

200908021A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(課題番号：H21-政策創薬-一般-010)

長期抗HIV療法に適う新規エイズ治療薬 Reverse
Transcriptase associated RNase H 活性阻害剤の実用化開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 星野忠次

(千葉大学 大学院薬学研究院)

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(課題番号：H21-政策創薬-一般-010)

長期抗HIV療法に適う新規エイズ治療薬 Reverse
Transcriptase associated RNase H 活性阻害剤の実用化開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 星野忠次

(千葉大学 大学院薬学研究院)

平成22(2010)年 3月

目次

I. 総括研究報告	
長期抗HIV療法に適う新規エイズ治療薬 Reverse Transcriptase associated RNase H 活性阻害剤の実用化開発 -----	1
星野忠次 千葉大学大学院薬学研究院	
II. 分担研究報告	
1. 先導阻害活性化化合物からの誘導体の計算機設計と有機合成 -----	6
星野忠次 千葉大学大学院薬学研究院	
2. 新規 RNase H 阻害剤の生物活性および酵素抑制活性の測定 -----	18
駒野 淳 国立感染症研究所エイズ研究センター	
3. HIV-1 RNase H 変異パターンに関する分子疫学的解析 -----	24
岩谷靖雅 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター	
4. 候補化合物の細胞毒性試験 -----	31
村上 努 国立感染症研究所エイズ研究センター	
5. HIV 逆転写酵素 (RT) 内在 RNase H ドメインに対する酵素活性阻害剤の 計算機シミュレーションによる設計 -----	36
沖本憲明 理化学研究所基幹研究所システム計算生物学研究グループ	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	45

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

研究課題：長期抗HIV療法に適う新規エイズ治療薬 Reverse Transcriptase associated
RNase H活性阻害剤の実用化開発

研究代表者 星野忠次 千葉大学大学院薬学研究院 准教授

研究要旨

薬剤耐性ウイルスを抑制する有効かつ現実的な対策として、既存薬と作用機序が異なる新規抗HIV薬の開発が挙げられる。本研究班では、HIV逆転写酵素に内在するRNase H活性を標的とする抗HIV薬の開発を進めている。研究終了時には、前臨床レベルの薬物を創出することが目標である。本年度は、Ⅰ. 計算機設計、Ⅱ. 有機合成、Ⅲ. 合成化合物の活性測定、Ⅳ. 化合物の毒性評価、Ⅴ. 変異パターンの分子疫学解析、を実施した。本研究により、先導化合物に比べて強い阻害活性を持つ化合物を得ることができた。また化合物の酵素標的部位への結合様式が明確になった。合成化合物には、ごく一部を除いて、強い細胞毒性を示すものはなかった。HIV-1感染者におけるサブタイプ B RNase H 遺伝子配列を解析した結果、RNase H領域で見られるアミノ酸変異が明確になった。これらの変異には、薬物が結合する部位近傍のアミノ酸残基は含まれていなかった。次年度以降、化合物最適化を進めてゆくための基本的情報（標的部位への結合構造、効率的な合成手順、信頼性の高い活性測定、細胞毒性を有する化学構造、臨床で見られるアミノ酸変異）が得られた。

研究組織

星野忠次

千葉大学大学院薬学研究院 准教授

駒野 淳

国立感染症研究所エイズ研究センター

主任研究員

岩谷靖雅

国立病院機構名古屋医療センター

臨床研究センター 室長

村上 努

国立感染症研究所エイズ研究センター

室長

沖本憲明

理化学研究所基幹研究所 システム計算生物

学研究グループ 副チームリーダー

A. 研究目的

HIV感染治療において、多剤併用療法の定着が感染予後の改善に大きな成果を挙げている。しかしHIV感染症の治療は長期化する傾向にあり、このため薬剤耐性ウイルスの出現の懸念も増大している。薬剤耐性ウイルスを抑制する有効かつ現実的な対応策として、既存薬と作用機序が異なる新規抗HIV薬の開発が挙げられる。本研究では、HIV逆転写酵素に内在するRNase H活性を標的とする抗HIV薬の開発を推し進め、前臨床レベルの薬物を創出する。既に阻害活性を持つ先導化合物を得ているので、この化合物からの誘導体を多数合成して活性評価を行い、阻害活性の高い化合物を見出す。同時に耐性変異ならびに抗ウイルス薬の相乗効果に関する

調査を行う。この情報はHIV感染症治療においても有用である。また薬物の毒性や特異性を調べ副作用のリスク要因を明確にして、実用性の高いRNase H活性阻害化合物の創製を試みる。

B. 研究方法

新規抗HIV薬を創製するため、I. 計算機設計、II. 有機合成、III. 合成化合物の活性測定、IV. 化合物の毒性評価、V. 耐性変異の分子疫学解析を、各研究者が分担し協力して研究を進めた。

I. 計算機設計

大規模化合物ライブラリを使った新規化合物探索、誘導体に関する構造活性相関、量子化学的手法を用いたRT内在のRNase Hドメインと薬剤複合体構造のモデリングを行った。大規模化合物ライブラリを使った化合物探索では、酵素活性阻害が確認された先導誘導体以外の新規骨格を有する阻害剤の発見のために、市販化合物ライブラリを使って化合物探索を行った。誘導体に関する構造活性相関では、本研究班で合成された誘導体 53 化合物とその酵素活性阻害データを使用し、活性相関を示す統計モデルの構築を行った。量子化学的手法を用いたRT内在のRNase Hドメインと薬剤複合体構造のモデリングでは、酵素活性中心を量子化学的に取り扱うQM/MM法を用いて精密な分子計算を実行した。

II. 有機合成

先導化合物の効率的な合成ルート(高収率合成法・短工程)の確立を行うことを最初の目的に合成研究を進めた。また、類似化合物の合成展開を活性測定の結果のフィードバックを受けながら実施した。RNase Hドメインは、Mg金属を活性中心に持ち、その周辺に4つの荷電アミノ酸を配することで、酵素活性部位を形成している。先導化合物のニトロフラン部分ならびにエステル結合部位のカルボニル基は、Mg金属に

配位結合する。またカルバモイル部位のカルボニル基が荷電アミノ酸と水素結合を形成して安定化する。カルバモイル結合部位の先には、疎水性官能基が配置され、標的タンパク質との結合を強化する役目を持っている。疎水性部位に様々な疎水性置換基を導入した化合物を多数合成して、化合物の阻害活性を測定することにより有効な疎水性置換基を探索した。

III. 合成化合物の活性測定

合成された誘導体について、逆転写酵素のRNase H活性に対する阻害能を測定した。また、新たな阻害剤化学構造を同定し、計算機薬物設計をより信頼性の高いものにするために、新たにin silicoシミュレーションで選抜された候補化合物についても評価を行った。簡便かつ迅速に多検体を検査する実験系としては、5'末端をFAM蛍光標識した合成RNAと3'末端を蛍光阻害物質BHQで標識した合成DNAをアニールさせてDNA/RNA heteroduplexの構造にさせ、これを基質として、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方法を用いた。

IV. 化合物の毒性評価

阻害活性が数 μM を示した誘導体化合物について、MT-4細胞と293T細胞を使用してそれらに対する細胞毒性測定した。MT-4細胞に対する細胞毒性の測定は、MTT assayにより算出した。化合物溶液の2倍段階希釈系列を作製し(100, 50, 25, 12.5 μM)、同時にサンプル無添加のコントロールを用意した上で、MT-4細胞($4 \times 10^5/\text{ml}$, 100 μl)を各ウェルに分注した。細胞毒性が50%を超えるものは、 CC_{50} も算出した。293T細胞に対する細胞毒性の測定でも、やはりコントロールとともに、化合物溶液の2倍段階希釈系列を作製した(100, 50, 25, 12.5 μM)。293T細胞($2 \times 10^5/\text{ml}$, 100 μl)を各ウ

エルに分注し、MTT assayにより細胞毒性を算出した。

V. 耐性変異の分子疫学解析

1次増幅では逆転写酵素 Polymerase (p51) 領域と RNase H (p15) 領域を取り囲む RT 2388 nt から 4380 nt を増幅し、2次(Nested)では同じく p51 から p15 全領域 (RT 2485 nt から 4285 nt)を増幅するプライマーセットを設計した。遺伝子配列決定には、nested PCR に用いたプライマーセット (DRRT7L および DRGPR3L)と、p51 下流からは DRRT4L、p15 上流からは DRRT30 が最適であることを見出し、RT 全領域の遺伝子配列を決定する系を確立した。この系を用いて、raltegravir投与歴がない治療患者および未治療患者に感染している HIV-1 サブタイプ B に絞って、RT 全領域の遺伝子配列を決定した。治療群および未治療群の検体数は、それぞれ 48 件と 42 件に達した。リファレンスの HXB2 株と各遺伝子配列を比較した。

C. 研究結果

I. 計算機設計

大規模化合物ライブラリを使った化合物探索の結果、103 化合物を試薬メーカーより購入することとした。今回化合物探索により購入した 103 化合物は、先導阻害化合物やその誘導体とは骨格が大きく異なるものである。実際、その 1 つについて、実験により酵素活性阻害効果が観察された。この化合物はこれまでに報告例のない新規骨格を有する阻害剤候補である。

誘導体に関する構造活性相関解析では、薬剤に阻害活性の有無を大まかに予想することはできるが、詳細な差異については困難であった。誘導体の構造最適化研究に供するには、構造活性相関のベースとなる統計モデルにつ

いて、更なる検証・修正が必要である。

量子化学的手法を用いた RT 内在の RNase H ドメインと薬剤複合体構造のモデリングでは、QM/MM 法によりエネルギー極小化計算終了後、その電子状態を考慮した活性ポケット構造の観察が可能となった。これらの情報は RNase H のような特徴的な活性ポケット構造を理解するには極めて有効である。今後は、この構造情報を基盤にして、de novo design の技法、ドッキング研究、QM/MM 法による化合物構造最適化研究を実施する計画である。

II. 有機合成

先導化合物を足掛かりに、本年度は90種類を越える誘導体を合成展開した。

高収率で短工程の先導化合物の効率的な合成ルートの確立を進めた結果、先導化合物を DMAP (Dimethyl amino pyridine)存在下で、ニトロフランカルボン酸と様々な置換基を持つ塩化アセチルアミド類縁体とを求核置換反応させることにより、多種の誘導体を短時間かつ高収率で得られる合成経路を見出した。

先導化合物は、ニトロフラン環部分の反対側に、疎水性官能基が配置され、標的タンパク質との結合を強化する役目を持っている。疎水性官能基の部分に様々な疎水性置換基を導入した化合物を合成して、化合物の阻害活性を測定した結果、IC₅₀値が数μM程度の類縁体化合物を見出した。これは先導化合物に比べて、数倍程度の活性の増強となった。また、標的タンパク質への結合親和性をさらに高めるため合成化合物が結合する活性部位の付近に存在する4つの荷電アミノ酸を視野に入れ、これらのアミノ酸と相互作用する置換基を疎水性置換基付近に導入した化合物を合成展開した。

ニトロフラン環部分は、含窒素芳香環化合物に比べて、若干、安定性に乏しいため、ニトロフラン環部分を他の類似官能基で代行できる

ような化合物構造を探索することを計画した。フラン環に様々な置換基を導入することにも成功しており、フラン環周辺の配位場を変化させることも可能となった。但し、必ずしも活性の上昇した化合物構造は得られていない。細胞毒性実験の結果などで、化合物の構造変更が余儀なくされた時のバックアップ化合物として、ニトロフラン部分の類似官能基の探索を今後とも継続する。

III. 合成化合物の活性測定

新規に化学合成した誘導体70種類と *in silico*シミュレーションで選抜された候補化合物48種類の計118種類の小分子化合物についてRNase H阻害剤としての評価を行った。計118種類の化合物の中でRNase H阻害能を有していたのは34種類 (28.8%) であった。先導化合物からの誘導体は33/70種類、*in silico*化合物は1/48種類が陽性であった。前者のヒット率は47.1%、後者のヒット率は2.1%であり、先導化合物からの誘導体の基本骨格が、酵素阻害活性を持つ構造であることが強く示唆された。ランダムスクリーニングで得られるRNase H阻害剤のヒット率は0.1~1.9%であり、今回試験した*in silico*シミュレーションで選抜された候補化合物スクリーニングはランダムスクリーニングよりやや高いヒット率であった。先導化合物からの誘導体がRNase H阻害剤の基本骨格として機能することは既に報告済み (Fuji et al, 2009 J. Med. Chem.) であるが、今回デザインされた誘導体におけるヒット率47.1%は、2009年の論文で検討されたヒット率25.0%より高い。これは薬剤デザインが妥当な戦略により行われていることを示唆している。今後も基本骨格を維持しながら側鎖の改変等を行うことで、より強力な阻害剤を探索する計画である。

IV. 化合物の毒性評価

MT-4 細胞に対する細胞毒性では、測定した

24化合物中、BK-202、BK-205で100 μ Mで約50%の細胞毒性が認められたが、その他の化合物は100 μ Mにおいてもほとんど細胞毒性を示さなかった。

293T細胞に対する細胞毒性では、BK-190など6化合物でCC50が36-83 μ Mとやや強い毒性を示したが、それ以外の化合物の多くは100 μ Mにおいてもほとんど細胞毒性を示さなかった。

また、RNase H阻害剤候補化合物24サンプルの細胞毒性をMT-4細胞、293T細胞を用いて評価した結果、RNase H阻害活性にはほとんど差が認められなかった誘導体間でも、細胞毒性に大きな差異が観察された。

V. 耐性変異の分子疫学解析

治療群あるいは未治療群においてRNase H領域 (N460、R461、V467、L469、T470、L491、Q512、N519、Q524、K527、I556、K558) に変異が認められた。治療群におけるRNase H領域の変異多型が、未治療群に比べ優位に高いことが示された。特に、治療群におけるR461KとL491S変異が多いことが認められた。p51領域内に生ずる耐性変異 (TAMs) による薬剤耐性度が増強されると報告されているRNase H領域の変異パターンは認められなかった。RNase H酵素活性中心であるN474、H539近傍のアミノ酸、あるいはPrimer Gripに関わるアミノ酸 (p15領域内のK473、K475、K476、Y501、H505) には変異が認められなかった。

RNase H領域の変異多型は限られているようである。特に、基質であるRNA/DNAハイブリッドに近接していると推測されるアミノ酸変異はなく、raltegravir投与歴がない治療患者と未治療患者との間には差が認められなかった。現時点では、raltegravir投与歴なしの既存薬によってRNase Hの酵素活性中心領域に変異が誘導される可能性は低いと推測される。RNase Hの酵素活性中心のアミノ酸は比較

的保存されていると考えられ、活性中心近傍を標的とした RNase H 阻害剤の開発は比較的有望である。

D. 健康危険情報

特記すべきことなし。

E. 研究発表

1. 論文発表

分担報告書を参照のこと。

2. 学会発表

分担報告書を参照のこと。

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

長期抗HIV療法に適う新規エイズ治療薬 Reverse Transcriptase associated RNase H活性阻害剤の実用化開発

分担課題：先導阻害活性化化合物からの誘導体の計算機設計と有機合成

研究代表者 星野忠次（千葉大学大学院薬学研究院 准教授）

研究要旨

多剤耐性ウイルスの出現と伝搬はHIV感染症治療の障害要因として、世界的にも大きな不安材料として顕在化している。薬剤耐性ウイルスを抑制する有効かつ現実的な対応策として、既存薬と作用機序が異なる新規抗HIV薬の開発が挙げられる。本研究は、HIV逆転写酵素に内在するRNase H活性を標的とする抗HIV薬の開発を推し進め、前臨床レベルの薬物を創出することが目的である。本年度は、Ⅰ. 計算機設計、Ⅱ. 設計化合物の有機合成、Ⅲ. 標的分子と阻害剤の共結晶作成を行った。計算機薬物設計(Ⅰ)では、初めに先導化合物の標的タンパク質内での結合方位予測を行った。逆転写酵素のRNase H活性が機能するには、活性部位にMg²⁺イオンが配位することが必須である。最近の研究報告を参照して、RNase H領域には、2つの金属イオンが配位し、さらにこの金属イオンに配位するように阻害剤が結合していると判断した。次に、量子化学計算により、予測した結合様式が、実現可能な原子配置であるか否かを、分子軌道法と分子動力学法を組合わせた計算技法により確かめた。化合物合成(Ⅱ)では、先導化合物を足掛かりに、90種類を越える誘導体を合成展開した。先導化合物の高収率で短工程な合成ルートの確立を進めた結果、ニトロフランカルボン酸と様々な置換基を持つ塩化アセチルアミド類縁体との求核置換反応により、多種の誘導体を短時間かつ高収率で得られる合成経路を見出した。この反応では、化合物の精製が簡便であるため、短時間でより多くの候補化合物を合成することが可能になった。また、先導化合物の疎水性官能基の部分に様々な疎水性置換基を導入した化合物を合成して、化合物の阻害活性を測定した結果、IC₅₀値が数μM程度の類縁体化合物を見出した。結晶構造解析(Ⅲ)では、先導化合物と精製した逆転写酵素との共結晶を作成し、X線構造解析を行った。タンパク質の構造は得られたが、2つの金属イオンならびに阻害剤部分については、電子密度が観測されなかった。阻害剤が結合した逆転写酵素の結晶を得るために、金属イオンにMn²⁺イオンを使用して、再度、共結晶化を行っている。以上の研究により、先導化合物に比べて強い阻害活性を持つ化合物を得ることができ、化合物の標的酵素部位への結合様式が明確になった。今後、標的タンパク質への結合親和性を高めるため、化合物構造改変をさらに進めてゆく予定である。

A. 研究目的

HIV感染治療において、多剤併用療法の定着

が感染予後の改善に大きな成果を挙げている。

従って、HIV 感染症はもはや慢性疾患の範疇に

入りつつある。しかしHIV感染症の治療は長期化する傾向にあり、このため薬剤耐性ウイルスの出現の懸念も増大している。抗HIV薬が登場してから約20年が経ち、多剤耐性ウイルスの出現と伝搬はHIV感染症治療の障害要因として、世界的にも大きな不安材料として顕在化している。特に単剤療法の時代を経てきたHIV感染患者では、多剤耐性のために既存の薬でのコントロールが困難に陥っている症例が多い。従って、今なお新たな治療薬の開発が切望されている。薬剤耐性ウイルスを抑制する有効かつ現実的な対応策として、既存薬と作用機序が異なる新規抗HIV薬の開発が挙げられる。抗ウイルス化学療法剤の中でも、ウイルス酵素を直接阻害する薬物は非常に治療効果が高い。RNase Hは唯一残されたHIV酵素標的であり、その阻害剤は既存薬との併用が可能である。このため医薬品として高い将来性が見込まれる。作用点異なる新規薬剤の実現は、多剤耐性症例の救済のみならず、副作用の回避や薬剤耐性ウイルスの出現を低下させることにも役立つと期待される。

本研究では、HIV逆転写酵素に内在するRNase H活性を標的とする抗HIV薬の開発を推し進め、前臨床レベルの薬物を創出する。研究初年度には既存の先導化合物を足掛かりに誘導体を合成展開して活性評価を行った。同時に耐性変異ならびに抗ウイルス薬の相乗効果に関する調査を開始した。次年度は上記の調査結果を踏まえて実用性の高い化合物へとさらに阻害薬を改変する予定である。最終年度は薬物の毒性や特異性を調べ副作用のリスク要因を明確にする。今年度は研究初年度に当たるので、先導化合物からの誘導体を多数合成して活性評価を行い、阻害活性の高い化合物を見出すことに特に注力した。

B. 研究方法

新規抗HIV薬を創製するため、I. 計算機設計、II. 設計化合物の有機合成を行う。合成した化合物分子については、研究分担者の駒野（国立感染研）に活性評価を依頼する。同時に、III. 標的分子と阻害剤の共結晶を作成し、X線構造解析を実行する。これにより化合物のRNase H部位での結合構造を確かめる。

(I. 計算機薬物設計)

RNase H阻害剤の候補化合物として、当研究班では、既に、5-nitro-furan-2-carboxylic acid adamantan-1-carbamoyl-methyl esterを、*in vitro*スクリーニングにより見出している。この先導化合物からの誘導体化合物の合成展開が、研究の取り掛かりとなる。

標的となるRNase H部位には、2つのMg²⁺イオンが配位結合し、触媒中心になっていることが、RNase H部位と阻害活性化合物に関する最近のX線結晶構造解析の結果より明らかになってきた（*J. Med. Chem.* 2009, 52, 5781-5784, *Structure* 2009, 17, 1625-1635）。そこで2つのMg²⁺イオンを配位させた逆転写酵素を、標的タンパク質として計算機内でモデル化した。RNase H阻害活性を持つヒット化合物の分子構造をGaussViewソフトウェアを用いて作成し、Gaussian03ソフトウェアによって構造最適化と電荷計算を行った。両者の複合体を計算機上で作成して、QM/MMと呼ばれる分子軌道法と分子力場法を組み合わせた技法により、標的タンパク質と化合物の複合体構造について、量子化学計算を実行した。金属が触媒活性部位に存在する場合、分子動力学計算では、しばしば不正確な結合構造となってしまう。これを避けるために、本研究では量子化学計算を利用した。量子化学計算により、研究班で得ているヒット化合物のRNase H部位への結合構造を算出した。

次にヒット化合物からの派生構造を考案した。Gaussian03ソフトウェアにて電荷計算を行うことで、化合物分子の分子力場パラメーターを作成した。このパラメーターを用いて、当班で開発されたOrientationプログラムを利用して、考案化合物とRNase H部位との結合親和性を予測計算した。結合親和性の良好なものについて、化合物合成の対象とした。またヒット化合物の骨格以外でも2つのMg²⁺イオンに強く配位し得る化合物構造を、計算機上でOrientationプログラムを用いて探索した。

(II. 化合物合成)

当研究班では、既にRNase H阻害剤のヒット化合物を有している。そこで、有機合成を駆使して、この先導化合物の効率的な合成ルート（高収率合成法・短工程）の確立を行うことを最初の目的に合成研究を進めた。また、以下の点に着目しながら類似化合物の合成展開を実施した。

・標的のRNase Hドメインは、Mg金属を活性中心に持ち、その周辺に4つの荷電アミノ酸を配すことで、酵素活性部位を形成している。先導化合物のニトロフラン部分は、Mg金属に配位結合すると予想されている。またエステル結合部位ならびにカルバモイル部位の2つのカルボニル基が荷電アミノ酸と水素結合を形成して安定化する。この部分は、国外の他のグループが開発を進めているジケト構造を持つRNase H阻害剤と類似性がある。カルバモイル結合部位の先には、疎水性官能基が配置され、標的タンパク質との結合を強化する役目を持っている。先導化合物はまだ活性が弱いため、先導化合物の標的タンパク質への結合親和性をさらに高めることが必要である。そこで初めに疎水性官能基の部分に様々な疎水性置換基を導入した化合物を多数合成して、化合物の阻害活性を測

定する。これにより有効な疎水性置換基を見出す。

・体内には薬物代謝酵素シトクロームp450に代表されるように、金属を酵素活性部位に持つタンパク質は多い。先導化合物のニトロフラン部分は、Mg金属に配位結合すると予想される。あまりに強く金属に結合してしまう化合物は、薬物毒性の原因になる可能性がある。細胞毒性実験の結果も勘案しながら、ニトロフラン部分を他の類似官能基で代行できるような化合物構造を考案し、これを合成する。これは前臨床検査に向けたバックアップ化合物となる。

・エステル結合部位は動物体内では、代謝されて切断されてしまう可能性がある。体内動態の観点から、一般にエステル結合は、医薬品構造としては望ましくない。そこで、この部分をケトン基に変換するなどの処置を行う。このための合成経路の変更を行う。

(III. 結晶構造解析)

HIV-1の逆転写酵素については、既に100を越える（2009年4月時点で119エントリー）X線結晶解析構造がProtein Data Bankに登録されている。逆転写酵素は、核酸を掴み保持するためのループ部分（finger, thumbと呼称）が存在する。このループ部分の可動性が大きいため、これまで高分解能のX線結晶構造が得られ難かった。ところが、米国Rutgers大学のEddy Arnold教授のグループから、finger領域にアミノ酸変異を入れることで、2Å以下の分解能を持つ逆転写酵素タンパク質結晶の作成が可能であることが報告された（Nucleic Acids Res. 2008, 36, 5083-5092）。そこでArnold教授より高分解能の結晶の得られる発現ベクターRT69Aを分与頂いた。逆転写酵素の発現には、大腸菌Rosettaを用いた。培養は37°Cで行い、O.D. 値が0.9となった時点で、IPTGを投入した。

その後、3時間37℃の培養により、タンパク質を発現させた。超音波装置により大腸菌の菌膜を破碎し、遠心機に掛けた後に、上清よりタンパク質を得た。発現したタンパク質にはHis-タグが付いているので、Niアフィニティーカラムにより、発現タンパク質を選別した。次にHRV-3C酵素を用いて、His-タグ部位の切断を行った。Niリジンを用いて、切断されたHis-タグと夾雑タンパク質を取り除いた。最後にCoアフィニティーカラムを通して、夾雑物を除去した。精製した逆転写酵素は、RNase H活性を持つことを確認した。研究分担者の駒野(国立感染研)の行う活性評価でも、本精製酵素が使われている。共結晶は、逆転写酵素と阻害活性化合物を、1:5のモル比で混合させた後に、ハンギングドロップ法を用いて作成した。結晶は、4℃の低温環境下で成長させた。

C. 研究結果

(I. 計算機薬物設計)

I-1. 結合方位予測

逆転写酵素のRNase H活性が機能するには、活性部位にMg²⁺イオンが配位することが必須である。但し、配位するMg²⁺イオンの数は、2009年の当初の時点では不明であった。既に逆転写酵素に関しては、Protein Data Bankに119ものX線結晶解析構造の登録があった。このうちRNase H領域に金属イオンが配位しているものは、21個あった。RNase H領域に2つの金属イオンが配位しているものは、1RTDのX線結晶解析構造のみであった。金属イオンがRNase H領域に配位していた構造のうち、5個は、配位結合を強くする目的で、Mg²⁺イオンの代わりに、Mn²⁺イオンが使われていた。2009年になってRNase H活性阻害剤とRNase H領域の共結晶X線構造解析が、異なる2つのグループより発表された(J. Med. Chem. 2009, 52, 5781,

PDBcode:3HYF; Structure 2009, 17, 1625, PDBcode:3IG1)。両者においてRNase H領域には、2つの金属イオン(共にMn²⁺イオンを使用)が配位し、さらにこの金属イオンに配位するように阻害剤が結合している様子が示された。図1にRNase H領域と阻害剤pyrimidinol (IC₅₀=0.6 μM)あるいはβ-thujaplicinol (IC₅₀=0.2 μM)との共結晶構造に関する報告を示す。カルボニル基あるいはヒドロキシ基が2つの金属イオンに適切な距離で相互作用している。また金属に配位していない部分は、溶媒側に露出していることが、いずれの結晶構造でも明らかになっている。

当研究班で見出されたヒット化合物は、ニトロフランの隣にカルボニル基が配置した構造を持っている。この部分が2つの金属イオンに強く配位すると推察される。エーテル結合を介して続く疎水性部分に様々な化学修飾を施して活性評価を行った結果(次章II-4)、疎水性部分を変化させてもRNase H阻害活性は低下しないものの、大きく活性を向上させるには至らなかった。従って、この部分は溶媒に露出しており、RNase H領域周辺のアミノ酸残基とは、あまり相互作用をしていないと推測できる。RNase H領域の活性ポケットは極めて浅いため、官能基の一部が溶媒側に露出してしまうことは、容易に理解できる。以上の知見から判断して、図2に示すように、ヒット化合物のフラン平面と2つの金属イオンが平行になる結合様式をとっていると結論した。

I-2. 量子化学計算

予測した結合様式が、実現可能な原子配置であるか否かを、分子軌道法と分子動力学法を組合わせた方法、いわゆるQM/MM計算により確かめた。この計算技法は、タンパク質のような巨大な分子に対して、分子軌道法を適用するための常套手段の一つとなっており、最近、盛んに

利用されるようになった。分子軌道法では、原子の結合を電子論的に求めるために、金属イオンなどを含む系でも、正確に構造が求まる。また、パラメーターを含まないために、分子力場法に見られるようなパラメーター設定上の制約がない。このため計算誤差が少ない。但し、計算量が膨大になるため、分子軌道を計算する領域を限定する必要がある。計算では、RNase H領域のAsp443, Glu478, Asp498, His539, Asp549と2つのMg²⁺イオンおよび阻害化合物を分子軌道(QM)領域とし、タンパク質のその他の残基と結晶水を分子力場(MM)領域とした。Gaussian03プログラムにより、構造最適化計算を実行した。RNase Hの構造として、PDBcode: 3HYFを用いた。これには阻害化合物の1種であるpyrimidinolが結合している。そこで化合物を、(a) pyrimidinol、(b)阻害活性化合物BK-161、(c) 阻害活性化合物 BK-186として、それぞれの場合について結合状態の構造最適化を行った。BK-161とBK-186は、当研究班で合成した化合物で、ニトロフランカルボニル骨格を持ち、IC₅₀で2 μM程度の阻害活性を持つ。

pyrimidinol結合モデルでは、3HYF結晶構造と、ほぼ同等の構造が得られた(図3)。2つのMg²⁺イオンに対し、Mg-O-C-C-C-Oの6員環と、Mg-O-C-C-Oの5員環が隣接して存在する形となっている。2つのMgの距離は、4.06 Åとなり、MgとOの距離は2.1 Å~2.8 Åとなっている。一方で、BK-161には2つのMg²⁺イオンに対しMg-O-N-C-O-C-C-O-Mgの9員環となっている。またBK-186では、Mg-O-N-C-S-C-C-O-Mgの9員環となった。2つのMgの距離は4.00 Åとなり、MgとOの距離は2.5 Å~2.9 Åである。pyrimidinolが5と6員環の隣接した結合様式をとるのに対し、ニトロフランカルボニル骨格では、大環状の構造を作ることによって、化合物が2つの金属イオンに配位していることが判った。現在、最も高

い阻害活性を示すβ-thujaplicinolは、Mg-O-C-C-OのとMg-O-C-C-Oの2つの5員環が隣接する様式で、化合物がRNase H部位の金属イオンに配位していることが最近になって示された。従って、ニトロフランカルボニル骨格は、これまで見出されてきたRNase H活性阻害剤とは異なる特徴的な結合様式を持っていることが明らかになった。

(II. 化合物合成)

先導化合物を足掛かりに、下記に示す項目に沿って研究を進めることで、本年度は90種類を越える誘導体を合成展開した。

II-1. 先導化合物の合成

当研究班の有する先導化合物からの誘導体化合物の合成展開が、研究の取り掛かりとなる。そこで、当初の目標として、高収率で短工程の先導化合物の効率的な合成ルートの確立を進めた。研究の結果、先導化合物をDMAP(Dimethyl amino pyridine)存在下5-nitro-furan-2-carboxylic acidと様々な置換基を持つchloro acethyl amid類縁体との求核置換反応において、多種の誘導体を短時間かつ高収率で得られる合成経路を見出した。この反応では、化合物の精製が簡便であるため、短時間でより多くの候補化合物を合成することが可能になった(図4)。また、得られた生成物の純度も高いため、正確な活性測定が期待できる。

II-2. 先導化合物誘導体の官能基置換(1)

標的のRNase Hドメインは、Mg金属を活性中心に持ち、その周辺に4つの荷電アミノ酸を配すことで、酵素活性部位を形成している。先導化合物のニトロフラン環部分は、Mg金属に配位結合する。ニトロフラン環部分は、含窒素芳香環化合物に比べて、若干、安定性に乏しいため、ニトロフラン環部分を他の類似

官能基で代行できるような化合物構造を探索することを計画した。本研究では、まずフラン環の持つニトロ基に着目した。このニトロ基はフラン環が Mg 金属に配位するのを補助する役目があると推測される。そこで、配位補助基として働きうるカルボニル基を導入したフラン環の合成に成功した。また、フラン環に様々な置換基を導入することにも成功しており、フラン環周辺の配位場を変化させることも可能となった(図5)。フラン環部位の合成展開により、分子設計における有用な情報を得ることができると期待される。現在のところ、これらの合成化合物を活性測定した結果、必ずしも活性の上昇した化合物構造は得られていない。細胞毒性実験の結果などで、化合物の構造変更が余儀なくされた時のバックアップ化合物として、ニトロフラン部分の類似官能基の探索を継続している。

II-3. 先導化合物誘導体の官能基置換(2)

先導化合物は、化合物の骨格の中心に、エステル結合部位が存在する。エステル結合部位は動物体内では、代謝されて切断されてしまう可能性がある。体内動態の観点から、一般にエステル結合は、医薬品構造としては望ましくない。そこで、この部分をケトン基に変換するなどの計画を立てた。これには、合成経路の大きな変更が伴った。研究の結果、エステル結合部位をエーテル構造に変換した化合物や、ケトン基に変換した化合物の合成に成功した(図6)。変換した構造を持つ化合物の活性測定を行った結果、アミノ結合では、阻害活性が失われることが明らかになった。これはアミノ基は平面性が強いいため、薬物全体が直線的な構造となってしまう、RNase H ドメインに収まらなくなるためである。今後、エステルと同様に配位補助機能を

持つ置換基の探索と代謝の問題点を克服することのできる置換基の導入を行う予定である。

II-4. 先導化合物誘導体の官能基置換(3)

先導化合物は、ニトロフラン環部分と反対側に、疎水性官能基が配置され、標的タンパク質との結合を強化する役目を持っている。先導化合物は活性が弱いため、標的タンパク質への結合親和性をさらに高めることが必要である。そこで疎水性官能基の部分に様々な疎水性置換基を導入した化合物を合成して、化合物の阻害活性を測定した(図7)。この結果、 IC_{50} 値が数 μ M程度の類縁体化合物を見出した。これは先導化合物に比べて、数倍程度の活性の増強となった。現在、さらに疎水性置換基の修飾を進めている。また、標的タンパク質への結合親和性をさらに高めるため合成化合物が結合する活性部位の付近に存在する4つの荷電アミノ酸を視野に入れ、これらのアミノ酸と相互作用する置換基を疎水性置換基付近に導入した化合物を合成した。

(III. 結晶構造解析)

先導化合物と精製した逆転写酵素について、共結晶の作成を試みたところ、結晶が析出した(図8)。結晶は、pH6.3で12%の PolyEthyleneGlycol (PEG) 8000を含む結晶化剤と、pH8.0で濃度20mg/mLのタンパク質溶液を1:1の割合で混合させて作成した。名古屋大学大学院工学研究科の山根隆教授ならびに鈴木淳臣准教授にX線結晶解析を依頼した。結晶解析の結果。逆転写酵素の部分は、PDBcode:3DLKで示された構造とほぼ同じであるが、2つの金属イオンならびに阻害剤部分については、電子密度が観測されなかった。すなわちタンパク質の結晶は得られたが、阻害剤がRNase H部位に結合していない結果となった。また金属イオン

も観測されないことから、阻害剤が結合しなかったのは、金属がRNase H部位に配位していないためと判断される。最近、RNase H領域に阻害剤のPyrimidinolが結合した状態のX線結晶解析構造が報告された(PDBcode:3HYF)。図9は、3HYF結晶構造(スティック表示)に、本研究の結晶を用いて得られたX線回折からの電子密度を重ね合わせたものである。タンパク質部分については、本研究で得られた結晶構造と過去の報告は矛盾のない結果となっている。今後、RNase H領域と阻害剤の共結晶を得るために、金属イオンにMn²⁺イオンを使用して、再度、結晶化を試みる必要がある。

D. 健康危険情報
特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ・ S. Matsuyama, A. Aydan, H. Ode, M. Hata, W. Sugiura, T. Hoshino
“Structural and Energetic Analysis on the Complexes of Clinically-isolated Subtype C HIV-1 Proteases and Approved Inhibitors by Molecular Dynamics Simulation”
J. Phys. Chem. B 114, 521-530 (2010)

2. 学会発表

- ・ 星野忠次、藍壇愛、原田壮一郎、杉浦互
「ウイルス酵素の構造変形に関する系統解析」
第23回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋 (2009.11.27)
- ・ 柳田浩志、松元輝礁、浦野恵美子、駒野淳、星野忠次
「新規HIV-1逆転写酵素RNase H活性阻害薬の設計と合成」

日本薬学会第130年会、岡山 (2010.3.29)
・ 藍壇愛、萩原洋子、鈴木優章、根矢三郎、星野忠次

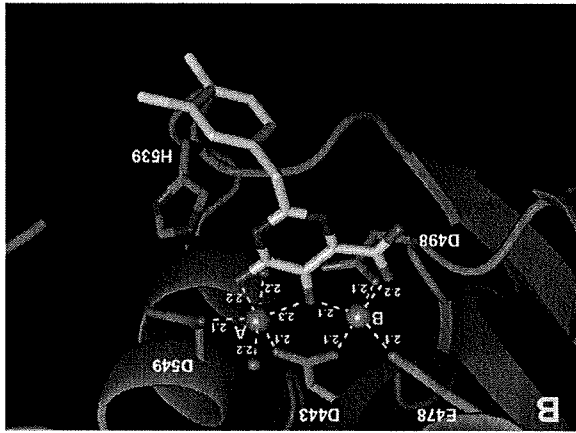
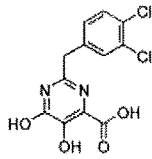
「V82A, I84V変異を標的としたHIV-1プロテアーゼ阻害剤の設計」

日本薬学会第130年会、岡山 (2010.3.29)
・ 原田壮一郎、鈴木優章、根矢三郎、星野忠次
「HIV-1逆転写酵素の結晶構造の分解能を向上させる変異に関する分子動力的研究」

日本薬学会第130年会、岡山 (2010.3.29)

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

J. Med. Chem. 52, 7581,2009
pyrimidinol



Structure 17, 1625,2009
 β -thujaplicinol

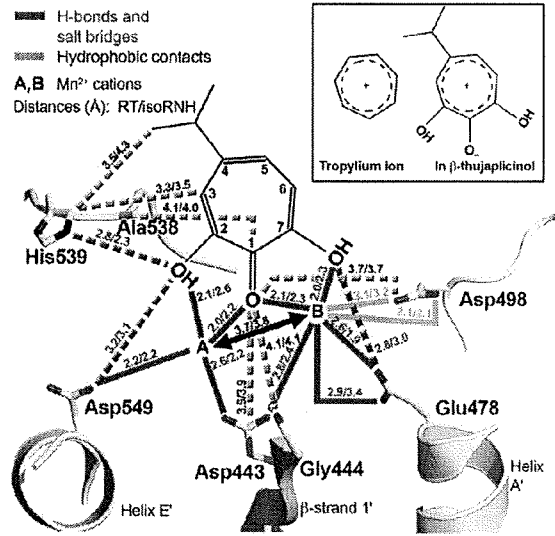


図1：RNase H領域と活性阻害剤の共結晶X線構造解析の報告

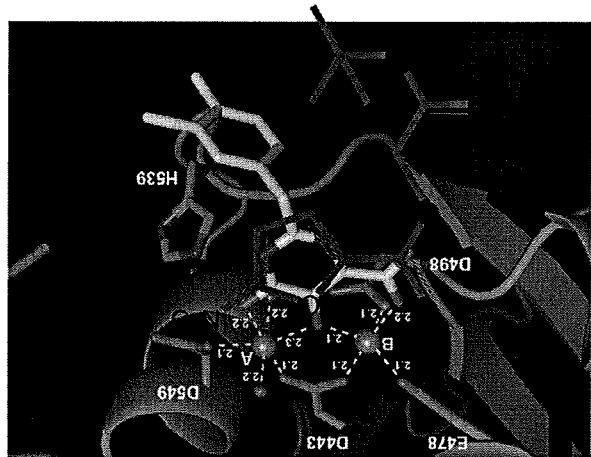
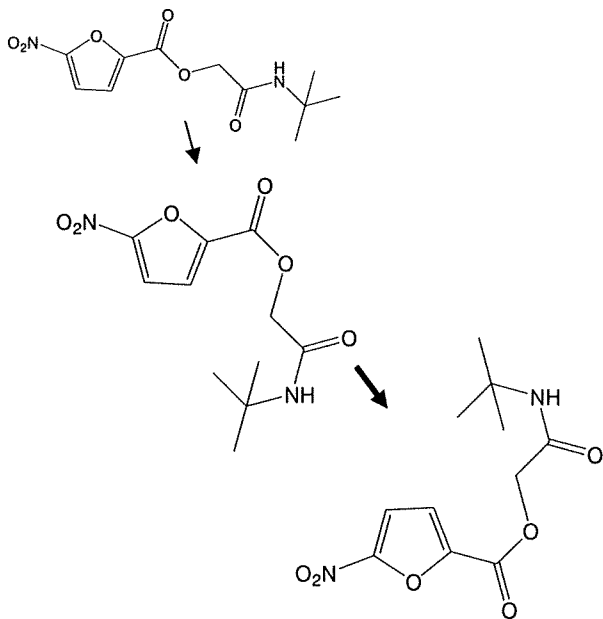


図2：先導化合物とRNase Hの結合構造の予測

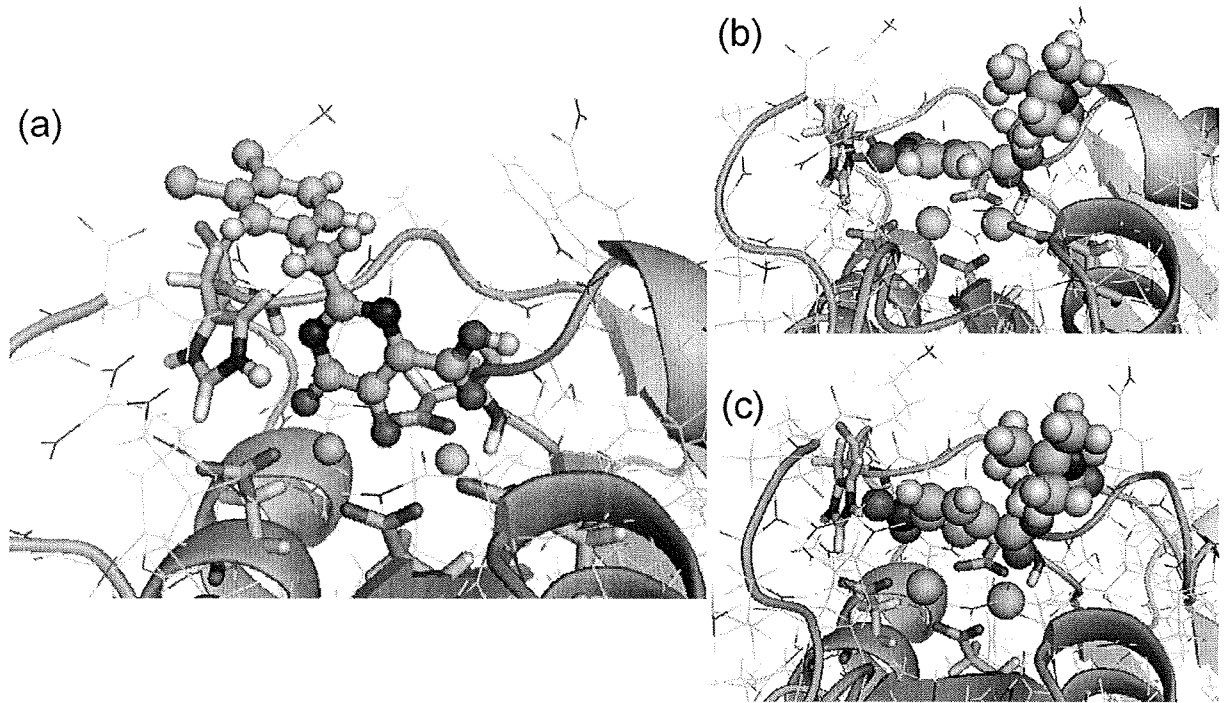


図3：化合物とRNase Hの結合構造の分子軌道法による計算予測

(a)Pyrimidinol, (b)BK-161, (c)BK-169

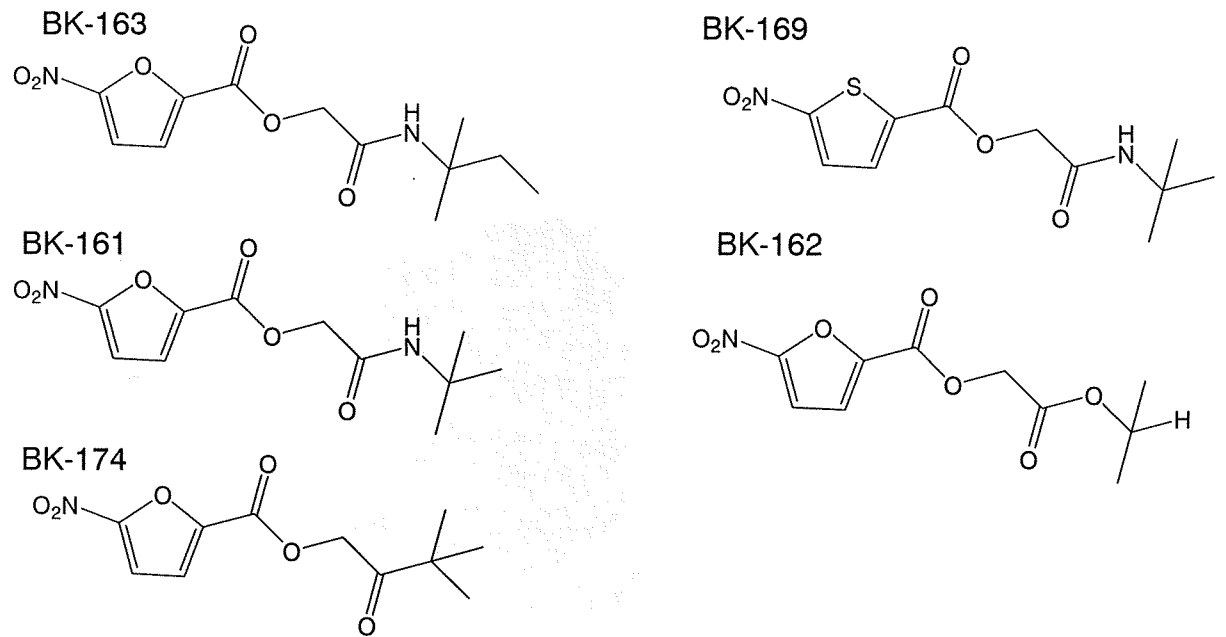


図4：阻害活性化合物の基本化学構造の骨格

IC₅₀= no inhibition

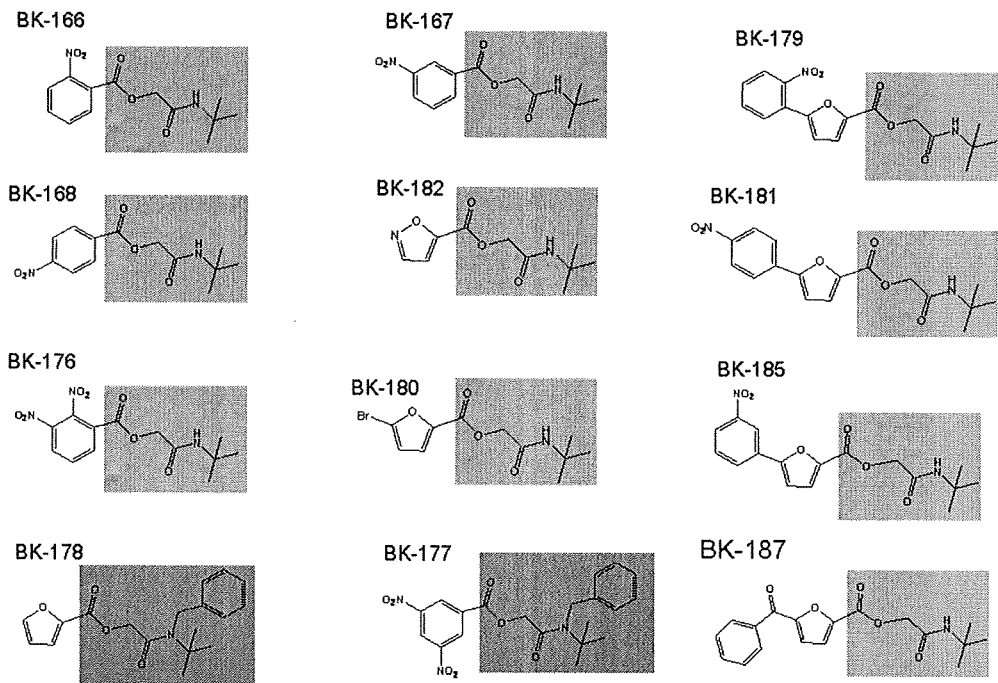


図5：ニトロフラン環部位を変化させた化合物の合成展開

IC₅₀= no inhibition

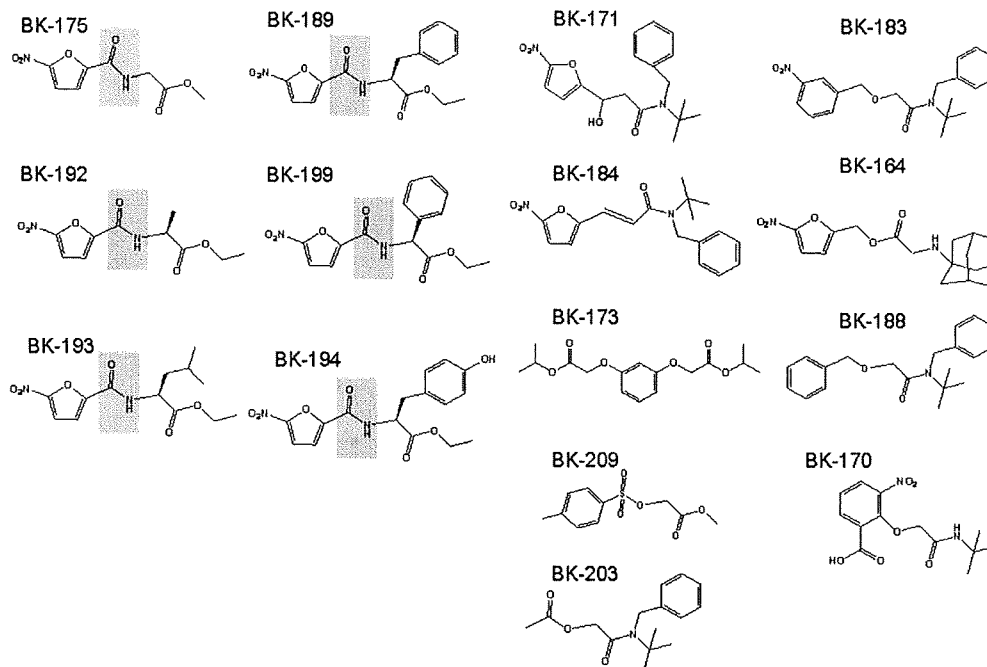


図6：エステル結合部位を変化させた化合物の合成展開

IC₅₀ ~ 5 μM

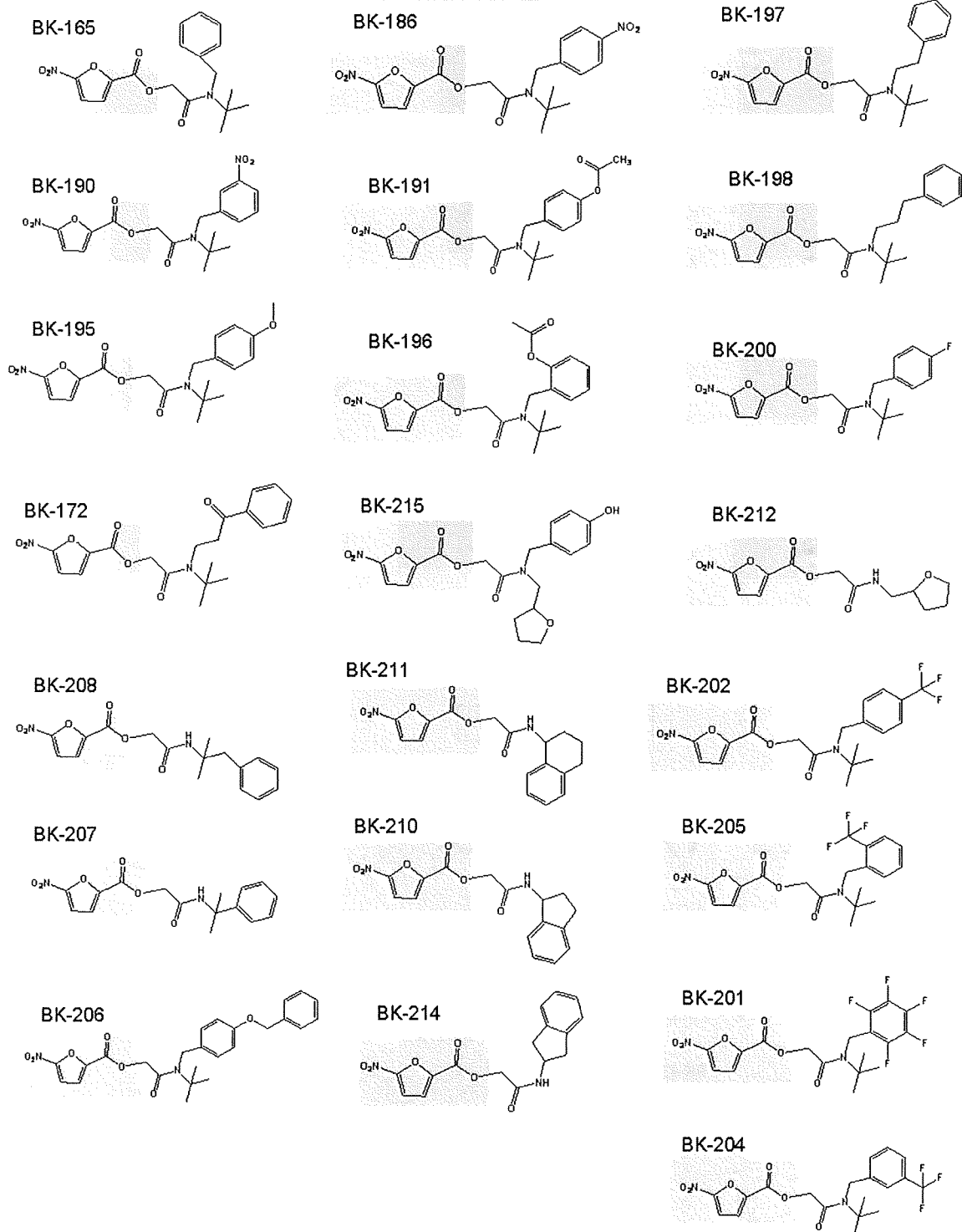
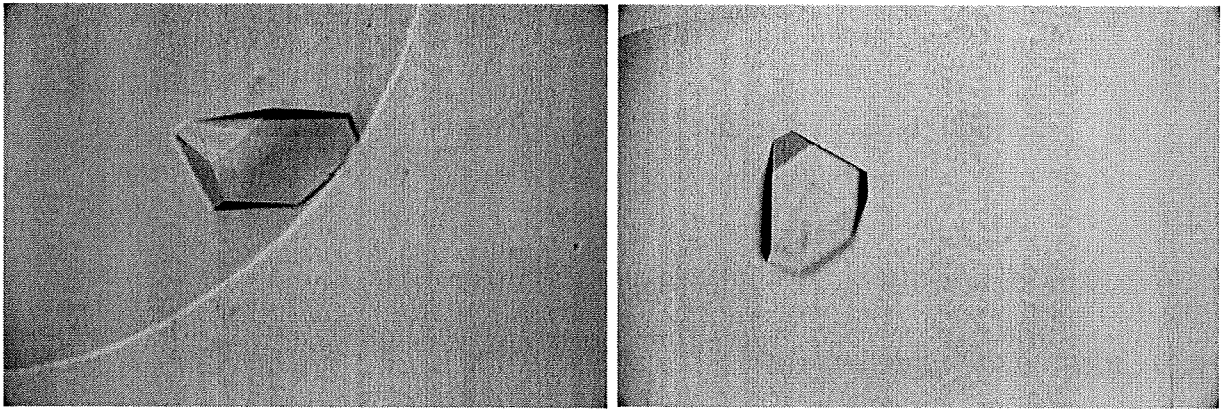


図 7 : 疎水性置換基部位を変化させた化合物の合成展開



HIV-1 RT (RT69A) +
inhibitor (5-nitro-furan-2-carboxylic acid [[4-(4-bromo-
phenyl)-thiazol-2-yl]]-(tetrahydro-furan-2-methyl)-

HIV-1 RT (RT69A) +
inhibitor (5-nitro-furan-2-carboxylic acid

図 8 : 標的タンパク質と活性阻害化合物の結晶

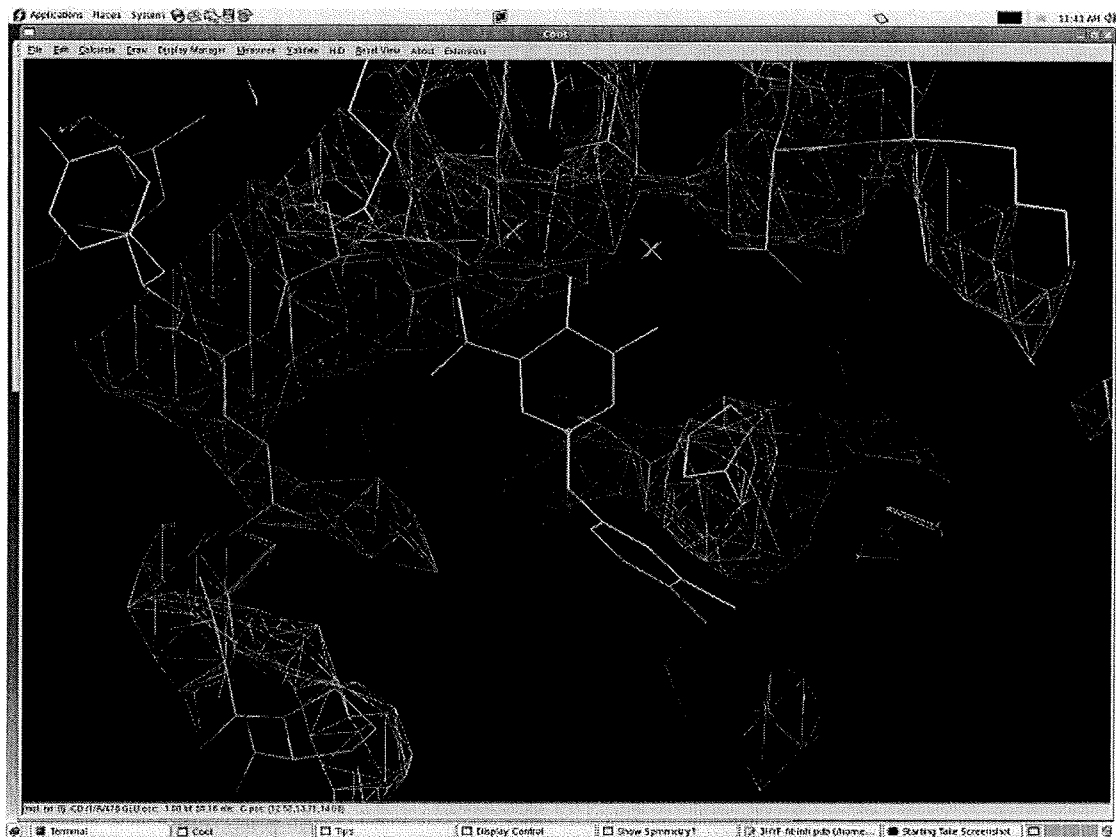


図 9 : X線結晶解析から得られた電子密度（網掛け）と共結晶
構造解析の報告（PDBcode:3HYF；スティック表示）との比較