

201009013A

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22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23(2011)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22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23(2011)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 -----	17
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 -----	23
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 -----	35
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 -----	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	43

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

既存薬と作用機序が異なる新規抗HIV薬の開発は、薬剤耐性ウイルスを抑制する有効かつ現実的な対策である。本研究班では、HIV逆転写酵素に内在するRNaseH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。研究開発の当初には、 IC_{50} 値で $16.5 \mu M$ の先導化合物を有していたが、前年度までに $1.0 \mu M$ の活性化合物を得た。今年度はさらに構造変換を進め、 IC_{50} 値で $0.8 \mu M$ の誘導体を得ることに成功した。量子化学計算に基づく計算機解析により、合成した化合物の標的酵素部位への安定な結合構造を明らかにした。合成化合物には、ごく一部を除いて、顕著な細胞毒性を示すものはなかった。臨床検体における HIV-1 RNaseH 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。これらの変異の全ては、RNase H領域の薬物や基質が結合する部位とは裏側、つまりRNase H活性ポケットとは反対側に位置しており、現在、臨床で見られる変異体にはRNase H阻害剤が有効であることが示唆された。最終年度に向け、化合物構造をより最適化し、有効な薬物を創出する計画である。

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計算生命科学研究所

センター
上級研究員

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RNaseH活性を標的とする抗HIV薬の開発を進め、前臨

床レベルの薬物を創出する。研究事業実施当初に、既に阻害活性を持つ先導化合物を得ていた。研究初年度には、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した。この結果を踏まえて、本年度は、阻害活性を向上させるために化合物の構造最適化を実施する。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る。

I. 計算機設計

前年度は、大規模市販化合物ライブラリを使って新規化合物探索を実施した。化合物探索では、先導化合物やその誘導体以外の新規骨格を有する阻害剤を発見することができた。そこで前年度に計算機スクリーニングによって得られたヒット化合物から更に阻害活性の強い化合物を得るため、ヒット化合物の類縁化合物の探索を行った。計算によって部分的構造や立体的構造特性の類似性から市販化合物ライブラリを対象に検索を行い、類似性の高かった約 360 個の化合物を選んだ。次に、これら化合物に対して合成展開の可能性や分子ドッキングによる結合親和性を考慮して選考を行い、最終的に 28 化合物を購入した。これらの化合物に対し、実験的により活性評価を行った。また同時に量子化学的手法を用いた RT 内在の RNase H ドメインとヒット化合物の結合構造を予測した。構造予測では、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

前年度は、当研究班で有していた先導化合物の高収率で短工程な合成方法を得ることができた。本年度は、この合成方法を利用して、多くの類似化合物を合成した。合成展開は、以下の点に着目しながら実施した。

- ・合成展開している化合物は、ニトロフラン環を基本骨格に持つ。この部分は、RNaseHドメインのMg金属に配位結合すると予想される。またこれまでの合成化合物の阻害活性評価から、ニトロフラン環に接続したエステル結合も必須であることが判っている。このエステ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。そこで疎水性官能基の部分に様々な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。

- ・体内には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から、ニトロフランを骨格構造に持つ化合物は、毒性を持たないことが確認されているが、この部分を他の類似官能基で代行できるような化合物構造も引き続き探索する。

- ・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方策が可能かどうかを検討する。

III. 合成化合物の活性測定

逆転写酵素の RNaseH 活性の阻害能力を測定する系として、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 構造を構築する。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 Multimode Detector (Beckman)にてリアルタイムでモニターした。本年度は 152 種類の小分子化合物を評価した。薬剤の濃度は 50 μ M, 10 μ M, 2 μ M にて活性を評価し、先導化合物と活性を比較する。NAC よりも高い活性を有する化合物については、さらに 50, 10, 2, 0.4, 0.08 μ M にて活性を評価する。

IV. 化合物の毒性評価

阻害活性が数 μ M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する。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 μ M)、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 10⁵/ml, 100 μ l) を各ウェルに分注した。細胞毒性が50%を超えるものは、CC₅₀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 μ M)。293T 細胞(2 \times 10⁵/ml, 100 μ l) を各ウェルに分注し、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

前年度構築した逆転写酵素領域の遺伝子増幅方法を用いて遺伝子増幅を行った。1次増幅では逆転写酵素 Polymerase (p51) 領域と RNaseH (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利用した。シーケンシングには、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 (RNaseH) 上流からは DRRT30 を用いて、遺伝子配列を決定した。この方法を用いて、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。

C. 研究結果

I. 計算機設計

前年度は、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した。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り、細胞毒性試験 (MTT アッセイ)においても問題がないことを確認した。

そこで本年度は、このヒット化合物の類似化合物探索を行った。化合物ライブラリより、計算によって類縁体化合物を 28 種選び出した。選考した 28 化合物に対し、活性評価を行ったところ 1 つの化合物が高い *in vitro* 活性阻害を示すことを確認した。

II. 有機合成

前年度得られた化合物を改変して開発を進めることで、本年度は 100 種類を越える誘導体を合成展開した。

当研究班では、ニトロフランを基本骨格としたヒット化合物を得ている。前年度に見出した効率的な合成経路を利用して、多くの候補化合物を合成した。合成化合物群は、ニトロフラン環部分と反対側に、ヒドロキシ基あるいはニトロ基などが結合したベンゼン環を配置した。類似化合物の中で最も良い阻害

活性を示したものは、 IC_{50} 値が $0.8 \mu M$ となった。

先導化合物からの誘導体群の持つ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した。合成化合物群を活性測定した結果、顕著な阻害活性は測定されなかった。

ニトロフランを基本骨格に持つ化合物では、エステル結合より先には、ヒドロキシベンゼンのような比較的小さな官能基が有効であることが明らかとなった。今後、類縁体の活性を向上させるには、さらに官能基の導入が必要となる。そこでフラン環4位への官能基の導入を検討した。これによりニトロフランの親水性部分を疎水性部分で挟み込むことにより、細胞膜の透過性を向上させる効果もあると期待できる。

III. 合成化合物の活性測定

新規に化学合成したNACME誘導体を152種類の小分子化合物についてRNaseH阻害剤としての評価を行った。計152種類の化合物の中でRNaseH阻害能を有していたのは38種類

(25.0%)であった。昨年検討した化合物(33/70, 47.1%) よりも2倍以上多くの化合物を評価することができたが、その中に含まれている活性を持つ化合物の割合は本年度の方がやや低かった。薬剤の持つ酵素阻害活性を IC_{50} で、高($< 4.9 \mu M$)、中($5 \sim 19 \mu M$)、低($20 \sim 50 \mu M$)に分類すると、高が13/152 (8.6%)、中が14/152 (9.2%)、低が11/152 (7.2%)、活性が検出されなかったものが114/152 (75.0%)であった。再現性よく強く酵素活性を抑制した化合物の中には IC_{50} が $0.8 \mu M$ に達する化合物があり、これは昨年度の化合物よりも低かったことから、最適化が進展していることが確認できた。

IV. 化合物の毒性評価

MT-4 細胞に対する細胞毒性：測定した28化合物中、7化合物で CC_{50} が $50 \mu M$ 以下の細胞毒性が認められたが、その他の化合物は $100 \mu M$ 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：測定した28化合物中、12化合物で CC_{50} が $50 \mu M$ 以下の細胞毒性が認められたが、その他の化合物は $100 \mu M$ 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はMT-4細胞に対する細胞毒性とほぼ同程度であったが化合物によってはやや差が認められた。

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、一般的に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。

V. 耐性変異の分子疫学解析

治療群および未治療群の検体数は、それぞれ81件と95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結果、治療群あるいは未治療群においてRNaseH領域(N460、R461、R463、V467、L469、T470、L491、Q509、Q512、N519、Q524、K527、I556、K558)に変異が認められた。治療群におけるRNaseH領域の変異多型が、未治療群に比べ優位に高いことが昨年同様示された。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RNaseH領域内の変異パターンQ509Lが1例は認められた。今年度解析した検体についても、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。

治療患者(RAL投与歴なし)と未治療患者との

間で、RNaseH 領域の変異多型は、優位に NRTI 治療歴患者により多くの多型が認められたが、限局されたアミノ酸に多型がある傾向があると推察される。これらの変異多型が RNaseH 領域内のどこに分布しているのかを構造学的に解析するため、HIV-1 HXB2 の逆転写酵素の結晶構造(PDB#1HYS)に、本研究で見出された多型箇所をマップした結果、核酸(RNA/DNA ハイブリッド)が結合する領域には変異多型が全く認められず、むしろ対局的な領域に集約していることが明らかになった。さらに、治療群と未治療群の間で局在パターンに違いが認められなかった。

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

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

分担課題：先導阻害活性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

多剤耐性ウイルスはHIV感染症治療の障害要因として、大きな不安材料となっている。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。本研究の目的は、HIV逆転写酵素に内在するRNaseH活性を標的とする抗HIV薬の開発を進め、前臨床レベルの薬物を創出することである。本年度は、Ⅰ.計算機解析、Ⅱ.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。計算機解析(Ⅰ)では、これまでに見出された活性化合物の代表的なものについて、標的タンパク質である逆転写酵素のRNaseH部位との結合構造予測を行った。RNaseH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ため、RNaseH領域に2つの金属イオンを配置し、さらにこの金属イオンに配位するように阻害剤を配置した。分子軌道法と分子動力学法を組合せた計算技法により、予測した結合構造が実現可能な原子配置であるかを確かめた。化合物合成(Ⅱ)では、先導化合物を足掛かりに、100種類を越える誘導体を合成展開した。前年度の合成物と合わせて、合計190種類の合成物を得ることができた。これは先導化合物の高収率で短工程な合成ルートを確立したことにより実現された。当研究班では、ニトロフランカルボン酸を基本骨格として、これに様々な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ている。その結果、IC₅₀値が1μM以下の類縁体化合物を見出した。結晶構造解析(Ⅲ)では、合成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十分な分解能で得られたが、阻害剤部分については、電子密度が観測されなかった。RNaseH領域と阻害剤の共結晶化を図るために、より活性高い化合物に水溶性の部分が付加するなどして、再度、結晶化を試みている。以上の研究により、先導化合物に比べて確実に高い阻害活性を持つ化合物を得ることができている。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必要がある。

A. 研究目的

HIV感染治療において多剤併用療法が定着し、感染予後は大きく改善された。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。但し、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として顕在化してきている。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。RNaseH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。作用点が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。

本研究では、HIV逆転写酵素に内在するRNaseH活性を標的とする抗HIV薬の開発を進め、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。次年度は上記の研究結果を踏まえて、より阻害活性の高い化合物へと化合物を改変してきた。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し、実用的な阻害剤化合物の提案をする。本年度は研究の第二年度に当たるので、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RNaseH

部位での結合構造を確かめる。

(I. 計算機薬物設計)

RNaseH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。研究初年度には、この先導化合物を変換して、阻害活性を約20倍増強することに成功した。今年度は、増強された化合物と標的タンパク質の結合構造の解析を行った。

標的となるRNaseH部位の触媒中心には、2つのMg²⁺イオンが配位結合している。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。RNaseH阻害活性を持つ合成化合物の分子構造をGaussViewソフトウェアを用いて作成した。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る技法により、標的タンパク質と化合物の複合体構造を求めた。計算には、Gaussian03ソフトウェアを用いて、構造最適化を行った。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。

量子化学計算は、分子中の電子の分布を求めるために、多大な計算時間を必要とする。従って、薬物設計において多数の化合物を検討するためには、比較的短時間で計算結果の得られる分子力場法に立脚した計算技法を用いる必要がある。この目的で、阻害剤候補化合物について、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、考案化合物とRNaseH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。

(II. 化合物合成)

前年度は、当研究班で有していた先導化合物の高収率で短工程な合成ルートの確立を行うことを目的に合成研究を進め、効率的な合成方法を得ることができた。本年度は、この合成方法を利用して、多くの類似化合物を合成した。合成展開は、以下の点に着目しながら実施した。

・標的のRNaseH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する。合成展開している化合物は、ニトロフランを基本骨格に持つ。この部分は、Mg金属に配位結合すると予想される。またこれまでの合成化合物の阻害活性評価から、エステル結合も必須であり、この部位が荷電アミノ酸あるいは配位金属と強い相互作用をして結合構造の安定化に寄与している。エステ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。疎水性官能基の部分に様々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からは、ニトロフランを骨格構造に持つ化合物は、毒性を持たないことが確認されている。従って、ニトロフラン類縁体を合成展開の基本とする。但し、この部分を他の類似官能基で代替できるような化合物構造も引き続き探索し、合成と活性評価を並行して実施する。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方策が可能かどうかを検討する。

(III. 結晶構造解析)

HIV-1の逆転写酵素は、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に、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教授らは、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を報告した (Nucleic Acids Res. 2008, 36, 5083-5092)。本研究では、Arnold教授から、高分解能の結晶の得られる発現ベクターRT69Aを分与頂き、このベクターから発現させた逆転写酵素を用いて構造解析を実施した。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、1mMのIPTGを投入した。その後、3時間37°C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、発現タンパク質を分画した。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。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°C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)

逆転写酵素のRNaseH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。2009年になってRNaseH活性阻害剤とRNaseH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RNaseH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。いずれの結晶構造でも、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明らかになった。

当研究班で合成展開しているヒット化合物は、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官能基部分はある程度溶媒に露出していると推測できる。RNaseH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。さらに合成化合物のフラン平面と2つの金属イオンが、同一平面内になる結合様式をとっていると推察した。

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有効な計算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、RNaseH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。RNaseHの構造として、PDBcode: 3HYFを用いた。化合物を、(a) 阻害活性化合物 BK-163、(b) 阻害活性化合物 BK-214、(c) 阻害活性化合物 BK-165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-163, BK-214, BK-165は、ニトロフランカルボニル骨格を持ち、阻害活性値はIC₅₀でそれぞれ、5.8、5.5、0.9 μMと測定されている。

3種類の阻害剤とRNaseH部位との結合最安定構造を図1に示す。いずれの最適化構造でも、2つのMg²⁺イオンを含みMg-O-N-C-O-C-O-Mgの9員環構造をとる形となった。MgとOの距離は2.0 Å~2.3 Åとなった。他の研究グループが開発しているRNaseH阻害剤のpyrimidinolでは、2つのMgイオンの間に化合物からのO原子が位置する形となり、5と6員環の隣接した結合様式をとる。さらに別の研究グループが開発しているβ-thujaplicinolという阻害剤では、同様にMgイオンの間に化合物からのO原子が位置して、2つの5員環が隣接する様式でRNaseH部位の金属イオンに配位する。これに対し、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、2つの金属イオンに配位していることが判った。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RNaseH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。計算の結果から、(a)BK-163、(b)BK-214、(c)BK-165のいずれも安定にニトロフラン部位が金属に配位すること、エステル基に続く疎水性官能基部分は、一部溶媒に露出していることが確認できた。活性中心の4つの酸性アミノ酸残基以外に、Ser499が化合物との結合に深く関与していることが確認された。

(II. 化合物合成)

前年度得られた化合物を改変して開発を進めることで、本年度は100種類を越える誘導体を合成展開した。

II-1. ニトロフラン誘導体の合成

当研究班では、ニトロフランを基本骨格としたヒット化合物を得ている。前年度には、この化合物の高収率で短工程合成ルートとして、DMAP (Dimethyl amino pyridine) 存在下で、5-nitro-furan-2-carboxylic acidと意図した置換基を持つ chloro acetyl amid 類縁体とを求核置換反応させることで、多種の誘導体を効率的に得られる合成経路を見出している。この反応を利用して、本年度も多くの候補化合物を合成した。合成された化合物の一部を図2に示す。

合成化合物群は、ニトロフラン環部分と反対側に、ヒドロキシ基あるいはニトロ基などが結合した疎水性の官能基であるベンゼン環が配置されている。計算機解析の結果より、疎水性官能基は一部が溶媒に露出している。従って、あまり大きな疎水性官能基は、結合に不利になる。ベンゼン環は、標的タンパク質との結合を強化する役目を持っている。エステル結合部位にベンゼン環が直接結合した構造は、合成化合物群の中でも高い活性を示すことが判明した。類似化合物の中で最も良い阻害活性を示したものは、BK-491で、 IC_{50} 値が $0.8\mu M$ となった。

現在、さらに疎水性置換基の修飾を進めている。

II-2. ニトロフラン部位改変の試み

標的のRNaseH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。前節で合成展開した化合物群の持つ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した(図3)。本研究では、フラン環をピリジン環に変換した化合物(BK-432, BK-434, BK-467, BK-468)、ピロール環に変換した化合物(BK-422, BK-421)、およびピリジン環のN原子にO原子が結合した化合物(BK-454, BK-447, BK-446)を合成した。これらの合成化合物を活性測定した結果、顕著な阻害活性は測定されなかった。従って、ニトロフラン誘導体が現在最も有望と判断している。但し、動物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は継続している。

II-3. フラン環4位への官能基の導入

ニトロフランを基本骨格に持つ化合物では、エステル結合より先には、ヒドロキシベンゼンのような比較的小さな官能基が有効であることがII-1節で明らかとなった。今後、類縁体の活性を向上させるには、さらに官能基の導入が必要となる。そこでフラン環4位への官能基の導入を検討した(図4)。これによりRNaseHの結合ポケットでの相互作用部位が増えて、阻害活性が向上することが期待できる。さらにニトロフランの親水性部分を疎水性部分で挟み込むことにより、細胞膜の透過性を向上させる効果があると期待できる。

ニトロフラン環の4位にBrを導入した化合物(BK-472)は阻害活性が保たれた。一方、4位にベンゼン環、イソペンチル、ニトロペンチルを導入した化合物(BK-483, BK-488, BK-489, BK490)では、いずれも阻害活性が得られなかった。従って、ニトロフラン環の4位には、小さな置換基しか許されないことが明らかになった。

(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5(a))。結晶は、pH6.3で12%のポリエチレングリコール(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。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り、2つの金属イオンに由来する高い電子密度がRNaseHの活性部位に観測された。ところが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RNaseH部位に結合していない結果となった。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と矛盾のない結果となっている。幾つかの合成阻害剤と逆転写酵素との共結晶を作成し、X線構造解析を行ったが、全て阻害剤からの電子密度は観測されなかった。これはまだ阻害剤の結合親和性が低いために、安定に活性部位に化合物が結合しないためと推測される。共結晶化の際の化合物の濃度を上げると、化合物分子の析出が起り、結晶が得られにくくなった。そこで親水性の高い化合物を合成し、共結晶化を行い、X線構造解析を行った(図5(b))。この際もタンパク質は得られたが、阻害剤との共結晶にはなっていない結果となった。今後、より阻害活性の高く、標的部位への結合親和性

の高い化合物を合成し、RNaseH領域と阻害剤の共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

- Yanagita H., Urano E., Matsumoto K., Ichikawa R., Takaesu Y., Ogata M., Murakami T., Wu H., Chiba J., Komano J., Hoshino T.
“Structural and Biochemical Study on the Inhibitory Activity of Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H Function of HIV-1 Reverse Transcriptas”
Bioorg. Med. Chem. **19**, 816-825 (2011)

2. 学会発表

- 星野忠次, 柳田浩志, 松元輝礁, 尾瀉将一, 浦野恵美子, 村上 努, 駒野 淳
「抗HIV薬RNaseH活性阻害剤の開発」
ナノ学会第8回大会, 講演予稿集S8I-1, 岡崎 (2010.5.14)
- 星野忠次, 柳田浩志, 松元輝礁, 尾瀉将一, 高江州善寿, 浦野恵美子, 市川玲子, 村上 努, 駒野 淳
「新規HIV-1逆転写酵素RNase H活性阻害剤の開発」
日本ウイルス学会学術集会, 03-2-07, 徳島 (2010.11.9)
- 柳田浩志, 松元輝礁, 尾瀉将一, 高江州善寿, 浦野恵美子, 市川玲子, 村上 努, 駒野 淳, 星野忠次
「新規HIV-1逆転写酵素RNase H活性阻害剤開発における構造活性相関」
日本エイズ学会学術集会, 2P-57, 東京 (2010.11.25)

・柳田浩志，松元輝礁，尾瀉将一，高江州善寿，
浦野恵美子，市川玲子，村上努，駒野淳，
星野忠次

「新規HIV-1逆転写酵素RNase H活性阻害剤開
発における構造活性相関」

日本薬学第131年会，29P-0113、静岡
(2011.3.29)

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

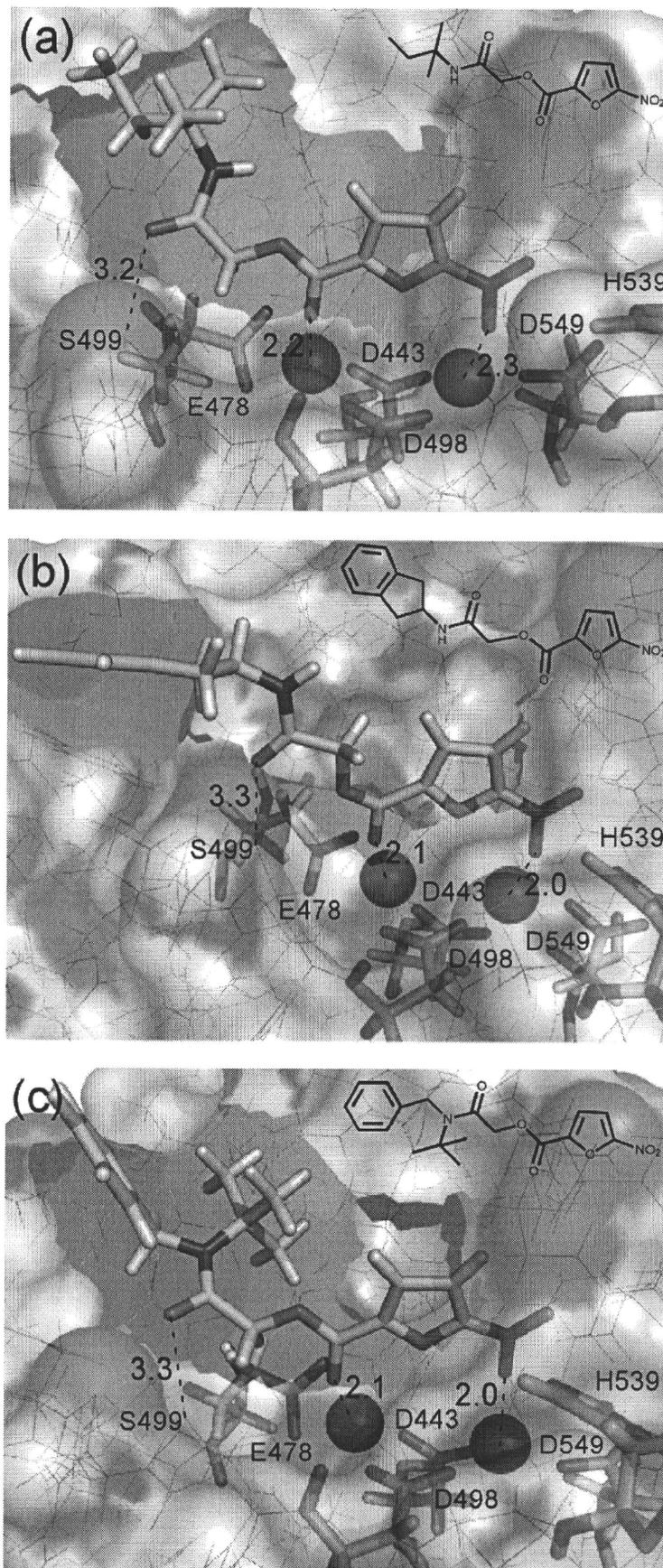


図 1 : 阻害剤とRNase H活性部位との結合安定構造

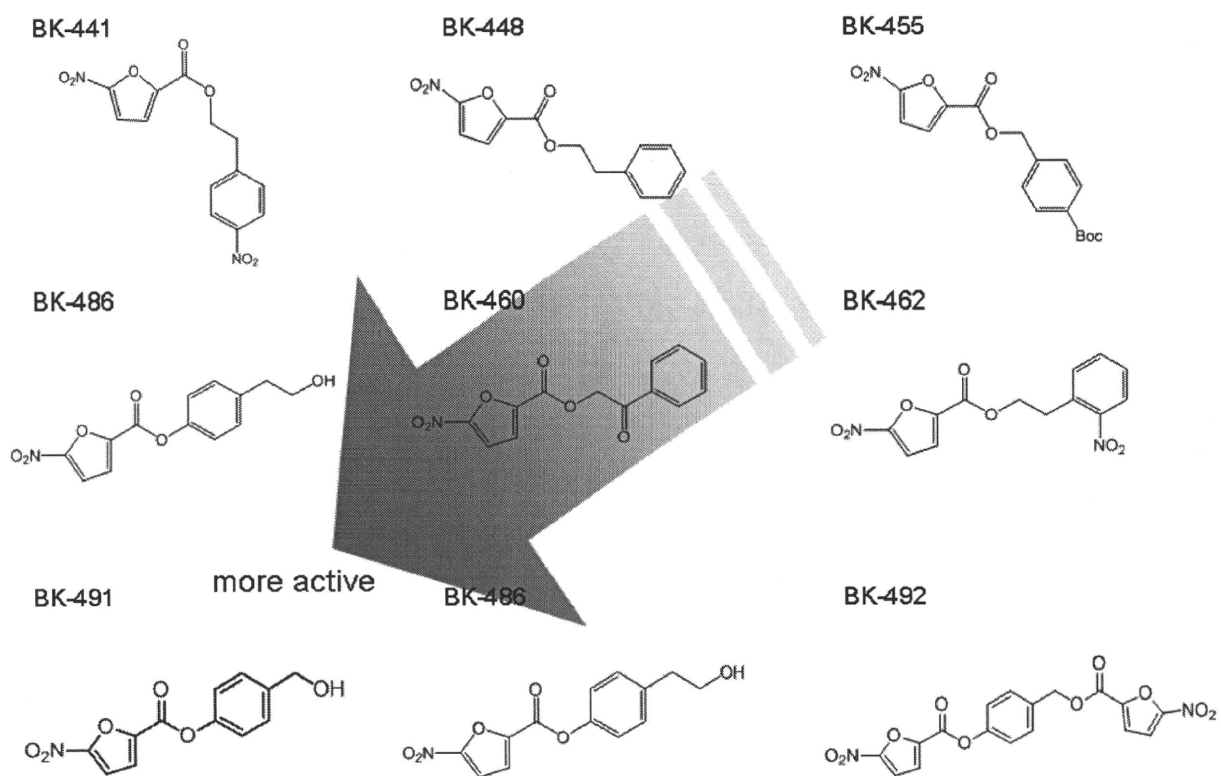


図2：ニトロフラン環を有する合成化合物群

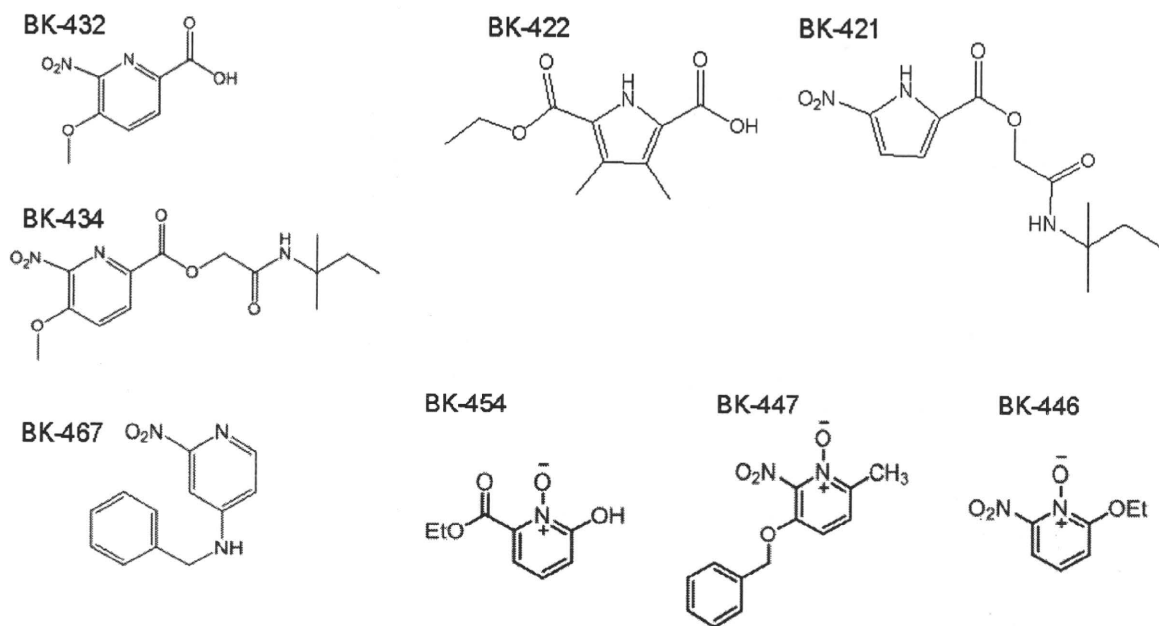


図3：ニトロフラン環部位を変換させた合成化合物群

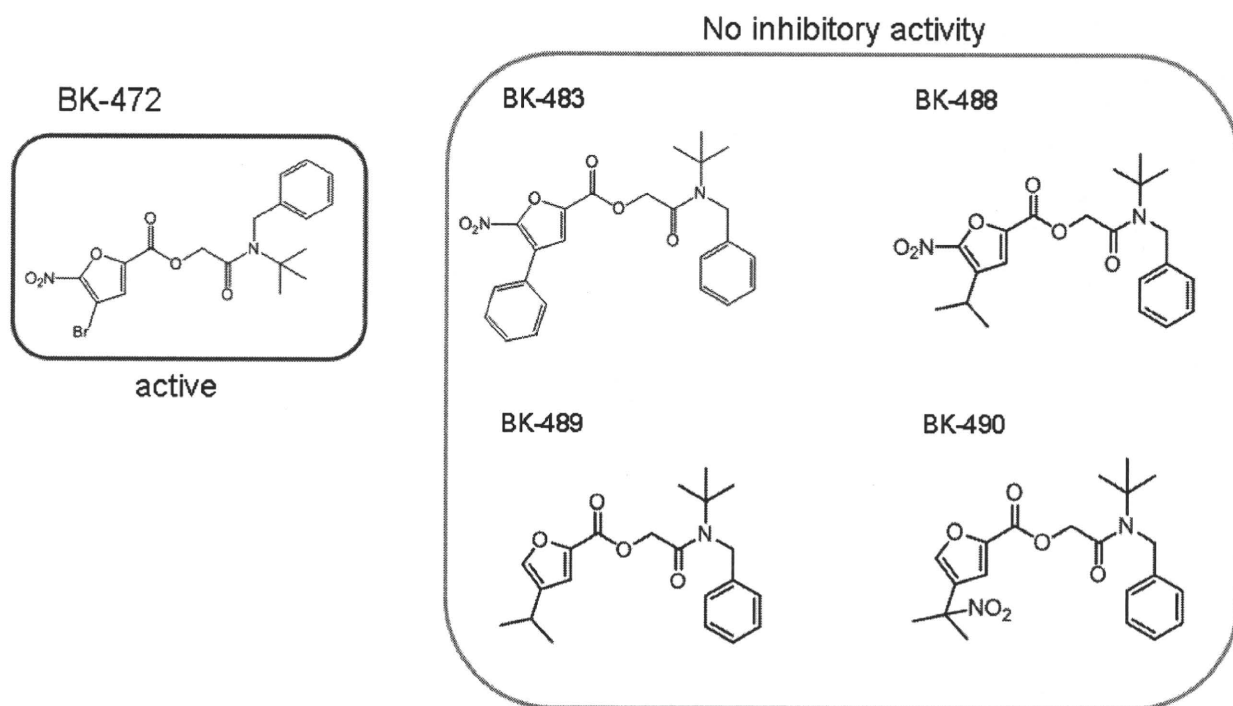


図4：ニトロフラン環4位に置換基を導入した合成化合物群

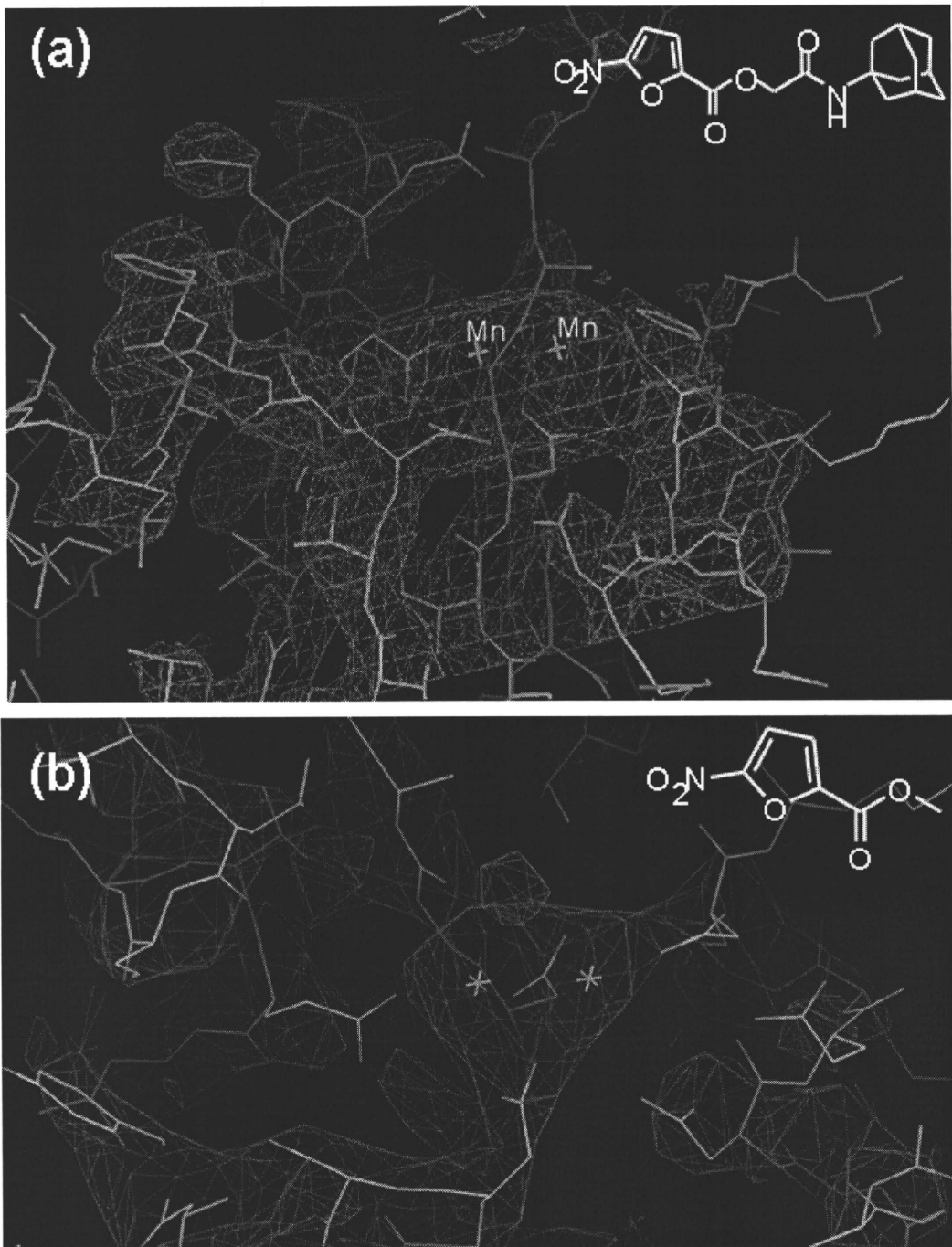


図5 : X線結晶解析から得られた電子密度 (網掛け)

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、HIV-1 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容易に獲得する。多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新規治療薬の開発が期待されている。治療標的としてウイルスの逆転写酵素に内在する RNaseH 活性は有力な候補である。我々はこれまで独自の研究により世界で初めて RNaseH 阻害剤の基本分子骨格 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME) を発見した。NACME 誘導体は抗ウイルス活性を持つ数少ないレトロウイルスに選択性の高い RNaseH 阻害剤である。本研究は NACME 誘導体を改良してより強力な RNaseH 阻害剤の同定を試みる。本年度は 152 種類の小分子化合物の RNaseH 阻害活性を評価し、新たに 38 種類の NACME 誘導体を RNaseH 阻害剤として同定することに成功した。昨年度よりも高い RNaseH 阻害効果を有する化合物が同定された。これらの構造・機能の相関解析を基盤として、高い活性を示した化合物をコアにしてさらに強力な RNaseH 阻害剤の開発が期待される。

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ため、現在の治療が効果を失ってしまう危険性があるためである。薬剤耐性 HIV-1 を生じさせないために有効な手段の一つは、90%以上のアドヒアランスを確保する事であるが、薬剤の持つ副作用などの影響で、これを達成するのは非常に困難

である。日本では薬剤の入手が容易であることから、比較的アドヒアランスが高く耐性ウイルスの発生頻度は諸外国に比べると低いことが知られている。しかし、耐性ウイルスが海外から持ち込まれることを阻止するのは困難である。今後も既薬の使用が制限される危険性は皆無とは言えない。したがって、薬剤耐性ウイルスの対処法として新規作用機序を持つ抗レトロウイルス薬の開発は依然重要な研究課題と思われる。有効な HIV 流行阻止が達成できないと、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。エ