

200830020A

平成20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21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

平成20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21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20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20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)	15
--------------------------------------	----

III 平成20年度 業績一覧

	25
--	----

IV 平成20年度 刊行物別刷 (抜粋)

	27
--	----

1. 平成20年度 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3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既存の薬剤とは異なる作用機序を持つ新規抗エイズ薬の開発が急がれる。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。これまでに2万種類のケミカルライブラリーの中から複数の RNase H 阻害剤リードを同定した。本年度はリード化合物の活性について詳細な酵素学的解析を行いその特異性について評価した。電算機的解析により作用機序の詳細な解析が行われ、in silico screening に応用する基礎を築いた。阻害剤として機能する化合物の基本骨格 NACME は国際学術雑誌 Journal of Medicinal Chemistry に発表された。3年間の研究を終えて、培養系において HIV-1 複製阻害活性を持つ次世代エイズ治療薬の先導化合物を同定し、阻害剤スクリーニングと電算機解析を同時に並行して行う事により短期間で薬剤最適化を図る本研究計画の潜在性を示すことができた。本研究は新規作用機序を持つ次世代エイズ治療の薬開発および将来承認される RNase H 阻害剤に対する行政対応に大きな貢献が期待される。

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）

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。

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 RNaseH 阻害薬開発戦略のフローチャートを参照）。

B. 研究方法

(1) 酵素阻害活性についての定量：これまで得られた有望なリード化合物における 2 つ、
5-nitro-furan-2-carboxylic acid
adamantan-1-carbamoylmethyl ester (NAC) と
5-nitro-furan-2-carboxylic acid
[[4-(4-bromo-phenyl)-thiazol-2-yl]-(tetrahydro-fura

n-2-ylmethyl)-carbamoyl]-methyl ester (NBTC) について HIV-1, MLV, E. coli, human RNase H1 に対する阻害活性を測定し種特異的な阻害活性の有無を評価する。

(2) インテグラーゼ阻害効果：RNase H の活性中心はインテグラーゼの活性中心と構造が似ており、両者を阻害する "double blocker" も報告されていることから、NAC/NBTC におけるインテグラーゼ活性阻害能を評価する。米国 NCI Dr. Y. Pommier らが開発した酵素反応生成物電気泳動法に基づく方法にて IC₅₀ を評価する。

(3) In silico screening による阻害剤候補の同定と評価：これまでに得られたリード化合物と構造予測モデルを駆使し、in silico screening による RNase H 阻害剤の探索を行う。バーチャルスクリーニングの結果得られた候補化合物がもつ RNase H 阻害活性の有無を実測する。

(4) docking simulation による新規 RNase H 阻害剤のデザインと合成：これまでに本研究班により同定されたリード化合物 NAC、NBTC をもとにして、骨格構造を保持し、側鎖を改変することにより、選択性が高く効果の強い RNase H 阻害剤をデザイン・合成してその活性を評価する。

(5) 酵素—阻害剤結合様式の決定：これまでに知られている RNase H 阻害化合物は、ケトン基あるいはヒドロキシル基が隣接して並ぶという特徴を持っている。NAC/NBTC は既存の RNase H 阻害剤と構造が異なっているため作用機序が異なる可能性がある。結合様式の理解は精密な薬物設計を行うために必須であるため、HIV-1 RT の RNaseH ドメインと本研究により見出された新規化合物の共結晶を作成して X 線構造解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究には該当しない。

C. 研究結果

1) 酵素阻害活性についての定量: NAC/NBTC は HIV-1, MLV の逆転写酵素に内在する RNase H 活性を阻害しその IC₅₀ は 5-30 μ M であった。

E. coli RNase H は阻害せず、NBTC のみが約 50 μ M でヒト由来 RNase H1 阻害活性を示した。

(2) インテグラーゼ阻害効果: HIV-1 RT のもつ strand transfer activity および 3' processing activity に対する阻害活性は検出されず、NAC/NBTC が選択的な RNase H 阻害剤であることが判明した。

(3) In silico screening による阻害剤候補の同定と評価: リード化合物からの派生構造を探索するために、バーチャル化合物ライブラリーを用いた計算機スクリーニングを行った。有望と判断された 36 候補化合物のうち、3 種類について実際に HIV-1 RT-associated RNase H 阻害活性を測定したが、NAC/NBTC より強力な活性を有する化合物は得られていない。

(4) docking simulation による新規 RNase H 阻害剤のデザインと合成: リード化合物に改変を行った幾つかの構造を考案し、ドッキング計算により有望な修飾構造体を選定した。選定された化合物の有機合成を試みているが、一部に不安定な化学構造が含まれているため現時点で最終設計構造は得られていない。中間体構造については、随時、活性測定を行っている。不安定構造部分を見直した化合物を設計し、平行して合成を進めている。

(5) 酵素—阻害剤結合様式の決定: 逆転写酵素は核酸を捕捉するループ部分の構造的揺らぎが大きく、X 線結晶解析の分解能が不十分な場合が多い。分解能を高めるために特定の変異を導入した逆転写酵素の発現ベクターを

Rutgers 大学の E. Arnold 教授より分与頂いた。この逆転写酵素を発現し、結晶化レベルまで精製した。発現した逆転写酵素は Polymerase 活性と RNase H 活性を持つことを確認した。得られたリード化合物との共結晶化を試みている。

D. 考察

研究期間 3 年で RNase H 阻害剤のスクリーニング系を構築し、ランダムケミカルライブラリーから 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME) を基本骨格構造とする RNase H 特異的阻害剤 NAC/NBTC などと同定することが出来た。これは既存の RNase H 阻害剤とは構造が事なる新規性に富む化学構造であった。NACME 誘導体はレトロウイルスに特異的でヒト細胞における HIV-1 複製を減弱させる活性も検出できた事から新しいエイズ治療薬の開発シードとして大きく期待できる。これを実用化するためには更に改変を繰り返し IC₅₀ が高く、細胞毒性が低い(therapeutic window が広い)誘導体が求められる。作用機序解析には共結晶構造解析と本剤に対する薬剤耐性ウイルスの選択が必要である。今後、これらの課題を重点的に進めるべきと思われた。

RNase H 阻害剤は今後開発がすすみ次世代のエイズ治療薬として認可される可能性は高い。このとき、我々が RNase H の学術的知見の蓄積と阻害剤機能の評価系を持つ事は新たな薬剤耐性問題への対応を含めた厚生労働行政上の対応に大きく貢献できると思われる。

電算機によるバーチャル薬剤デザインと実際のスクリーニングとを協調して行うことにより短期間で効率的に薬剤開発を行うという本研究のコンセプトの潜在性を十分に示せたのではないだろうか。このノウハウを RNase H

阻害剤だけでなく新たな作用機序を持ったエイズ治療薬開発に応用させることが本研究課題の成果を真に生かすことであろう。

(平成20年度の主な研究成果図を参照)。

E. 結論

研究期間3年で NACME を基本骨格構造とする RNase H 阻害剤リード化合物の同定に成功した。これは既存の RNase H 阻害剤とは構造が事なる新規性に富む化学構造であり、新規作用機序を持つエイズ治療の薬開発および将来承認される RNase H 阻害剤に対する行政対応に大きな貢献が期待される。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

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

HIV-1 複製阻害活性を有する新規 RNaseH 阻害剤 NACME 誘導体 (予定)。

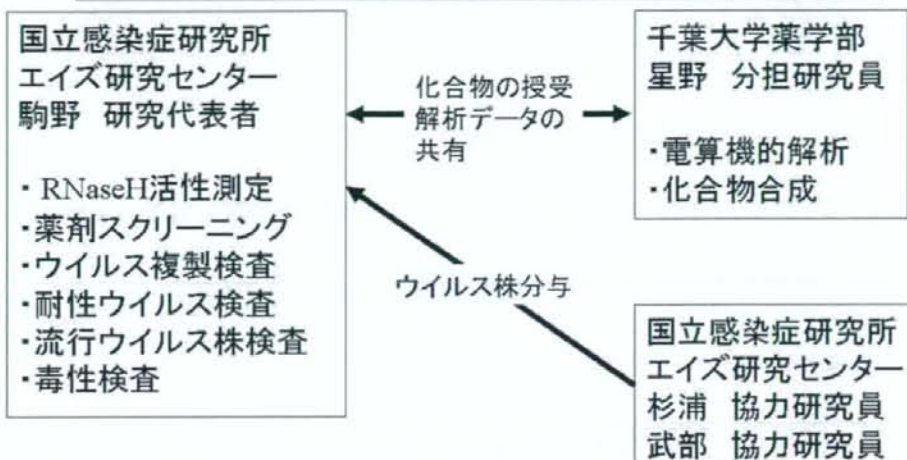
2. 実用新案登録

なし

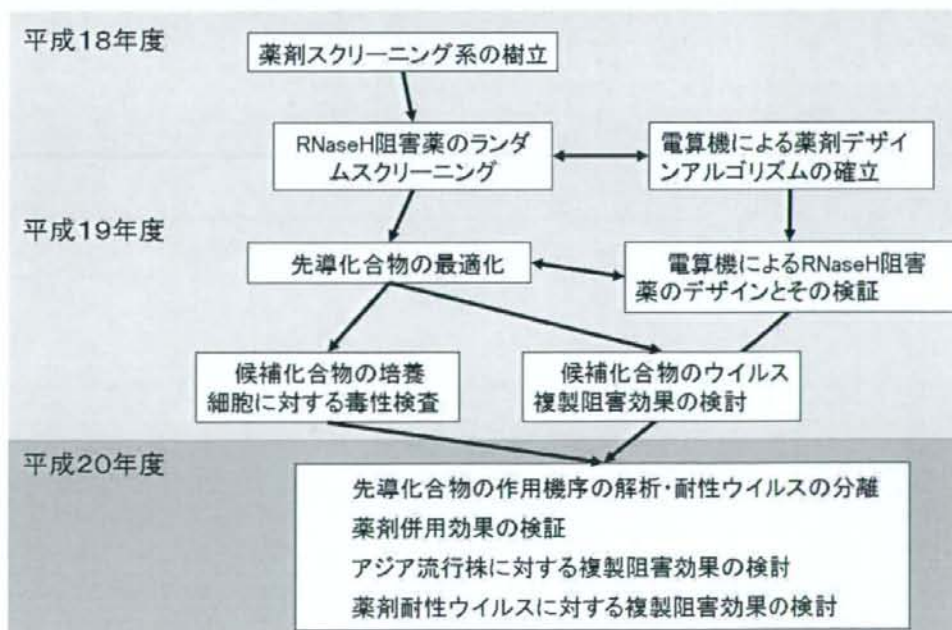
3. その他

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20年度 の主な研究成果

- I. RNase H阻害剤リード化合物の詳細な活性評価
- II. 立体構造解析による作用機序解析と新規 RNase H阻害剤
- III. 研究成果を米国化学学会学術誌 *Journal of Medicinal Chemistry*への発表
- IV. 電算機技術を利用したエイズ治療薬開発手法の開発
- V. RNase H研究とHIV研究基盤の構築

11. 平成20年度 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

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3年目にあたる。

研究要旨 リード化合物 5-nitro-furan-2-carboxylic acid [[4-(4-bromo-phenyl)-thiazol-2-yl]-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-carbamoyl]-methyl ester (NBTC)はウイルス株間で活性に差異があったもののレトロウイルス逆転写酵素に内在する RNase H 活性を IC50 が 5-30 μ M で選択的に阻害する事が証明された。ヒト RNase H1 を阻害する活性も持つ事が明らかになった。インテグラーゼの strand transfer および 3' processing 阻害活性を欠き、選択的な RNase H 阻害剤である事が示された。細胞培養レベルで HIV 複製抑制能を示した事から、次世代エイズ治療薬開発のリード化合物として 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME) 誘導体は有用と考えられる。

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事が懸念される。

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として 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME) 誘導体を同定した。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酵素学的な詳細な解析と選択的阻害作用に浮いて解析した他、structure-based in silico screening で得られた誘導体について RNase H 阻害活性を評価した。

B. 研究方法

(1) 酵素阻害活性についての定量：これまで

得られた有望なリード化合物である 5-nitro-furan-2-carboxylic acid adamantan-1-carbamoylmethyl ester (NAC) と 5-nitro-furan-2-carboxylic acid [[4-(4-bromo-phenyl)-thiazol-2-yl]-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-carbamoyl]-methyl ester (NBTC) について HIV-1, MLV, E. coli, human RNase H1 に対する阻害活性を測定し種特異的な阻害活性の有無を評価する。酵素活性の原理は Parniak らが開発した real-time monitoring assay を使用し、その原理の詳細は Chan et al., Anal Biochem 2004 に詳述されている。

(2) インテグラーゼ阻害効果: RNase H の活性中心はインテグラーゼの活性中心と構造が似ており、両者を阻害する”double blocker”も報告されていることから、NAC/NBTC におけるインテグラーゼ活性阻害能を評価する。米国 NCI Dr. Y. Pommier らが開発した酵素反応生成物電気泳動法に基づく方法(Mahalingam et al., 1997)にて IC₅₀ を評価する。

(3) In silico screening による阻害剤候補の同定と評価: これまでに得られたリード化合物と構造予測モデルを駆使し、in silico screening による RNase H 阻害剤の探索を行う。バーチャルスクリーニングの結果得られた候補化合物がもつ RNase H 阻害活性の有無を実測する。In silico screening の詳細は他の分担報告に譲る。

(倫理面への配慮)

本研究には該当しない。

C. 研究結果

1) 酵素阻害活性についての定量: NAC/NBTC は HIV-1, MLV の逆転写酵素に内在する RNase H 活性を阻害しその IC₅₀ は 5-30 μ M であった。E. coli RNase H は阻害せず、NBTC のみが約 50 μ M でヒト由来 RNase H1 阻害活性を示した(図 1、

図 2、表 1)。

(2) インテグラーゼ阻害効果: HIV-1 RT のもつ strand transfer activity および 3' processing activity に対する阻害活性は検出されず、NAC/NBTC が選択的な RNase H 阻害剤であることが判明した(図 3、表 1)。

(3) In silico screening による阻害剤候補の同定と評価: リード化合物からの派生構造を探索するために、バーチャル化合物ライブラリーを用いた計算機スクリーニングを行った。有望と判断された 36 候補化合物のうち、3 種類について実際に HIV-1 RT-associated RNase H 阻害活性を測定したが、NAC/NBTC より強力な活性を有する化合物は得られていない。

D. 考察

研究期間 3 年で RNase H 阻害剤のスクリーニング系を構築し、ランダムケミカルライブラリーから 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME) を基本骨格構造とする RNase H 特異的阻害剤 NAC/NBTC などを同定することが出来た。これは既存の RNase H 阻害剤とは構造が事なる新規性に富む化学構造であった。NACME 誘導体はレトロウイルスに特異的でヒト細胞における HIV-1 複製を減弱させる活性も検出できたことから新しいエイズ治療薬の開発シードとして大きく期待できる。これを実用化するためには更に改変を繰り返して IC₅₀ が高く、細胞毒性が低い(therapeutic window が広い)誘導体が求められる。作用機序解析には共結晶構造解析と本剤に対する薬剤耐性ウイルスの選択が必要である。今後、これらの課題を重点的に進めるべきと思われた。

電算機によるバーチャル薬剤デザインと実際のスクリーニングとを協調して行うことにより短期間で

効率的に薬剤開発を行うという本研究のコンセプトの潜在性を十分に示せたのではないだろうか。このノウハウを RNase H 阻害剤だけでなく新たな作用機序を持ったエイズ治療薬開発に応用させることが本研究課題の成果を真に生かすことであると信じる。

E. 結論

研究期間3年で NACME を基本骨格構造とする RNase H 阻害剤リード化合物の同定に成功した。これは既存の RNase H 阻害剤とは構造が事なる新規性に富む化学構造であり、新規作用機序を持つエイズ治療薬開発のため大きな貢献が期待される。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem* (in press)
- 2) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Let* (in press)
- 3) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J. Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in

the targeted metastasis. *Cancer Sci* (in press)

- 4) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J Gen Virol* (in press)
 - 5) 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. *AIDS*. May 31; 22(9):1081-3, 2008.
 - 6) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*. Apr; 9(4):540-58 2008.
1. 学会発表
(国際学会)
 - 1) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits CXCR4 trafficking to the plasma membrane and blocks X4 HIV-1 entry. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY
 - 2) Emiko Urano, Yuki Kariya, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific

silencer of HIV-1 replication. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

3) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto and Jun Komano. Functional substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Gag with phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

(国内学会)

1) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

2) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

3) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. The 8th

Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

4) 浦野 恵美子, 奥長浩之, 森川裕子, 駒野 淳. DNA J/HSP40 Co-chaperone family による HIV-1 複製抑制. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年、岡山

5) 駒野 淳, 浦野 恵美子, 刈屋 祐美, 二橋 悠子, 市川 玲子, 濱武 牧子, 深觸 秀輔, 森川 裕子, 芳田 剛, 小柳 義夫, 山本直樹. T 細胞における HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング - Brd4 C 末端ドメインの同定とその機能解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年、岡山

6) 駒野 淳, 濱武 牧子, 青木 徹, 浦野 恵美子, 二橋 悠子, 山本 直樹. BiFC/BRET による癌転移増強分子 CXCR4 の Ligand 非依存的な多量体形成の解析. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008, 名古屋

7) 村上 努, 大隈 和, 田中礼子, 仲宗根正, 濱武牧子, 駒野 淳, 谷中幹郎, 田中勇悦, 山本直樹. KRH-3955 は経口投与可能な高活性抗 X4 HIV-1 阻害剤である. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008, 大阪

8) 青木 徹, 清水佐紀, 浦野恵美子, 濱武牧子, 寺嶋一夫, 玉村啓和, 村上 努, 森川裕子, 山本直樹, 駒野 淳. HIV-1 Pre55Gag のミリス トイル基非依存性ウイルス粒子産生と感染性. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008, 大阪

9) 高橋良明, 村上 努, 駒野 淳, 古田 篤司, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦. 宿主由来タンパク OX40L, OX40 の HIV-1 感染に与える影響. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008, 大阪

10) 浦野 恵美子, 奥長浩之, 森川裕子, 山本直

樹、駒野 淳. Inhibition of HIV-1 replication by co-chaperone DNA J/HSP40 protein family. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪

11) 小林明子、芳田 剛、駒野 淳、小柳義夫. レンチウイルスバクターを用いた抗 HIV 因子のスクリーニングとその解析. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008,大阪

12) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008,神戸

13) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008,神戸

14) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008,神戸

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

HIV-1 複製阻害活性を有する新規 RNaseH 阻害剤 NACME 誘導体 (予定)。

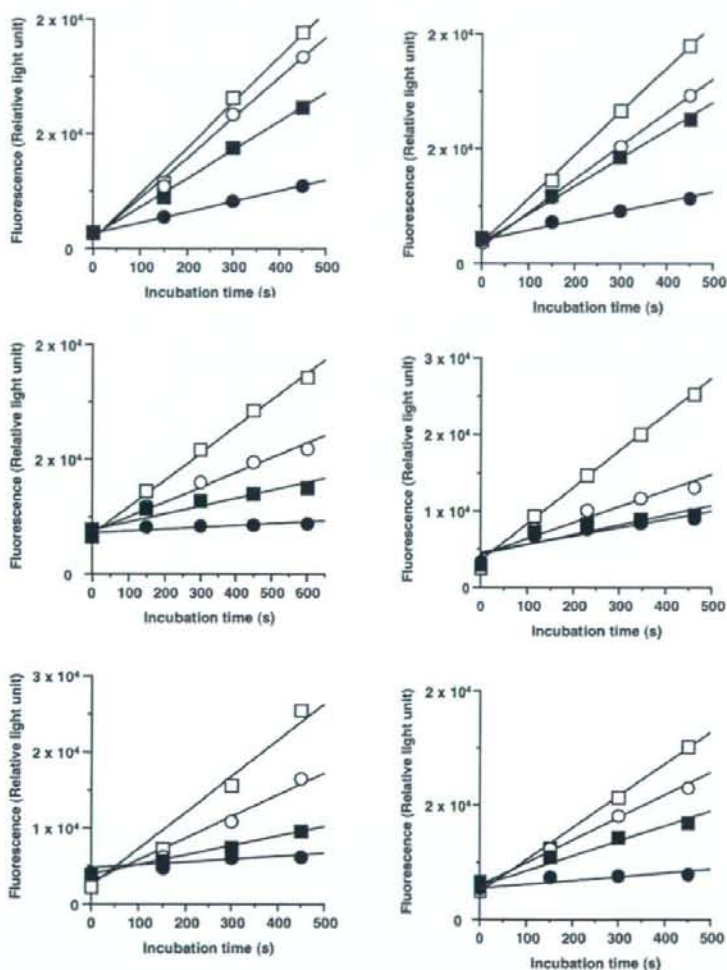


図1. IC50の測定

左がNAC、右がNBTCの結果。使用した酵素は上から順にHIV-1 clade B (LAI)、CRF01_A_E、MLV RT。薬剤濃度は50 (solid circle), 10 (solid square), 2 (open circle), and 0 μ M (DMSO, open square)。

Human RNase H1

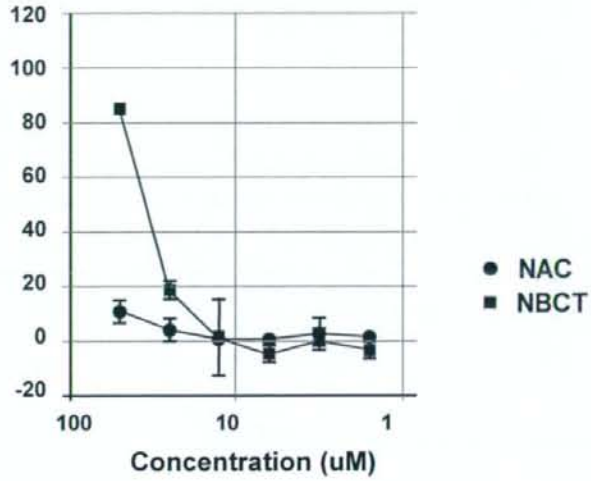


Figure 2

HIV-1 integrase assay

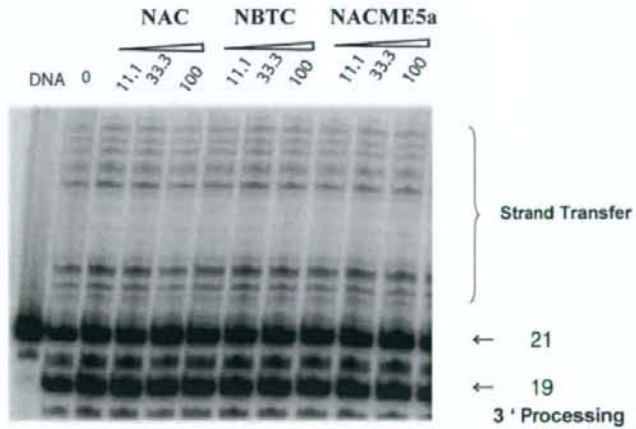


Figure 3

	NAC	NBTC
HIV-1 RT		
clade B	29.6 ± 9.2 uM (n=6)	26.7 ± 13.5 (n=5)
clade C	26.5 ± 15.0 uM (n=5)	32.2 ± 7.5 uM (n=3)
CRF01 A_E	3.8 ± 1.5 uM (n=3)	2.6 ± 1.8 uM (n=5)
MLV RT	8.4 ± 9.4 uM (n=6)	8.6 ± 8.9 uM (n=7)
E. Coli RNase H	no inhibition	no inhibition
Human RNase H1	no inhibition	~ 50 uM
HIV-1 IN	no inhibition	no inhibition

表 1