

Novel fluorescence assay for HIV-1 protease and its application to mutant discrimination

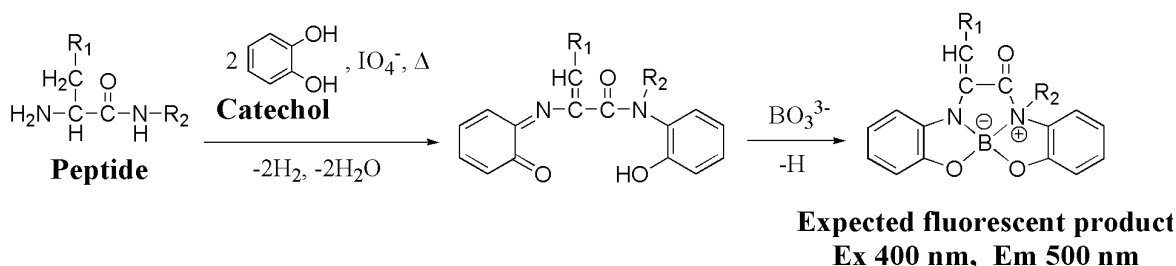
(HIV-1 プロテアーゼの新規蛍光測定法の開発と変異識別法への応用)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 Yu Zhiqiang

[目的]

Human immunodeficiency virus 1 protease (HIV-1 PR) は、HIV-1 の成熟過程において Gag および Gag-Pol 前駆体タンパク質のプロセッシングを行なうため、エイズ治療における標的分子として重要な酵素である。現在、HIV-1 PR 阻害剤がエイズ治療薬として使用されているが、HIV-1 PR の変異による薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。実際に、臨床現場において HIV-1 PR に変異をもつ変異株が多数発見されており、これらの簡便な識別方法が求められている。

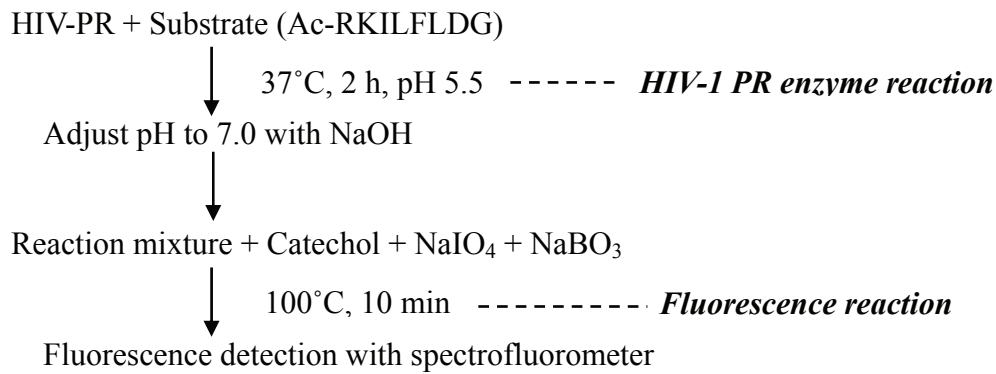
最近、我々は、カテコールとホウ酸、過ヨウ素酸ナトリウムを用いるペプチドの選択的な新規蛍光誘導体化反応を見出した (Scheme 1)¹⁾。本研究では、まず、この蛍光誘導体化反応を応用し、新規の HIV-1 PR 活性測定法の開発を行なった。次に、この測定法をもとに、複数の基質ペプチドと HPLC を用いた変異型 HIV-1 PR 識別法の開発を行なった。



Scheme 1. Fluorescence reaction for peptides.

[実験方法]

1) HIV-1 PR 活性測定法：開発した HIV-1 PR 活性測定法の原理を Scheme 2 に示す。本法は、acetyl-Arg-Lys-Ile-Leu-Phe-Leu-Asp-Gly (Ac-RKILFLDG) を基質として HIV-1 PR の酵素反応を行ない、生成した Phe-Leu-Asp-Gly (FLDG) を蛍光反応により蛍光物質へと変換する。その後、生じた蛍光を検出することで、HIV-1 PR 活性を測定するものである。まず、FLDG を用いて、蛍光反応時間、蛍光反応温度、pH、試薬の濃度を変化させ、蛍光反応の最適化を行なった。次に、大腸菌で発現させた HIV-1 PR の活性測定を行ない、市販の HIV-1 PR 活性測定キットと比較した。



Scheme 2. Assay of HIV-1 PR activity with batch method.

2) 変異型 HIV-1 PR 識別法 : PCR を用いて変異型 HIV-1 PR の作製を行ない、大腸菌で発現させた。次に、4 種類の合成アセチル化ペプチドを基質として用い、酵素反応を行なった後、生成するペプチドを蛍光誘導体化後、HPLC により分離、蛍光検出した。野性型および変異型 HIV-1 PR について、それぞれの HPLC クロマトグラムを作成し、クロマトグラムパターンを比較した。

[結果および考察]

1) HIV-1 PR 活性測定法 : 蛍光反応の条件を検討した結果、反応温度 100°C、pH 7.0、反応時間 10 min を最適条件として選択した。また、各試薬の至適濃度は、0.83 mM catechol, 0.17 mM NaIO₄, 50 mM NaBO₃ であった。この蛍光反応は、N 末端に遊離のアミノ基を持つペプチドに選択的であるため、未分解のアセチル化基質および分解された N 末側アセチル化ペプチド (Ac-RKIL) は、蛍光物質へ変換されない。この条件を基に、HIV-1 PR の活性を測定した結果、本法は市販のキットと同様な HIV-1 PR の活性値を示した。現在市販されている HIV-1 PR 活性測定キットは、蛍光標識したペプチドを基質として使用している。これに対して、本法は、このような標識ペプチドを必要とせず、種々のペプチドを基質として使用することができ、さらに、使用する試薬も安価である。また、本法により、種々のプロテアーゼ阻害剤の効果を調べた結果、HIV-1 PR の特異的な阻害剤であるペプスタチン A のみ阻害活性が検出できた。これにより、本法は HIV-1 PR に特異的な測定法であることが確認できた²⁾。

2) 変異型 HIV-1 PR の識別法 : HIV-1 PR は、様々なアセチル化ペプチドを基質として認識することができる。そこで、変異によって HIV-1 PR の基質特異性が変化していれば、複数の基質ペプチドと酵素反応した後、生成したペプチド断片の HPLC クロマトグラムパターンを比較することで変異型の識別ができると考えた。最初に、4 種類のアセチル化基質を用いて、野性型および 2 種の変異型 HIV-1 PR (mutant 1, 2) の活性を比較した。その結果、mutant 2 において、Ac-SQNYLIVQ に対する活性が低下していた (Fig. 1. peak 4)。次に、抗 HIV 薬のリトナビル (HIV-1 PR 阻害剤) の阻害活性を調べたところ、mutant 2 はリトナビルに対して高い抵抗性を示した。一方で、

mutant 1 は、野生型とほぼ同様の基質特異性およびリトナビル感受性を示した。これらの結果は、変異によって薬剤耐性を獲得すると、基質特異性が変化することを示しており、本法は、このような薬剤耐性と関連した変異型 HIV-1 PR の識別が可能になるものと考え³⁾。以上のように、本法は、高選択性、安価であり、変異型 HIV-1 PR の識別ができることから、エイズ治療薬の開発や HIV 研究において有用と考えられる。

また、今回開発した、HPLC を用いた変異型 HIV-1 PR の識別法は、基質となるペプチドの配列を変えることで、HIV-1 PR 以外のプロテアーゼの識別にも応用できると考えられる。

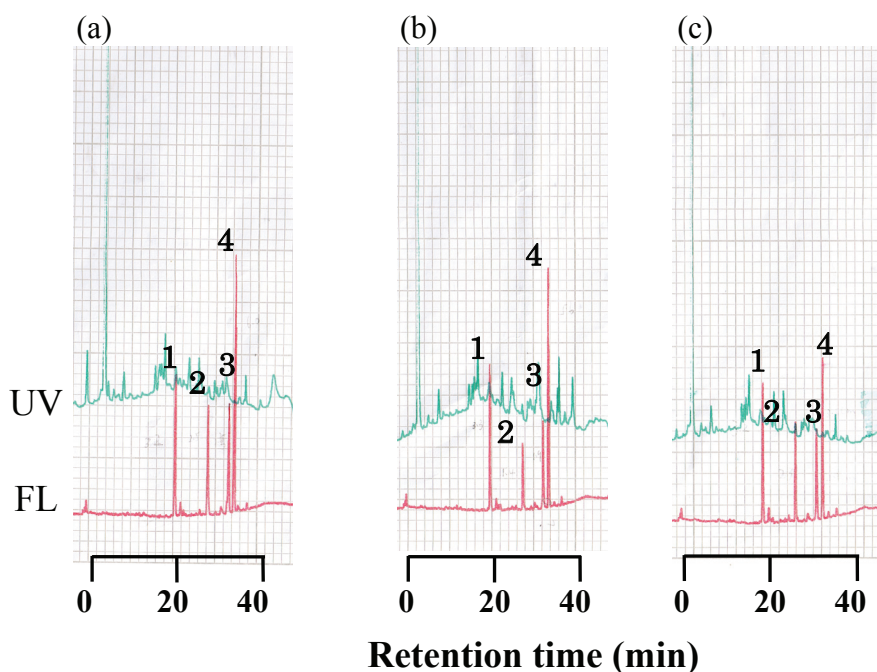


Figure 1. Typical HPLC profile of the fluorescent products generated from four substrates by (a) wild type, (b) mutant 1 (L5P, G57R, N83Y), and (c) mutant 2 (L5P, G57R, G68R). Peaks 1-4 are FL products: 1=LETS from Ac-SGIFLETS, 2=FEAM from Ac-ARVLF EAM, 3=FLDG from Ac-RKILFLDG, 4=LIVQ from Ac-SQNYLIVQ. FL: fluorescence detection at 400 nm (excitation) and 500 nm (emission). UV: ultraviolet absorption detection at 254 nm.

[基礎となった学術論文]

- 1) Kabashima T., Yu Z., Tang C., Nakagawa Y., Okumura K., Shibata T., Lu J., Kai M.: A selective fluorescence reaction for peptides and chromatographic analysis. *Peptides*, 29, 356-363 (2008).
- 2) Yu Z., Kabashima T., Tang C., Shibata T., Kitazato K., Kobayashi N., Lee M.K., Kai M.: Selective and facile assay of human immunodeficiency virus protease activity by a novel fluorogenic reaction. *Anal. Biochem.*, 397, 197-201 (2010).
- 3) Yu Z., Kabashima T., Tang C., Shibata T., Kai M.: A fluorescence assay for facile discrimination of mutant HIV-1 proteases. (in preparation)