

201108009A

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23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24(2012)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23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24(2012)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 -----	30
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 -----	34
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薬の開発を行った。研究開発は、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、の項目を立てて、研究組織内で分担して各項目研究を進めた。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、本年度は $1.4 \mu M$ の活性化合物を得ることに成功した。分子動力学計算により、合成した化合物が標的酵素部位に安定に結合し得ることを確認した。阻害活性の高い合成化合物には、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反応活性部位にはアミノ酸変異が入り難いことが明確になった。臨床で見られるRNase H領域の変異の全ては、RNase H活性ポケットとは離れており、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。今後の化合物構造の最適化において、有効な薬物創出につながる知見が得られた。また200種を超える新規化合物の合成に成功し、HIVのRNaseH活性阻害剤のみならず、インフルエンザウイルスやB型肝炎ウイルスの阻害剤探索にも利用できる化合物群のライブラリーが構築できた。

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

理化学研究所生命システム研究センター
上級研究員

A. 研究目的

HIV感染治療における多剤併用療法の定着により、HIV感染症の治療予後は大きく改善した。一方で、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薬の開発を行った。研究事業実

施当初には、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。次年度は、さらに阻害活性を向上させるために化合物の構造変換を行った。同時に臨床検体におけるRNase H領域の耐性変異に関する調査を行った。この結果を踏まえて、最終年度である本年度は、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した。また薬物の毒性や特異性も調べ、実用性の高いRNase H活性阻害化合物の開発を進めた。

B. 研究方法

新規抗HIV薬を創出するため、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

RNase H ドメインの活性中心と薬剤分子を量子化学的に取り扱うことのできる QM/MM 法によって複合体構造の計算を行った。この複合体構造モデルを利用し、これまでに発見されている既存薬剤の構造情報を取り入れ、体積の重なり及びファーマコフォアの観点から薬剤の探索を実施した。

まず、化合物ライブラリ(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、約100万化合物を収容するリード化合物創出用ライブラリを構築した。次に、これまで発見されている数種のRNase H阻害剤を取り入れて薬剤の重ね合わせを行った。これらの薬剤構造から体積の重なりを考慮した分子体積モデルを構築し、更に、この分子体積モデル上に水素結合ドナーやアクセプターなどのファーマコフォア情報を付加した分子形状クエリーを作成した。最後に、リード化合物創出用

ライブラリ内の化合物と分子形状クエリーの類似度から薬剤候補を絞り込んだ。分子形状クエリーの作成及びライブラリ化合物との類似度計算はROCS(OpenEye)を利用して行った。

II. 有機合成

前年度までに、ニトロフランを骨格とした化合物の高収率で短工程な合成ルートの確立を行い、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、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、ニトロフランのニトロ基とフラン酸素原子をはさんで反対側にも親水性基が必要であり、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する。

- ・体内にはMg金属を酵素活性部位に持つタンパク質も多く、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、ニトロフランの骨格構造自体は、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。

- ・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。この部分をケトン基に変換するなどの方策を検討する。

III. 合成化合物の活性測定

逆転写酵素のRNase H活性の阻害能力を測定する系として、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 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 59 種類の小分子化合物を評価した。薬剤の濃度は 50 μM , 10 μM , 2 μM 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, 0.08 μM にて活性を評価した。

IV. 化合物の毒性評価

293T細胞を使用して各種誘導体化合物に対する細胞毒性を測定した。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。

V. 耐性変異の分子疫学解析

前年報告した手法により、逆転写酵素領域を増幅した。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 p15 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。シークエンシングには、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。

C. 研究結果

I. 計算機設計

昨年度まで構築した RT-阻害剤構造では、タンパク質骨格やアミノ酸側鎖が X 線結晶構造から大きくずれており、薬剤設計に利用するには不適切であることがわかった。本年度は、QM/MM 計算の電子状態を考慮する QM 部分以外の原子配置を固定してエネルギー極小化を行った。

上記の過程で構築した RT-阻害剤複合体構造の情報を利用して、これまでに発見されている既存薬剤の構造情報を取り入れ、薬剤の体積の重なり及びファーマコフォア情報を基に分子形状クエリーを作成した。この分子形状クエリーを使ってリード化合物創出用ライブラリの中から類似度の高い 11 化合物を選考した。これらの薬剤の酵素活性阻害を実験により測定したが、阻害活性を持つ薬剤は発見できなかった。

II. 有機合成

前年度までに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 30 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。初めにニトロフランフェニルエステル骨格を持つ類縁体化合物群を合成した。フェニル基のメタあるいはパラ位に水酸基を持つ派生物は、先導化合物とほぼ同じ阻害活性を持つ。水酸基をアセチル基で置き換えても、阻害活性は同程度である。エチルエステルに置き換えると活性は向上した。さらにオルト位にメトキシ基を導入すると活性は向上した。結局、パラ位にメチルエステル基を、オルト位にメトキシ基を含む化合物が良い阻害活性を示した。

次にニトロフランエステルにベンジル基が結合した化合物群を合成した。ベンジル基に他の官能基が結合していない化合物でも阻害活性が認められた。ニトロ基やメトキシ

エステルあるいはブトキシエステルをベンジル基に結合させると、活性に僅かな違いが出た。但し、前節のニトロフランフェニルエステル骨格を持つ類縁体化合物の方が阻害活性の高いものが多かった。

ニトロフラン部位に接続するエステル結合をカルボニル基で置き換えた化合物を合成した。ニトロフェニル基をアルキル鎖の長さならびにニトロ基の結合位置を変えてカルボニル炭素に結合させたが、いずれの場合も阻害活性を持たなかった。エステル結合をアミド結合に変換しても、やはり阻害活性は全く見られなかった。

ニトロフラン部位を別の官能基に変換した化合物群を合成した。フラン部位をチオフェンに変換させると場合により活性は大きく低下する。フラン環をピロール環に変化させても、阻害活性は測定されなかった。フラン環の4位にハロゲンを導入すると、僅かな活性の向上が見られたが、疎水性官能基や芳香族環を結合させると阻害活性は失われた。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。フラン環の3位に小さな疎水性官能基であるメチル基を結合させた場合は活性の低下が見られた。

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59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59種類の化合物の中でRNase H阻害能を有していたのは12種類 (20.3%) であった。研究計画初年度と2年目に検討した化合物に含まれている活性を持つ化合物の割合 (47.1%, 25.0%) は作年度よりもやや低かった。薬剤の持つ酵素阻害活性をIC50で、高 (< 4.9 μM)、中 (5~19 μM)、低 (20~50 μM) に分類すると、高が5/59 (8.5%)、中が5/59 (8.5%)、低が2/59 (3.4%)、活性が検出されなかったも

のが47/59 (79.7%)であった。昨年度と同様の阻害活性物質のヒット率を達成し、かつ高い酵素阻害活性を示した化合物の頻度が昨年度実績 (8.6%) とほぼ同じであったことから、今年度も構造活性相関の理解も深化にともなって阻害効果の高い化合物が高い割合で合成されていたと考えられる。

IV. 化合物の毒性評価

293T 細胞に対する細胞毒性について、化合物の構造ごとに調査した。

・ Nitro-furan 部分の誘導体 :

furan 環のニトロ基の近傍に Br を導入した化合物の CC_{50} が $3\mu\text{M}$ と細胞毒性が強かった。それ以外の誘導体では CC_{50} は数十 μM から 100 μM 以上と細胞毒性は弱かった。

・ Phenyl-ester コアを有する誘導体 :

多くの誘導体では CC_{50} は数十 μM から 100 μM 以上と細胞毒性は弱かった。

・ Benzyl-based 置換基と結合した ester コアを有する誘導体 :

多くの誘導体では CC_{50} は数十 μM から 100 μM 以上と細胞毒性は弱かった。

・ ester 結合を他の連結様式に変換した誘導体 :

ester 結合をベンジルニトロ基に変換した数種の誘導体の CC_{50} は 10 μM 前後とやや強かった。

V. 耐性変異の分子疫学解析

RAL耐性を獲得した感染者 (n = 4) の Pol 領域の遺伝子配列を解析した。4症例は G140S+Q148H (2症例) あるいはN155H、Y143C/A のメジャー変異を獲得していた。4症例の内、3症例についてRAL 投与前の Pol 領域の遺伝子配列の決定に成功した。HIV-1 HXBII をリファレンスとして、RNaseH 領域の遺伝子配列を比較した結果、L491S はRAL 投与前後で変異変化のあったものはK451RとL452T、Q480Eであった。しかし、これらの変異は、2症例のみで見

られ、3症例に共通するものではなかった。一方、R461KとL491SはRAL以外のHAART治療後のサンプルから検出された。昨年度の研究結果から、両変異は治療(RALなし)群に優位に認められる変異であることから、RALによる二次変異である可能性は低いと考えられる。その他の変異は、RAL投与前(あるいは治療開始前)にも共通して存在した変異であるため、遺伝的多型だと考えられる。図には示していないが、N447SがRAL投与前に変異として検出(1症例)された。Los AlamosのHIV-1サブタイプBの配列(1990年後半)にもN447Sが存在することから、遺伝的多型であると考えられる。以上のことから、RAL耐性獲得とRNase H領域への二次変異との関連するものは認められず、RAL投与前によるRNase Hの二次的な変異誘導は考えられにくいように思われる。

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）
分担研究年度終了報告書

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感染症治療の大きな障害要因となっている。薬剤耐性ウイルスを抑制する対応策として、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、合成された化合物のうち最も阻害活性の高いものについて、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上で、分子動力学計算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、30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220種類の合成物を得ることができた。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。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領域のみからなるタンパク質を発現させ、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たが、今後、標的タンパク質への結合親和性を高めるため、さらに化合物構造改変を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。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、多剤耐性ウイルスはHIV感染症治療の障害要因としてとっ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。

本研究では、HIV逆転写酵素の持つRNaseH活性を標的とした抗HIV薬の開発を進める。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、さらに活性の高い化合物への変換を行うとともに、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。本年度は研究の最終年度に当たるので、実用的な阻害剤化合物への改変を念頭に置き、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（国立感染症研）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。これまでに、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。計算機解析では、活性の強い化合物と標的タンパク質の結合構造を予測し、予測構造の安定性の確認を

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、分子動力学計算により、標的タンパク質と化合物の複合体構造が室温で安定に保たれるか否かを確かめた。計算には、AMBER9ソフトウェアを用いて、構造の揺らぎを追跡した。

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。この目的のために、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）

前年度までに、ニトロフランを骨格とした化合物の高収率で短工程な合成ルートの確立を行い、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、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、ニトロフランのニトロ基と反対側にも親水性基が必要であり、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。この疎水性官能基の部分の改良が、RNase Hとの特異性を向上させるためには必須である。

・活性化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が、体内にはMg金属を酵素活性部位に持つタンパク質も多い。従って、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、ニトロフランの骨格構造自体は、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行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。

・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)

前年度までに、HIV-1の逆転写酵素全体を用いて結晶構造解析を試みた。タンパク質結晶は得られるものの、化合物が結合していない構造しか観測されなかった。本年度はRNaseHドメインのみを取り出した部分構造タンパク質を作成し、結晶化を試みた。発現ベクターは、novagen pET50(b)ベクターにRNaseHドメインをコードする核酸配列を組み込んだものを使用した。RNaseHドメインの発現には、大腸菌Rosettaを用いた。培養は30℃で行い、O.D.値が0.5となった時点で、0.2mMのIPTGを投入した。その後、20時間30℃の培養により、タンパク質

を発現させた。超音波破碎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-タグを含むNusと呼ばれるドメインが付いているので、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-タグを含むNusドメイン部位の切断を行った。Niリジンを用いて、切断されたNusドメインと夾雑タンパク質を取り除いた。次に陽イオンカラムを通して、夾雑物を除去した。最後にゲルろ過クロマトグラフィーにより最終精製を行った。共結晶は、逆転写酵素と阻害活性化化合物を、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。

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。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。このフラン基とカルボニル基が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、分子動力学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分子に対して用いられる標準的な計算方法であり、以前より、盛んに利用されている。計算では、RNaseH領域のAsp443, Glu478, Asp498, His539, Asp549と阻害化合物が、2つのMg²⁺イオンを介

して相互作用するように配置した。化合物については、Gaussian03プログラムにより、構造最適化計算を実行した。RNaseHの初期構造として、PDBcode：3HYFを用いた。

阻害剤とRNaseH部位との分子動力学計算中の平均結合構造を図1(a)に示す。RNaseH活性部位と化合物は、2つのMg²⁺イオンを含みMg-O-N-C-O-C-C-O-Mgの9員環構造をとる形となった。MgとOの距離は2.0Å程度となった。他の研究グループが開発しているRNaseH阻害剤では、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るものが多い。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で、2つの金属イオンに配位していることが判った。図1(b)に分子動力学シミュレーション中における1つのMg²⁺イオンとフラン基の酸素原子ならびに別のMg²⁺イオンとカルボニル酸素原子の距離の変化を示す。およそ2.0Åの値で、ほぼ一定に保たれていることが判る。従って、Mg²⁺イオンと酸素の結合は極めて安定である。図1(c)には、図1(a)のd3, d4, d5で表す距離のシミュレーション中の変化を示す。d3の距離は計算中に大きく変動する。すなわち化合物の溶媒に露出している部分は、一部のアミノ酸残基と相互作用をしているものの不安定な部分である。これに対して、d4, d5は距離が一定に保たれている。化合物が主に相互作用しているのはSer499であり、この残基が化合物との結合に深く関与していることが判る。

(II. 化合物合成)

前年度までに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30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。既に、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 acethyl 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、本年度も候補化合物を合成した。合成された化合物の一部を図2～5に示す。

II-2. ニトロフラン骨格を持つ類似化合物

図2には、ニトロフランフェニルエステル骨格を持つ類縁体化合物群を示す。フェニル基のメタあるいはパラ位に水酸基を持つ派生物は、先導化合物とほぼ同じ阻害活性を持つ。水酸基をアセチル基で置き換えても、阻害活性は同程度である。エチルエステルに置き換えると活性は向上した。さらにオルト位にメトキシ基を導入すると活性は向上した。結局、パラ位にメチルエステル基を、オルト位にメトキシ基を含む化合物が良い阻害活性を示した。パラ位にフェニルメチルアミンを導入しても活性は保たれた。

図3にはニトロフランエステルにベンジル基が結合した化合物群の構造を示す。ベンジル基に他の官能基が結合していない化合物でも阻害活性が認められる。ニトロ基やメトキシエステルあるいはブトキシエステルをベンジル基に結合させると、活性に僅かな違いが出る。ベンジル基までのアルキル鎖を長くしても活性はあまり変化しないが、水酸基を付けると、阻害活性は低下する。メトキシ基を入れるとさらに活性は低下する。メトキシ基を2つ導入すると、やや活性は回復するが、これを塩素に変換すると活性は大きく低下する。

II-3. エステル結合の変換の試み

図4には、ニトロフラン部位に接続するエステル結合をカルボニル基で置き換えた化合物を示す。体内ではエステル分解酵素の働きでエステル結合を持つ化合物は急速に代謝されてしまう。従って、エステル結合を回避する化合物が望ましい。ニトロフェニル基をアルキル鎖の長さならびにニトロ基の結合位置を変えてカルボニル炭素に結合させたが、いずれの場合も阻害活性を持たなかった。エステル結合をアミド結合に変換しても、やはり阻害活性は全く見られなかった。従って、現在のところニトロフラン接続部位にはエステル結合が有効となっている。

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ることで、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5には、ニトロフラン部位を別の官能基に変換した化合物群を示す。フラン部位をチオフェンに変換させると場合により活性は大きく低下する。フラン環をピロール環に変化させても、阻害活性は測定されなかった。フラン環の4位にハロゲンを導入すると、僅かな活性の向上が見られたが、疎水性官能基や芳香族環を結合させると阻害活性は失われた。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。フラン環の3位に小さな疎水性官能基であるメチル基を結合させた場合は活性の低下が見られた。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。

(III. 結晶構造解析)

合成化合物群のなかで最も阻害活性の高かった化合物と精製したRNaseHドメインについて、共結晶の作成を試みたが、結晶は得られなかった。一方で逆転写酵素を用いた場合は結晶が析出した。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、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。これは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。今後さらに研究を継続して、より阻害活性が高く、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., Fudo S., Urano E., Ichikawa R., Ogata M., Yokota M., Murakami T., Wu H., Chiba J., Komano J., Hoshino T.
“Structural Modulation Study of Inhibitory Compounds for RNase H Activity of HIV-1 Reverse Transcriptase”
Chem. Pharm. Bull. **60**, in press (2012)
- Yanagita H., Yamamoto N., Fuji H., Liu X., Ogata M., Yokota M., Takaku H., Hasegawa H., Odagiri T., Tashiro M., Hoshino T.
“Mechanism of drug resistance of hemagglutinin

of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function”

ACS Chem. Biol. **7**, 552-562 (2012)

2. 学会発表

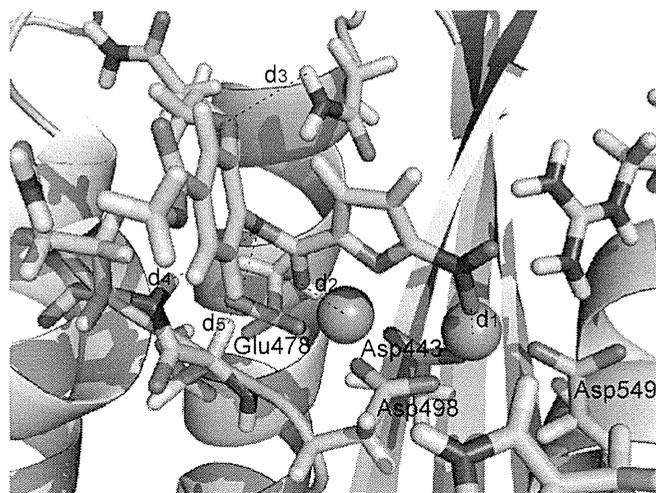
- ・柳田 浩志, 松元 輝礁, 尾瀉 将一, 高江州 善寿, 浦野 恵美子, 市川 玲子, 村上 努, 駒野 淳, 星野 忠次
「新規HIV-1逆転写酵素RNase H活性阻害剤開発における構造活性相関」
第21回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、P-15、千葉 (2011.5.30)
- ・Yanagita, H., Hoshino, T., Ogata, M., Urano, E., Ichikawa, R., Murakami, T., Komano, J.
「Development of the compounds inhibiting RNase H enzymatic activity of HIV-1 reverse transcriptase」
International union of microbiological

societies 2011 congress, VI-PO35-4, Sapporo (2011.9.15)

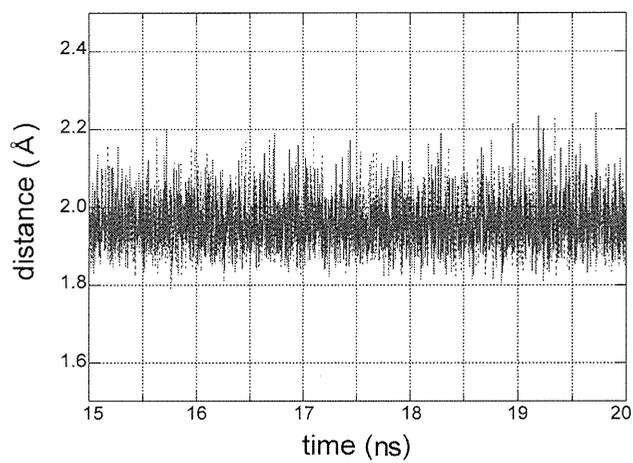
- ・柳田浩志, 横田瑞穂, 尾瀉将一, 浦野恵美子, 市川玲子, 村上努, 駒野 淳, 星野忠次柳田 浩志, 横田瑞穂, 尾瀉将一, 浦野恵美子, 市川玲子, 村上努, 駒野 淳, 星野忠次
「HIV-1逆転写酵素RNase H活性阻害剤の開発」
第25回日本エイズ学会学術集会、047-267, 東京(2011.11.30)
- ・星野 忠次, 柳田 浩志,尾瀉 将一, 横田 瑞穂, 浦野 恵美子, 市川 玲子, 村上 努, 駒野 淳
「HIV-1逆転写酵素RNase H活性阻害剤の開発」
日本薬学第132年会, 30E09-pm06、札幌 (2012.3.30)

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

(a)



(b)



(c)

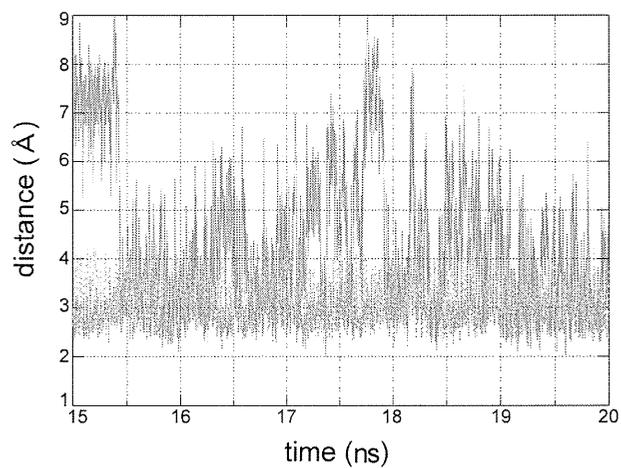


図1：化合物のRNase H活性部位への結合構造



Compound	-O-R	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
1		7.2	>100
2		8.2	24
3		9.1	>100
4		8.7	49
5		3.6	>100
6		3.1	>100
7		1.4	>100
8		3.8	>100

図2：フェニルエステルニトロフラン骨格を持つRNase H活性阻害化合物



Compound	-O-R	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
9		5.4	38
10		5.0	>100
11		5.8	75
12		4.5	>100
13		5.1	57
14		7.9	39
15		14.2	42
16		18.6	36
17		12.5	36
18		8.5	51
19		17.4	64

図3：エステル部位にベンジル派生官能基が結合した構造を持つ化合物

Compound	-CH ₂ -R or -NH-R	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
20		>50	11
21		>50	17
22		>50	9
23		>50	29
24		>50	27
25		>50	32

図4：エステル部位をケトン基あるいはアミノ基に変換した化合物

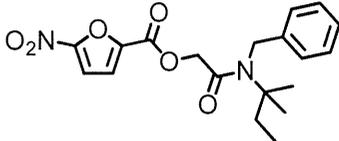
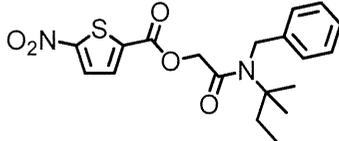
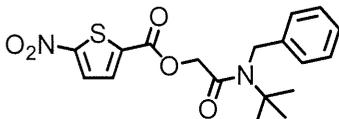
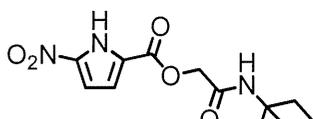
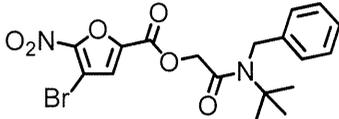
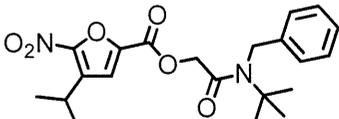
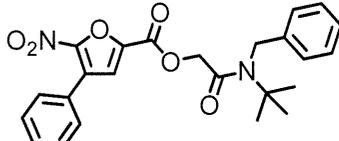
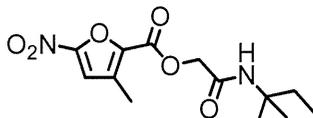
Compound	Structure	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
26		8.4	74
27		>50	49
28		30.3	50
29		>50	86
30		6.6	3
31		>50	>100
32		>50	>100
33		25.7	76

図5：ニトロフラン部位を変換または修飾した化合物

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

分担研究者：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）

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

研究要旨 HIV-1 感染症は抗レトロウイルス薬の併用療法で病期進行を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る。治療標的としてウイルス複製に必須の活性であるウイルス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。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 59 種類の小分子化合物の RNaseH 阻害活性を評価し、新たに 12 種類の誘導体を RNaseH 阻害剤として同定することに成功した。リード化合物よりも高い RNaseH 阻害効果を有する化合物を同定することができた。これらの構造・機能の相関解析を基盤として、より高い活性を持つ誘導体を合成展開してさらに強力な 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行政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。そのため、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容易ではない。副作用や耐性ウイルス問題により、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。効果的な 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。予防エイズ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みられるパテント切れ問題や、一定の抗 HIV-1 効果を持つ新たなインテグラーゼ阻害剤の上市により、積極的な製薬メーカーによる抗レトロウイルス薬開