

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

HBV感染を阻害する低分子化合物のスクリーニング

長田 裕之（理研 環境資源科学研究センター 副センター長）

研究要旨：微生物や植物の二次代謝産物、およびその誘導体を中心に収集した化合物ライブラリーを用いて新規抗HBV薬を探索する。この探索においては、HBVの感染初期過程を高感度に検出できる感染モデル系を利用し、従来の治療薬（インターフェロンや核酸アナログ）とは作用点が異なる新たなタイプのHBV治療薬の開発を目的とする。研究前期（H24-25）は微生物生合成遺伝子改変技術やフラクシオンライブラリー、表現型スクリーニング基盤を利用し、新規天然化合物の創製を行う。研究中期（H26-）からHBV様擬粒子を用いたスクリーニングを実施し、阻害活性を示す化合物をバイオプローブとしたケミカルバイオロジー研究を展開する。これら一連の研究を通じて、HBV治療に資する候補化合物の創製と新規創薬標的（HBV受容体など）の提示を目指す。

A. 研究目的

HBV感染阻害物質の探索を実施するためには、多様性に富んだケミカルライブラリーが必要である。またそのようなライブラリー構築には、質の高い化合物群と構造や活性情報が充実したデータベースやデータマイニング技術、などの創薬基盤の整備が不可欠である。本年度は、微生物生合成遺伝子改変技術やフラクシオンライブラリーを用い、天然化合物の収集を加速する。また細胞表現型を利用して薬剤の作用機序解析を実施し、HBV感染阻害薬探索に資する化合物ライブラリーの整備・拡充を行う。

B. 研究方法

化合物ライブラリーの整備を目的とし、天然化合物の網羅的な収集と細胞形態変化を指標とした作用機序解明を計画した。では、生合成遺伝子改変微生物やフラクシオンライブラリー、天然化合物データベース NPPlot を用いて新規天然化合物を探索した。では細胞形態変化データベース「モルフォベース」を利用し、で取得した天然化合物の作用機序を検証した。また計画に先行してHBV様擬粒子を用いたパイロットスクリーニングを実施した（実施場所：国立国際医療研究センタ

ー）。NanoLuc 遺伝子を導入した組換えHBV粒子をPXB細胞に感染させ、理研天然化合物バンク NPDepo から提供された標準化合物ライブラリー（作用既知薬剤80種）のウイルス感染阻害活性を評価した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組み換え生物等の使用に際しては、理研の定める細則や指針を遵守した。

C. 研究結果

天然化合物の網羅的な収集

微生物代謝産物を系統的に収集したフラクシオンライブラリーと天然化合物データベース NPPlot を用いた新規天然化合物探索を実施し、ピロリジジノン系新規代謝産物ピロリジラクトン（Nogawa et al）や新規キノマイシン類縁体（Lim et al）など、様々な新規物質を取得した。

ピロリジラクトンの作用機序解析

細胞形態変化データベース「モルフォベース」を用い、ピロリジラクトンの作用メカニズムを解析した。ピロリジラクトンはトリプシン活性を選択的に阻害する新たなタイプのプロテアソーム阻害剤であった（Futamura et al）。

HBV 擬粒子を用いたスクリーニング

NPDepoから提供された標準化合物についてウイルス感染阻害活性を評価した。その結果、タンパク質合成やDNA合成阻害剤、微小管重合阻害剤、抗ウイルス物質を含む11化合物で顕著な活性が見られた。HBVの生活環を考えると、ヒットが予想される化合物群であり、本評価系がワークしていることが示唆された。

#### D. 考察

研究前期にHBV感染阻害薬の探索源に資する化合物を3万種類以上整えることをマイルストーンとしていた。今年度までに様々な新規微生物代謝産物を見い出すと共に植物エキスのフラクションライブラリー作製も順調に進み、計画通りにサンプルの準備を整えた。さらにHBV擬粒子を用いた評価系の検証を実施し、大規模スクリーニングを開始するめどをつけた。

#### E. 結論

生合成遺伝子改変微生物やフラクションライブラリーからの新規代謝産物取得、微生物培養物や植物エキスのフラクションライブラリー作製により、化合物ライブラリーを整備・拡充し、抗HBV薬のスクリーニング体制を整えた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nogawa T, Kawatani M, Uramoto M, Okano A, Aono H, Futamura Y, Koshino H, Takahashi S, Osada H. Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus. *J Antibiot*, 66: 621-3, 2013
- 2) Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Nogawa T, Osada H. Identification of a molecular target of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic profiling systems. *ChemBioChem*, 14: 2456-63, 2013
- 3) Lim CL, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Hongo Y, Nakamura T, Koshino H, Takahashi

S, Ibrahim D, Osada H. RK-1355A and B, novel quinomycin derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library based on NPPlot screening. *J Antibiot*, in press. doi: 10.1038/ja.2013.144.

##### 2. 学会発表

- 1) 長田裕之, 二村友史, 室井誠「細胞形態とプロテオーム変化を指標にした新規抗がん剤の分指標的予測」第17回日本がん分子標的治療学会学術集会, 京都, 6月, 2013
- 2) 川谷誠, 青野晴美, 二村友史, 室井誠, 渡辺信元, 長田裕之「糸状菌由来新規抗がん活性物質 pyrrolizilactone の標的同定」第17回日本がん分子標的治療学会学術集会, 京都, 6月, 2013
- 3) Lim CL, 野川俊彦, 浦本昌和, 岡野亜紀子, 本郷やよい, 中村健道, 越野広雪, 高橋俊二, Ibrahim D, 長田裕之「Isolation of novel bioactive compounds from fraction library of microorganisms based on NPPlot screening」第55回天然有機化合物討論会, 京都, 9月, 2013
- 4) Osada H. "Isolation of New Microbial Metabolites for Natural Product Depository (NPDepo)" 2<sup>nd</sup> Annual Conference ICBS2013, 京都, 10月, 2013
- 5) Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Osada H. "Development and utilization of a cell morphology database, MorphoBase, for drug target identification" AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston, Oct 2013.
- 6) 長田裕之「抗がん剤のケミカルバイオロジー」第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月, 2013
- 7) 二村友史, 川谷誠, 室井誠, 青野晴美, 長田裕之「モルフォベースを利用した抗がん剤探索: 特異な線状構造体を誘導する NPD4152 の発見」第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月, 2013

#### H. 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: なし