

平成18～20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）

総合研究報告書

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18～20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）

総合研究報告書

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18～20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18～20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) 9

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) 27

III 平成18～20年度 業績一覧 47

IV 平成18～20年度 刊行物別刷(抜粋) 53

1. 平成18～20年度
総括研究報告書

平成18-20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）

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既存の抗レトロウイルス薬とは異なる作用機序の次世代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RNase H活性を阻害するエイズ治療薬の開発を目的とする。研究の結果、培養系においてHIV-1複製阻害活性を持つ有望なリード化合物として5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME)誘導体を同定した。3年間の研究を終え、電算機的解析と実測の融合による創薬手法が優れた研究計画であったことが実証され、次世代エイズ薬としてのRNase H阻害剤開発の道筋を示す学術的成果をあげた。逆転写酵素阻害剤に対する耐性メカニズムの理解や、近い将来承認されるであろうRNase H阻害剤の耐性解析に対する行政対応にも大きな貢献が期待できる。

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RNase H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RNase H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 RNase H 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

- (1) 酵素活性および阻害剤活性測定系樹立
- (2) スクリーニング施行
- (3) リード化合物の同定と活性評価
- (4) ウイルス複製阻害活性の評価
- (5) 電算機解析による阻害剤作用機序解析
- (6) リード化合物のデザインと有機合成

(1) 酵素活性および阻害剤活性測定系樹立：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 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である。これら実験系を樹立しスクリーニングに最適化する。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) 由来の精製 his Tag RT を使用する。

(2) スクリーニング施行：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 HIV RNase H 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。

(3) リード化合物の同定と活性評価：スクリーニングで得られた化合物の核構造と活性の相関を解析する。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-furan-2-ylmethyl)-carbamoyl]-methyl ester (NBTC) について HIV-1, MLV, E. coli, human RNase HI 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。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インテグラーゼ活性阻害能を評価する。

(4) ウイルス複製阻害活性の評価：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 システムであり、系の最適化をほどこしたうえでリード化合物の抗 HIV 活性を評価する。さらに有望リード化合物 NAC、NBTC については 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 を使用した。ELISA kit は Zeptomeric 社の p24 検出系を利用した。

(5) 電算機解析による阻害剤作用機序解析: 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と計算条件を選定し結合状態を推定する。結合状態の解析精度を上げるために 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。結合様式を証明するためリード化合物と酵素の共結晶を作成して X 線構造解析を行う。

(6) リード化合物のデザインと有機合成: RNase H に対する阻害活性を持つと期待される化合物を設計し、合成経路を立案し合成を行う。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、生成物を分離した。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た。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、その構造を確認した。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。(倫理面への配慮)

本研究には該当しない。

C. 研究結果

- (1) 酵素活性および阻害剤活性測定系樹立
- (2) スクリーニング施行
- (3) リード化合物の同定と活性評価
- (4) ウイルス複製阻害活性の評価
- (5) 電算機解析による阻害剤作用機序解析
- (6) リード化合物のデザインと有機合成

(1) 酵素活性および阻害剤活性測定系樹立: 再現性のよい 2 種類の RNase H 活性評価系が樹立された阻害剤スクリーニングのため最適化された。1 次- 2 次スクリーニングは PAGE 系にて行い、1 次スクリーニングは化合物を 5 つプールする事により効率を上げるよう工夫した。

(2) スクリーニング施行: 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 阻害剤リード化合物を 3 ヶ月にて同定することができた。酵素活性阻害効果のある化合物は、全体の 0.19% を占めた。一般的なスクリーニングよりもやや“ヒット率”が低く、酵素阻害剤の困難さが示唆された。

(3) リード化合物の同定と活性評価: NAC/NBTC は HIV-1, MLV の逆転写酵素に内在する RNaseH 活性を阻害しその IC50 は 5-30 μ M であった。E. coli RNaseH 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。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。この活性はこれまでに報告されている RNase H 阻害剤と比較して見劣りするものではなく、有望なリード化合物であると思われた。

(4) ウイルス複製阻害活性の評価: 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

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広く応用できることが明らかとなった。リード化合物 NAC 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 NBTC が抗ウイルス活性をもつことが示された。NP2CD4CCR5/JR-CSF システムでは NBTC 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。NAC/NBTC 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ところ、NAC には弱い抗ウイルス活性が、NBTC 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。これまで報告されている多くの RNase H 阻害剤には抗 HIV 活性を伴わないことが多く、我々の同定したリード化合物の有用性が示唆された。

(5) 電算機解析による阻害剤作用機序解析：複数のプログラムにてリード化合物が逆転写酵素の RNase H 活性中心に配位することが予測された。結合状態の解析精度を上げるために新規プログラム *Orientation* を開発し評価したところ、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で、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、酵素活性に重要なヒスチジン残基と相互作用する事が示唆され、この相互作用と実測値に強い相関を得た。これらのデータは阻害剤が基質側の RNA リン酸基と酵素側の Mg²⁺イオンとヒスチジン残基の相互作用を阻害することで活性を示す可能性を示唆する。立体構造解析において、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ことが判明した。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。

(6) リード化合物のデザインと有機合成：デザインされた複数の化合物について合成を試みた。実際の合成では、副反応生成物が多く生じ目的の反応物だけを大量且つ高い純度で精製することは容易ではなかった。しかし合成した標品の中には不純物が存在しても RNase H 阻害活性を持つものもあり、デザインと合成法を改良し新規化合物の有機合成を継続して行っている。化合物デザインにおいては合成しやすさ、化合物の安定性、細胞毒性や臓器毒性の低減、およびインテグラーゼ阻害を同時に達成できるような設計を試みている。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。試みた全ての誘導体において、NAC/NBTC より強力な活性を有する化合物は得られていない。今後さらに多くの誘導体を試験する必要があると思われる。

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ードとして大きく期待できる。本研究の成果は 2009 年に米国化学学会が発行する国際英文雑誌 *Journal of Medicinal Chemistry* に掲載予定である。数少ない阻害剤開発の一角を占める貴重な報告と思われる。印象的だったのは journal editor のコメントで、“This study appear to have a sufficient impact on the future drug design in this field.” このコメントからもわかるように本研究は学術的に非常に高い評価を得ている。

RNase H 阻害剤は非常に重要な創薬標的である。治療標的を複数化することで大きな治療効果が得られることは HAART 療法で実証済みである。RNase H 阻害剤の中には逆転写酵素活性も阻害するものや、インテグラーゼ活性も阻害するものが複数報告されている。RNase H 阻害剤をもとにしてこのようなダブル/トリプルブロッカーができれば、医療費の削減に大きく貢献できるだけでなく、患者の負担も削減する事ができる。現在の誘導体をデュアルインヒビターにするための構造改変も今後の重要な課題の一つである。RNase H 阻害剤の開発はこの意味からもぜひ強力に押し進める必要がある。

RNase H 阻害剤をエイズ治療薬として実用化するためには更に改変を繰り返し IC_{50} 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、これらの課題も進める予定である。

行政的な立場から見ると、われわれの研究は現在問題になっている薬剤耐性に対する対応にも、

近い将来認可されるかもしれない RNase H 阻害剤に対する対応にも繋がる。多剤耐性ウイルスに関しては、酵素の構造上、逆転写酵素と RNase H ドメインが離れているため、薬剤耐性に関して両者は直接の関係を持たないと考えられてきたが、RNase H ドメインへのアミノ酸変異が逆転写酵素阻害剤に対する耐性に影響することが近年報告されている。故に、本研究で得られる RNase H 活性の学術的理解は既存の薬剤耐性ウイルスを克服するための一助となると期待される。RNase H 阻害剤の開発について振り返ると、2003年から2006年にかけて新たな阻害剤が報告されていたが、2008年末になり米国NCIのグループが新たな構造をもつ阻害剤を発表した。この開発にはメルク社など大手製薬企業も関与しており、近い将来 RNase H 阻害剤が認可され治療に使用されるかもしれない。この際には我々が培った技術により新規薬剤の薬剤耐性を評価することが容易になるであろう。日本で唯一本酵素活性を標的にした研究を行っており、重要な研究技術であることは疑いない。

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と思われる。電算機技術は独自のプログラム開発に基づいており、ライセンス問題がないため多量の計算をスーパーコンピューター等で使用される並列 CPU による演算を行い短時間に行う事が出来る。これは標的が多くなればなるほどパワーを発揮するものであり、今後本研究を他の分指標的に応用する際に大きく貢献すると期待される。本研究のノウハウを 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。

我々は世界的にユニークな T 細胞系による HIV-1 耐性遺伝子スクリーニングを行っている。本研究で培われた抗 HIV-1 効果をスクリーニングする評価系、電算機によるバーチャル薬剤デザインと融合させる事により迅速に新しいエイズ治療薬を開発できることが期待される。

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 阻害剤とは構造が異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）。

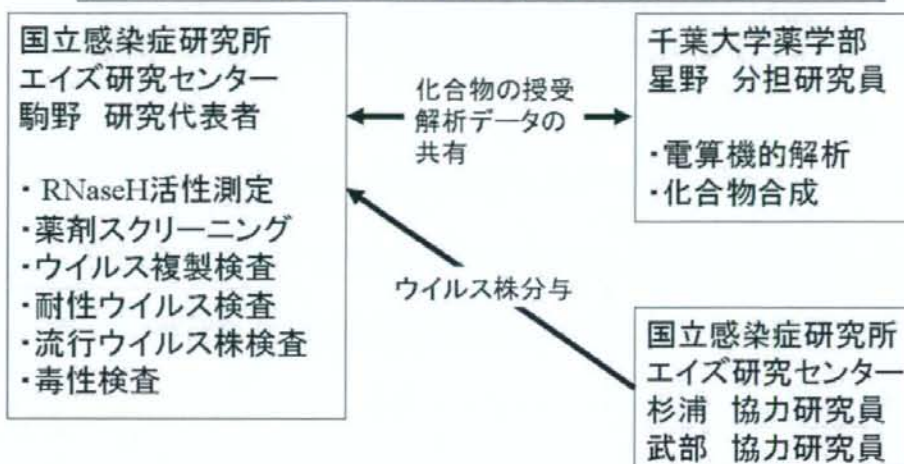
2. 実用新案登録

なし

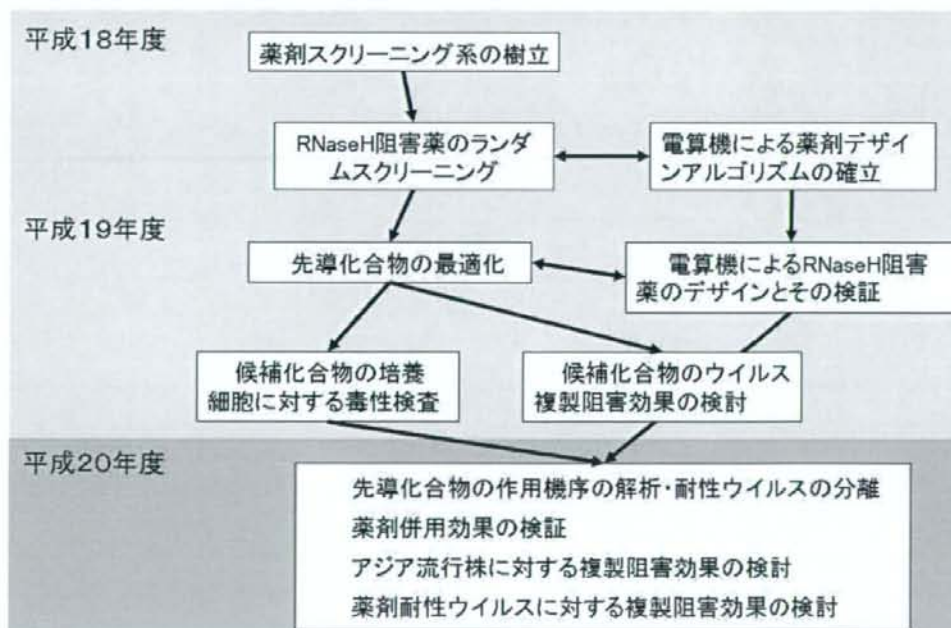
3. その他

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



本研究の主な研究成果

- I. RNase H阻害剤リード化合物の同定と活性評価
- 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. 電算機技術を利用したエイズ治療薬開発手法の開発
- IV. RNase H研究と HIV研究基盤の構築

II. 平成18～20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)

研究要旨 本研究の目的は、電算機によるタンパク質立体構造解析手法を最大限に活用し、HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNase H 活性を阻害する小分子化合物をスクリーニングし迅速に最適化をし、有用なリード化合物を得て、その有用性を抗ウイルス活性として証明すると同時に、その基本化学構造をもとに誘導体合成への道筋を示す事である。我々はスクリーニング系を確立し、ランダムリード化合物 5-nitro-furan-2-carboxylic acid [[4-(4-bromo-phenyl)-thiazol-2-yl]-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-carbamoyl]-methyl ester (NBTC) はレトロウイルス逆転写酵素に内在する RNase H 活性を選択的に阻害する事を証明した。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。本研究は現在問題になっている薬剤耐性に対する対応にも、近い将来認可されるかもしれない RNase H 阻害剤に対する迅速な行政対応も可能にする重要な研究と位置づけられる。

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。

我々はスクリーニング系を確立し、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。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、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. RNaseH 活性測定系の樹立

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 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)。

酵素は市販の HIV-1 Clade B RT (Boehringer, Worthington 社)、MLV (Promega 社)、大腸菌由来 RNase H (Sigma 社) および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) 由来の his Tag RT (約 0.5U/μl) 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变化させて、酵素反応の至適条件を検討した。

2. RNase H 阻害剤の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。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、陽性の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。

Parniak MA, et al., 2003. *Anal Biochem* **322**:33-9. に詳述。

3. 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。インテグラーゼ阻害効果は米国 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。

4. In silico screening による解析

これまで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。

5. ハイスループット HIV 阻害剤評価系樹立

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 を行った。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た。さらに 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した。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。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。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。

6. ウイルス抗原検出系による抗 HIV-1 活性評価

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した。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

1. RNaseH 活性測定系の樹立

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 100-200 サンプルを処理し、約 3 ヶ月程度で 2 万種類の化合物ライブラリーについて 1-2 次スクリーニング (図 3、4) および 3 次スクリーニングを行うことが可能となり、一連の化合物を得る事が出来た。活性のあるもの、無いものをそれぞれ図 5、図 6 と 7 に示す (図 5、6、7)。

2. RNase H 阻害剤の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) 由来の RT に内在する RNase H 活性を抑制することが判明した。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 5、NAC と NBTC)。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た。

3. 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 RNaseH 活性を阻害しその IC50 は 5-30 μ M であった (図 8 : 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))。E. coli RNaseH 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 9)。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 9)。

4. In silico screening による解析

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。阻害活性のある薬剤は、Mg と酵素活性に関与する His 残基に相互作用することが明らかとなった。ヒスチジン残基への相互作用はヒト RNaseH1 で特に明確で、ヒト酵素を阻害する NBTC ではこれに配位するが、阻害しない NAC では配位しなかった。一方、両者とも大腸菌酵素には配位せず、これらのドッキング simulation データは実測値と非常によく一致し、電算機のデータの妥当性を強く示唆した。システム概要を図 10 に示す (図 10)。

5. ハイスループット HIV 阻害剤評価系樹立

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に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 11)。

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 NAC 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、NBTC に抗 HIV-1 活性が検出された。NACME5a 誘導体は NBTC よりやや強い抗 HIV-1 活性を検出したものの、高濃度では明らかな細胞毒性をみとめた。NBTC では 20uM 以下でやや弱い細胞毒性を認めた (図 12)。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、NAC/NBTC 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。

6. ウイルス抗原検出系による抗 HIV-1 活性評価

NP2CD4CCR5/JR-CSF システムでは NBTC 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 12uM であった (図 13)。薬剤による細胞増殖抑制は TD50 にて 50uM 以上であった。PBMC/NL4-3 システムでは 25uM での抗ウイルス活性を評価した NAC ではやや抗ウイルス活性が検出された (図 14、図中の黒丸)。しかし NBTC は非常に強い抗 HIV-1 活性が検出された (図 14、図中の白丸)。使用濃度において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

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。本研究の成果は 2009 年に米国化学学会が発行する国際英文雑誌 Journal of Medicinal Chemistry に掲載予定であ

る。RNase H 阻害剤をエイズ治療薬として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。

我々が樹立した抗 HIV-1 効果をスクリーニングする評価系 MT-4Luc は迅速、安価、多検体処理能力に優れ、再現性が高いヒト T 細胞株を使用した理想的なものであり、細胞毒性の評価が合わせて可能であることから、今後の有用性が高いと期待される。

行政的な立場から見ると、逆転写酵素阻害剤に対する薬剤耐性が RNase H ドメインによるアミノ酸変異に影響されることが近年してきされていることから、本研究は現在問題になっている薬剤耐性に対する行政的対応に繋がる。さらに、近い将来認可されるかもしれない RNaseH 阻害剤に対する対応にも繋がる。日本で唯一本酵素活性を標的にした研究を行っており、重要な研究技術であり、継続的研究発展が期待される。

E. 結論

研究期間 3 年で新規化学構造である NACME を基本骨格構造とする RNase H 阻害剤のリード化合物同定に成功した。これは新規作用機序を持つ次世代エイズ治療薬開発のため大きな貢献が期待される。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時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された。このノウハウを RNase H 阻害剤だけでなく新世代の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。

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) Akihida Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi Soeda, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 8; 105(1):294-9 2008.
- 7) 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.
- 8) Komano J, Hamatake M, and Yamamoto N. Analyses of long-term surviving HIV-infected Japanese patients with coagulation disorders hint at novel means to prevent and treat HIV/AIDS (review). *Challenging practices on HIV/AIDS in Japan 2008*, Kashiwazaki ed., JFAP publications, 97-99, 2008
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.