

201108009B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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～23年度 総合研究報告書

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

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～23年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	39
III. 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）

総合研究報告書

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。ウイルス複製に必須の酵素活性であるウイルス逆転写酵素に内在するRNase H活性は有力な治療標的候補である。本研究班では、HIV RNase H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進めた。研究当初に既に、RNase H阻害剤の基本分子骨格5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME)からなる先導化合物を見出していたが、本研究の遂行により、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。先導化合物は $IC_{50}$ 値で $16.5 \mu M$ の薬理活性を示すが、本研究で $1.4 \mu M$ の活性化化合物を得た。研究では総計281種類の小分子化合物のRNase H阻害活性を評価し、新たに83種類の誘導体をRNase H阻害剤として同定することに成功した。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。活性の認められた合成化合物については、細胞毒性を測定した。阻害活性のある85種の化合物中、52化合物についてMT-4細胞と293T細胞の両方の細胞で、33化合物については、293T細胞のみ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、ニトロフランを中心とするRNase H活性阻害剤の骨格構造そのものはほとんど細胞毒性を示さないことが判明し、この骨格構造はRNase H活性阻害剤の基盤物質として適しているとの結論を得た。臨床検体における HIV-1 RNaseH 遺伝子配列を解析し、RNase H領域で見られるアミノ酸変異を明確にした。RNaseH 阻害剤開発の上では、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。RNaseH 遺伝子の遺伝的多型変異と既存薬の治療により生じる二次変異を解析した結果、NRTI治療患者と未治療患者との間で、RNaseH 領域の変異多型に違いが認められた。遺伝子解析において認められた遺伝的多型のいずれも、RNaseH の構造上、核酸認識面には認められなかった。このことから、RNaseH の酵素活性中心および核酸認識部位は非常に保存され、安定した薬剤ターゲット領域であることが示唆された。以上の構造・機能の相関解析、細胞毒性の測定、遺伝子変異の解析を基盤として、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RNase H阻害剤の開発が期待される。また本研究において、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

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。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ことであるが、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発は望めない。このような社会的背景からも、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厚生研究として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こと、(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こと、(3) 既存の薬剤耐性ウイルスに対しても治療効果を持つこと、(4) 副作用が少ないこと、(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活性はウイルス複製に必須であり、上記の条件にもよく合致する。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。

本研究事業は、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、の項目を立てて遂行した。

I. 計算機設計では、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探索設計することを試みた。近年の研究報告により、

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創薬ターゲットは計算創薬において高難度であると考えられ、また、計算創薬による研究報告もほとんどされていない。そこで、従来の計算創薬手法に加えて、新たな計算手法を導入しながら、(1) 大規模化合物ライブラリを使った化合物探索、(2) (1)のヒット化合物に基づく類似化合物探索、(3) 電子状態を考慮したRT-阻害剤複合体の構造モデリングとそれに基づく薬剤探索、の手順に従って薬剤探索を実施した。

II. 有機合成、III. 化合物の活性測定、IV. 毒性評価については、我々が既に見出している阻害活性を持つ先導化合物を足掛かりにして実施した。先導化合物は5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME)構造を持つ。この化合物の基本骨格は過去に報告例のない構造である。この独自の薬物シードを発展させるために、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、さらに細胞毒性を評価することで、阻害活性の高い化合物を見出し、薬剤物の最適化を推し進めることとした。

V. 耐性変異の分子疫学解析では、(1)治療・未治療患者に感染している HIV-1 の RNaseH 遺伝子多型の解析、(2) RAL に対する耐性を獲得した治療患者のウイルス RNaseH 領域の二次変異の解析に取り組んだ。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 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も報告されている。 $Mg^{2+}$  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。

## 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

(1) 大規模化合物ライブラリを使った化合物探索

先導化合物以外の新規骨格を有する阻害剤の発見のため、市販化合物ライブラリを使って分子ドッキングによる化合物探索を行った。その手順は以下のとおりである。

(1-1) 分子ドッキングで使用したタンパク質構造の構築

タンパク質構造には、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タンパク質立体構造とした。

(1-2) 化合物ライブラリの調整

市販化合物ライブラリ(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 万化合物程度含有)を構築した。

(1-3) 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 計算を使用した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。この後、購入可能な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。

(2) (1) のヒット化合物に基づく類似化合物探索

(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、このヒット化合物に関する類似化合物探索を行った。薬剤の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計算による検索を行い、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) 電子状態を考慮した RT-阻害剤複合体の構造モデリングとそれに基づく薬剤探索

前述したように 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極めて重要な役割を果たしている。このような2つの  $Mg^{2+}$  を含有する RNase H ドメインと化合物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ことが重要である。本研究では、計算ソフト QSITE を用いて量子化学計算を取り込んだ QM/MM 計算を実行した。この際、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的に取り扱って複合体構造の計算を行った。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+\*を使用して計算を行った。

計算の初期構造には、RT-阻害剤 (thujaplicinol) 複合体の X 線結晶構造 (PDB:3IG1) を使用した。この構造に対して、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。計算条件の検討の結果、MM 部分のタンパク質骨格やアミノ酸側鎖が初期構造から大きく変化しない様に、QM 部分以外の原子配置を固定してエネルギー極小化した構造が薬剤探索において適切であるとみなした。ここで得られたエネルギー極小化構造を使って、既存薬剤 (図 2) の結合様式やその相互作用エネルギー解析を実施した。

上記で構築した RT-阻害剤複合体構造を利用し、これまでに発見されている数種の既存薬剤の構造情報を取り入れ、その構造の体積の重なり及び官能基 3 次元特徴 (ファーマコフォア) の観点から薬剤の探索を実施した。この際、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、QM/MM 計算により得られた RT-阻害剤複合体構造を使用して、これまで発見されている数種の RNase H 阻害剤の構造情報を利用し薬剤探索のための分子形状クエリーを作成した。ここでは、数種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

当研究班では、既に RNase H 阻害剤の先導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) の確立を行うことも念頭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ので、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必要がある。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した。

・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、これを合成した。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した。

### 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。

本研究では総計 281 種類の小分子化合物を評価した。薬剤の濃度は 50  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  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。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  $\mu\text{M}$  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。

### IV. 化合物の毒性評価

(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。
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。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)。
6. CO<sub>2</sub> インキュベーター (37C, 5%CO<sub>2</sub>) 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  $\mu\text{l}$ ) を除去した。
  - 2) dye solution (MTT 試薬) を 15  $\mu\text{l}$  各ウェルに添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間培養した。
  - 3) solubilization solution/stop mix を 100  $\mu\text{l}$  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、4  $^{\circ}\text{C}$  で一晩静置した)。
  - 4) プレートを室温に戻してから 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<sub>50</sub> も算出した)。

(2) 293T 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。
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  $\mu$ 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 ( $2 \times 10^5$ /ml, 100  $\mu$ 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。

## V. 耐性変異の分子疫学解析

逆転写酵素領域を増幅するプライマーを検討し、独自の遺伝子増幅方法 (図3) を確立した。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 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。

(倫理面への配慮)

検体は番号化され、患者本人が特定できない状態で解析を行っている。

## C. 研究結果

### I. 計算機設計

#### (1) 大規模化合物ライブラリを使った化合物探索

化合物探索により購入した 103 化合物は、本研究全体において得られている NACME 誘導体とは骨格が大きく異なるものである。従って、実験により酵素活性阻害効果が観察されれば新規骨格を有する阻害剤候補となる。

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) (1)のヒット化合物に基づく類似化合物探索

類似化合物の探索によって選考した 28 化合物に対し、上記 (1)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) 電子状態を考慮した RT-阻害剤複合体の構造モデリングとそれに基づく薬剤探索

RT-阻害剤構造の QM/MM 計算において、全体構造を動かしてエネルギー極小化した場合、タンパク質骨格やアミノ酸側鎖が X 線結晶構造とは大きく異なることがわかった。そこで、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うことを試みた。結果、構造全体を動かしたエネルギー極小構造に比べて、QM 部分のみを動かした構造では、タンパク質骨格は計算の初期構造とほとんど変わらなくなった (図 4)。一方、構造を動かしている QM 部分 (活性中心近傍) においては、構造全体を動かした構造と QM 部分のみを動かした構造では、アミノ酸、金属、配位水、阻害剤 (thujaplicinol) の相対配置がずれていることがわかった (図 4)。そこで、薬剤探索には、タンパク質構造が X 線結晶構造に類似している QM 部分のみを動かしたエネルギー極小構造を採用した。この構造を基に、これまでに阻害活性のあったヒット薬剤 (図 2) を分子ドッキング等の技術で配位させ、多様な結合様式の RT-阻害剤の構造をモデリングした。これらのモデリング構造から、構造解析およびエネルギー解析を行った。結果、図 2 (A) のヒット薬剤は、2つの官能基 (sulfanylidenepranoic acid) の一方を RNase H ドメインの活性中心にある2つの  $Mg^{2+}$  へ配位させ、もう一方の官能基はタンパク質表面に存在するアルギニン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（溶媒効果を含む）を示すことがわかった（図5）。図2（B）の化合物においても同様の結合様式が最安定のポテンシャルエネルギーを示すことがわかった。

量子化学計算により決定したRT-阻害剤複合体構造モデルを基本にして、これまでに発見されている数種の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情報を基に分子形状クエリーを作成した（図6）。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、阻害活性能を持つ薬剤は発見できなかった。

## II. 有機合成

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、200種類を超える誘導体を合成展開した。

### 先導化合物誘導体の官能基置換(1)

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った。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 acetyl 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7）。また、得られた生成物の純度も高いため、正確な活性測定が可能となった。

ニトロフランを基本骨格としたヒット化

合物を基礎に、さら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（図8）。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示した。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った。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（図9）。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プ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。

### 先導化合物誘導体の官能基置換(2)

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を合成した。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10)。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なかったが、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た。

再度、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(図11)。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。

### 先導化合物誘導体の官能基置換(3)

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12)。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。さらに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(図13)。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場合には、いずれ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。

### 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281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)。281種類の化合物の中でRNaseH阻害能を有していたのは83種類(29.5%)であった。薬剤の持つ酵素阻害活性をIC<sub>50</sub>で、高(<4.9 μM)、中(5~19 μM)、低(20~50 μM)に分類すると、高が23/281(8.8%)、中が44/281(15.7%)、低が16/281(5.7%)、活性が検出されなかったものが198/281(70.5%)であった(表2)。

### IV. 化合物の毒性評価

H21-H22年度は、52化合物についてMT-4細胞と293T細胞の両方の細胞で、H23年度は293T細胞のみで細胞毒性を測定した。多くの化合物はほとんど細胞毒性を示さなかった(CC<sub>50</sub>が100 μM以上)が、ニトロベンジル基またはフッ素や臭素などハロゲン元素を導入した誘導体において、CC<sub>50</sub>で10 μMから数十μM程度の細胞毒性を示すものが存在した。

### V. 耐性変異の分子疫学解析

#### (1) 未治療群における RNaseH 領域の遺伝子多型

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 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14)。

#### (2) 治療群における RNaseH 領域の遺伝子多型

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14) は認められた。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。

#### (3) RAL 耐性群における RNaseH 領域の遺伝子多型

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。RNaseH 領域には図15に示す変異と N447Sの遺伝的多型が認められた。しかし、これらの感染者における RAL 投与前あるいは耐性獲得前で、RNaseH 領域の遺伝子変異に有意な変化は認められなかった。これらのことから、RAL 耐性獲得と RNaseH 領域への二次変異との相関はない可能性がある。

### D. 考察

#### I. 計算機設計

“(1)大規模化合物ライブラリを使った化合物探索”と“(2)(1)のヒット化合物に基づく類似化合物探索”の研究では、阻害活性を有する化

合物は2種類しか発見できなかった。このことから、2つの配位金属 Mg が隣接して存在している活性中心に相互作用する化合物を従来の古典的創薬手法 (分子ドッキング等) で探索することは非常に難しいことがわかった。

“(3)電子状態を考慮したRT-阻害剤複合体の構造モデリングとそれに基づく薬剤探索”では、薬剤、金属、活性中心付近のアミノ酸の相互作用について電子状態を考慮して観察し、これらの情報を利用した新しい計算創薬手法を試みた。しかし、この手法により選定した化合物は、実験的にRNase H阻害活性をもたなかった。この手法が成功しなかった原因は、QM/MM計算に適用した既知薬剤の数が少なかったことに加えて、分子形状クエリーの制限が強すぎたことが考えられる。

### II. 有機合成

化合物の構造活性相関より、本研究で開発したニトロフラン誘導体は、図16(A)に示す結合構造をとっていると判断される。ニトロフラン基の隣にカルボニル酸素があるため、2つのMg<sup>2+</sup>イオンを含みMg-O-N-C-O-C-O-Mgの9員環構造をとる形が構成されると予測される。他の研究グループが開発しているRNase H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員環と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た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RNase H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が特徴であり、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。

化合物の阻害活性向上とエステル結合を切断し難くするという観点より、図16(B)に示す化合物群がRNase H阻害剤として有望であると判断される。

### Ⅲ. 合成化合物の活性測定

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29.5%は、2009年にはじめてNACME誘導体を同定した論文で検討されたNACME誘導体のヒット率25.0%よりも高い (Fuji et al, JMC 2009)。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, 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といえる。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。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。化合物の構造と機能を比較することによって、NACME構造のnitrofuranとそれに近接するケトン構造はRNase H活性阻害に必須であること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ことができるためにさらに多くの化合物を評価することができると思われる。特にNitrofuran側へのさらなる側鎖修飾と加水分解に対する耐性付与が今後の合成展開の課題と思われる。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。また

NACMEとは異なる構造を持つ化合物で中程度の活性を有する薬物も得られた。このことはバックアップ化合物を準備できたという点で意義深い。本研究で遂行した合成化合物の活性測定結果は、構造活性相関から得られた知見が十分に信頼性の高いレベルに達していることを強く示唆するものであり、次世代の誘導体合成に期待がかかる。

### Ⅳ. 化合物の毒性評価

これまでの細胞毒性の結果とRNase H阻害活性を総合すると、RNase H阻害活性が高いが細胞毒性が低い誘導体、RNase H阻害活性が高いが細胞毒性も比較的高い誘導体、RNase H阻害活性が低いが細胞毒性が高い誘導体の3通りのパターンに分かれた。この3年間に合成された化合物の細胞毒性試験の結果は、今後のより毒性の低い誘導体合成のための有益な情報となる。

### Ⅴ. 耐性変異の分子疫学解析

治療患者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。一方で、RAL耐性ウイルスでは、RAL 耐性獲得前後で RNaseH領域には優位な二次変異の変化は認められず、RAL のインテグラーゼに対する特異性の高さが間接的に示されたのではないかと考えられる。さらに、RAL はRNaseH に変異を誘導できるほどの活性部位へ干渉作用がないことが考えられた。

今回見出した変異多型が 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17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で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ことが、抗 HIV 薬開発する上で効果的であることが考えられる。

## E. 結論

計算機設計では、RT内在のRNase Hドメインに対し、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って探索・設計することを試みてきた。RNase Hドメインの酵素活性中心は、2つの配位金属Mgが隣接して存在している高難度な創薬ターゲットであるため、従来の計算創薬手法に加えて電子状態を考慮した新たな計算手法の導入を試みた。本課題における試行錯誤により創薬研究における重要な情報が得られた。

RNase H活性を阻害する小分子化合物を同定するための有機合成と活性評価を進め、構造活性相関の理解を深化させて、新たに83種類のNACME誘導体をRNase H阻害剤として同定した。これにより開発の足掛かりとなった化合物よりも高い活性をもつ誘導体の合成と新たな阻

害剤分子骨格をもつ化合物の同定に成功した。本研究で開発しているニトロフランを中心骨格とするRNase H活性阻害剤では、骨格構造そのものはほとんど細胞毒性を示さないことを見出した。RNase H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、我々の研究の独自性は高く評価されている。日本発の新たなHIV-1感染症治療薬として貢献が期待される。

## F. 研究発表 (論文発表)

1. Harada M., Murakami H., Okawa A., Okimoto N., Hiraoka S., Nakahara T., Akasaka R., Shiraishi Y., Futatsugi N., Mizutani-Koseki Y., Kuroiwa A., Shirouzu M., Yokoyama S., Taiji M., Iseki S., Ornitz D.M., Koseki H. : FGF9 monomer-dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion. *Nat Genet.* **41**, 289-298 (2009)
2. Okimoto N., Futatsugi N., Fuji H., Suenaga A., Morimoto G., Yanai R., Ohno Y., Narumi T., Taiji M. : High-performance drug discovery: computational screening by combining docking and molecular dynamics simulations. *PLoS Comput Biol.* **5(10)**, e1000528 (2009)
3. Watanabe H., Tanaka S., Okimoto N., Hasegawa A., Taiji M., Tanida Y., Mitsui T., Katsuyama M., 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* **10**, 32-45 (2010)
4. Hirano Y., Okimoto N., Kadohira I.,

- Suematsu M., Yasuoka K., Yasui M. : Molecular Mechanisms of How Mercury Inhibits Water Permeation through Aquaporin-1: Understanding by Molecular Dynamics Simulation. *Biophysical Journal*, **98**, 1512–1519 (2010)
5. Taiji M., Okimoto N. : 高性能計算による薬剤分子設計. *日本化学会情報化学部会誌* **29**, 55-60 (2011)
  6. Kondo H., Okimoto N., Morimoto G., Taiji M. : Free-Energy Landscapes of Protein Domain Movements upon Ligand Binding. *Journal of Physical Chemistry B*, **115**, 7629-7636 (2011)
  7. Matsuyama S., Aydan A., Ode H., Hata M., Sugiura W., Hoshino T. : 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)
  8. 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)
  9. 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)
  10. 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)
  11. Hassan R., Suzu S., Hiyoshi M., Takahashi-Makise N., Ueno T., Agatsuma T., Akari H., Komano J., Takebe Y., Motoyoshi K., Okada S. : Dys-regulated activation of a Src tyroine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *Journal of Cellular Physiology.* **221(2)**, 458-468 (2009).
  12. 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 J.A., Tamamura T. : Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: structure-activity relationship studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **18(18)**, 6771-6775 (2010).
  13. 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<sup>Gag</sup>. *Gene Therapy.* **17(9)**, 1124-1133 (2010).
  14. Suzuki S., Urano E., Hashimoto C., Tsutsumi H., Nakahara T., Tanaka T., Nakanishi Y., Maddali K., Han Y., Hamatake M., Miyachi K., Pommier Y., Beutler J.A., Sugiura W., Fuji H., Hoshino T., Itotani K., Nomura W.,



- Narumi T., Yamamoto N., Komano J.A., Tamamura H. : Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J. Med. Chem.* **53(14)**, 5356-5360 (2010).
15. 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.* **40(5)**, 1504-1509 (2010).
16. 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.* **28** suppl. 2, B68-74 (2010).
17. 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.* 101(4), 876-881 (2010).
18. 馬場昌範, 中田浩智, 朝光かおり, 駒野 淳, 岡本実佳, 杉浦 亘. : Perspectives of anti-HIV research (Review). *The Journal of AIDS Research.* **12(2)**, 74-80 (2010)
19. Urano E., Kuramochi N., Tomoda H., Takebe Y., Miyauchi K., Komano J., Morikawa Y. : A Novel Postentry Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Screened by Yeast Membrane-associated Two-hybrid System. *Antimicrob Agents Chemother.* **55(9)**, 4251-4260 (2011)
20. Aoki T., Miyauchi K., Urano E., Ichikawa R., Komano J. : Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. *Gene Therapy.* **18(9)**, 936-941 (2011).
21. Miyauchi K., Urano E., Yoshiyama H., Komano J. : Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. *Cancer Sci.* **102(6)**, 1236-1241 (2011).
22. Takizawa M., Miyauchi K., Urano E., Kusagawa S., Kitamura K., Naganawa S., Murakami T., Honda M., Yamamoto N., Komano J. : Regulation of the susceptibility of HIV-1 to a neutralizing antibody KD-247 by non-epitope mutations distant from its epitope. *AIDS.* in press.
23. Nomura W., Hashimoto C., Ohya A., Miyauchi K., Urano E., Tanaka T., Narumi T., Nakahara T., Komano J., Yamamoto N., Tamamura H. : Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem.* in press.
24. Watanabe T., Urano E., Miyauchi K., Ichikawa R., Hamatake M., Misawa N., Sato K., Ebina H., Koyanagi Y., Komano J. : The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDIB/D4GDI limits HIV-1 replication. *AIDS Res Hum Retroviruses.* in press.
25. Imadome K., Yajima M., Arai A., Nakagawa-Nakagawa A., Kawano F., Ichikawa S., Shimizu N., Yamamoto N., Morio T., Ohga S., Nakamura H., Ito M., Miura O., Komano J., Fujiwara S. : CD4-positive T cells have a critical role in the proliferation of

- EBV-infected T and NK cells.  
*PLOS Pathog.* in press.
26. 駒野 淳: 止まらないエイズウイルス流行の拡大。  
中央論評、in press
27. Urano, E., Aoki T., Futahashi Y., Murakami T., Morikawa Y., Yamamoto N., Komano J. : Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55<sup>Gag</sup> with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production.  
*J. Gen. Virol.* **89**(Pt 12), 3144-3149 (2008)
28. Tanaka T., Tsutsumi H., Nomura W., Tanabe Y., Ohashi N., Esaka A., Ochiai C., Sato J., Itotani K., Murakami T., Ohba K., Yamamoto N., Fujii N., Tamamura H. : Bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore.  
*Org. Biomol. Chem.* **6**, 4374-4377 (2008).
29. Iwasaki Y., Akari H., Murakami T., Kumakura S., Dewan Z., Yanaka M., Yamamoto and N. : Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists.  
*Cancer Sci.* **100**, 778-781 (2009)
30. Murakami T., Kumakura S., Yamazaki T., Tanaka R., Hamatake M., Okuma K., Huang W., Toma J., Komano J., Yanaka M., Tanaka Y., Yamamoto N. : 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.* **53**(7), 2940-2948 (2009).
31. 村上 努 HIVの粒子形成のメカニズム—  
Gag蛋白に関する最新の知見—  
*Confronting HIV2009* **35**, 5-7 (2009)
32. 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)
33. Murakami T., Yamamoto N. : The role of CXCR4 in HIV infection and its potential as a therapeutic target (Review).  
*Future Microbiology*, **5** (7), 1025-1039 (2010)
34. Nakahara T., Nomura W., Ohba K., Ohya A., Tanaka T., Hashimoto C., Narumi T., Murakami T., Yamamoto N., Tamamura H. : Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins Leads to Synthetic Antigen Molecules Inducing Neutralizing Antibodies.  
*Bioconjugate Chem.*, **21**(4), 709-714 (2010)
35. Tanaka T., Narumi T., Ozaki T., Sohma A., Ohashi N., Hashimoto C., Itotani K., Nomura W., Murakami T., Yamamoto N., Tamamura H. : Azamacrocyclic-metal complexes as CXCR4 antagonists.  
*Chem. Med. Chem.*, **6**, 834-839 (2011)
36. Narumi T., Komoriya M., Hashimoto C., Wu H., Nomura W., Suzuki S., Tanaka T., Chiba J., Yamamoto N., Murakami T., Tamamura H. : Conjugation of cell-penetrating peptides leads to identification of anti-HIV peptides from matrix proteins.  
*Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1468-1474 (2011)
37. 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* **106**,

- 19539-19544 (2009)
38. 岩谷靖雅. 宿主防御因子 APOBEC3G の抗 HIV 作用メカニズムに関する研究. *日本エイズ学会誌* **11**, 218-222 (2009)
39. 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. AIDS* **54**, 241-247 (2010)
40. Shibata J., Sugiura W., Ode H., Iwatani 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.* **90**, 33-41 (2010)
41. 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)
42. Fujisaki S., Yokomaku Y., Shiino T., Koibuchi T., Hattori J., Ibe S., Iwatani Y., Iwamoto A., Shirasaka T., Hamaguchi M., Sugiura W. : Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1017-1024 (2011)
43. Li J., Hakata Y., Takeda E., Liu Q., Iwatani Y., Kozak CA., Miyazawa M. : Two genetic determinants acquired late in Mus evolution regulate the inclusion of exon5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathogens.* **8**, e1002478 (2011)
44. Kitamura S., Ode H., Iwatani Y. : Structural features of antiviral APOBEC3 proteins are linked to their functional activities. *Frontiers in Microbiology* **2**, 258 (2011)
45. 徳永 研三、足立 昭夫、高折 晃史、中山 英美、岩部 幸枝、岩谷 靖雅 : HIV-1 感染阻害因子. *日本エイズ学会誌* **13**, 56-62 (2011)
46. 岩谷靖雅. 宿主防御因子APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序. *ウイルス* **61**, 61-72 (2011)
- (学会発表)  
(国際会議)
1. Okimoto N. : High-performance drug discovery: computational screening by combining docking and molecular dynamics simulations. ” , the 54th Biophysical Society Annual Meeting, 2010.2.23, San Francisco
  2. 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-P035-4, Sapporo (2011.9.15)
  3. 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, May 18-23, 2009
  4. 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, May 18-23, 2009
  5. 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
6. Jun Komano. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latency. National Taiwan University, College of Medicine, Room 202, Taiwan, Oct 6, 2010
  7. 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, Sep 7-10, 2010
  8. 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
  9. Jun Komano, Emiko Urano, Makiko Hamatake, 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. XVIII INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE, Vienna, Austria, July 18-23, 2010
  10. 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
  11. 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
  12. Kosuke Miyauchi, Emiko Urano, Jun Komano. Induction of innate anti-viral response by XMRV infection. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep 15, 2011
  13. Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Reiko Ichikawa, Mari Takizawa, Jun Komano. HIV-1 protease-activable CASP3 as a therapeutic gene against HIV-1 infection. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep 13, 2011
  14. Tadashi Watanabe, Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Reiko Ichikawa, Makiko Hamatake, Kei Sato, Hirotaka Ebina, Yoshio koranagi, Jun Komano. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDIB/D4GDI limits HIV-1 replication. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep 13, 2011
  15. Ken-ichi Imadome, misako Yajima, Ayako Arai, Atsuko Nakazawa, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto, Tomohiro Morio, Shouichi Ohga, Mamoru Ito, Jun Komano, Shigeyoshi Fujiwara. Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV-HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology, Sapporo, Sep 13, 2011
  16. Jun Komano. Inhibition of leukemic cell growth and HIV-1 propagation by HIV-1 protease-activable CASP3. CSHL meeting