

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KAI3701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼ二量体化を阻害する低分子化合物の探索

所属 岐阜大学 人獣感染防御研究センター プリオン研究部門
研究者 中村寛則

研究要旨 論理的創薬手法を用いて、抗 HIV 作用が期待される低分子化合物の探索を行った。HIV 感染細胞系を用いて検証した結果、二量体の活性部位をターゲットとして探索した化合物の中に、非常に弱い抗 HIV 作用が認められるものが複数個見つかった。

A. 研究目的

本研究の目的は、論理的創薬手法を用いて、抗 HIV 活性を持つリード低分子化合物を発見することである。HIV の増殖は、HIV プロテアーゼの活性阻害によって抑制されることが知られている。HIV プロテアーゼは二量体を形成した後にその活性を発現できるので、二量体化が阻害できれば HIV の増殖を抑制することができる。本研究では、二量体化を阻害するリード化合物を新規に発見することを目的とする。これに先立って、論理的創薬手法の有効性の検証やその手法のチューニングを、二量体の活性部位に結合する低分子化合物を探索することによって行う。

B. 研究方法

抗 HIV 作用を持つ低分子化合物の探索を論理的創薬手法で行った。論理的創薬手法とは、ある種の情報および理論に基づいて創薬を行うものである。本研究では、ターゲットタンパク質の立体構造情報と結合エネルギーを算出する理論を用いて、タンパク質に強く結合する低分子化合物をスクリーニングする方法を指す。これは、タンパク質立体構造情報に基づく薬剤探索 (structure-based drug discovery(SBDD))もしくは *in silico* スクリーニング法と呼ばれることもある。本研究で用いた具体的な *in silico* スクリーニング法は以下の通りである。計算機プログラムは、米国スクリプス研究所の Olsen らによって開発された AutoDock ver. 3.05 を用いた。低分

子化合物のデータベースには、米国カルフォルニア州立大学サンフランシスコ校の Shoichet らが整備し、web 上で公開している ZINC を用いた。ZINC は、スクリーニング用低分子化合物の販売元からカタログ情報を取得し、水素原子付加や各原子の電荷情報を付加する等を行って *in silico* スクリーニングが容易になるように整備をした低分子化合物のデータベースである。ZINC には、約 300 万個の低分子化合物のデータが含まれている。今回行った *in silico* スクリーニングでは、ZINC に含まれるサブセットの一つである lead-like サブセットを用いた。これは、低分子化合物の分子量が 150~350、水素結合供与体原子数は 3 以下、水素結合受容体原子数は 6 以下、水への溶解やすさの指標である xlogP が -2 から 4 という条件を満たす化合物集団である。Lead-like サブセットに含まれる低分子化合物数は約 64 万個であるが、納期・単価を考慮して、本年度は、lead-like サブセットの中から ASINEX 社(ロシア)から購入可能な低分子化合物のデータセット (約 8 万個) を独自に抽出し、これらを計算対象として効率的に *in silico* スクリーニングを行った。実際に行った計算は、まず、サブターゲットの HIV-1 プロテアーゼ二量体活性部位に対して、2 種類の異なる X 線結晶構造 (Protein Data Bank(PDB) コードが 1HVR および 1HPV のもの)を用い、それぞれ複数回の計算を行った。

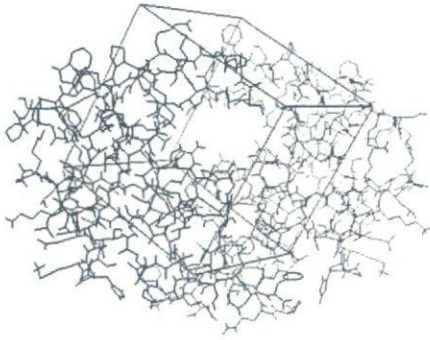


図1.HIV-1プロテアーゼ二量体の活性部位をターゲットとしたドッキングシミュレーションで用いたグリッドボックス。

次に、単量体に結合し二量体化を阻害する化合物のスクリーニングに対しては、1種類のX線結晶構造(1HPV)から一方の単量体の立体構造情報のみを取り出して、それを用いて *in silico* スクリーニングを行った。

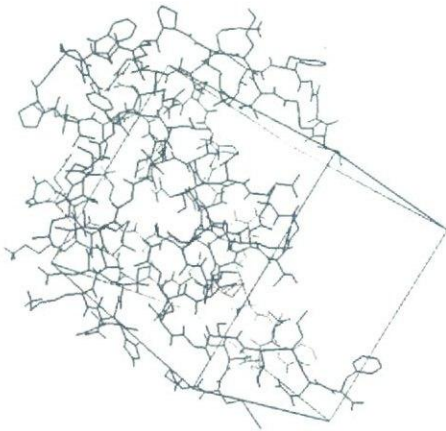


図2.HIV-1プロテアーゼ二量体のX線結晶構造より一方のみを用いて、その二量体界面をターゲットとしたドッキングシミュレーションで用いたグリッドボックス。

以上の3種類の *in silico* スクリーニングを行い、結合エネルギーが低いものから、合計410個(順に、139個、123個、148個)の低分子化合物を実際に購入した。

購入した低分子化合物に対しては、聖マリアンナ医科大学微生物学教室にて、培養細胞を用いたMTT

アッセイ法によって抗HIV活性を検証した。96穴のマイクロプレート上にて、HIV感染細胞と非感染細胞のそれぞれに低分子化合物を、濃度を振って添加、5日間培養後に各ウェルの生存細胞数をMTT法によって定量化した。抗HIV活性は有効率で算出した。有効率は、低分子化合物を添加した非感染細胞の生存数に対する低分子化合物を添加したHIV感染細胞の生存数の比を用いた。

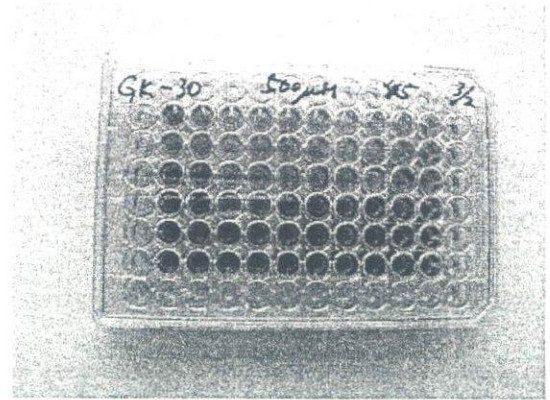


図3.MTTアッセイ後のプレートの例

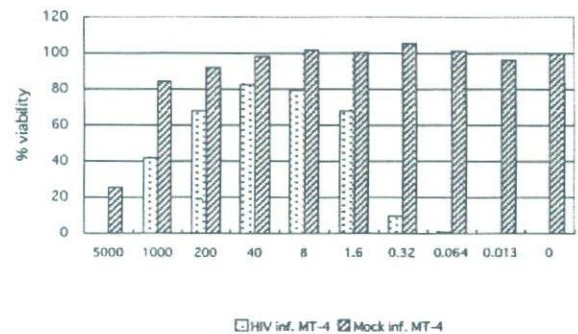


図4.HIV感染系を用いたMTTアッセイ法におけるポジティブコントロール(ddC)の例。HIV非感染細胞の生存量(斜線)とHIV感染細胞の生存量(点)。両方に低分子化合物を添加。低分子化合物濃度0の非感染細胞生存量で規格化。この例では、50%有効濃度(EC50)は0.96µM、50%細胞障害濃度(CC50)=2,645µM。

(倫理面への配慮)

計算機シミュレーションによる低分子化合物スクリーニングについては、特に倫理的問題は生じない。また、HIVなどの取り扱いを行う際は、聖マリアンナ医科大学および岐阜大学のP3施設の運用基準に従い、特に以下の件について注意を払い実験を行う

ようにする。

- 前室を設置し、前室の前後の扉を同時に開けない。
- 床等の表面波、容易に水洗・燻蒸が可能な構造を有する。
- 足等で又は自動で操作可能な手洗い設備を完備する。
- 給排気設備を完備する。
- 排気は、原則として、実験室・建物内の他の部屋に再循環されない。
- 排水は、遺伝子組換え生物等の不活化後に排出できる設計とする。
- 原則として、研究用安全キャビネットを設置し、キャビネット内で操作する。
- 実験室内に高圧滅菌器を設置する。
- 専用の作業衣を着用し、廃棄等の前に遺伝子組換え生物等の不活化を行う。
- キャビネット操作時は、原則として、実験室に出入りしない。
- 「P3レベル実験中」の表示する。
- P3レベルの拡散防止措置を執る。

C. 研究成果

計算対象とした低分子化合物において、二量体の活性部位をターゲットとしたドッキングシミュレーションで得られた結合エネルギーの分布は以下の通りであった。

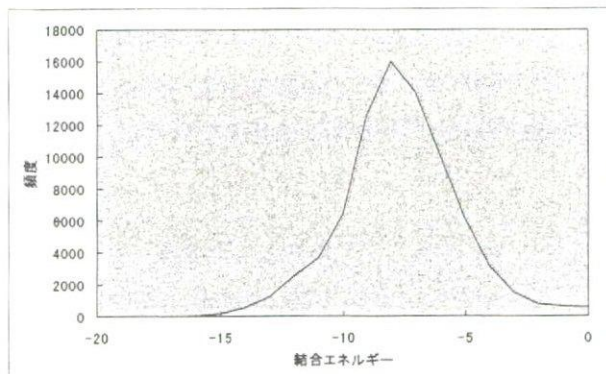


図5. 二量体活性部位をターゲットとして約8万個の低分子化合物に対して行ったドッキングシミュレーションで得られた結合エネルギーの分布。X線結晶構造は1HVR。

ドッキングシミュレーションでは、確率的な探索アルゴリズムを用いており、用いる乱数列によって得られる結合エネルギー値が異なることがある。本研究では、同じ探索パラメーターセットを用いて異なる乱数列で同じ計算を再度実行した。結合エネルギーの分布は、1回目と2回目でほとんど同じだった。2回の計算でどちらの回でも上位150位以内に含まれていた低分子化合物の数は、116個であった。つまり、77% (=116/150 x 100) の低分子化合物は共通に上位に含まれていた。

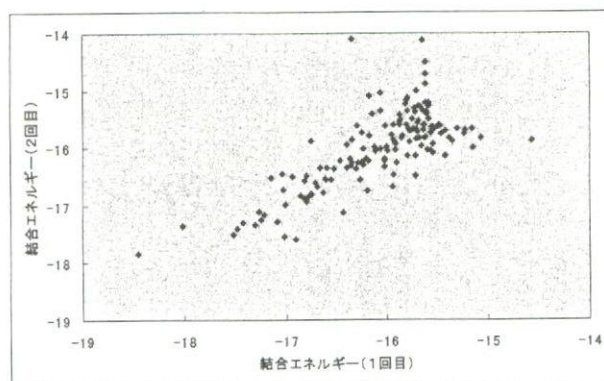


図6. 二量体活性部位をターゲットとして行ったドッキングシミュレーションで得られた上位150個の低分子化合物の結合エネルギー1回目 vs. 2回目。X線結晶構造は、1HVR。

次に、1HVRに対するドッキングシミュレーションで得られた結合エネルギーと、異なるX線結晶構造である1HPVに対して得られたものを比較した。1HVRと1HPVを用いて結合エネルギーを算出しそれぞれ順位を求めた。順位が両方の計算において150位以内だった低分子化合物は41個だった。つまり、異なるX線結晶構造を用いた場合共通に上位150位以内に入る割合は、27.3% (=41/150 x 100) だった。この同じタンパク質でも結晶構造が異なるとスクリーニングで上位に来る化合物リストが大きく異なるということは、適した結晶構造を選出する、もしくは、ドッキングシミュレーションの前に結晶構造を改善する必要があることを示唆している。

単量体に結合し二量体化を阻害する候補低分子化合物の探索を行った結果得られた結合エネルギーの

分布を図7に示す。二量体の活性部位へのドッキングでは、結合エネルギーが-10より低いものが比較的多かったが、今回の単量体へのドッキングではそれがほとんど見られなかった。もし計算が正しければ、単量体に強く結合する低分子化合物の発見は比較的困難かもしれない。しかし、異なる結晶構造の単量体を用いるとまた状況は異なるかもしれない。

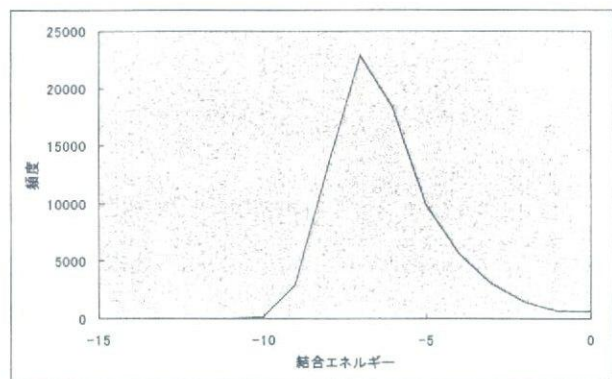


図7. 単量体とのドッキングシミュレーションで得られた結合エネルギーの分布。用いた構造は、1HPVのA鎖。

HIV感染系における抗HIV活性の評価はまだ進行中であるが、これまでに262個の低分子化合物に対する評価を行った。ほとんどの低分子化合物において全く抗HIV作用が見られなかった(図8)が、一部の低分子化合物において非常に弱い抗HIV作用が見られた(図9、図10)。

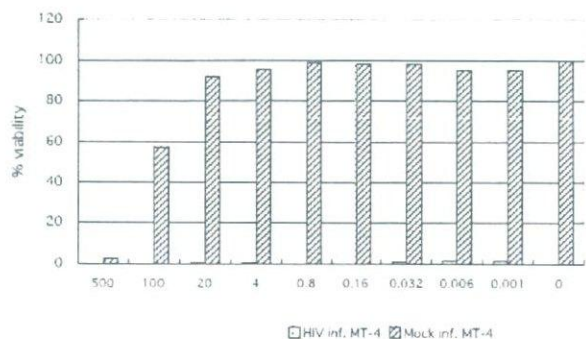


図8. 抗HIV作用がみられない検体の例。HIV感染細胞は全く生存していない。

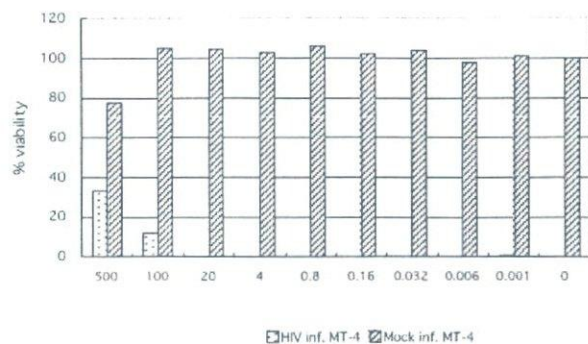


図9. HIV感染細胞が絶滅はしておらず、わずかに抗HIV作用が見られる検体の例。

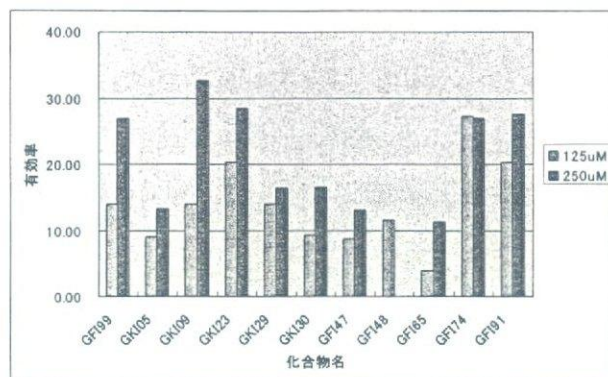


図10. 有効率が10%を越えた検体。

その中でも比較的抗HIV作用が高いと考えられる低分子化合物の一つ(GK109)は、濃度が250uMで有効率32.6%、125uMで有効率14.0%だった。これらは、サキナビル等の基質アナログとは異なる骨格をもつ低分子化合物だった。

D. 考察

HIV感染細胞系で感染による細胞の死滅を抑制する低分子化合物を見つけることは比較的困難な問題かもしれない。なぜなら、プロテアーゼの酵素活性をほぼ完全に阻害しなければ、ウィルスの増殖を食い止めることができないと考えられるからである。弱い抗HIV活性は認められたものの、HIV-1プロテアーゼの触媒機能を阻害しているかどうかは、未検証であり、今後検証する必要がある。また、抗HIV活性がみられた低分子化合物でも有効率が50%を超えていないので、今後は、弱い抗HIV活性を持つ低分子化合物に対して官能基の置換等を行って最適化を試みる。また、in silicoスクリーニング法の改良を行って、改良した手法を用いて繰り返し薬剤探索

を行う予定である。本年度は、分子量が 350 より小さい化合物に対してスクリーニングを実行したが、非常に弱い活性のものしか見つけることができなかった。HIV-1 プロテアーゼ阻害薬として承認されている薬剤の分子量は比較的大きいことから、より大きな低分子化合物に対して探索を行うことが有効かもしれない。

E. 結論

論理的創薬手法により、抗 HIV 活性が期待できる低分子化合物をリストアップし、HIV 感染細胞系でその抗 HIV 活性を検証した。ほとんどの低分子化合物において全く抗 HIV 活性が見られなかったのに対し、一部の低分子化合物において非常に弱い抗 HIV 活性が見られた。これらの低分子化合物の作用機序については、さらなる検証が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし。
2. 学会発表
該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社