

平成18年度厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H18-エイズ-若手-003

電算機的アプローチを活用した RNaseH 活性を標的とする HIV-1 複製阻害剤開発に関する研究（若手育成型）

総括・分担研究報告書

平成19年3月

主任研究者 駒野 淳

国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

## 研 究 組 織

研究者名	所属	役職
駒野 淳	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
星野 忠次	千葉大学・大学院薬学研究院・薬品物理化学研究室	助教授

## 目 次

### I. 平成18年度 総括研究報告書

#### 総括研究報告書

主任研究者: 駒野 淳 (国立感染症研究所・エイズ研究センター) ..... 1

### II. 平成18年度 分担研究報告書

1 小分子化合物ライブラリーからの HIV-1 逆転写酵素に内在する RNaseH 活性阻害剤  
のスクリーニング

駒野 淳 (国立感染症研究所・エイズ研究センター) ..... 7

2 RNase H 阻害剤先導化合物の酵素-化合物相互作用の電算機的解析に関する研究

星野忠次 (千葉大学・大学院薬学研究院・薬品物理化学研究室) ..... 17

III 平成18年度 業績一覧 ..... 29

IV 平成18年度 刊行物別刷 (抜粋) ..... 31

# **I. 平成 1 8 年度 総括研究報告書**

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
総括研究報告書

研究課題：電算機的アプローチを活用した RNaseH 活性を標的とする HIV-1 複製阻害剤開発に関する研究（若手育成型）

課題番号：H18-エイズ-若手-003

主任研究者：駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第3室 主任研究官）

当該年度は3年計画の1年目にあたる。

#### 研究要旨

研究開始から20年を経過した現在でも有効な治療・予防エイズワクチンはなく、早急な実用化も困難が予想される。ワクチン完成までの間、多剤耐性ウイルスに対抗するためには、これまでの薬剤とは異なる作用機序の新規抗エイズ薬の開発が急がれている。本研究では、次世代抗エイズ薬として、逆転写酵素(Reverse Transcriptase;RT)に内在するRNaseH活性を阻害するエイズ治療薬の開発を目的とする。本年度は2万種類のケミカルライブラリーの中から構造の異なる複数のRNaseH阻害剤リードを同定し、電算機的解析にて阻害剤が酵素の活性中心に配位する可能性を示した。構造—機能相関をえるため類似体の検索を行い、RNaseH阻害剤としての基本骨格が徐々に明らかとなってきた。特に先導化合物に由来する最適化合物に抗HIV活性が検出されたことは特筆に値する。進捗状況としては、1年目の研究計画を着実に終了し、2年目の研究計画にすでに着手している。実験データと電算機解析を同時並行して行うことにより、短時間で薬剤最適化の方向性が明瞭に示されたことは非常に意義深い。

分担研究者（1名）

星野 忠次（千葉大学・大学院薬学研究院・物理化学、助教授）

な深刻な社会経済構造の破綻をきたす事態が懸念される。これに対して迅速に実現可能で有効な対応策の一つは新規抗HIV薬の開発を強力に推進することである。

#### A. 研究目的

エイズ患者/HIV-1感染者の救済は厚生労働省に求められる重要な緊急課題の一つである。日本のHIV-1感染者は増加の一途をたどっている。近年、多剤併用化学療法に抵抗性を示す薬剤耐性ウイルスが世界的に蔓延の兆しを見せており、日本も例外ではない。これが放置されると、エイズが日本に深く浸透し、アフリカ諸国に見られるよう

新規抗HIV薬開発が重要である3つの主な理由は、（1）ワクチン開発の早急な実現が困難であること、（2）既存の抗エイズ薬と併用により効果増強が期待できること、（3）既存の薬剤耐性ウイルスに対しても治療効果が期待できるためである。HIV-1の逆転写酵素が持つRNaseH活性の阻害剤は未だ実用化されていない。我々は3年間の開発期間中に電算機によるタンパク質立体構

造解析手法を有効に活用し前臨床試験施行に値する RNaseH 活性阻害剤先導化合物を供給することを目標に掲げる。

電算機の活用には高度に専門的な知識と経験が必要とされる。我々は HIV-1 プロテアーゼの薬剤耐性における電算機シミュレーションで実績のある千葉大学薬学部の星野博士と共同して電算機アルゴリズムの開発、改良、薬剤デザイン、および合成を推進する。また国立感染症研究所エイズ研究センターの杉浦・武部両博士を協力研究者に迎え、薬剤耐性ウイルスとアジアで流行するウイルスに対する薬効を解析する（研究開発組織の概要図を参照）。

平成 18 年度 多検体を短時間で検査する RNaseH 活性測定系を確立し、2 万種類の化合物ライブラリーから酵素活性阻害剤をスクリーニングする。並行してタンパク質の 3 次元立体構造をもとに酵素の活性部位と相互作用する小分子化合物を電算機的解析により選択しその酵素抑制活性を解析する。

平成 19 年度 電算機アルゴリズムと実験データの相互照合により、電算機的解析に信頼性を与えると同時に、先導化合物の合成、薬剤の最適化、阻害剤の作用機序解析、培養細胞に対する毒性 (TD50) 評価、培養細胞レベルでウイルス増殖を抑えるか (IC50) の評価を行う。

平成 20 年度 先導化合物の薬剤耐性ウイルス・アジアで流行するウイルス株に対する有効性、既存の薬剤との相乗効果を検証、薬剤耐性の機序を電算機的に検討し実験的に証明する（以上 RNaseH 阻害薬開発戦略のフローチャートを参照）。

## B. 研究方法

### <実験系樹立>

2 つの異なる実験系にて酵素阻害剤スクリーニングを行う。変成 PAGE で検出する系と、蛍光

シグナルの増加を保温可能な蛍光 ELISA リーダーにてリアルタイムでモニターする系をそれぞれ樹立する。酵素は大腸菌に発現させ精製した HIV-1 の異なる株（クレード C, B, AE, B'）由来の精製 his Tag RT を使用する。酵素量、プローブ量、反応溶液に含まれる塩濃度を変化させて、酵素反応の至適条件を検討する。

### <ランダムスクリーニング>

上記の系を使って既存の 300 万化合物の構造を代表する 2 万の小分子化合物ライブラリーから RNaseH 活性を阻害するものをスクリーニングして先導化合物を得る。

### <電算機シミュレーション>

BioMedCACHe, Glide, GOLD などのソフトウェアを使用し、protein data bank より DNA/RNA と結合した状態で立体構造解析された RNase H の構造を抽出し、スクリーニングした化合物の実験結果とシミュレーション結果を相互に比較して、最適な電算機アルゴリズムを選定する。

### <有機合成>

リード化合物の有機合成フローを作成し、純度の高い生物活性を有する化合物が精製できるかを確認する。精製過程を検証し、それをもとに最適化候補化合物の合成に供する。

### <ウイルス複製系の樹立>

リード化合物のウイルス複製への影響を簡便かつ迅速に測定する実験系樹立を行う。使用するのは CEM 細胞に SIV 由来の LTR promoter により転写される luciferase 遺伝子を持つ LuSIV 細胞のシステムと、MT-4 細胞に MLV 由来の LTR promoter により転写される luciferase 遺伝子をもつ MT-4 Luc について、それぞれ既存の抗レトロウイルス剤にて系が機能するかを検証する。

（倫理面への配慮）

本研究には該当しない。

## C. 研究結果

### <実験系樹立について>

環境中の RNase A などの混入により評価が困難となる可能性があったが、再現性のよい 2 種類の RNase H 活性評価系が樹立された。酵素反応速度が著しく速いため、酵素活性阻害を評価するためには反応条件の検討が鍵となった。

### <スクリーニングについて>

本スクリーニングにより、2 万種類の中から構造の異なる複数の RNase H 阻害剤を 3 ヶ月にて同定することができた。阻害効果のある化合物は、全体の 0.19% を占めた。最も効果の高い化合物について詳細を検討すると、これらは HIV-1 の異なる株 (クレード C, B, AE, B') 由来の RT に内在する RNase H 活性は IC<sub>50</sub> で 0.5 μM 以下であることが判明した。一方、MLV の RT に内在する RNase H 活性、大腸菌由来 RNase H、ヒト細胞抽出液中の RNase H 活性は阻害しなかった。化合物の構造類自体の解析にて、inhibitor の基本骨格が明らかとなったが、既存の RNase H 阻害薬と異なる構造であった。

### <電算機シミュレーション>

ドッキングシミュレーションは酵素活性とドッキングスコアに一定の相関をみいだすことができた。しかし、ある程度リード化合物の基本構造をシェアする一群の化合物においては酵素阻害活性 (スクリーニングデータ) と予測値の相関は必ずしも見出されなかった。リード化合物の酵素活性中心への配意は複数のシミュレーションアルゴリズムで予測されることから、ドッキングの位置予測は可能であることが示され、最適化にはそれを参考にした分子運動のゆらぎなどを取り入れ、限られた領域だけに的を絞った蛋白-小分子化合物相互作用シミュレーションが必要と考えられる。

### <有機合成>

最も有望なリード化合物について有機合成を試み、生物活性を有する化合物の合成に成功した。しかし、いまだ不純物の混入が懸念されており、さらなるプロトコール改善が求められる。

### <ウイルス複製系の樹立>

LuSIV と MT-4 Luc の系は両者とも非常に優れたウイルス阻害剤スクリーニング系であることが示され、リード化合物の抗ウイルス活性の評価および細胞毒性の評価に応用できることが明らかとなった。リード化合物は抗ウイルス活性を持っていなかったが、その修飾化合物が抗ウイルス活性をもつことが示された。

## D. 考察

1 年目の研究成果として、複数の HIV-1 株由来の RT の RNase H 活性を特異的に阻害するリード小分子化合物を複数同定した。電算機を利用した立体構造解析により、詳細な結合モデルを提示することができた。創薬における電算機予測の限界である予測の妥当性の検証を、生のスクリーニングデータの共有を同時期的に共有することにより克服し、迅速に信頼性の高い結合予測ができたことは意義深い。このデータをもとに、これらリード化合物を最適化し、RNase H を標的とした次世代抗エイズ薬の開発が期待できる。

特に、リード化合物の 1 次最適化により、抗 HIV-1 活性が検出されたことは意義深い。抗ウイルス剤開発にむけて確かな方向性で研究が進行していることを示しているからである。

1 年目から次年度計画まで踏み込むなど達成度は著しく高いと思われる。高水準の学術成果を提供できると期待できると同時に応用科学としての成果も十分期待される。分担研究者および協力研究者らと活発な議論を展開し、さらなる研究の迅速な展開につなげたい (平成 18 年度の主な

研究成果図を参照)。

#### E. 結論

2万種類ものランダムケミカルライブラリーより RNase H 活性を抑制する新たなクラスの阻害剤の先導化合物が迅速に同定され、データの共有により電算機的解析を並行して遂行することにより、構造機能相関が短期間のうちに明らかとなった。これにより迅速な最適化が可能と考えられる。新規作用機序を有する特異性の高い HIV-1 複製阻害剤の開発が期待される。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

分担報告書参照

##### 2. 学会発表 (抜粋)

分担報告書参照

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

あり

##### 2. 実用新案登録

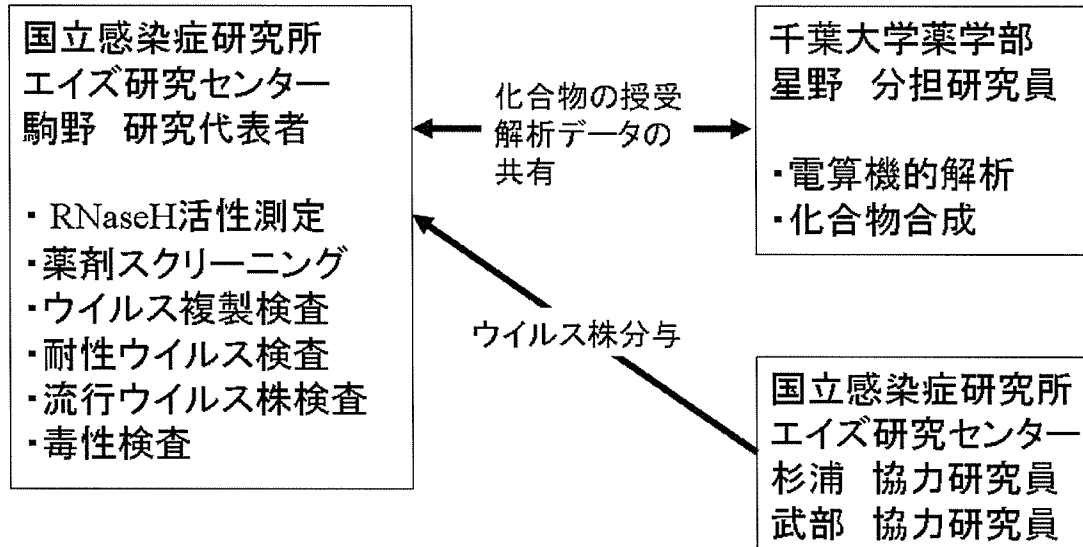
なし

##### 3. その他

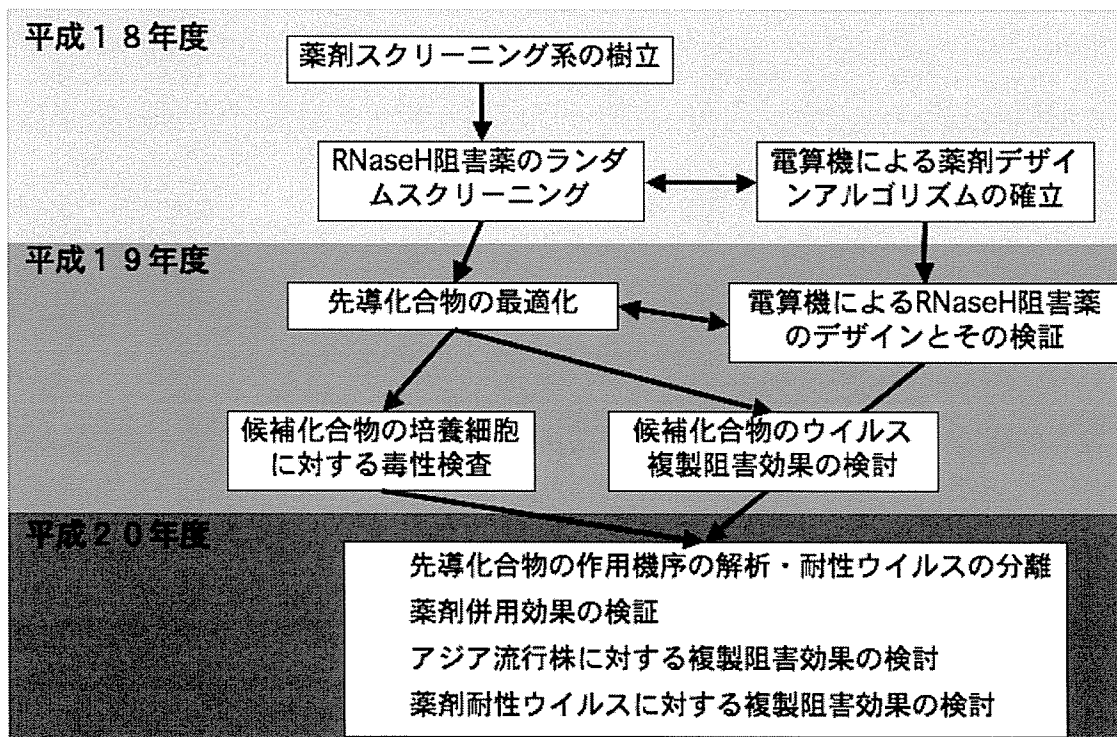
なし



## 研究開発組織の概要



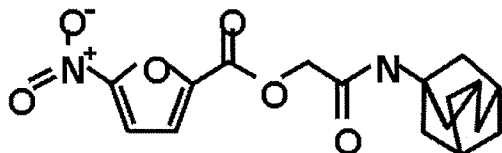
## RNaseH阻害薬開発戦略のフローチャート



# 平成18年度の主な研究成果

## 計画は着実に進行

### I. RNase H活性を阻害する先導化合物の同定



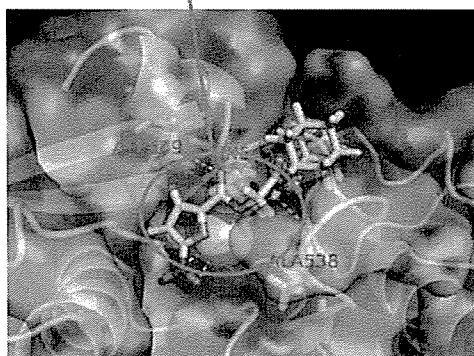
### II. スクリーニングデータによる 電算機アルゴリズムの最適化

先導化合物は活性中心に  
結合し、酵素活性を阻害

### III. 第一次最適化を終了

### IV. 抗ウイルス活性の検出

### V. 化学合成法の確立



## **II. 平成18年度 分担研究報告書**

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

研究課題：電算機的アプローチを活用した RNaseH 活性を標的とする HIV-1 複製阻害剤開発に関する研究（若手育成型）

課題番号：H18-エイズ-若手-003

分担研究課題：小分子化合物ライブラリーからの HIV-1 逆転写酵素に内在する RNaseH 活性阻害剤のスクリーニング

分担研究者：駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第3室 主任研究官）

### 研究要旨

300万種類もの既知の小分子化合物からランダムな構造を持つ特徴的化合物を2万種類選抜し、ケミカルライブラリーとした。本ライブラリーの中から構造の異なる複数の RNase H 阻害剤を同定した。阻害効果のある化合物は、全体の0.19%を占めた。最も効果の高い化合物について詳細を検討すると、これらは HIV-1 の異なる株（クレード C, B, AE, B'）由来の RT に内在する RNase H 活性は IC50 で 0.5 $\mu$ M 以下であることが判明した。一方、MLV の RT に内在する RNase H 活性、大腸菌由来 RNase H、ヒト細胞抽出液中の RNase H 活性は阻害しなかった。ヒット化合物には共通する構造が発見され、構造類似体の解析によって inhibitor の基本骨格が明らかとなった。既存の RNase H 阻害薬と異なる構造であったことから、新たなクラスの RNase H 阻害薬開発が可能と思われる。

#### A. 研究目的

世界保健機関（WHO）と国連合同エイズ計画は2005年度に世界の HIV 感染者の推計が過去最悪の4千万人に達し、死者の累積数が2500万人を超えたと発表した。今年 HIV に感染した人は490万人、死者は310万人で、感染者、新規感染者とも増加傾向に歯止めがかかっていない。我が国のエイズ禍は、輸血による「薬害エイズ」に始まったが、現在では異性間の性的接触が主たるウイルス伝達ルートになりつつある。平成17年度に日本の HIV 感染者は1万人を超えた。先進諸国の中で患者数の減少が見られないのは日本だけである。

エイズ克服のため、我が国ではワクチンとエイズ

治療薬の開発が行われている。治療・予防ワクチンの数年先の実用化は困難と考えられている。一方、抗ウイルス剤は既にエイズ発症予防に一定の成果を挙げている。複数の抗ウイルス剤を同時に服用する多剤併用療法（HAART）の進歩により、エイズ死亡率は著しく減少した。そのため、エイズは「不治の病」から「コントロール可能な病」へと変化しつつある。しかし、患者から見れば依然「不治の病」であり、エイズウイルス感染者は HAART 療法の副作用に悩まされている。このためエイズ患者/HIV 感染者の救済は厚生労働省に求められる重要な緊急課題の一つである。

近年 HAART 療法が効かない薬剤耐性ウイルスが蔓延の兆しを見せている。このままでは、既存の

薬剤のみで薬剤耐性ウイルス感染者を救済することは困難となろう。ワクチン開発が困難な現実に対処していることを鑑みると、現況に速やかに対応する手段は、作用機序が既存のメカニズムと異なる新規抗 HIV 薬の開発であることは明らかである。その理由は、既存の抗エイズ薬と併用により効果増強が期待できることと、既存の薬剤耐性ウイルスに対しても治療効果が期待できるからである。未だ阻害剤が実用化されていない HIV 酵素は、インテグラーゼと逆転写酵素に内在する RNaseH 活性である。我々は電算機によるタンパク質立体構造解析手法を有効に活用し、開発が遅れている RNaseH を標的とする HIV 複製阻害剤の開発に貢献することを最終目的とする。日本発の抗エイズ薬開発は日本のエイズ患者を救済するだけでなく、多大な国際貢献が期待できる。薬剤の市場流通による経済効果も甚大であり、停滞した日本経済の活発化にも繋がると期待できる。

## B. 研究方法

<実験系樹立>逆転写酵素の RNaseH 活性を簡便かつ迅速に多検体を測定する実験系を樹立する。1〜2次スクリーニングのための Assay 系は、末端を FAM 蛍光標識した合成 RNA と合成 DNA を等量アニールさせて DNA/RNA heteroduplex を得る。これを基質とし、酵素反応により分解した RNA 断片を変性 PAGE で検出する (図 1)。3次スクリーニングのための Assay 系は、末端を FAM 蛍光標識した合成 RNA と末端を蛍光阻害物質 TAMRA または BHQ で標識した合成 DNA を等量アニールさせて DNA/RNA heteroduplex を得る。これを基質とし、酵素反応により分解して増加する蛍光シグナルを保温可能な蛍光 ELISA リーダーにてリアルタイムでモニターする (図 2)。

酵素は大腸菌に発現させ精製した HIV-1 の異なる株 (クレード C, B, AE, B') 由来の his Tag RT

(約 0.5U/ $\mu$ l) を使用する。酵素量、プローブ量、反応溶液に含まれる塩濃度を変化させて、酵素反応の至適条件を検討した。

<ランダムスクリーニング>上記の系を使って既存の 300 万化合物の構造を代表する 2 万の小分子化合物ライブラリーから RNaseH 活性を阻害するものをスクリーニングして先導化合物を得る (図 3)。実験効率を上げるため、5つの化合物をプールにして 1 次スクリーニングし、2 次スクリーニングにて 5つのうちのどの化合物に活性があったのかを同定した。酵素阻害の有無はそれぞれ 2 回の酵素反応にて再現性を確認して判断した。また 3 次スクリーニングでは上記と異なる実験系で酵素阻害活性が検出されるかをテストし、陽性的場合これを先導化合物とした。酵素阻害活性の強さは、分解産物と基質の量比または蛍光シグナルの増大率にてスコアした。

## <1〜2次スクリーニングの詳細>

### 1. 尿素含有変性 PAGE 用のゲル作製

1×TAE16.5ml を 50ml チューブに入れ、そこに Urea1.2g を溶かした。さらに 40% Acrylamide/Bis Solution を 13.5ml 加えた。静かに転倒混和して十分に混ぜたら、APS を 0.018g 精密天秤で計り、加え、静かに転倒混和した。十分に混ぜたら、TEMED を 0.03ml (30 $\mu$ l) 加え、転倒混和し、ゲル板に流し込んだ。その後コームをさし、乾燥防止のために MilliQ で湿らせたペーパータオルを被せ、その上に重しを乗せて 1 時間以上放置した。

### 2. Probe の調製

用いた基質は、合成 DNA (5'-TCTGGTCTAACCAGAGAGACC-3') と 3' 末端を緑色蛍光標識した合成 RNA (5'-GGUCUCUCUGGUUAGACCAGA-3') を TE Buffer にて 1mM に調製したものから、各 1.5 $\mu$ l ずつ 147

$\mu\text{l}$ の TE Buffer に混和し、 $95^{\circ}\text{C}$ 、5 分間温めて  $4^{\circ}\text{C}$ 、Over Night で冷やして、アニールさせた Heteroduplex 使用した。

### 3. RT について

用いた RT は、his Tag がついた HIV-1 BaL あるいは Indie C 由来の RT p66/p55 精製酵素( $\sim 500\text{ng}/\mu\text{l}$ )を使用した。これは、RT 活性として約  $5\text{U}/\mu\text{l}$  の精製標品である。

### 4. 反応の Set Up

a. 酵素の最適反応時間を決定するために、一定酵素量、 $37^{\circ}\text{C}$ で 5 分、15 分、30 分、60 分と反応時間を変えた。

b. 最適酵素量を決定するために、酵素  $1\mu\text{l}$  を 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍と希釈し、 $10\mu\text{l}$  の反応系に  $1\mu\text{l}$  加え、各  $37^{\circ}\text{C}$ 、60 分で反応させた。

c. Chemical を溶かしている溶媒の影響を調べるために、反応 Buffer の濃度を変えての実験をした。IP Buffer については、 $10\mu\text{l}$  の反応系に IP Buffer を 10% 加えた場合と 25% 加えた場合と DMSO を 25% 加えた場合で実験を行った。

### 5. Chemical の調製

Chemical を DMSO にて  $10\text{mM}$  に調製されたものを Stock とした。これを IP Buffer に 5 種類の Chemical を各  $3\mu\text{l}$  混合し、Five Chemical Pool(最終濃度各  $400\mu\text{M}$ )とした。

### 6. 小分子化合物のライブラリースクリーニングの反応 Set Up

RT  $0.06\mu\text{l}$  と ATP( $10\mu\text{M}$ ) $1\mu\text{l}$  を RT Buffer  $3.94\mu\text{l}$  に溶解し、全量  $5\mu\text{l}$  とした。そこに溶かした Chemical  $2.5\mu\text{l}$  を最終濃度  $100\mu\text{M}$  になるように混合し、さらに基質  $2.5\mu\text{l}$  を加え  $37^{\circ}\text{C}$ 、60 分間反応させた。

### 7. 泳動

反応後、 $5\times$  Stop/Loading Buffer を  $2.5\mu\text{l}$  加え、反応を止めた。その後、4% 尿素含有 18% Polyacrylamide Gel(TAE Base)にて  $120\text{V}$ 、60

分で電気泳動した。

### 8. 緑色蛍光シグナルの検出

泳動後、Typhoon9400 (Excitation= $532\text{nm}$ , EmissionFilter= $526\text{SP}$ , PTM= $950\text{V}$ , Sensitivity=normal)にて緑色蛍光を検出した。

### 9. スクリーニング戦略

スクリーニングは、第 1 次、第 2 次に分割した。

・第 1 次は、Five Chemical Pool を RNase H Assay で使用し、Five Mix 中に含まれる RNase H 抑制作用を検出した。

・第 2 次は、第 1 次スクリーニングで陽性となった Five Mix を単独の Chemical に戻し、それらの抑制作用を同定した。

< 3 次スクリーニングの詳細 >

Parniak, M. A., K. L. Min, S. R. Budihas, S. F. Le Grice, and J. A. Beutler. 2003. A fluorescence-based high-throughput screening assay for inhibitors of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity. Anal Biochem 322:33-9. に詳述。

(倫理面への配慮)

本研究には該当しない。

### C. 研究結果

< 実験系樹立 > 効率的かつ再現性よく RNase H 阻害剤を検出する実験系が樹立された。1 日におよそ  $100\sim 200$  サンプルを処理し、約 3 ヶ月程度で 1-2 次スクリーニング (図 4、5) および 3 次スクリーニング (図 6) を行うことが可能となった。

< ランダムスクリーニング > 本スクリーニングにより、2 万種類の中から構造の異なる複数の RNase H 阻害剤を同定した。阻害効果のある化合物は、全体の 0.19% (38 個) を占めた。最も効果の高い化合物について詳細を検討すると、これ

らは HIV-1 の異なる株 (クレード C, B, AE, B') 由来の RT に内在する RNase H 活性は IC50 で 0.5microM 以下であることが判明した。一方、MLV の RT に内在する RNase H 活性、大腸菌由来 RNase H、ヒト細胞抽出液中の RNase H 活性は阻害しなかった。構造類自体の解析にて、inhibitor の基本骨格が明らかとなった。中でも最も頻度が高く現れた基本骨格を第一の先導化合物骨格として採用し解析を続けることとした (図 7)。2 番目に多くみられた阻害剤骨格も含め、これらの分子骨格は既存の RNase H 阻害薬とは異なる構造であり、新たなクラスの RNase H 阻害剤となる可能性が指摘された。また、分子量が 350 を下回っており、更なる官能基の付加修飾による最適化を施しても細胞膜透過性が維持できると考えられ、経口投与可能な薬剤開発への可塑性を十分有していることが予測される。

#### D. 考察

本研究により、複数の HIV-1 株由来の RT の RNase H 活性を阻害する小分子化合物を複数同定した。大腸菌や近縁のレトロウイルスの RNase H 活性をも阻害しないことから、非常に特異性の高い阻害剤開発が期待できる。電算機を利用した立体構造解析をもとに、これらリード化合物を最適化し、RNase H を標的とした次世代抗エイズ薬の開発が期待できる。

#### E. 結論

2 万種類ものランダムケミカルライブラリーより RNase H 活性を抑制する新たなクラスの阻害剤の先導化合物が同定された。今後の最適化により、新規作用機序を有する特異性の高い HIV-1 複製阻害剤が開発される礎となることが期待される。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Futahashi Y, \*Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science*. 2006. In press.

2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex. *AIDS*. 2006. In press.

3) Miyauchi K, \*Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother*. 2006;17(4): 167-174

4) Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J, Hoshino T, Engelman DM, \*Matsuda Z. Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis*. 2006 Apr;59(2):77-84.

##### 3. 学会発表 (抜粋)

1) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi

- K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb). May 23-27, 2006. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY
- 2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb), Poster, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.
- 3) Miyauchi K, Curran R, Mathews E, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman DM, \*Matsuda Z. Alteration of intracellular transport of the envelope protein of HIV-1 by a shift in a helical phase within its membrane-spanning domain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.
- 4) Komano J. Characterization of neutralizing antibodies found in long-term non-progressors of Japanese hemophiliacs. 3<sup>rd</sup> Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS. Sep 7-9, 2006. Center for Disease Control Department of Health, Taiwan, R. O. C.
- 5) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of CDK9/Cyclin T complex (P-TEFb). 7<sup>th</sup> AIDS Seminar in Kumamoto, Kumamoto. Sep 21-22, 2006. Japan.
- 6) Komano J, Futahashi Y, Isogai M, Hamatake M, Matsuda Z, Shiino T, Takebe Y, Sato H, Yamamoto N. Drug Resistance Mutations in the Polymerase Catalytic Domain Negatively Affect the RNase H Activity of HIV-1 Reverse Transcriptase. 7<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA
- 7) Murakami T, Yasutomi E, Ablan S, Miyakawa K, Komano J, Matsuda Z, Freed EO, Yamamoto N. Detailed analyses of HIV-1 matrix mutants: Effects on an early stage of infection. 7<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA
- 8) 青木徹, 貝の瀬由成, 二橋悠子, 清水佐紀, 松田善衛, 山本直樹, 駒野淳. HIV-1 GagN 末端のミリスチン酸化非依存的な分子集合・出芽および VLP の性質に関する解析. 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋
- 9) 濱武牧子, 浦野恵美子, 花房忠次, 加藤真吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳. AIDS 長期未発症の HIV 感染血友病患者における高力価中和抗体の存在とその病期進行への寄与に関する解析. 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋
- 10) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹. 挿入変異を伴う多剤耐性 HIV-1 (CRF01\_AE) における薬剤耐性亢進のメカニ



ズムー薬剤耐性獲得における RNase H 活性の関与.  
第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21,  
2006. 名古屋

11) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや,  
藤義秀, 星野忠次, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 の  
逆転写酵素が持つ RNase H 活性に対する特異的阻  
害剤の開発. 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集  
会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

12) Komano J. Myristoylation independent  
assembly, transport, and VLP formation of  
HIV-1 Gag. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会.  
Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

13) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや,  
武部豊, 山本直樹. HIV-1 の逆転写酵素に内在す  
る RNase H 活性阻害薬の開発 (1) 一分子化合  
物ライブラリーからのスクリーニング. 第 2 0  
回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006.  
東京

14) 濱武牧子, 浦野恵美子, 花房忠次, 加藤真  
吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳.  
血友病患者におけるエイズ長期未発症症例にお  
ける高力価中和抗体の存在と標的部位の同定.  
第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2,  
2006. 東京

15) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子,  
松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山  
本直樹. HIV-1 逆転写酵素 polymerase active

site への薬剤耐性変異が誘導する RNase H 活性の  
低下と耐性亢進への寄与. 第 2 0 回日本エイズ  
学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

16) Jun Komano. Broadly reactive strong  
neutralizing antibody against HIV-1 in  
long-term survivors of HIV-1-infected  
haemophiliacs. The US-Japan Cooperative  
Medical Science Program 19th Joing Meeting of  
AIDS Panel. Dec 6-7, 2006. Kagoshima, Japan

17) 駒野淳. HIV-1 複製制御の分子メカニズムとエ  
イズ治療法への展望. 造血幹細胞移植と感染症対  
策. Feb 03, 2007. 東京

18) Jun Komano et al. Broadly reactive strong  
neutralizing antibody against HIV-1 in  
long-term survivors of HIV-1-infected  
haemophiliacs. Keystone symposia, HIV vaccine  
and molecular and cellular determinants of HIV  
pathogenesis. Mar 25-30, 2007. Whistler,  
British Columbia, Canada

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

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

# 化合物ライブラリー

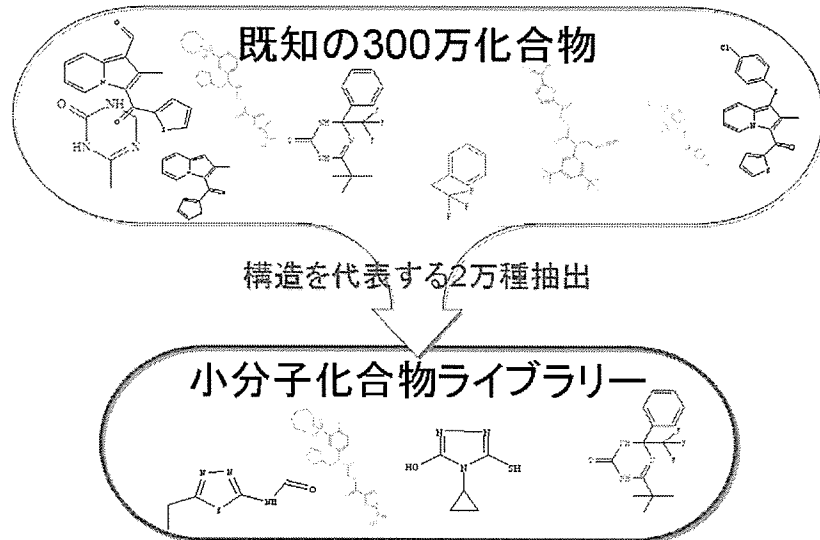


図 1

# 1-2次 Screening



Urea変成ゲル  
電気泳動

図 2

# 3次 Screening

RNaseH抑制作用のあるChemical を異なるpolymerase-independent RNaseH assay systemにより検証する。

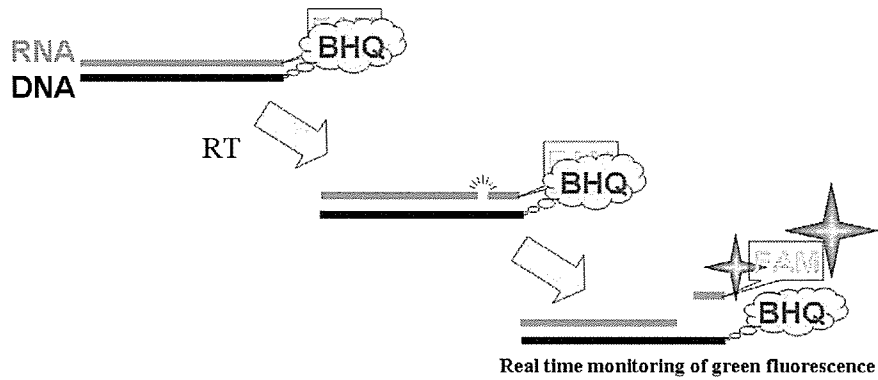


図 3

## 1次Screening結果の一例

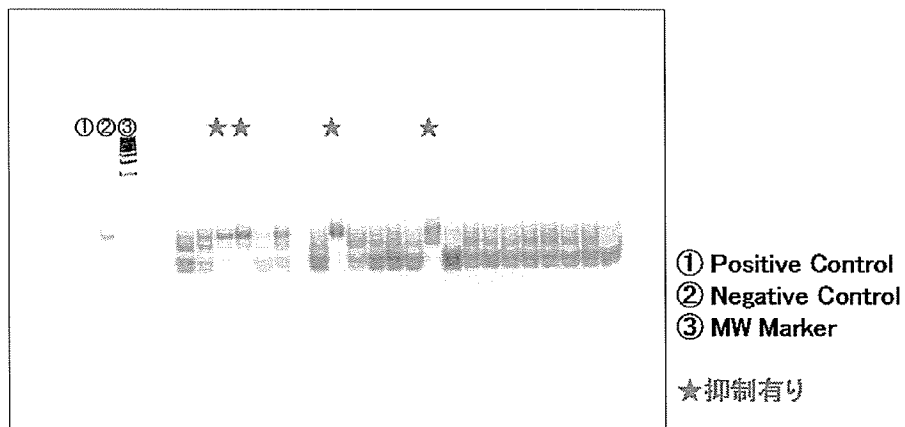


図 4

## 2次Screening結果の一例

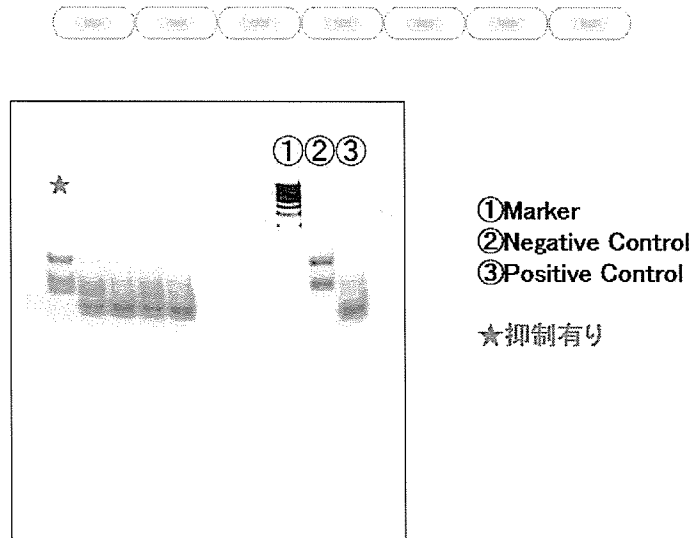
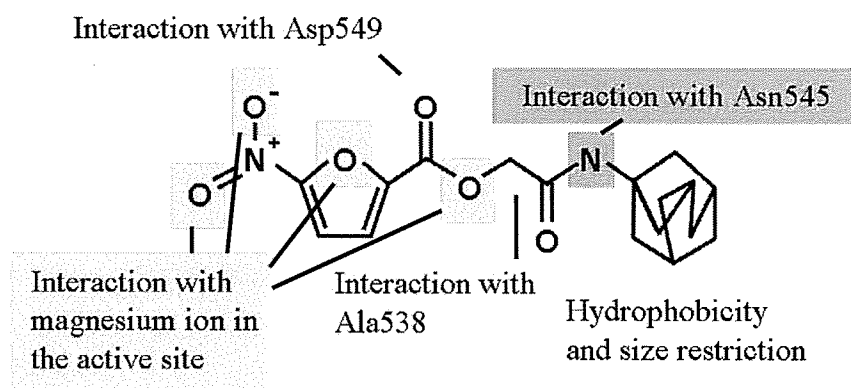


図 5

## リード化合物の構造-機能関連に関する考察



先導化合物と酵素は多くの相互作用を介して結合している

図 6