

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：37409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791031

研究課題名(和文) 低分子化合物による HIV プロテアーゼ二量体形成阻害機構の解明と創薬への応用

研究課題名(英文) Elucidation of TPV's protease dimerization inhibition (PDI) mechanism and development of potent compounds possessing PDI activity

研究代表者

青木 学 (Aoki, Manabu)

熊本保健科学大学・保健科学部・講師

研究者番号：70389542

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)：HIVプロテアーゼ(PR)の二量体形成阻止(PDI)活性を有するプロテアーゼ阻害剤 Tipranavir (TPV) に対する耐性 HIV より同定した L24M と L33I は PDI 活性を喪失させることを確認、またそのようなアミノ酸置換は PR の folding に重要とされる部位とオーバーラップする 3 領域に集簇した。一方、ESI-MS による PR 前駆体モデルタンパク質と TPV との結合解析より、TPV はその単量体と二量体に結合することを確認した。更に PDI 活性を喪失させる領域と同じアミノ酸配列を持つトリペプチドの一部は PDI 活性を有しており今後の薬剤開発のデザイン等に資するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Tipranavir (TPV), a protease inhibitor, has protease dimerization inhibition (PDI) activity. 31 TPV-related resistance mutations were examined to determine whether those mutations affect TPV's PDI activity. 17 of those mutations reduced TPV's PDI activity and located in three PR regions critical for PR monomer folding. Furthermore, tests were conducted to determine if TPV binds to monomer PR subunits by using ESI-MS. The tests suggest that TPV binds to both monomer and dimer PR, indicating that TPV likely inhibits PR dimerization through binding to monomer PR subunits. 14 tripeptides carrying identical amino acid sequences as the aforementioned three regions affecting TPV's PDI activity were synthesized and examined for their influence on PDI activity. Some of the tripeptides were shown to inhibit PR dimerization. Further studies on the mechanisms of dimerization inhibition by compounds should provide better insights required for developing more potent protease dimerization inhibitors.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV プロテアーゼ阻害剤 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 逆転写酵素阻害剤 (RTI) とプロテアーゼ阻害剤 (PI) を組み合わせた多剤併用療法の導入によって、HIV 感染症は「制御可能な慢性感染性疾患」へと変貌した。しかし一方で、HIV がそれらの薬剤に対して耐性を獲得、しかもその多くが交叉耐性を示すことから治療に抵抗する症例が増加、結果として不完全なウイルス制御による治療失敗の重要な原因となっている。このことから従来の薬剤とは異なる作用機序を有する薬剤の開発や従来のクラスで野生 HIV 株だけではなく多剤耐性 HIV 株にも強力な活性を發揮し、且つ耐性発現を著しく遅延させるような薬剤の開発が求められている。

(2) HIV-1 のプロテアーゼ (PR) は 99 個のアミノ酸から成り、ホモ二量体を形成し活性を發揮する。PR は Gag-pol 前駆体の一部に含まれ転写・翻訳後に autoprocessing により前駆体から切断、成熟することが知られている。HIV-1 の PIs はホモ二量体を形成した PR の酵素活性部位に結合し抗 HIV 活性を發揮する。2005 年、米国 FDA に認可された非ペプチド系 PI であるチプラナビル (TPV) は、野生 HIV 株だけではなく多剤耐性 HIV 株にも強力な活性を發揮することが知られており、また既存の PIs が有する酵素活性阻止能だけではなく、PR の二量体形成をも阻止することが報告されているがその阻害機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

(1) TPV の PR 二量体形成阻止機構は未だ不明であることから、本研究では TPV の二量体形成阻害機構を解明すると共にその知見を基盤に未だ開発されていない PR 二量体の形成を特異的且つ強力に阻害する薬剤の開発を進める。本研究の応用により、二量体や多量体で活性を發揮する HIV の逆転写酵素やインテグラーゼなど PR 以外の酵素や更には他の病原体を標的にした薬剤の開発も可能になると思われる。また HIV PR の二量体形成機

構は未だ充分には解明されておらず、HIV PR の翻訳から folding、二量体形成までの一連のダイナミズムにおける知見の集積により基礎生物学の進歩に貢献でき且つ抗 HIV 剤として新たに標的可能となるステップを露にすると思われる。

3. 研究の方法

(1) 試験管内での TPV 耐性誘導実験

11 種類の多剤耐性臨床分離 HIV-1 株 (HIV_A, HIV_B, HIV_C, HIV_G, HIV_{TM}, HIV_{MM}, HIV_{JSL}, HIV_{SS}, HIV_{ES}, HIV_{EV}, HIV₁₃₋₅₂) を混ぜたウイルス (HIV_{1MIX}) を PHA で刺激した末梢血単核球に加えて IL-2 の存在下で 1 週間培養した。その後、ヒト T 細胞株である MT-4 細胞を添加して培養を継続、その上清を用いて耐性誘導を開始した。細胞は MT-4 細胞のみを用いた。1 継代目の TPV 濃度は 0.1 ~ 0.4 μ M、最終濃度は 15 μ M とした。また HIV_{1MIX} 以外に 4 種類の多剤耐性臨床分離 HIV-1 株 (HIV_B, HIV_C, HIV_G, HIV_{TM}) について単一で用いて耐性を誘導した。継代培養中は上清中の HIV-1 p24 抗原量を全自動化学発光酵素免疫測定システム (ルミパルス f) で測定しウイルス複製の有無と程度を確認した。200 ng/ml 以上の抗原量を得た後、培養上清と非感染の MT-4 細胞を混ぜてインキュベーションを行い、薬剤濃度を上げた培養液中で細胞のみ培養を継続した。上記操作を繰返すことにより耐性 HIV-1 を誘導した。

(2) TPV による HIV-1 プロテアーゼ二量体形成阻止能の確認実験

Cyan fluorescent protein (CFP) もしくは yellow fluorescent protein (YFP) と HIV-1 プロテアーゼをリンカーアミノ酸で繋いだ感染性組換え HIV-1 プラスミド (pHIV-PR^{CFP} および pHIV-PR^{YFP}) を作成し実験に用いた。COS7 細胞を培養プレートに撒き、24 時間後、野生型プロテアーゼもしくは種々のアミノ酸置換を導入した pHIV-PR^{CFP} および pHIV-PR^{YFP} を TPV の存在下で

co-transfection を行った。72 時間培養後、Fluoview FV500 confocal laser scanning microscope (OLYMPUS Optical Corp, Tokyo) にて細胞内で起こる FRET (fluorescence resonance energy transfer) を観察、解析を行った。

(3) TPV と HIV-1 プロテアーゼ (PR) との結合実験

E.coli を用いて HIV-1 プロテアーゼ (PR) を発現・精製した。精製した PR はギ酸を用いて一旦変性した後、TPV の存在下もしくは非存在下でリフォールディングすることによりサンプルを調整、electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) を用いて TPV の PR に対する結合特性を解析した。

4. 研究成果

(1) HIV-1 プロテアーゼ (PR) のどの部分が TPV の結合に重要なかを解明するために、既存の薬剤に耐性となった 11 種類の多剤耐性臨床分離株の混合株を出発株とし、試験管内で TPV 耐性 HIV を誘導した。高度 TPV 耐性 HIV 変異体 (15 μ M の TPV 存在下で増殖可能) の PR 領域のアミノ酸配列の解析の結果、TPV 耐性に関与すると思われる 4 つのアミノ酸置換 (L24M、L33I、I54V、V82T) を同定した。次にこれらのアミノ酸置換が TPV の二量体形成阻止活性 (PDI) に影響するかどうか FRET を用いた評価系により解析したところ、L24M と L33I は単一で TPV の PDI 活性を喪失させるが、I54V と V82T は影響しないことを確認した (図 1)。この結果は酵素活性阻止と PDI の両方が TPV の抗 HIV 活性に重要であるが、PDI 活性は 1 アミノ酸置換で喪失することから酵素活性阻止に比し脆弱であることが示唆された (Aoki *et al.* *J Virol.* 86:13384-96, 2012)。

(2) PR のどの部位が TPV の PDI 活性に重

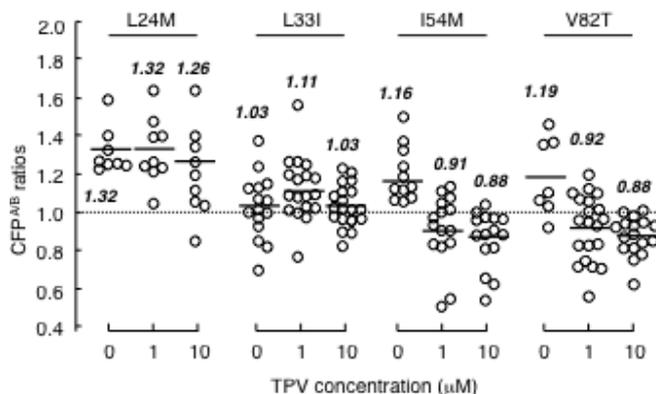


図 1. TPV 耐性 HIV 変異体より同定したアミノ酸置換の TPV の PDI 活性に与える影響

FRET による測定の結果 CFPA/B 比が 1 以下であれば二量体形成が阻害されていると判断した。L24M および L33I を導入したプロテアーゼは 10 μ M の TPV 存在下でも二量体形成が阻害されなかったが、I54V や V82T では 1 μ M で阻害された。

要かを確認するために、これまでに報告されている TPV 耐性関連変異 (24 部位、31 アミノ酸置換) について同様に解析を行った。結果、複数のアミノ酸置換が PDI 活性の喪失に関与することが分かった。またそれらのアミノ酸置換は PR の 3 領域に集簇することが分かった (図 2)。この 3 領域は PR 単量体のフォールディングに重要とされる部位と大部分がオーバーラップする事から、TPV は PR が成熟する前のフォールディングの段階で PR の二量体形成を阻止している可能性が示唆された。

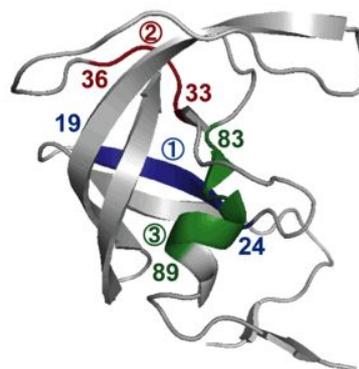
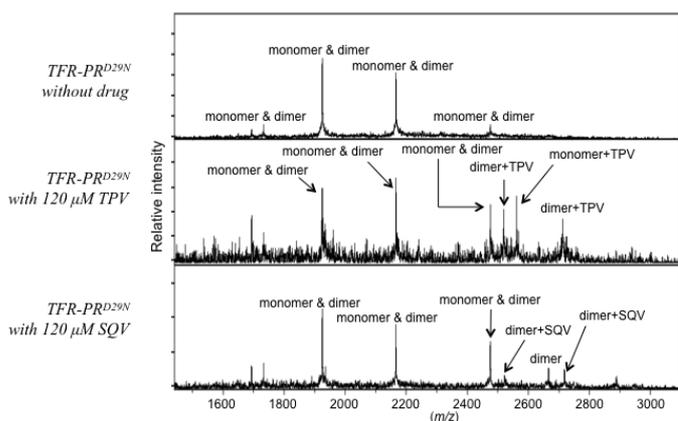


図 2. TPV の PDI 活性の喪失に関する PR の 3 領域 TPV の PDI 活性の喪失に関する 3 領域 19-24, 33-36, 83-89 を PR に示した。3 領域は互いに近接していることが分かった。

(3) PR は Gag-Pol 前駆体タンパク質の一部

として翻訳後、autoprocessingにより前駆体から切断され成熟することが知られていることから、PRのNおよびC末端に前駆体タンパク質の一部を結合させたタンパク質(TFR-PR)を作成、ESI-MSでTPVとの結合解析を行った。結果、TPVはこのTFR-PRの単量体と二量体の両方に結合することが確認されたが、同じPIであるSQVは二量体への結合しか見られなかった(図3)。(2)(3)の結果より、TPVはPRが二量体を形成する前のPR前駆体単量体に結合し、foldingを阻害することで二量体形成を阻止している可能性が示唆された。



(4) タンパク質のフォールディングの際に

図3. ESI-Massを用いたTPVのPR前駆体への結合解析

PR前駆体のモデルタンパク質(TFR-PRD29N)とTPVとの結合解析の結果、TPVはTFR-PRD29Nのmonomerとdimerの両方に結合したが、別のPIであるSQVはdimerにしか結合しなかった。

はタンパク質の一部が核(folding nucleus)として作用する部位が存在し、その核と同じアミノ酸配列を持つペプチドがフォールディングを阻害するとの報告があることから(Brogia RA *et al.* *Curr Opin Struct Biol.* 18:60-66. 2008)、TPVのPDI活性の喪失に關与する領域と同じアミノ酸配列のトリペプチドを合成し、PDI活性を検討した。その結

果、一部に弱いPDI活性が見られた。この結果から、今後更に配列や構造を検討することで、より強力なPDI活性を有する化合物の開発に繋がるものと期待された。

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 7 件)

1. Aoki M, Danish ML, Aoki-Ogata H, Amano M, Ide K, Das D, Koh Y, Mitsuya H. Loss of the Protease Dimerization Inhibition Activity of Tipranavir (TPV) and Its Association with the Acquisition of Resistance to TPV by HIV-1.

Journal of Virology. 86: 13384-96, 2012.

2. Amano M, Tojo Y, Salcedo-Gómez PM, Campbell JR, Das D, Aoki M, Xu CX, Rao KV, Ghosh AK, Mitsuya H.

GRL-0519, a novel oxatricyclic ligand-containing nonpeptidic HIV-1 protease inhibitor (PI), potently suppresses replication of a wide spectrum of multi-PI-resistant HIV-1 variants in vitro.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 57:2036-46. 2013.

3. Yedidi RS, Maeda K, Fyvie WS, Steffey M, Davis DA, Palmer I, Aoki M, Kaufman JD, Stahl SJ, Garimella H, Das D, Wingfield PT, Ghosh AK, Mitsuya H.

P2' Benzene Carboxylic Acid Moiety Is Associated with Decrease in Cellular Uptake: Evaluation of Novel Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitors Containing P2 bis-Tetrahydrofuran Moiety.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 57:4920-7. 2013.

4. Maeda K, Desai DV, Aoki M, Nakata H, Kodama EN, Mitsuya H.

Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to

4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with

lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001.

Antiviral Therapy. 19:179-89. 2014.

5. Yedidi RS, Garimella H, **Aoki M**, Aoki H, Desai DV, Chang SB, Davis DA, Fyvie WS, Kaufman JD, Smith DW, Das D, Wingfield PT, Maeda K, Ghosh AK and Mitsuya H.

Conserved hydrogen-bonding network of P2 bis-tetrahydrofuran containing HIV-1 protease inhibitors (PI) with protease active site amino acid-backbone aid in their activity against PI-resistant HIV.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 58:3679-3688. 2014.

6. Hayashi H, Takamune N, Nirasawa T, **Aoki M**, Morishita Y, Das D, Koh Y, Ghosh AK, Misumi S and Mitsuya H.

Dimerization of HIV-1 Protease Occurs through Two Steps Relating to the Mechanism of Protease Dimerization Inhibition by Darunavir

Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America.19;111(33):12234-9. 2014.

7. Ghosh AK, Yashchuk S, Mizuno A, Chakraborty N, Agniswamy J, Wang YF, **Aoki M**, Gomez PM, Amano M, Weber IT, Mitsuya H.

Design of gem-difluoro-bis-tetrahydrofuran as P2 ligand for HIV-1 protease inhibitors to improve brain penetration: synthesis, X-ray studies, and biological evaluation. *ChemMedChem*. 2015 Jan;10(1):107-15.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 学 (AOKI, Manabu)

熊本保健科学大学・保健科学部・医学検査
学科・講師

研究者番号：70389542

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：