

200820033A

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 H19-エイズ-若手-003

多剤耐性HIVにおける将来的な変異・構造予測と
新規抗HIV薬開発

総括・分担 研究報告書

平成21年4月

主任研究者 川下 理日人
大阪大学大学院薬学研究科・助教

目次

I. 平成20年度 総括・分担研究報告書	1
主任研究者 川下 理日人 (大阪大学大学院薬学研究科 微生物動態学分野)	
II. 平成20年度 分担研究報告書	6
1. HIVプロテアーゼにおける構造活性相関研究	6
岡本 晃典 (大阪大学大学院 薬学研究科 微生物動態学分野)	
2. 新規膜融合阻害剤の構造解析	10
中村 昇太 (大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター)	
3. HIVプロテアーゼにおける配列解析および進化予測のためのプログラム開発	14
後藤 直久 (大阪大学微生物病研究所附属 遺伝情報実験センター ゲノム情報解析分野)	
4. タイにおけるHIV配列の特徴及び進化傾向の予測	17
U. Chandimal de Silva (大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター)	
III. 研究成果の刊行物・一覧	20
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	24

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総括・分担研究報告書

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

主任研究者：川下 理日人（大阪大学大学院 薬学研究科 微生物動態学分野 助教）

当該年度は3年計画の2年目にあたる。

<研究要旨>

HIV 感染症は種々の抗 HIV 薬の開発やカクテル療法（HAART）の確立により、先進諸国においては慢性疾患へと変化している。しかしながら、HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであり、現実として多剤耐性ウイルスも出現している。それゆえ、既存のカクテル療法に限界が生じるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。これらは既存のカクテル療法と組み合わせることにより、さらに大きな効果を上げるものと期待されている。しかし、それら新しい作用機序を有する抗 HIV 薬においても、耐性ウイルスが既に報告されており、これらに対して何らかの対策を取る必要が生じている。

そこで、もしこれらの耐性変異が生じる位置、およびそれらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルスが生じた際にも速やかに対処できると思われる。よって、本研究ではそのような背景下、理論面と実験面から研究を行う予定であり、本年度はプロテアーゼの網羅的な配列解析データを用いた系統樹作成と構造活性相関研究を行うことにより、薬剤耐性プロテアーゼに関する変異予測に利用する基礎データの蓄積を行った。また、膜融合阻害剤に関してはランダムスクリーニングを用いることで、既知の阻害剤と同等程度の活性を有するペプチドを発見した。

分担研究者（4名）

- ・岡本晃典（大阪大学大学院 薬学研究科 微生物動態学分野 助教）
- ・中村昇太（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任助教）
- ・後藤直久（大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター ゲノム情報解析分野 助教）
- ・U. Chandimal de Silva（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任研究員）

A. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであるため、多剤耐性ウイルスが出現し、既存の HAART に限界が生じると予想される。そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。

そこで、これらの耐性変異が生じる位置・構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに新規阻害剤を設計することが可能となる。また、その耐性を計算科学的に速やかに評価することにより、HAART における

薬剤選択にも有用となる。よって、本研究ではそのような背景下、以下の6つの項目に沿って研究を行う。

- ①耐性ウイルスに対する網羅的配列解析と変異傾向の把握
- ②多剤耐性ウイルス蛋白質に対する構造予測および阻害剤予測
- ③今後起こりうる耐性変異の予測とそれら変異蛋白質の構造予測
- ④構造未知蛋白質のX線結晶構造解析
- ⑤膜融合阻害剤等、新規作用機序を有する抗HIV薬の分子設計
- ⑥ドッキングスタディを活用した薬剤耐性の評価法確立

本年度は前年度の結果を利用して、CRF01_AEの薬剤耐性出現の傾向を系統樹解析により調査し、定量的構造活性相関(QSAR)を用いて、プロテアーゼ阻害剤と薬剤感受性との関連を検討した。また、膜融合阻害剤では、前年度の計算により候補となったペプチドを購入し、実験的な評価を行った。

B. 研究方法

<プロテアーゼ阻害剤・系統解析>

前年度に解析を行ったHIV-1 CRF01_AEプロテアーゼ配列のうち、日本とタイ由来の株に着目し、MAFFTによるアライメント後、MEGA 4.0にて系統樹を作成した。次に、この系統樹上に薬剤耐性データを対応した。

なお、薬剤耐性変異データはLos Alamos HIV Databases中のResistance DatabaseおよびStanford UniversityによるHIV Drug Resistance Database中のHIVdb programを用いた。

<プロテアーゼ阻害剤・定量的構造活性相関(QSAR)>

10種のCRF01_AEプロテアーゼにおける実験データと、9種のFDA認可阻害剤における構造記述子(構造の特性を表す)を用いてQSAR式(構

造と活性の相関を表す)を構築した。構造記述子は二次元記述子・三次元記述子合わせて232種類算出し、ここから分散が0となるもの、記述子間の相関係数が0.8以上かつ実験値との相関性が低いものを除外した。残った記述子を用いてPLS(Partial Least Square)を行い、QSAR式を構築した。なお、実験データは研究協力者の亀岡正典特任准教授より入手し、QSAR式の計算にはMOE(CCG社)を用いた。

<膜融合阻害剤>

前年度で得たC-HR類似ペプチドのうち、既知阻害剤よりエネルギーが安定なものを抽出し、MOEを用いた分子動力学法によりN-HRとC-HRとの相互作用エネルギーを計算した。次に、相互エネルギーが高いものからランダムに10個選択し、合成ペプチドを購入した。

これら10種のペプチドと対照ペプチドT-20を用いて、8種のCRF01_AE型ウイルスに対し、実験的な評価を行った。なお本実験は、研究協力者の亀岡正典特任准教授が行ったものである。

(倫理面への配慮)

配列解析や系統解析、および計算化学的手法を用いた分子設計に関しては、ヒトの遺伝子や個人情報等の利用がないため、考慮する必要はない。もし、研究協力者がウイルス関係の実験を行うに当たって、個人の血液サンプル等を用いる場合は、倫理委員会の規定に則り、担当研究者以外にその個人情報が漏れないよう十分配慮する。

C. 研究結果

<プロテアーゼ阻害剤・系統解析>

系統解析の結果、薬剤耐性を有するウイルスは3つのクラスターに分類された。また、クラスター中での共通配列を参照配列と比較したところ、2つのクラスターでそのアミノ酸が異なっていることがわかった。

<プロテアーゼ阻害剤・定量的構造活性相関(QSAR)>

計算された QSAR 式の相関を見たところ、10 種のうち 9 種のウイルス株に対して良好な QSAR 式が得られた。また、ダルナゼルは他の阻害剤と異なる作用を有することが報告されているため、これを除外した 8 種の阻害剤を用いて同様の検討を行ったところ、全ウイルス株に対して良好な QSAR 式が得られた。

<膜融合阻害剤>

購入した 10 種類のペプチドのうち、6 種に関してはほとんど活性がなかった。しかし、1 種は 2 つのウイルス株に対して、2 種は 4 つのウイルス株に対して T-20 と同程度の活性がみられた。さらに、もう 1 種のペプチドでは、全ウイルス株に対して T-20 と同程度の活性がみられた。

D. 考察

<プロテアーゼ阻害剤・系統解析>

基本的に FDA 承認が古い薬剤ほど薬剤耐性が高かったが、興味深いことにタイではプロテアーゼの利用が少ないにも関わらず、未使用の阻害剤に対する耐性傾向が観測された。このことは、薬剤耐性ウイルスが国外からもたらされたのではないかと示唆される。

<プロテアーゼ阻害剤・定量的構造活性相関 (QSAR) >

上記で得られた QSAR 式を解析した結果、分子の形状、正電荷に関係する構造記述子が重要であることがわかった。これはプロテアーゼ阻害剤に重要となる残基が負電荷をもつアスパラギン酸であることから、妥当であると考えている。

<膜融合阻害剤>

最も活性のあるペプチドの配列を調べたところ、ヘリックスの外側部分を中心に改変したものであった。すなわち、ヘリックスをより強固にすることで、内側ヘリックスとの相互作用の際に構造が崩れず、より強い相互作用が維持できるのでは無いかと考えている。

E. 結論

今回我々は、系統解析・構造活性相関など、

計算機を用いた手法を利用して、薬剤耐性プロテアーゼに関する情報を得た。また、膜融合阻害剤に関しては、分子動力学計算で得た結果をもとに設計したペプチドを用いて実験的な評価を行い、T-20 と同等程度の活性を得ることができた。

今年度までの検討結果を活用して、薬剤耐性を有するウイルスの情報提供、薬剤耐性を有するウイルスに対抗できる阻害剤の開発を行い、今後もエイズ治療対策への貢献を行っていきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

<欧文>

- 1) Sakudo A., Baba K., Tsukamoto M., Sugimoto A., Okada T., Kobayashi T., **Kawashita N.**, Takagi T., Ikuta K. Anionic polymer, poly(methyl vinyl ether-maleic anhydride)-coated beads-based capture of human influenza A and B virus, *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 752-757, (2009).
- 2) Nishikiori R., Yamaguchi M., Takano K., Enatsu T., Tani M., de Silva U. C., **Kawashita N.**, Takagi T., Morimoto S., Hangyo M., Kawase M. Application of Partial Least Square on Quantitative Analysis of L-, D-, and DL-Tartaric Acid by Terahertz Absorption Spectra, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 305-307, (2008).
- 3) Ohgaru T., Shimizu R., Okamoto K., **Kawashita N.**, Kawase M., Shirakuni Y., Nishikiori R., Takagi T. Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic Partial Least Squares, *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 910-917, (2008).
- 4) Nishikiori R., Makino Y., Ochi Y., Yamashita N., Okamoto K., **Kawashita N.**, Takahara J.-i., Yasunaga T., Takagi T., Kawase M. Development of Fingerprint Verification Type Self-Organized Map

Applied to Profiling Seized Methamphetamine. *J. Comput. Aided Chem.*, **9**, 30–36, (2008).

- 5) Ohgaru, T., Shimizu, R., Okamoto, K., **Kawashita, N.**, Kawase, M., Shirakuni, Y., Nishikiori, R., Takagi, T.
Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic Partial Least Squares,
J. Chem. Inf. Model., **48**, 910-917, (2008).

<和文>

1) **川下理日人**

目指せ！第2世代のHIVインテグラーゼ阻害剤
ファルマシア、2008年12月号

2. 学会発表

<国際学会>

- 1) Yamasaki H.; Ohgaru T.; Okamoto K.; **Kawashita, N.**; Takahara J.; Yasunaga T.; Takagi T.
Refinement of Regression Discrimination Analysis,
The 8th China-Japan Joint Symposium on Drug
Design and Development, Kobe, 2008.11.
- 2) Matsuura A.; Hidaka S.; Okamoto K.; **Kawashita, N.**; Kawase M.; Yasunaga T.; Takagi T.
DNA Microarray Data Analyses Using
Perceptron-Type Methods,
The 8th China-Japan Joint Symposium on Drug
Design and Development, Kobe, 2008.11.
- 3) Hidaka S.; Matsuura A.; Yamasaki H.; Ohmayu Y.;
Okamoto K.; **Kawashita, N.**; Takagi T.
Nonlinear classification of drug-induced
arrhythmogenic activity,
The 8th China-Japan Joint Symposium on Drug
Design and Development, Kobe, 2008.11.
- 4) Ohgaru T.; Shimizu R.; Okamoto K.; **Kawashita, N.**;
Kawase M.; Shirakuni Y.; Nishikiori R.; Takagi T.
Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic
PLS,
The 8th China-Japan Joint Symposium on Drug
Design and Development, Kobe, 2008.11.

- 5) Matsuura A.; Hidaka S.; Ochi Y.; Okamoto K.;
Kawashita, N.; Nishikiori R.; Kawase M.; Yasunaga
T.; Takagi T. Extraction sites discrimination for
medicinal plants using multivariate analyses.
The 4th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on
Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Kyoto,
2008.4

<国内学会>

- 1) 栗花落昇平、岡本見典、尾形直紀、**川下理日人**、
高原淳一、高木達也
化学物質の環境運命予測を目指した、光分解・加
水分解反応データベースの構築
日本薬学会第129年会、京都、2009年3月
- 2) 杉本裕昌、**川下理日人**、田雨時、柏田理恵、岡
本見典、亀岡正典、川瀬雅也、安永照雄、高木達
也
新規HIVプロテアーゼ阻害剤を指向した定量的
構造活性相関(QSAR)
日本薬学会第129年会、京都、2009年3月
- 3) 安田匡志、**川下理日人**、柏田理恵、田雨時、岡
本見典、川瀬雅也、安永照雄、高木達也
ドッキングスタディを利用したインフルエンザ
ノイラミニダーゼ阻害剤の薬剤耐性評価
日本薬学会第129年会、京都、2009年3月
- 4) 田雨時、**川下理日人**、柏田理恵、岡本見典、
亀岡正典、安永照雄、生田和良、高木達也
HIV gp41の分子動力学計算による相互作用解析
次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマ
フォーラム2009、大阪、2009年3月
- 5) 大眉佳大、白石寛明、岡本見典、日高伸之介、
高原淳一、**川下理日人**、高木達也
3次元記述を用いた生態毒性予測モデルの構
築 第32回構造活性相関シンポジウム、神戸、
2008年11月
- 6) 石塚賢彦、大軽貴典、日高伸之介、山崎広之、
高原淳一、岡本見典、**川下理日人**、安永照雄、高
木達也 Druglikenessを有する化合物の oral
bioavailability予測
第32回構造活性相関シンポジウム、神戸、2008
年11月

- 7) 川瀬倫子、水田浩之、川下理日人、鷹岡昭夫、
長谷川紀昭、山田直子、生田和良
高細胞融合能を示す非感染性HIV-1 粒子のEnv
gp41 へのアミノ酸変異導入の効果
第回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10
月
- 8) 川瀬倫子、水田浩之、川下理日人、生田和良

高細胞融合能を示す非感染性HIV-1 粒子のEnv
gp41 へのアミノ酸変異導入の効果
第22回近畿エイズ研究会学術集会、奈良、2008
年6月

- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
なし。

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

分担研究者：岡本 晃典（大阪大学大学院 薬学研究科 微生物動態学分野 助教）

分担研究課題：HIV プロテアーゼにおける構造活性相関研究

<研究要旨>

HIV 感染症は種々の抗 HIV 薬の開発やカクテル療法（HAART）の確立により、先進諸国においては慢性疾患へと変化している。しかしながら、HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであり、現実として多剤耐性ウイルスも出現している。それゆえ、既存のカクテル療法に限界が生じるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。これらは既存のカクテル療法と組み合わせることにより、さらに大きな効果を上げるものと期待されている。しかし、それら新しい作用機序を有する抗 HIV 薬においても、耐性ウイルスが既に報告されており、これらに対して何らかの対策を取る必要が生じている。そこで、もしこれらの耐性変異が生じる位置、およびそれらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルスが生じた際にも速やかに対処できると思われる。

本分担研究では、阻害剤の分子パラメータと HIV プロテアーゼの構造情報を利用した定量的構造活性相関研究を行い、阻害剤の分子パラメータとウイルスを用いた感受性試験における活性値間の良好な QSAR 式を構築することができた。

A. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、多剤耐性ウイルスが出現しやすいウイルスであるため、既存の HAART に限界が生ずるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。しかし、それらに対しても耐性ウイルスが既に報告されており、さらなる対策が必要となる。

そこでこれら耐性変異が生じる位置、それらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに対処可能となる。

そのような背景下、本年度は定量的構造活性相

関（QSAR）解析を用いて、蛋白質と阻害剤の構造活性相関の面から、薬剤耐性を見積もることができないかと考え、阻害剤の分子パラメータとウイルス感受性試験の結果を利用した QSAR 解析を行った。

B. 研究方法

10 種の CRF01_AE プロテアーゼにおける実験データと、9 種の FDA 認可阻害剤における構造記述子（構造の特性を表す）を用いて QSAR 式（構造と活性の相関を表す）を構築した。構造記述子は二次元記述子・三次元記述子合わせて 232 種類算出し、ここから分散が 0 となるもの、記述子間の相関係数が 0.8 以上かつ実験値との相関性が低

いものを除外した。残った記述子を用いて PLS (Partial Least Square) を行い、QSAR 式を構築した。なお、実験データは研究協力者の亀岡正典特任准教授より入手し、QSAR 式の計算には MOE (CCG 社) を用いた。

(倫理面への配慮)
特になし。

C. 研究結果

計算された QSAR 式の相関を見たところ、10 種のうち 9 種のウイルス株に対して良好な QSAR 式が得られた。また、ダルナビルは阻害様式として二量化阻害も考えられているため、これを除外した 8 種の阻害剤を用いて同様の検討を行ったところ、全ウイルス株に対して良好な QSAR 式が得られた。

D. 考察

有効な記述子の中で、Q_VSA_PPOS(分子表面の正の極性を表す)が正の相関を示しており、HIV プロテアーゼの活性部位が負の電荷を持つアスパラギン酸を中心として構成されていることから妥当である。他にも水との親和性や分子の形状に関わる記述子が有効とされており、これらも活性に関わる要因であると考えられる。

E. 結論

今回我々は、HIV プロテアーゼの QSAR 式を構築することにより、薬理活性を示す特徴的な構造記述子を同定した。

現在のところ、薬剤感受性株に対する解析が中心であるが、この情報を薬剤耐性ウイルスにも適用して、その構造記述子の変化と薬剤耐性との相関を議論することにより、薬剤耐性ウイルスの簡便な同定法へと適用可能ではないかと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

<欧文>

- 1) Hiromatsu K.; Takahara J.; Nishihara T.; **Okamoto K.**; Yasunaga T.; Ohmayu Y.; Takagi T.; Nakazono K. Prediction for Biodegradability of Chemicals by Kernel Partial Least Squares. *J. Comput. Aided Chem.*, **10**, 1-9, (2009).
- 2) Kanbayashi, Y.; **Okamoto, K.**; Ogaru, T.; Hosokawa, T.; Takagi, T. Statistical validation of the relationships of cancer pain relief with various factors using ordered logistic regression analysis. *Clinical J. Pain*, **25**, 65-72, (2009).
- 3) Kanbayashi Y.; Nomura K.; Fujimoto Y.; Yamashita M.; Ohshiro M.; **Okamoto K.**; Matsumoto Y.; Horiike S.; Takagi T.; Ishida Y.; Taniwaki M. Risk factors for infection in haematology patients treated with rituximab. *Eur. J. Haematol.*, **82**, 26-30, (2009).
- 4) Takeuchi M.; **Okamoto K.**; Takagi T.; Ishii H. Ethnic difference in inter-East Asian subjects with normal glucose tolerance and impaired glucose regulation: a systematic review and meta-analysis focusing on fasting serum insulin. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **82**, 383-390, (2008).
- 5) Takeuchi M.; **Okamoto K.**; Takagi T.; Ishii H. Ethnic difference in patients with type 2 diabetes mellitus in inter-East Asian populations: A systematic review and meta-analysis focusing on fasting serum insulin. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **81**, 370-376, (2008).
- 6) Kanbayashi, Y.; Nomura, K.; Fujimoto, Y.; Shimura, K.; Shimizu, D.; **Okamoto, K.**; Matsumoto, Y.; Horiike, S.; Shimazaki, C.; Takagi, T.; Taniwaki, M. Population Pharmacokinetics of Itraconazole Solution Used as Prophylaxis for Febrile Neutropenia. *Int. J. Antimicrobial Agents*, **31**, 452-457, (2008).

- 7) Ohgaru, T.; Shimizu, R.; **Okamoto, K.**; Kawase, M.; Shirakuni, Y.; Nishikiori, R.; Takagi, T. Ordinal Classification Using Comparative Molecular Field Analysis, *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 207-212, (2008).
- 8) Ohgaru, T., Shimizu, R., **Okamoto, K.**, Kawashita, N., Kawase, M., Shirakuni, Y., Nishikiori, R., Takagi, T. Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic Partial Least Squares, *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 910-917, (2008).
2. 学会発表
- <国際学会>
- 1) Yamasaki H.; Ohgaru T.; **Okamoto K.**; Kawashita N.; Takahara J.; Yasunaga T.; Takagi T. Refinement of Regression Discrimination Analysis. The 8th China-Japan Joint Symposium on Drug Design and Development, Kobe, 2008.11.
- 2) Matsuura A.; Hidaka S.; **Okamoto K.**; Kawashita N.; Kawase M.; Yasunaga T.; Takagi T. DNA Microarray Data Analyses Using Perceptron-Type Methods, The 8th China-Japan Joint Symposium on Drug Design and Development, Kobe, 2008.11.
- 3) Hidaka S.; Matsuura A.; Yamasaki H.; Ohmayu Y.; **Okamoto K.**; Kawashita N.; Takagi T. Nonlinear classification of drug-induced arrhythmogenic activity, The 8th China-Japan Joint Symposium on Drug Design and Development, Kobe, 2008.11.
- 4) Ohgaru T.; Shimizu R.; **Okamoto K.**; Kawashita N.; Kawase M.; Shirakuni Y.; Nishikiori R.; Takagi T. Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic PLS, The 8th China-Japan Joint Symposium on Drug Design and Development, Kobe, 2008.11.
- 5) Matsuura A.; Hidaka S.; Ochi Y.; **Okamoto K.**; Kawashita N.; Nishikiori R.; Kawase M.; Yasunaga T.; Takagi T. Extraction sites discrimination for medicinal plants using multivariate analyses, The 4th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Kyoto, 2008.4
- <国内学会>
- 1) 栗花落昇平、**岡本晃典**、尾形直紀、川下理日人、高原淳一、高木達也
化学物質の環境運命予測を目指した、光分解・加水分解反応データベースの構築
日本薬学会第129年会、京都、2009年3月
- 2) 杉本裕昌、川下理日人、田雨時、柏田理恵、**岡本晃典**、亀岡正典、川瀬雅也、安永照雄、高木達也
新規 HIV プロテアーゼ阻害剤を指向した定量的構造活性相関 (QSAR)
日本薬学会第129年会、京都、2009年3月
- 3) 安田匡志、川下理日人、柏田理恵、田雨時、**岡本晃典**、川瀬雅也、安永照雄、高木達也
ドッキングスタディを利用したインフルエンザノイラミニダーゼ阻害剤の薬剤耐性評価
日本薬学会第129年会、京都、2009年3月
- 4) 井口拓馬、Ximei WU、伊藤徳夫、**岡本晃典**、高木達也、田中慶一、中西剛、永瀬久光
アスコルビン酸によるヒト胎盤ステロイドホルモン産生促進作用におけるビタミンC輸送系の関与
日本薬学会第129年会、京都、2009年3月
- 5) 渡辺俊輔、原田雅史、高橋由武、山下典之、伊藤世士洋、**岡本晃典**、高木達也
脳血流 SPECT 画像の多変量解析による診断支援
第31回情報化学討論会、東京、2008年11月
- 6) 大塚佳大、白石寛明、**岡本晃典**、日高伸之介、高原淳一、川下理日人、高木達也
3次元記述子を用いた生態毒性予測モデルの構築
第32回構造活性相関シンポジウム、神戸、2008年11月
- 7) 石塚賀彦、大軽貴典、日高伸之介、山崎広之、高原淳一、**岡本晃典**、川下理日人、安永照雄、高

- 木達也 Druglikeness を有する化合物の oral bioavailability 予測
第 32 回構造活性相関シンポジウム、神戸、2008 年 11 月
- 8) 大城宗生、野村憲一、神林祐子、藤本佳子、**岡本晃典**、高木達也、谷脇雅史
- 発熱性好中球減少症予防としてのイトラコナゾールシロップの母集団薬物動態解析
第 70 回日本血液学会総会、京都、2008 年 10 月
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）なし。

<研究要旨>

膜融合阻害剤 SC34EK は HIV-1 の膜蛋白質 gp41 の部分配列 C34 を改良して設計された合成ペプチドである。我々はこの新規の膜融合阻害剤 SC34EK の溶液物性及び、その構造を調べた。その結果、この SC34EK は gp41 の相互作用部位のペプチドと C34 よりも強い相互作用を形成し、設計通りの構造を有していることを明らかにした。これらの結果は今後の膜融合阻害剤の設計・改良に非常に有用であると考えられる。

A. 研究目的

エイズによる死亡率は 3 剤のカクテル療法である HAART によって大幅に低減されたが、HIV は患者要因などによって隙を見せると即適応し、耐性変異を獲得する例が多く報告されている。この急速な HIV の進化速度に対抗し、完全にエイズを克服するためには、異なる作用機序の薬剤を開発し続ける必要がある。1994 年 Wild らに報告された合成ペプチド DP-178 が抗 HIV 活性を示したことが明らかになってから長年の研究の後、その作用機序が膜融合阻害であることが明らかとされた。2003 年に膜融合阻害剤として米国 FDA に認可された Enfuvirtide は HAART 療法の失敗例を救う有力な薬剤として登場したが、HIV の驚異的な進化力は、この膜融合阻害剤にもすぐに耐性変異を生み出した。特に Enfuvirtide が作用すると考えられている HIV 膜タンパク gp41 領域に存在する V38A、N43D 等の変異は Enfuvirtide の結合性を著しく低下させることを我々のグループは明らかとしてきた。実際、Enfuvirtide を長期間使用した患者血漿から上記の変異を有するウイルスが分離されることが明らかとなっている。よってこれらのウイルス複製を抑制しうるペプチドの開発が望まれている。

膜融合阻害剤 Enfuvirtide は、プロテアーゼ阻害剤のような酵素の活性部位の空間的に非常に限られた部位の阻害ではなく、膜蛋白質 gp41 の 150 残基を超える広範なヘリックス領域が作用部位である。したがって新たな作用部位を Enfuvirtide が作用する領域から外して設定し薬剤を開発することが可能であり、Enfuvirtide との交差耐性を回避することが可能であると考えられる。我々は京都大学薬学研究科 藤井信孝教授、ウイルス研究所 児玉栄一助教らのグループと共同で新たな膜融合阻害剤 SC34EK の開発を行っている。SC34EK は gp41 の C 末端側 34 残基の領域(C34)を基に、電荷アミノ酸 Glu、Lys への 13 残基置換によって、その安定化、阻害能の向上を目指し設計した合成ペプチドであり、Enfuvirtide 耐性 HIV にも効果を示す優れたペプチドである。本研究ではこの高活性をしめす SC34EK の熱力学的、構造学的解析を行った。

B. 研究方法

1. N36-SC34EK の円二色性スペクトル測定

C34 は相互作用する N36 と安定な 6 本鎖ヘリックスバンドルの複合体を形成する。この複合体の

ヘリシティの熱依存性を円二色性分散計で測定することにより、その安定性を見積もることができる。我々は本来のウイルスの配列である C34 と SC34EK の安定性を比較した。

2. N36-SC34EK 複合体の X 線結晶構造解析

SC34EK の設計では 34 残基中 13 残基の溶媒側に位置するアミノ酸を電荷アミノ酸 Glu と Lys に変化させた。これは 6 本鎖複合体を形成した際に、Glu と Lys が塩橋を形成し (EK モチーフ)、その相互作用効果により阻害能の向上を目指したものである。我々は、この設計を確かめるために N36-SC34EK 複合体の X 線結晶構造解析を行った。

N36-SC34EK の結晶化スクリーニングの結果、リザーバー条件が 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)、200 mM 硫酸アンモニウム、14% PEG2000、4°C の条件下でハンギングドロップ蒸気拡散法により六角柱型の結晶が得られた。クライオ条件の探索の結果、35% キシリトールのリザーバーへの添加条件へ、段階的に条件変更することによってクライオ条件下で安定に結晶が保持できた。回折強度測定を SPring-8 BL38B1 で行い、最高到達分解能 2.1 Å の回折データを得た。位相決定は野生型構造を用いた分子置換法により行い、最終的に R/R_{free} 値 0.213/0.238 まで構造精密化を行った。

C. 研究結果

1. SC34EK の安定性

まず C34 や SC34EK 単体でのヘリシティを CD スペクトル測定により確認した。その結果、C34 に比べ、SC34EK はヘリシティの向上が見られた。次に 6 本鎖ヘリックスバンドルの熱変性測定の結果、N36-SC34 複合体の変性中点の温度は 52.0°C であるのに対し、N36-SC34EK 複合体の温度は 69.5°C であった。これらの結果から SC34EK は C34 よりも安定な 6 本鎖ヘリックスバンドルを形成し、生

理的な gp41 分子内結合よりも結合能が増加し、その結果阻害能が高いことが期待された。

2. N36-SC34EK の構造

得られた構造は中央に N36 の 3 本のヘリックスバンドルが形成され、それを 3 本の SC34EK が囲んだ典型的な 6 本鎖ヘリックスバンドル構造を有していた。既報の野生型 N36-C34 複合体 (Chan DC et al. Cell 89:263-73, 1997) と比較の結果、主鎖原子の RMSD (二乗平均偏差の平方根) が 0.59 Å と非常に良い一致を示した。N36 と SC34EK 間に形成されるトリプトファンリッチドメインやロイシンジッパーなどの疎水相互作用面は完全に保存されていた。導入された EK モチーフは設計通り全て溶媒側に位置しており、この導入の結果、電荷アミノ酸が占める表面積の割合が、野生型では 35% であるのに対し、N36-SC34EK 複合体では 60% であった。これらの EK モチーフは塩橋や水素結合に見られる直接的な相互作用様式を示さなかった。分子表面全体で形成される静電相互作用の改善が N36-SC34EK 複合体の安定化に寄与したと考えられる。

D. 考察

並行して行った共同研究者による SC34EK の活性測定から、Enfuvirtide の抗 HIV 活性 ($EC_{50} = 35 \pm 17$ nM) と比べ SC34EK の活性 ($EC_{50} = 0.7 \pm 0.3$ nM) が強いことが明らかになった。また現在臨床で問題となっている主な Enfuvirtide 耐性ウイルスにも抗 HIV 活性 ($EC_{50} = 4.4 \pm 0.5$ nM) を維持していた。これらはこの研究で明らかにした SC34EK の物性と構造が、ウイルスと細胞を用いた *in vivo* の系でも反映され、その安定な複合体形成能が阻害効果を増強していると考えられる。そのため SC34EK は Enfuvirtide 耐性ウイルスに効果を示すだけでなく、基本になった C34 耐性ウイルスに対してもそ

の強い活性を有していた。しかし、gp41 のアミノ酸配列が大きく異なる HIV-2 に対する活性は Enfuvirtide と同様に低下していた。これらのことから、SC34EK は非特異的に gp41 に結合し阻害効果を示すのではなく、その高い特異性を維持していることから、臨床応用においても副作用を起こしにくいと考えられる。また、EK モチーフの導入により水溶性が上昇していることから吸収性が増加すると考えられ、現在問題となっている投与部位の激しい炎症反応の低減にもつながる可能性がある。

現在、SC34EK に対する耐性ウイルスを試験管内で誘導しているが、これまでのところ T-20 のように単一変異によって耐性化するような変異は認められていない。今後はこれらの耐性変異を有するペプチドの立体構造をさらに明らかとし、より耐性化しにくいペプチド合成や経口可能な小分子化合物の開発に役立つ情報を得たいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Nakamura S.**, Yang C.-S., Sakon N., Ueda M., Tougan T., Yamashita A., Goto N., Takahashi K., Yasunaga T., Ikuta K., Mizutani T., Okamoto Y., Tagami M., Morita R., Maeda N., Kawai J., Hayashizaki Y., Nagai Y., Horii T., Iida T., Nakaya T.
Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Nasal and Fecal Specimens using an Unbiased High-throughput Sequencing Approach
PLoS ONE, **4**, e4219, (2009).
- 2) Nishikawa, H., **Nakamura, S.**, Kodama, E., Ito, S., Kajiwara, K., Izumi, K., Sakagami, Y., Oishi, S.,

Ohkubo, T., Kobayashi, Y., Otaka, A., Fujii, N., and Matsuoka, M.

Electrostatically constrained alpha-helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide.
Int. J. Biochem. Cell. Biol., **41**, 891-899, (2009).

- 3) Hakamada, S., Sonoyama, T., Ichiki, S., **Nakamura, S.**, Uchiyama, S., Kobayashi, Y., Sambongi, Y.

Stabilization mechanism of cytochrome c552 from a moderately thermophilic bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 2103-2109, (2008).

- 4) Li, S. M., Li, G. M., **Nakamura, S.**, Ikuta, K., Nakaya, T.

Reduced incorporation of SARS-CoV spike protein into viral particles due to amino acid substitutions within the receptor binding domain.
Jpn J Infect Dis, **61**, 123-127, (2008).

- 5) Matsumoto, S., Yoshida, T., Murata, H., Harada, S., Fujita, N., **Nakamura, S.**, Yamamoto, Y., Watanabe, T., Yonekura, H., Yamamoto, H., Ohkubo, T., Kobayashi, Y.

Solution Structure of the Variable-Type Domain of the Receptor for Advanced Glycation End Products: New Insight into AGE-RAGE Interaction, *Biochemistry*, **47**, 12299-12311, (2008).

- 6) **Nakamura, S.**, Maeda, N., Miron, I. M., Yoh, M., Izutsu, K., Kataoka, C., Honda, T., Yasunaga, T., Nakaya, T., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Horii, T., and Iida, T.

Metagenomic diagnosis of bacterial infections, *Emerg. Infect. Dis.*, **14**, 1784-1786, (2008).

2. 学会発表

- 1) **Nakamura S.**, Forum of The Network of Research Centers on Infectious Diseases (2008), Oct. 2008, (Hanoi, Vietnam) Metagenomic

detection of pathogens by using a next generation sequencer.

H. 知的財産権の出願・登録情報なし。

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

分担研究者：後藤 直久（大阪大学微生物病研究所附属 遺伝情報実験センターゲノム情報解析分野 助教）

分担研究課題：HIV プロテアーゼにおける配列解析および進化予測のためのプログラム開発

<研究要旨>

HIV 感染症は種々の抗 HIV 薬の開発やカクテル療法（HAART）の確立により、先進諸国においては慢性疾患へと変化している。しかしながら、HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであり、現実として多剤耐性ウイルスも出現している。それゆえ、既存のカクテル療法に限界が生じるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。これらは既存のカクテル療法と組み合わせることにより、さらに大きな効果を上げるものと期待されている。しかし、それら新しい作用機序を有する抗 HIV 薬においても、耐性ウイルスが既に報告されており、これらに対して何らかの対策を取る必要が生じている。そこで、もしこれらの耐性変異が生じる位置、およびそれらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルスが生じた際にも速やかに対処できると思われる。

本分担研究では、HIV プロテアーゼの耐性変異を得るまでの進化を辿るべく、まずは系統樹作成と薬剤耐性データの対応関係を調査したところ、薬剤耐性を有するウイルスは3つのクラスターを形成することがわかった。今後はこの進化系統を遡ることで、耐性変異への進化経路を考察する。

A. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、多剤耐性ウイルスが生じやすいウイルスであるため、既存の HAART に限界が生ずるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。

そこでこれら耐性変異が生じる位置、それらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに対処可能となる。

そのような背景下、本年度は昨年度の配列解析結果を発展させ、これら配列の系統樹解析を行い、薬剤耐性ウイルスが持つ特徴の抽出を試みた。

B. 研究方法

前年度に解析を行った HIV-1 CRF01_AE プロテアーゼ配列のうち、日本とタイ由来の株に着目し、MAFFT によるアライメント後、MEGA 4.0 にて系統樹を作成した。次に、この系統樹上に薬剤耐性データを対応した。なお、系統樹は NJ 法、p-distance を用いて作成した。

なお、薬剤耐性変異データは Los Alamos HIV Databases 中の Resistance Database および Stanford University による HIV Drug Resistance Database 中の HIVdb program を用いた。

（倫理面への配慮）

特になし。

C. 研究結果

系統解析の結果、薬剤耐性を有するウイルスは図1のように3つのクラスターに分類された。また、クラスター中での共通配列を参照配列と比較したところ、2つのクラスターでそのアミノ酸が異なっていることがわかった。

D. 考察

図1で、大きく3つのクラスターが形成できたが、この薬剤耐性データは予測値であるため、近年生じた新しい薬剤耐性データを用いてこの系統樹に当てはめることにより、より精度の高い薬剤耐性予測に利用できるのではないかと考える。また、このクラスターを遡って、系統の分岐点を調査することにより、どのような進化を経ると耐性変異が生じていくかがわかると考えている。

E. 結論

系統樹解析の利用により、薬剤耐性株の中心となる大きなクラスターの同定ができた。さらなる検討を必要とするものの、この情報は変異傾向の把握を行う際に利用可能であり、さらに薬剤耐性ウイルスの出現予測にも適用可能ではないかと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

<欧文>

- 1) Okada N., Iida T., Park K.-S., **Goto N.**, Yasunaga T., Hiyoshi H., Matsuda S., Kodama T., Honda T. Identification and characterization of a novel type III secretion system in trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic

lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level.

Infect. Immun., **77**, 904–913, (2009).

- 2) Nakamura S., Yang C.-S., Sakon N., Ueda M., Tougan T., Yamashita A., **Goto N.**, Takahashi K., Yasunaga T., Ikuta K., Mizutani T., Okamoto Y., Tagami M., Morita R., Maeda N., Kawai J., Hayashizaki Y., Nagai Y., Horii T., Iida T., Nakaya T. Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Nasal and Fecal Specimens using an Unbiased High-throughput Sequencing Approach *PLoS ONE*, **4**, e4219, (2009).
- 3) Yamashita A., **Goto N.**, Nishiguchi S., Shimada K., Yamanishi H., Yasunaga T. Computational search for over-represented 8-mers within the 5'-regulatory regions of 634 mouse testis-specific genes *Gene*, **427**, 93–98, (2008).

2. 学会発表

<国内学会>

1) 後藤直久

オープンソースバイオインフォマティクスライブラリ BioRuby の最近の改善点

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)

神戸、2008年12月

2) 後藤直久

BioRuby バージョン 1.3.0 の紹介

第40回人工知能学会分子生物情報研究会 (SIG-MBI) ・第11回オープンバイオ研究会

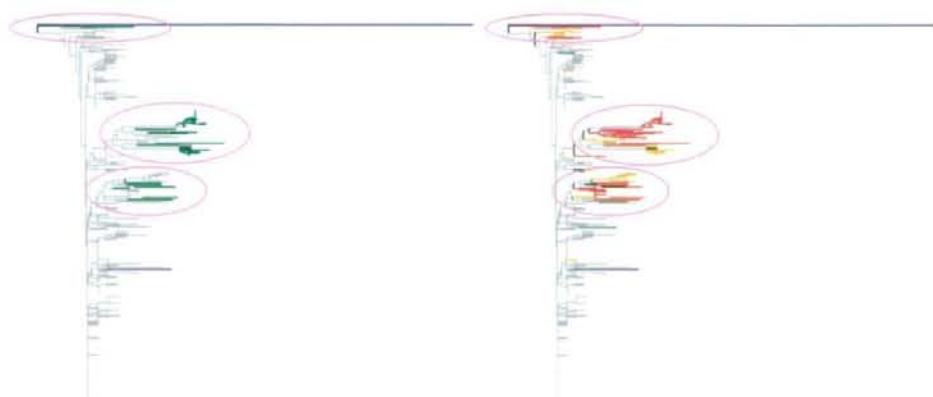
北陸先端科学技術大学院大学、石川、2009年3月

- ### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
- なし。

図1. 日本およびタイの配列を元に系統樹を作成し、Stanford 大学の薬剤耐性データベースから得られた薬剤耐性スコアを元に着色した図。

左：ダルナビル

右：ネルフィナビル



上図で、上側の青色は SIV の配列、下側の青色はサブタイプ B のコンセンサス配列を表す。また、薬剤耐性レベルは、赤：high、黄：intermediate、緑：low を表す。

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

分担研究者：U. Chandimal de Silva（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任研究員）

分担研究課題：タイにおける HIV 配列の特徴及び進化傾向の予測

＜研究要旨＞

HIV 感染症は種々の抗 HIV 薬の開発やカクテル療法（HAART）の確立により、先進諸国においては慢性疾患へと変化している。しかしながら、HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであり、現実として多剤耐性ウイルスも出現している。それゆえ、既存のカクテル療法に限界が生じるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっており、これらは既存のカクテル療法と組み合わせることにより、さらに大きな効果を上げるものと期待されている。しかし、それら新しい作用機序を有する抗 HIV 薬においても、耐性ウイルスが既に報告されており、これらに対して何らかの対策を取る必要が生じている。そこで、もしこれらの耐性変異が生じる位置、およびそれらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルスが生じた際にも速やかに対処できると思われる。

本分担研究では、タイに普及している HIV の配列解析により、それぞれのサブタイプ及びモザイク形ウイルスのそれぞれの地域にあたっての普及程度に関する情報提供及び新しいモザイク形ウイルスを発見することができた。

A. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであるため、多剤耐性ウイルスが出現しており、既存の HAART に限界が生ずるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。しかし、それらに対しても耐性ウイルスが既に報告されており、さらなる対策が必要となる。

そこでこれら耐性変異が生じる位置、それらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに対処可能となる。

そのような背景下、本年度はまず新しいモザイク形ウイルスの発見を目指して、細胞培養により一人の患者の中に存在する数少ないあるクアシスビシーズのウイルスを選択的に見つけ出す方法を設計し、この有効性を確認するためタイの3地域から血液サンプルを収集し、実験を行った。

B. 研究方法

①タイ王国ランバン県、プーケット県とトラン県の病院から81検体の血液サンプルとそれぞれの患者によるアンケートを入手した。

②患者血液からPBMCを分離し、健康な人のPBMCと培養し、一部のサンプルからウイルスを分離でき、さらにMT-4細胞に感染した。

③env V3 遺伝子配列を基に設計された HIV サブタイプ B、サブタイプ B (タイ型)、サブタイプ C、CRF01_AE のペプチドを使い、各サンプルのそれぞれのサブタイプに対する抗体の存在度を ELISA 法により検査した。

④PBMC・MT-4 培養から分離できたウイルスと、元のウイルスの逆転写酵素及び gp160 遺伝子を読み取り、解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実行にあたり、タイ国保健省の倫理委員会の許可を得た。各レベルで血液提供者の権利を守るよう努力した。

C. 研究結果

本研究では、ウイルス 44 株からモザイク形ウイルス 1 株を検出し、これらはいずれもサブタイプ B と CRF01 のモザイクであった。また、ELISA 法でブーケット県では複数のセロタイプが一人の患者の血液中にある事例が多数検出できた。

D. 考察

我々の培養・感染実験によるクアシスビシーズ検出方法は、感染率が低い(2/44)のは大きな欠点だったが、検出率(1/2)は評価しづらいが高かったと言える。そこで、感染率を上げるのは次の重要な課題となった。また、ELISA では複数のセロタイプが一人の患者中に検出したことから、複数のサブタイプ及びそれらからなるモザイク型ウイルスの存在の可能性が高くなった。今後、細胞培養・PCR 法などで徹底的に調べることとなった。

E. 結論

我々は、今までタイの HIV-1 ウイルス 44 株からモザイク型ウイルス 1 株を検出した。また、さらにモザイク型のクアシスビシーズが多く存在している証拠を見つけた。これらのことは、HIV の進化速度の速さの証拠であり、ある地域で普及しているウイルスお特徴を常に把握しておく必要性を

強調している。本研究では、そのために利用できる単純な手法を設計し、検出したウイルスの全ゲノム配列を読み取り、患者のアンケート情報との関連性を統計的に調べたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

<欧文>

1) Utachee, P.; Jinnopat, P.; Isarangkura-Na-Ayuthaya, P.; **de Silva, U.C.**; Nakamura, S.; Siripanyaphinyo, U.; Wichukchinda, N.; Tokunaga, K.; Yasunaga, T.; Sawanpanyalert, P.; Ikuta, K.; Auwanit, W.; Kameoka, M.

Phenotypic studies on recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) containing CRF01_AE env gene derived from HIV-1-infected patient, residing in central Thailand.

Microbes Infect, 11 (3), 334-343, (2009)

2) Du, A.; Daidoji, T.; Koma, T.; Ibrahim, M.S.;

Nakamura, S.; **de Silva, U.C.**; Ueda, M.; Yang, C.;

Yasunaga, T.; Ikuta, K.; Nakaya, T.

Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody.

Biochem Biophys Res Commun, 378 (2), 197-202, (2009).

3) Utachee, P.; Jinnopat, P.; Isarangkura-Na-Ayuthaya, P.; **de Silva, U.C.**; Nakamura, S.; Siripanyaphinyo, U.; Wichukchinda, N.; Tokunaga, K.; Yasunaga, T.; Sawanpanyalert, P.; Ikuta, K.; Auwanit, W.; Kameoka, M.

Phenotypic studies on recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) containing CRF01_AE env gene derived from HIV-1-infected patient, residing in central Thailand.

Microbes Infect, 11, 334-343, (2009).