI.07234-11
3. Arun K. Ghosh, Bruno D. Chapsal, Melinda Steffey, Johnson Agniswamy, Yuan-Fang Wang, Masayuki Amano, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya. Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranylethyl urethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012. 22(6): 2308-2311. 査読有, doi: 10.1016/j.bmcl.2012.01.061

[学会発表] (計 4 件)

1. 天野将之, Pedro Miguel Salcedo-Gómez,

Amber R Moore-Arthur, 満屋裕明. HIV-1 capsid 蛋白 (CA) の挿入変異がもたらす CA 自壊の分子機構の解明および CA 阻害活性を有する化合物の検索. 第 26 回日本エイズ学会学術集会. 慶応義塾大学日吉キャンパス, 横浜, Nov 3-4, 2012.

2. Masayuki Amano, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Amber R Moore-Arthur, and Hiroaki Mitsuya. Mechanism of spontaneous degradation observed in the insertion-containing HIV-1 Capsid proteins, and a new attempt to discover small compound which induce HIV-1 Capsid protein degradation. 13th Kmamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, Aso-Granvirio Hotel, Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012.
3. Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Masayuki Amano, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. Novel HIV-1 protease inhibitors with potent antiviral activity and favorable blood brain barrier penetration. 13th Kmamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, Aso-Granvirio Hotel, Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012.
4. Masayuki Amano, Y Tojo, M Aoki, S G. Pedro-Miguel, J.R. Campbell, A.K. Ghosh, H Mitsuya. A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) GRL-0519A Potent Against Multi-PI-Resistant HIV In Vitro. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR). April 16-19, 2012, Royton Hotel, Sapporo, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 将之 (AMANO MASAYUKI)

熊本大学・エイズ学研究センター・g C O

E リサーチ・アソシエイト

研究者番号：30575080