

イズ予防ワクチンの早急な実現が困難であることを鑑みると、迅速に実現可能で有効な対応策の一つとして、新規抗 HIV 薬の開発は強力に推進する必要がある。大手製薬メーカーの主力製品におけるパテント切れ問題や一定の抗 HIV-1 効果を持つインテグラーゼ阻害剤の実用化により、製薬メーカーは抗レトロウイルス薬開発からますます遠ざかる傾向にある。このため新たな抗レトロウイルス薬開発の基盤となる学術研究を十分支援する必要がある。この点で本研究は実際的な取り組みであり非常に価値が高い。

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を増強する、(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。したがって RNase H 阻害剤は重要な抗ウイルス剤開発の標的といえる。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 carbamoylmethyl ester (NACME) 誘導体を報告した (Fuji et al., J Med Chem 2009; Yanagita et al., Bioorg Med Chem 2011)。本研究は RNase H 活性阻害剤 NACME 誘導体における薬剤活性を評価することにより最適化を推し進めることを目標に掲げる。本年度は昨年を引き続き新たな NACME 誘導体を合成展開し、HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNaseH 活性の阻害能力を測定すると同時に、各化合物の構造と活性の関連について検討を行った。

B. 研究方法

逆転写酵素の RNaseH 活性の阻害能力を測定する系として、Perniack 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 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 50uM, 10uM, 2uM 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。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, 0.08uM にて活性を評価した。本実験系の詳細は Fuji et al., J Med Chem 2009、及び Yanagita et al., Bioorg Med Chem 2011 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 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 (表 1)。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 IC₅₀ で、高 (<4.9 uM)、中 (5~19 uM)、低 (20~50 uM) 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 (表 2)。再現性よく強く酵素活性を抑制した化合物の中には IC₅₀ が 0.8uM 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示唆される。昨年度高い酵素阻害活性を示した化合物の数は5/70 (7.1%)であった (表2)。これと比べると今年度阻害効果の高い化合物が高い割合で合成されていることがわかる。

D. 考察

NACME 誘導体が RNaseH 阻害剤の基本骨格として機能することは我々が 2009 年に発表した論文 (Fuji et al, J Med Chem 2009) で初めて検証された。今回デザインされた NACME 誘導体におけるヒット率 24.8%は、2009 年の報告書で検討された NACME 誘導体のヒット率 25.0%と同程度である。ランダムスクリーニングで得られる RNaseH 阻害剤のヒット率は 0.1~1.9%であり (Parniak et al, Aual Biochem 2003; Fuji et al, J Med Chem 2009)、今回試験し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有意に高いヒット率であった。これは NACME を骨格にした創薬デザインが有効であることを改めて示している。平成 21 年度と比較して NACME 誘導体の RNaseH 阻害のヒット率が斬減したことには大きな意味はないと思われる。ヒットした化合物の数自体は増えているうえ、活性のない化合物の構造は戦略的な NACME 誘導体合成の大きな助けとなるためである。今後も基本骨格を維持しながら側鎖の改変を行い、低い IC50 を示した化合物を中心にした周辺化合物を合成して、より強力な阻害剤が同定できると期待される。

RNaseH 阻害剤の開発を行っている研究グループは世界的に数が少なく、我々の研究は高く評価されている。化合物の構造と機能を比較する事によって、NACME 構造の nitrofuran とそれに近接するケトン構造は RNaseH 活性阻害に必須である事が改めて確認された。これらを異なる化学構造に置換しても活性を維持できれば、類似体の合成展

開を容易にする事ができるためにさらに多くの化合物を評価する事ができると思われる。特に Nitrofuran 側への側鎖修飾が今後の合成展開の一つの課題と思われる。

E. 結論

HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNaseH 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、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。これらをもとにすれば、RNaseH 活性阻害剤をより改良すること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) Aoki T, Miyauchi K, Urano E, Ichikawa R, Komano J. Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. Gene Ther. In press.
- 2) 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 transcriptase. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2011; 19, 816-25.
- 3) Suzuki S, Maddali K, Hashimoto C, Urano E, Ohashi N, Tanaka T, Ozaki T, Arai H, Tsutsumi H, Narumi T, Nomura W, Yamamoto Y, Pommier Y, Komano JA, Tamamura T. Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: structure-activity relationship studies. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2010 Sep 15;18(18):6771-5.
- 4) Aoki T, Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tamamura H, Terashima K, Murakami T, Yamamoto

- N, Komano J. Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55^{Gag}. *Gene Therapy*. 2010 Sep; 17(9):1124-33.
- 5) Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem*. 2010 Jul 22;53(14):5356-60.
- 6) Hamatake M, Komano J, Urano E, Maeda F, Nagatsuka Y, Takekoshi M. Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J Immunol*. 2010 May;40(5):1504-1509.
- 7) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi T, Komano J. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*. 2010 May 26;28 Suppl 2:B68-74.
- 8) 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*. 2010 Apr;101(4):876-81.
- 9) 馬場昌範, 中田浩智, 朝光かおり, 駒野 淳, 岡本実佳, 杉浦 亙. Perspectives of anti-HIV research (Review). *The Journal of AIDS Research*. 12(2);74-80, 2010
- 学会発表
(国際学会)
- 1) Jun Komano, Emiko Urano, Hiroshi Yanagita, Yuko Morikawa, Tyuji Hoshino. Novel HIV-1 inhibitors targeting the last viral enzymatic activity and the structural protein. The 24th Joint meeting of the AIDS panels, HIV Resistance Impact in Asia. Singapore, Dec 8-10, 2010
- 2) Jun Komano. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latency. National Taiwan University, College of Medicine, Room 202, Taiwan, Oct 6, 2010
- 3) Jun Komano, Toru Aoki, Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Kosuke Miyauchi. Production of GFP-incorporated infectious pseudovirion by the N-terminal modification of HIV-1 Gag. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA May 24-29, 2010.
- 4) Emiko Urano, Noriko Kuramochi, Hiroshi Tomoda, Yutaka Takebe, Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Yuko Morikawa. A novel post-entry inhibitor of HIV-1 replication targeting the capsid domain of Gag. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA May 24-29, 2010
- 5) Emiko Urano, Noriko Kuramochi, Kosuke Miyauchi, Reiko Ichikawa, Hiroshi Tomoda, Yutaka Takebe, Jun Komano, Yuko Morikawa. A novel postentry inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Screened by Yeast Membrane-associated Two-hybrid System. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2010, Awaji Island, Hyogo, Japan, Sept 7-10, 2010
- 6) Jun Komano. Study on neutralizing antibodies against two highly variable viruses. The US-Japan Cooperative Medical Science Program 23rd Joint Meeting of AIDS Panel. Awaji Island, Hyogo, Japan, Sept 10, 2010
(国内学会)
- 1) Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Jun Komano. The analysis of novel cyclin T1 splice variant lacking exon 7. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12月7-10日, 2010

- 2) Kosuke Miyauchi, Toru Aoki, Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Jun Komano. Protein transduction by pseudo-lentiviral nano particles. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12月7-10日,2010
- 3) 山吉 麻子, 林 里衣, 福本 裕之, 小柳 義夫, 駒野 淳, 小堀 哲生, 村上 章. Non-coding RNA (7SK) の機能解析と機能性人工核酸としての応用. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12月7-10日,2010
- 4) 尾崎 太郎, 田中 智博, 橋本 知恵, 宮内 浩典, 鳴海 哲生, 山本 直樹, 駒野 淳, 玉村 啓和. gp120のCD4結合サイトを模倣した新規抗原分子の創製. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
- 5) 柳田 浩志, 松元 輝礁, 尾瀨 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. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
- 6) 滝澤万里, 草川 茂, 北村勝彦, 長縄 聡, 本田 三男, 村上利夫, 山本直樹, 駒野 淳. 非エピトープ変異による中和抗体感受性制御を指標にしたHIV Env定常状態の構造解析. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
- 7) 宮内 浩典, 浦野 恵美子, 駒野 淳. HIV複製を増強するEBV感染B細胞由来のサイトカイン. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
- 8) 橋本 知恵, 田中 智博, 浦野 恵美子, 尾崎 太郎, 新井 啓之, 鳴海 哲夫, 野村 渉, Kasthuraiah Maddli, Yves Pommier, 山本 直樹, 駒野 淳, 玉村 啓和. HIV-1遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
- 9) 宮内 浩典, 浦野 恵美子, 駒野 淳. ハイスループットディスプレイアッセイの構築. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日,2010
- 10) 今留 謙一, 矢島 美沙子, 川野 布由子, 市川 紗弓, 清水 則夫, 中村 浩幸, 松田 剛, 駒野 淳, 山本 直樹, 藤原製悦. EBウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日,2010
- 11) 星野 忠次, 柳田 浩志, 松元 輝礁, 尾瀨 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. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日,2010
- 12) 浦野 恵美子, 倉持 紀子, 市川 玲子, 宮内 浩典, 供田 浩, 武部 豊, 駒野 淳, 森川 裕子. HIV-1Gagを標的とする低分子化合物BMMPによるウイルスエントリー阻害機構. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日,2010
- 13) 星野忠次, 柳田浩志, 松元輝礁, 尾瀨将一, 浦野恵美子, 村上 努, 駒野 淳. 抗HIV薬RNaseH 活性阻害剤の開発. 第8回ナノ学会大会, 岡崎市, 5月14日,2010

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

Tetsuo Narumi, Wataru Nomura, Chie Hashimoto, Aki Ohya, Jun Komano, et al. HIV外被蛋白質gp41のC34領域ペプチドの三量体の創製と阻害剤およびワクチンとしての開発(出願2010年11月4日).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

表1. RNaseH 阻害剤スクリーニングにおける阻害剤ヒット率

Parniak et al, Anal Biochem 2003	0.10%
Fuji et al, J Med Chem 2009	1.90%
Fuji et al, J Med Chem 2009 NACME 誘導体	25.00%
H21 年度合成 NACME 誘導体	47.10%
H22 年度合成 NACME 誘導体	25.00%

表2. 本研究で得られた NACME 誘導体の力価

H21 年度合成 NACME 誘導体	数	%
総計	70	
阻害効果高 (IC50 < 4.9 μ M)	5	7.1%
阻害効果中 (IC50 5-19.9 μ M)	25	35.7%
阻害効果高 (IC50 20-50 μ M)	3	4.3%
H22 年度合成 NACME 誘導体	数	%
総計	152	
阻害効果高 (IC50 < 4.9 μ M)	13	8.6%
阻害効果中 (IC50 5-19.9 μ M)	14	9.2%
阻害効果高 (IC50 20-50 μ M)	11	7.2%

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

RNaseH は非常に魅力的な新規薬剤ターゲットである。つまり、HIV の Pol 領域にコードされるウイルス複製に必須な酵素であり、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。ただし、RNaseH 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あるいは干渉作用を十分考慮しなければならない。開発される RNaseH 阻害剤に対する薬剤ウイルスが出現した場合、RNaseH 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基盤情報（HIV 遺伝子情報など）を蓄積し、NRTI 治療・未治療間で、RNaseH 領域と Polymerase 領域の変異の相関性を解析することは必要不可欠である。昨今臨床現場に導入されたインテグラーゼ阻害剤 Raltegravir (RAL)の作用機序は、酵素活性中心に配位した Mg^{2+} をその特有な Diketo 構造によって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。そこで、RNaseH 阻害剤開発を進める上でRAL によって誘発される可能性がある二次的な RNaseH 領域内の変異が、RNaseH 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疫学的に検証する必要がある。これらの背景を踏まえ、分担研究として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 RNaseH 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 RNaseH 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。

A. 研究目的

HIV感染症における多剤併用療法は飛躍的に改善したものの、未だ根治には至っておらず、終生服薬の継続が求められている。このため治療の長期化が進み、今後、薬剤耐性ウイルスの

出現や治療薬による副作用の問題など克服しなければならない課題に対処しなければならない。そのためには、少なくとも基礎研究レベルにおいて既存の薬に満足することなく、断続的な治療薬開発は必要不可欠である。さらに、作

用点が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ャンスを低下させることが期待できる。また、現在使用されている逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤既存薬は改良が重ねられているため、同じ作用点を標的にした新規薬剤の実用化には、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。そのため、現状では同じ作用点をもつ新薬開発のハードルが高い。以上の背景から、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。その中でも、RNaseHは非常に魅力的な新規薬剤ターゲットである。つまり、HIVのPol領域にコードされるウイルス複製に必須な酵素であり、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。ただし、RNaseH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あるいは干渉作用を十分考慮しなければならない。逆転写酵素(Polymerase領域とRNaseH領域からなる)の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、RNaseH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。例えば、RNaseH Q509L変異が、NRTIに対するTAMs薬剤耐性の度合いを増強することが知られている。さらに、NRTIの治療によってPolymerase領域ではなく、RNaseH領域に変異が誘導されるケースも報告されている。以上のことから、単にRNaseHの遺伝

子多型を考慮し、多くの遺伝タイプに対するRNaseH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RNaseH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ない。さらに、将来を想定し、開発されるRNaseH阻害剤に対する薬剤ウイルスが出現した場合、RNaseH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基盤情報(HIV遺伝子情報など)を蓄積し、NRTI治療・未治療間で、RNaseH領域とPolymerase領域の変異の相関性を解析することは必要不可欠である。

さらに、昨今臨床現場に導入されたインテグラーゼ阻害剤Raltegravir (RAL)の作用機序は、酵素活性中心に配位した Mg^{2+} をその特有なDiketo構造によって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、RNaseH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RNaseH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)。 Mg^{2+} を並列して配位する構造学的類似性から、RAL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、RNaseH領域に二次的な変異が誘導される可能性が予測される。そこで、RNaseH阻害剤開発を進める上でRALによって誘発される可能性がある二次的なRNaseH領域内の変異が、RNaseH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疫学的に検証する必要がある。

これらの背景を踏まえ、分担研究として2つの研究テーマに取り組んでいる。

2) 未治療患者に感染している HIV-1 の RNaseH 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 RNaseH 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、RNaseH 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、2年目は初年度に確立した遺伝子解析方法を利用して、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)RNaseH 遺伝子配列を解析し、RNaseH 領域に認められる遺伝的多型を解析し、初年度に続き症例数を増した。

B. 研究方法

昨年度構築した逆転写酵素領域の遺伝子増幅方法(図2)を用いて遺伝子増幅を行った。簡単に、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

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(図2)。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(図2)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)(3)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ように考えられる。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構造学的に考察してみた。HIV-1 HXB2 の逆転写酵素の結晶構造(PDB#1HYS)(4)を基に、本研究で見出された多型箇所をマップした結果を図3に示す。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に局在パターンに違いが認められなかった。また、変異多型の局在箇所また、逆転写酵素 TAM 耐性に影響を与えると報告されている K527Q (赤)と R461K (青)は polymerase 領域に近接していることが分かった。治療群に優位に検出された RNaseH 領域内の R461K 変異が、Polymerase 活性あるいは NRTI に対する耐性に対して影響を与えるのか明らかになっておらず、今後詳細な解析をする必要がある。以上のことから、治療 (RAL なし)群に優位に認められる変異多型箇所は RNaseH 酵素活性中心や核酸結合面とは正反対領域にあるため、RNase H 酵素活性中心や核酸結合面に結合する低分子化合物を探索する方が抗 HIV 薬として効率的であることが考えられる。次年度は、検体数を増やし解析を続けるとともに、RAL 投与歴が RNaseH の遺伝子多型に影響するかどうか追究したいと考えている。

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. 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.
3. Ding J, *et al.* (1998) Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* 284:1095-1111.
4. Sarafianos SG, *et al.* (2001) Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J* 20:1449-1461.

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shibata J, Sugiura W, Ode H, Oiwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H.
“Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case”
Antiviral Res. (2011) *in press.*
- 2) Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W.
“Outbreak of Infections by Hepatitis B Virus Genotype A and Transmission of Genetic Drug Resistance in Patients Coinfected with HIV-1 in Japan”
J Clin Microbiol. (2011) 49:1017-1024
- 3) Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W.
“HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2”
J Acquir Immune Defic Syndr. (2010) 54:241-247
- 4) 松下修三、横山勝、宮内浩典、松田善衛、俣野哲朗、岩谷靖雅

“HIV 細胞進入とその防御機序”
日本エイズ学会誌12:67-73, 2010

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

図1 使用したプライマーセット

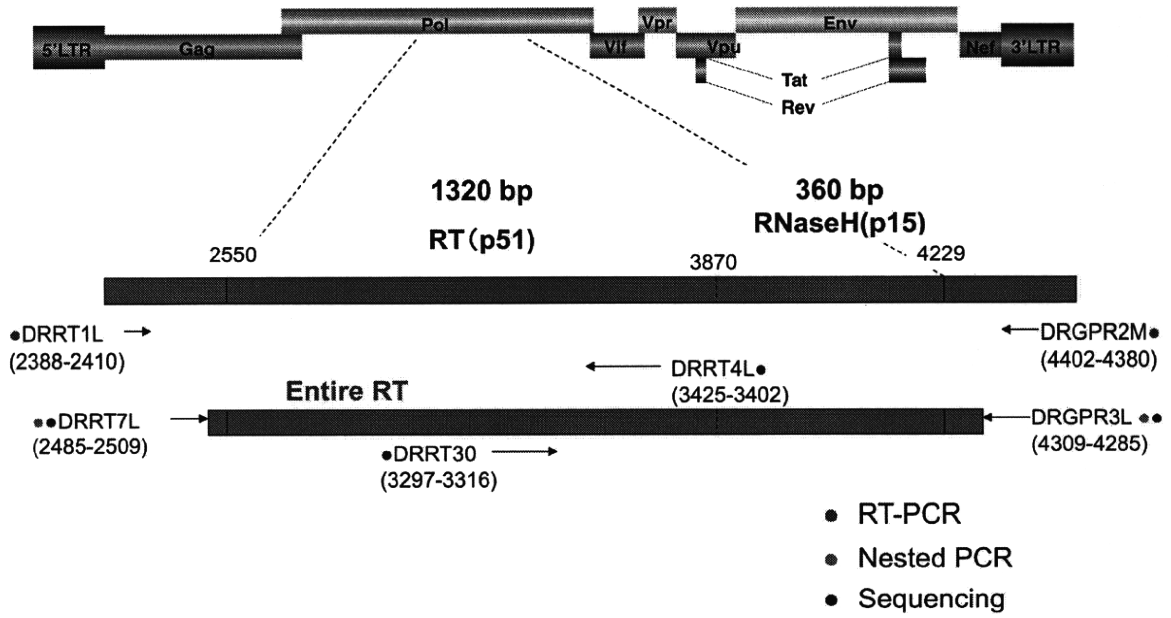


図2 治療／未治療で見られる遺伝型多型

p51領域変異	RNaseH領域変異	全症例数	治療症例数	未治療症例数
K366R	N460D	7	6	1
P272A	N460D	2	2	0
K103N	N460D	13	9	4
M184V	N460D	21	18	3
M41L	R461K	7	7	0
M184V	R461K	8	6	2
K20R	R461K	14	12	2
G359S	R461K	6	6	0
Q207E	R461K	10	8	2
E399D	R461K	3	3	0
M357T	R461K	18	11	6
I293V	R461K	9	5	4
L210W	R461K	2	2	0
P272A	R461K	16	12	4
E297V	R463K	8	5	3
K385R	R463K	5	3	2
V317A	V467[L,V]	6	6	0
T215Y	L469I	8	8	0
E297K	L469I	5	5	0
D177E	T470A	7	5	2

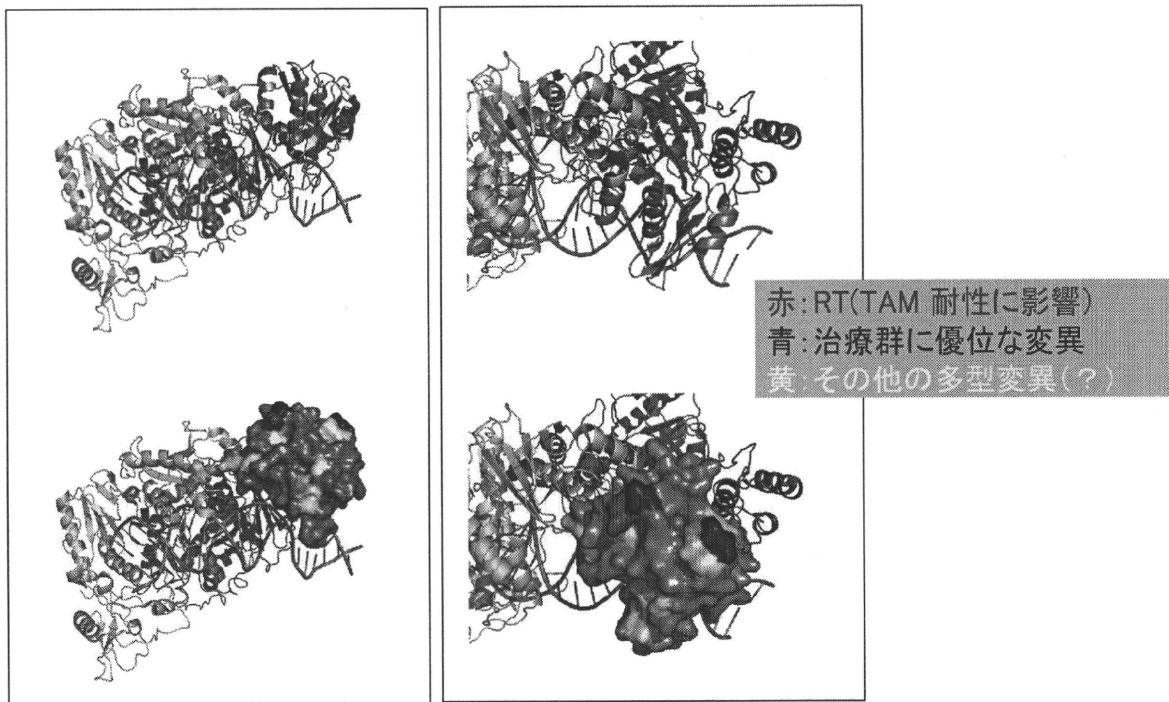
※黄色は薬剤耐性変異

p51領域変異	RNaseH領域変異	全症例数	治療症例数	未治療症例数
T67N	L491S	1	1	0
M41L	L491S	8	8	0
L210W	L491S	6	6	0
T215Y	L491S	8	8	0
P272A	L491S	17	15	2
F214L	L491S	1	1	0
V118I	L491S	7	7	0
T215Y	Q509L	1	1	0
L283I	Q512K	5	5	0
I135T	N519S	26	17	9
I202V	N519S	7	6	1
P272A	Q524E	8	6	2
P272A	K527Q	9	7	2
D123E	K527Q	6	6	0
P272A	K527Q	1	1	0
T286A	K527Q	7	7	0
P272A	K550G	2	2	0
D177E	I556V	8	7	1
D67N	K558R	7	7	0

サブタイプBのみ
RAL投与無し

治療 n=81
未治療 n=95

図3 RNaseH 変異は核酸結合領域とは異なる外側に集積している



HIV-1 RT HXB2 (Modified from Structure Data PDB 1HYS)

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。今年度も主任研究者（星野）が合成し、分担研究者駒野が RNase H 阻害活性を測定した 28 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、どちらの細胞においても、CC₅₀ が 10 μM 程度に比較的細胞毒性の強い化合物から CC₅₀ が 100 μM 以上の細胞毒性の弱い化合物まで様々であった。

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 μl 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 μl 分注し、エッジ効果を防止した)。
2. トップのウェルに 200 μM 化合物溶液 (RPMI1640 +10%FBS (2%DMSO 含有)を

200 μl 分注した(トップのウェルの最終濃度は 100 μM)。

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 μM)。その右隣の列はサンプル無添加のコントロールとした。MT-4 細胞(4x10⁵/ml, 100 μl) を各ウェルに分注した (培養液の最終 DMSO 濃度は 1%になる)。

6. CO₂ インキュベーター(37C, 5%CO₂)にて培養を開始した。

7. (培養 1-3 日目) 添加した化合物の細胞毒性を観察した。

8. (培養 3 日目)

- 1) 培養上清 (100 μl) を除去した。

- 2) dye solution (MTT 試薬) を 15 μl 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 μl 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) プレート室温に戻してから 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、 CC_{50} も算出した)。

(2) 293T 細胞に対する細胞毒性の測定 (MTT 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 (2×10^5 /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 28 化合物中、7 化合物で CC_{50} が 50 μ M 以下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 (表)。

(2) 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 μ M 以下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 (表)。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 (表)。

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 28 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Murakami, T and N. Yamamoto.

The role of CXCR4 in HIV infection and its potential as a therapeutic target (Review). *Future Microbiology*, 5 (7): 1025-1039, 2010.

2) Nakahara, T., W. Nomura, K. Ohba, A. Ohya, T. Tanaka, C. Hashimoto, T. Narumi, T. Murakami, N. Yamamoto and H. Tamamura.

“Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins Leads to Synthetic Antigen Molecules Inducing Neutralizing Antibodies” *Bioconjugate Chem.*, 21(4):709-714, 2010.

3) Aoki, T., S. Shimizu, E. Urano, Y. Futahashi, M. Hamatake, H. Tamamura, K. Terashima, T. Murakami, N. Yamamoto, and J. Komano.

“Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55Gag” *Gene Therapy*, 17:1124-1133, 2010.

- 4) Yanagita, H., E. Urano, K. Mastumoto, R. Ichikawa, Y. Takaesu, M. Ogata, T. Murakami, H. Wu, J. Chiba, J. Komano, and T. Hosino.

“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 transcriptase”
Bioorg. Med. Chem. 19:816-825, 2011.

- 5) Tanaka, T., T. Narumi, T. Ozaki, A. Sohma, N. Ohashi, C. Hashimoto, K. Itotani, W. Nomura, T. Murakami, N. Yamamoto, and H. Tamamura.

“Azamacrocyclic-metal complexes as CXCR4 antagonists”
Chem. Med. Chem., In press.

第24回日本エイズ学会学術集会・総会、
東京、2010年11月24-26日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし。

2. 学会発表

- 1) 小森谷真央、村上 努、鈴木慎太郎、鳴海哲夫、野村 渉、山本直樹、玉村啓和。

“HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出”

第5回ケミカルバイオロジー学会年会、横浜、2010年5月18-19日

- 2) 竹村太地郎、川又美弥子、村上 努。

“CypA 非依存的に増殖する HIV-1 変異株の分離”

第58回日本ウイルス学会学術集会・総会、徳島、2010年11月7-9日

- 3) 村上 努、小森谷真央、鈴木慎太郎、橋本智恵、鳴海哲夫、野村 渉、山本直樹、玉村啓和。

“細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーを用いた新規抗 HIV-1 ペプチドの探索と創出”

第58回日本ウイルス学会学術集会・総会、徳島、2010年11月7-9日

- 4) 竹村太地郎、村上 努、Kewal Ramani Vineet.

“HIV-1 感染における CypA の機能解析”

第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24-26日

- 5) 小森谷真央、村上 努、鈴木慎太郎、橋本知恵、鳴海哲夫、野村 渉、山本直樹、玉村啓和。

“HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出”

表. RNaseH阻害剤の細胞毒性(まとめ)

# of BCompounds	293T								MT-4									
	Drug concentration (μM)								Drug concentration (μM)									
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0C ₅₀	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0C ₅₀		
	% inhibition								% inhibition									
205	18	3	3	2				>100	-51	-28	-14	3					>100	
218	-7	-6	-9	-9				>100	-11	-11	-5	4						>100
217	3	5	1	-2				>100	-12	-8	-3	-8						>100
219	2	1	2	3				>100	3	-4	-3	-0						>100
228	24	8	4	4				>100	88	25	10	8						75
227	40	9	8	8				>100	96	38	13	15						38
229	-5	-4	-5	-3				>100	-15	-4	4	7						>100
230	-10	-3	1	2				>100	-15	-7	-1	-5						>100
234	52	9	-1	1				83	48	55	2	-1						>100
237	98	71	13	8				32	86	53	3	-0						71
238	100	93	15	8				34	100	42	8	1						55
241	96	24	11	5				80	54	7	-4	-0						84
441	84	47	20	11				53	94	38	23	9						24
448	99	58	12	13				44	89	8	1	5						73
455	24	14	16	11				>100	8	-1	-8	-3						>100
462	100	75	17	4				37	98	45	14	0						93
463	99	88	23	10				33	96	51	5	5						49
464	89	21	9	8				87	46	-5	-13	-5						>100
466	100	74	14	10				35	100	64	22	5						80
473	100	85	14	11				36	100	32	6	11						61
475	100	93	15	8				>100	100	7	-8	-13						68
476	100	81	19	12				42	99	82	44	3						28
484	100	89	18	11				39	98	67	33	2						20
485	100	67	15	8				40	100	14	8	-7						67
486	7	4	5	0				>100	-11	1	8	-2						>100
487	100	82	11	-1				37	96	74	40	8						31
491	8	-3	-2	-2				>100	-11	13	-3	4						>100
492	100	98	86	81	38	18	8	9	89	98	88	94	20	11	-2			12

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 計算生命科学研究センター
計算分子設計研究グループ 上級研究員）

研究要旨

本研究全体では、HIV 逆転写酵素(RT)内在の RNase H 活性を阻害する化合物が既に発見されている。医薬品開発を進める上で多様なシード化合物候補を検出することは非常に重要であることから、現在までに同定されている阻害剤候補とは骨格の異なる新規の阻害剤の探索を計算機シミュレーションと実験（RNase H 阻害活性の評価、細胞毒性の評価）を連動して行った。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おり、従来の計算創薬手法だけでは薬剤設計を行うことは難しいと考えられる。そこで、本年度は、従来の計算創薬手法に量子化学計算を取り入れて薬剤設計を行い、新規の RNase H 活性阻害剤を検出し、その結合様式予測を行った。

A. 研究目的：

HIV 逆転写酵素(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質ポケットを対象にした計算創薬の研究はほとんど報告されておらず、従来の計算創薬手法だけでは薬剤設計を行うことは難しいと考えられる。そこで、本年度は、従来の計算創薬手法に量子化学計算を取り入れて薬剤設計することを試みた。

本研究全体では、RT 内在の RNase H 活性を阻害する化合物が既に発見されている。医薬品開発を進める上で多様なシード化合物候補を検出することは非常に重要であることから、現在まで本研究全体で同定されている阻害剤候

補とは骨格の異なる化合物の探索を計算機シミュレーションと実験（RNase H 阻害活性の評価、細胞毒性の評価）を連動し実施した。

具体的な研究は（1）-（3）の流れで行った。

- （1） 分子ドッキングの手法による化合物選考と実験的評価
- （2） ヒット化合物の類似化合物探索と実験的評価
- （3） （1）、（2）により得られたヒット化合物構造についての RNase H ドメインとの結合様式予測

B. 研究方法

- （1）分子ドッキングの手法による化合物選

考と実験的評価

化合物スクリーニング用ライブラリ (600 万化合物収載) に対し、発ガン性や薬らしさの観点から絞り込みを行い、更に、X 線結晶構造 (PDB:3HYF) からモデリングした RNase H ドメインの構造に対して分子ドッキング (ドッキングソフト GOLD 及び GLIDE を使用) を行った (昨年度実施)。分子ドッキングから予測された RNase H ドメインに高親和性の 103 化合物を選考し、実験により *in vitro* 活性阻害と細胞毒性の評価を行った (今年度実施、図 1 参照)。

(2) ヒット化合物の類似化合物探索と実験的評価

(1) の結果得られたヒット化合物 (図 2 (A)) 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、上記 (1) と同様の実験的評価を行った。

(3) (1)、(2) により得られたヒット化合物の RNase H ドメインとの結合様式予測

RT 内在の RNase H ドメインには 2 つの Mg^{2+} が配位しており、阻害剤との結合において非常に重要な役割を果たしている。これら 2 つの Mg^{2+} を含有する RNase H ドメインと阻害剤との相互作用を高精度に計算機シミュレーションにより予測するためには、古典分子力学の手法だけでは限界があり、量子化学的な

手法を導入して RNase H ドメイン-阻害剤複合体の構造を取り扱う必要がある。そこで、計算ソフト QSITE を使用し、RNase H ドメインの活性中心 (薬剤との結合に重要な 6 個のアミノ酸、2 つの Mg^{2+} 、2 つの水分子を含む) と薬剤分子を量子化学的に取り扱い、活性中心から離れている RNase H ドメインのアミノ酸残基については古典分子力学の取り扱いをする QM/MM 法によって複合体構造の計算を行った。この際、量子化学計算部分に対しては、密度汎関数法 (DFT) の B3LYP 法で基底関数 lacvp+* を使用して計算した。

具体的には、RT-阻害剤 (thujaplicinol) 複合体の X 線結晶構造 (PDB:3IG1) を鋳型にして、ホモロジーモデリング技法により欠損部位を補完した RNase H ドメイン-阻害剤 (thujaplicinol) の複合体構造を構築し、QM/MM 法によってエネルギー極小化を行った (図 3 参照)。ここで得られたエネルギー極小化構造を基に、(1) と (2) のヒット化合物 (図 2 (A), (B)) の結合様式を古典分子力学シミュレーションにより網羅的に探索し、その後、QM/MM 法によってエネルギー極小化を行い構造解析とエネルギー解析 (ポアソンボルツマン法による溶媒和の効果も含む) を行った。

C. 研究結果

(1) 分子ドッキングの手法による化合物選考と実験的評価

分子ドッキングの結果を基に購入した 103 化合物に対する実験 (*in vitro* 活性阻害と細胞毒性の評価) の結果、図 2 (A) の化合物が阻害活性を示し、細胞毒性試験 (MTT アッセイ) においても問題ないことを確認した。

(2) ヒット化合物の類似化合物探索と実験的評価

計算によって選考した 28 化合物に対し、上記と同様の実験的評価を行ったところ図 2 (B) の化合物が *in vitro* 活性阻害を示すことを確認した。

(3) (1)、(2) により得られたヒット化合物の RNase H ドメインとの結合様式予測

古典力学だけではなく QM/MM 法も導入した計算の結果、ヒット化合物 (図 2 (A)) は、2 つの官能基 (sulfanylidenepranoic acid) の 1 つが RNase H ドメインの活性中心にある 2 つの Mg^{2+} に配位し、もう一方の官能基はタンパク質表面に存在するリジン (540 番) と水素結合を形成している結合様式が最安定のポテンシャルエネルギー (ポアソンボルツマン法による溶媒効果を含む) を示すことがわかった (図 4)。また、ヒット化合物 (図 2 (B)) についても前者のヒット化合物と同様の結合様式においてポテンシャルエネルギーが最安定であることを確認した。

D. 考察

QM/MM 法による電子状態を考慮した化合物と RNase H ドメインの結合様式予測の結果から、化合物設計に関する有益な情報が入手できる。RNase H ドメイン—化合物複合体の構造から、ポケット構造の静電ポテンシャル面 (図 5) を観察してみると、ヒット化合物 (図 2 (A)) の左側には、負電荷が局在している領域が存在し、空間的にも十分余裕があることがわかる。従って、この領域に官能基を導入しタンパク質と水素結合を形成するような化合物を設計すれば、さらに阻害活性を向上することが期待できる。今後は、ここで構築した計算モデルを利用して様々な化合物について結合様式を予測し、この

情報を基に合理的な薬剤設計を実現できると期待している。

E. 結論

本年度の研究により、電子状態を考慮した RNase H ドメイン活性阻害剤の開発の為に計算構造モデルを構築できたと考えている。今後は、この計算モデルを基盤にして合理的な分子設計技法を実施していくつもりである。

F. 研究危険情報

無し

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Watanabe H, Tanaka S, Okimoto N, Hasegawa A, Taiji M, Tanida Y, Mitsui T, Katsuyama M and Fujitani H. Comparison of binding affinity evaluations for FKBP ligands with state-of-the-art computational methods: FMO, QM/MM, MM-PB/SA and MP-CAFE approaches. Chem-Bio Informatics Journal 2010; 10: 32-4
2. Hirano Y, Okimoto N, Kadohira I, Suematsu M, Yasuoka K, and Yasui M. Molecular Mechanisms of How Mercury Inhibits Water Permeation through Aquaporin-1: Understanding by Molecular Dynamics Simulation. Biophysical Journal 2010; 98: 1512-1519.

(2) 学会発表

1. 沖本 憲明 ”分子動力学専用計算機 MDGRAPE-3 を使用した化合物スクリーニング” 並列生物情報処理イニシアティブ