

15) Miyuchi 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):167-74

学会発表 (抜粋)

海外

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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) Kosuke Miyuchi, 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

9) 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

10) Saki Shimizu, Emiko Urano, Jun Komano, Yuko Futahashi, Kosuke Miyauchi, Maya Isogai, Zene Matsuda, Kyoko Nohtomi, Kazunari Onogi, Yutaka Takebe, Naoki Yamamoto. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb), CSH Meeting on Retroviruses, May 23-27, 2006, Cold Spring Harbor, NY

11) Jun Komano, Characterization of neutralizing antibodies found in long-term non-progressors of Japanese hemophiliacs. 3rd Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS, Center for Disease Control Department of Health. Spt7-9, 2006, Taiwan, R.O.C.

12) 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. 2006. Kagoshima

国内

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 lpleeckstrin 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 Pr55Gag 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テリウムを用いた抗 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

15) 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

16) 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 互 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

17) 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 互 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

18) 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

19) 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

20) 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

21) 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-1 α . 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

22) 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

23) 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

24) Saki Shimizu, Emiko Urano, Jun Komano, Yuko Futahashi, Kosuke Miyauchi, Maya Isogai, Zene Matsuda, Kyoko Nohtomi, Kazunari Onogi, Yutaka Takebe, Naoki Yamamoto. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb), 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, 2006, 京都

25) Kosuke Miyauchi, Rachael Curran, Erin Mathews, Jun Komano, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, Don M. Engelman, Zene Matsuda. 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, 2006, 京都

26) Fuji, H., Tatsumi, J., Komano, A., Hoshino, T., Development of HIV-1 RNaseH inhibitor by Computer-Assisted Drug Design. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. 2006, 沖縄

27) Saki Shimizu, Yutaka Takebe, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Kosuke Miyauchi,

Maya Isogai, Zene Matsuda, Kyoko Nohtomi, Kazunari Onogi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of CDK9/Cyclin T complex (P-TEFb). 7th AIDS Seminar in Kumamoto.2006、熊本

28) 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・萌芽および 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,2006,名古屋

29) 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,2006,名古屋

30) 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—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,2006,名古屋

31) 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,2006,名古屋

32) 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,2006.東京

33) 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) —小分子化合物

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,2006.東京

34) 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,2006.東京

35) 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,2006.東京

36) 藤秀義, 辰巳絢子, 駒野淳, 星野忠次. HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNase H 活性阻害薬の開発 —in silico 解析による作用機序解析と最適化の試み—. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会,2006.東京

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

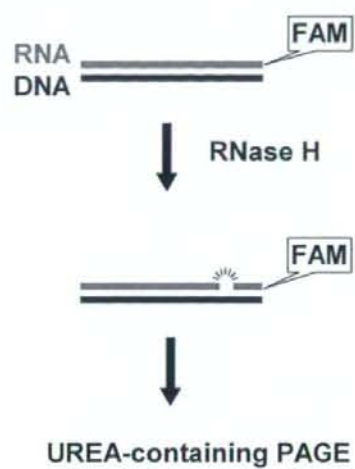
HIV-1 複製阻害活性を有する新規 RNaseH 阻害剤 NACME 誘導体 (予定)。

2. 実用新案登録

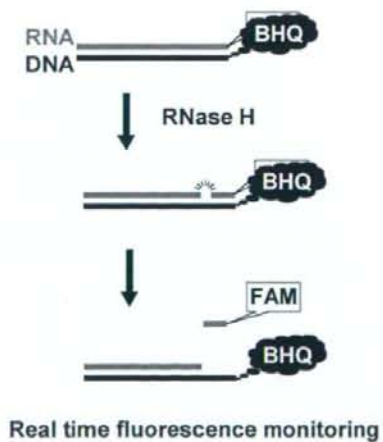
なし

3. その他

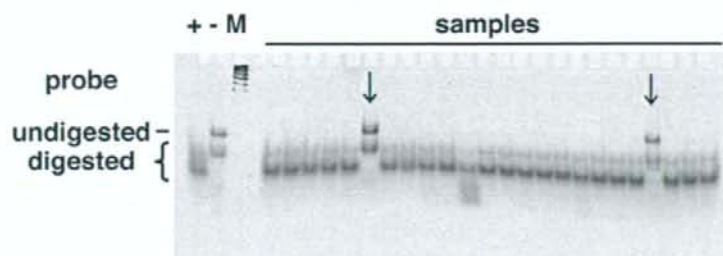
なし



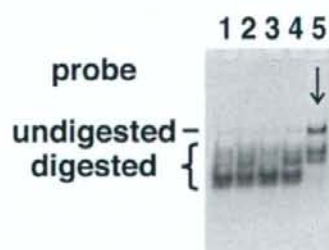
☒ 1



☒ 2



☒ 3



☒ 4

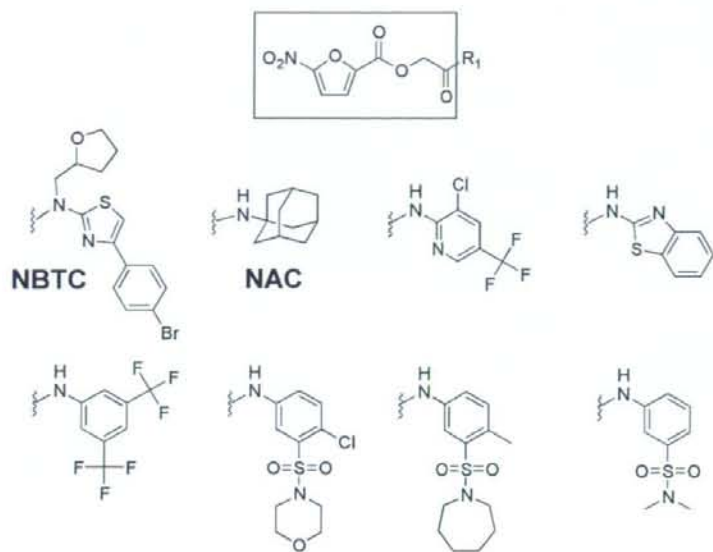


图 5

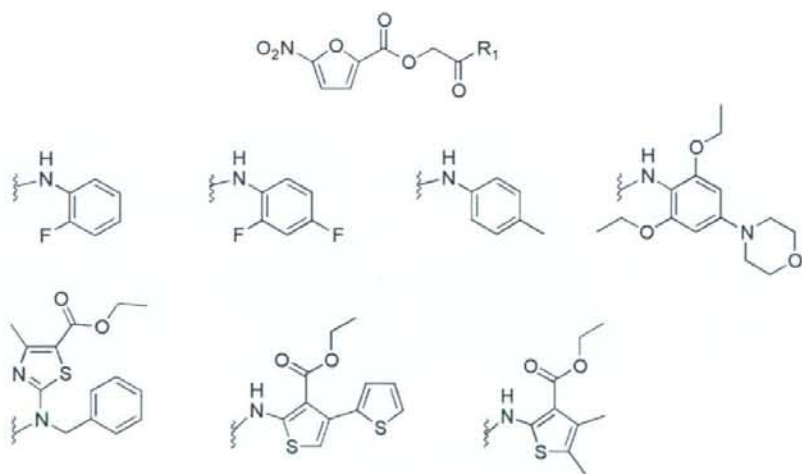


图 6

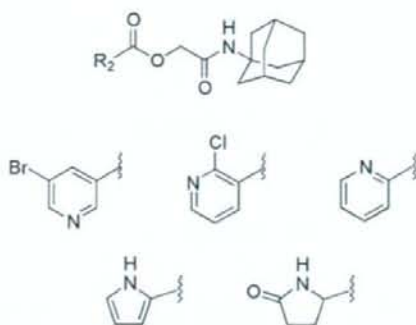


图 7

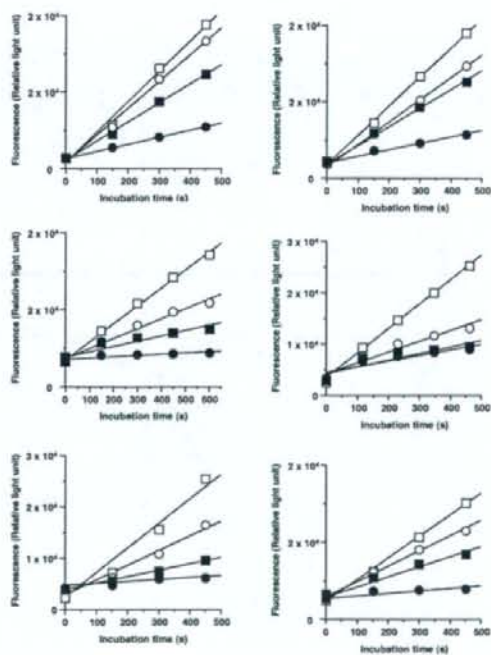
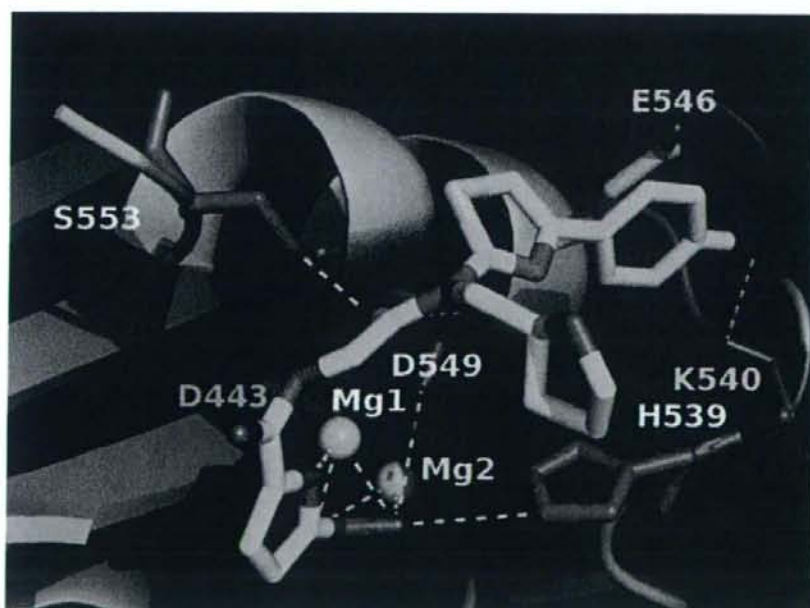


图 8

	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 HI	no inhibition	~ 50 uM
HIV-1 IN	no inhibition	no inhibition

☒ 9



☒ 1 0

MT-4 Luc system

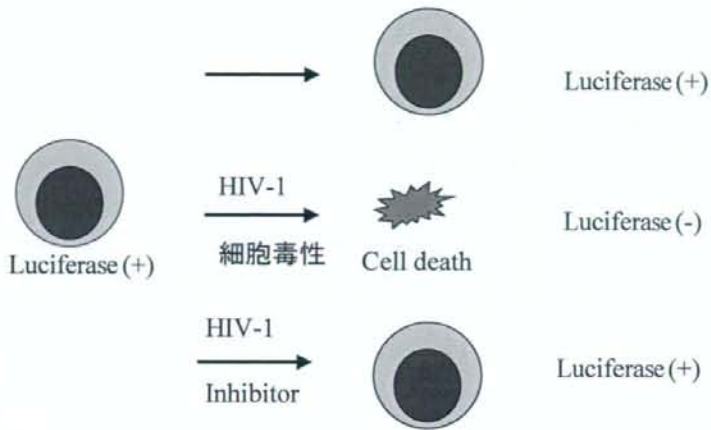


図 1 1

構造類似体の抗HIV-1活性

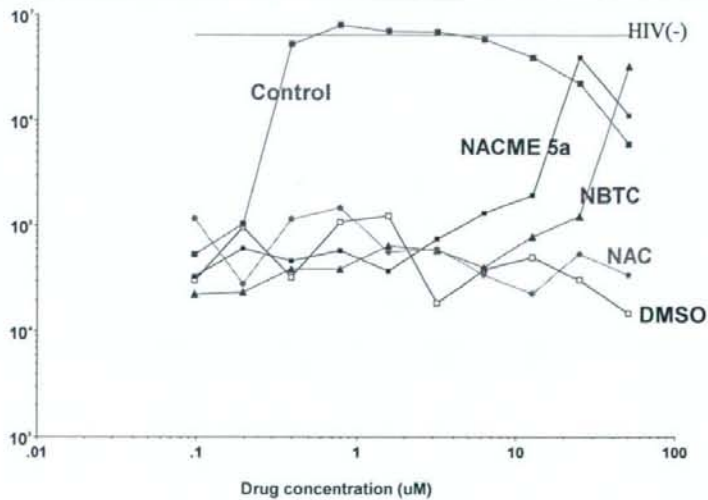
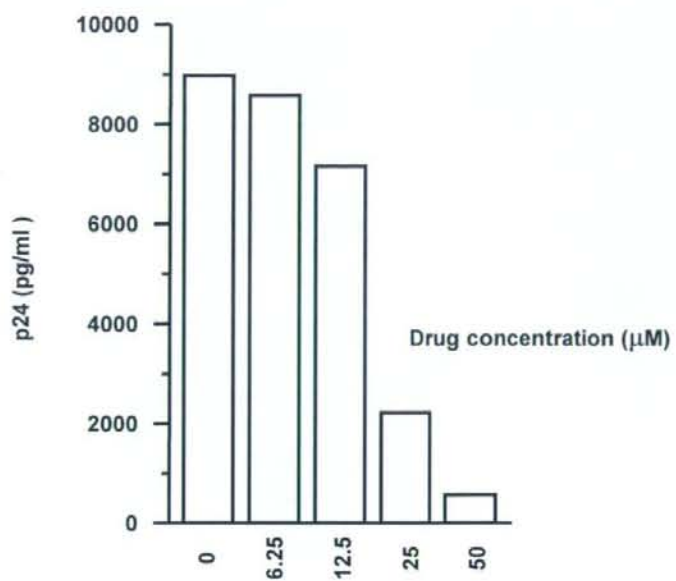
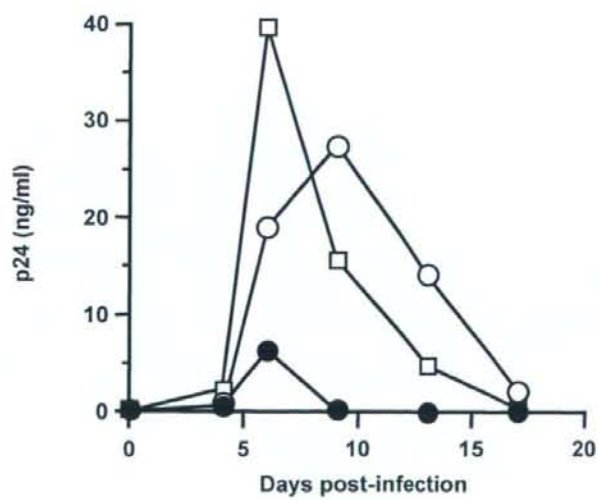


図 1 2



☒ 1 3



☒ 1 4

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（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 多剤併用療法に抵抗性を示す薬剤耐性ウイルスの出現により、新規の抗エイズ薬の開発が必要とされている。本研究では、逆転写酵素の RNaseH ドメインの働きに着目して、新規抗エイズ薬として RNaseH 活性を阻害する薬物をコンピューターシミュレーションによって設計し、有機化学実験により合成することを目的とする。主任研究者である国立感染症研究所の駒野博士による生化学実験でのスクリーニングから、RNaseH 阻害作用を有する分子化合物が複数見出された。これら化合物を用いて、逆転写酵素に対するドッキングシミュレーションを行った。その結果、化合物の多くは、RNaseH ドメインの活性部位に対して、類似の結合様式で結合した。本分担研究では、このシミュレーションの知見に基づいて、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 2 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。また生化学実験でのスクリーニングによって見出された薬物と標的タンパク質分子である HIV の逆転写酵素の RNaseH ドメインとの結晶化実験を進めた。さらに、本研究で対象としている化合物の中心骨格と、既に認可されているインテグラーゼ阻害剤との骨格を比較して、RNaseH ドメイン、逆転写酵素の Polymerase ドメイン、あるいはインテグラーゼ活性部位に対して、薬物が作用するときの共通の化合物構造の検討を行った。

A. 研究目的

現在、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。現在認可されている抗エイズ薬は、どれもウイルスの薬剤耐性により薬効が低下することが知られている。現在、抗エイズ薬の多剤併用療法によりエイズの発症を遅らせることはできるようになったが、抗エイズ薬の長期服用による薬剤耐性ウイルスの発生は免れず、ほと

多くの患者が最終的にはエイズを発症する。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のウイルスが宿主細胞に侵入する過程を阻止する薬剤あるいはインテグラーゼの阻害剤などが、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。

研究代表者（感染研：駒野）は、2万種類の化合物ライブラリーよりスクリーニングを行った。その結果、逆転写酵素を構成する蛋白質 p66 に含まれる RNaseH ドメインに作用する化合物を見出した。RNaseH は、逆転写酵素の働きの一部として、RNA の特定配列部位を切断する機能を持つ。すなわち RNaseH は HIV-1 の逆転写が行われる際に、鋳型となる RNA を分断する働きを持ち、逆転写の過程において非常に重要な機能を担っている。研究代表者（駒野）により見出された化合物は、この 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り、この RNaseH 活性阻害剤を開発することが、本研究班の研究目標である。

化合物ライブラリーからスクリーニングで得た物質は、強い阻害活性を示すものでも、 IC_{50} で 3-30 μ M 程である。医薬品として成立するためには、さらに 1-2 桁低いレベルで活性阻害効果を持つものが望まれる。そこで分担課題として、コンピューターを用いて、標的蛋白質 (RNaseH) と化合物の結合様式を理解した上で、さらに結合親和性

の強い化合物構造を考案することが求められている。すなわち計算機により、リード化合物の設計を実行することが、分担課題の最大の任務である。本研究では、設計した化合物について、実際に有機合成を行う。合成化合物は、合成の中間体や派生物も含めて、研究代表者（駒野）により活性測定が行われる。この作業を繰り返して最適なリード化合物を見出す。さらに活性薬物と RNaseH ドメインとの共結晶化実験を進め、薬物の標的タンパク質への作用機構を理解し、より効果の高い RNaseH 活性阻害剤の設計に役立てる。

B. 研究方法

(B-1) 計算機解析

研究代表者（感染研：駒野）による生化学実験でのスクリーニングによって、RNaseH に対する阻害活性を持つヒット化合物が見出されている。図 1 はヒット化合物のうちの 2 種を示したものであるが、フラン環からカルボニル基が伸び、さらにアミド結合を通して疎水性官能基が存在するという共通の骨格構造を持つ。RNaseH の分子構造は既に X 線結晶解析により明らかにされている。ヒット化合物の構造も判る。但し、ヒット化合物が RNaseH のどの部分に、どのような配置で結合するかは、明確でない。そこでドッキングシミュレーションソフトウェアを使用して、これを解析した。Protein Data Bank には、逆転写酵素の 3 次元立体構造として、1SUQ の構造が登録されている。RNaseH は、逆転写酵素のサブドメインであるので、この構造を計算に使用した。

初めに BioMedCache（富士通）を用いて、ヒット化合物の構造を計算機内で作成して、その安定コンフォメーションを求めた。次にこのコンフォメーションを用いて、ドッキングシミュレーションを行った。標的タンパク質側は、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、シュレディンガー社の Glide というソフトウェアと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の両者で行った。両者ともドッキングシミュレーションプログラムの中では実績のあるソフトウェアである。

図2はそれぞれのドッキングソフトウェアを用いて、ヒット化合物のうち結合親和性の高い化合物 (215A07) について、RNaseH との結合構造を予測してのものである。Glide ソフトウェアと Gold ソフトウェアの両者で、ほぼ同様の構造が得られた。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。化合物の酸素原子が多く存在する箇所は、丁度、この Mg^{2+} イオンに配位結合して安定化していると推察される。Glide と Gold 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、ヒット化合物が適切に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。

ヒット化合物に加えて、弱い阻害活性を持つ32種類の化合物もドッキング計算に使用し、比較検討を行った (図3)。図3では、阻害活性を持つ化合物を実験で測定された活性値の順に横軸に並べ、縦軸には Gold ソフトウェアでの結合スコアをプロットして、両者の相関を見たものである。凡その相関は見受けられるものの、十分に満足の行くものでは無かった。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えない。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で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2種類を選定して、合成経路を立案した。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。

(B-3) 生化学実験

RNaseH ドメインと生化学実験でのスクリーニングによって見出されたヒット化合物の標的タンパク質への結合構造を実験で確認するために、両者の共結晶の作成を試みた。RNaseH ドメインは HIV の逆転写酵素の一部である。逆転写酵素の結晶化は既に多く達成されている。ところが結晶の X 線解析の解像度は 3 - 6 Å と十分でない場合が多い。最近、アミノ酸変異の導入により、解像度を 2 Å 以下にすることができるとの報告があった。本実験では、この発現ベクターを分与入手して、大腸菌にて発現を行った。発現した逆転写酵素は His-タグによるアフィニティー法ならびにゲルろ過法で精製した。

C. 研究結果

(C-1) 計算機解析

生化学的スクリーニングにより最も高い活性が測定された化合物2種 (5-nitro-furan-2-carboxylic acid adamantan-1-yl carbamoyl-methyl ester : NAC と 5-nitro-furan-2-carboxylic acid [[4-(4-bromo-phenyl)-thiazol-2-yl]-(tetrahydro-furan-2-methyl)-carbamoyl]-methyl ester : NBTC) の化学構造ならびに化合物形状を図4に示す。NACとNBTCは、共に、フラン環にカルボニル基を通してアミド結合が接続し、アミノ結合の先に疎水性官能基が結合する共通の骨格を持っている。またフラン環のカルボニル基の結合部位とは反対側に、ニトロ基が結合している。フラン環の両端にあるカルボニル基とニトロ基およびフラン環の酸素原子が核酸を模倣しており、RNaseHドメインの核酸結合部位に有効に吸着するものと考えられる。NACとNBTCは、HIVのRNaseH活性を、 $IC_{50} = 3-30 \mu M$ で抑制することが、主任研究者の駒野による実験で確認されている。

生化学的スクリーニングにより見出されたRNaseH活性阻害化合物であるNACとNBTCについて、これら化合物が標的であるRNaseHドメインに結合した時の結合構造をドッキングシミュレーションと呼ばれる計算機解析により予測したのが図5である。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)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。図5に示すように、RNaseHドメインの活性部位の荷電性アミノ酸残基(Asp443, Glu478, Asp498, Asp549)は、いずれもNACとNBTCのニトロ基およびフラン環と水素結合を形成している。従って、フラン環を中心とした骨格は、

阻害剤として非常に重要な化学構造であると判断できる。カルボニル基に続くアミド基の酸素原子は、RNaseHドメインのSer553と水素結合を形成している。従って、この部分はその先に接続する疎水性官能基の結合向きを規定する重要な部分である。NACに比べNBTCは、若干、活性阻害効果が高いが、これは疎水性官能基の先端に電荷を持つ領域があり、この部分がLys残基と相互作用を持つためと推察できる。

RNaseHドメインとRNaseH阻害活性を持つ化合物の構造を参考に、新規の化合物構造を考案した。考案の指針として、フラン環周辺の化学構造を保ったまま、疎水性官能基を変化させた(図6)。考案した化合物を、図7ならびに図8に示す。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7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、疎水性の官能基を配置した。図8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。1例を図9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ので、結合向きについては、2つの可能性がある。化合物の結合向きを互いに逆にしても、Goldソフトウェアで算出されるスコア一値には、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9に示したように化合物中央のアミ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7と図8に示した構造について、Gold ソフトウェアによるドッキングならびに Orientation ソフトウェアによる結合エネルギー評価を行った。その知見から、再度、化合物を考案し直した。最終的に図10に示すように2種類の新規の化合物構造を考案した。いずれの分子も、活性部位の溝に填るために細長い形をしている。

化合物1はフラン環の代わりにチオフェンを用いたものである。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。さらにニトロ基の代わりにスルフォニル基を用いた。これは標的ドメインとの結合強化という狙いがある。チオフェンの反対の端には、疎水性の官能基を配置した。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。さらに主骨格が途中の窒素原子で分岐して、疎水性領域が直線構造より曲がった構造にした。化合物中央のアミド結合を形成する窒素原子部分で炭素鎖が分岐することで、化合物の標的への結合向きを制御することができる。

化合物2では、フラン環はヒット化合物の構造をそのまま用いて、他の末端部分には2つの芳香族間が窒素原子で結合された構造を当てはめた。つまり、この部分に強い疎水性領域を形成し、しかも柔軟性のある形を持たせることとした。

図7および図8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10に示した構造が、有望であることが確認できた。図10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。ドッキングシミュレーションの結果、考案した2種の化合物はいずれも

RNaseH の活性ドメインの溝の部分に適切に結合した(図11、図12)。Gold ソフトウェアで算出されるスコア値は、化合物1の方がやや良好であるが、化合物の合成のしやすさでは、化合物2の方が有利と思われる。

(C-2)有機合成

化合物1について、図13に示す合成経路を立案した。初めに、硫酸基をチオフェンに結合させる。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、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。

化合物2について、図14に示す合成経路を立案した。初めに、グリシンに保護基である Boc 基をアミド結合で付加する。次にアミノアゾベンゼンをペプチド結合で結合させる。Boc 基を脱保護した後に、ニトロフランをアミド結合で結合させて完成させる。実際の合成での合成産物を、図15に示す。目的の化合物が少量ではあるが、合成することに成功した。現在、合成化合物の活性を測定している。

(C-3)生化学実験

X 線結晶解析の解像度を 2\AA 以下にすることのできる変異が導入された逆転写酵素の発現ベクター (RT69A) を、Rutgers 大学の Eddy Arnold 教授より分与頂いた。このベクターを使用して、大腸菌 (Rosetta) にて、逆転写酵素を発現した。37°C で大腸菌をストレプトマイシン入りの液体培地で培養し、O. D. 値が 0.9 になった時点で、IPTG を投入して発現を誘導した。IPTG 投入後、3 時間後に遠心機により集菌した。発現した逆転写酵素

には、ヒスチジンタグがついているので、一段階目の精製として、Ni カラムを用いた。この後にエンテロキナーゼによる酵素反応で、ヒスチジンタグ部分を切断した。フィルターろ過後、ゲルろ過クロマトグラフィーで、二段階目の精製を行った。精製した逆転写酵素には、ポリメラーゼ活性も RNaseH 活性もあることが、基質の切断反応から確認できた。現在、NAC あるいは NBTC との共結晶化を試みている。

D. 考察

計算機により RNaseH 阻害活性が確認されている化合物と逆転写酵素の RNaseH ドメインとのドッキング計算を実行した結果、活性の高い化合物は以下の指針で構築できることが示唆される。

(1) 活性中心には、 Mg^{2+} イオンが存在しており、化合物はこれをキレートして配位結合を形成するようにする。従って酸素原子が適当な間隔 (3.2 Å 程度) で離れて位置する構造が良い。この箇所は、化合物の親水性領域となる。(2) RNaseH ドメインでは、 Mg^{2+} イオンが存在している部位から外側に 3 箇所の空間が広がっている。これを埋めるように疎水性残基を配置する。3 箇所の全ての空間を埋めるような化合物分子は、分子量が大きくなる可能性があるため、最小限の大きさで溝に当て填るようにする。結合親和性を高めるために、芳香族環などで π - π 相互作用を持つように工夫する必要がある。(3) Mg^{2+} イオンにキレートする構造部分の親水性部分が大きい場合、薬剤の腸管吸収や膜透過性を考慮して、疎水性残基で、親水性部分を囲むようにするとよい。

実際に本研究では、計算機を用いて、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は、以下の点を特に考慮した。(A) 活性中心にある Mg^{2+} イオンとキレートするような結合様式を有効に活用する。フラン環やチオフェンとその近傍の酸素原子が適当な間隔を空けて配置する構造は (図 16 赤)、 Mg^{2+} イオンへのキレートに適しており、これまでスクリーニングで得られた化合物の多くが、この基本骨格を持っている。(B) フラン環やチオフェンにはニトロ基あるいは硫酸基を付加すると良い。これは水溶性を上げる効果と RNaseH 側のアミノ酸と水素結合を形成する役目を持っている (図 16 青)。(C) フラン環あるいはチオフェンと反対側には、疎水相互作用をする領域が必要である。本研究では 2 つのベンゼン環を配置した。標的ドメインの結合部位を十分に適切に埋めるために、ジアゾ基を導入した (図 16 橙)。

設計した化合物は、既存の認可薬との共通の構造を持たせることにも配慮している。これは合成の実績がある構造であることと、副作用の出にくい構造であることを担保するためである。図 17 に示すように中央のペプチド結合は、プロテアーゼ阻害剤によく見られる構造であり、例えば初期の HIV-1 プロテアーゼ阻害剤のリトナビルには、ペプチド結合が含まれている。末端の硫酸基はタウリンの主用骨格である。図 18 に示すようにアゾベンゼンは、サラゾサルファピリジンに含まれている構造であり、サラゾサルファピリジンの主用骨格となっている。またシアノ基も、これを含む医薬品が実際に存在している。従って、既に認可された医薬品に使用されていることから、その部分構造が重篤な健康被害を生じる可能性が低くなっている。

本研究で対象としている化合物構造は、RNaseH 活性だけでなく、他の HIV 酵素活性の阻害効果も期待できる。図 19 は、最近、国内でも承認され

た HIV インテグラーゼ阻害剤のラルテグラビルの構造を示している。オキサジアゾールの部分はフラン環あるいはチオフェンと同等の骨格を持っている。逆転写酵素の RNaseH ドメインも HIV インテグラーゼも、核酸を分解する機能がある。従って、フラン環、チオフェン、オキサジアゾールの部分は、有効に核酸を捕捉する働きがあるものと予想される。

E. 結論

活性薬物と標的タンパク質の結合に関して、Glide および Gold (という 2 種類のドッキングソフトウェアを使用して解析した結果、両者で類似の結合構造が得られた。これにより、活性を持つ基本骨格が判り、その結合構造も大よそ確認できたことで、以後の薬物設計の足掛りを得た。

生化学実験でのスクリーニングによって見出された RNaseH に対する阻害活性を持つ薬物の構造をもとに、新規の化合物を考案した。考案した薬物について、RNaseH との結合構造をドッキングシミュレーションにより予測し、有望な化合物構造を 2 つ選び出した。それらについて、有機合成を試みた。期間内に一方の化合物の合成に成功した。この化合物について生化学実験により活性の評価を行っている。今後、合成に成功した化合物を足掛かりとして、幾つかの化合物の合成を実施し、より有望な RNaseH 阻害活性化合物を探索する予定である。

設計合成した化合物は HIV インテグラーゼ阻害剤とも類似した構造を持っている。これは阻害作用機構が、承認済みの阻害剤と共通であることを意味しており、HIV の酵素阻害剤として効果が期待できる。またマルチターゲット薬に発展する可能性も秘めた化合物構造であることが示唆され

る。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ode, H., Neya, S., Hata, M., Sugiura, W., Hoshino, T. : Computational Simulations of HIV-1 Proteases -Multi-drug Resistance Due to Nonactive Site Mutation L90M-, J. Am. Chem. Soc., 128, 7887-7895 (2006)
- Miyachi, K., Curran, R., Matthews, E., Komano, J., Hoshino, T., Engelman, D. M., 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., 59, 77-84 (2006)
- Ode, H., Matsuyama, S., Hata, M., Hoshino, T., Kakizawa, J., Sugiura, W. : Mechanism of Drug Resistance Due to N88S in CRF01_AE HIV-1 Protease Analyzed by Molecular Dynamics Simulations, J. Med. Chem. 50, 1768 - 1777 (2007)
- Ode, H., Matsuyama, S., Hata, M., Neya, S., Kakizawa, J., Sugiura, W., Hoshino, T. : Computational Characterization of Structural Role of the Non-active Site Mutation M36I of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease, J. Mol. Biol. 370, 598-607 (2007)
- Hoshino, T., Iwamoto, K., Ode, H., Ohdomari, I. : Accurate evaluation method of molecular binding affinity from fluctuation frequency. Jpn. J. Appl. Phys.

47, 3719-3725 (2008)

- Katagiri, D., Fuji, H., Neya, S., Hoshino, T. : Ab initio Protein Structure Prediction with Force Field Parameters Derived from Water Phase Quantum Chemical Calculation. *J. Comput. Chem.* 29, 1930-1944 (2008)
- Fuji, H., Suzuki, M., Neya, S., Hoshino, T. : Development of Software Program Predicting the Binding Site and the Binding Mode of Ligands Against a Target Protein. *e-J. Surf. Sci. Nanotechnol.* 6, 241-245 (2008)

2. 総説

- 星野忠次, 大出裕高: HIV プロテアーゼ阻害剤とウイルスの薬剤耐性、分子構造から考える薬物の作用機序(11)、*医薬ジャーナル*、Vol. 43. No. 12. pp.5-11 (2007)
- 大出裕高, 横幕能行, 松山翔, 伊部史朗, 藤崎誠一郎, 間宮均人, 濱口元洋, 金田次弘, 星野忠次 : コンピュータ・シミュレーションで薬剤耐性 HIV-1 に対する薬効の予測は可能か? 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会学会報告サマリー集 グラクソ・スミスクライン社編集 (2008)

3. 学会発表

- 大出裕高, 松山翔, 畑晶之, 根矢三郎, 杉浦互, 星野忠次 「HIV-1 プロテアーゼ Non-active Site 変異による薬剤耐性の分子動力的機構解析」日本薬学会第 126 年会要旨集-2, 37 (2006) 仙台
- 成田友之, 横幕能行, 宮内浩典, 松田善衛, 松田昌和, 杉浦互, 根矢三郎, 星野忠次 「HIV-1 薬剤耐性評価における HIV-1 プロテアーゼ活

性測定システムの構築」日本薬学会第 126 年会要旨集-3, 103 (2006) 仙台

- Ode, H., Matsuyama, S., Neya, S., Hata, M., Sugiura, W., Hoshino, T., “NFV-Resistant Mechanism due to Non-active Site Mutation N88S on Subtype AE HIV-1 PRs.”, 2006 Annual Meeting of CBI Society, Proceedings, 54 (2006) Tokyo, Japan
- Fuji, H., Tatsumi, J., Komano, A., Hoshino, T., “Development of HIV-1 RNaseH inhibitor by Computer-Assisted Drug Design.”, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Program p.442, (2006) Okinawa, Japan
- 藤秀義, 辰巳絢子, 駒野淳, 星野忠次 「HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNase H 活性阻害薬の開発 -in silico 解析による作用機序解析と最適化の試み-」第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 214 (2006) 東京
- 大出裕高, 松山翔, 柿澤淳子, 杉浦互, 星野忠次 「CRF01_AE HIV-1 における NFV 耐性変異 N88S の出現メカニズムに関する構造的知見」第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 241 (2006) 東京
- 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 藤秀義, 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 54 回日本ウイルス学会学術集会 (2006) 東京
- 大出裕高, 松山翔, 畑晶之, 根矢三郎, 杉浦互, 星野忠次 「HIV-1 プロテアーゼ Non-active Site 変異 M36I の分子動力的機能解析」日本薬学会第 127 年会要旨集-3, 53