

染性の確認を現在も進めている。また、epigenomic modulator を応用し、新規天然物を高効率で分離し、HBV 活性を測定している。

NTCP に関しては、MT-2 である程度の HBV の感染を支持するものの、productive な感染には至っていない。もともと MT-2 は HBV や HCV の感染を低レベルで支持することから、肝由来細胞に加えて、リンパ球系の白血病細胞全般にわたり、NTCP 遺伝子を導入し、その感染性を確認しようとしている。また、細胞側の改善に限らず、ウイルス側の adaptation の可能性を上げるために、HepG2.2.15.7 細胞と共培養を行い、リンパ球系細胞により適合したウイルスを拾い上げる確立を上げることを現在も行っている。

Epigenomic modulator を応用した新規天然物の回収法が確立され、現在、分子量 1000 以下、構造が新規である約 100 程度の天然物を入手した (Figure 2)。その抗 HBV 活性を測定しているが、未だヒット薬剤は見出されていない。この天然物ライブラリーから、HIV に特的な侵入阻害剤、分子量 420 を見出している。CXCR4 指向性、CCR5 指向性の両方に効果を示すことから、これらのアンタゴニストではないと考えられる。また HSV などのヘルペス系には効果を示していない。今後も、このような新規ライブラリーのスクリーニングを継続し、来年度はリードにつながるヒット誘導体を見出して行く予定である。

E. 結論

HBV レセプター候補の NTCP 浮遊細胞に導入し、HBV の感染性等を検討中であり、耐性ウイルスの誘導やそのスクリーニングシステムに応用したい。また、感染などのストレス下でより効率的に産生される新規天然物を分離・精製し、構造を決定させたところ、新規骨格を有する天然物を多数得ることが可能であった。これらの新規天然物を HepG2.2.15 細胞の系でスクリーニングしている。

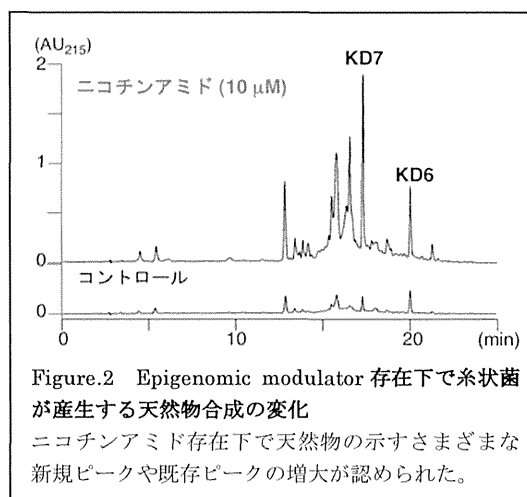


Figure.2 Epigenomic modulator 存在下で糸状菌が産生する天然物合成の変化
ニコチンアミド存在下で天然物の示すさまざまな新規ピークや既存ピークの増大が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hiroto Nakata, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy* 19:179-189, 2014.
- 2) Eleftherios Michailidis, Andrew D. Huber, Emily M. Ryan, Yee T. Ong, Maxwell D. Leslie, Kayla B. Matzek, Kamalendra Singh, Bruno Marchand, Ariel N. Hagedorn, Karen A. Kirby, Lisa C. Rohan, Eiichi N. Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) inhibits HIV-1 reverse transcriptase with multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 289:24533-24548, 2014

- 3) Shigeyoshi Fujiwara , Hiroshi Kimura, Ken-ichi Imadome, Ayako Arai, Eiichi Kodama, Tomohiro Morio, Norio Shimizu, Hiroshi Wakiguchi. Current Studies on Chronic Active Epstein-Barr virus Infection in Japan. *Pediatrics International*, **54**: 159-166, 2014
- 4) Tetsuro Hisayoshi, Mayu Shinomura, Kanta Yokokawa, Ikumi Kuze, Atsushi Konishi, Kumi Kawaji, Eiichi N. Kodama, Keishi Hata, Saori Takahashi, Satoru Nirasawa, Kiyoshi Yasukawa. Inhibition of the DNA polymerase and RNase H activities of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai) and *Petasites japonicus* (Fuki) components. *Journal of Natural Medicines*, in printing 2015

2. 学会発表

- 1) Zhe Li, Karen Kirby, Bruno Marchand, Michailidis Eleftherios, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, Stefan Sarafianos. Structural Basis of Inhibition and Resistance Mechanism to EFdA, a Highly Potent NRTI. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, Washington, Feb. 23-26, 2015

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

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

新規抗HBV薬の1次・2次評価に関する研究

研究分担者 田中 靖人 名古屋市立大学・大学院医学研究科 教授

研究要旨： B型肝炎ウイルス (HBV) の根絶には、HBV薬剤耐性株に対して治療効果を示す創薬開発が急務である。そこで新規の核酸アナログ候補化合物の探索を目的とし、1) *in vitro*および2) *in vivo*を用いた薬剤感受性評価を行った。1) 1.24倍長HBV Genotype Ce野生株とエンテカビル (ETV) 耐性株をTransfectionしたHuh-7細胞へ候補化合物 (7種類) を添加し、細胞内HBV複製に対する抑制能をSouthern Blotting法により検討した。その結果、化合物 SK14-276では野生株、ETV耐性株ともにテノホビル (TFV) と比較して低濃度でウイルス複製を抑制した。次に、2) HBV Genotype Ce野生株とETV耐性株を感染させたキメラマウスにSK14-276を投与し、抗HBV作用を検討した。SK14-276を1 mg/kg/dayで投与した結果、野生株感染群では、血清中HBV-DNA量を抑制したものの、体重減少、ヒトアルブミン (hAlb) 量の低下、ALT値の上昇がみられた。また、ETV耐性株感染群についても同様の傾向がみられた。現在、キメラマウス由来の検体を用いて、化合物 SK14-276による肝障害の要因を検討中である。

研究協力者：村上周子
名古屋市立大学大学院医学研究科
特任助教

A. 研究目的

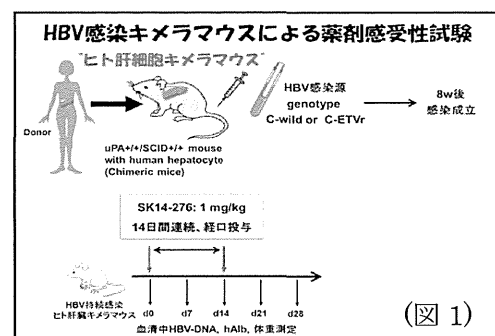
これまでに我々は、当研究室にて確立した*in vitro*によるSouthern blottingを用いた薬剤感受性評価ならびに、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた*in vivo*によるHBV感染実験を展開し、抗HBV効果を示す候補化合物のスクリーニングを行ってきた。本研究では、HBV野生株および薬剤耐性株のHBV複製効率に対して抑制作用を示す新規核酸アナログ候補化合物の探索を行い、新規治療薬を開発することを目的としている。

B. 研究方法

1) 現在臨床で主流とされる核酸アナログ構造を基軸に、新たに合成された核酸アナログ候補化合物 7 種類 (SK14-072、SK14-244、SK14-276、SK14-330)

の抗HBV作用を検討するため、1.24倍長HBV複製モデルの野生株とETV耐性株1種類 (genotype Ce) をトランスフェクトしたHuh-7細胞に各化合物を添加し、細胞内のHBV複製に与える影響をSouthern blottingにより評価した。

2) 1)の結果、細胞内HBV複製に対して抑制能を示したSK14-276を、HBV野生株とETV耐性変異株を感染させたキメラマウスへ投与し (1 mg/kg/day)、抗HBV効果や肝傷害の有無を検討した (図1)。



(倫理面への配慮)

遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

1) Southern blotting の結果、SK14-276 は他の化合物と比較して HBV Genotype Ce 野生株、ETV 耐性株ともに、低濃度でウイルス複製を抑制し、且つ、現在臨床で使用されるテノホビル (TFV) と比較しても低濃度で抑制した。(TFV/IC50: 野生株 3498.1 nM、ETV 耐性株 28226.8 nM、SK14-276/IC50: 野生株 599.3 nM、ETV 耐性株 9598.7 nM)。その他、6 種化合物の IC50 は以下のとおりである。

TOM-II-20/IC50: 野生株 563.5 nM、ETV 耐性株 ND (not detected)、KMA-XL-117/IC50: 野生株 1.5-4.0 nM、ETV 耐性株 >1000 nM、

SK 13-210a/IC50: 野生株 275.7 nM、ETV 耐性株 4566.3 nM、(ただし高毒性のため試験から除外。)

SK 14-072/IC50: 野生株 >10000 nM、ETV 耐性株 >10000 nM、

SK14-244/IC50: 野生株 1370.3-4051.6 nM、ETV 耐性株 ND、

SK14-330/IC50: 野生株 205.9 nM、ETV 耐性株 ND。

2) HBV Genotype Ce 野生株と ETV 耐性株を感染させたキメラマウスに

SK14-276 を 1 mg/kg/day で投与し、抗 HBV 作用を検討した。その結果、野生株感染群では血清中 HBV-DNA 量を抑制したものの、体重減少、ヒトアルブミン (hAlb) 量の低下、ALT 値の上昇がみられた。また、ETV 耐性株感染群についても同様であり、野生株、ETV 耐性株ともに、化合物投与から 14 日までに全個体が死亡した。

D. 考察

7 種類の新規核酸アナログ候補化合物のうち、*in vitro* 試験により抗 HBV 作用の認められた SK14-276 を、HBV 野生株と ETV 耐性株を感染させたキメラマウスに投与した。その結果、野生株、ETV 耐性株感染群ともに血清 HBV-DNA

量を抑制したものの ALT 値が上昇し、肝障害が引き起こされた可能性が考えられた。

現在、キメラマウス由来の検体 (血液、肝臓) を用いて、化合物 SK14-276 による肝障害の要因を検討中である。

E. 結論

HBV に対する創薬開発に向けて、*in vitro* による Southern blotting 試験および、ヒト肝細胞キメラマウスの肝炎モデルは、薬剤感受性評価に非常に有用である。今後、これらの系を用いて薬剤スクリーニングや、HBV 感染キメラマウスを用いた薬剤の抗 HBV 作用、毒性などの有害事象に対する検討も行いたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wong DK, Kopaniszen M, Omagari K, **Tanaka Y**, Fong DY, Seto WK, Fung J, Huang FY, Zhang AY, Hung IF, Lai CL, Yuen MF. Effect of hepatitis B virus reverse transcriptase variations on entecavir treatment response. *J Infect Dis.* 2014;210(5):701-7.
2. Isogawa M, **Tanaka Y**. Immunobiology of hepatitis B virus infection. *Hepatol Res.* 2015;45(2):179-89.
3. Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, **Tanaka Y**. Postexposure Prophylactic Effect of Hepatitis B Virus (HBV)-Active Antiretroviral Therapy against HBV Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(2): 1292-8.
4. Matsumoto A, Yatsushashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda

- T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, **Tanaka Y**, Umemura T, Tanaka E. Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleoside/nucleotide analog treatment in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res*. 2015 in press.
5. 日下部篤宣, **田中靖人**, 飯尾悦子, 村上周子, 松浦健太郎, 新海登, 宮木知克, 藤原圭, 野尻俊輔, 折戸悦朗, 城卓志. B型・D型肝炎ウイルス重複感染による肝障害に対してペグインターフェロンが有効であった1例. *肝臓*. 2014; 55(11): 653-660.
2. 学会発表
1. Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Iijima S, Hayashi S, Omagari K, Isogawa M, **Tanaka Y**. Evaluating hepatitis B virus lifecycle and screening anti-viral drugs using primary human hepatocytes isolated from chimeric mice. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep.3-6, 2014. Los Angeles.
2. Matsui T, Kang JH, Tanaka K, Nagai K, Tomonari A, Maguchi H, **Tanaka Y**. Quantified HBV ccc DNA in liver predicts changes in HBV markers during pegylated interferon α 2a treatment for chronic hepatitis B. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov.20-21, 2014. Hiroshima.
3. 松居剛志, 姜貞憲, **田中靖人**. B型慢性肝炎に対するペグインターフェロン療法の治療効果に関連する遺伝要因. 第100回日本消化器病学会総会. 平成26年4月23日～26日. 東京.
4. 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, 飯島沙幸, 飯尾悦子, 松波加代子, 新海登, 松浦健太郎, 五十川正記, **田中靖人**. 大量調整可能なヒト肝細胞を用いたHBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日～30日. 東京.
5. 松波加代子, 新海登, **田中靖人**. 当院におけるB型慢性肝炎に対する治療戦略～テノホビル (TDF) の有用性. 第40回日本肝臓学会東部会. 平成26年11月27日～28日. 東京.
- 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

前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験に関する研究

～ 新規抗 HBV 感染症治療薬の臨床開発に向けて ～

分担研究者：

伊藤 俊之（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部長）

研究協力者：

川崎 敏克（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部治験管理室長）

近藤 美紀（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部副看護師長）

小早川雅男（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部臨床研究相談室長）

松下 由美（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究支援部臨床研究推進室長）

安藤 幸恵（独立行政法人国立国際医療研究センター臨床研究センター中央事務局）

北川 明（独立行政法人国立国際医療研究センター開発医療部探索的臨床試験支援室長）

菊池 嘉（独立行政法人国立国際医療研究センター副臨床研究支援部長）

研究要旨

本プロジェクトにおいて開発予定の新規抗 HBV 感染症治療薬候補として最適化した化合物を用いて、前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験などの臨床開発を円滑に実施する。

A. 研究目的

本プロジェクトにおいて開発予定の新規抗 HBV 感染症治療薬候補として最適化した化合物を用いた前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験などの臨床開発を実施するにあたり、まず当施設を中心とした臨床試験実施体制並びに実施支援体制を確立・整備した後、各試験を円滑に実施することを目的とする。

B. 研究方法

リード化合物の最適化による医薬品候補化合物獲得に至るまで、あと 1～2 年を要すると推察される。それまでの期間、①前臨床試験の実施に向けた各種調整、②臨床試験実施並びに実施支援体制の確立・整備等を行い、リード化合物獲得後の前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験などの臨床開発の円滑な実施に備える。なお、医薬品候補化合物獲得の進捗状況に鑑み、今年度は②を中心に研究を行った。

1) 臨床試験実施体制並びに実施支援体制の確立・整備

- (1) 臨床試験プロトコール作成支援体制
 - ①「臨床研究プロトコール作成ユニット（以後、プロトコール作成ユニット）」の試験的運用
 - (2) 多施設共同試験実施体制
 - ①「国立国際医療研究センター臨床研究センター中央事務局（以下、NCGM 中央事務局）」の試験的運用
 - ②コーディネーター部門の整備
 - (3) 第 I 相臨床試験（以下、Phase I）病棟
 - ①院内各部門間調整
 - ②病棟整備、病棟スタッフ教育等

(倫理面への配慮)

まず動物実験などで新規抗 HBV 感染症治療薬候補として最適化された化合物の安全性を十分に確認するが、動物実験においては、必要最小限数の動物使用となるよう配慮する。

さらに volunteers については、国立国際医療研

究センター臨床研究センター、研究組織内の各大学医学部内における該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請し認可された後で、ヘルシンキ宣言や該当の法令や倫理指針等に則り、研究対象者に対する人権擁護に配慮して、臨床試験の具体的な内容及び考えられる副作用の危険性等について文書による説明を行い、同意取得（インフォームド・コンセント）が得られた後に臨床試験を開始する。

C. 研究結果

1) 臨床試験実施体制並びに実施支援体制の確立・整備

(1) 臨床試験プロトコール作成支援体制

①プロトコール作成ユニットの試験的運用
 国立国際医療研究センター（以下、NCGM）臨床研究センター内に、臨床医、生物統計家、データセンター長やメディカルライター等を主要メンバーとして、H24 年度に組織横断的に構成されるプロトコール作成ユニットを設置した。プロトコール作成ユニットは、週 1 回の打ち合わせやメールでのやり取りを通じて、研究者と協議しつつ、プロトコール作成を全面的に支援している。プロトコール作成ユニットは、これまでその支援の対象を、ICH-GCP レベルでの実施を求められる医師主導治験と先進医療に限定していたが、施設内部の研究者から自己の医師主導臨床研究のプロトコール作成支援の要請が数多くなされてきたことから、平成 26 年度から支援対象を医師主導臨床研究にまで拡大した。それに伴い、名称を「治験及び先進医療プロトコール作成ユニット」から「臨床研究プロトコール作成ユニット」に変更し、メンバーに治験管理室長と NCGM 中央事務局員を追加した。今年度、プロトコール作成ユニットは計 6 件のプロトコール作成（改訂作業を含む）を支援した（表 1）。

表 1. 作成支援プロトコール（平成 26 年度）

医師主導治験	①胃静脈瘤に対するモノエタノールアミンオレイン酸を使用したバルーン閉塞下逆行性静脈閉塞術(B-RTO)に関する医師主導治験
--------	---

先進医療	①FDG-PET/CT の不明熱診断への応用ーガリウム SPECT との比較研究（先進医療 B） ②腹膜偽粘液腫に対する減量切除術と周術期腹腔内化学療法に関する前向き研究（先進医療 B） ③全自動遺伝子解析装置を用いた、グラム陰性桿菌血症例における迅速菌名同定・耐性遺伝子同定（先進医療 A）
臨床研究	①エボラ出血熱患者またはエボラ出血熱が強く疑われる患者を対象とするファビピラルの有効性及び安全の検討 ②ファビピラルによるエボラ出血熱発症予防効果及び安全性の検討

(2) 多施設共同試験実施体制

①NCGM 中央事務局の試験的運用

H24 年度に、NCGM 臨床研究センター臨床研究支援部内に、NCGM 中央事務局を設置し、事務局員として専任の薬剤師を配置した。当施設は、多施設共同試験に対応する中央事務局としての経験が必ずしも十分とは言えないため、本格稼働時の安定的運用を目的として、外部に一部業務委託（事務局業務支援等）している。

今年度は、これまで支援を実施してきた医師主導治験（多施設共同）1 件、先進医療 B（多施設共同）1 件、先進医療 B（単施設）1 件の、合計 3 件の臨床研究が試験開始となった。NCGM 中央事務局は、引き続き試験事務局業務の支援にあっている（表 2）。

表 2. 試験事務局業務を支援した臨床試験（平成 26 年度）

医師主導治験	①胃静脈瘤に対するモノエタノールアミンオレイン酸を使用したバルーン閉塞下逆行性静脈閉塞術(B-RTO)に関する医師主導治験（多施設共同）
--------	--

先進医療 B	①FDG-PET/CT の不明熱診断への応用ーガリウム SPECT との比較研究（多施設共同） ②腹膜偽粘液腫に対する減量切除術と周術期腹腔内化学療法に関する前向き研究（単施設）
--------	--

②コーディネーター部門の整備

従前は企業治験を担当するコーディネーターと、臨床研究を支援するコーディネーターが別部署に所属し、各々が独立して業務を行っていたが、業務の効率化やノウハウの共有等を目的として、平成 25 年度 4 月に両者を治験管理室に一元的に所属する臨床研究コーディネーター

(CRC) として体制整備した。これまで臨床研究を支援してきた CRC は ICH-GCP に対する理解が比較的浅かったが、企業治験の OJT によってより深い理解が得られ、業務の質がより向上している。

(3) Phase I 病棟

前臨床試験は当施設内で実施するのではなく、外部委託を予定していることから、当施設内で実施する最初の試験は Phase I となる。そこで、当施設内で Phase I を実施できる体制整備から着手することとした。H26 年 3 月に関係者で東京大学医学部附属病院の Phase I 病棟の見学を行い、検討の参考とした。

① 院内各部門間調整

病院長、救急部門、看護部、薬剤部、検査部門、施設課等との間で調整が進行中で、Phase I 病棟の設置場所並びに職員配置が議論の中心となっている。ごくわずかながらも Phase I 実施実績を有する新病棟 16 階と、新外来棟内の化学療法室が新たな設置場所の候補として挙げられており、現在も関係者間での調整を継続している。

② 病棟整備、病棟スタッフ教育等

Phase I を実施するにあたり、病棟で必要となる物品類の整備や病棟スタッフの教育を要するが、時間的に若干の余裕があることから、まだ本格的には取り掛かかれてはいない。

D. 考察

1) 臨床試験実施体制並びに実施支援体制の確立・整備

(1) 臨床試験プロトコール作成支援体制

①プロトコール作成ユニットの試験的運用

今後、ユニット内の相互連携の強化や外部からの意見聴取などにより、更に質の高い臨床試験プロトコールの作成を目指す。また、来年度以降、教育的効果をも期待して、若手医師（卒後 5～10 年程度）複数名のプロトコール作成ユニットへの参画を検討している。なお、臨床試験プロトコール作成支援件数が増加した場合、メディカルライター等の人員増が必要となる可能性がある。

(2) 多施設共同試験実施体制

①NCGM 中央事務局の試験的運用

これまで NCGM 中央事務局が支援してきた複数の臨床研究が試験開始となった。実務経験をかなり積んできたこともあり、今後は外部への業務委託なく本格稼働時の運用が可能となる見込みである。但し、対応する多施設共同試験の件数が増加した場合、事務局員の人員増が必要となる可能性がある。また、現在部分的である中央倫理委員会としての機能を、将来的には NCGM 中央事務局が運営することによって、完全に機能させることを検討している。更に、多施設を対象とすることから、倫理審査の IT 化（ペーパーレス化）による効率的な運営の実現を目指したい。

②コーディネーター部門の整備

CRC 間での業務の効率化やノウハウの共有のもとに、質の高い臨床研究の実施を目指す。なお、対応する多施設共同試験の件数が増加した場合、CRC の人員増が必要となる可能性がある。

(3) Phase I 病棟

①院内各部門間調整

当施設では Phase I の実施経験が少ないことから、当該病棟のスタッフを含めて更に国内複数施設の Phase I 病棟の見学等を含めた各種情報収集に努め、当施設における Phase I 病棟整備の参考としたい。

②病棟整備、病棟スタッフ教育等

対象症例や病棟スタッフの安定的確保が困難であるため、現時点では Phase I のみに対応する病棟ではなく、まずは Phase I 実施時にのみ、病棟の一部の病床を Phase I のための病床として活用する体制を整備する方向で検討を進めている。なお、既存の病棟を活用することから、物品類の整備や改築費等は最小限に抑えたいと考えている。また、Phase I 病棟が確定した後に、当該病棟を中心とした関連スタッフに対する教育並びに病院職員全体への啓発を目的とした説明会等の実施を予定している。

3. その他

・なし

E.結論

新規抗 HBV 感染症治療薬候補となるリード化合物の最適化および医薬品候補化合物の早期の獲得が望まれるが、未だその時期は定かではない。

それまでの期間、前臨床試験の実施に向けた各種調整や、臨床試験実施並びに実施支援体制の確立・整備等に努め、医薬品候補化合物獲得後の前臨床試験並びに第 I / II a 相臨床試験などの臨床開発の円滑な実施に備えることとする。

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

1. 特許取得

・なし

2. 実用新案登録

・なし

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

創薬化合物の新規性についての研究・解析及び前臨床試験移行諸条件の検討・解析及び
マーケットリサーチに関する研究

研究分担者 助永 義和 独立行政法人国立国際医療研究センター・
臨床研究センター・知財開発管理室長

研究要旨 1. 最適化誘導体合成の新規性調査：合成された化合物の特許を含めた新規性調査を行った結果、複数の新規性化合物が発見された。2. 特許出願：新規性化合物の中でホスト・ミトコンドリアポリメラーゼを対象としたスクリーニングの結果、安全域の広い化合物がserendipityとして得られたので、特許出願のための明細書作成に着手した。

A. 研究目的

最適化誘導体合成を継続し、複数のリード化合物が創製されつつある。権利化を推進し特許出願できる新規医薬品候補創製を目指すため、新規性調査は必至の過程である。研究分担者は「誘導体合成された化合物の新規性調査を行う」「広い安全域など医薬品候補として画期的な新規化合物を発見し、物質・製法に関する特許出願を行う」ことを目標として研究を行っている。

B. 研究方法

(1) 新規性調査法

アメリカ科学会のCASが提供する電子情報サービスSciFinderは論文検索はもとより、化学構造式による検索が可能な唯一の電子情報サービスであるだけでなく、特許検索も可能である。新規性調査についてはこのSciFinder解析ソフトを使用して、構造式より検索を行う。

(2) 特許出願の条件検討

医薬品候補として特許出願に選定する方法として、探索的ADMETを疾患標的分子・リード化合物に合わせた選択法で行う。核酸アナログはホスト・ミトコンドリアポリメラーゼとの選択性(基質レジスタント)を優先する。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

■SciFinder解析ソフトによる調査条件：

ISIS draw構造式描写による

Exact search Substructure search

■SciFinder解析ソフトによる調査結果：

(1) YMS1, HM1シリーズ

Novel : 8 compounds

(2) 塩基部修飾型誘導体

Novel : 3 compounds

(3) 糖部修飾型誘導体

Novel : 2 compounds

(4) HM2, SK, YMS2シリーズ

Novel : 2 compounds

(5) 6 positionシリーズ

Novel : 6位誘導体は全てNovel compounds

■特許出願化合物選定結果：

安全域の広い誘導体の基本骨格をserendipityとして発見した。特許出願準備中で、2014年度4Q前半に出願計画である。

D. 考察

SciFinder解析ソフトは化学構造式をCAS検索できる唯一のソフトであり、全世界のPatent検索も可能とする。当該低分子合成治療薬の新規性解析には非常に有用であった。特に不斉炭素を含む構造も分離可能である。継続最適化誘導体のSciFinder解析により、新規性誘導体部位に関する情報が蓄積され、合成の方向性が想定できるに至った。

E. 結論

最適化誘導体合成継続過程で、安全域の広い医薬品候補となる基本骨格を発見した。この新規化合物複数個は物質特許としてとkkkyは成立するため、serendipityを期待した用途もクレームとする。追加実施例も計画している。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特許取得前のため無し。

2. 学会発表

特許取得前のため無し。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

名称「抗ウイルス活性を示すヌクレオシド誘導体」として平成27年5月出願予定

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

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

肝炎ウイルスのポリメラーゼの結晶構造解析

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

HBV ポリメラーゼ (HBV pol) の立体構造を原子レベルで明らかにするために、HBV pol の結晶構造解析を行っている。本年度は、小麦無細胞発現系で発現・精製した蛋白質を利用して構造解析の準備を行い、また、発現系の最適化を行った。これらとは、別に哺乳類細胞発現系にて作製し、可溶性 HBV pol 蛋白質を精製でき、これらを HBV pol 特異的抗体を利用して、Western Blotting で確認した。また、プライミングアッセイによって、哺乳類細胞から得られた蛋白質が活性を持つ HBV pol である可能性を示唆できた。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス(HBV)の治療薬に対する耐性株の出現により、現在の治療薬の効果が減少することが危惧されている。この耐性ウイルスに対する新規阻害剤の開発が急務の課題である。阻害剤の標的である HBV ポリメラーゼ(HBV pol)の逆転写領域の結晶構造解析を目的としている。HBV ポリメラーゼは不溶性の蛋白質と知られており、20年以上、その立体構造が明らかにされていない。構造解析に利用できる蛋白質を得るには、可溶性の蛋白質を大量に準備しなければならない。現在まで、蛋白質の立体構造解析に適する蛋白質発現系の条件を満たす発現系として、大腸菌、昆虫細胞、無細胞発現系、哺乳細胞発現系などが知られている。これらの発現系の中で、どれが HBV pol 蛋白質結晶構造解析に適しているか、未だ分かっていない。そこで、蛋白質発現系の開発から手がけることにした。

昨年度までに、昆虫細胞発現系と小麦無細胞蛋白質発現系による蛋白質発現を行った。これらの解析から小麦無細胞発現系から得られた蛋白質が可溶性蛋白質を大量に得られることが示唆できた。本年度は、この小麦無細胞蛋白質発現系を利用して、立体構造解析の準備、および発現系の構造解析に適した要件への改良を行った。また、創薬支援技術基盤プラットフォームの全面協力を得て、哺乳類細胞発現系も作製し、その発現・精製を確認し、活性測定を行った。

B. 研究方法

小麦無細胞蛋白質発現系

小麦無細胞発現には、セルフリーサイエンス社 WEPRO シリーズを利用した。まず、蛋白質発現用のベクターを作成した。発現領域は、図 1 に示した通りである。これらの蛋白質には、精製用のタグとして、GSTとHisの両方を N 末端に付加してある。

蛋白質発現の手順は、WEPROのマニュアルに従って行った。大まかな手順は次に示したとおりである。まず、発現プラスミドから mRNA を合成し、その後、mRNA を翻訳反応液に加え、20時間反応後、翻訳産物を確認した。蛋白質合成確認のために、翻訳産物を遠心し、

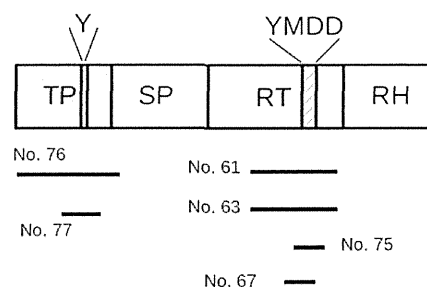


図1 HBVポリメラーゼのドメイン構成とその発現領域。HBV pol の発現領域の相対的位置を太線で示し、その発現領域を識別するために、No. で示した番号を付与した。逆転写活性領域をYMDDで、プライミング活性によりグアニンが共有結合する部位をYで示した。

上清をSDS-PAGEとWestern Blotに供した。

核磁気共鳴(NMR)解析

小麦無細胞発現系にて発現・精製したHBV pol蛋白質を、リン酸バッファー(pH 7.4)を溶媒として、0.1mg/mlの濃度で250 uL準備した。これに、重水およびDSSを加え、NMRサンプルチューブに封入した。NMR解析には、Bruker Biospin AVANCE III 600を用い、測定温度は25℃で1H-NMRのスペクトル測定を行った。

哺乳類細胞発現系

HBV polをコードするP遺伝子全長をpcDNA34cPAWベクターに組み込んだ。このコンストラクトには、アフィニティー精製のために、C末端にPAタグを付加した。このプラスミドを浮遊動物細胞に遺伝子導入し、HBV polを発現した。PAタグ特異的抗体N Z1でプルダウン後、Sample bufferで溶出した。

プライミング活性測定

哺乳類細胞発現系にて発現・精製した蛋白質の活性を調べるために、放射性同位体³²Pで標識した Guaninを用いて、プライミング活性を調べた。25℃で4時間反応後、SDSサンプルバッファーを加え、10分間、100℃でサンプルバッファーを調整した。反応産物をSDS-PAGEに供し、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーにより、ゲル上の放射性物質を検出した。

C. 研究結果

小麦無細胞発現系による蛋白質発現・精製および溶化領域の検討

昨年度までに、小麦無細胞発現系にて、蛋白質が0.1-1mg/mL以上発現できることが分かった。これらの可溶性凝集体を形勢し、結晶構造解析に利用できなかった。そこで、発現条件を検討し、同時に、発現領域を変更して、可溶性蛋白質が得られるか検討した。まず、逆転写活性領域を含み、かつ、安定な構造を保つと推測できる領域を昨年度までに作製したHBV polモデル構造を利用して、選択した。次に、それらの領域が可溶性領域の度合いをPROSOII (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/prosoII/prosoII.seam>)にて計算した。結果的に、6つのコンストラクトを作製し(図1)、その発現量と可溶性について系統的に検討した。蛋白質の可溶性の検討では、蛋白質発現時に別表に示した界面活性剤を示した濃度ごとに加えた。得られた発現産物(クルード)を21,600xg, 10分間遠心し、上清画分(可溶性画分)と沈殿画分(不溶性画分)とに分け、SDS-PAGE後、CBB染色した。目的タンパク質の定量のためにBSAを標準タンパク質として同時に泳動した。図2は、加えた界面活性剤と

その濃度により蛋白質の可溶性が変化する典型例を示す。また、6つのコンストラクトの発現量と可溶性の変化については、別表に示した。これらの解析から、多くの発現蛋白質は不溶性画分として得られるが、界面活性剤を加えることで可溶性画分に取得できることが分かった。

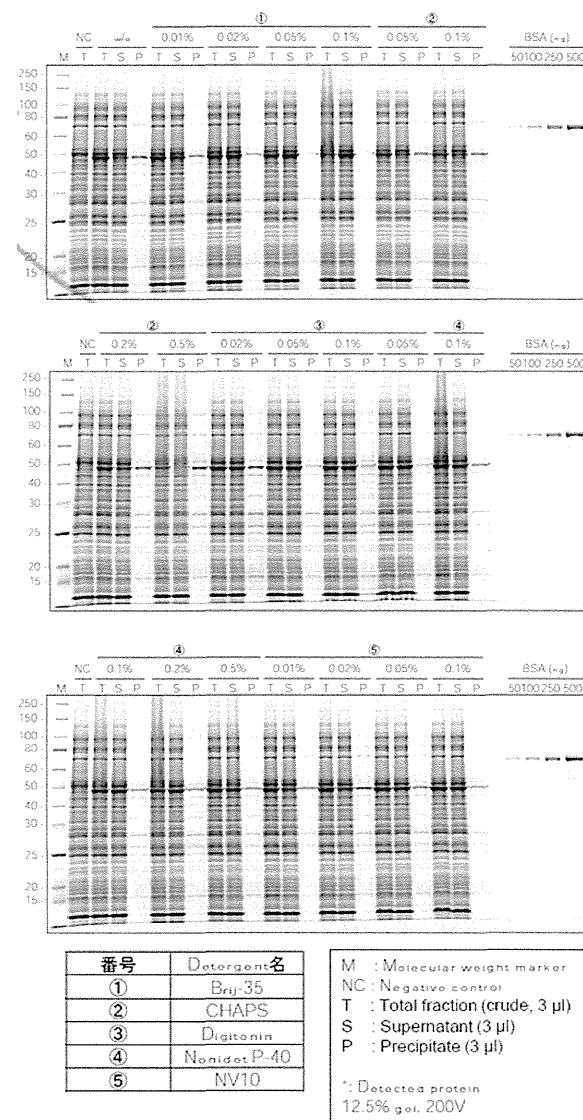


図2: 蛋白質可溶化条件の検討: 発現可溶化条件の検討を行うために、表に示した5つの界面活性剤をそれぞれ図に記載した濃度で加えた。

NMR解析の準備

小麦無細胞発現系にて、可溶性HBV polを精製出ることが分かった。これらの可溶性領域が溶液中で立体構造をとり得るかどうかを検討するために、核磁気共鳴(NMR)解析を行う準備を行った。図3は、1H-NMRのスペクトルを示す。

ポジティブコントロールとして立体構造を持つことが明らかな蛋白質を、ネガティブコントロールとして溶液中でランダムな構造をもつと推定されるランダムペプチドを示してある。この結果から、今回調べた、精製HBV polはランダムペプチドの状態と同一のスペクトルを示し、溶液中で一定の構造をとっていることを示すことができなかつた。しかし、NMRによる測定法を確立できたので、今後、可溶性蛋白質として得られたサンプルについて、同様の解析を行い溶液中の構造の解析を行う。

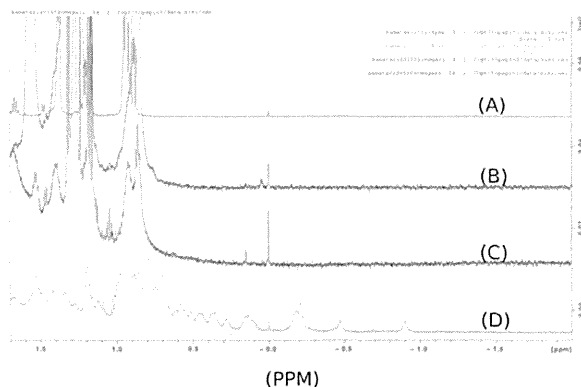


図3：¹H-NMRスペクトル

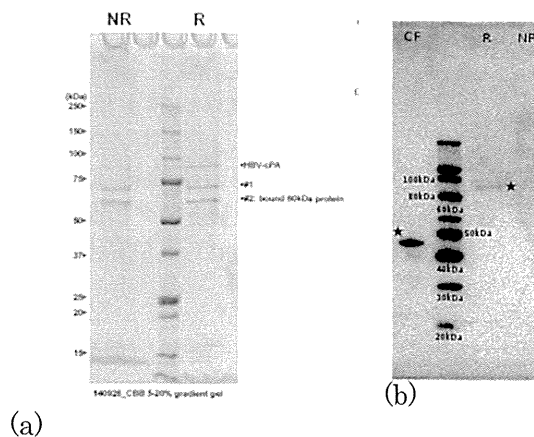
小麦無細胞発現系を用いて発現・精製した蛋白質の溶液中での構造を調べた。(A)ランダムペプチド、(B)-(C)HBV pol、(D)ポジティブコントロール

哺乳類細胞での発現

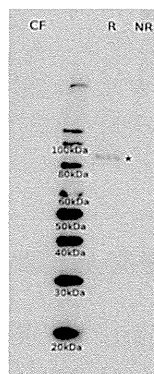
哺乳類細胞を利用した発現系の作製が報告されている。この哺乳類細胞発現系では、宿主因子HSP関連蛋白質と共精製され、協同的な活性を示すことが報告されている。しかし、その発現量は蛋白質の立体構造解析に利用できる程度の量を発現できていない。また、極端に不溶性の蛋白質として得られるため、構造解析には不向きである。そこで、蛋白質の発現量と可溶性を改良した、HBV polの全長をもつ哺乳類細胞発現系を作製した。"コンストラクトの作製・蛋白質の発現精製では、"創薬等支援技術基盤プラットフォーム"、高木淳一教授（大阪大学）の全面協力により、目的蛋白質を得た。発現・精製した蛋白質をSDS-PAGEおよびWestern Blotting に供し、その発現量と得られた蛋白質がHBV polであるかどうかを評価した。Western Blotting には、一次抗体として、HBV polのTP領域とspacer領域を抗原認識する抗体を利用した。発現・精製した蛋白質サンプルを還元剤有りとなしのSDSサンプルバッファーに加え、それぞれをSDS-PAGEに供した。その結果から、SDSサンプルバッファー中に還元剤を用いた場合のみ、HBV polが可溶性画分として、精製されることを確認した(図4(a): R)。つまり、非還元状態では、HBV polと思われるバンドが消失した。このHBV polの精製産物には、常に宿主細胞の因子が含まれる。この宿主因子を明らかにするために、ペプチドシーケンサーでN末端側のアミノ酸配列を調べ、HSP60であることを明らかにした。

次に得られた蛋白質をwestern blottingに供し、精製蛋白質がHBV polであることを確認した。図4(b), (c)は、それぞれ一次抗体にTP領域を認識する抗体、spacer領域を認識する抗体を用いた。また、コントロールとして、無細胞発現系にて精製したTP領域を発現している蛋白質を用いた。図4(b)では、一次抗体として、TP領域を認識する抗体を用いて、無細胞発現系で得られた蛋白質と、哺乳類発現系で得られた蛋白質の両方が検出できた。

図4 (c)では、spacer領域を認識する抗体を用いて、哺乳類発現系から得られた蛋白質のみ検出できた



(a)



(c)

図4：HPの発現、SDS-PAGE, Western Blot

(A)蛋白質発現のSDS-PAGEにより確認。NR: SDS-PAGEサンプルバッファーに還元剤を含まない。R; SDS-PAGEサンプルバッファーに還元剤を含む。HBV polのみだけでなく、宿主因子と共精製される。大阪大学 海津博士から資料提供。(B) Western

Blottingによる発現蛋白質の確認。一次抗体はTP領域を抗原領域として認識する。CF: 小麦無細胞発現系にて、TP領域のみ発現させた蛋白質、R; SDS-PAGEサンプルバッファーに還元剤を含む。NR: SDS-PAGEサンプルバッファーに還元剤を含まない。Western Blottingによる発現蛋白質の確認。一次抗体はspacer領域を抗原領域として認識する。CF: 小麦無細胞発現系にて、TP領域のみ発現させた蛋白質、R; SDS-PAGEサンプルバッファーに還元剤を含む。NR: SDS-PAGEサンプルバッファーに還元剤を含まない。

哺乳類細胞で発現した蛋白質の活性の確認

哺乳類細胞発現系で得た精製蛋白質の活性を調べるために、プライミングアッセイを行った。HBV polは逆転写開始する前に、TP領域にグアニン塩基が共有結合する、プライミング活性をもつ。この性質を利用して、放射性同位体³²Pで標識したグアニンにて、HBV polのプライミング活性を調べた。HBV polがプライミング活性を示すと、放射性同位体³²PのバンドがHBV Polの推定分子量である95kDa付近にバンドが確認できる。

哺乳類細胞発現系では、HBV polは宿主因子HSP60と共精製される。このHSP60は、蛋白質の立体構造形勢を補助し、蛋白質が成熟したのち、ATPとMgの存在下で立体構造形成を補助していた蛋白質から乖離する。なお、ATPとMgは、Mnに代用可能である。そこで、HSP60が結合した状態と乖離した状態、つまり、Mg, ATP, Mnの有無でプライミング活性を調べた。その結果、ATP非存在下において(図5)、25kDa付近、75-100kDaにバンドが確認できた。これらのバンドがHBV polのプライミング活性によって得られたものであることを確認するために、来年度はHBV polの1次抗体を利用したWestern blottingにより、これと同一にバンドの位置が検出できるか確認する。

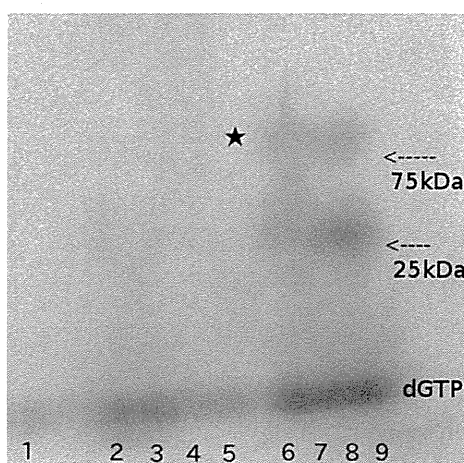


図5: プライミング反応

HBV polの活性を調べるために、放射性同位体 ^{32}P で標識したグアニンとの反応を調べた。Mn, Mg, ATP, ϵ RNAの有無により、プライミング活性が起こるかを調べた。Lane 1: negative control. 1Mg/ml BSAをHBV polの代わりに加えた。Lane 2: Mn(+)/ATP(-)/ ϵ RNA(+). Lane 3: Mn(+)/ATP(-)/ ϵ RNA(-). Lane 4: Mg(+)/ATP(+)/ ϵ RNA(+), Lane 5: Mg(+)/ATP(+)/ ϵ RNA(-), Lane 6: Mg(+)/ATP(-)/ ϵ RNA(+), Lane 7: Mg(+)/ATP(-)/ ϵ RNA(-), Lane 8: Mg(-)/ATP(-)/ ϵ RNA(+), Lane 9: Mg(-)/ATP(-)/ ϵ RNA(-)

D. 考察

小麦無細胞発現系と哺乳類細胞発現系にて、HBV pol蛋白質の発現系を作製した。小麦無細胞発現系では、0.1-1mg/ml以上の蛋白質の発現が確認できた。これらの蛋白質の多くは不溶性蛋白質として得られたが、発現時に界面活性剤を加えることで可溶性画分に取得することが可能となった(図、別表)。また、これらのサンプルを利用して、溶液中の構造を調べるためにNMR解析の準備を行った。今年度までに、NMR測定の準備が完了し、小麦無細胞発現系にて得られた蛋白質を利用して、溶液中の構造を調べることが可能となった。

哺乳類細胞蛋白質発現系を利用して、HBV pol全長を発現する系を作製した。得られた蛋白質をSDS-PAGEとWestern Blottingに供し、その発現量と得られた蛋白質がHBV polであることを確認した。得られた蛋白質は可溶性画分として得ることができ、HBV polの2種類の抗体と反応した。これらのことから、哺乳類発現系から得られた蛋白質はHBV pol蛋白質であり、かつ構造解析に適した可溶性の蛋白質であることが分かった。また、このHBV polの活性を調べるために、プライミングアッセイを行った。その結果、ATP非存在下で75-100kDaの間に ^{32}P 放射性同位体のバンドを確認できた。つまり、HSP60が結合した状態で、HBV polはプライミング活性を示す可能性ある。この仮説を証明するために、来年度は、HBV pol抗体を利用して、75-100kDaの間に見られたバンドがHBV polがグアニンと共有結合したものであることを確認する。

E. 結論

小麦無細胞発現系にて、可溶性HBV pol蛋白質を大量に得ることができた。また、哺乳類細胞発現系にて可溶性HBV pol蛋白質を得ることもできた。哺乳類細胞発現系から得た蛋白質は、HBV polがもつプライミング活性を示していることが推測できた。現在、報告されている蛋白質は極端な不溶性蛋白質として得られており、今回小麦無細胞発現系および、哺乳類細胞発現で作製したHBV pol蛋白質は構造解析に適した蛋白質であると考えている。今後、これらの蛋白質を利用して、HBV polの立体構造を明らかにしていくつもりである。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Wong DK, Kopaniszen M, Omagari K, Tanaka Y, Fong DY, Seto WK, Fung J, Huan g FY, Zhang AY, Hung IF, Lai CL, Yuen MF. "Effect of hepatitis B virus reverse transcriptase variations on entecavir treatment response." J Infect Dis. 2014 Mar 8. [Epub ahead of print]

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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)

研究協力者 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)

研究協力者 田中靖人 (名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学・教授)

研究要旨

本研究は、B型肝炎治療薬開発において重要な創薬ターゲット分子であるB型肝炎ウイルス (HBV) 逆転写酵素 (Pol) の立体構造情報の取得を目指すものである。HBV Polはその安定性・可溶性に大きな問題があり、これまでに大量発現精製に成功した例は報告されていない。H26年度において私たちは主に、(1) リフォールディング、(2) ヒト HBV Pol のホモログ分子の発現テスト、(3) HIV-1 RT への HBV Pol 型変異導入、の3つを柱に研究を行った。リフォールディングおよびホモログの発現テストでは、ポジティブな結果を得る事ができなかった一方で、HIV-1 RT の基質 (薬剤) 結合ポケットに HBV Pol 型変異を導入した変異体 A において蛋白質を大量取得、結晶化、および構造決定に成功した。

A. 研究目的

本研究は、HBV 逆転写酵素の詳細な立体構造情報を取得することを目的とする。構造を明らかにすることで、薬剤による酵素阻害メカニズムを明らかにし、さらには計算機化学によるドッキングシミュレーションを強力に押し進め、新たな候補化合物の探索へと展開することが可能となる。

本研究目的を達成するためには、構造を正しく形成した HBV Pol 蛋白質を大量に、かつ高い精製度で準備することが要求される。しかしながら、これまでに安定した HBV Pol 分子を取得することができる系は確立されていない。私たちは H24-25 年度において、様々な HBV Pol 断片を発現させ、ドメイン単位で酵素の取得ができないか探索してきた。さらには、GST や MBP など可溶性蛋白質を融合させた発現や、無細胞システムでの発現、推定される HBV Pol 会

合パートナーとの共発現等を試行してきた。しかしながら、本分子を安定して可溶性で取得する条件を見出すには至っていない。そこで H26 年度は H24-25 とは異なったアプローチとして、主に以下の3つの試みを行ったのでここに報告する。

(1) リフォールディング

断片化した HBV Pol をグアニジン塩酸塩や尿素で完全に変性溶解させたのち、正しい構造へとリフォールディングできるか条件検討を行った。

(2) ホモログの発現

これまでに研究が行われているヒト HBV Pol および Duck HBV Pol 以外の HBV Pol (アミノ酸相同性 26-86%) の発現テストを行った。蛋白質の溶解性・安定性とその蛋白質の機能が直接関係していないと仮定すれば、ホモログの中に安定な (ヒト HBV Pol と比べて相対的に発現量や可溶性に優れた)

HBV Pol を見出せる可能性があると考えられる。

(3) HIV-1 RT の利用

HIV-1 RT は可溶性で安定して取得でき、結晶構造解析の実績もある。HIV-1 RT と HBV Pol のポリメラーゼ活性部位は類似していると考えられるため、HIV-1 RT の活性部位近傍に HBV Pol 型変異を導入することで、間接的に HBV Pol の活性部位ポケットの構造情報を得ようというアプローチである。

B. 研究方法

1. リフォールディング

名古屋市立大学大学院医学研究科の田中靖人教授より供与いただいた Pol 遺伝子 (Genbank: AB246345) を用いて実験を行った。また名古屋市立大学の尾曲克己博士との情報交換を基に推定したドメイン境界情報をもとに構築した多数の発現コンストラクトから、全長 (1-843)、TP (1-178)、 Δ RH (1-693)、RT/RH (310-843) の4つの発現領域を選択し、リフォールディング実験に供した。酵素の発現は大腸菌 BL21(DE3) を用い、37°C で IPTG 発現誘導を行い大量の封入体を蓄積させた後、ソニケーションにより菌体を破碎、不溶性画分の洗浄と遠心分離を繰り返して封入体の精製を行った。得られた封入体を 8 M urea もしくはグアニジン塩酸塩で溶解させ、透析法もしくは希釈法によってリフォールディングを試行した。得られたサンプルの上清および沈殿を SDS PAGE で解析するとともに、動的光散乱法や CD スペクトル解析により溶解状態のサンプルの性状を調べた。

2. ホモログ発現テスト

GenBank データベースに登録されている HBV Pol 遺伝子のうち、これまで研究の中心を担ってきたヒト HBV および Duck HBV 由来の Pol 以外のホモログとして、ゴリラ

HBV Pol (相同性: 86%)、ウーリーモンキー HBV Pol (70%)、ウッドチャック HBV Pol (51%)、白雁 HBV Pol (26%) の4種を選択、TP および RT/RH 領域の発現テストを行った。遺伝子は Genscript 社による合成遺伝子を利用した。発現は大腸菌 BL21(DE3) を用い、25°C で発現誘導を一晩行い、ビーズショッカー (安井器械) により菌体を破碎、遠心分離により不溶物を除去した後、Ni アフィニティレジン (ロシュ) を用いた精製を行った。それぞれ全抽出液、上清、沈殿、Ni レジン精製溶出液を SDS PAGE およびウェスタンブロットにて解析した。

3. HIV-1 RT の HBV Pol 型変異体

HIV-1 RT/RH 遺伝子は国立感染症研究所より提供を受けた (GenBank: AAB60572)。HBV Pol 型残基の変異導入はインバース PCR 法により行った。HBV Pol 型変異を導入した HIV-1 RT p66 および野生型 p51 を大腸菌にて共発現させるため pACYC および pET ベクターを用いクローニングを行い、大腸菌 BL21(DE3) によって p66/p51 ヘテロダイマーを発現させた。ソニケーションによる菌体の破碎後、Ni アフィニティクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行い、結晶化実験を行った。得られた結晶はシンクロトロン放射光にて X 線回折実験を行った。構造解析には HKL2000、CCP4、Phenix 等の結晶構造解析ソフトウェアを使用した。

C. 研究結果

1. Pol 断片のリフォールディング

HBV Pol の全長および断片 (B. 研究方法参照) のリフォールディングを行うため、大腸菌を用いて大量の封入体を取得した。封入体は尿素もしくはグアニジン塩酸塩によって溶解させ、希釈法もしくは透析法によってリフォールディングを試みた。リフ

ていることを明確に示しており、全ての HBV に共通の何らかの理由により著しく溶解性の低いアミノ酸配列になっていると考えられる。詳細は考察の項目で述べる。

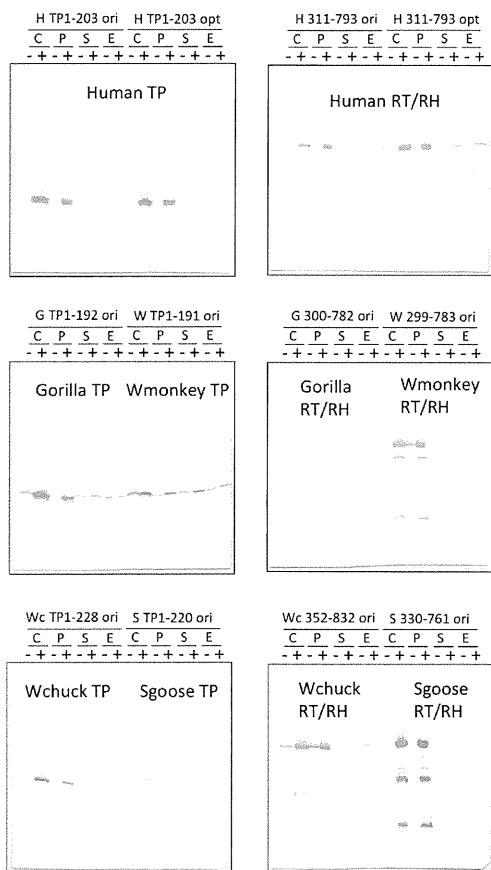


図3. ホモログの発現テスト

抗ヒスタグ抗体を用いたウェスタンブロットを示す。C, 細胞全量; P, 沈殿; S, 上清; E, Ni eluent. +/- は IPTG 誘導を示す。主に沈殿画分にサンプルが検出されているが、ゴリラ RT/RH のように発現が認められないものもある。

3. HIV-1 RT p66/p51 への変異導入および精製、結晶化

HBV Pol の可溶性取得が極めて困難であるため、活性部位残基のみが局所的に保存されているホモログ分子であって、これまでに多くの結晶構造が報告されている HIV-1 RT を材料に用い、HBV Pol の活性部位構造を推定するアプローチを試みることにした。HIV-1 RT の活性部位近傍を可能な限り HBV Pol 型のアミノ酸へと置換し、発

現可溶化、精製できたものから、逆転写阻害アッセイ、結晶化および構造解析を行うこととした。HIV-1 RT は p66 と p51 のふたつの異なる分子量のサブユニットからなるヘテロダイマーとして機能し、活性部位として働くのは p66 側だけである。そこで、変異導入は p66 に限定し、p51 は野生型のままとした。p66 と p51 の共発現系を pET および pACYC ベクターを使って構築、この時、片方のサブユニットの N 末にのみヒスタグを融合させ、大腸菌 BL21(DE3) を用いて発現させた。薬剤 (核酸アナログ) 結合ポケット近傍を HBV Pol 型に置換したいくつかの変異体やキメラ酵素を上記の方法で発現テストし、その中で mutant A に関して高純度に精製することができた (図4)。このサンプルを結晶化スクリーニングに供したところ、いくつかの条件で初期結晶を得ることに成功し、さらにバッファー濃度、pH、沈殿剤濃度等を最適化して、良質な単結晶を得た (図5)。予備的回折実験の結果、格子定数は $a = b = 146, c = 118$ 、空間群は $P321$ であった。この結晶系は、これまでに PDB に報告されている HIV-1 RT 結晶構造のどれとも異なるものであった。分子置換法による位相決定を行い、現在構造座標精密化を進めている。

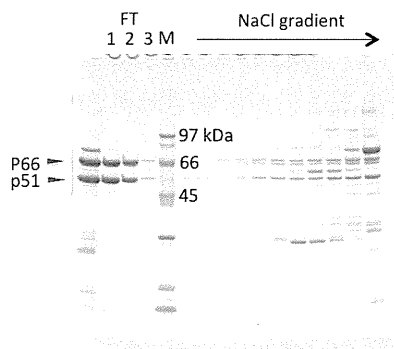


図4. 精製 HIV-1 RT mutant A

DEAE Sepharose (陰イオン交換) カラムのフロースルー (FT) にて高純度精製サンプルを取得した。一番左レーンには Ni アフィニティカラム精製サンプル (陰イオン交換クロマトグラフィーに供する前の純度を示す)。

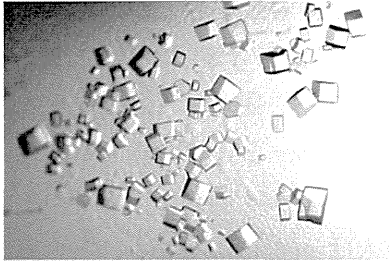


図5. HIV-1 RT mutant A の結晶

これまで報告されていない結晶化条件下で、これまでに報告されていない新しい晶系の結晶を得た。

D. 考察

リコンビナント HBV Pol の大量取得の試みはこれまで世界中で行われてきたが、いまだ成功していない。これまで私たちは、様々な領域で HBV Pol を断片化し、さらには様々な可溶性タグを融合して発現テストを行ってきた。また多様な発現ホストや無細胞系での Pol の取得を試みたが、決定的な解決策を得ていない。今回は可溶化状態での Pol の取得は現状困難であると考え、封入体からの巻き戻し（リフォールディング）を試みた。その際、溶解性を上げることが知られるポリマーや種々の界面活性剤を利用し、さらには複数の領域の封入体でリフォールディングの効果を検証した。結果、酸性バッファー条件下で可溶化状態の大量の TP ドメインの取得に成功した。しかしながら、物理化学的解析の結果、可溶性凝集であることが示唆された。RT や全長のサンプルにおいては、そもそもグアニジン塩酸塩で完全に変性溶解させることも難しく、Ni アフィニティカラムで精製できないなど、その性質の醜悪さは一般の蛋白質の性質とはかけ離れていた。そこで私たちは、この性質が HBV Pol に共通するものなのか、それともヒト HBV Pol に特に顕著なものであるのかを知るために、ホモログの発現テストを試みた。一般に組換え発現蛋白質の封入体形成の性質等は、蛋白質の機能とは

無関係であり、由来の生物種を変えることで同じ蛋白質でも発現精製の困難さが大きく変化することはよくあるからである。私たちは、ヒト HBV に近いものから順に、ゴリラ、ウーリーモンキー、ウッドチャック、白雁 HBV 由来の Pol の発現テストを行った。結果、どのサンプルもヒト HBV Pol 同様に著しい不溶性の性質を示すことが明らかになった。この実験結果は、ヒト HBV Pol が示す不溶性の性質は、どの HBV Pol においても保存されていることを示しており、すなわち HBV Pol の機能に密接に関係している可能性を示すものである。その要因のひとつとして、P 遺伝子上にフレームを変えてオーバーラップする遺伝子が多数あることから、それらとの共進化の過程で Pol の構造が不安定化していることが考えられる。それを補償するものとして感染細胞内で Pol が機能する際、何らなのホストファクターが Pol と会合し、共に機能している可能性が示唆されている。実際に、これまでの HBV 関連の論文では Hsp90 がそれに相当すると指摘されているが、それで結論が出ているとは考えられない。哺乳細胞で HBV Pol を発現させても Hsp90 との複合体として取得できないからである。Pol は、継続的ヌクレオチド鎖の伸長反応および RNA 分解を行う「酵素」であって、その触媒反応を遂行するために、ある定まった立体構造の形成が不可欠であるだろう。まだ見出されていない Pol が機能するための仕組み、もしくは未同定の更なる因子が存在してはじめて Pol はしかるべき構造を形成し溶解性として大量に取得できるようになるのではないかと考えている。今後、可能性のある会合パートナーとの共発現、HEK293 細胞を用いた宿主因子の探索を行うと同時に、会合パートナー非依存的に可溶化できるような変異体の取得を目指し、主に TP 領域を用いてランダム変異導入による進化

工学的アプローチにも着手している。

上記のとおり HBV Pol を取得することが非常に難しいことから、間接的に HIV-1 RT の構造を利用して、その薬剤結合部位の構造情報を取得することができないか試行することとした。HBV Pol と HIV-1 RT はアミノ酸配列の相同性は 20%程度しかない一方で、活性部位のアミノ酸残基はよく保存されている。また、HIV および HBV 感染症の両方に有効な核酸アナログがあることから明らかなように、両者の薬剤結合ポケットの構造は類似しているだろう。そこで、HIV-1 RT の結合ポケットおよびその周辺残基を HBV 型に置換した変異体を作成し、HBV 感染症に有効な核酸アナログで活性阻害がかかるような HIV-1 RT を生み出せば、その活性部位の構造は HBV Pol 構造の代替として利用できると考えることができる。今回、いくつかの変異体およびキメラを作成し、その中で薬剤結合ポケットを形成するアミノ酸を置換した変異体 A において大量精製および結晶化に成功した。今後、さらに周辺アミノ酸残基を HBV Pol 型に置換したものを取得し、逆転写阻害アッセイおよび結晶化、構造解析を試行する予定である。

E. 結論

HBV Pol の不溶性の問題を解決するためにリフォールディングを試みたが、正しく構造を形成して可溶性で取得することはできなかった。ヒト HBV Pol のホモログの発現テストを行ったが、ヒト HBV Pol 同様に非常に不溶性が高く、性質の悪さはヒト HBV Pol だけではなく、広く HBV Pol に共

通していると考えられる。安定した可溶性 HBV Pol を取得するために、会合するホストファクターの探索、および溶解性向上変異体の取得に向けた進化工学的研究を今後計画している。また別のアプローチとして、HIV-1 RT の構造を用いた HBV Pol 活性部位構造の推定を行うため、HIV-1 RT に HBV Pol 型変異を導入した複数の変異体やキメラの設計および発現テストを行った。このうち、変異体 A において酵素の取得および結晶構造解析に成功した。現在、座標の精密化中である。今後、さらに活性部位近傍を HBV Pol 型に徹底置換した変異体酵素を取得し、逆転写アッセイと共に HBV Pol 構造研究に役立てることができそうなものを選択、結晶化および構造決定を行う予定である。

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。