

平成19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20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	准教授

目 次

I. 平成19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19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とリード化合物の抗ウイルス作用の解析

駒野 淳 (国立感染症研究所・エイズ研究センター) 5

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) 13

III. 平成19年度 業績一覧 25

IV. 平成19年度 刊行物別刷 (抜粋) 29

I. 平成19年度 総括研究報告書

平成19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2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。本年度は平成18年度に同定された複数の RNase H 阻害剤リードの詳細な抗ウイルス作用の解析と電算機的解析をもとにした pharmacophore を参照して誘導体デザインと合成戦略の作出を行った。その結果、電算機プログラムの改良による docking simulation の質の向上が認められ、抗 HIV-1 活性は検出されなかったリード化合物から得られた誘導体の中から培養細胞におけるウイルス複製系において X4-/R5-tropic HIV-1 双方に対する抗 HIV-1 活性を持つものを同定した。進捗状況としては、2年目の研究計画は着実に進行しており、本研究の目的である「実験データと電算機解析を同時並行して行う研究開発戦略」が創薬において非常に効果的であることが裏付けられた。

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、准教授）

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。(研究開発組織の概要図を参照)。

平成 18 年度 多検体を短期間で検査する 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 RNase H 阻害薬開発戦略のフローチャートを参照)。

B. 研究方法

＜抗ウイルス活性評価について＞

抗ウイルス活性と細胞毒性の双方を一度に多種類の化合物についてスクリーニングする系の構築をヒト T 細胞株 MT-4 と X4-tropic HIV-1 を使用して行った。有用な候補化合物についてさらにウイルス抗原を直接的に検出する評価系にて

HIV-1 増殖抑制能について評価を加えた。

＜電算機シミュレーション＞

GOLD による docking simulation 結果をもとに局所の熱力学動態および水分子等を配位した状況を再現し、in vivo に近い条件下での安定な薬物酵素相互作用の simulation を行った。このため新規プログラム *Orientation* を開発し評価した。

＜薬剤最適化および有機合成戦略＞

昨年度のリード化合物合成手法と docking simulation を参照して HIV-1 RT に特異的な新規 RNase H 阻害剤のデザインおよび合成戦略の構築を行った。

(倫理面への配慮)

本研究には該当しない。

C. 研究結果

＜抗ウイルス活性評価について＞

スクリーニング系「MT-4 Luc」は良好に機能し、短期間で数百の化合物の抗ウイルス活性及び細胞毒性評価を行うことについて、これを著しく容易にした。この系を使用して先導化合物から得られた誘導体に抗 HIV-1 活性を有するものを同定した。

＜電算機シミュレーション＞

新規電算機アルゴリズム *Orientation* は既存の acetylcholin esterase およびその阻害剤モデルにて良好な予測値を導出することが示された。これをもとに先導化合物およびその誘導体が HIV-1 RT の RNase H ドメインの活性部位に水素結合様式ならびに疎水相互作用様式を取ること、活性中心にある Mg²⁺イオンとキレートするような形で結合すること、RNA 中のリン酸基が Mg²⁺イオンに配位するのを阻害することで活性を示すことが示唆された。

＜有機合成＞

上記計算結果をもとに新規化合物がデザイン

され、その有機合成経路が考案された。現在それらの合成を若干の改良等を加えながら実際に候補化合物の合成を展開している。

D. 考察

本研究は電算機 simulation を「確立した手法」として単に依存するのではなく、実際のスクリーニングデータ等との密な解析結果のフィードバックを行う事により計算科学の妥当性を常に評価しつつ実験を展開する特徴がある。この特徴を生かすことにより、研究開始時に存在しなかった RNase H 阻害剤が研究計画が始動して 2 年目の研究成果として複数提示され解析されるに至った。これは、本研究計画の妥当性を強く支持するものであり非常に有意義と思われる。Docking simulation も新規プログラム開発により、より詳細な結合モデルを提示することができた。これもプログラミングを実際に行う能力を有している当研究グループならではの研究成果であろう。これらのデータをあしがかりとして、リード化合物にさらに最適化を施し、HIV-1 RT 特異的な RNase H を標的とした次世代抗エイズ薬のデザインが可能となることが期待される。

当初計画された 2 年目の年度計画はほぼ達成された。しかし、再度複数回にわたる最適化サイクルを行う事は著しく高い抗 HIV-1 活性を持つ特異性の高い化合物を得るために必須であると思われる。

一方、ウイルス複製抑制の実験方法や電算機アルゴリズムは本研究に用いるだけでなく、HIV-1 研究領域にとどまらず他の多くの生命科学・医学研究に活用することにより、高水準の学術成果を短期間にえられるであろう。

E. 結論

複数の RNase H 阻害剤先導化合物の詳細な抗ウ

イルス作用の解析と電算機的解析をもとにした pharmacophore を参照して誘導体デザインと合成戦略を創出した。電算機プログラムの改良による docking simulation の質の向上が認められ、抗 HIV-1 活性は検出されなかったリード化合物から得られた誘導体の中に培養細胞におけるウイルス複製系において抗 HIV-1 活性を持つものを見いだした。本研究の目的である「実験データと電算機解析を同時並行して行う研究開発戦略」が創薬において非常に効果的であることが実際に裏付けられた。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

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

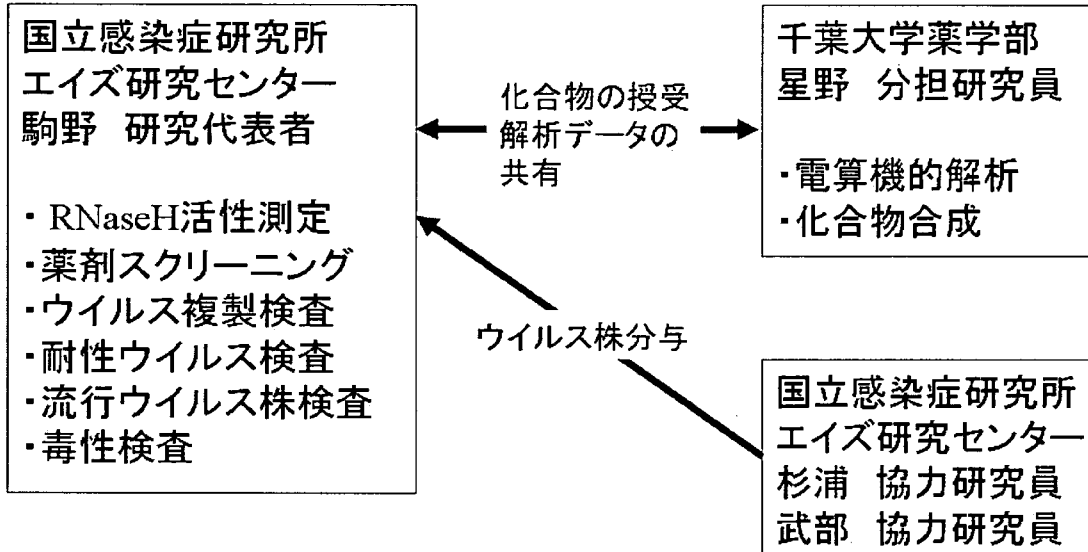
2. 実用新案登録

なし

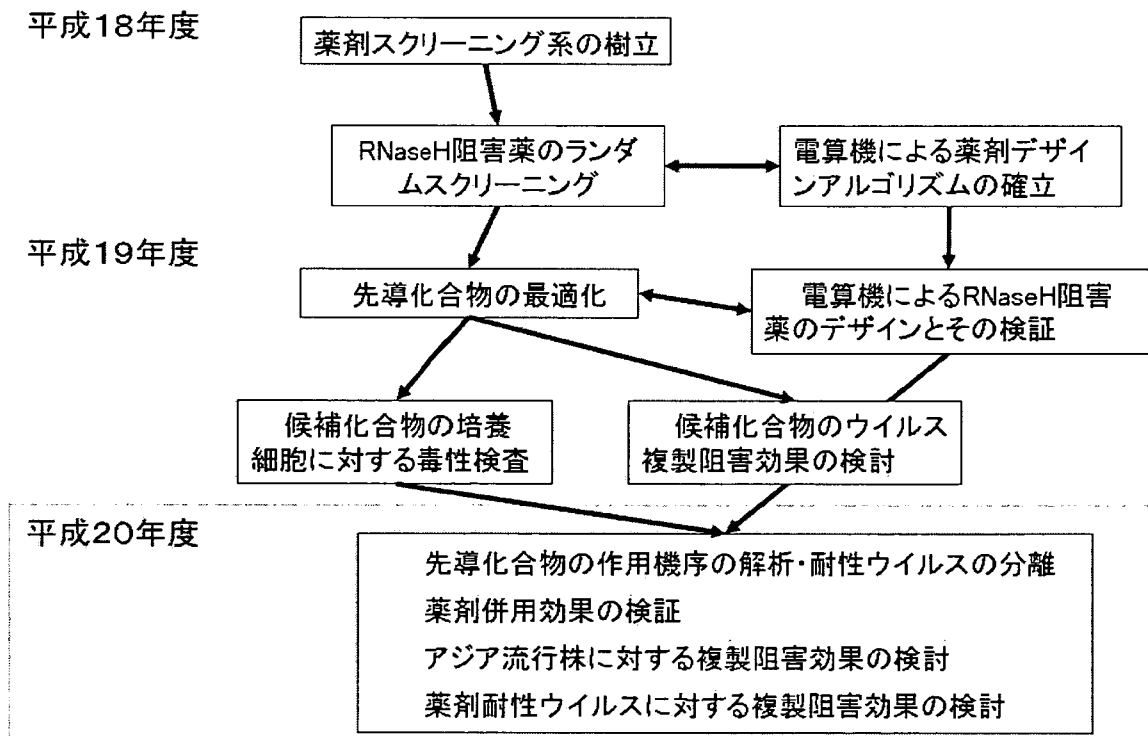
3. その他

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



II. 平成19年度 分担研究報告書

平成19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 RNase H 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 RNase H 活性阻害剤のスクリーニングとリード化合物の抗ウイルス作用の解析

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2万種類選抜したケミカルライブラリーの中から得られた RNase H 阻害剤リード化合物について詳細な解析を進めた。本年度はリード化合物をもとに合成された修飾化合物に関する細胞系における抗 HIV-1 活性を評価するために、high-throughput anti-HIV-1 activity screening system を開発し、これをもとに候補化合物の抗 HIV-1 活性を解析評価した。さらに有望な化合物については直接ウイルスの抗原をもってウイルス複製を測定する ELISA 系にて抗 HIV-1 活性を検索した。その結果、もともと抗ウイルス活性のなかったリード化合物から X4-tropic および R5-tropic ウイルスに対する抗 HIV-1 活性をもつ小分子化合物が得られた。本化合物は既存の RNase H 阻害薬と異なる構造であり、新たなクラスの RNase H 阻害薬開発が可能であると思われた。

A. 研究目的

HIV 感染者およびエイズ患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。世界の HIV 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。我が国は先進諸国の中で未だ患者数の減少が見られない国のひとつである。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が、治療・予防ワクチン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。しかし、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おり、近い将来既存の薬剤のみ

で感染者の救済は困難となることが懸念される。

現況に対応する手段の一つ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。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 RNase H 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。

昨年度までに、我々は2万種類ものランダムケミカルライブラリーより RNase H 活性を抑制する既存の RNase H 阻害剤とは異なる構造を持つ新たなクラスの阻害剤の先導化合物を同定した。本年度はリード化合物をもとに合成された修飾化合物に関する細胞系における抗 HIV-1 活性を評価するために、high-throughput anti-HIV-1 activity

screening system を開発し、これをもとに候補化合物の抗 HIV-1 活性を解析評価した。さらに有望な化合物については直接ウイルスの抗原をもってウイルス複製を測定する ELISA 系にて抗 HIV-1 活性を検索した。

B. 研究方法

<ハイスループット抗 HIV-1 薬剤試験系樹立>

ヒト由来の T 細胞株 MT-4 に MLV ベクターにて firefly luciferase 発現ユニットを導入する。MLV ベクター作製は Komano et al., Mol Biol Cell 2004 に詳述。発現プロモーターは MLV LTR を使用した。1x10⁵ の細胞に対し、1ml の MLV ベクターを感染させた。感染後 2 日目に limiting dilution を行い cloning した。Clone が恒常的に発現する luciferase を測定し、活性が高いものを数クローン選択し、HIV-1 感染への感受性および CPE の程度を検索すると同時に luciferase 活性の変化を測定した。系の樹立に際しては、96 well plate にてウイルス感染させる際に使用する細胞数、ウイルス量 (X4-tropic HXB2, p24 量にて)、luciferase 活性を測定するまでの培養日数を条件検討する。Luciferase 活性は Promega 社 Steady-Glo を使用し、Veritas luminescence detector により発光を検出した。

<リード化合物から合成展開された化合物における抗 HIV-1 活性のスクリーニング>

上記 MT4-Luc 系にて当初 in vitro で RNase H 活性を呈した化合物とそれを電算機モデリング等の情報をもとに得られた誘導体における抗 HIV-1 活性を解析した。陽性コントロールには integrase inhibitor lead compound を使用した。陰性コントロールには DMSO を薬剤と同様の希釈倍率にて用いた。

<ウイルス抗原を検出する系による抗 HIV-1 活性の検索>

MT-4Luc で有望と思われた限られた数の化合物について NP2CD4CCR5 で JR-CSF (R5 指向性ウイルス) の複製を、PBMC で NL4-3 (X4 指向性ウイルス) の複製をそれぞれ検索する。NP2CD4CCR5 では感染後 4 日後に細胞培養上清を回収して p24 を測定し、PBMC では適宜細胞を split してその際に得られる培養上清について p24 濃度を測定した。薬剤の陰性コントロールとしては溶媒に用いている DMSO を最も低倍率にて使用する高濃度の薬剤と同倍率で希釈したものを使用した。ELISA kit は Zeptometric 社の p24 検出系を利用した。

(倫理面への配慮)

本研究には該当しない。

C. 研究結果

<ハイスループット抗 HIV-1 薬剤試験系樹立>

MT-4 に luciferase を恒常的に発現させた MT-4Luc のクローンを数クローン樹立し、中でも HIV-1 感染後 CPE の発生が顕著で感染後 luciferase activity 低下が顕著なクローンを選択した。細胞数は 500 per well で round bottomed 96 well plate が最適であり、HXB2 を 100-1000pg/ml に調整したものを 25ul 感染に使用するのが至適な条件である事が判明した。ウイルスを感染させないレベルの luciferase 活性が抗 HIV-1 活性のないレベルとなる。本系では細胞毒性を luciferase activity の低下として抗ウイルス活性を計測するとき同時に評価する事が出来るという利点があることが示された (図 1)。

<リード化合物から合成展開された化合物における抗 HIV-1 活性のスクリーニング>

RNase H 活性を呈した化合物とそれを電算機モデリング等の情報をもとに得られた誘導体における抗 HIV-1 活性を解析したところ、始めに同定されたリード化合物である 215A7 には全く抗

HIV-1 活性が検出されず細胞毒性もなかったが、5a と#17 誘導体に抗 HIV-1 活性が検出された (図 2)。5a 誘導体は#17 誘導体よりやや強い抗 HIV-1 活性を検出したが、高濃度では明らかな細胞毒性をみとめた。#17 誘導体では 20 μ M 以下でやや弱い細胞毒性を認めた。これは細胞の代謝を検出する実験系においても同様の結果を得たため、#17 誘導体についてさらにウイルス抗原を検出する実験系における抗 HIV-1 活性を検討した。

<ウイルス抗原を検出する系による抗 HIV-1 活性の検索>

NP2CD4CCR5/JR-CSF システムでは#17 誘導体は濃度依存的な抗ウイルス活性を示し、その 50%ウイルス抑制濃度は約 12 μ M であった (図 3)。薬剤による細胞増殖抑制は TD50 にて 50 μ M 以上であった。PBMC/NL4-3 システムでは 25 μ M での抗ウイルス活性を評価した (図 4)。215A7 リード化合物ではやや抗ウイルス活性が検出された。しかし#17 誘導体は非常に強い抗 HIV-1 活性が検出された。薬剤による明らかな細胞増殖抑制は検出されなかった。

D. 考察

<ハイスループット抗 HIV-1 薬剤試験系樹立>

抗 HIV-1 効果をスクリーニングする評価系は迅速、安価、多検体処理能力に優れ、再現性が高いヒト T 細胞株を使用したものが理想的であり、細胞毒性の評価が合わせて可能である系は有用性が高い。ウイルスは複製しない psudotype virus を使う実験系と、replication-competent な molecular clone または primary isolate を使用する系があり、バイオリスクの面からは前者が、シグナルの robustness と multi-round 複製を評価できる意味では後者が重要である。我々は後者を選択し、X4-tropic virus のみを解析する事ができる系の樹立を目指した。細胞は PBMC, T cell line,

non-T cell line を使用する option があるが、再現性および扱いに優れ、かつ natural host である human T cell line をもとに系の構築をめざした。MT-4Luc 系は細胞毒性にて luciferase 活性が下がり、ウイルス複製がおこっても luciferase 活性が下がる事から、これらを同時に検出する事が出来る優れた実験系である。簡便性という点では操作ステップが少なく、96 well plate で screening するのに適した format である。Luciferase assay を利用する事によりウイルス不活化とシグナル検出を one step で行えるため、biosafety-wise にも優れた実験系となっている。HIV-1 感染によってシグナルする Lusiv 系と併用する事により特異性が高くなることが期待できる。

<抗 HIV-1 活性の検索>

in vitro の酵素活性阻害活性をもとに得られたリード化合物には抗 HIV-1 活性がなく、そこから電算機を利用した立体構造解析をもとに得られた化合物に細胞培養レベルで抗 HIV-1 活性が検出された事は最適化等の方向性が正しい事を示す重要な知見である。最も in vivo に近いと思われる PBMC にて抗ウイルス効果が検出された事は重要である。X4-/R5-tropic HIV-1 に関わらず抗 HIV-1 活性が示された事はその作用機序から十分推定された事ではあるが、有効性が限られたウイルス株だけではないことを実験的に示せた事は非常に重要な知見と思われる。215A7 リード化合物が MT-4Luc で抗 HIV-1 活性がほとんど検出されなかったにもかかわらず PBMC 系にて弱い抗 HIV-1 活性が検出されたのは、細胞の持つ細胞質からの薬剤排出能の違い等があたえる細胞内薬剤レベルの相違に基づくものと思われる。

逆転写酵素に内在する RNase H 活性阻害剤として前臨床レベルに到達した先導化合物は未だ存在しない。試験管内で RNase H 活性を抑制する化合物と

してはいくつかが発表されているが、その多くは HIV-1 への特異性を欠き細胞培養レベルで HIV-1 複製を阻害しない。HIV-1 複製抑制に対する RDS 1643 の EC50 は細胞培養レベルで 14 μ M と依然高濃度であり最適化と毒性緩和が求められる。我々の同定した誘導体#17 が持つ現在の抗ウイルス活性は IC50 が約 10-20 μ M と依然 RDS 1643 と同程度の濃度であり、実用化にむけて今後最適化による IC50 の低下が求められる。電算機モデリングを使用した効率よい薬剤デザインにより有望な誘導体合成が期待される。

E. 結論

本研究により、もともと抗ウイルス活性のなかったリード化合物から X4-tropic および R5-tropic ウイルスに対する抗 HIV-1 活性をもつ小分子化合物を得る事に成功した。本化合物は既存の RNase H 阻害薬と異なる構造であり、新たなクラスの RNase H 阻害薬開発が可能であると思われる。電算機シミュレーションを駆使し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) Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. (in submission)
- 2) Akihide Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi,

Hiromi Soedal, Shinichiro Hattori, Kilian Perrem, Mikio Yamamoto, Joh Chiba, Jun-ichi Mimaya, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, Mitsuo Honda, Akihiko Yoshimura, Ichiro Aoki, Yuko Morikawa and Naoki Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. (PNAS, in press)

- 3) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. CD63 and its mutants disrupt CXCR4 trafficking to the plasma membrane and inhibit T-cell tropic HIV-1 entry. (Traffic in press)
- 4) Matsuda Z, Iga M, Miyauchi K, Komano J, Morishita K, Okayama A, Tsubouchi H. In vitro translation to study HIV protease activity. Methods Mol Biol. 375: 135-49. 2007. Review.
- 5) Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnopat P, Dhepakson P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Tokunaga K, Sato H, Komano J, Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Ikuta K. Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. Biochem Biophys Res Commun. Aug 3; 359(3):729-34, 2007.
- 6) 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 negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. AIDS. Mar 12; 21(5):575-82, 2007.
- 7) 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 Sci. Mar; 98(3):373-9, 2007.

8) Murakami T, Gottlinger H, Morikawa Y, Komano J, Ryo A, Sato H. Regulation of Gag trafficking and functions (Review) The Journal of AIDS Research. 9(2); 102-107, 2007.

2. 学会発表 (抜粋)

海外

- 1) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, and Jun Komano, Upregulating expression of cyclin K/CPR4 limits the replication of HIV-1. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 2) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yoshiharu Miura, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. CD63 AND ITS MUTANTS INHIBIT FUSION OF CXCR4-CONTAINING VESICLES TO THE PLASMA MEMBRANE AND BLOCK X4 HIV-1 ENTRY. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 3) Toru Aoki, Saki Shimizu, Urano Emiko, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, and Jun Komano, RERouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV gag by replacing myristoylation signal with membrane proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 4) Kei Miyagawa, Tsutomu Murakami, Yuki Ohsaki, Jun Komano, Toyoshi Fujimoto and Naoki Yamamoto. Analysis of interaction between HIV-1 Gag and tip47 and its associated proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 5) Kosuke Miyauchi, Rachael Curran, Erin Matthews, Jun Komano, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, Donald M Engelman, and Zene Matsuda. the specific phase of membrane-spanning helix of hiv-1 gp41 is critical for intracellular transport of env. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 6) Jun Komano, Characterization of neutralizing antibodies purified from

Japanese LTNP hemophiliacs, US-Japan Cooperative Medical Science Program 20th Joint Meeting of the AIDS Panels September 13-14, 2007 & NHPM2007 Presentation at AIDS Panel: Sept 14, 2007, Monterey, CA

国内

- 1) 藤秀義、辰巳絢子、栗田明宙、駒野淳、星野忠次：コンピュータ支援による HIV-1 治療薬の開発。レトロウイルス研究会夏期セミナー2007 プログラム 2007 年、山梨県河口湖
- 2) 辰巳絢子、藤 秀義、高村 斉、駒野 淳、根矢三郎、星野忠次「HIV-1 の RNaseH 活性を阻害する薬物の設計と評価」日本薬学会第 127 年会要旨集-3, 54, 2007 年、富山
- 3) 濱武 牧子 駒野 淳 浦野 恵美子 巖馬華 中原 徹 堤 浩 宮内 浩典 森川裕子 玉村 啓和 杉浦 亙 山本 直樹. HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する 6 アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性. 熊本エイズセミナー 2007 年、熊本
- 4) 駒野 淳 浦野 恵美子 巖馬華 中原 徹 堤 浩 濱武 牧子 宮内 浩典 森川裕子 玉村 啓和 杉浦 亙 山本 直樹. HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する 6 アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年、札幌
- 5) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Cyclin K/CPR4 による HIV-1 複製抑制とそのメカニズムの解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年、札幌
- 6) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto and Jun Komano. Gag タンパク質の形質膜輸送シグナルがミリスチル化であることのウイルス学的意義について. 第 21 回日本エイズ学会学術集会, 2007 年、広島
- 7) 浦野 恵美子、奥長 造之、森川 裕子、駒野淳. Co-chaperone タンパク質 DNA J/HSP40 family による HIV-1 複製抑制. BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年、横浜

- 8) 浜武 牧子、二橋 悠子、青木 徹、山本 直樹、駒野 淳 . Biophysical analysis of homotypic interaction facets that mediate the clustering of the G-protein-coupled receptor CXCR4 in the absence of SDF-1alpha. BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年, 横浜
- 9) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto and Jun Komano. 非ミリスチル化 Gag を用いたレトロウイルス Gag の Vps 輸送経路を通過することによる影響およびそのウイルス学的意義. BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年, 横浜
- 10) 藤秀義, 浦野恵美子, 巖 馬華, 中原徹, 堤浩, 濱武牧子, 宮内浩典, 森川裕子, 玉村啓和, 杉浦 互, 山本直樹, 駒野淳, 星野忠次「ドッキングシミュレーションによる HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有するペプチドの分子設計」第 45 回日本生物物理学会 講演予稿集, S126 2007 年, 横浜
- 11) 辰巳絢子、藤秀義、駒野淳、根矢三郎、星野忠次. HIV-1 の RNaseH を標的とした新規抗 HIV 薬の設計・評価・合成、日本薬学会第 128 年会, 2008 年

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

MT-4 Luc system

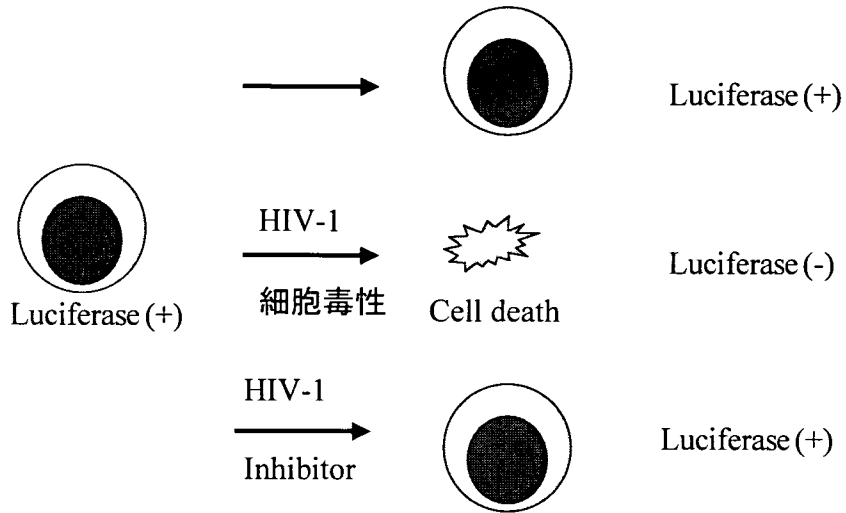


図 1

構造類似体の抗HIV-1活性

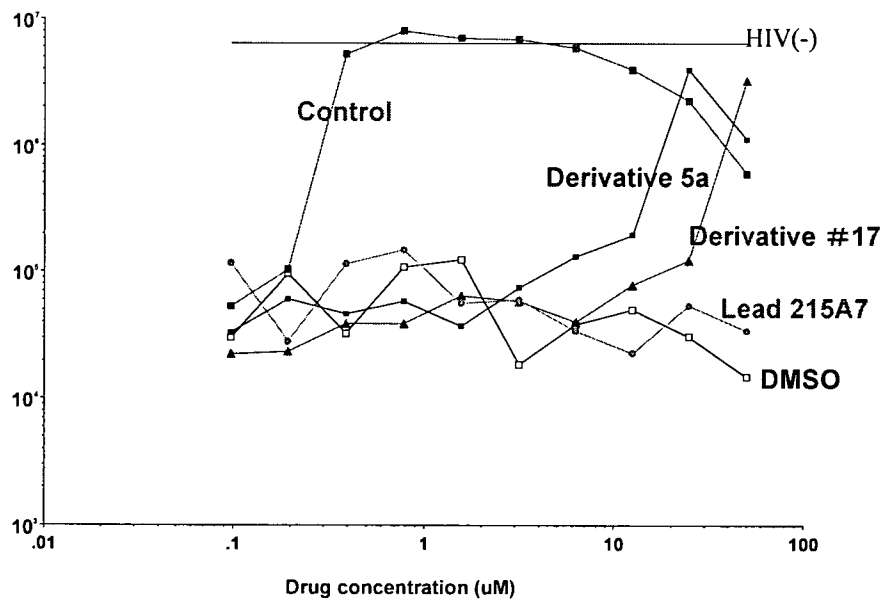
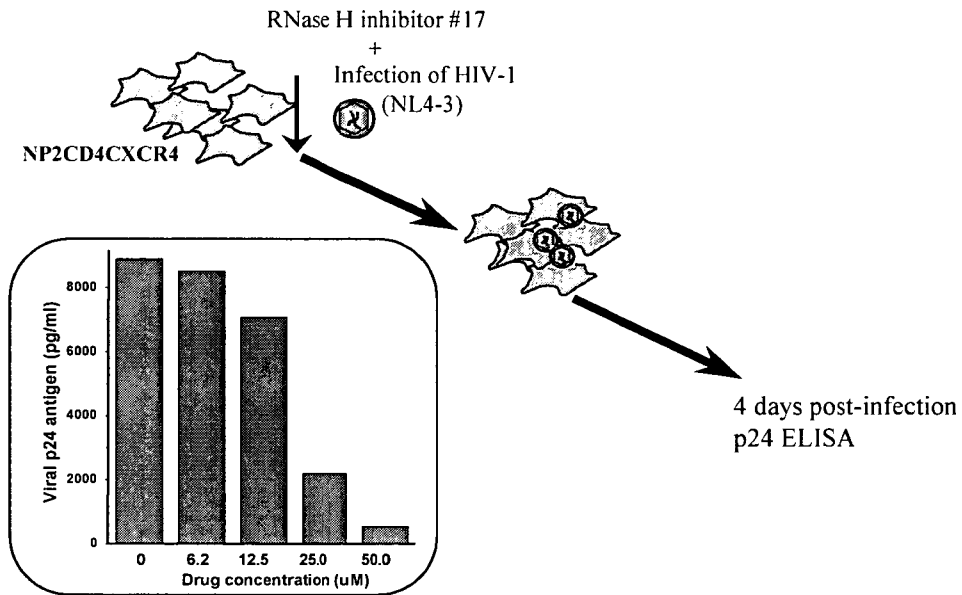


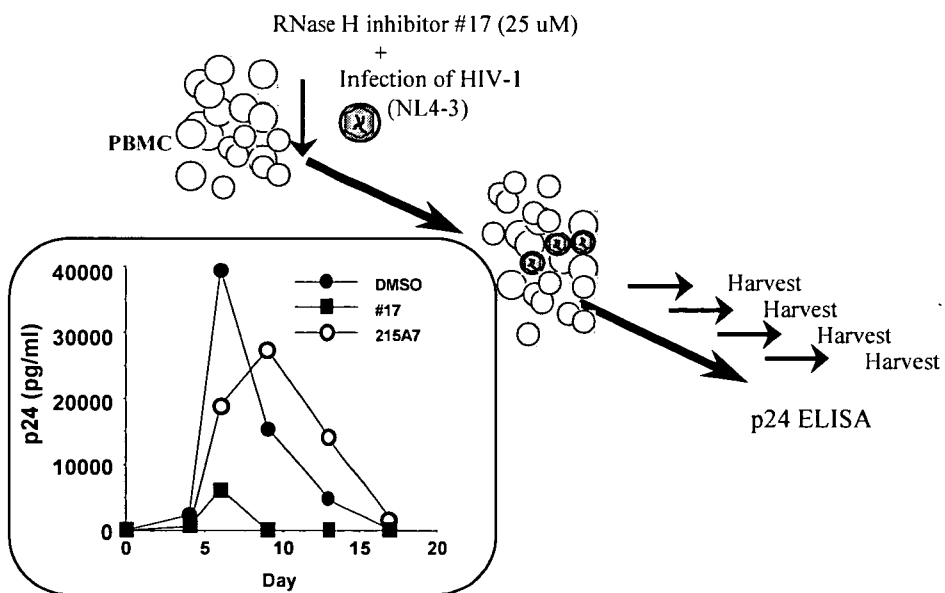
図 2

Dose-dependent inhibition of HIV-1 replication by RNase H inhibitor lead compound



☒ 3

Inhibition of HIV-1 replication by RNase H inhibitor lead compound



☒ 4

平成19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 RNase H 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：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

分担研究者 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 准教授）

研究要旨 生化学実験でのスクリーニングによって見出された RNaseH 阻害作用を有する低分子化合物を用いて、逆転写酵素に対するドッキングシミュレーションを行なうことで、既に、化合物と RNaseH ドメインの結合様式を解明している。本研究では、この知見に基づいて、新たな化合物を設計した。化合物の設計指針として、(1) RNaseH ドメインの活性部位に対して、スクリーニングにより見出された化合物と類似の水素結合様式ならびに疎水相互作用様式を取ること、(2) 活性中心にある Mg^{2+} イオンとキレートするような形で結合すること、(3) RNA 中のリン酸基が Mg^{2+} イオンに配位するのを阻害することで活性を示すこと、である。幾つかの RNaseH 阻害活性を持つ分子を考案し、ドッキングシミュレーションを活用して結合親和性を評価した。さらに有望と思われる1種類の化合物について有機化学実験により合成を試みた。

A. 研究目的

HIV-1 感染症治療においては、主に逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬を用いた多剤併用療法(HAART)が行われている。ところが HIV-1 は遺伝子変異を起こしやすいため、長期間の薬剤投与により、ウイルスが薬剤耐性を獲得する現象が起こる。このウイルスの薬剤耐性の獲得は、現在のエイズ治療において最も深刻な問題の一つとなっている。薬剤耐性の問題を回避するために、抗エイズ薬の開発には2つの動向がある。一つは、従来からの逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤とは異なり、別の部位に標的を定めた抗エイズ薬の開発である。HIV-1 が宿主細胞に侵入する過程を阻止する薬剤などが、これまでに発表されている。もう一方のアプローチは、薬剤耐性ウイルスにも薬効を大きく低下させない逆転写酵素

阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発である。本研究班では、前者のアプローチ、すなわち新しい標的部位に作用する抗エイズ薬の創出を研究目的としている。具体的には、逆転写酵素を構成する蛋白質 p66 に含まれる RNaseH ドメインに作用して、RNaseH 活性を阻害する薬物を創出することが目的である。

昨年度までに、研究代表者（感染研：駒野）により、化合物ライブラリーからのスクリーニングにより、RNaseH ドメインに作用する化合物が幾つか見出された。。この化合物は、RNA 切断機能を阻害して酵素の働きを抑える効果がある。つまり RNaseH 活性部位に結合することで、本来の RNaseH の機能を阻害することが可能である。これらの化合物と標的である RNaseH ドメインのドッキングシミュレーションを実行して、薬物と標的タンパ

ク質の結合に関する知見を得ている。見出された化合物のほとんどは、RNaseH ドメインの活性部位に対して、類似の結合様式を持っていた。これらの化合物は、 Mg^{2+} イオンとキレートするような形で結合しており、RNA 中のリン酸基が Mg^{2+} イオンに配位するのを阻害することで活性を示すと推察される。分担課題として、コンピューターを用いて、標的蛋白質 (RNaseH) に対して結合親和性の強い化合物構造を考案することが求められている。薬物候補化合物と RNaseH ドメインの結合様式が明確になったので、計算機により、リード化合物の設計を実行し、設計した化合物について、実際に有機合成を行う。この作業を繰り返して最適なリード化合物を見出すことが、本研究の目的である。

B. 研究方法

(B-1) 計算機解析

既に見出されているヒット化合物の構造とその結合様式を参考に、RNaseH に対する阻害活性を持つと期待される化合物を考案した。次に考案した化合物と RNaseH の結合配置をドッキングシミュレーションソフトウェアを使用して、予想した。逆転写酵素の 3 次元立体構造として、Protein Data Bank 中の 1SUQ の構造を使用した。RNaseH は、逆転写酵素のサブドメインである。RNaseH ドメイン中の化合物の結合サイトの探索範囲を絞り込むために、逆転写酵素の RNaseH 部位にある 4 つの荷電性アミノ酸残基 (Asp443, Glu478, Asp498, Asp549) から 20 Å 以内を、結合部位として指定した。ドッキングシミュレーションは、ケンブリッジ結晶データセンターが販売する Gold というソフトウェアで行った。Gold は、ドッキングシミュレーションプログラムの中では定評のあるソフトウェアである。但し、ドッキング計算

は現在の最新の計算機とソフトウェアでも、その予測精度は、必ずしも十分に高いとは言い難い。そこで、独自に開発した薬物と標的タンパク質の結合親和性評価ソフトウェア (Orientation) を使用して、結合構造の最適化と結合エネルギーの再評価を行った。これにより考案した化合物の中から有望なものを選び出し、実際に有機合成を検討する対象として絞り込んだ。

(B-2) 有機合成

RNaseH に対する阻害活性を持つと期待される設計化合物について合成経路を立案した。合成経路は最終生成物として十分な収量が確保できるように、5 段階以下で反応が完了するようにした。合成反応では、薄層クロマトグラフィーで反応生成物の有無を確認し、主にカラム精製を行い、生成物を分離する。また必要に応じて、再結晶化を行い、中間精製物の純度を高める。合成で得られた化合物は、核磁気共鳴分光法 (NMR) ならびに電子線イオン化質量分析法 (EI-MASS) により、その構造を確認する。

C. 研究結果

(C-1) 計算機設計

既に生化学的スクリーニングにより活性が確認されている化合物 (215A07) と RNaseH とのドッキングシミュレーションを実行した結果を図 1 に示す。RNaseH ドメインでは、活性部位に 4 つの荷電性アミノ酸残基 (Asp443, Glu478, Asp498, Asp549 : 図中に赤で表示) が存在するが、これを横切るような形で溝ができています。溝と 4 つの残基の交わる部分には、 Mg^{2+} イオンが配位している。ヒット化合物は、丁度、この Mg^{2+} イオンに配位結合して安定化している。Gold とは別のドッキングソフトウェアである Glide (シュレディンガー社) を使用しても、ほぼ同様の結合構造が得られた。

GoldとGlideという2つのソフトウェアで同一の結果が得られたことや、ヒット化合物が溝に填ることから判断して、この結合構造は確からしいと思われる。

RNaseH ドメインと RNaseH 阻害活性を持つ化合物の構造を参考に、図2ならびに図3に示すように新規の化合物構造を考案した。先に活性が確認されている215A07は、活性中心にある Mg^{2+} イオンに配位するフラン環を有し、さらに活性部位の溝に填るために、細長い形をしている。図2には、溝に填る細長い形状という特徴を持つものを載せた。フラン環の反対の端には、疎水性の官能器を配置した。さらに図3には、直線構造ではないものを載せた。つまりフラン環より伸びる炭素鎖が、途中の窒素原子で分岐して疎水性領域が、より広がっている構造をとっている。

考案した化合物は、いずれも RNaseH の活性ドメインの溝の部分に結合した。例として、2例を図4に示す。活性部位の溝に填るために、活性を持つ化合物は、細長い形をしている。結合構造については、フラン環の向きに注目すると、2方向の可能性がある。図4に示した2例では、化合物の結合向きは互いに逆になっているが、Goldソフトウェアで算出されるスコア値には、大きな差がなかった。従って、明確に結合向きを制御することは、直線型の構造をもつ化合物では難しいと判断した。一方で図5に示したように化合物中央のペプチド結合を形成する窒素原子部分で炭素鎖が分岐している場合には、結合向きを制御することができる。

図6には、フラン環から伸びる炭素鎖が窒素原子上で分岐した構造のうち、最も有望と思われる構造を示す。この化合物では、フラン環に代えてチオフェンを用いている。これは両者の性質がそれほど変わらないが、チオフェンの方が安定で合

成に向いているからである。チオフェンとは反対方向に、2つの芳香族間が窒素原子で結合された構造があり、この部分が強い疎水性領域を形成し、しかも柔軟性のある形となっている。チオフェンには硫酸基を結合させ、標的タンパク質の間に強い水素結合が形成できるようにした。図2および図3に示す全ての化合物構造については、結合親和性評価プログラムであるOrientationを使って結合エネルギーを算出し、同時に結合構造の最適化を行った。その結果、図6に示した構造が、有望であることが確認できた。図6下には、新規の化合物構築から計算機評価までの手順を示した。

(C-2)有機合成

図6に示した化合物について、図7に示す合成経路を立案した。初めに、チオニルブチル酸とアミノアゾベンゼンをペプチド結合で連結する。次にチオフェンに硫酸基を結合させる。さらにペプチド結合部位の窒素原子にシアノ基を結合させて完成させる。実際の合成では、一段階目の反応は進行し目的の反応物が得られた。ところが硫酸基を結合させる反応の反応性が高く、目的の部位以外にも水酸基が結合し、目的の反応物だけを精製することが困難であった。そこで図8のように反応経路を変えて、先に硫酸基をチオフェンに結合させ、次にアミノアゾベンゼンをペプチド結合で反対側に結合させ、最後にシアノ基を結合させる合成経路を考えた。これに基づいて、化合物合成を進めている。

D. 考察

計算機により RNaseH 阻害活性が期待できる化合物を設計したが、その際に標的である RNaseH ドメインの特徴に適合するように官能基の配置に考慮した。図9に化合物の形とそれぞれの官能