

第17回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

HIV-1 プロテアーゼの二量体化の機序の解析とその阻止, および
HIV-1 プロテアーゼ阻害剤のデザインと開発Elucidation of the Mechanism of HIV-1 Protease Dimerization and
Its Inhibition by HIV-1 Protease Inhibitors

林 宏 典

Hironori HAYASHI

国立国際医療研究センター難治性ウイルス感染症研究部

Department of Refractory Viral Infection, National Center for Global Health and Medicine

日本エイズ学会誌 19: 128-136, 2017

研究背景

HIV-1 に対する抗ウイルス療法 (ART: antiretroviral therapy) の導入は, HIV-1 感染者の quality of life (QOL) を劇的に改善するだけでなく二次感染の予防に繋がること (TasP: treatment as prevention) が示され, ART および ART に使用される抗 HIV 剤の重要性がますます高まっている。他方, 現在の ART では, 感染患者内から HIV-1 の排除は不可能で, いったん感染すると複数の抗 HIV-1 剤を生涯にわたり毎日服用しなくてはならない。しかも HIV-1 は容易に薬剤耐性を獲得するため, 薬剤の長期服用による多剤耐性 HIV-1 変異株 (HIV-1^{MDR}s) の出現がいぜん大きな課題である。

2006 年に米国 FDA に認可を受けた darunavir (DRV) は, HIV-1 野生株 (HIV-1^{WT}) だけでなく HIV-1^{MDR}s に対しても高い抗 HIV-1 活性を示し, さらに HIV-1 の薬剤耐性獲得に対して高い抵抗性を示す (高いジェネティックバリアを有する) ことが知られている^{1,2)} (図 1, 表 1)。DRV に関しては, 過去に結晶構造や fluorescent resonance energy transfer (FRET) と呼ばれる方法を用いて詳細な解析が行われており, DRV は HIV-1 由来のプロテアーゼ (PR) の主鎖と強力な水素結合を形成するだけでなく, PR の二量体形成を阻害することで強力な抗 HIV-1 作用と高いジェネティックバリアを発揮していると考えられている^{1,2)} (図 2)。しかし, 近年この DRV に対する耐性を有する HIV-1 変異株 (HIV-1^{DRV}s) の出現が *in vivo* および *in vitro* の両方で確認され, 将来問題となることが予想される。*In vitro* における

DRV 耐性誘導実験は 2010 年に Koh らによってすでに報告されており, DRV 耐性に重要な 4 つの変異 (V32I/L33F/I54M/V84I) が明らかとなっている^{3,4)}。本稿では, PR がこれら 4 つの変異を獲得することによってどのような変化が起こり薬剤耐性を獲得しているのかを結晶構造解析, 質量分析, 分子動力学計算および熱力学的解析を用いて検討した結果と, われわれが設計・合成・開発し, HIV^{DRV}s に対して高い阻害効果を発揮する新規 PR 阻害剤 (protease inhibitors; PIs) の分子機序について解説するとともに, DRV および tipranavir (TPV) に代表される PR の二量体化阻害剤の作用機序と新規二量体化阻害剤の開発について述べる。

薬剤耐性変異が PR の構造に及ぼす影響と薬剤耐性獲得のメカニズム

PR は単量体 (monomer) が 99 アミノ酸から成る比較的小さなタンパク質でその酵素活性の発揮には二量体化が必須である。PR が二量体 (dimer) を形成することは 1980 年代後半に結晶構造解析等を用いて確認され, 活性中心近傍部位 (active site interface) と末端領域 (termini interface) と呼ばれる部分で相互作用することで dimer を形成していることが明らかにされた^{5,6)} (図 2)。特に末端領域は, 逆平衡に並んだ 4 つの β シート構造間で水素結合ネットワークが形成されることによって PR dimer の安定化に大きく貢献すると考えられており, 末端領域の相互作用だけで PR dimer の安定化に必要なエネルギーの約 75% を占めると報告されている⁷⁾。また, アミノ酸番号 50 番付近の構造は flap 領域と呼ばれており, PR が基質と結合することで“開いた状態”から“閉じた状態”へと大きく構造が変化する部分として知られている^{8,9)} (図 3)。

過去にさまざまな研究グループが結晶構造解析を用いて薬剤耐性に関連する変異が PR の構造および DRV との相

著者連絡先: 林 宏典 (〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1 国立国際医療研究センター難治性ウイルス感染症研究部)

2017 年 5 月 30 日受付

相互作用様式に及ぼす影響を検討してきた。これらの解析の結果、DRV と複合体を形成していない PR (apo-PR) の構造には変化が確認されており、HIV-1^{WT} 由来の PR (PR^{WT}) に比べて HIV-1^{MDR}s 由来の PR 変異体 (PR^{MDR}s) は flap 領域が大きく開いた構造を形成することが明らかとなった¹⁰⁾。一方、PR^{MDR}s と DRV の複合体を結晶化し構造解析を用いて、耐性変異が DRV の結合様式に与える影響を解析してきたが、PR^{WT} と PR^{MDR}s に対する DRV の結合様式に明確な差異は確認できていない^{10,11)}。われわれの研究グループにおいても、HIV-1^{DRV}s 由来の PR 変異体 (PR^{DRV}s) の apo 体および DRV 結合体の構造解析を行い上記と同じ結果を得ている。

結晶構造において PR^{WT} と PR^{MDR}s に対する DRV との結合様式の違いが確認できなかった理由に関しては、結晶構

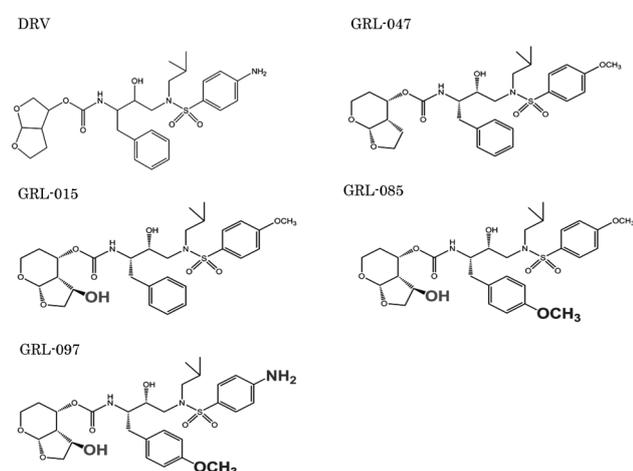


図 1 DRV および新規化合物の化学構造

GRL-015, -085 および GRL-097 は Tp-THF の C5 の位置に存在する水酸基によって PR の flap 領域にある Gly48 と水素結合を形成する¹⁵⁾。

造から得られる情報は、DRV と PR の結合・解離における一側面、すなわち結合解離平衡における DRV と PR の複合体がとり得る構造中で最も結晶化しやすい状態のみを反映するといったことが考えられる。実際、double electron-resonance (DEER) 法を用いて動的な状態での flap 領域の動きに関して解析を行った研究では、PR^{MDR}s が薬剤存在下において flap 領域の構造が“開いた状態”から“閉じた状態”へと移行しにくくなっていることを示唆する結果が得られている^{12,13)}。また、予備的な実験ではあるが、最新の GPU (graphics processing unit) を搭載したスーパーコンピュータを用いて、われわれが NIH の研究者と共同して行った分子動力学計算の結果では、DRV と結合した PR^{DRV}s の flap 領域は PR^{WT} に比べ“閉じた状態”から“開いた状態”へ移行しやすくなっていることを示唆する結果が得られている (未発表)。すでに、2007 年に報告された surface plasmon resonance (SPR) 法を用いた研究の結果から、薬剤耐性を獲得した種々の PR に対して、DRV を含む各 PIs の結合速度は低下し解離速度が上昇するという結果が得られている¹⁴⁾。これらの結果から、HIV-1 がアミノ酸変異を獲得することで、PR の flap 領域が閉じにくく開きやすい構造、すなわち DRV およびその他の PIs が結合しにくくまた解離しやすくなる構造へと変化することで、結果的に薬剤耐性が獲得されると考えられる。

HIV^{DRV}s に対して阻害効果を発揮する化合物の開発とその作用機序の解析

われわれは、DRV の開発以降、*in vitro* における DRV 耐性の誘導を行い、耐性度の異なる種々の DRV 耐性 HIV-1 変異株 (HIV^{DRV P20}, HIV^{DRV P30} および HIV^{DRV P51}) の同定を行ってきた。これらの変異株を用いて HIV-1^{DRV}s に高い阻害効果を発揮する新規化合物群 (GRL-015, -085, -097 *etc.*) の同定に成功 (図 1, 表 2), 結晶構造解析を用いて各化合物の

表 1 DRV は種々の HIV-1^{MDR}s に対して高い阻害効果を発揮する²⁾

Virus	IC ₅₀ (mM)				
	SQV	APV	IDV	NFV	DRV
HIV-1 ^{ERS104pre} (wild-type X4)	0.01	0.023	0.018	0.019	0.003
HIV-1 ^{MOKW} (wild-type R5)	0.004	0.011	0.018	0.033	0.003
HIV-1 TM (MDR X4)	0.23 (23)	0.39 (17)	>1 (>56)	0.54 (28)	0.004 (1)
HIV-1 ^{MM} (MDR X4)	0.30 (30)	0.34 (15)	>1 (>56)	>1 (>53)	0.02 (7)
HIV-1 ^{JSL} (MDR R5)	0.35 (35)	0.75 (33)	>1 (>56)	>1 (>53)	0.029 (10)
HIV-1 ^A (MDR R5)	0.14 (14)	0.16 (7)	>1 (>56)	0.36 (19)	0.004 (1)
HIV-1 ^B (MDR X4)	0.31 (31)	0.34 (15)	>1 (>56)	>1 (>53)	0.013 (4)
HIV-1 ^c (MDR X4)	0.037 (4)	0.28 (12)	>1 (>56)	0.44 (23)	0.003 (1)
HIV-1 ^D (MDR X4)	0.029 (3)	0.25 (11)	0.39 (22)	0.32 (17)	0.004 (1)

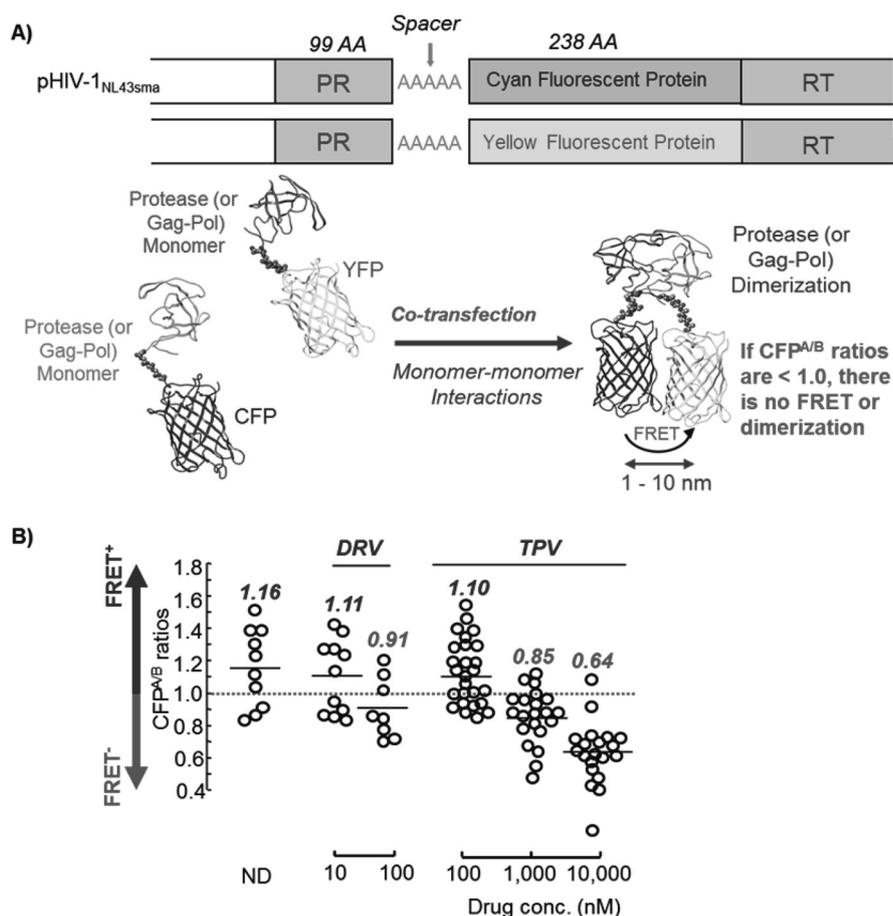


図 2 Fluorescent resonance energy transfer (FRET) を用いた HIV-1 プロテアーゼ (PR) の二量体化阻害の検出: A) HIV_{NL4-3} をコードしたプラスミド上の PR 領域と逆転写酵素 (RT) 領域の間にアランリンカーを介して cyan fluorescent protein (CFP) または yellow fluorescent protein (YFP) を導入したプラスミドを作成した。この 2 種類のプラスミドを細胞にトランスフェクションして、CFP-tagged PR および YFP-tagged PR を発現させる。これらの PR が dimer を形成することで CFP と YFP が近接し、FRET が起こる。すなわち、PR が dimer を形成した場合は FRET が起こるが、dimer を形成しなければ FRET は起こらない。実際に FRET が起こったかどうかは、CFP^{A/B} ratio という値を基に判断している。CFP^{A/B} ratio が 1.0 より大きな値を示した場合、FRET が起こっている (dimer を形成している) ことを、1.0 より小さな値を示した場合は、FRET が起こっていない (dimer を形成していない) ことを示す¹⁾。B) FRET を用いた実験系で DRV, TPV および KU-241 の PR 二量体化阻害活性を測定した結果を示す。DRV は 100 nM 存在下で、TPV は 1,000 nM 存在下で PR の二量体形成を阻害していることが示された¹⁾。

PR との相互作用様式を検討、GRL-015, -085 および -097 が HIV-1_{DRV}^RS を効果的に阻害するメカニズムの解明を行った¹⁵⁾。解析の結果、新たに開発した GRL-015, -085 および -097 は flap 領域に存在する Gly48 と強力な水素結合を形成することが明らかとなった (図 4)。上述のように、HIV-1_{DRV}^RS は PR の flap 領域が閉じにくく開きやすい構造 (不安定化した構造)、すなわち DRV およびその他の PIs が結合しにくくまた解離しやすくなる構造へと変化することで、結果的に薬剤耐性が獲得されると考えられる。HIV-1_{DRV}^RS を効果的に阻害する化合物、GRL-015, -085 および -097 が PR

の flap 領域と相互作用を形成するという結果は、この flap の不安定化による耐性獲得という機構を支持する結果であり、GRL-015, -085 および -097 が PR_{DRV}^RS の不安定化した flap 領域と相互作用を形成することで、flap 領域を安定化することで PR_{DRV}^RS に対する高い親和性を維持していることを示唆する結果と考えられる。

新規プロテアーゼ阻害剤 (PIs) の開発における今後の課題

現在、ART で使用されている投薬方法は、1日1回の経

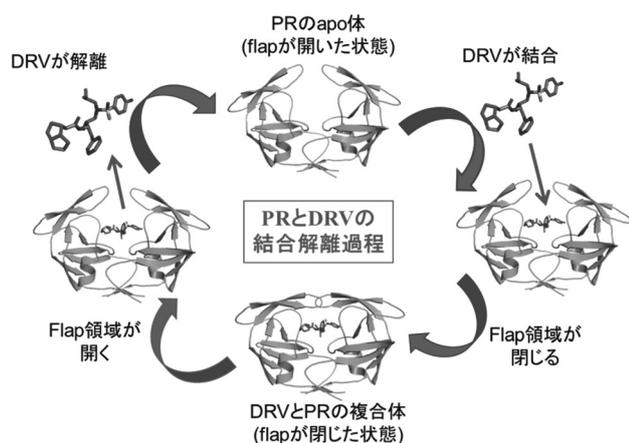


図 3 Darunavir (DRV) の HIV-1 プロテアーゼ (PR) に対する結合と解離の過程

PR は DRV と結合することで flap が開いた状態から閉じた状態へと移行することが知られている。PR は薬剤変異を獲得することで flap 領域が不安定化し閉じた状態へと移行しづらくなると考えられる。

口投与 (QD) となっているが、過去にわれわれが同定・開発し、メルク社に導出された 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA/MK-8591) は¹⁶⁾、第 I 相臨床試験 (Phase I) の結果から 1 週間に 1 回の投与 (QW) または 1 カ月に 1 回の投与 (QM) で十分な抗 HIV 効果を発揮することが示唆されている。今後、EFdA/MK-8591 が米国 FDA の認可を受けた場合、ART の投与法は 1 日 1 回 (QD) から QW または QM へ大きく方向転換し、患者の負担を大きく軽減できると期待される。一方、現在 ART で使用されているすべての PIs は、薬剤耐性変異に対して非常に高い抵抗性を示すという利点はあるものの、CYP 酵素による代謝を受けやすく booster と呼ばれる CYP 阻害剤との併用によってようやく QD による服薬方法を維持できている状態である。また、比較的副作用が生じやすいなど患者にとって負担の大きな薬剤となりつつある。通常、致死的な疾患を除く慢性疾患などの治療に関しては、CYP 阻害効果のある化合物は、その他に服薬する薬剤への影響 (drug-drug interactions ; DDI) や副作用の観点から好ましくない、あるいは禁忌薬とされている。ART の導入により HIV-1 感

表 2 DRV および新規化合物の HIV-1^{WT} および HIV-1^{DRV^RS} に対する抗 HIV-1 活性¹⁵⁾

Virus	IC ₅₀ in nM (fold change)				
	DRV	GRL-0476	GRL-015	GRL-085	GRL-097
HIV _{NL4-3}	2.8	2.8	3.3	3.2	46
HIV _{DRV^RP20}	36 (13)	270 (64)	3.3 (1.0)	1.6 (0.5)	ND*
HIV _{DRV^RP30}	222 (80)	420 (98)	16 (4.7)	2.8 (0.9)	28 (0.6)
HIV _{DRV^RP51}	2,800 (1,022)	ND*	220 (68)	42 (13)	310 (6.8)

* Not determined.

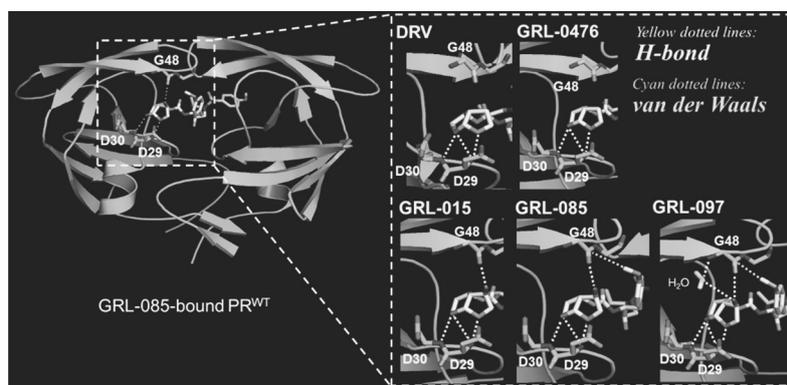


図 4 HIV-1^{WT} 由来の PR (PR^{WT}) と新規化合物の複合体の結晶構造解析

HIV-1^{DRV^RS} に対して高い阻害効果を発揮する化合物、GRL-015、-085、-097 は PR^{WT} の flap 領域に存在する Gly48 と水素結合を形成しているが、HIV-1^{DRV^RS} に対して阻害効果を発揮しない化合物、DRV と GRL-0476 には Gly48 との水素結合の形成は確認できなかった¹⁵⁾。

染症は、「死の病」から「治療可能な慢性感染症」へと再定義されるほどとなっており、boosterを使用しないことを念頭に置いたPIsの開発が望まれる。実際、2017年の2月に開催されたconference on retroviruses and opportunistic infections (CROI)でGilead社がCYPによる代謝をほとんど受けず生体内で長期間血中濃度を維持できるPIsの報告を行っている。このようなことから、今後はboosterに依存せずにQDまたはQWでの投与が可能となるPIsの開発が主流となることが予測される。新規PIsに関する現在の薬剤耐性を生じにくいという利点を保持したまま、CYP酵素による代謝の影響を減らし生体内での血中濃度をより長期間維持できるようなPIsをどのようにして開発していくかが今後の大きな課題である。

タンパク質間相互作用に着目した新規抗HIV剤の開発

細胞内外で起こる生命現象のほとんどは、酵素やレセプターといったタンパク質と基質の結合、または複合体形成などのタンパク質間相互作用 (protein-protein interactions ; PPIs) によってコントロールされている。複合体を形成するタンパク質は、 $1,000\sim 2,000\text{ \AA}^2$ という広い範囲にわたって相互作用しており、その作用は面と面が接して結合する構造をとることが多い。一方、タンパク質と化合物との結合では、結合面にcavityと呼ばれる“ポケット”が必要であり、かつ $300\sim 500\text{ \AA}^2$ と狭い範囲での相互作用しか形成しないためタンパク質間で起こる相互作用 (PPIs) を完全に阻害することはむずかしく、1990年代前半頃までタンパク質間の相互作用面は創薬の標的には不向きであると考えられていた¹⁷⁾。1995年から2005年にかけて行われた種々の変異導入実験により、PPIsが相互作用面に存在するすべてのアミノ酸ではなく“hot spots”と呼ばれる一部のアミノ酸が相互作用またはその開始に重要であり、“hot spots”を標的とすることで化合物によるPPIsの制御が可能になるという事実が示唆されるようになってようやくPPIsの阻害剤の開発は活発になった^{18~23)}。

DRVおよびTPVがPRの酵素活性だけでなく二量体化を阻害することが明らかになったのは2007年のことであり、それ以前はARTで使用されているすべてのPIsは、PRのdimerに結合することにより酵素活性を阻害していると考えられていた。現在では、DRVおよびTPV以外にもタンパク質間相互作用を阻害または促進する効果を持った抗HIV-1剤がいくつか報告されている。これらの化合物の中には、現在開発段階にある化合物だけでなく、すでにARTで使用されている小分子化合物の新たな作用機序として報告されているものもある。開発中の化合物に関しては、integraseと宿主因子であるLEDGF/p75などとの結合阻害^{24,25)}、capsid間の相互作用の阻害²⁶⁾、envelopeとCD4の

結合阻害といった効果を持つ小分子化合物^{27,28)}が報告されている。既存の化合物の新たな作用機序として報告された例としては、抗HIV-1活性との関連は不明であるがefavirenz (EFV)などの非核酸系逆転写阻害剤 (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors ; NNRTIs) による逆転写酵素の二量体化促進効果等があげられる^{29,30)}。

新規PR二量体化阻害剤の開発を志向したPR二量体化過程の詳細な解析

上述のように、PRが酵素活性を発揮するためにはdimerの形成が不可欠であることから、PRの二量体化阻害は創薬のターゲットとなり得ると考えられており、これまで複数の研究者がPRの二量体化阻害剤の開発を試みてきた^{31~34)}。しかし、それらの研究者が開発した化合物は臨床応用されることはなく、現在ARTで使用されているPIsの中で二量体化阻害効果を有する化合物はDRVとTPVのみである。より効果的かつ効率的にPR二量体化阻害剤の開発を行うためには、PRがどのように二量体を形成し、その二量体形成過程で重要な役割を果たすアミノ酸すなわち“hot spots”を同定する必要がある。そこで、われわれは新たにelectrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) と呼ばれる質量分析法を用いてPRの二量体化過程の詳細な解析を行った³⁵⁾。上述のとおりPRの二量体形成に重要な相互作用部位は、活性中心近傍部位 (active site interface) と末端領域 (termini interface) の2カ所存在しており、特にtermini interfaceは、PR dimerの安定化に必要なエネルギーの約75%を占めると報告されている⁷⁾。過去にNMRやFRET等を用いた研究 (図2A) が行われ、PRのactive site interfaceのアミノ酸 (Thr26, Asp29 および Arg87) に変異を加える、または、C末端領域に存在する96番目から99番目までのアミノ酸を削除することでPRの二量体形成が著しく阻害されることが明らかとなっていることから、これらのアミノ酸を“hot spots”の候補として解析を行った。PRの二量体化に重要とされる各相互作用部に存在するアミノ酸に変異や欠損を導入、ESI-MSを用いてPRのdimerの検出を行った結果、active site interfaceに位置するアミノ酸、Thr26をAlaに、Arg87をLysにそれぞれ置換したPR変異体 (PR^{T26A} and PR^{R87K}) では、dimerの形成が確認されなかった³⁵⁾ (図5)。一方で、同じく二量体形成に重要とされ、dimerの安定化に最も貢献するとされているtermini interfaceに存在するアミノ酸 (Thr96~Phe99) を削除した変異体 (PR^{1-C95A}) は、わずかではあるがdimerの形成が確認された³⁵⁾ (図5)。この結果は、active site interfaceに存在するThr26およびArg87がPRの二量体化における“hot spots”であることを示している。また、active site interfaceに1カ所変異を導入するだけで、dimerの安定化に最も貢

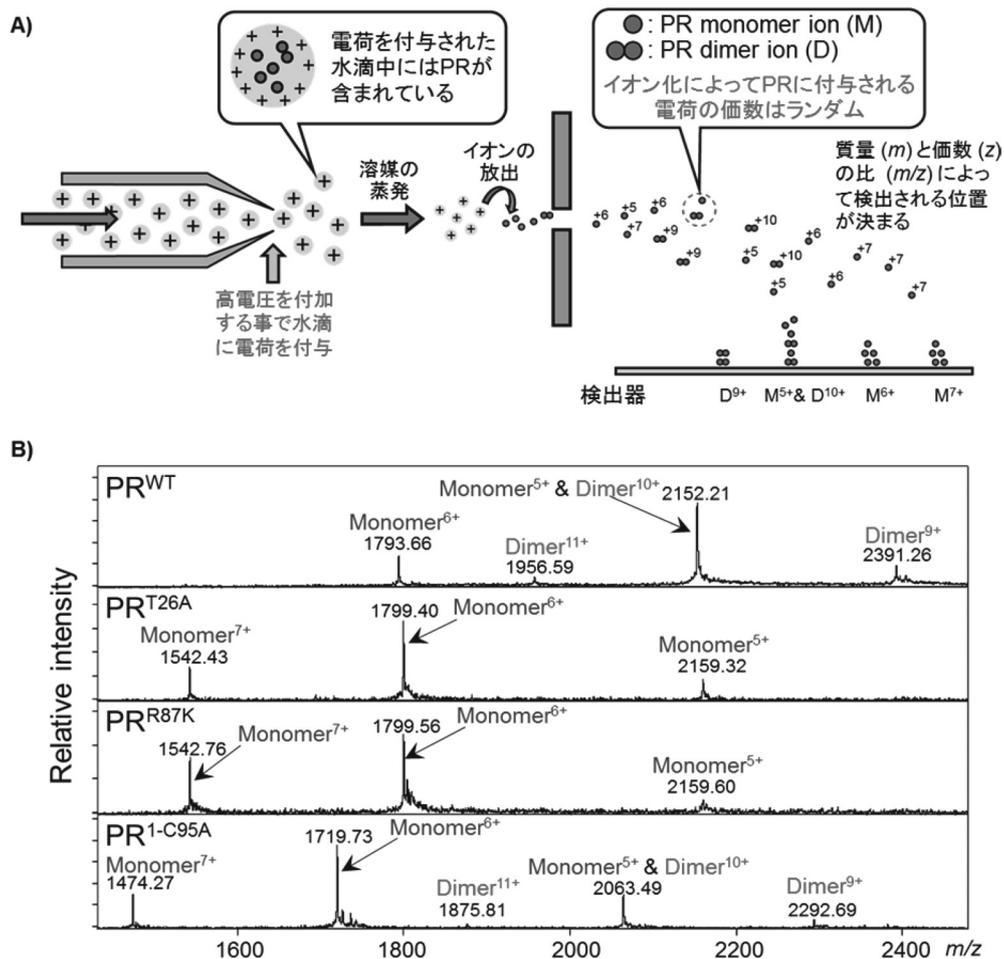


図 5 Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) を用いた HIV-1 プロテアーゼ (PR) の二量体化の検出
 A) ESI-MS にアプライしたサンプルはキャピラリーから水滴が霧状に噴出される。噴出口で高電圧を付与することで、噴出された水滴に電荷が付与される。その水滴の溶媒を蒸発させると、PR は水滴に含まれる電荷の影響を受けイオン化される。このとき PR に付与される電荷の価数はランダムであり、さまざまな電荷をもったイオンが生成される。イオン化された PR monomer および dimer は、質量分析器によって検出されるが、検出されるイオンの位置はイオンの質量 (m) と、それぞれのイオンに付与された電荷の価数 (z) の比 (m/z) によって検出される。このため、実際の測定データには、monomer 由来のピークまたは dimer 由来のピークが複数検出されることになる。B) ESI-MS によって種々の PR 変異体の二量体形成を確認した結果、変異を含まない PR^{WT} は dimer を形成しているのに対して、活性中心近傍のアミノ酸に変異を加えた変異体 (PR^{T26A} and PR^{R87K}) は monomer のみしか存在していないことが明らかとなった。一方、PR の C 末端のアミノ酸を削除した変異体 (PR^{1-C95A}) は dimer を形成していることが明らかとなった³⁵⁾。

献するとされる termini interface の相互作用までもが失われ、PR が dimer を形成しなくなるという結果は、PR の dimer が、2 段階で形成されることを示唆している。すなわち、PR は、(1) まず、active site interface で相互作用することで、不安定な dimer を形成し、ついで (2) termini interface の相互作用を形成することにより不安定な dimer を安定化し、完全な dimer を形成する³⁵⁾ (図 6)。

DRV および TPV の二量体化阻害機構の解明

さらにわれわれは、新たに明らかとなった二量体化過程のどのステップを DRV が阻害しているかを明らかにするために、DRV が PR monomer の active site interface または termini interface のどちらに結合しているかを検討することにした。Active site interface に位置し、かつ DRV 耐性に関与する変異 (V32I/L33F/I54M/I84V) を導入した PR 変異体 (PR^{V32I/L33F/I54M/I84V}) および termini interface に変異を加えた

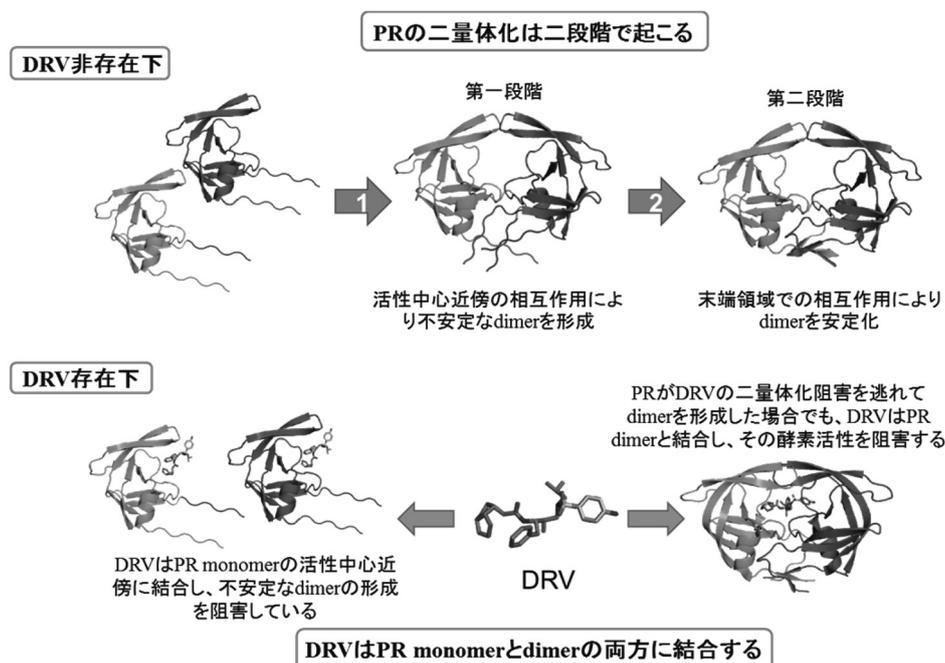


図 6 PR の二量体化のダイナミクスと DRV の二量体化阻害機構

PR は、まず活性中心近傍で相互作用することによって不安定な dimer を形成し、ついで末端領域で相互作用することで不安定な dimer を安定化し、完全な dimer を形成する。DRV は、PR monomer の活性中心近傍に結合して、PR monomer が不安定な dimer を形成することを阻害する。PR が DRV の二量体化阻害を逃れて dimer を形成しても DRV は PR dimer に結合し、その酵素活性を阻害する³⁵⁾。

PR 変異体 (PR^{L97A/F99A}) を作成し、DRV と monomer の結合を ESI-MS を用いて検討した^{3,4,35)}。解析の結果、DRV は PR^{V321/L33F/I54M/I84V} の monomer に対する結合を失ったが、PR^{L97A/F99A} の monomer に対する結合は維持していた。すなわち、DRV は二量体形成に重要な “hot spots” が存在する PR monomer の active site interface に結合することで、PR 二量体化過程の第一段階である不安定な dimer の形成を阻害していることが示唆された³⁵⁾ (図 6)。

PR が termini interface での相互作用の形成を完了し安定な dimer がいったん形成されると、DRV は PR dimer を monomer へと解離することはない¹⁾。しかし、dimer が形成されたとしても、DRV は dimer の基質結合部位に強力に結合し、その酵素活性を阻害して HIV-1 の複製を阻害する (図 6)。すなわち、DRV は二量体化阻害、酵素活性阻害という 2 つの機能を有しているために高いジェネティックバリアと強力な抗 HIV 効果を発揮すると考えられる。

TPV に関しては、ESI-MS ではなく FRET を用いた詳細な解析が過去に行われており、活性中心近傍のアミノ酸に変異を加えた変異体 (PR^{L24M}, PR^{L33I}, PR^{L33F} and PR^{E34D}) に対する二量体化阻害能が著しく低下することが明らかとなっている³⁶⁾。これらの結果から、TPV も DRV と同様に active

site interface に結合して二量体化過程の第一段階である不安定な dimer の形成を阻害しているのではないかと考えられる。

PR の二量体化阻害剤の開発におけるこれまでの問題点と展望

上述のように、PPIs を阻害するためには “hot spots” を標的とすることが効果的であると考えられる。ESI-MS を用いた研究の結果、PR の二量体形成における “hot spots” は活性中心近傍に位置していると考えられる。しかし、過去に設計された DRV および TPV 以外の PR 二量体化阻害剤 (protease dimerization inhibitors ; PDIs) は、PR の活性中心近傍ではなく termini interface を標的としていた^{31~34)}。上述したように termini interface は、強固な水素結合ネットワークを形成することで PR dimer の安定化に非常に重要な働きをすることが結晶構造から明らかとなっている。一方で、PR monomer の状態では末端領域は不安定な構造をとっていると考えられている³⁷⁾。Termini interface を標的とした場合、不安定な monomer の構造に結合し、二量体化の際に形成される強固な水素結合ネットワークの形成を阻害し得るほど強力な結合能を持った化合物の開発が必要とな

る。このような化合物の開発は非常に困難であると考えられる。特記すべきは、われわれの報告した DRV などの PDI 以外の PDI は termini interface を標的としたペプチドのみであり、経口投与は不可能で、血中半減期はきわめて短いと考えられ、治療薬とはならないことである。DRV が二量体化阻害に成功した要因の 1 つは、非ペプチド性の小分子化合物であって、しかも末端領域ではなく“hot spots”の存在する active site interface の相互作用を標的としたことであると考えられる。

現在までに PR monomer と PDI との複合体の結晶構造は得られておらず、詳細な相互作用様式はいぜん不明である。一方で、DRV と PR monomer の相互作用様式に関する分子動力的な解析手法を用いた研究が行われている³⁸⁾。また、最新の研究では、PDI を開発する上で創薬の標的となり得る部位 (druggable sites) が PR monomer の表面、特に active site interface に複数存在している可能性が示唆されている³⁹⁾。これらの結果は、同じ active site interface への結合であったとしても DRV および TPV とはまったく異なる結合部位 (または相互作用様式) を有し、これらの化合物と交叉耐性を示さない PDI が開発される可能性を示唆しており、興味深い。DRV と TPV の PR monomer に対する結合部位に違いがあるかどうかに関しては、現在 ESI-MS を用いたより詳細な検討が行われている。今後、PR monomer と PDI の結晶構造が解明され、その相互作用様式が明らかとなれば、これまで以上に強力な PDI の設計・開発が可能となると強く期待できる。

謝辞

本研究に際してさまざまなご指導をいただきました満屋裕明先生に深く感謝いたします。また実験および研究の遂行に当たり、さまざまな面でご助力やご指摘をいただいた青木学先生、関康博先生に感謝いたします。

利益相反: この研究における利益相反に相当する事項はない。

文 献

- 1) Koh Y, Matsumi S, Das D, *et al* : Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem* 282 : 28709–28720, 2007.
- 2) Koh Y, Nakata H, Maeda K, *et al* : Novel bis-tetrahydrofuranylethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with potent activity against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus *in vitro*. *AAC* 47 : 3123–3129, 2003.
- 3) Koh Y, Amano M, Towata T, *et al* : *In vitro* selection of highly darunavir-resistant and replication-competent HIV-1 variants by using a mixture of clinical HIV-1 isolates resistant to multiple conventional protease inhibitors. *J Virol* 84 : 11961–11969, 2010.
- 4) Koh Y, Aoki M, Danish ML, *et al* : Loss of protease dimerization inhibition activity of darunavir is associated with the acquisition of resistance to darunavir by HIV-1. *J Virol* 85 : 10079–10089, 2011.
- 5) McKeever BM, Navia MA, Fitzgerald PM : Crystallization of the aspartylprotease from the human immunodeficiency virus, HIV-1. *J Biol Chem* 264 : 1919–1921, 1989.
- 6) Wlodawer A, Miller M, Jaskólski M, *et al* : Conserved folding in retroviral proteases : crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 245 : 616–621, 1989.
- 7) Todd MJ, Semo N, Freire E : The structural stability of the HIV-1 protease. *J Mol Biol* 283 : 475–488, 1998.
- 8) Ishima R, Freedberg D, Wang YX, *et al* : Flap opening and dimer-interface flexibility in the free and inhibitor-bound HIV protease, and their implications for function. *Structure* 7 : 1047–1055, 1999.
- 9) Cai Y, Yilmaz NK, Myint W, *et al* : Differential flap dynamics in wild-type and a drug resistant variant of HIV-1 protease revealed by molecular dynamics and NMR relaxation. *J Chem Theory Comput* 8 : 3452–3462, 2012.
- 10) Agniswamy J, Shen CH, Aniana A, *et al* : HIV-1 protease with 20 mutations exhibits extreme resistance to clinical inhibitors through coordinated structural rearrangements. *Biochemistry* 51 : 2819–2828, 2012.
- 11) Wang Y, Liu Z, Brunzelle JS, *et al* : The higher barrier of darunavir and tipranavir resistance for HIV-1 protease. *Biochem Biophys Res Commun* 412 : 737–742, 2011.
- 12) Galiano L, Ding F, Veloro AM, *et al* : Drug pressure selected mutations in HIV-1 protease alter flap conformations. *J Am Chem Soc* 131 : 430–431, 2009.
- 13) Vera IMS, Blackburn ME, Fanucci GE : Correlating conformational shift induction with altered inhibitor potency in a multidrug resistant HIV-1 protease variant. *Biochemistry* 51 : 7813–7815, 2012.
- 14) Dierynck I, Wit MD, Gustin E, *et al* : Binding kinetics of darunavir to human immunodeficiency virus type 1 protease explain the potent antiviral activity and high genetic barrier. *J Virol* 81 : 13845–13851, 2007.
- 15) Aoki M, Hayashi H, Yedidi RS, *et al* : C-5-modified tetrahydropyrano-tetrahydrofuran-derived protease inhibitors (PIs) exert potent inhibition of the replication of HIV-1 variants highly resistant to various PIs, including Darunavir.

- J Virol 90 : 2180–2194, 2016.
- 16) Kawamoto A, Kodama E, Sarafianos SG, *et al* : 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *Int J Biochem Cell Biol* 40 : 2410–2420, 2008.
- 17) Fuller JC, Burgoyne NJ, Jackson RM : Predicting druggable binding sites at the protein-protein interface. *Drug Discov Today* 14 : 155–161, 2009.
- 18) Hwang H, Vergen T, Janin J, *et al* : Protein-protein docking benchmark version 4.0. *Proteins* 78 : 3111–3114, 2010.
- 19) Arkin MR, Wells JA : Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions : progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* 3 : 301–317, 2004.
- 20) Clackson T, Wells JA : A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* 267 : 383–386, 1995.
- 21) Basse MJ, Betzi S, Bourgeas R, *et al* : 2P2Idb : a structural database dedicated to orthosteric modulation of protein-protein interactions. *Nucl Acids Res* 41 : D824–827, 2013.
- 22) Higuero AP, Schreyer A, Bickerton GR, *et al* : Atomic interactions and profile of small molecules disrupting protein-protein interfaces : the TIMBAL database. *Chem Biol Drug Des* 74 : 457–467, 2009.
- 23) Labbé CM, Laconde G, Kuenemann MA, *et al* : iPPI-DB : a manually curated and interactive database of small non-peptide inhibitors of protein-protein interactions. *Drug Discov Today* 18 : 958–968, 2013.
- 24) De Luca L, Ferro S, Morreale F, *et al* : Inhibitors of the interactions between HIV-1 IN and cofactor LEDGF/p75. *ChemMedChem* 6 : 1184–1191, 2011.
- 25) Fader LD, Malenfant E, Parisien M, *et al* : Discovery of BI 224436, a noncatalytic site integrase inhibitor (NCINI) of HIV-1. *ACS Med Chem Lett* 5 : 422–427, 2014.
- 26) Shi J, Zhou J, Shah VB, *et al* : Small-molecule inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization. *J Virol* 85 : 542–549, 2011.
- 27) Zhao Q, Ma L, Jiang S, *et al* : Identification of *N*-phenyl-*N'*-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl)-oxalamides as a new class of HIV-1 entry inhibitors that prevent gp120 binding to CD4. *Virology* 339 : 213–225, 2005.
- 28) Ohashi N, Harada S, Mizuguchi T, *et al* : Small-molecule CD4 mimics containing mono-cyclohexyl moieties as HIV entry inhibitors. *ChemMedChem* 11 : 940–946, 2016.
- 29) Tachedjian G, Orlova M, Sarafianos SC, *et al* : Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors are chemical enhancers of dimerization of the HIV type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 7188–7193, 2001.
- 30) Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, *et al* : Efavirenz enhances HIV-1 gag processing at the plasma membrane through gag-pol dimerization. *J Virol* 87 : 3348–3360, 2013.
- 31) Babé LM, Rosé J, Craik CS : Synthetic “interface” peptides alter dimeric assembly of the HIV 1 and 2 proteases. *Protein Sci* 1 : 1244–1253, 1992.
- 32) Shultz MD, Ham YW, Lee SG, *et al* : Small-molecule dimerization inhibitors of wild-type and mutant HIV protease : a focused library approach. *J Am Chem Soc* 126 : 9886–9887, 2004.
- 33) Shultz MD, Chmielewski J : Probing the role of interfacial residues in a dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Bioorg Med Chem Lett* 9 : 2431–2436, 1999.
- 34) Davis DA, Brown CA, Sinnger KE, *et al* : Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Antiviral Res* 72 : 89–99, 2006.
- 35) Hayashi H, Takamune N, Nirasawa T, *et al* : Dimerization of HIV-1 protease occurs through two steps relating to the mechanism of protease dimerization inhibition by darunavir. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 : 12234–12239, 2014.
- 36) Aoki M, Danish ML, Aoki-Ogata H, *et al* : 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* 86 : 13384–13394, 2012.
- 37) Levy Y, Caflisch A, Onuchic JN, *et al* : The folding and dimerization of HIV-1 protease: evidence for a stable monomer from simulations. *J Mol Biol* 340 : 67–79, 2004.
- 38) Hung D, Caflisch A : How does darunavir prevent HIV-1 protease dimerization ? *J Chem Theory Comput* 8 : 1786–1794, 2012.
- 39) Bai F, Morcos F, Cheng RR, *et al* : Elucidating the druggable interface of protein-protein interactions using fragment docking and co evolutionary analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 113 : E8051–8058, 2016.