

いた。Ficoll-Paqueを用いてHep2.2.15.7細胞のviabilityを高めた後、 4×10^3 個ずつ96穴プレートに播き、day 3, 5で化合物を含む液体培地と上清を交換し、day 7で無血清培地に交換した後に2日において培養上清を回収し、直接もしくはviral DNAを抽出した後、Primerdesign社のqPCR detection kitおよびIllumina社のPCR機器を用いたreal time PCR法に使用する事で各化合物の抗HBV活性を評価した。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際して、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・大学内の該当するIRBで倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。他方で臨床応用に必要な検討事項についても検討して、同時に大手製薬企業へのライセンス化を図る。

C. 研究結果

我々は抗HBV活性と抗HIV-1活性を有すると期待される新規に合成されたヌクレオシド誘導体67化合物中37化合物(分子量: 239.2-455.3)について、MT2細胞を標的細胞としたMTT assay法により野生株(HIV-1_{LAI})に対する抗HIV活性、及びヒトT細胞由来の細胞株であるMT2細胞に対する細胞毒性、加えてヒト肝癌由来の細胞株であるHuh-7細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果、37化合物中20化合物が野生HIV-1株に対し1 μM 未満のEC₅₀値を有し、実測値はEC₅₀: 0.0001-0.8681 μM であった。また、37化合物中30化合物はMT2細胞に対してCC₅₀ (50% cytotoxicity concentration : 50% 細胞毒性濃度) 値が100

μM を超え、明らかな毒性を示さなかった。また、37化合物中24化合物はHuh-7細胞に対して明らかな毒性を示さなかった。これら新規の核酸アナログ候補化合物のうち、その化学構造特性や抗HIV-1活性を考慮した上で8種類を選択し、本研究分担研究者である田中博士のグループにより試験管内での抗HBV活性について検討した結果、2種類の化合物において抗HBV活性が確認できた。また、67化合物中抗HBV活性を評価していなかった52化合物について現在活性の検討を行っているが、現時点までに少なくとも2種類の化合物について、real-time PCR法でHBV DNAの合成阻害活性を有する事を見出した。また研究分担者原口博士のグループが合成した15化合物について、現在抗HBV活性の評価検討を継続している。

D. 考察

本分担研究において我々は、研究代表者である満屋グループが有する未発表誘導体等のヌクレオシド誘導体ライブラリーを、real-time PCR法により評価する事で、抗HBV活性を示す複数の化合物を同定し得た。今後試験管内抗HBV活性評価系の更なる高速化・簡便化を目指しアッセイ法の改良を重ね、化合物の評価を続けていく。

E. 結論

今後本研究において得られるであろうHBV RTの微細立体構造の知見も基にしながら、これらhit化合物の構造最適化・合成展開・活性評価を図り、更に強力な抗HBV感染症治療薬の開発に推進していく。

F. 研究発表

論文発表（当該年度のみ）

1. **Masayuki Amano**, Yasushi Tojo, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Joseph Richard Campbell, Debananda Das, Manabu Aoki, Chun-Xiao Xu, Kalapala Venkateswara Rao, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. (2013) GRL-0519, A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor (PI), Potently Suppresses The Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2036-2046.
2. Aoki, M., Danish, M.L., Aoki-Ogata, H., **Amano, M.**, Ide, K., Koh, Y, and Mitsuya, H. (2012) Loss of protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) is associated with HIV-1 acquisition of resistance to TPV. *J. Virol.* 86(24):13384-13396.
3. Ghosh AK, Chapsal BD, Steffey M, Agniswamy J, Wang YF, **Amano M**, Weber IT, Mitsuya H. (2012) Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranlyl urethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 22(6): 2308-2311.

学会発表（国際学会・当該年度のみ）

1. **Masayuki Amano**, Y Tojo, M Aoki, S G. Pedro-Miguel, J R. Campbell, A K. Ghosh, H Mitsuya. A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) GRL-0519A Potent Against Multi-PI-Resistant HIV In Vitro. 25th International Conference on Antiviral

Research (ICAR). April 16-19, 2012, Sapporo, Japan.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

肝炎ウイルスのポリメラーゼ・逆転写酵素の結晶構造解析

研究分担者 尾曲 克己 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学・助教

研究要旨：B型肝炎ウイルスの耐性株出現を許さない新規薬剤をデザインするために、薬剤開発に必須な逆転写酵素 (RT) の活性部位の原子レベルでの立体構造を明らかにする。蛋白質の立体構造解析には、高純度・高濃度に単離された蛋白質とその結晶が必要である。まず、HBV 逆転写酵素を大量に発現する系をバキュロウイルスや大腸菌などを用いて開発する。得られた逆転写酵素を用いて、結晶化、x線結晶構造に供し、その立体構造を明らかにする。明かにした立体構造を利用して、新規薬剤のデザインが可能となる。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)の治療薬である、逆転写酵素阻害剤の耐性ウイルスの出現が問題となっている。現在、日本と世界で広く用いられているHBVの逆転写酵素阻害剤であるEntecavir(ENT)は耐性株の出現率が低いと報告されているが、先行して利用された阻害剤からの切り換えにより、耐性の出現頻度が高くなっている(Mukaide, Tanaka, *et al.*, 2010)。今後、ENT耐性株が増加することが予想される。この耐性株に対する治療薬は、現在、知られていない。この耐性株に対する治療薬の条件は、ENTと異なる作用機序を持ち、耐性プロフィールがENTと異なることである。これらの条件を満

たす阻害剤をデザインするには、逆転写酵素活性部位の立体構造に立脚した、活性メカニズムや阻害剤の作用機序を明らかにする必要がある。本研究では、耐性出現を許さない新規薬剤をデザインするために、薬剤開発に必須な逆転写酵素 (RT) の活性部位の立体構造を原子レベルで明らかにする。

B. 研究方法

蛋白質の立体構造解析には、高純度・高濃度に単離された蛋白質とその結晶が必要である。現在までに、逆転写酵素を高純度・高濃度に単離する方法は開発されていない。HBV逆転写酵素を大量に発現する系をバキュロウイルスや大腸菌などを

用いて開発する。本研究では、大腸菌発現系にて全遺伝子領域を発現させると凝集体が生じるという報告から、主にバキュロウイルス発現系を用いる。なお、特定の遺伝子領域のみの発現は大腸菌発現系でも可能であるため、HBV逆転写酵素が持つNativeな活性を持った発現領域を探索するために大腸菌発現系も作製する。大腸菌発現系でも蛋白質の発現が確認できたものは、安武博士が凝集等の改善を行う。

本研究の手順を以下に示す。HBV RT領域をバキュロウイルスもしくは大腸菌に組み込み、これらを用いて、高純度高濃度の蛋白質を作製・精製する。得られた逆転写酵素をx線結晶構造に供し、その立体構造を明らかにする。最終的には、バキュロウイルスと大腸菌発現系から得られた逆転写酵素の機能解析を行い、結晶構造解析から得られた立体構造がNativeな活性を持つものであることを示す。

C. 研究結果

1) 蛋白質発現領域の探索

HBV逆転写酵素をコードする遺伝子構造は、図1に示したP遺伝子上に複製開始に関わるTP領域、逆転写活性をもつRT領域、RNase活性をもつRNase領域をもつ。後述の大腸菌発現系に示すように、この全領域を発現させることはできなかった。そこで、発現領域をフラグメント化して、それらをバキュロウイルス、大腸菌発現系に導入した。

発現領域は、HBV逆転写酵素のモデリング構造(Du, Omagari, Tanaka, *et al.*, submitted; Mukaide, Tanaka, *et al.*, 2010)と安武博士の構造安定性予測の解析から決定した。

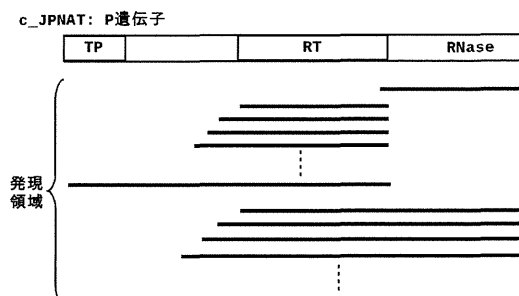
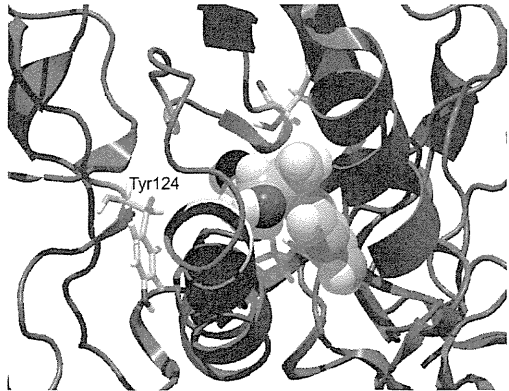


図1: 蛋白質発現領域の概念図。上段は遺伝子構造を、下段の黒線は発現させる遺伝子領域を示す。P遺伝子は、HBVの複製に関わる遺伝子である。それぞれ、複製開始に関わるTP領域、逆転写活性をもつRT領域、RNase活性をもつRNase領域に分かれる

モデリング構造の作製には、HIV逆転写酵素の結晶構造を鋳型に用いた。逆転写活性部位は、レトロウイルスを含め逆転写酵素に特有のYMDDモチーフを持つ(図2)。この活性部位を保持できるように、モデル構造と構造安定性予測の解析から構造形成に必須と考えられる発現領域を決定した。この逆転写活性領域は図1に示したRT領域になる。このRT領域以外に、RNase活性領域を含めたRT-RNase領域も発現領域に選定した。さらに、これらRT領域、RT-RNase領域の開始点を10残基ずつ前に伸ばして、大腸菌発現系での可溶性と発現量を調べることにした。

図2: 逆転写酵素活性部位のモデル構造。



蛋白質をRibbon構造で、阻害剤をSpace Fillで示した。阻害剤との相互作用に関わる残基をstick構造で示してある

2)大腸菌発現系

HBV逆転写酵素が含まれるP遺伝子全領域に加え、図1のようにRT領域、RNase領域とそれらの組み合わせたRT-RNase領域を持つ蛋白質の発現系、21種類を構築した。P遺伝子全領域の遺伝子を持つ蛋白質の発現をSDS-PAGEでは確認できなかった。次に、前述の蛋白質発現領域の探索に従い、RT領域とRT-RNase領域の発現を行った。RT領域の遺伝子を持つ蛋白質の発現は、図3に示すように、IPTGにて発現誘導

1 2 3 4 5 6 7

図3: 逆転写領域を持つ蛋白質の発現。IPTGで発現誘導した後、SDS-PAGEに供し、ゲルをCBB染色した。Lane1:誘導0時間、Lane2:誘導3時間、Lane3:誘導5時間、Lane4:誘導10時間、Lane5:誘導20時間、Lane6:誘導なし0時間、Lane7:誘導なし5時間。

を行うと誘導開始後3時間、5時間、10時間、23時間に推定分子量25kD付近にバンドを確認できた。IPTG誘導をかけないサンプルでは、バンドを確認できなかった。RT-RNase領域の発現は不溶画分が大量に存在し確認することができなかった。

2)バキュロウイルス発現系

HBV逆転写酵素の遺伝子をもつ4種のバキュロウイルスを作製した。このリコンビナントウイルスには、図4のような逆転写酵素を含むP遺伝子領域と、逆転写活性を有するRT領域、RNAase活性を有するRNase領域、その両方を含むRT-RNase領域を組み込んだ。ウイルスの大量培養の準備が整ったので、現在、蛋白質の発現を確認している。

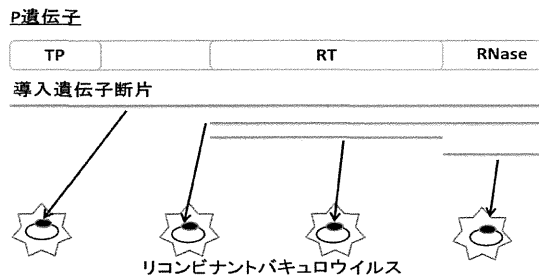


図4: バキュロウイルスに組込んだ遺伝子領域

D. 考察

蛋白質の立体構造解析には、高純度・高濃度に単離された蛋白質とその結晶が必要である。過去の報告で

は、バキュロウイルスもしくはアフリカツメガエルの卵母細胞を用いてNativeな活性を持つと推測される蛋白質が単離されてきた。しかし、これら蛋白質は結晶構造を得るのに必要な量の蛋白質を発現するまでに至っていない。現在までのところ、逆転写酵素を高純度・高濃度に単離する方法は、開発されていないと言える。本研究では、HBV逆転写酵素を大量に発現する系をバキュロウイルスや大腸菌などを用いて開発する

大腸菌発現系を用いて、RT領域の蛋白質の発現を確認できた(図3)。しかし、P遺伝子全領域と、RT-RNase領域の発現は不溶画分が大量に析出し確認できなかつた。また、RT領域の発現も、結晶化には不十分な量であり、さらなる改良が必要である。これらの事から、逆転写酵素を大腸菌で大量に発現するには、可溶化と大量発現の改良を行う必要があることが分かった。これら改良については、安武博士が改良方法を明らかにしている。

バキュロウイルス発現系では、HBV逆転写酵素の遺伝子をもつ4種のバキュロウイルスの作製が完了した(図4)。100ml~1Lの大量培養を行える程度のウイルスを準備できたので、来年度、蛋白質の発現を確認する。

E. 結論

HBV 逆転写酵素の蛋白質発現は大腸菌発現系では困難とされてき

たが、我々は発現領域を調整することにより可能とした。今後、結晶化に向けて、発現領域、培養条件の検討を行う。また、HBV逆転写酵素の遺伝子を組み込んだバキュロウイルス、4種類の作製が完了した。今後、この蛋白質の発現が期待される。蛋白質発現と、同時に、これらの蛋白質は、逆転写酵素が持つNativeな活性を持つかを調べ、逆転写酵素の活性部位の立体構造を原子レベルで明らかにする。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

HBV 逆転写酵素の構造学的研究

研究分担者 安武 義晃（産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員）

研究要旨

本研究は、B型肝炎ウイルス（HBV）感染症治療薬開発において重要なターゲット分子である HBV 逆転写酵素（HBV-Pol）の立体構造を解析し、その活性部位構造の詳細を原子分解能で明らかにすることを目的とする。H24年度はまず、活性部位を含んでかつ可溶性蛋白質として発現する領域の探索を行った。合計で 30 種以上の領域の発現系を構築し、可溶性蛋白質として発現するかを検証した。結果、いくつかの領域において可溶性画分に HBV-Pol を精製できることを明らかにした。今後、この領域のうち最も発現が強いものから順に、結晶化実験に向けたサンプルの大量調製を行う。

A. 研究目的

本研究では、HBV 逆転写酵素（HBV-Pol）を大量に可溶性画分に発現させ、結晶化法を用い、HBV 感染症の重要な創薬ターゲット分子である本蛋白質の構造を原子分解能で明らかにすることを目的とする。蛋白質の発現およびその結晶化条件が確立されれば、既存の抗 HBV 薬との複合体構造解析も現実的となり、薬剤と HBV-Pol との相互作用の詳細情報や、変異体を用いた結晶解析により薬剤耐性獲得メカニズムを理解することが可能となる。また、新たな薬剤候補物質との複合体構造解析や、計算機化学によるドッキングシミュレーション等を強力に押し進めることも可能となる。

HBV-Pol は分子量約 90 kDa の蛋白質で、逆転写開始に関与する N 末端側ドメイン、機能が明らかでないリンカー領域、逆転写（RT）ドメイン、RNase ドメインの 4 つの領域から成るペプチド鎖である。HBV-Pol は発現量および溶解度に問題があるとされており、結晶化実験可能な充分量の

HBV-RT を安定して発現・精製した例がこれまでに存在しない。私たちは、汎用的に用いられる大腸菌を主要な発現ホストとして選択し、その中で HBV-Pol の転写翻訳を最大化させ、かつポリペプチド鎖が正しく折り畳まれ、可溶性蛋白質として得られるための条件探索から開始した。

B. 研究方法

1. HBV-Pol 全長の発現

（1）発現系の構築

HBV-Pol 遺伝子（Genbank: AB246345）は、名古屋市立大学大学院医学研究科の田中靖人博士より供与いただいた。遺伝子配列に基づき、PCR による遺伝子の増幅を行った。増幅された遺伝子は大腸菌用発現プラスミド pET、もしくは *Rhodococcus erythropolis* 用発現プラスミド pTip-QC2 に挿入した。

（2）菌体の培養・発現誘導

目的遺伝子を乗せた大腸菌用 pET ベクターは全て BL21 に形質転換を行った。最適

な誘導温度、誘導剤 (IPTG) 濃度、誘導時間を検討するため、LB 培地を用いた小スケールでの発現テストを行った。目的遺伝子を乗せたロドコッカス用 pTip ベクターは L88 株 (リゾチーム感受性株) に形質転換し、LB 培地を用い 28°C で一晩、0.5 µg/mL のチオストレプトンによる発現誘導を行った。

(3) 精製・検出

培養菌体は遠心分離により集菌し、ビーズショッカー (安井器械) により菌体を破砕、遠心分離により不溶物を除去後、Ni アフィニティレジンを用いた精製を行った。菌体破砕・サンプル精製の際に用いたバッファは、リン酸 Na バッファ (native condition)、および 8 M urea を含むリン酸 Na バッファ (denatured condition) の双方で行った。目的蛋白質発現の検出は、SDS PAGE およびウェスタンブロットにより行った。

2. HBV-Pol フラグメントの発現

(1) 発現領域の決定方法

HBV-Pol のアミノ酸配列を用いて、既存の類似蛋白質の構造情報を用いずに、立体構造が不安定な領域の予測 (disorder 領域の予測) を行った。予測計算には、GlobPlot2、DLP-SVM 等の 6 種の異なるアプリケーションを用いた。

(2) 発現系構築

構造 disorder 領域予測結果に基づき、様々な長さの HBV-Pol 遺伝子フラグメントを、それぞれ最適なプライマーを作製して PCR により増幅し、pET ベクターに挿入した。

(3) 菌体の培養・発現誘導

目的遺伝子フラグメントを乗せた pET ベクターは全て BL21 に形質転換を行った。

最適な発現誘導温度、誘導剤 (IPTG) 濃度、誘導時間を検討するため、LB 培地を用いた小スケールでの発現テストを行った。

(4) 精製・検出

培養菌体は遠心分離により集菌し、ビーズショッカー (安井器械) により菌体を破砕、遠心分離により不溶物を除去後、Ni アフィニティレジンを用いた精製を行った。菌体破砕・サンプル精製の際に用いたバッファは、リン酸 Na バッファ (native condition)、および 8 M urea を含むリン酸 Na バッファ (denatured condition) の双方で行った。目的蛋白質の検出は、SDS PAGE およびウェスタンブロットにより行った。SDS PAGE およびウェスタンブロットには、培養細胞丸ごと、破砕遠心分離後の沈殿、破砕遠心分離後の上清、Ni アフィニティレジンによる精製後サンプルの、各ステップ 4 種で行い、そもそも発現しているのか、発現しているが可溶化していないかどうか、発現全量に対する可溶性蛋白質の比率、Ni レジンに結合できているかどうか、Ni レジンによる精製後も可溶性を保っているか、等の検証を詳細に行った。

C. 研究結果

1. HBV-Pol 全長の発現結果

Rhodococcus erythropolis 細胞を利用した場合、HBV-Pol の全長蛋白質の発現は認められなかったため、以後、本実験は全て大腸菌を用いて行うこととした。

大腸菌を用いて N 末端にヒスタグを融合させた場合には *R. erythropolis* の場合同様に全く発現を検出できなかったが、C 末端にヒスタグ、および N と C の両方にヒスタグを付加させた場合には、HBV-Pol と考えられる蛋白質を微量ながら検出することができた (図 1)。そこで、発現全量と不溶化蛋白質の量をより詳細に調べるため、細胞、

破碎後の上清、沈殿、およびNiアフィニティレジンによる精製後の溶出液をそれぞれ SDS PAGE に供し、ウェスタンブロットにより検出を行った。結果、沈殿の中に多くの HBV-Pol が存在するものの、一部可溶化し、Niアフィニティ精製後の溶出液中にも存在することが確認できた (図2)。

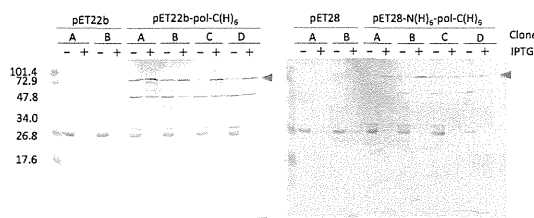


図1. HBV-Pol 全長の発現テスト (ウェスタンブロット)
HBV-Pol に相当するバンドを認めることができた (▼)。コントロールとして、インサートが入っていない空ベクターを用いた実験も行った。

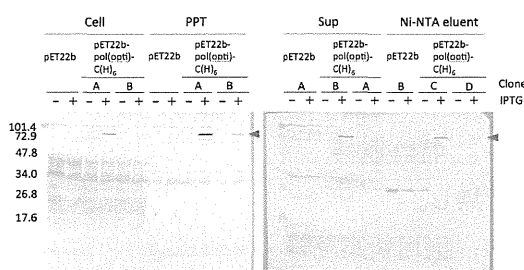


図2. HBV-Pol 全長の可溶性・不溶性のテスト (ウェスタンブロット)
可溶性画分に HBV-Pol に相当するバンドを認めることができた (▼)。Cell, 細胞 (全蛋白質を含む); PPT, 菌体破碎・遠心分離後の沈殿物 (不溶化蛋白質を含む); Sup, 菌体破碎・遠心分離後の上清 (可溶性蛋白質を含む); Ni-NTA eluent, Niアフィニティレジン精製後の溶出画分 (Niアフィニティレジンに結合し、精製できた蛋白質)。

2. 構造不安定領域の推定

研究方法欄に記載したプログラムを用いて、HBV-Pol 蛋白質のアミノ酸配列から、その立体構造の安定性の評価を行った。すべてのプログラムは、程度の差はあるものの、リンカー領域がフォールドしない不安定な領域であるという結果を示した。またソフトウェアによっては C 末端側にも不安定な領域があることが示唆された。

3. HBV-Pol フラグメントの発現結果

構造不安定領域の予測結果に基づき、様々なフラグメントの発現を行った。8 M urea を用いた細胞抽出液のウェスタンブロット解析を図3に示す。結果、いくつかのフラグメントにおいては分解物と思われるバンドが多数検出されたが、目的遺伝子のフラグメントに相当するバンドも確認した。この結果に基づいて、さらに非変性条件下でサンプルを取り扱い、細胞、破碎後の上清、沈殿、およびNiアフィニティレジンによる精製後の溶出液のそれぞれに対してウェスタンブロットにより検出を行った。その結果、Niアフィニティレジンによる精製後も、相対量は少ないものの可溶性サンプルの存在が認められる領域があった (図4)。

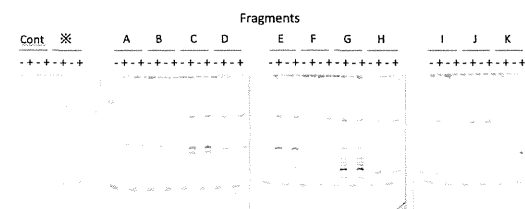


図3. フラグメントの発現テストの一例 (ウェスタンブロット)
Cont, 空ベクター (コントロール); ※, HBV-Pol-NHIS (全長)。記号「-」「+」は IPTG の添加による発現誘導の有無を示す。ここでは 11 種のフラグメントについて示した。

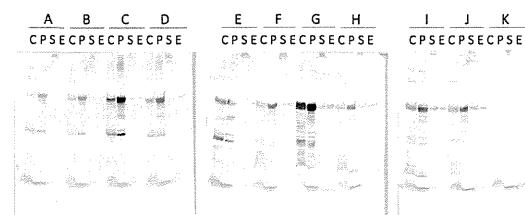


図4. HBV-Pol フラグメントの可溶性・不溶性のテストの一例 (ウェスタンブロット)
可溶性画分、Niアフィニティレジン精製後も HBV-Pol フラグメントに相当するバンドを認めることができた。C, 細胞 (全蛋白質を含む); P, 菌体破碎・遠心分離後の沈殿物 (不溶化蛋白質を含む); S, 菌体破碎・遠心分離後の上清 (可溶性蛋白質を含む); E, Niアフィニティレジン精製後の溶出画分 (Niアフィニティレジンに結合し、精製できた蛋白質)。

D. 考察

これまでに、結晶化に向けた HBV-Pol の異宿主での大量発現、精製、結晶化は報告されていない。HBV-Pol の溶解度に問題があるとされ、正しい構造を形成し可溶性の状態では大量のサンプルを取得することが難しいと考えられる。HBV-Pol 遺伝子は、逆転写開始に関与する N 末端側ドメイン、機能が明らかでないリンカー領域、逆転写 (RT) ドメイン、RNase ドメインの 4 つの領域から成る。このうち、リンカー領域は、本分子の機能に重要ではないという示唆がある。私たちの構造安定性予測の解析においても、この領域は構造をとらない不安定な配列特性を持つことが示された。そもそも、HBV のゲノムは非常にコンパクトで、Pol 遺伝子の上にウイルス粒子の外被蛋白質 (S 蛋白質) をコードする遺伝子が完全にオーバーラップしている。コドンの読み枠がずれているが、この S 遺伝子の大部分は HBV-Pol のリンカー領域に相当する。この領域の配列は進化的に S 蛋白質に最適化されているかもしれない。以上のようなことから、フラグメント化させた Pol 遺伝子を発現させることが、本分子の安定した発現の為に重要だと考えた。様々な長さで領域を用いて発現テストを行ったところ、いくつかの領域で発現精製が可能であることが示唆された。一方、全長の解析には、何らかのシャペロン分子や、逆転写開始時に結合する RNA との共発現など、安定に Pol 遺伝子が発現するために未だ発見されていない因子を見出す必要があるかもしれない。

E. 結論

HBV-Pol の全長を *R. erythropolis* もしくは大腸菌を用いて発現させ、ウェスタンブロットによって検出を行った。発現ホストに *R. erythropolis* を用いた場合、HBV-Pol の発現は確認できなかった。一方、大腸菌を用

いた場合には発現を確認することができた。構造不安定であると予測される領域を調べ、その結果に従い、長さを様々に変化させたフラグメントでの発現テストを行った。結果、可溶性で発現できる領域を見出すことができた。今後、発現が確認できた領域に対して、大量培養、蛋白質の精製を行い、結晶化実験可能な量のサンプル取得を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当無し。

2. 学会発表

該当無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金
B型肝炎創薬実用化等研究事業
分担研究報告書

核酸アナログの合成

研究分担者 井本 修平 崇城大学薬学部

研究要旨

Entecavir(ENT)等と同等あるいは更に強力で、かつ耐性プロファイルがENT等とは異なり、耐性発現の出現を許さない(又は著しく遅延させる)新規核酸アナログのデザイン・合成を行う。

A. 研究目的

わが国におけるB型肝炎ウイルスキャリアは約150万人程度と考えられている。現在、B型肝炎の治療薬としてエンテカビル等が広く用いられているが、既存の薬剤に対して耐性化したHBVに対する治療薬の開発が急務となっている。そこで、本研究では、これまでのHBV治療薬よりも強力かつ耐性発現を許さない(または著しく遅延させる)新規B型肝炎治療薬の設計と合成を行う。

B. 研究方法

満屋グループが所有するヌクレオシド誘導体ライブラリ中で強い抗HBV活性を有する化合物、または既存のB型肝炎治療薬を基本として化合物の設計・合成・評価を行い、構造最適化を行う。

(倫理面への配慮)

研究分担者の本推進研究における担当は有機合成による治療薬候補化合物の合成であるため、倫理面の問題は無い。

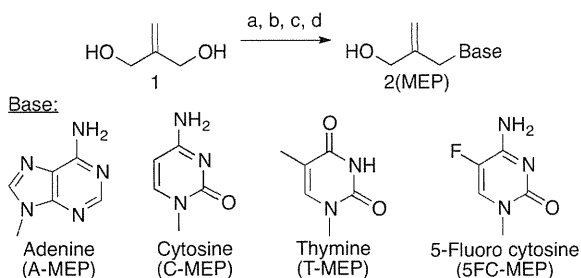
C. 研究結果

①アシクロ型Entecavir誘導体の合成

Scheme.1に示す合成法に従って、Entecavirの開環型誘導体(2:MEP series)を合成した。

2-methylenepropane-1,3-diol(1)を出発原料として、片方の水酸基をTBS化した後、残りの水酸化メシル化、引き続き核酸塩基(adenine/cytosine/thymine/5-fluorocytosine)を導入した。TBAFにてTBS基を脱保護し、抗HBV活性測定用の検体とした。

まずはこれら化合物の抗HIV活性を評価したところ、すべてIC₅₀が100□M以上であった。抗HBV活性については現在評価中である。

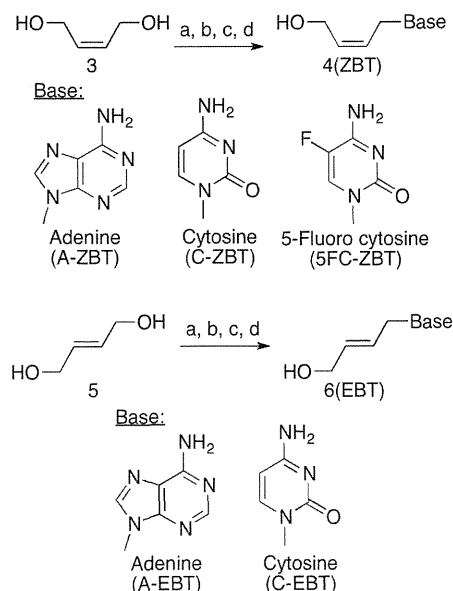


Scheme.1 Synthesis of MEP series

a) TBSCl, Imidazole, DMF, b) MsCl, TEA, DCM, c) Nucleobase, 18-crown-6-ether, K₂CO₃, DMF d) TBAF, THF

②アルケンを有するアシクロ型ヌクレオシド誘導体の合成

Adefovirの構造を参考として、アルケン構造を有するシンプルな構造のヌクレオシド誘導体(ZBT/EBT series)をScheme.2に従って先ほどと同様の手法で合成した。



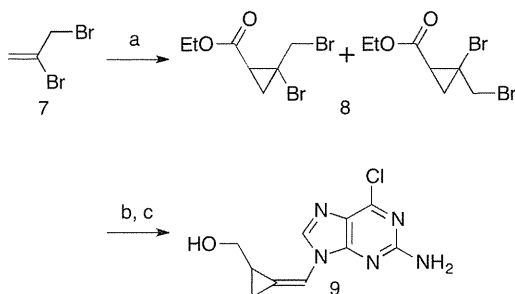
Scheme2. Synthesis of EBT/ZBT series

a) TBSCl, Imidazole, DMF, b) MsCl, TEA, DCM, c) Nucleobase, 18-crown-6-ether, K₂CO₃, DMF d) TBAF, THF

これら化合物の抗HIV活性を評価したところ、A-ZBTについてはIC₅₀が22.2 μMと弱いながらも活性を示すことが明らかとなった。抗HBV活性については現在評価中である。

③Methylenecyclopropane骨格を有するヌクレオシド誘導体の合成

Methylenecyclopropane骨格を有するヌクレオシド誘導体が強い抗HBV作用を有することが示唆されたため、多数の類縁体合成を目指すこととした。2,3-dibromopropeneを出発原料とし、シクロプロパン化を行ってジブromoエステル体を立体異性体の混合物として得た。2-amino-6-chloropurineを導入と引き続きベータ脱離によりオレフィンを形成させた後、エステルの還元を行い、ヒドロキシ体へと誘導とした(Scheme.3)。現在、これらの反応収率が思わしくないため、収率向上および精製のための条件検討を行っている。今後、リン酸誘導体およびプリン骨格6位に架橋反応性のあるビニル基を含む多数の置換誘導体を合成し、活性を評価する予定である。



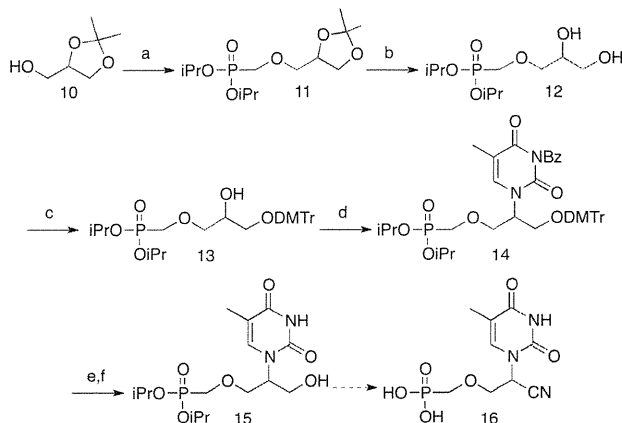
Scheme.3 Synthesis of Methylenecyclopropane analoge

a) Ethyl diazoacetate, dirhodium tetraacetate, DCM, b) K₂CO₃, DMF, c) DIBAL-H, THF

④アシクロヌクレオシドホスホネートの1'-分岐型ヌクレオシドの合成

Scheme.4の化合物16を目標として合成を進めた。Glycerolacetone(10)を出発原料とし、Diisopropyl(bromomethyl)phosphonateと反応させ、ホスホネート体(11)とした。酸性条件下、アセトニドの脱保護を行って、ジオール体(12)へと誘導した後、1級アルコールをジメトキシ

トリチルにて保護し引き続き光延条件下でグリコシル化を行ってアシクロヌクレオシドホスホネート(14)とした。水酸基と塩基部位の脱保護を行って、現在15までの合成が完了している。今後、3工程を経て目的とする16を合成予定である。



Scheme.4 Synthesis of 1'-cyano-T-acyclonucleoside phosphonate

a) Diisopropyl(bromomethyl)phosphonate, LiI, *tert*-BuOLi, DMF, b) pTsOH, MeOH, water, c) DMTrCl, pyridine d) DEAD, PPh₃, THF, e) pTsOH, DCM, MeOH, f) Ammonia in Methanol

E. 結論

本年度は、上記に示した化合物を新しい抗HBV候補化合物として設計し、9種類については合成を達成した。今後、合成した化合物の活性および毒性に関する評価結果や、逆転写酵素との結合様式の構造解析結果を基にして、さらに強力な新規抗HBV薬の合成を進めていく。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 1. 論文発表 なし 2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

新規化合物の抗ウイルス活性の評価に関する研究

研究分担者 青木 学 熊本保健科学大学保健科学部医学検査学科講師

研究要旨：本研究では既存の抗HBV逆転写酵素剤阻害剤であるエンテカビルと同等かそれ以上の活性を有する新規のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤の開発・同定を目的とし、新規化合物の*in vitro*における抗HIV-1活性、抗HBV活性および細胞毒性の検討を行った。評価した39種類の化合物については、既存の抗HIV-1剤と同等かそれ以上の活性を示すものが見られたが、高い抗HBV活性は認められなかった。本研究により得た一連のデータは、新規化合物の合成を行なう分担研究者にフィードバックされ、今後の化合物のデザイン・合成に有益な情報をもたらすものと考えられる。

A. 研究目的

本邦における B 型肝炎ウイルス (HBV) のキャリアは人口の約 1%を占めているとされ、持続感染により慢性 B 型肝炎、肝硬変へと病態が進行し、肝がんを発症する可能性がある。HBV に対する治療薬としては 3 種類の核酸誘導体が臨床応用されているが、HBV がこれらの薬剤に対して耐性を獲得する等の問題があり、特に先行して臨床応用されたラミブジンに対する耐性ウイルスが比較的早期にエンテカビル (ETV) に耐性を獲得することが知られていることから、既存の薬剤に耐性となったウイルスにも高い活性を発揮し、且つ耐性プロフィールが全く異なるなどの新規化合物の開発が必須である。本研究ではまず、研究代表者がこれまでの抗 HIV 剤の開発においてデザイン・合成し、既に得ている未発表のヌクレオシド誘導体の *in vitro* における抗 HIV-1 活性および抗 HBV 活性を測定、また同時に

細胞毒性に関して評価を行う。これと平行して本研究プロジェクトの新規化合物のデザイン・合成を担当する分担研究者より供給される新規化合物についても同様に評価を行う。その中から細胞毒性が良好で且つ ETV 等の既存の薬剤と同等かより強力な活性を有する薬剤を同定し、そのような化合物については更に薬剤耐性 HBV に対する活性を測定、また既存の薬剤と比較して耐性ウイルスが発現し易いかどうか (genetic barrier) 等の検討も行う。また抗ウイルス活性等の一連のデータについては、合成を行なう分担研究者に速やかにフィードバックし更に化合物の再デザイン・最適化を進める。

B. 研究方法

1) 新規化合物の抗 HIV-1 活性の評価：逆転写酵素は HBV がウイルス RNA から cDNA を合成するために必須の酵素であり、また

レトロウイルスである HIV も逆転写酵素を有する。これまでの研究より、抗 HIV 剤として使用されてきた 3TC (ラミブジン) が抗 HBV 逆転写酵素阻害活性を有することが分かり、抗 HBV 剤として臨床で使用されている。このことから抗 HBV 逆転写酵素阻害活性と抗 HIV 逆転写酵素阻害活性はある程度の相関があると考えられている。また HIV と HBV の

重感染例では両活性の情報は治療を行なう上で必須である。化合物の活性評価に関して、抗 HIV 剤においては MTT assay によるハイスループットの測定系が既に存在することから、まず HIV に対する活性を測定し、ある程度の活性を示す化合物について抗 HBV 活性を測定する。方法は、T 細胞株である MT-2 細胞と実験室野生 HIV-1 株である HIV-1_{LAI} を用いた MTT assay により行なった。新規化合物を段階希釈し、次いで 2×10^4 /ml の MT-2 細胞と 100 TCID₅₀ の HIV-1_{LAI} を添加した。一週間培養後、MTT 試薬を添加し、570 nm の吸光度を測定し、IC₅₀ 値を算出した。

2) 化合物の細胞毒性の検討：細胞は MT-2 細胞を用い、MTT assay にて評価を行なった。新規化合物を段階希釈し、次いで 2×10^4 /ml の MT-2 細胞を添加、一週間培養した。MTT 試薬を添加し、570 nm の吸光度を測定し、CC₅₀ 値を算出した。

3) 新規化合物の抗 HBV 活性の評価：10%FCS 加 DMEM にて新規化合物を段階希釈し、持続的に HBV を産生する HepG2.2.15 細胞を 1×10^5 /ml で播種した。培養 5 日後、培養上清中の HBV DNA を QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) で抽出・精製し、その 50 ng 中の HBV DNA を real-time PCR 法

で検出した (LightCycler, Roche)。Primer は HBV の逆転写酵素遺伝子内に設計、試薬は SYBR Green を用いた。この方法を用いて、現在抗 HBV 剤として使用されている ETV とテノフォビル (TDF) の抗 HBV 活性を測定した。図 1 に示すように、各薬剤濃度依存性に抗 HBV 活性が見られた。

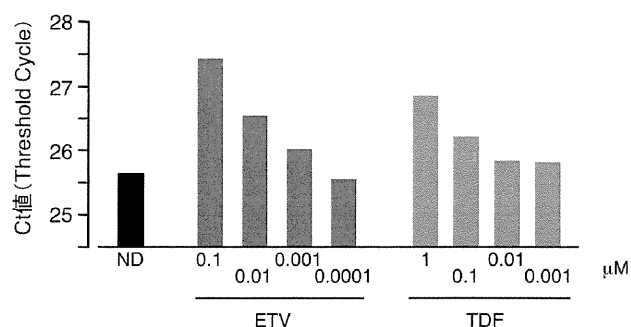


図 1. Real-time PCR 法による抗 HBV 活性の検討 ETV と TDF を段階希釈し、HepG2.2.15 細胞を播種、培養 5 日後培養上清中の DNA を抽出し、HBV DNA を real-time PCR 法にて測定した。結果、濃度依存性に抗 HBV 活性が見られた。

ND: No drug

(倫理面への配慮)

本研究は、株化された細胞株と実験室株の HIV-1 を用いているため倫理面への特別な配慮は必要が無いと判断した。

C. 研究結果

研究代表者の満屋博士のグループがこれまでに HIV に対する核酸系の逆転写酵素阻害剤 (NRTI) として開発し、保存されていた 30 種類の NRTIs (分子量: 239~455) の抗 HIV-1 活性を評価した。結果、24 種類は IC₅₀ 値が 1 μM 以上であったが、6 種類は 0.028~0.87 μM (AZT: 0.052 μM) を示した。またこれらの化合物の細胞毒性については、5 種類の CC₅₀ 値が 100 μM 以下を示し (3~48 μM)、うち 3 種類は抗 HIV-1 活性が見られた化合物であった。

また本研究班の分担研究者である井本博

士のグループにより合成された 9 種類の化合物についても同様に解析し、抗 HIV-1 活性について 1 種類が 24 μM の IC_{50} 値を示した (残り 8 種類はいずれも 100 μM 以上)。またこの一連の化合物の細胞毒性は 100 μM では認められなかった。更に抗 HBV 活性について real-time PCR 法にて検討したところ、ETV の 1 μM よりも高い活性は、各化合物 100 μM では見られなかった (図 2)。

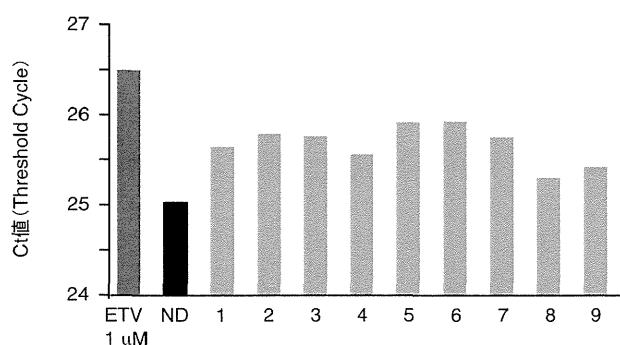


図 2. 新規に合成された化合物の抗 HBV 活性の検討
新規に合成された 9 種類の化合物について 100 μM の抗 HBV 活性を測定した。ETV1 μM と薬剤非存在下 (ND) をコントロールとした。

D. 考察

満屋博士のグループにより合成、保存されていた 30 種類のヌクレオシド誘導体 (NRTIs) については、抗 HIV-1 活性が見られたものが 6 種類、また 5 種類の化合物について細胞毒性が見られた。これらの化合物については化学構造と抗 HIV-1 活性および細胞毒性との関連性は不明である。この 30 種類の NRTIs より抗 HIV-1 活性が見られたものおよび活性は見られないがユニークな構造を有するものの観点より 7 種類を選択し、本研究プロジェクトの研究分担者である田中博士のグループにより抗 HBV 活性の検討が行なわれたが、この 7 種類については活性を認めなかった。また井本博士

のグループにより合成された 9 種類の化合物については、1 種類が抗 HIV-1 活性を認めたものの、いずれも既存の薬剤に匹敵するほどの高い抗 HBV 活性は認められなかった。

E. 結論

39 種類の新規化合物について抗 HIV-1 活性、抗 HBV 活性および細胞毒性について検討、評価を行った。既存の抗 HIV 剤である AZT と同等かそれ以上の抗 HIV-1 活性を示すものが見られたが、いずれも高い抗 HBV 活性を同定するに至らなかった。本研究で得られたデータは、新規化合物の合成を担当する分担研究者へフィードバックされ、今後の新規化合物のデザイン、合成に有益な情報を齎すものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Amano M, Tojo Y, Salcedo-Gómez PM, Campbell JR, Das D, **Aoki M**, Xu CX, Rao KV, Ghosh AK, Mitsuya H. GRL-0519, A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor (PI), Potently Suppresses The Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. In press.
2. **Aoki M**, Danish ML, Aoki-Ogata H, Amano H, Ide K, Koh Y, Mitsuya H. Loss

of protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) is associated with HIV-1 acquisition of resistance to TPV. *J. Virol.* 86(24):13384-13396. 2012.

2) 学会発表（国際学会のみ記載）

1. **M Aoki**, H Hayashi, H Aoki-Ogata, C D. Martyr, A K. Ghosh, H Mitsuya. GRL-01511A: a Novel HIV-1 Protease Inhibitor Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1s. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR). April 16-19, 2012, Sapporo, Japan.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yarchoan, R. and Mitsuya, H.	Development of the first AIDS drugs: AZT and other dideoxynucleosides.	S.F.J. Le Grice and M. G. Goffette, eds.	Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase: A Bench-to-Bedside Success	Springer Publishing	New York	2013	in press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Amano, M., Tojo, Y., Salcedo-Gómez, Pedro. M., Campbell, J.R., Das, D., Aoki, M., Xu, C-X, Rao. K.V., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H.	GRL-0519, a novel oxatricyclic nonpeptidic HIV-1 protease inhibitor (PI), potently suppresses the replication of a wide spectrum of multi-pi-resistant HIV-1 variants in vitro.	<i>Antimicrob. Agents Chemother.</i>	57 (5)	in press	2013
Sohl, C.D., Kasiviswanathan, R., Kim, J., Pradeep, U., Schinazi, R.F., Copeland, W.C., Mitsuya, H., Baba, M., Anderson, K.S.	Balancing antiviral potency and host toxicity: identifying a nucleotide inhibitor with an optimal kinetic phenotype for HIV-1 reverse transcriptase.	<i>Mol Pharmacol.</i>	82	125-33	2012
Murphey-Corb, M., Rajakumar, P., Michael, H., Nyaundi, J., Didier, P., Reeve, A.B., Mitsuya, H., Sarafianos, S.G., and Parniak MA.	Response of simian immunodeficiency virus to the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine in vitro and in vivo.	<i>Antimicrob Agents Chemother.</i>	56	4707-12	2012
Ghosh, A.K., Chapsal, B.D., Steffey, M., Agniswamy, J., Wang, Y.F., Anderson, M., Weber, I.T., Mitsuya, H.	Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuran-yl urethanes: design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors.	<i>Bioorg Med Chem Lett</i>	22	2308-11	2012
Ghosh AK, Anderson D, Weber IT, Mitsuya H.	Enhancing protein backbone binding—a fruitful concept for combating drug-resistant HIV.	<i>Angew Chem Int Ed Engl</i>	51	1778-802	2012
Sohl, C.D., Singh, K., Kasiviswanathan, R., Copeland, W.C., Mitsuya, H., Sarafianos, S.G., Anderson, K.S.	Mechanism of interaction of human mitochondrial DNA polymerase γ with the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine indicates a low potential for host toxicity.	<i>Antimicrob Agents Chemother.</i>	56	1630-4	2012

Ndongwe TP, Adedeji AO, Michailidis E, Ong YT, Hachiya A, Marchand B, Ryan EM, Rai DK, Kirby KA, Whatley AS, Burke DH, Johnson M, Ding S, Zheng YM, Liu SL, Kodama E, Delviks-Frankenberry KA, Pathak VK, Mitsuya H, Parniak MA, Singh K, Sarafianos SG.	Biochemical, inhibition and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase.	<i>Nucleic Acids Res.</i>	40	345-59	2012
Michailidis E, Singh K, Ryan EM, Hachiya A, Ong YT, Kirby KA, Marchand B, Kodama EN, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG.	Effect of translocation defective reverse transcriptase inhibitors on the activity of n348, a connection subdomain drug resistant HIV-1 reverse transcriptase mutant.	<i>Cell. Mol. Biol.</i>	58	187-95	2012
Maeda, K., Das, D. Nakata, H., and Mitsuya H.	CCR5 inhibitors: emergence, success, and challenges.	<i>Expert Opin Emerging Drugs</i>	17	135-45	2012
Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kraubingh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, Otagiri M.	Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment.	<i>Biochim Biophys Acta.</i>	1830(4)	2917-23.	2013
Taguchi K, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M.	Pharmaceutical aspects of the recombinant human serum albumin dimer: structural characteristics, biological properties, and medical applications.	<i>J Pharm Sci.</i>	101 (9)	3033-46.	2012
Ishima Y, Chen D, Fan J, Maeda H, Minomo A, Kragh-Hansen U, Koi T, Maruyama T, Otagiri M.	S-Nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects.	<i>Bioconjug Chem.</i>	23 (2)	264-71.	2012
Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajima K, Misumi S, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M.	Characterization of the hepatic cellular uptake of $\alpha(1)$ -acid glycoprotein (AGP), part 1: a peptide moiety of human AGP is recognized by the hemoglobin β -chain on mouse liver parenchymal cells.	<i>J Pharm Sci.</i>	101 (9)	1599-606.	2012
Shimbo T, Miyaki K, Song Y, Masaki N, Study Group Developing Nationwide Database of Hepatitis Japan.	The effectiveness and tolerability of combined treatment with peginterferon alpha-2a and alpha-2b and ribavirin in the treatment of patients with chronic hepatitis C: Results based on the nationwide hepatitis registry in Japan	<i>Value in Health</i>	15 (7)	A326	2012

Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, <u>Enomoto N.</u>	The serum RANTES level influences the response to pegylated-interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.	<i>Hepatology Res.</i>	in press		2012
Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, <u>Enomoto N.</u>	Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection.	<i>J Med Virol.</i>	84 (9)	1360-8.	2012
Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, <u>Enomoto N.</u> , de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K.	Inhibition of Both Protease and Helicase Activities of Hepatitis C Virus NS3 by an Ethyl Acetate Extract of Marine Sponge <i>Ampelodesma</i> sp.	<i>PLoS One.</i>	7 (11)	e48685.	2012
Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, <u>Enomoto N.</u>	IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication.	<i>J Viral Hepatitis.</i>	in press		2012
Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, <u>Enomoto N.</u>	Comprehensive analysis for viral elements and IL28B polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in hcv-1b infection.	<i>Hepatology.</i>	56(5)	1611-201221	2012