

物を 3 週間連日投与したが、今回の予備実験では両群間において血中 HBV DNA 量の有意な差は認められなかった。しかし、投与群の一部に低下傾向を示すマウスを認め、さらに *in vivo* 評価を進めるべき所見を得た。

③HBV の新規感染・増殖細胞系の作製

6 種類のヒト肝細胞癌株で HBV のレセプターである NTCP mRNA の発現をリアルタイム PCR で比較した。この中で、FLC-4 細胞が最も高い発現を認めた(図 5)。

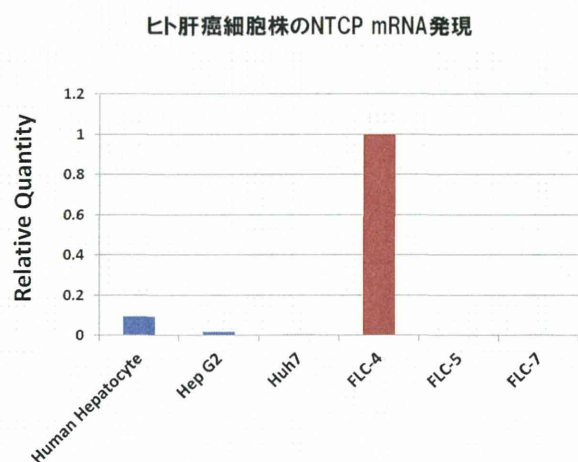


図 5

しかし、HBV 感染実験に用いられる分化した HepaRG 細胞よりも NTCP mRNA 発現は低かった。内在性の NTCP 発現を上げるため、レチノイン酸およびそのデリバティブを投与したところ、NTCP mRNA は 10 倍以上上昇した。

D. 考察

①核酸アナログ(NA)耐性 HBV を episomal に複製する細胞株と野生型 HBV を episomal に複製する細胞株の樹立

NA 耐性、野生型 HBV を episomal に複製する新規培養細胞の樹立によって、一次スクリーニングされた化合物およびその誘導体の抗 HBV 効果を正確に評価できる。また、episomal な HBV 複製系であることから、cccDNA からの HBV 複製とも類似したシステムであり、cccDNA をターゲットとした薬剤開発にも役立つことが期待される。

②TK-NOG ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗 HBV 化合物の *in vivo* 評価系の構築

TK-NOG ヒト肝細胞キメラマウスは、HBV の感染・増殖を *in vivo* で評価する上で極めて有用な動物モデルであることが、一連の実験から確認できた。ヒト肝細胞の置換率を上げるために、事前にガンシクロビル投与で肝細胞障害を惹起すると、動物の生存率の低下をまねく。また、移植するヒト肝細胞の“生きの良さ”や“ウイルス感受性”でもヒト肝細胞の生着性、ウイルス感染・増殖性も変化する。従って、安定したヒト肝細胞のソースが必要である。iPS 細胞から作製したヒト肝細胞での HBV 感染・増殖性も検定し、本システムに組み込むことを考慮している。また、ヒト肝細胞移植法も肝傷害後の開腹・脾臓注入なので、個体の生存率が低下する。このため、移植後にガンシクロビルを投与するプロトコールや iPS 再生医療に実用化されている技術や肝細胞増殖因子の投与も検討している。TK-NOG ヒト肝細胞キメラマウスでの検討前に、HBV episomal 複製細胞で化合物の至適濃度を決め、細胞毒性をチェックすることも重要である。また、化合物の溶解度を高め、吸収・代謝を考慮したデリバリーシステムの開発も必要である。

③HBV の新規感染・増殖細胞系の作製

FLC-4 細胞に 1.3 K x HBV genome を組み込んだ plasmid を導入すると、HBV は複製される。しかし、HBV をただ暴露しても、感染は今のところ起こっていません。HBV の感染には NTCP 以外の別のファクターが必要であると考えられる。未知のファクターも感染防御のターゲットになる可能性がある。

E. 結論

新規開発抗 HBV 薬候補化合物の 2 次・3 次スクリーニング系として、①HBV episomal 複製細胞株の樹立、②TK-NOG ヒト肝細胞キメラマウス

を用いた *in vivo* 評価系の構築、③FLC-4 細胞を用いた HBV 感染増殖系の構築を行った。①②は平成 27 年度以降の化合物の最適化を進める上で有用である。また、FLC-4 では NTCP の発現は最も高いものの、HBV の感染には成功しておらず、他の感染に必要なファクターの存在が示唆された。

F.健康危険情報

特記すべき事項なし

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1.論文発表

- 1) Nagatsuma K, Hano H, Murakami K, Shindo D, Matsumoto Y, Mitobe J, Matsuura T, et al. Hepatic stellate cells that co-express LRAT and CRBP-1 partially contribute to portal fibrogenesis in patients with human viral hepatitis. *Liver Int* 2014; 34: 243-52.
- 2) Uranbileg B, Enoku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Seiko, Kyoji S, Ohtomo M, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly-malignant potential. *Int J Cancer* 2014; 134: 2189-98
- 3) Sato M, Hikita H, Hagiwara S, Sato M, Soroida Y, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Kojima S, Matsuura T, Yotsuyanagi H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Potential associations between perihepatic lymph node enlargement and liver fibrosis, hepatocellular injury or hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res*. 2014 May 22. doi: 10.1111/hepr.12361. [Epub ahead of print]

- 4) Hara M, Kirita A, Kondo W, Matsuura T, Nagatsuma K, Dohmae N, Ogawa S, Imajoh-Ohmi S, Friedman SL, Rifkin DB, Kojima S. LAP degradation product reflects plasma kallikrein-dependent TGF-beta activation in patients with hepatic fibrosis. *Springerplus* 2014 May 1; 3:221. Doi: 10.1186/2193-1801-3-221 eCollection 2014.
- 5) Matsumoto M, Matsuura T, Aoki K, Maehashi H, Iwamoto T, Ohkawa K, Yoshida K, Yanaga K, Takada K. An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatol Res* 2014 May 6. Doi: 10.1111/hepr.12353 [Epub ahead of print].

2.学会等発表

- 1) 「次世代生命基盤技術を用いた B型肝炎制圧のための創薬研究」小嶋班、「B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究」村上班合同班会議 (第 5 回小嶋班班会議) . 2014 年 7 月 26 日・27 日、国立感染症研究所. 鈴木哲朗: カプシド形成阻害剤、耐性ウイルス産生株作製、坪田昭人: カプシド形成阻害剤、TK-NOG 動物実験、松浦知和: NTCP 阻害剤、FLC-4
- 2) 平成 26 年度厚生労働省科学研究費補助金 B型肝炎創薬実用化等研究事業 小嶋班・満屋班合同勉強会. 2014 年 9 月 28 日、野村コンファレンスプラザ日本橋 5 階大ホール B. 鈴木哲朗、松浦知和、清水弘樹: B型肝炎患者検体からの HBV 遺伝子クローニングと核酸アナログ耐性 HBV 発現系作製、坪田 昭人: ヒト化肝臓キメラマウスの活用法.
- 3) NTCP 関連研究者による合同班会議. 2014 年 10 月 29 日、国立国際医療センター 肝炎・免疫研究センター. 松浦知和: NTCP 高発現ヒト肝癌細胞株

4) 「次世代生命基盤技術を用いた B 型肝炎制圧のための創薬研究」第 6 回小嶋班班会議. 2014 年 11 月 15 日、東京慈恵会医科大学・臨床講堂.
鈴木哲朗：コアタンパク質カプシド形成阻害抗 HBV 薬、核酸アナログ耐性ウイルス産生細胞を用いた薬効評価、松浦知和：侵入阻害抗 HBV 薬、ヒト肝癌細胞の NTCP 発現、坪田昭人：作用機序および薬物動態、TK-NOG マウスを用いた in vivo 抗ウイルス活性評価。

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得

特になし

②実用新案登録

特になし

③その他

特になし

次世代生命基盤技術を用いた B 型肝炎制圧のための創薬研究
定量型質量分析計を用いた HBV レセプターの定量
および網羅的プロテオミクスを用いた新規化合物評価系の構築

研究分担者 金井好克 国立大学法人大阪大学 教授
研究協力者 永森収志 国立大学法人大阪大学 准教授

研究要旨

本研究は、抗 B 型肝炎ウイルス (HBV) 薬開発のために HBV の感染・増殖機構における標的分子の定量解析を目的とした。定量型質量分析計を用いて、HBV エントリーに重要な役割を持つと報告された Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1) の比較定量法を構築し、さらに安定同位体ペプチドを利用した絶対定量系を確立した。また、NTCP の基質である [³H]-taurocholic acid (TCA) を用いた輸送機能測定系を構築したことで、細胞膜で機能している NTCP のみを定量的に比較することが可能となった。これらの手法を用いて、NTCP 安定発現株の NTCP を絶対定量すること、および Primary human hepatocyte、分化型 HepaRG 細胞における NTCP の絶対定量に成功した。さらに HBV 感染が上昇する DMSO 存在下での NTCP 発現量と DMSO 非存在下における NTCP 発現量を正確に比較することにも成功した。

また、網羅的比較定量発現プロテオミクスおよび網羅的比較リン酸化プロテオミクス技術を用いて、化合物スクリーニングにより得られたヒット化合物/リード化合物が細胞に及ぼす影響を、細胞内のタンパク質発現の変動とシグナル伝達における変化としてとらえるための評価系を構築した。本手法により、標的の下流にない想定外の分子の発現変動やリン酸化の変化についても分析し、化合物の作用メカニズムの全体像を把握することが可能である。

A. 研究目的

本研究は抗 B 型肝炎ウイルス (HBV) 薬開発のために、HBV の感染・増殖機構における標的分子の解析を定量プロテオミクス技術によって行うことを目的とした。さらに大規模スクリーニング研究によって見いだされるヒット化合物の作用機序を明らかにし、さらに副次的薬理効果を解析するため、シグナルの網羅的解析を可能とする比較定量プロテオミクス解析系の構築を進めた。標的分子の定量解析のためには、他の研究グループと協力し、感染許容細胞・非許容細胞、感染細胞・非感染細胞および感染動物・非感染動物などを用いる。ヒット化合物の作用機序解明についてもスクリーニング班のみでは無く、他の研究グループとも密に連携を取り、オミクス解析による情報を統合し、ヒット化合物による生体システムへの影響の全貌を解明することを目指している。

B. 研究方法

HBV エントリーに重要な役割を持つと報告された SLC10A1(NTCP) の発現量を確認するため、質量分析計を用いた絶対定量系の確立を試みた。絶対定量系の構築に必要な標的ペプチドの情報を取得するため、NTCP 安定発現細胞 (HepG2-NTCP-C4) を用いて条件検討を行った。膜タンパク質の網羅的プロテオミクス法(金井、永森他特願 2012-37919)に従い、細胞膜に富んだ膜画分を調製し、ペプチド化した。得られたペプチドに対して、質量分析計 Thermo Q Exactive (ベンチップ型四重極 Orbitrap) にナノ LC Michrom Bioresources Advance UHPLC を接続した nano LC-MS/MS システムを用いてショットガンプロテオーム解析を行った。タンパク質配列解析は、解析ソフトウェア Thermo Proteome Discoverer をプラットフォームとし、解析アルゴリズム Matrix Science Mascot によって UniProt データ

ベースを用いて行った。解析によって得られた SLC10A1(NTCP)の同定ペプチド配列情報に基づき、絶対定量系に必要な安定同位体標識ペプチド (AQUA ペプチド) を設計した。さらに予備実験を行い、使用する AQUA ペプチドの量と質量分析計の測定パラメータ等を最適化した。既知量の AQUA ペプチドをペプチド化後の膜画分試料に添加し、絶対定量用のサンプルとした。絶対定量解析には精度の高いプレカサージオン測定法である Selected Ion Monitoring (SIM) 法、もしくは Parallel Reaction Monitoring (PRM) 法を用いた。絶対定量値の算出には解析ソフトウェア Thermo Pinpoint を使用した。

網羅的比較定量発現プロテオミクスには iTRAQ 法もしくは non-label 法を用いた。網羅的比較リン酸化プロテオミクスには、IMAC 法でリン酸化ペプチドを選択的に回収し iTRAQ 法を使用した。

SLC10A1(NTCP)の輸送測定には、放射性タウロコール酸³H]-taurocholic acid (TCA) を基質として用いた。

(倫理面への配慮)

実験動物を使用する実験計画は、動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）、動物の殺処分方法に関する指針（平成19年環境省告示第105号）、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年文部科学省告示第71号）等に基づいて実施した。またすべての動物実験は大阪大学動物実験委員会による承認を経て、「大阪大学動物実験規程」にしたがって行った。ヒト臨床サンプルを使用する実験は、本年度の研究に含まれていない。

C.研究結果

質量分析計を用いた SLC10A1(NTCP)の絶対

定量系構築のため、NTCP 安定発現株のショットガンプロテオーム解析によって絶対定量に必要な標的ペプチドの情報を取得した。このペプチドの配列情報に基づいて設計した AQUA ペプチドを用いて、NTCP 安定発現細胞の DMSO 存在下および DMSO 非存在下におけ SLC10A1(NTCP) 発現量を測定したところ、それぞれ全膜タンパク質 1 mg 当たり 194±7 fmol および 110±7 fmol であり、その差は 1.76 倍であった。一方、細胞表面をビオチン化し、細胞膜上のタンパク質のみを定量したところ、DMSO 添加により SLC10A1(NTCP)発現量は 1.26 倍に上昇した。さらに、³H]-TCA 輸送機能解析系を用いて、NTCP 安定発現細胞の DMSO 添加による輸送活性への影響を調べたところ、最大輸送速度 V_{max} に 1.24 倍の変化が見られた。DMSO 添加による輸送活性の増加は、絶対定量で得られた NTCP 発現量の上昇程度と良い相関を示すものであった。

構築した SLC10A1(NTCP)絶対定量系を用いて、HBV の感染が可能である Primary human hepatocyte (PHH) における SLC10A1(NTCP) の絶対定量を、培養開始後、経時的に回収して行った。SLC10A1 (NTCP)発現量は、それぞれ全膜画分 1 mg 当たり 11.5±2.0 fmol (1 日目)、4.3±0.6 fmol (2 日目)、5.6±0.4 fmol (4 日目)、5.6±0.6 fmol (6 日目)であった。同様に、HBV の感染が報告されている分化型 HepaRG 細胞の SLC10A1 (NTCP)絶対定量結果は、全膜画分 1 mg 当たり 2.5±0.1 fmol であった。PHH における SLC10A1(NTCP)発現量は NTCP 安定発現株における発現量の 5-10%程度であった。

また、網羅的な比較定量プロテオミクス技術を用いて、トランスポーターの阻害薬が細胞や生体に与える影響をタンパク質の発現変動とシグナル伝達の変化として評価する解析系を構築した。リン酸化プロテオミクスにおける分析条件を検討し、さらなる網羅性の向上に成功した。

D. 考察

NTCP 安定発現細胞の DMSO 存在下および DMSO 非存在下における SLC10A1(NTCP)発現量の差は 1.76 倍であったが、細胞膜上のタンパク質のみを定量したところ、DMSO 添加により SLC10A1(NTCP)発現量は 1.26 倍に上昇しており、若干の差が見られた。これは、DMSO 添加によって増加する NTCP が一定の割合で、細胞内に存在していることを示唆する。実際、 $[^3\text{H}]$ -TCA 輸送機能解析により、最大輸送速度 V_{\max} は DMSO の有無により 1.24 倍の変化が見られた。これは膜上に存在する SLC10A1(NTCP)量の増加と一致する。この条件において、 V_{\max} は輸送体の量と相関していると考えられるため、DMSO 添加による細胞膜上の SLC10A1(NTCP)増加量は 1.25 倍程度であることが強く示唆される。さらに、PHH および分化型 HepaRG 細胞を用いた SLC10A1(NTCP)の絶対定量結果は、HBV 感染に必要な SLC10A1(NTCP)存在量が、NTCP 安定発現細胞の解析結果から考えられるより、著しく少ないことを強く示唆する。

E. 結論

HBV エントリーに重要であることが報告されている SLC10A1(NTCP)の絶対定量を行うことによって、ウイルス感染における SLC10A1(NTCP)の重要性を定量的に議論することが可能になった。これは抗 HBV 薬開発を定量的解析に基づいて進められるということであり、網羅的な比較定量プロテオミクス系構築とあわせて、新しい機序の新薬創出にとって極めて重要な進捗である。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

1. Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. *Hepatology* 2014 May;59(5):1726-37.

2. 学会発表

1. 金井好克、「トランスポーターからみた全身疾患と臨床検査」、日本臨床検査自動化学会第 28 回春季セミナー特別講演、2014 年 4 月 5 日、金沢
2. Yoshikatsu Kanai, “Transporters in pharmacology and molecular target drug discovery”5th Asia Pacific ISSX Meeting 2014 Keynote Lecture, May 11, 2014, Tianjin China
3. 金井好克、「トランスポーターの分子実体の解明と分子標的創薬への応用」第 6 回新たな創薬パラダイムの創出—日本発の創薬技術・新薬のシンポジウム—基調講演、2015 年 1 月 9 日、東京
4. 金井好克、「トランスポーターの生体恒常性維持における役割と疾患治療標的としての意義」第 44 回日本心脈管作動物質学会イブニングセミナー、2015 年 2 月 6 日、高松
5. 金井好克、「トランスポーターを標的とした創薬」第 87 回未来医療セミナー、2015 年 3 月 9 日(月)、大阪

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得

出願中 名称：多数回膜貫通膜タンパク質の比較変動解析を可能とする網羅的プロテオミクス技術、出願番号：特願 2012-37919、出願日：平成 24 年 2 月 23 日、出願人：大阪大学、発明者：金井好克・永森收志他

②実用新案登録

該当無し

③その他

該当無し

HBV 候補薬の有効性と毒性の評価

研究分担者 相崎英樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

研究協力者 明里宏文（京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター教授）

研究要旨

Core タンパク質の 2 量体化阻害剤のスクリーニングにより見出された候補薬において強い抗 HBV 作用が検出されて、小動物における安全性試験が行われている。大動物を用いた安全性試験用にマーマセットの準備ができており、創薬ステップのスムーズな進行が期待できる。さらに、簡便に HBV 感染細胞を生きのまま細胞内 HBV の増殖をモニターできる系が開発でき、抗 HBV 薬のスクリーニングに有効であると期待できる。この系を用いて、感染許容性と非許容性細胞の分別し、その性質の違いを解析しており、HBV 感染・増殖に関与する宿主因子の同定に利用可能である。

A. 研究目的

現行の B 型肝炎治療薬は HBV を完全に排除することはできないため、一生服用し続ける必要があり、副作用、抵抗性ウイルス出現、免疫低下による B 型肝炎の再活性化などの問題がある。本研究班では HBV を完全に排除可能な薬剤の開発を目指す。

本年度は、スクリーニング班に細胞等を提供すると共に技術指導を行う。スクリーニングで見出された候補薬物について細胞系で有効性の評価を行った。明里協力研究員は小動物、大動物を用いるための準備実験に入る。

B. 研究方法

(1) 候補薬物の有効性の評価

Core タンパク質の 2 量体化阻害剤のスクリーニングおよびその後の 2 次スクリーニングにより得られたヒット化合物とその類縁体化合物について、Hep38.7-Tet 細胞およびヒト初代肝細胞 PXB 細胞を用いて抗ウイルス活性を評価した。

(2) 感染細胞系における簡便な HBV 増殖解析システムの構築

HBV mRNA を標的とする蛍光プローベ（スマートフレア）を培養液に添加するだけで細胞内 HBV 産生量を細胞が生きのまま観察できるアッセイ系の確立を目指す。これまで候補薬物の有効性評価は細胞またはその上清から HBs, e 抗原または HBV DNA を検出していたが、細胞の蛍光観察で候補薬

物の有効性評価の大変な省力化が期待できるだけでなく、HBV の増殖能力を真に反映する HBV RNA を測定することが可能になる。

(3) 感染許容性と非許容性 HepG2-NTCP 細胞の分別と解析

HepG2-NTCP 細胞に HBV を接種し、上記の蛍光プローベを用いて、感染許容性と非許容性細胞の分別を試みた。

(4) 大動物を用いた安全性評価系の準備（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換え DNA 実験委員会等の承認を受けて行った。

C. 研究結果

(1) 候補薬物の有効性の評価

いくつかの化合物において抗ウイルス活性を確認した。さらに、抗ウイルス活性が認められた化合物について核酸アナログ剤と抗ウイルス活性を比較した結果、より強い抗ウイルス活性を有する事を確認した。

(2) 感染細胞系における簡便な HBV 増殖解析システムの構築

コントロールの蛍光プローベを HepG2 細胞の培養液に添加したところ細胞内に取り込まれ、強い蛍光を示した。HBV mRNA を標的とする蛍光プローベを作成し、Hep38.7-Tet 細胞の培養液に添加したところ、HBV 産生細胞で蛍光が検出された。

(3) 感染許容性と非許容性 HepG2-NTCP 細胞の分別と解析

HepG2-NTCP 細胞に HBV を接種し、上記の蛍光プローブを用いて、感染許容性と非許容性細胞の分別し、その性質の違いを解析している。

(4) 大動物を用いた安全性評価系の準備

コモンマーモセットに HBV を接種し、その感染増殖を定期的に採血して血中の HBV を解析したものの、感染は成立しなかった。

D. 考察

Core タンパク質の2量体化阻害剤のスクリーニングにより見出された候補薬において強い抗 HBV 作用が検出されて、小動物における安全性試験が行われている。大動物を用いた安全性試験用にマーモセットの準備ができており、創薬ステップのスムーズな進行が期待できる。さらに、簡便に HBV 感染細胞を生きたまま細胞内 HBV の増殖をモニターできる系が開発でき、抗 HBV 薬のスクリーニングに有効であると期待できる。この系を用いて、感染許容性と非許容性細胞の分別し、その性質の違いを解析しており、HBV 感染・増殖に関する宿主因子の同定に利用可能である。

E. 結論

候補薬において強い抗 HBV 作用が検出され、小動物における安全性試験が行われている。大動物を用いた安全性試験の準備ができており、今後創薬ステップのスムーズな進行が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of Retinoic Acid Receptor Diminishes Hepatocyte Permissiveness to Hepatitis B Virus Infection through Modulation of NTCP Expression. *J Biol Chem.* 2014 30. pii: jbc.M114.602540.
- 2) Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting cellular squalene synthase, an enzyme essential for cholesterol biosynthesis, is a potential antiviral strategy against hepatitis C virus. *J Virol.* In press
- 3) Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol.* 2014;95:60-65.
- 4) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2014 95:2658-67.
- 5) Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, Wakita T. Development of Hepatitis C Virus Genotype 3a Cell Culture System. *Hepatology.* 2014 60:1838-50.
- 6) Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H, Matsuura T. Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C. *PLoS One.* 2014 12;9(5):e97078.

10. 1371/journal.pone.0097078.
- 7) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Alyl HH, Fukasawa M, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T, Evaluation and Identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP, *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443:808-13.
- 8) Gilmorel JL, Aizaki H, Yoshida1 A, Deguchi K, Kumeta M, Junghof J, Wakita T, Takeyasu K. Nanoimaging of ssRNA: Genome Architecture of the Hepatitis C Virus Revealed by Atomic Force Microscopy. *J Nanomed Nanotechol.* 2014; doi:10.4172/2157-7439.S5-010
- 9) 相崎英樹, 松田麻未, 藤本陽, 脇田隆字. HCV研究の最先端, HCV感染実験系における代謝変化. *臨床消化器内科*, 東京:日本メディカルセンター, 2014;29;810-13.
- ## 2. 学会発表
- 1) Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon ATJ, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokamai M, Wakita T. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and ITS application to drug development. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 2) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koiwai O, Wakita T. Microtubule-dependent hepatitis B virus (HBV) replication revealed by chemical screening on an efficient HBV-replicating cell line. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 3) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 4) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Suzuki R, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Takeyama H, Wakita T. Japanese encephalitis virus-subviral particles harboring HCV neutralization epitopes induce neutralizing antibodies against HCV. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 5) Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single domain intrabodies against HCV core inhibit viral propagation and core-induced NF- κ B activation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 6) Watanabe N, Date T, Kono T, Aizaki H, Wakita T. Identification of an important envelope region by competitive inhibition experiment with envelope peptides. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses,

- Banff (Canada), Sep, 2014
- 7) Fujimoto A, Aizaki H, Matsuda M, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Suzuki T, Wakita T. Maintenance of HCV infectivity by down-regulating hepatic lipase expression. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 8) Goto K, Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. NS5A-associated membrane protein, embryonic lethal, abnormal vision, drosophila-like 1, regulates hepatitis C virus RNA synthesis and translation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 9) Ohashi H, Watashi K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Kamisuki S, Sugawara F, Wakita T. Flutamide Inhibits Hepatitis C Virus Assembly through Disrupting Lipid Droplets. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 10) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Regulation of hepatitis C virus replication by liver X receptor is disrupted by a fungi-derived neoechinulin B. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 11) Hmwe SS, Suda G, Sakamoto N, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Aizaki H, Wakita T. Construction of novel infectious genotype 2b culture system. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 12) Wakita T, Kong L, Aizaki H. Regulation of viral lifecycle in hepatitis C virus infection. Dynamic interplay between viruses and their hosts, Yokohama, Nov, 2014
 - 13) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoic acid receptor plays an important role in mediating hepatitis B virus infection through regulation of NTCP expression. The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov, 2014
 - 14) 青柳東代、相崎英樹、藤本陽、松本喜弘、松田麻未、Su Su Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、脇田隆字。グリチルリチンによる抗 HCV 作用 - phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス (HCV) 分泌過程に与える影響 -。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
 - 15) 渡士幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字。B 型肝炎ウイルス (HBV) L タンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
 - 16) 大橋啓史、渡士幸一、中嶋翔、金ソルイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆字。C 型肝炎ウイルス粒子の構

- 築を阻害する flutamide の作用機序の解析。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- 17) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字。HBV 感染受容体 NTCP の発現調節機構の解析およびこれを阻害する低分子化合物の抗 HBV 効果。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- 18) 渡士幸一、相崎英樹、脇田隆字。培養系を用いた抗 B 型肝炎ウイルス化合物の同定と作用機序解析。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
- 19) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、鈴木亮介、渡士幸一、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、脇田隆字。グリチルリチンによる抗 C 型肝炎ウイルス作用 - phospholipase A2 および Autophagy による HCV 分泌過程の制御 - 。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
- 20) 脇田隆字、相崎英樹、渡士幸一。C 型肝炎ウイルス生活環全体を標的とした新規作用を有する抗ウイルス剤の探索。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
- 21) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、Hussein Aly、藤本陽、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、深澤征義、小祝修、楠原洋之。ヒト NTCP 安定発現による B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染許容性の獲得とそれを用いた HBV 侵入機構の解析。第 22 回肝病態生理研究会、東京、2014 年 5 月
- 22) 渡邊則幸、伊達朋子、河野環、溝上雅史、相崎英樹、脇田隆字。E1 ペプチドによる HCV 感染阻害機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 23) 大橋啓史、渡士幸一、中嶋翔、金ソレイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆字。Aryl hydrocarbon receptor による脂肪滴形成及び C 型肝炎ウイルス粒子構築の制御。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 24) Lingbao Kong、青柳春代、松田麻未、藤本陽、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、堂前直、鈴木健裕、鈴木哲朗、脇田隆字、相崎英樹。Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication by interacting with NS4B. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 25) 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、Jesus Izaguirre-Carbonell、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字。天然有機化合物 Neoechinulin B を利用した liver X receptor による C 型肝炎ウイルス産生制御機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 26) 岩本将士、渡士幸一、杉山真也、鈴木亮介、相崎英樹、田中靖人、溝上雅史、大谷直子、小祝修、脇田隆字。効率的な B 型肝炎ウイルス (HBV) 複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 27) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、杉山真也、田中靖人、溝上雅史、脇田隆字。レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 28) 松田麻未、鈴木亮介、嵯峨涼平、藤本陽、渡士幸一、相崎英樹、森石恆司、岡本徹、松浦善治、黒田俊一、脇田隆字。遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関する宿主因子の

解析。第62回日本ウイルス学会学術集会、
横浜、2014年11月

- 29) 渡士幸一、Sluder Ann、松永智子、梁明秀、
森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、
相崎英樹、Borroto-Esoda Katyna、田中靖
人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田
隆字。B型肝炎ウイルス（HBV）large S タ
ンパク質と NTCP の相互作用阻害による
抗 HBV 戦略。第62回日本ウイルス学会学
術集会、横浜、2014年11月
- 30) 嵯峨涼平、藤本陽、渡邊則幸、松田麻未、
長谷川慎、渡士幸一、相崎英樹、中村紀子、
小西英二、加藤孝宣、田島茂、高崎智彦、
竹山春子、脇田隆字、鈴木亮介。日本脳炎
ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス 2 価
ワクチン抗原の発現と中和抗体の誘導。第
62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、
2014年11月

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

IFN 様小分子化合物 CDE(cccDNA Eliminator)の設計・創製・ケミカルバイオロジー研究

研究分担者 掛谷 秀昭 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨

小分子化合物 CDE-3008 (cccDNA Eliminator 3008/RO4948191)は、インターフェロン(IFN) α 受容体 2 (IFNAR2)のアゴニスト活性を有し、IFN α 誘導性遺伝子群(ISGs)の発現を促進する化合物であり、抗 HBV 薬および抗 HCV 薬として期待されているが、溶解性 (水溶性)、活性力価、血中安定性などの点で問題を抱えている。さらに、CDE-3008 類の IFN α 2 受容体 2 への結合サイトを含めた作用機構解析の詳細、および抗 HBV 活性は不明である。そこで、新規抗 HBV 薬の設計・創製の基盤研究として、CDE-3008 類の抗 HBV 活性の評価、構造活性相関研究等を行い、CDE-3008 類が cccDNA 除去を伴う抗 HBV 活性を有すること、イミダゾ [1, 2-*a*] [1, 8]ナフチリジン骨格を有する新規 CDE 類化合物の設計・創製を行った。

A.研究目的

小分子化合物 CDE-3008 (cccDNA Eliminator 3008/RO4948191)は、インターフェロン(IFN) α 受容体 2 (IFNAR2)のアゴニスト活性を有し、IFN α 誘導性遺伝子群(ISGs)の発現を促進する化合物であり、抗 HBV 薬および抗 HCV 薬として期待されているが、溶解性 (水溶性)、活性力価、血中安定性などの点で問題を抱えている。さらに、CDE-3008 類の IFN α 2 受容体 2 への結合サイトを含めた作用機構解析の詳細、および抗 HBV 活性は不明である。そこで、新規抗 HBV 薬の設計・創製の基盤研究として、CDE-3008 類が有するイミダゾ [1, 2-*a*] [1, 8]ナフチリジン骨格を創薬テンプレートとして、極性官能基の導入・改変や標的タンパク質との相互作用解析のための分子プローブ化を指向した合成経路の検討・確立・リード化合物の開発を目指している。

B.研究方法

1) CDE-3008 類の設計・創製：2,4 位にトリフルオロメチル基を有する CDE-3008 類は、2, 6-ジアミノピリジンを出発物質として、リン酸存在下、1, 1, 1, 5, 5, 5-ヘキサフルオロペンタン-2, 4-ジオンと反応させて得られる化合物 1 を経由し、その

後、イミダゾ [1, 2-*a*] [1, 8]ナフチリジン骨格を構築し、最後に 1, 3, 4-オキサゾール環を導入可能な合成経路を確立した。さらに、置換基としてのオキサゾール環の改変には本合成経路を応用した (図 1)。一方、構造活性相関研究の知見を踏まえて、検出タグおよび光親和性官能基を導入した二官能性分子プローブの設計・合成を行った。各反応経過、ならびに反応生成物の追跡は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて行った。さらに、反応生成物の同定・構造解析は、核磁気共鳴スペクトル(NMR)解析、質量分析スペクトル(MS)解析等を行った。

2) IFN 様活性の評価：HCV レプリコン細胞 (小原道法先生 (都立医学臨床研究所) より分与) を用いて、HCVRNA 増幅量をルシフェラーゼ活性で定量し評価を行った。[小嶋聡一先生 (理化学研究所) と共同]

3) 抗 HBV 活性の評価：PXB 細胞に HBV を感染させた後、増幅した cccDNA 量を RT-qPCR で定量し評価を行った。[小嶋聡一先生 (理化学研究所) と共同]

4) IFNAR2-ECD (IFNAR2 細胞外ドメイン) と CDE-3008 類の *in vitro* 結合評価：リンコンビナント IFNAR2-ECD と各種合成した CDE-3008 類

の *in vitro* における親和性を Octet96 を用いて評価した。[吾郷日出夫先生（理化学研究所）と共同]（倫理面への配慮）

該当なし

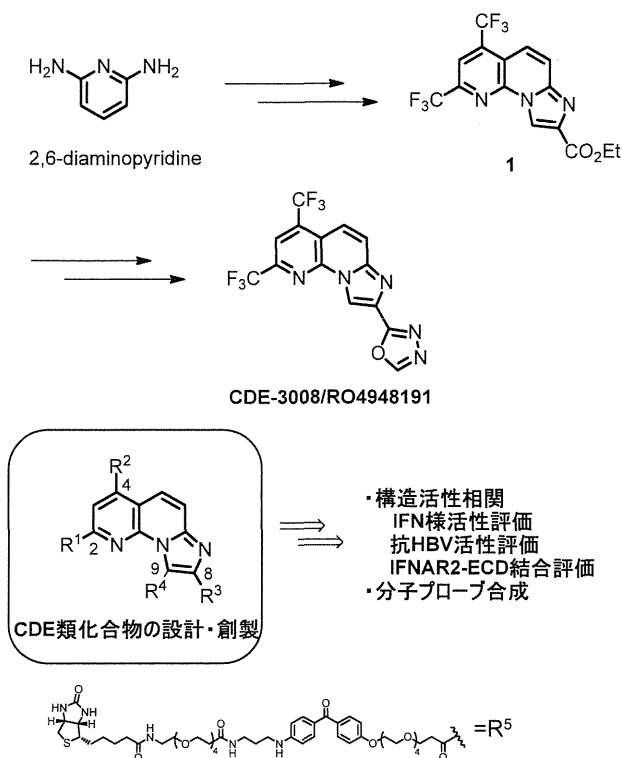


図 1. CDE 類の設計・合成およびプローブ合成

C. 研究結果

確立した本合成経路の最初の縮合段階で用いる 1,3-ジケトン化合物の分子内置換基に相当する R^1 あるいは R^2 を極性官能基等価体にする事で、極性官能基の導入や標的タンパク質との相互作用解析のための分子プローブの合成が可能になる。そこで、2,6-ジアミノピリジンに対して、分子内置換基 R^1 あるいは R^2 が異なる数種類の 1,3-ジケトン化合物の反応性を検討した結果、1,8-ナフチリジン骨格内に、その後の各種修飾反応が可能で官能基を有する中間体の合成経路の確立に成功した（図 1）。また、活性発現のためのファーマコホア探索に有用と考えられる置換基 R^3 のオキサゾール環の有無、あるいは他置換基への変換も行った。

また、設計・創製した CDE 類化合物の活性評価

には、IFN 様活性および抗 HBV 活性を用いた。その結果、CDE 類化合物 (CDE-3008, 3020, 3023 など) が cccDNA 消去活性を有し、抗 HBV 活性を示すことが明らかになった。さらに、IFN 様活性および抗 HBV 活性を示す CDE 類化合物に対して、IFNAR2-ECD との結合の *in vitro* 親和性評価のための検討を行った。

一方、CDE 類化合物の作用機構解析および標的タンパク質解析のための分子プローブ化研究として、検出タグ（ビオチン基）および光親和性官能基（ベンゾフェノン）とを有する二官能性分子プロー布林カー R^5 （図 1）を導入した CDE 類分子プローブの合成経路の検討・確立も行い、CDE-3025 などの合成に成功した。

D. 考察

CDE 類化合物の構造活性相関研究に関して、オキサゾール環の活性発現への関与度、イミダゾ [1,2-a][1,8]ナフチリジン骨格上の置換基 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 の活性発現への関与度等のデータが蓄積されつつあるので、今後、Q-SAR (Quantitative-Structure-Activity relationship, 定量的構造活性相関研究) 等の *in silico* 解析情報を構造展開・最適化研究に利用可能である。

E. 結論

CDE-3008 ならびにその類縁化合物の合成経路の詳細な検討により、構造活性相関研究および分子プローブ合成に適した合成経路を確立した。さらに、CDE 類が cccDNA 消去を伴う抗 HBV 活性を有すること、CDE 類の構造活性相関において重要な知見を得るとともに、新規抗 HBV 薬リード化合物 (CDE-3020, 3023 など) を見出した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsunematsu, Y., Nishimura, S., Hattori, A., Oishi, S., Fujii, N., Takeya, H. Isolation, structure elucidation and total synthesis of tryptopeptins A and B, new TGF- β signaling modulators from *Streptomyces* sp. **Org. Lett.** 17, 258-261, 2015.
- 2) Nishimura, S., Tokukura, M., Ochi, J., Yoshida, M., Takeya, H. Balance between exocytosis and endocytosis determines the efficacy of sterol-targeting antibiotics. **Chem. Biol.** 21, 1690-1699, 2014.
- 3) Yoshimura, A., Kishimoto, S., Nishimura, S., Otsuka, S., Sakai, Y., Hattori, A., Takeya, H. Prediction and determination of the stereochemistry of the 1,3,5-trimethyl substituted alkyl chain in verucopeptin, a microbial metabolite. **J. Org. Chem.** 79, 6858-6867, 2014.

2. 学会発表

- 1) Takeya, H. Chemical biology for drug discovery and target identification. IUPAC2014 & 248th ACS (American Chemical Society) National Meeting, San Francisco, CA, USA, Aug. 2014. (招待講演)
- 2) 掛谷秀昭. シンポジウム・モノトりの新展開 : 創薬シーズ開発を指向した天然物ケミカルバイオロジー -表現型スクリーニングと標的探索・同定-. 第 20 回天然薬物の開発と応用シンポジウム. 東京, 11 月, 2014. (招待講演)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

① 特許取得

本年度開発した化合物の一部については、次年度に設計・創製する化合物と併せて特許出願をする予定である。

② 実用新案登録

なし

③ その他

なし

低分子化合物による IFN 受容体活性化の構造基盤に関する研究

研究分担者 吾郷日出夫 理化学研究所 理化学研究所 ビームライン基盤研究部生命系放射光利用
システム開発ユニット

研究協力者 浮田陽子 理化学研究所放射光科学総合研究センター リサーチアソシエイト

研究要旨

完全閉鎖二本鎖 DNA の形成阻害を作用機序とする薬剤 (CDE : covalently closed circular DNA) とインターフェロン受容体 2 細胞外ドメイン (IFNAR2-ECD) の親和性を定量化する方法を確立した。解析の結果、CDE 化合物に応じて二通りの結合パターンがある事を示した。IFNAR2-ECD のプロダクティブコンホメーションの決定に有利な IFN α 2 変異体の作成に成功した。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) ゲノムである不完全環状二本鎖 DNA は、宿主細胞中で完全閉鎖二本鎖 DNA (covalently closed circular DNA: cccDNA) となる。HBV の生活環を踏まえると、宿主細胞内の cccDNA の除去は、抗 HBV 薬に求められる生物活性の一つである。本研究班の研究から、インターフェロン (IFN) 受容体 2 (IFNAR2) 細胞外ドメイン (IFNAR2-ECD) に結合し、インターフェロン受容体 1 (IFNAR1) 非依存的に I 型インターフェロン様の生物活性を示す分子が、cccDNA を減少させる生物活性も併せ持つ事が明らかになっている。cccDNA を減少させる生物活性を持つ薬剤 (cccDNA eliminator: CDE) が、IFNAR2-ECD と結合して生物活性を発揮するとの作業仮説に基づく探索活動を行う上で、IFNAR2-ECD と候補化合物の親和性の定量は不可欠である。本年度、これ迄に構築した IFNAR2-ECD、IFN α 2 を使い、新しく定量方法を開発した。

また、IFN α 2 の C 末の 8 アミノ酸残基を IFN α 8 の 8 アミノ酸残基に置き換えた変異体 IFN (IFN α 2- α 8tail) が、前述の cccDNA を減少させる活性を持つ化合物同様に IFNAR2-ECD に結合して IFNAR1 非依存的に IFN 様の活性を示す事が報告された事を受け、IFN α 2- α 8tail によって誘起される IFNAR2-ECD の活性化した構造 (プロダクティブコンホメーション) が、CDE 化合物で誘起され

る IFNAR2 のプロダクティブコンホメーションで、CDE 候補化合物の構造最適化等に使用できるとの仮説のもと、IFN α 2- α 8tail との複合体構造として IFNAR2-ECD のプロダクティブコンホメーションを明らかにするため IFN α 2- α 8tail の発現系を構築した。

B. 研究方法

CDE 候補化合物と IFNAR2-ECD の親和性評価

評価系は、Octet Red96 システム (fortébio) を用いた。Ni-NTA (NTA) Biosensor を Octet Red96 システムで使用するセンサーとした。センサーに結合させるリガンドとして、C 末端にヒスチジンタグを持つ IFNAR2-ECD、非特異吸着の影響を補正する目的で DsbC (EC 5.3.4.1) を用いた。センサーの説明書きに従い、Ni-NTA (NTA) Biosensor へタンパク質を吸着した。Octet Red96 システムでは、8 個のセンサーを使い、一度に 8 条件の測定が可能である。この内の 2 つのセンサーを使い、装置由来の測定値のドリフトを補正するブランクとして、アナライトを含まない溶液を測定した。アッセイは 10 分の平衡化、3 分のアナライトの結合、10 分から 20 分の解離過程からなる。結合過程で用いる試験液は、アナライトを含む、5 % (v/v) DMSO/PBS 緩衝液である。測定温度は 30 度である。

2 つのブランクを両方とも使用できるよう、独

自に作成したデータ解析手順は、(1) センサー間の相対スケール計算、(2) 装置由来のセンサー表面の厚みのドリフトと非特異吸着の補正、(3) 速度論的パラメータの算出のためのセンサーグラムの解析の三段階で構成される。相対スケール計算は、平衡化の最後の 10 秒間の平均のセンサー表面の厚みで相対スケールを計算した。装置由来のドリフトと非特異吸着の補正は以下の計算式で行った。

$$AU_{obs} = \left\{ AU_{IFNAR2-M6}^{analyte} - \frac{AU1_{IFNAR2-M6}^{blank} + AU2_{IFNAR2-M6}^{blank}}{2} \right\} - \left\{ AU_{DsbC}^{analyte} - \frac{AU1_{DsbC}^{blank} + AU2_{DsbC}^{blank}}{2} \right\}$$

ここで、 $AU_{protein}^{analyte}$: アナライトを含む溶液に、IFNAR2-ECD もしくは DsbC を吸着したセンサーを浸漬した時の測定値。 $AU_{protein}^{blank}$: アナライトを含まない溶液に、protein を吸着したセンサーを浸漬した時の n 個目の測定値。センサーグラムの解析は GraphPad Prism 5.0 の non linear regression/Association kinetics (two or more ligand concentration) モデルを使用した。センサーグラムの CDE 候補化合物濃度依存性が小さい場合は、(association then dissociation) を使用した。

アッセイ系の評価として IFNAR2-ECD に対する、IFN α 2- α 8tail の親和性を 1.0 μ M, 0.7 μ M, 0.5 μ M の濃度で測定し K_d を求めた。

CDE 候補化合物の IFNAR2-ECD に体する親和性の測定のため、各々の CDE 候補化合物に付き、三種類の濃度 (CDE-3008, 3020, 3022, 3024, 3026 : 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M; CDE-3015, 3030, 3031, 3032: 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M) で測定を行った。

IFN α 2- α 8tail の大量発現 IFN α 2- α 8tail の高発現用プラスミッド pET40b(+)-IFN α 2- α 8tail を PCR 法にて作成した。鋳型は IFN α 2 の大量発現用プラスミッド pET22b(+)-IFN α 2 を用いた。PCR で用いた 3' プライマーの構成は、プライマーの 5' 側から、発現プラスミッドに組み込

むための制限酵素 SalI 認識配列、C 末の 8 アミノ酸残基の配列を IFN α 8 の配列に置換する変異を含む塩基の順である。5' プライマーは、発現プラスミッドに組み込むための制限酵素 NcoI 認識配列、PreScission Protease 認識アミノ酸配列の塩基配列、IFN α 2 の N 末アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列に対応する塩基配列の順である。制限酵素で処理した PCR 産物を pET40b(+) に組み込み pET40b(+)-IFN α 2- α 8tail を作成した。

pET40b(+) に組み込むことで目的タンパク質をペリプラズム画分に、C 末端にヒスチジンタグを持つジスルフィド結合異性化酵素 DsbC との融合タンパク質として分泌させられる。形質転換した BL21-CodonPlus (DE3) を、37°C で OD₆₀₀ が 0.6 まで培養し、その後 IPTG を 0.2 mM となるよう添加し、20 度で一日培養を継続した。菌体からペリプラズム画分を集め-80 °C で保管した。精製手順は、ニッケルキレーティング樹脂を使った融合タンパク質の粗精製、Prescission Protease による DsbC の切断、ニッケルキレーティング樹脂による DsbC と未消化の融合タンパク質の除去、陽イオン交換樹脂、ゲル濾過の順である。精製度は SDS ゲル電気泳動にて調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、市販の材料と大腸菌を使用した組換え実験で得られた材料を用いて行うもので、倫理上の問題を生じない。

C. 研究結果

CDE 候補化合物と IFNAR2-ECD の親和性評価

CDE 候補化合物と IFNAR2-ECD の親和性を定量できるアッセイ系を立ち上げた。アッセイ系の評価として IFNAR2-ECD に

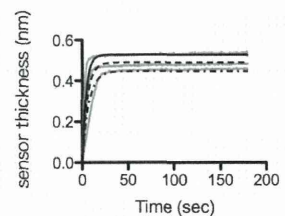


図 1 IFN α 2- α 8tail と IFNAR2-ECD の結合時のセンサーグラム。黒実線、黒鎖線、黒一点鎖線はそれぞれ IFN α 2- α 8tail が 1.0 μ M, 0.7 μ M, 0.5 μ M に相当する。灰色の実線は非線形解析の結果の近似曲線。

対する、1 μ M, 0.7 μ M, 0.5 μ M の IFN α 2- α 8tail の親和性を測定し、センサーグラムに濃度依存性があることを確認し、データ処理系を含むアッセイ系が使用できる事を確認した (図 1)。非線形解析で得られた K_d は 224 \pm 3 nM であった。次に CDE 候補化合物の IFNAR2-ECD との親和性を決定した (表 1、図 2、図 3)。CDE-3008、CDE-3020、CDE-3022、CDE-3024、CDE-3031 のセンサーグラムは濃度依存性が低く、CDE-3031 以外は全濃度範囲で共通の K_D を求める事ができなかった (表 1 中の「-」)。CDE-3008、CDE-3020、CDE-3022、CDE-3024 は、解離過程も考慮し、CDE 化合物の濃度毎に association then dissociation で解析した (図 3)。

表 1 CDE の IFNAR2-ECD の親和性解析

Compound	K_D with Std. Error (μ M)	95 % confidence interval of K_D (μ M)	Goodness of Fit R square
CDE-3008	-	-	-
CDE-3015	0.82 \pm 1.42	-1.95 to 3.60	0.7831
CDE-3020	-	-	-
CDE-3022	-	-	-
CDE-3024	-	-	-
CDE-3026	536.9 \pm 71.7	396.3 to 677.5	0.8520
CDE-3030	48.3 \pm 1.5	45.3 to 51.3	0.7836
CDE-3031	2.0 \pm 0.4	1.2 to 2.8	0.1588
CDE-3032	315.6 \pm 33.3	250.3 to 381.0	0.7349

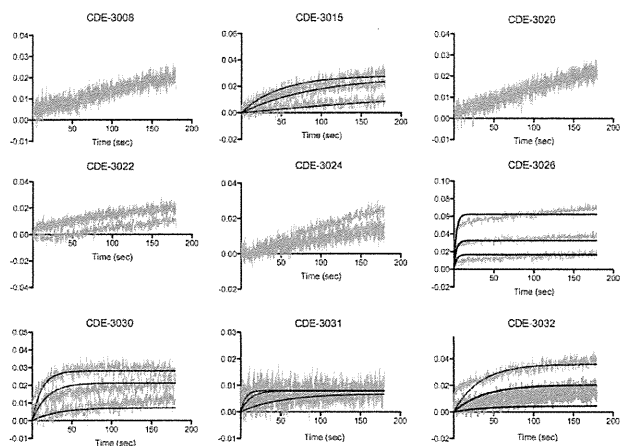


図 2 Octet Red96 で測定した IFNAR2-ECD と CDE 化合物の結合を示すセンサーグラム。灰色は実測値、黒実線は非線形解析の結果の近似曲線。

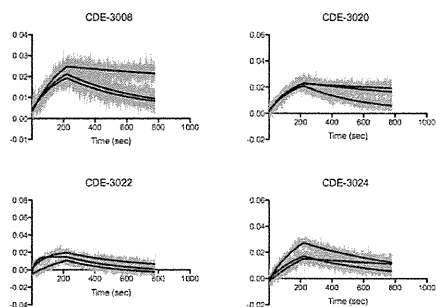


図 3 結合過程後も増大するセンサーグラム。灰色は実測値、黒実線は非線形解析の結果の近似曲線。

IFN α 2- α 8tail

の大量発現

IFN α 2- α 8tail を SDS 電気泳動ではほぼシングルバンドになる程度に精製する事に成功した

(図 4)。発現量は約 0.4 mg/L 培養であった。SDS 電気

泳動では還元剤の有無で移動度が変わった。13.5 mg/ml IFN α 2- α 8tail (5 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 0.15 M NaCl) は沈殿剤溶液 (0.1 M NaCl, 0.02 M NaCiterate (pH5.6), 5.5 % (w/v) PEG3350) と体積比 1:1 で混合し、20 $^{\circ}$ C で静置する事で結晶を与えた (図 4)。

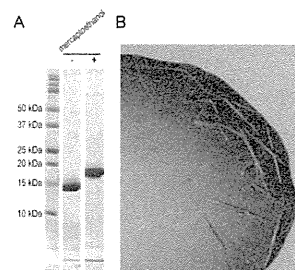


図 4 IFN α 2- α 8tail の SDS 電気泳動と結晶。(A) 精製した IFN α 2- α 8tail の SDS 電気泳動。(B) IFN α 2- α 8tail の結晶。

D. 考察

CDE 候補化合物と IFNAR2-ECD の親和性評価

センサーグラムの化合物濃度依存性が有為に観察され、より短時間で結合が飽和する化合物 (CDE-3015、CDE-3026、CDE-3030、CDE-3032) は、5 % DMSO を含む溶液に 50 μ M 以下の濃度で溶解している事が判る。これらの候補化合物は、測定した濃度範囲でセンサーグラムを説明する共通の K_D を求める事ができた。これらの化合物の中では、共通の骨格を持つ CDE-3015、CDE-3030 が比較的小さな K_D を示した。一方、CDE 候補化合物、CDE-3008、CDE-3020、CDE-3022、CDE-3024 は押し並べてセンサーグラムの濃度依存性が小さい。この事から、水溶液中の実効的な化合物濃度が 12.5 μ M より低いのか、これらの化合物に対して低親和性の IFNAR2-ECD が多数を占める中で、ある頻度で結合可能な状態に変化する可能性が推定される。また、これらの化合物の結合は、IFNAR2-ECD の構造を緩やかに変化させる可能性が示された。結合試験では、化合物を含む溶液で行う 180 秒の会合過程の後、600 秒間 CDE 候補化合物を含まない溶液にセンサーを移動し解離過程のセンサーグ

ラムの変化を記録する。解離過程では本来センサーグラムの値が減少すると期待されるにもかかわらず、数十秒間センサーグラムの値が増加し続けた。センサーグラムは、センサー上に結合している分子の厚さを nm 単位で記録していることから、化合物の結合に伴う IFNAR2-ECD の構造変化に時間がかかる可能性が示された。

化合物のセンサーグラムの特徴は大きく二つに分けられ、比較的速く IFNAR2-ECD に着脱する一団と、結合速度が緩やかで、結合後しばらくの間 IFNAR2-ECD の構造変化が継続する可能性がある一団である。これらの点から、これまでに調べた CDE 候補化合物は、IFNAR2-ECD との結合様式に違いがあると考えられた。この結合様式の違いと cccDNA 量を低下させる生物活性の強弱の相関関係を慎重に調べる必要がある。

IFN α 2- α 8tail の大量発現

還元剤の有無で SDS 電気泳動の移動度に変化が見られる事、また、結晶となる事から、今回発現した IFN α 2- α 8tail は、均一の構造に折り畳まれ、かつ、ジスルフィド結合を持つ事がわかり、IFNAR2-ECD との複合体作成に使用できると考えられる。

E.結論

CDE 候補化合物の IFNAR2-ECD に対する相互作用様式に二通りある可能性が示された。相互作用様式と cccDNA 量を現象させる生物活性の強弱の相関を踏まえ、構造最適化の方向性を検討する必要がある。

IFNAR2-ECD のプロダクティブコンホメーションの解明が、CDE 候補化合物の生物活性発現機構の解明に寄与する。この観点から、CDE 候補化合物と同様に IFNAR 1 非依存的に IFN 様の活性を示し、水溶性に富む IFN α 2- α 8tail は、IFNAR2 との複合体構造解析を通して、IFNAR2 のプロダクティブコンホメ-

ーションの解明に寄与できる。

F.健康危険情報

G.研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

該当なし

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得 該当なし

②実用新案登録 該当なし

③その他 該当なし

網羅的翻訳後修飾解析

（CDE化合物の結合部位を探索のための翻訳後修飾を含めた発現IFN α 2の構造解析に関する研究）

研究分担者 堂前 直 理化学研究所 グローバル研究クラスタ連携支援ユニット・専任技師

研究要旨

cccDNA 消去抗 HBV 薬候補剤（CDE 化合物）の構造最適化をするために、In silico 探索の初期モデル構築に必要なタンパク質の構造や結合部位の解析を行った。CDE 化合物の標的タンパク質である IFN α 2 の細胞外ドメインの構造を質量分析で構造を解析し、糖鎖結合部位 6 箇所を含むアミノ酸配列の 100%を確認した。CDE 化合物とタンパク質の共有結合を形成できなかったため、結合部位は決定できなかった。

A.研究目的

B型肝炎制圧のために非核酸アナログの創薬シードを作るため、翻訳後修飾を網羅的に探索するモディフィコム解析システムを構築し、創薬ターゲットの探索を行ってきた。本年度から治療薬の開発のために、標的探索のステージから候補薬剤の最適化や作用機作の解明に向けた取り組みを開始した。最適化のための in silico 探索や作用機作解明のために、標的タンパク質の候補薬剤結合部位を解明することが重要な課題となっている。それに先駆け、cccDNA エリミネータ（CDE）化合物の標的タンパク質である IFNAR2 の細胞外ドメインのタンパク質（IFNAR2-ECD）の構造をモディフィコム解析システムを応用して決定し、さらに結合部位解析を試みた。

B.研究方法

IFNAR2 の細胞外ドメイン（IFNAR2-ECD）は吾郷先生が発現精製したものを譲り受けた。CDE 化合物は掛谷先生が合成したものを譲り受けた。結合アッセイは古谷先生が行い、その結果を参考にした。

タンパク質は複数の酵素による消化断片を行い生じたペプチドをえた。質量分析では、これを MALDI-TOF MS（Bruker ultraflextreme）は、Reflector mode での MS 分析と LIFT mode による MS/MS 分析を行い、またナノ液体クロマトグ

ラフィーエレクトロスプレーイオン化法質量分析法（nLC-MS, Thermo Q-Exactive）では、データ依存的 Top10Method を用いて、MS および MS/MS を取得して分析した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C.研究結果

IFNAR2-ECD のトリプシン消化物を MALDI-TOF MS によりペプチドマスフィンガープリント法（PMF）により解析したところ、16断片で前アミノ酸配列を 73%カバーする断片を得ることができた。36N の一部、65N の全部、166N あるいは 170N の一部、182N の一部が HexNAc 化されているものを確認することができた。IFNAR2-ECD は複雑な糖鎖を持つタンパク質として合成・精製されたのち、エンド N グルカナーゼの一種 EndoH により糖鎖除去されたため、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）がアスパラギン残基に付加していることを示す。同様に Endoproteinase Asp-N により消化を行った断片も PMF 分析し、アミノ酸配列の同じく 73%をカバーする 12 断片を検出した。65N の全部、94N の全部、166N あるいは 170N の一部の糖鎖を確認した。MALDI-TOF-MS/MS 解析により、トリプシン消化物は全体の 65%をカバーする 11 断片