

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

分担研究課題：新規 RNase H 阻害剤の生物活性および酵素抑制活性の測定

研究分担者：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 HIV-1 感染症は抗レトロウイルス薬の併用療法で感染症進行をある程度制御できるようになった。しかし、ウイルスは変異しやすいために抗レトロウイルス薬に対する耐性を獲得する。薬剤耐性ウイルスは徐々に流行を広げておりこれを制御するための方法が求められている。この対策の一つとして期待されているのは新規治療薬の開発であり、その治療標的としてウイルスの逆転写酵素に内在する RNase H 活性が指摘されている。我々はこれまで RNaseH 阻害剤の基本分子骨格 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME) 誘導体を発見した。本研究では NACME 誘導体を改良してより強力な RNase H 阻害剤の同定を試みる。本年度は118種類の小分子化合物の RNase H 阻害活性を評価し、34種類の化合物を RNase H 阻害剤として同定することに成功した。これを基盤情報としてさらに強力な RNase H 阻害剤の開発が可能になることが期待される。

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。そのうえ、近年では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いる。薬剤耐性を生じさせないために有効な手段の一つは、アドヒアランスを確保する事であるが、薬剤の持つ副作用はこれを障害する大きな要因の一つになっている。また、抗レトロウイルス薬の長期毒性はいまだ完全に払拭されたわけではなく、今後も既存の薬剤や新薬で使用が制限される危険性は皆無とは言えない。この現状が放置され、有効な HIV 流行阻止が達成されないと、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。ワクチン開発の早急な実現が困難であることを鑑みると、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 薬開発に求められる要点は、(1) 既存の薬剤と作用機序を異にする、(2) 既存の抗エイズ薬との併用により薬剤作用の増強する、(3) 既存の薬剤耐性ウイルスに対しても治療効果を持つ、(4) 副作用が少ない、(5) 薬剤の体内動態が優れていることなどである。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が、RNase H 阻害剤は上記の条件に合致することが期待される。我々はこれまでに有望なリード化合物として 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoyl

methyl ester (NACME) 誘導体を報告している (Fuji et al., J Med Chem 2009)。本研究では RNase H 活性阻害剤誘導体における薬剤活性を評価することにより、薬剤の最適化を推し進めることを目標に掲げる。本年度は新たに NACME 誘導体を合成展開し、逆転写酵素の RNase H 活性を阻害する活性を測定するとともに、化合物の同定と改良を効率的にするための支援技術として、電算機アルゴリズム開発の実証実験を行った。

B. 研究方法

NACME 誘導体を合成展開し、逆転写酵素の RNase H 活性を阻害する活性を測定する。また、新たな阻害剤化学構造を同定し、電算機に基づいた *in silico* 薬剤スクリーニング技術の信頼性を向上させ、computer assisted drug design 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、Parniak らが樹立した手法を基にした (Parniak et al, Anal Biochem 2003)。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。

本年度は 118 種類の小分子化合物を評価した。薬剤の濃度ははじめに 50 μ M にて活性を評価し、リード化合物である 5-nitro-furan-2-carboxylic acid adamantan-1-carbamoylmethyl ester (NAC) と活性を比較した。本実験系の詳細は Fuji et al., J Med Chem 2009 に記載されている。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

新規に化学合成した NACME 誘導体を 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 (表 1. 番号のみが前者、BK 付き番号が後者)。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。NACME 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、NACME の誘導体が酵素阻害活性を持つ構造であることが強く示唆される。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 (Parniak et al, 2003 Aual Biochem; Fuji et al, 2009 J Med Chem)、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。

D. 考察

NACME 誘導体が RNase H 阻害剤の基本骨格として機能することは 2009 年の論文 (Fuji et al, 2009 J Med Chem) で検証されているが、今回デザインされた誘導体におけるヒット率 47.1% は、2009 年の報告書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を行い、より強力な阻害剤が同定できると期待される。

in silico ドラッグスクリーニングでは 10% 以上のヒット率があることがしばしば経験される。これに比べると今回のヒット率 2.1% は必ずしも高くはなかった。この原因は金属イオンが活性中心に位置するため、十分に電算機の潜在力を引き出せなかった可能性が指摘できる。しかし、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ことを考えると、今回の *in silico* スクリーニングで用いたアルゴリズムは、RNase H 阻害活性を持つ化合物を選抜するための計算基盤になるかもしれない。今後は金属イオンと小分子化合物の相互作用をより適切な計算法を適用することが求められる。この計算アルゴリズムが構築できれば RNase H 阻害活性を持つ化合物新規化合物のデザインや NACME 誘導体の改良に大きく役立つ事ができると期待される。

in silico 戦略で得られた活性を有する化合物は基本骨格が NACME と大きく異なる。これは NACME 誘導体による薬剤開発が生体毒性等により頓挫した際の重要な代替候補となる可能性がある。今後はこの化合物についても活性と構造の相関を検討する必要もあるかもしれない。

構造と活性の相関に関する詳細な解析は、星野班員の分担報告書を、*in silico* シミュレーションに関する詳細は沖本博士の分担報告書を参照のこと。

E. 結論

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同定するためのスクリーニングを行い、34 種類の化合物を RNase H 阻害剤として同定することに成功した。これらをもとに、RNase H 活性阻害剤の改良が可能になると期待できる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1) Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J. A dominant-negative

derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci*. In press.

2) Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Jun Komano. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*. In press.

3) Makiko Hamatake, Jun Komano, Emiko Urano, Fumiko Maeda, Yasuko Nagatsuka, Masataka Takekoshi. Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J Immunol*. In press.

4) Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, Naoko Takahashi-Makise, Takamasa Ueno, Tsutomu Agatsuma, Hirofumi Akari, Jun Komano, Yutaka Takebe, Kazuo Motoyoshi and Seiji Okada.

Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *Journal of Cellular Physiology*. 2009 Nov;221(2):458-468.

5) Tsutomu Murakami, Sei Kumakura, Toru Yamazaki, Reiko Tanaka, Makiko Hamatake, Kazu Okuma, Wei Huang, Jonathan Toma, Jun Komano, Mikiro Yanaka, Yuetsu Tanaka, and Naoki Yamamoto. The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type

1 Infection: Comparative Studies with AMD3100. Antimicrobe Agents and Chemotherapy. 2009 Jul;53(7):2940-2948.

学会発表

(国際学会)

1) Tsutomu Murakami, Kei Miyakawa, Cecilia Bucci, Jun Komano, Naoki Yamamoto. Role of Rab7 and its effector protein in HIV-1 assembly. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

2) Emiko Urano, Hiroyuki Okunaga, Yuko Morikawa, Jun Komano. Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DnaJ/Hsp40 protein family. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

(国内学会)

1) 駒野 淳. オーミクス解析手法が次世代エイズ治療・予防法開発に与えるインパクトシンポジウム「これからのHIV研究の進むべき方向」第23回日本エイズ学会, 名古屋, 11月27日 2009

2) 濱武牧子, 宮内浩典, 青木 徹, 浦野恵美子, 駒野 淳. Higher-order homotypic oligomerization determines the steady-state cell surface levels of CXCR4. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

3) 上原大輔, 坂本真衣子, 吉川治孝, 泉川圭一, 早川俊哉, 駒野 淳, 高橋信弘. Proteomic search for the function of HIV-1Rev protein in human cells. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

4) 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, 山本直樹, 駒野 淳. Development of 5th generation lentiviral vector. 第32回日本分子生物学会年

会, 横浜, 2009

5) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田 剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulates the infectivity of human immunodeficiency virus replication. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

6) 村上 努, 呉 鴻規, 富田香織, 伯川冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本直樹. Rab蛋白質とそのエフェクター蛋白質のHIV-1粒子形成における役割 (Rab7を中心に). 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009

7) 浦野 恵美子, 倉持紀子, 供田 洋, 武部 豊, 駒野 淳, 森川 裕子. 酵母の膜結合Gag-Gag反応系で同定されたHIV-1 Gagアセンブリー阻害剤. 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009

8) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田 剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. T細胞におけるHIV-1抵抗性遺伝子のスクリーニング-SEC14L1a C末端ドメインの同定とその機能解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

9) 濱武牧子, 駒野 淳, 前田 史子, 長塚靖子, 竹腰 正隆. HIV-1複製抑制能を有する健常人由来CD4反応性IgM抗体クローンの分離: HIV-1に対するnatural humoral resistance. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

10) 滝澤 万里, 草川 茂, 北村克彦, 長縄 聡, 村上 利夫, 本多 三男, 山本 直樹, 駒野 淳. Diversified HIV-1を利用した中和抗体KD-247感受性を規定するEnv アミノ酸残基の網羅的解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

11) 村上 努, 呉 鴻規, 富田 香織, 伯川 冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本 直樹. HIV-1粒

子形成におけるRab7とそのエフェクタータンパク質の役割. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

Hideto Chono, Jun Komano, et al. Inventory of high-titer lentivirus production system by modifying the amino-terminus of Gag (出願2009年11月19日 特願2009-263587) .

2. 実用新案登録

なし

3. その他

表1. 小分子化合物の RNase H 阻害活性評価

化合物 ID	RNase H 阻害活性	化合物 ID	RNase H 阻害活性	化合物 ID	RNase H 阻害活性
161	○	202	○	BK-020	×
162	○	203	×	BK-021	×
163	○	204	○	BK-022	×
164	×	205	○	BK-023	×
165	○	206	×	BK-024	×
166	×	207	○	BK-025	×
167	×	208	○	BK-026	×
168	×	209	×	BK-027	×
169	○	210	○	BK-028	×
170	×	211	○	BK-029	×
171	×	212	○	BK-030	×
172	×	214	○	BK-031	×
173	×	215	○	BK-032	×
174	○	216	○	BK-033	×
175	×	217	○	BK-034	×
176	×	218	×	BK-035	×
177	×	219	○	BK-036	×
178	×	220	×	BK-037	×
179	×	221	○	BK-038	×
180	×	222	○	BK-039	×
181	×	223	×	BK-040	×
182	×	224	×	BK-041	×
183	×	225	×	BK-042	×
184	×	226	○	BK-043	×
185	×	227	○	BK-044	×
186	○	228	×	BK-045	×
187	×	229	○	BK-046	×
188	×	230	○	BK-047	×
189	×	231	×	BK-048	×
190	○	232	×	BK-049	×
191	○	BK-010	×	BK-050	×
192	×	BK-011	×	BK-051	×
193	×	BK-012	×	BK-052	×
194	×	BK-013	×	BK-053	×
195	○	BK-014	×	BK-055	○
196	○	BK-015	×	BK-056	×
197	○	BK-016	×	BK-057	×
198	×	BK-017	×	BK-058	×
200	○	BK-018	×		
201	○	BK-019	×		

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

分担研究課題：HIV-1 RNase H 変異パターンに関する分子疫学的解析

研究分担者：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）

研究要旨

RNase H 阻害剤開発の上で、薬剤耐性ウイルスの出現と既存薬に対する耐性ウイルスの交差耐性を十分考慮することが求められる。逆転写酵素は、逆転写酵素 Polymerase 領域とRNase H 領域からなるため、Polymerase 領域内に生じる核酸系逆転写酵素阻害剤（Nucleoside analogue RT Inhibitor：NRTI）に対する薬剤耐性変異が、RNase H 領域の変異によって、NRTI 耐性度が増強されるケースも報告されている。以上を踏まえて、本研究では、2つの研究テーマに取り組んでいる。(1)未治療患者に感染している HIV-1 の RNase H 遺伝子多型を解析、その遺伝情報の蓄積、(2)治療患者(NRTI 治療と RAL 治療)に感染している RNase H 遺伝子変異と、RT Polymerase 遺伝子領域およびインテグラーゼ遺伝子領域の変異との相関性についての解析、である。

現在、本邦における薬剤耐性ウイルスの検査には、RNase H 領域が含まれておらず、遺伝子配列決定の標準方法が確立されていない。そのため、初年度である 21 年度は、まず、PCR による RNase H 領域の核酸増幅とクローニング、遺伝子配列決定検査のためのプライマー等の最適化に取り組んだ。最適化した条件を用いて、RAL 投与歴のない感染者（治療群と未治療群）における HIV-1（サブタイプ B）RNase H 遺伝子配列を解析した。

A. 研究目的

HIV 感染における多剤併用療法の進歩により感染予後の改善に大きな成果を挙げ、HIV 感染症はもはや慢性疾患の範疇に入りつつある時代に突入している。しかし、治療の長期化が進み、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獲得している患者を救済することは重要な課題であるが、さら

に、世界的には、薬剤耐性ウイルスの伝搬が大きな社会的不安材料となっている。このような問題を打破するためには、より広く選択可能な治療薬を開発することが必要である。さらに、作用点異なる新規薬剤は併用することにより既存薬（例えば逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤）の投与量を抑えることができるため、副作用の軽減や薬剤耐性ウイルス出現のチ

チャンスを下させることが期待できる。また、既存薬は多くの改良がなされているため、同じ作用点を標的にした新規薬剤の実用化は、既存薬に対する耐性ウイルスにも効果を示すなどのより改善された阻害剤として要求されるなど、現状では新薬開発のハードルが高い。このようなことから、作用機序が既存のメカニズムと異なる新規抗HIV薬の開発を強力に推進することは効果的で、かつ重要であると考えられる。RNase H は、HIV の Pol 領域にコードされるウイルスの複製に必須な酵素であり、残された標的の中で、抗 HIV 阻害剤開発において最も効果的で現実的な標的であると考えられる。

RNase H 阻害剤開発の上で、薬剤耐性ウイルスの出現と既存薬に対する耐性ウイルスの交差耐性を十分考慮することが求められる。逆転写酵素は、逆転写酵素 Polymerase 領域と RNase H 領域からなるため、Polymerase 領域内に生じる核酸系逆転写酵素阻害剤 (Nucleoside analogue RT Inhibitor : NRTI) に対する薬剤耐性変異が、RNase H 領域の変異によって、NRTI 耐性度が増強されるケースも報告されている。図 1 に示すように、例えば、RNase H Q509L 変異が、NRTI に対する TAMs 薬剤耐性の度合いを増強する。さらに、NRTI の治療によって Polymerase 領域ではなく、RNase H 領域に変異が誘導されるケースも報告されている (図 2 に代表的なまとめを示す)。以上のことを考慮すると、単に RNase H の遺伝子多型を考慮し、多くの遺伝タイプに対する RNase H に阻害効果を示す候補化合物の選択を押し進めるだけでなく、NRTI による治療歴

がある患者におけるウイルス RNase H 遺伝子領域の多型を考慮した薬剤開発をしなければならぬ。さらに、将来を想定し、開発される RNase H 阻害剤に対する薬剤ウイルスが出現した場合、RNase H 領域に生じる変異が既存薬 (特に、NRTI) の治療に対してどのような影響を与えるか予測する材料 (HIV 遺伝子情報) を蓄積し、NRTI 治療・未治療間で、RNase H 領域と Polymerase 領域の変異が何らかの相関があるのか解析することが必要である。

近年、インテグラーゼ阻害剤 Raltegravir (RAL) が本邦においても臨床の現場では用いられている。インテグラーゼは、 Mg^{2+} が配位した酵素活性中心を有し、RAL は配位した Mg^{2+} をキレートすることによりインテグラーゼの酵素活性を不活化しウイルスの複製を阻害する。構造学的に、RNase H も酵素活性中心に Mg^{2+} を配位し、基質は異なるが酵素活性中心がインテグラーゼと類似した構造をとることが知られている。実際、インテグラーゼと RNase H 酵素活性の両方に阻害活性を有する低分子化合物があることが報告されている (1, 2)。このような構造学的類似性から、RAL 投与によるインテグラーゼ領域に生じる薬剤耐性変異耐性 (一次的な変異) だけでなく、RNase H 領域に二次的な変異が誘導される可能性が考えられる。そのため、現状では、RNase H 阻害剤開発には RAL によって誘発される可能性がある二次的な RNase H 領域内の変異が、RNase H 阻害剤候補化合物の分子結合あるいは阻害効果に影響をあたえる可能性があるか検討する必要がある。

以上のような背景を踏まえ、2つの研究テーマに取り組む。

1) 未治療患者に感染している HIV-1 の RNase H 遺伝子多型を解析、その遺伝情報を蓄積する。

2) 治療患者(NRTI 治療と RAL 治療)に感染している RNase H 遺伝子変異と、RT Polymerase 遺伝子領域およびインテグラーゼ遺伝子領域の変異との相関性について解析する。

現在、本邦における薬剤耐性ウイルスの検査には、RNase H 領域が含まれておらず、遺伝子配列決定の標準方法が確立されていない。そのため、初年度である 21 年度は、まず、PCR による RNase H 領域の核酸増幅とクローニング、遺伝子配列決定検査のためのプライマー等の最適化に取り組んだ。最適化した条件を用いて、RAL 投与歴のない感染者（治療群と未治療群）における HIV-1（サブタイプ B）RNase H 遺伝子配列を解析した。

B. 研究方法

逆転写酵素領域の遺伝子配列解析のため、nested PCR による遺伝子増幅に必要なプライマー等の最適化を検討した(図3)。その結果、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 と 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、RAL 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 に絞り、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

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(図4)。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 領域内の変異パターン(図3)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) (3)には変異が認められなかった。

RAL 投与歴がない治療患者と未治療患者との間で、RNase H 領域の変異多型は限られた傾向があるように考えられる。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、両群の間に差が認められなかった。今後、検体数を増やし解析をする必要があるが、現時点では、RAL 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。これらのことから、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といえる。今後、症例数を増やすこととともに、構造学的な考察も組み入れる必要がある。今回認められた RNase H 変異部位が、タンパクの構造上の位置はどこなのか、さらに RT 全体の構造への影響（ゆがみや核酸の位置関係）があるかを、モデル構造などを用いて解析することが今後の課題になる。

引用文献

1. Budihas SR, *et al.* (2005) Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity by hydroxylated tropolones. *Nucleic Acids Res* 33:1249-1256.
2. Marchand C, *et al.* (2008) Madurahydroxylactone derivatives as dual inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and RNase H. *Antimicrob Agents Chemother* 52:361-364.
3. Dash C, Scarth BJ, Badorrek C, Gotte M, & Le Grice SF (2008) Examining the ribonuclease H primer grip of HIV-1 reverse transcriptase by charge neutralization of RNA/DNA hybrids. *Nucleic Acids Res* 36:6363-6371.

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- Iwatani Y., Chan D. S. B., Liu L., Yoshii H., Shibata J., Yamamoto N., Levin J. G., Gronenborn A. M., and Sugiura W.: HIV-1 Vif-mediated ubiquitination / degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2009) 106:19539-19544
- Iwatani Y.: Study on molecular mechanism of host defense factor, APOBEC3G, against HIV. *J. AIDS Research* (2009) 11:218-222

2. 学会発表

- 岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦互「Vif依存的なAPOBEC3Gのコピキチン化部位と抗ウイルス作用」
第23回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋 (2009.11.28)

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

RNase H 変異	薬剤耐性 (NRTI) が強まる耐性変異パターン
E478Q	—
Q509L	TAMs (M41L/L210W/T215Y or D67N/K70R/T215F)
H539N	—
D549N	TAMs (M41L/L210W/T215Y or D67N/K70R/T215F)
T473	TAMs (M41L/L210W/T215Y or D67N/K70R/T215F)
Q475	TAMs (M41L/L210W/T215Y or D67N/K70R/T215F)
K476	TAMs (M41L/L210W/T215Y or D67N/K70R/T215F)
Y501	TAMs (M41L/L210W/T215Y or D67N/K70R/T215F)
I505	TAMs (M41L/L210W/T215Y or D67N/K70R/T215F)

※ Q509LはUpdate of the Drug Resistance Mutations in HIV-1で現在認定されている変異

図 1 : RNase H 変異が影響を与える耐性変異

NRTI-treatedでのみ見られる変異	NRTI-treatedで有意に見られる変異
Q547K I506L	K527N K530R

図 2 : NRTI-treated に特有に見られる変異

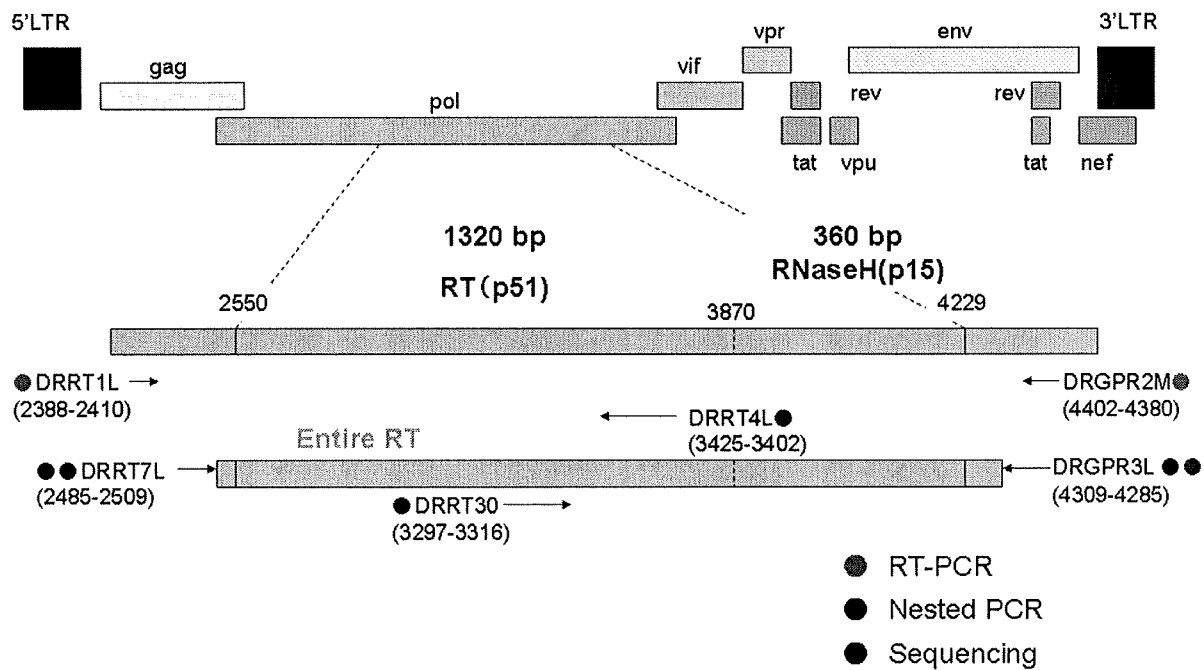


図3：使用したプライマーセット

p51領域変異	RNase H 領域変異	全症例数	治療症例数	未治療症例数
K366R	N460D	5	4	1
K103N	N460D	6	5	1
M184V	N460D	17	15	2
M41L	R461K	4	4	0
M184V	R461K	7	6	1
K20R	R461K	10	8	2
G359S	R461K	4	4	0
Q207E	R461K	8	6	2
E399D	R461K	3	3	0
M357T	R461K	11	8	3
I293V	R461K	6	5	1
P272A	R461K	12	10	2
E297V	R463K	3	3	0
K385R	R463K	3	3	0
V317A	V467[I, V]	3	3	0
T215Y	L469I	3	3	0
E297K	L469I	3	3	0
D177E	T470A	4	4	0
M41L	L491S	5	5	0
L210W	L491S	4	4	0
T215Y	L491S	6	6	0
P272A	L491S	9	9	0
V118I	L491S	3	3	0
L283I	Q512K	3	3	0
I135T	N519S	18	15	3
I202V	N519S	3	3	0
P272A	Q524E	5	4	1
P272A	K527Q	5	5	0
D123E	K527Q	4	4	0
T286A	K527Q	3	3	0
D177E	I556V	3	3	0
D67N	K558R	4	4	0

※黄色（網掛け）は薬剤耐性変異

サブタイプ Bのみ RAL投与無し （治療 n=48 未治療 n=42）

図4：治療／未治療で見られる遺伝型多型

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

分担研究課題：候補化合物の細胞毒性試験

研究分担者 村上 努（国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長）

研究要旨：本研究の最終目的は、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である。分担研究者の今年度の研究目的は主任研究者（星野）が合成し、分担研究者駒野が RNase H 阻害活性を測定し、阻害が数 μM を示した 24 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を MTT 法にて測定した。その結果、MT-4 細胞では、BK-202、BK-205 で $100\ \mu\text{M}$ で約 50%の細胞毒性が認められたが、その他の化合物は $100\ \mu\text{M}$ においてもほとんど細胞毒性を示さなかった。293T 細胞では、BK-190 など 6 化合物で CC_{50} が $36\text{--}83\ \mu\text{M}$ とやや強い毒性を示したが、それ以外の化合物の多くは $100\ \mu\text{M}$ においてもほとんど細胞毒性を示さなかった。

A. 研究目的

本研究の最終目的は、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である。分担研究者の今年度の研究目的は主任研究者（星野）が合成し、分担研究者駒野が RNase H 阻害活性を測定し、阻害が数 μM を示した化合物について 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することである。

B. 研究方法

(1) MT-4 細胞に対する細胞毒性の測定 (MTT assay) :

1. $100\ \mu\text{l}$ の RPMI1640+10%FBS (2%DMSO 含有) を 96 ウェルマイクロプレートに分注した (プレートの外周は PBS を $100\ \mu\text{l}$ 分注し、エッジ効果を防止した)。

2. トップのウェルに $200\ \mu\text{M}$ 化合物溶液 (RPMI1640 +10%FBS (2%DMSO 含有) を $200\ \mu\text{l}$ 分注した (トップのウェルの最終濃度は $100\ \mu\text{M}$)。

3. 化合物溶液の 2 倍段階希釈系列を作製した ($100, 50, 25, 12.5\ \mu\text{M}$)。その右隣の列はサンプル無添加のコントロールとした。

4. MT-4 細胞 ($4 \times 10^5/\text{ml}$, $100\ \mu\text{l}$) を各ウェルに分注した (培養液の最終 DMSO 濃度は 1%になる)。

5. CO_2 インキュベーター (37C , $5\%\text{CO}_2$) にて培養を開始した。

6. (培養 1-3 日目) 添加した化合物の細胞毒性を観察した。

7. (培養 3 日目)

1) 培養上清 ($100\ \mu\text{l}$) を除去した。

2) dye solution (MTT 試薬) を $15\ \mu\text{l}$ 各ウェ

ルに添加し、CO₂ インキュベーター内で1時間培養した。

- 3) solubilization solution/stop mix を 100 μ l 各ウェルに添加し、よくピペティングした（色素を十分溶解するさせるため、4Cで一晩静置した）。
- 4) プレートを生温に戻してから OD570/690 を分光光度計 (BIO-TEK ELx808) にて測定した。
- 5) サンプルの細胞毒性を算出した（細胞毒性が 50%を超えるものは、CC₅₀ も算出した）。

(2) 293T 細胞に対する細胞毒性の測定 (MT assay)

1. 100 μ l の RPMI1640 +10%FBS (2%DMSO 含有) を 96 ウェルマイクロプレートに分注した(プレートの外周は PBS を 100 μ l 分注し、エッジ効果を防止した)。
2. トップのウェルに 200 μ M 化合物溶液 (RPMI1640 +10%FBS (2%DMSO 含有)) を 200 μ l 分注した(トップのウェルの最終濃度は 100 μ M)。
3. 化合物溶液の 2 倍段階希釈系列を作製した (100, 50, 25, 12.5 μ M)。その右隣の列はサンプル無添加のコントロールとした。
4. 293T 細胞 (2x10⁵/ml, 100 μ l) を各ウェルに分注した (培養液の最終 DMSO 濃度は 1%になる)。
5. 以下、(1)の MT-4 細胞の方法と同様に行った。

(倫理面での配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

(1) MT-4 細胞に対する細胞毒性 :

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 (図 1)。

(2) 293T 細胞に対する細胞毒性 :

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(図 2)。

D. 考察

RNase H 阻害活性ではほとんど差が認められなかった誘導体間で細胞毒性に大きな差異が観察された。また、全般的に MT-4 細胞と比較して 293T 細胞でより強い細胞毒性が観察された。今回得られた細胞毒性の結果は今後より毒性の低い誘導体合成のための有益な情報となる。

E. 結論

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。その結果、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細胞毒性に大きな差異が観察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Urano, E., T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami, Y. Morikawa, N. Yamamoto, and J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55^{Gag} with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J. Gen. Virol.* 89(Pt 12):3144-3149, 2008.
- 2) Tanaka, T., H. Tsutsumi, W. Nomura, Y. Tanabe, N. Ohashi, A. Esaka, C. Ochiai, J. Sato, K. Itotani, T. Murakami, K. Ohba, N. Yamamoto, N. Fujii, and H. Tamamura. Bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. *Org. Biomol. Chem.* 6:4374-4377, 2008.
- 3) Iwasaki, Y., H. Akari, T. Murakami, S.

Kumakura, Z. Dewan, M. Yanaka, and N. Yamamoto. Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Sci.* 100:778-781, 2009.

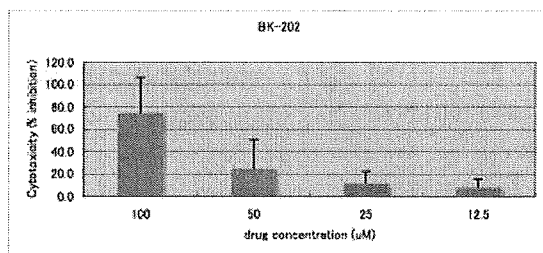
- 4) Murakami, T., S. Kumakura, T. Yamazaki, R. Tanaka, M. Hamatake, K. Okuma, W. Huang, J. Toma, J. Komano, M. Yanaka, Y. Tanaka, and N. Yamamoto. The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2940-2948, 2009
- 5) 村上 努 HIVの粒子形成のメカニズムー Gag蛋白に関する最新の知見ー *Confronting HIV2009* no.35:5-7, 2009.
- 6) 村上 努: HIV複製を制御する宿主因子の探索
The Journal of AIDS Research 11 (3): 205-209, 2009

2. 学会発表

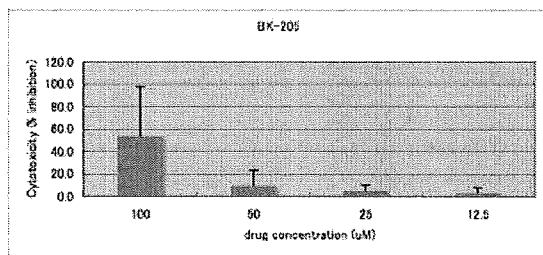
- 1) T. Murakami, K. Miyakawa, C. Bucci, J. Komano, and N. Yamamoto. Role of Rab7 and its effector protein in HIV-1 assembly. May 18-23 2009, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.
- 2) 村上 努, 呉 鴻規, 富田香織, 伯川冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本直樹. HIV-1 粒子形成における Rab7 とそのエフェクター蛋白質の役割 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 東京, 2009 年 10 月 25-27 日
- 3) 村上 努, 呉 鴻規, 富田香織, 伯川冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本直樹. Rab 蛋白質とそのエフェクター蛋白質の HIV-1 粒子形成における役割 (Rab7 を中心に) 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会, 名古屋, 2009 年 11 月 26-28 日
- 4) T. Aoki, S. Shimizu, U. Emiko, M. Hamatake, K. Terashima, H. Tamamura, T. Murakami, N. Yamamoto and J. Komano. Development of 5th generation lentiviral vector. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 9-12

日

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当事項なし



CC₅₀: 71 μM



CC₅₀: 95 μM

図1. RNase H阻害剤の細胞毒性 (MT-4細胞)

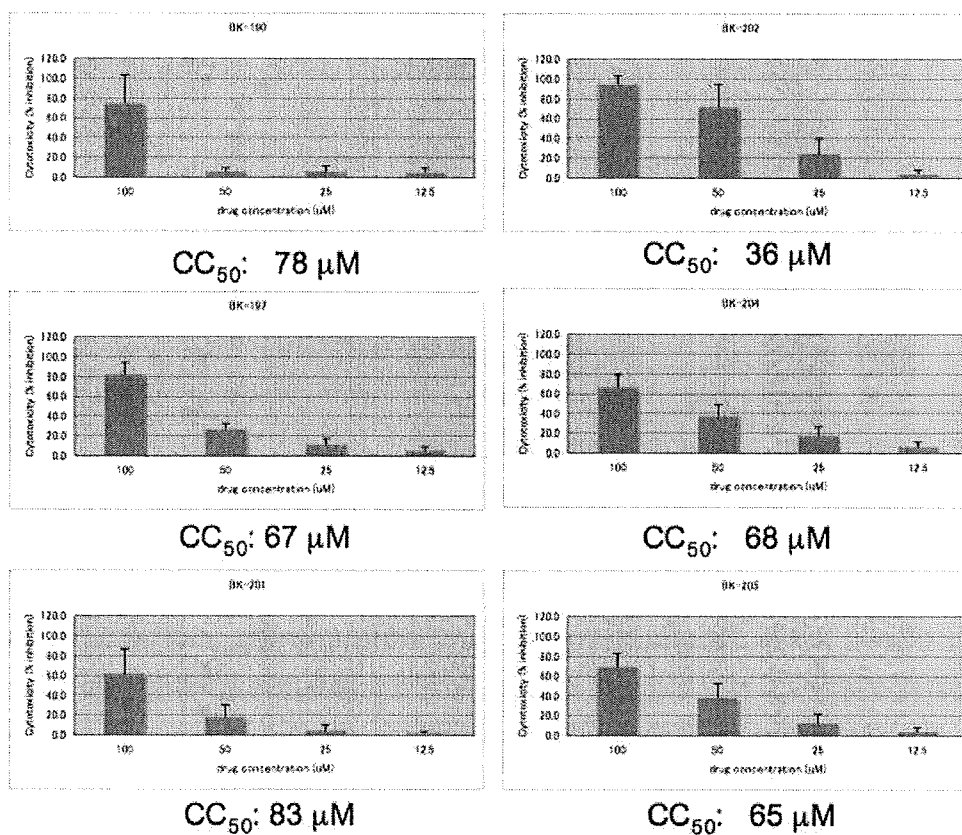


図2. RNase H阻害剤の細胞毒性 (293T細胞)

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

分担研究課題：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

研究分担者 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）

研究要旨

RT 内在の RNase H ドメインの酵素活性中心には、2つの配位金属 Mg が隣接して存在している。このような特性を持つタンパクポケットを対象にした計算機支援の薬剤設計はほとんど報告されていない。そこで本研究では、従来の薬剤設計手法に加えて、新たな計算手法の導入を試みている。今年度は、(1) 大規模化合物ライブラリを使った新規化合物探索、(2) 先導化合物からの誘導体の構造・物性と実験による酵素活性阻害のデータからの構造活性相関、(3) 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通じて、阻害剤開発のための基本的情報（精密構造の入手、先行研究からの構造活性相関）を得ることができた。さらに大規模ライブラリを用いた計算機スクリーニングからは、新規骨格を有する阻害剤候補化合物を見出すことができた。

A. 研究目的：

本年度は、RT 内在の RNase H ドメインをターゲットとして、その酵素活性を阻害する薬剤を計算機シミュレーションにより設計することにある。昨年後半の研究報告により、RT 内在の RNase H ドメインの酵素活性中心には、2つの配位金属 Mg が隣接して存在していることが明らかになった。このような特性を持つタンパクポケットを対象にした計算機支援の薬剤設計はほとんど報告されていないため、従来の薬剤設計手法に加えて新たな計算手法の導入が必要となる。そこで、今年度の研究では、以下に示す3つの研究を行った。

(1) 大規模化合物ライブラリを使った新

規化合物探索

- (2) NACME 誘導体の構造・物性と実験による酵素活性阻害のデータからの構造活性相関
- (3) 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

B. 研究方法

(1) 大規模化合物ライブラリを使った化合物探索

先行研究で酵素活性阻害が確認された NACME 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。その手順は以下のとおりである。

タンパク質構造の構築

化合物探索には、RNase H ドメインの結晶構造 (PDB ID: 3HYF) を使用した。この際、上記の結晶構造には欠損部位などが観察されたので、ホモロジーモデリング技法により欠損部位の修繕を施し分子ドッキングの入力構造とした。

化合物ライブラリの調整

スクリーニング用の化合物ライブラリ (SCD:600 万化合物含有) から、薬剤設計には不向きな化合物や反応性の高い化合物を除去し、分子ドッキング用の化合物ライブラリ (18 万化合物程度) を構築した。

分子ドッキング

上記の RNase H 構造と化合物ライブラリを用いて、図 1 に示すように分子ドッキング技法を使って 3 段階の絞り込みを行った。1 段階目はドッキングソフト GOLD を使って 3 万化合物にまで濃縮、2 段階目はドッキングソフト GLIDE を使って 5000 化合物まで濃縮、最後に FINGERPRINT 計算を使ってクラスタリングとドッキングスコアの順位付けにより 250 化合物を選考した。

(2) NACME 誘導体の構造・物性と実験による酵素活性阻害のデータからの構造活性相関

今年度までに合成された NACME 誘導体 53 化合物とその酵素活性阻害データを使用し、その関係性を示す統計モデルの構築を行った。

(3) 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

上述したように RNase H の活性中心の構造には、2 つの配位金属 Mg が近接して存在していることがわかっている。この構造に対して、分

子動力学的な計算を適用すると酵素活性に重要な Mg の配置が大きく崩れてしまうことがわかった。そこで、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構造モデリングを行った。量子化学計算部分は基底関数系として CC-PVTZ(-f) を用いて DFT 法

(B3LYP) により計算を行った。初期構造には、最新の実験データである座標データ (PDB ID: 3IG1) を使用した。この構造の欠損アミノ酸部位の補完や水分子の追加などの修正を施し、計算の入力構造とした。

C. 研究結果

(1) 大規模化合物ライブラリを使った化合物探索

分子ドッキングにより絞りこんだ 250 化合物から 103 化合物を購入して、現在、感染研で酵素活性阻害効果を実験中である。

(2) NACME 誘導体の構造・物性と実験による酵素活性阻害のデータからの構造活性相関

NACME 誘導体 53 化合物とその酵素活性阻害データを使って構築した統計モデルの 1 例を示す。このモデルでは、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ることが予想される。その他の計算手法と組み合わせて利用していくことが望ましいと考えられる。

(3) 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

最新の RT の X 線結晶構造を使って、酵素活性に重要な Mg の周辺アミノ酸、薬剤分子については量子化学計算を、それ以外の領域には分子力学計算を適用してエネルギー極小化を実行中である。

D. 考察