

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 5 月 7 日現在

機関番号 : 17401

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2012~2012

課題番号 : 24659484

 研究課題名 (和文) HIV プロテアーゼ二量体化機構の分子・原子レベル解析と新規の
二量体化阻害剤開発

 研究課題名 (英文) The analysis of HIV-protease dimerization mechanism at atomic and
molecular resolution, and the design of novel dimerization inhibition compounds.

研究代表者

満屋 裕明 (MITSUYA HIROAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号 : 20136724

研究成果の概要 (和文) : 質量分析や結晶構造解析を用いて、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 由来のプロテアーゼ (PR) が二量体を形成する過程の詳細を明らかにしようと試みた。HIV のプロテアーゼ阻害剤である darunavir (DRV) が PR の二量体形成をどのように阻害しているかを解明し、更に HIV が DRV に対する耐性を獲得する機構を解明する重要な知見を得た。本成果は、PR の二量体化を阻害し、薬剤耐性が出現し難い新規抗 HIV 薬開発を加速度的に進めると強く期待される。

研究成果の概要 (英文) : Using mass spectrometry and X-ray crystal structure analysis, we attempted to elucidate the dimerization dynamics of HIV-1 protease (PR). Our data showed that darunavir (DRV), an FDA-approved PR inhibitor, binds to both monomers and dimers of PR and blocks HIV-1 replication. We also showed that the introduction of DRV-resistance-associated amino acids into PR prevented DRV from binding to PR monomers and decreased the amount of dimerized PR species. The data should be of utility in not only examining the PR dimerization dynamics but also designing more potent PR inhibitors that hardly permit the emergence of DRV-resistant HIV-1 variants.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野 : ウィルス学

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 : 新規抗 HIV 剤開発、プロテアーゼ、二量体化阻害、結晶構造解析、ESI-MS

1. 研究開始当初の背景

多剤併用療法 (ART) は HIV 感染患者の臨床症状を著明に改善、余命を飛躍的に延長した。一方で、ART に使用される抗 HIV 薬に対し交差耐性を示す多剤耐性 HIV の出現が問題視されており、より強力で、薬剤耐性に抵抗性を示す新規抗 HIV 剤の開発が急務である。

HIV プロテアーゼ (PR) はウィルスの増殖に必要な不可欠な酵素であり、二量体 (dimer) を形成する事でその酵素活性を發揮している。従って、PR の二量体化阻害は新たな薬剤の標的部位となり得る。

これまで申請者のグループは、FRET

(fluorescence resonance energy transfer) を用いた実験系を用いて、PR の二量体形成に重要なアミノ酸部位を特定し、臨床で使用されている抗 HIV 剤である darunavir (DRV) が HIV プロテアーゼ (PR) の酵素活性だけでなく、その二量体形成をも阻害する事を世界で初めて明らかにした。また、ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometer) という質量分析装置を用いて DRV が PR の単量体 (monomer) に結合する事を確かめた。更に、試験管内で、DRV 耐性 HIV の導出に成功し、HIV が DRV 耐性を獲得する為には PR 領域に 4 つの変異 (V32I, L33F,

I54M 及び I84V)が必要である事を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、これまで得られたウイルス学的・分子生物学的な新知見に加え、結晶構造解析や ESI-MS による質量分析を用いることにより、(1) PR の二量体形成過程の詳細と (2) DRV の PR 二量体化阻害 (PDI: protease dimerization inhibition) 活性のメカニズムを詳細に解析するとともに、(3) HIV が DRV に対して耐性を獲得するメカニズムを明らかにする事を目的とする。また、得られた結果を基に、DRV よりも強力な PDI 活性を持ち、薬剤耐性が発現し難い新規化合物の設計・同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) HIV プロテアーゼの発現・精製: 大腸菌を用いたタンパク質発現系を用いて HIV プロテアーゼ (PR) の発現を行った。大腸菌と真核細胞間でのコドン使用頻度の違いによるタンパク質の発現量低下を防ぐために、菌体は Rosetta (DR3) pLysS 株を使用した。発現させた PR を不溶性画分として回収し、wash buffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 M Urea) を用いて数回洗浄し、100 mM ギ酸で変性させて溶解・回収した。

(2) ESI-MS による解析: 100 mM ギ酸により変性させた PR を refolding buffer (100 mM ammonium acetate (pH 5.0), 2% methanol, with or without 120 μ M inhibitors) を用いてリフォールドさせ、ESI-MS を用いて相互作用の解析を行った。

(3) 結晶構造解析: リフォールドさせた PR を限外濾過により濃縮し、hanging drop vapor diffusion 法を用いて結晶化をはかった。得られた結晶に、兵庫県播磨市にある高輝度放射光施設 SPring-8 で X 線を照射し各結晶の X 線回折画像を得た。得られた回折画像から構造計算プログラム CCP4 を用いて三次元構造を導出した。

(4) FRET を用いたプロテアーゼの二量体形成確認: Cos7 細胞に、CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンをコードしたプラスミドをトランスフェクションした。Cos7 細胞内で PR を発現させた後、共焦点顕微鏡を用いて FRET の有無を観測した。

(5) 多剤耐性 HIV 変異体に対する抗 HIV 活性の評価: 初期スクリーニングとして野生株の HIV-1 を用いて MTT、MAGI アッセイなどによる抗 HIV 活性の評価を行い、有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株を用いて、HIV 由来タンパク質である p24 を定量することで阻害活性を測定する (p24 アッセイ)。p24 アッセイは全自動化学発光測定

機: Lumipulse F を用いる。

4. 研究成果

本研究では、HIV の耐性獲得メカニズムやウイルス増殖に不可欠である PR の二量体化及びその阻害機構に関して、ESI-MS や結晶構造解析といった手法を用いて分子・原子レベルでの解析を行った。

(1) ESI-MS を用いた DRV の PR 二量体化阻害メカニズムの解析: HIV 由来の protease (PR) は複数のウイルス蛋白質が連なった poly-protein (Gag-Pol) として発現される。PR はこの Gag-Pol から切り出される又は自己切断される事 (auto-proteolysis) により本来の活性を獲得する。PR の二量体形成は、この PR の auto-proteolysis 及び活性の獲得に重要な役割を果たす。我々は、過去に FRET を利用した実験から DRV が PR の二量体化を阻害する一方で、SQV や NFV といった他の抗 HIV 剤は二量体化を阻害しない事を報告した。また、ESI-MS を用いた解析により、DRV が PR monomer に結合する事を明らかにした。本研究では、新たに SQV と NFV が PR monomer に結合しない事及び、DRV 耐性 PR 変異体に DRV が結合しない事を確かめ、DRV の PDI 活性が DRV と PR monomer の結合に由来する事を証明した (Fig. 1)。更に、DRV が Gag-Pol のモデル蛋白質として用いた TFR-PR^{D25N} の monomer と結合する事を明らかにし、DRV の PDI 活性が PR の auto-proteolysis の阻害にも関与している事を示した。

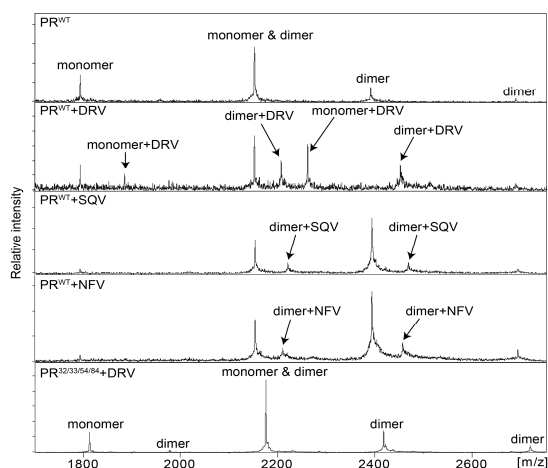


Fig 1. PR 野生株 (PR^{WT}) に対する抗 HIV 剤の結合特性及び HIV 耐性 PR (PR^{32/33/54/84}) に対する DRV の結合: DRV は PR^{WT} の monomer 及び dimer の両方に結合するが、SQV、NFV は dimer にしか結合していなかった。また、DRV は DRV 耐性 PR である PR^{V32I/L33F/I54M/I84V} に対して結合しなかった。以上の結果から、DRV は PR monomer に結合する事で、PR の二量体化を阻害する事が示された。

(2) PR の二量体形成過程におけるダイナミクスの解析: PR dimer は各 monomer subunit が活性中心近傍と N 及び C 末端領域で相互作用する事で形成される。PR の dimer 形成に重

要なアミノ酸は既に報告されており、活性中心近傍のアミノ酸では、T26, D29 及び R87 が重要とされる。また、末端領域（1～4 番及び 94～99 番目のアミノ酸）での相互作用は dimer の安定化エネルギーの 75%を占めると報告されている。本研究で我々は、これらのアミノ酸が PR dimer の形成にどのような役割を果たしているかを、ESI-MS を用いて解析した。Dimer 形成に重要とされる各アミノ酸に変異を導入した変異体 PR^{T26A}, PR^{D29N}, PR^{R87K} 及び PR の C 末端領域を削除した変異体 PR^{1-C95A} を作製し、これら変異体の二量体形成を確認した。ESI-MS を用いた解析の結果、活性中心近傍のアミノ酸 T26 及び R87 に変異を加えた変異体 PR^{T26A} 及び PR^{R87K} は PR dimer の形成が完全に阻害されていたにもかかわらず、C 末端領域を削除した変異体 PR^{1-C95A} は僅かに dimer を形成する事が明らかとなった。これらの結果から、PR の二量体化は、まず初めに活性中心近傍での相互作用形成による不安定な dimer 形成と、次に末端領域での相互作用形成による dimer の安定化という 2 段階を経る必要がある事が示唆された。

(3) HIV の DRV 耐性獲得メカニズムの解析: 過去に我々は試験管内で DRV 耐性 HIV を導出する事に成功し、PR の DRV 耐性獲得に関与する変異 V32I, L33F, I54M 及び I84V の特定に成功した。さらにこれらの変異が臨床から分離された DRV 耐性 HIV にも含まれる事を明らかにした。本研究では、我々が試験管内で誘導した DRV 耐性 HIV 由来の PR 変異体 (PR_{DRV-R}^{P30}, PR_{DRV-R}^{P51}) を DRV 存在下又は非存在下で結晶化させ、その結晶内に含まれる分子の三次元構造を導出する目的で、X 線結晶構造解析を行った。結晶への X 線照射は、創薬等支援技術基盤プラットフォームの協力の下、兵庫県播磨市にある高輝度放射光施設 SPring-8 で行った。結晶構造解析の結果、DRV に結合していない PR_{DRV-R}^{P30}, PR_{DRV-R}^{P51} は flap 領域と呼ばれる PR の部分構造が PR 野生株 (PR^{WT}) とは大きく異なっていた (Fig. 2A)。この構造変化は、flap 領域の安定化に寄与するとされる E35 及び R57 間での相互作用の部分的又は完全な喪失に起因していると考えられる (Fig. 2B-D)。現在、この変化が DRV 耐性関連変異 V32I, L33F, I54M 及び I84V とどのように関連しているかを解析している。また、DRV 存在下における PR_{DRV-R}^{P30}, PR_{DRV-R}^{P51} の 3 次元構造は DRV に結合した PR^{WT} の構造と類似していた。しかし、DRV に結合した PR_{DRV-R}^{P30}, PR_{DRV-R}^{P51} は、非結合時と同様、E35 及び R57 間での相互作用の喪失が確認された。この事から、HIV は DRV との相互作用形式を直接変化させて耐性を獲得しているのではなく、flap 領域を不安定化させる事により、DRV と結合した状態での複合体全体の安定性を低下させることにより、DRV との親

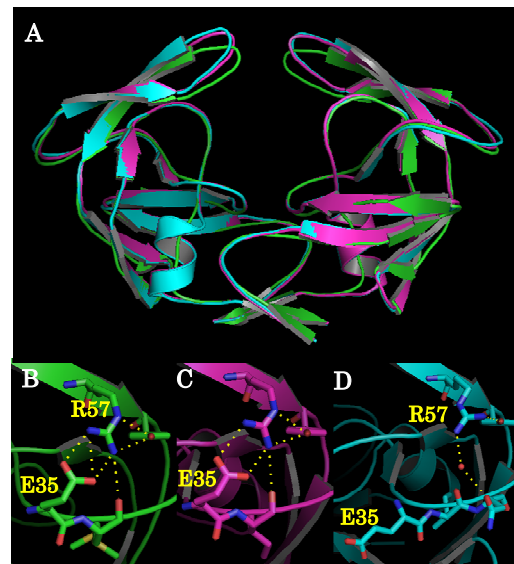


Fig. 2 PR 野生株と DRV 耐性 PR の 3 次元構造の比較: A. DRV 耐性 PR は PR 野生株と比較して flap 領域が大きく開いた構造を示した。B-D. PR 野生株と比較して、DRV 耐性 PR は E35 と R57 間の水素結合の数が減少していた。E35 及び R57 間の水素結合は flap 領域の安定化に寄与する事から、この部位での水素結合の減少が flap 領域に構造変化をもたらしている事が示唆される。緑色: PR^{WT}、桃色: PR_{DRV-R}^{P30}、水色: PR_{DRV-R}^{P51}、黄色破線: 水素結合

和性を低下させている事が示唆された。

(4) DRV 耐性 HIV に対して阻害活性を示す新規化合物の結合様式の解明: これまで我々は米国の共同研究者等とともに新規抗 HIV 剤の候補化合物の同定・開発を行ってきた。近年我々は、新たに DRV 耐性 HIV に対して強力な阻害活性を示す新規化合物の特定に成功した。本研究では、これら新規化合物と PR_{DRV-R}^{P30}, PR_{DRV-R}^{P51} の複合体を結晶化し、3 次元構造を導出することで新規化合物と PR_{DRV-R}^{P30}, PR_{DRV-R}^{P51} の結合様式を明らかにした。DRV の誘導体である新規化合物は、DRV の PR に対する相互作用形式を維持しつつ、新たに付加された部分構造が PR の flap 領域と水素結合及び疎水性結合を形成している事が明らかとなった。今後は、核磁気共鳴 (NMR) 法など、蛋白質の部分的な揺らぎや動きを測定できる手法を利用して、薬剤結合時又は非結合時における flap 領域のダイナミクスやより詳細な薬剤耐性メカニズムを解析する予定である。

(5) 総括: ESI-MS を用いた解析により、我々は新たに DRV の PDI 活性が DRV の PR monomer に対する結合によるものである事を明らかにした。また、PR の二量体形成は、① 活性中心近傍での相互作用形成による不安定な dimer の形成と、② 末端領域での相互作用形成による dimer の安定化という 2 段階を経る必要がある事が示唆された。結晶構造解析を用いた解析結果から、HIV は PR の flap 領域を不安定化させることで DRV に対する耐性を獲得する事が示唆された。同様に、DRV

耐性 HIV を阻害する新規 DRV 誘導体は DRV の相互作用形式を維持しつつ、新たに PR の flap 領域との相互作用を形成する事で、結合を維持している事が示唆された。本研究結果は、より強力な PR 二量体化阻害剤の開発だけでなく、DRV に耐性を示す多剤耐性 HIV を強力に阻害する新規抗 HIV 剤の開発を加速度的に促進する重要な知見であるといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

- ① Amano, M., Tojo, Y., Salcedo-Gómez, Pedro M., Campbell, J.R., Das, D., Aoki, M., Xu, C-X, Rao, K.V., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H., 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.*, 査読有, Vol. 57, 2013, 2036-46. (DOI: 10.1128/AAC.02189-12)
- ② Michailidis E, Singh K, Ryan EM, Hachiya A, Ong YT, Kirby KA, Marchand B, Kodama EN, Mitsuya H., Parniak MA, Sarafianos SG., Effect of translocation defective reverse transcriptase inhibitors on the activity of n348i, a connection subdomain drug resistant HIV-1 reverse transcriptase mutant. *Cell. Mol. Biol.*, 査読有, Vol. 58, 2012, 187-195. (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551986/>)
- ③ Aoki, M., Danish, M.L., Aoki-Ogata, H., Amano, H., Ide, K., Koh, Y., and Mitsuya, H., Loss of protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) is associated with HIV-1 acquisition of resistance to TPV. *J. Virol.*, 査読有, Vol. 86, 2012, 13384-13396. (DOI: 10.1128/JVI.07234-11)
- ④ Murphey-Corb, M., Rajakuma, P., Michael, H., Nyaundi, J., Didier, P.J., Reeve, A.B., Mitsuya, H., Sarafianos, S.G., and Parniak MA. (2012) Response of simian immunodeficiency virus to the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.*, 査読有 Vol. 56, 2012, 4707-4712. (DOI: 10.1128/AAC.00723-12)
- ⑤ Maeda, K., Das, D. Nakata, H., and Mitsuya, H., CCR5 inhibitors: emergence, success, and challenges. *Expert Opin Emerging Drugs*, 査読有 Vol. 17, 2012, 135-145. (DOI:10.1517/14728214.2012.673584)
- ⑥ Sohl, C.D., Kasiviswanathan, R., Kim, J., Pradere, U., Schinazi, R.F., Copeland, W.C., Mitsuya, H., Baba, M., Anderson, K.S., Balancing antiviral potency and host toxicity: identifying a nucleotide inhibitor with an optimal kinetic phenotype for HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Pharmacol.*, 査読有, Vol. 82 2012, 125-133. (DOI: 10.1124/mol.112.078758)
- ⑦ Ghosh, A.K., Chapsal, B.D., Steffey, M., Agniswamy, J., Wang, Y.F., Amano, M., Weber, I.T., Mitsuya, H., Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydro-furanyl urethanes: design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.*, 査読有, Vol. 22, 2012, 2308-2311. (DOI:10.1016/j.bmcl.2012.01.061)
- ⑧ Ghosh AK, Anderson DD, Weber IT, Mitsuya H. (2012) Enhancing protein backbone binding--a fruitful concept for combating drug-resistant HIV. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 査読有, Vol. 51, 2012, 1778-1802. (DOI: 10.1002/anie.201102762)
- ⑨ Sohl, C.D., Singh, K., Kasiviswanathan, R., Copeland, W.C., Mitsuya, H., Sarafianos, S.G., Anderson, K.S., Mechanism of interaction of human mitochondrial DNA polymerase γ with the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine indicates a low potential for host toxicity. *Antimicrob Agents Chemother.*, 査読有, Vol. 56, 2012, 1630-1634. (DOI: 10.1128/AAC.05729-11)
- ⑩ Ndongwe TP, Adedeji AO, Michailidis E, Ong YT, Hachiya A, Marchand B, Ryan EM, Rai DK, Kirby KA, Whatley AS, Burke DH, Johnson M, Ding S, Zheng YM, Liu SL, Kodama E, Delviks-Frankenberry KA, Pathak VK, Mitsuya H., Parniak MA, Singh K, Sarafianos SG., Biochemical, inhibition and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.*, 査読有 Vol. 40, 2012, 345-359. (DOI: 10.1093/nar/gkr694)

〔学会発表〕(計3件)

- ① 林 宏典, 高宗 暢暁, 三隅 将吾, 青木 学, 満屋 裕明, HIV プロテアーゼ二量体化機構及び darunavir の二量体化阻害メカニズムの解明、第26回 エイズ学会学術集会・総会, 慶應義塾大学 日吉キャンパス (神奈川), 2012年11月24日~26日
- ② Hironori Hayashi, Nobutoki Takamune, Manabu Aoki, Yasuhiro Koh, Shogo Misumi and Hiroaki Mitsuya, The binding properties of darunavir to HIV-1 protease monomer subunit、第13回熊本エイズセミナー・グローバルCOE合同シンポジウム, ホテル日航熊本 (熊本), 2012年10月24日~26日
- ③ 林 宏典, 高宗 暢暁, 三隅 将吾, 青木 学, 満屋 裕明, HIV プロテアーゼ二量体化機構及び DRV の二量体化阻害メカニズムの解明、第14回 白馬シンポジウム, 京都市国際交流会館 (京都), 2012年6月7日~8日 (ベストポスター賞受賞)

〔図書〕(計1件)

- ① Yarchoan, R. and Mitsuya, H., A Bench-to-Bedside Success (S.F.J. Le Grice and M. Goette, eds.), Springer Publishing, New York, Development of the first AIDS drugs: AZT and other dideoxynucleosides. In Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase, 2013, (in press).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

満屋 裕明 (MITSUYA HIROAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 20136724