

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14975

研究課題名(和文) 薬剤耐性の無い核酸系逆転写阻害薬開発に向けた新たな戦略

研究課題名(英文) The new strategy for the development of the inhibitor of reverse transcriptase

研究代表者

永次 史 (Nagatsugi, Fumi)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：90208025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗HIV治療薬さらにはB型肝炎の治療薬として多くの核酸誘導体が服用されている。これらの核酸誘導体が効かない薬剤耐性ウイルスの出現が問題となる。本研究では薬剤耐性を持つ逆転写阻害核酸薬の設計に向けた新たな戦略の開発を目指した。具体的にはウイルスRNA鋳型鎖とプライマーDNA鎖間に共有結合が形成させることで、薬剤耐性機構であるヌクレオチド除去反応が進行しても、従来の核酸誘導体とは異なり、ウイルスRNA鋳型鎖状に修飾塩基が残り逆転写反応が完全に停止することを期待した。その結果、架橋反応2本鎖DNAはHIV-1逆転写酵素を補足することによりHIV-1逆転写酵素を阻害できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：A number of nucleoside (or nucleotide) reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) are used in the treatment of HIV and hepatitis B. The long term administration of these medicines is required in this treatment, and leads the appearance of the drug-resistance virus. The major mechanism of resistance to NRTIs is a nucleotide excision, in which is removed of chain-terminating 3'-terminal NRTIs. In this study, we aim to develop the new strategy for the design of the reverse transcriptase inhibitor with drug resistance. We expected that the cross-linking reactions between RNA template and primer DNA would lead the inhibition for the reverse transcriptase reaction by forming covalent bond. We prepared the crosslink forming oligonucleotide (CFO) containing 2-amino-6-vinylpurine (AVP) at 3' terminal position of the DNA primer. The CFO can react to the target thymine at the complementary site. The crosslinked duplex DNA can inhibit the HIV-1 reverse transcriptase by capturing this enzyme.

研究分野：核酸化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：逆転写阻害核酸系薬剤 薬剤耐性機構 HIV治療薬 ヌクレオチド除去反応 架橋反応

### 1. 研究開始当初の背景

核酸誘導体は抗がん剤、抗ウイルス薬など様々な薬剤として臨床応用されている。中でも抗 HIV 治療薬さらには B 型肝炎の治療薬として多くの核酸誘導体が服用されている。これらの核酸誘導体は逆転写酵素によりウイルス RNA を鋳型として DNA に取り込まれ、DNA プライマー鎖伸長反応を阻害することでウイルスの増殖を阻害する。しかし、HIV 及び B 型肝炎の治療薬は長期投与が必要となるため、これらの核酸誘導体が効かない薬剤耐性ウイルスの出現が問題となる。これらの治療薬開発には薬剤耐性の克服が必要とされるが、現在のところ薬剤耐性機構に抵抗性を持たせる合理的な創薬指針はまだない。本研究では、薬剤耐性を持つ逆転写阻害核酸薬の開発に向けた新たな戦略の開発を目指した。

### 2. 研究の目的

逆転写阻害核酸系薬剤の耐性機構は、特に HIV 治療薬について研究が進んでおり、耐性機構の主な一因として、ヌクレオチド除去反応があることが明らかとなっている(図 1)。

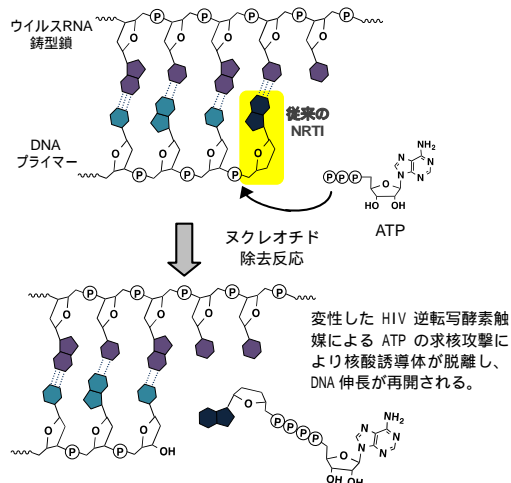


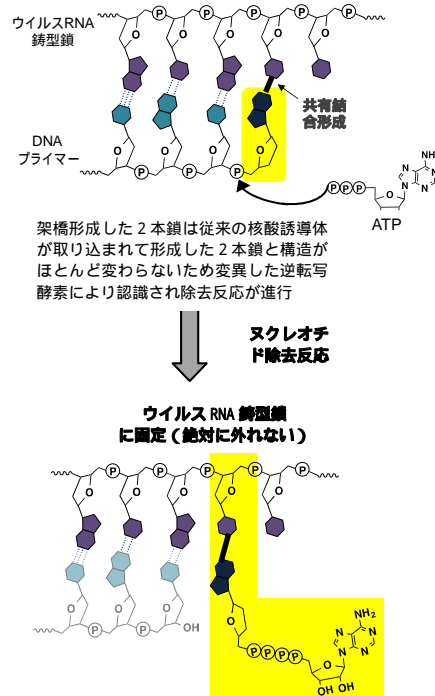
図 1 核酸系逆転写酵素阻害剤に対する耐性メカニズム

変異した HIV-1 逆転写酵素は、プライマー 3' 末端に導入され逆転写反応を停止させている核酸誘導体を認識し、細胞内 ATP の求核付加を介してこの核酸を除去し、逆転写反応

を再開させることが報告されている。本研究では図 1 に示した薬剤耐性機構に着目し、薬剤耐性を克服した逆転写阻害核酸系薬剤に向けた新たな戦略の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、ウイルス RNA 鋳型鎖とプライマー-DNA 鎖間に不可逆的な共有結合を形成する核酸誘導体を用いて耐性機構の克服を目指した新規逆転写酵素阻害を提案した。下記にその概念を示している。ウイルス RNA 鋳型鎖とプライマー-DNA 鎖間に共有結合が形成された後、薬剤耐性機構であるヌクレオチド除去反応が進行しても、従来の核酸誘導体とは異なり、ウイルス RNA 鋳型鎖上に修飾塩基が残ることで、逆転写反応が完全に停止することを期待した。



ヌクレオチド除去反応が進行しても鎖伸長が再開されない

図 2 本申請研究で提案した薬剤耐性機構に着目した新規逆転写酵素阻害剤の開発

今まで報告されている逆転写酵素阻害核酸系薬剤ではいずれも逆転写反応を止めるメカニズムによる DNA 合成阻害であることから、ウイルス変異によりポリメラーゼが除去修復機能を会得した場合には薬剤が効かなくなる。本研究では、これらの耐性メカニズ

ムを逆にとり、ウイルス RNA 鋳型鎖に共有結合を形成する架橋反応性核酸を用いることでその耐性機構の完全抑制を試みている点が非常に斬新であると考えられる。現在、B 型肝炎治療薬に関する薬剤耐性機構はまだ詳細には不明であるが、HIV 治療薬に対するのと同様にヌクレオチド除去反応がその機構の一つであることが提案されている。今回の申請研究により確立される方法論は B 型肝炎治療薬に関する薬剤耐性機構解明に寄与するのみならず、新たな治療薬創製の創薬指針を提案できるものと考えている。

#### 4. 研究成果

まずプライマーの 3' 末端に AVP の前駆体を持つオリゴヌクレオチドを合成し、テンプレート DNA に対する反応性を検討した。その結果、中性条件下で相補的な位置のチミンと反応することがわかった。

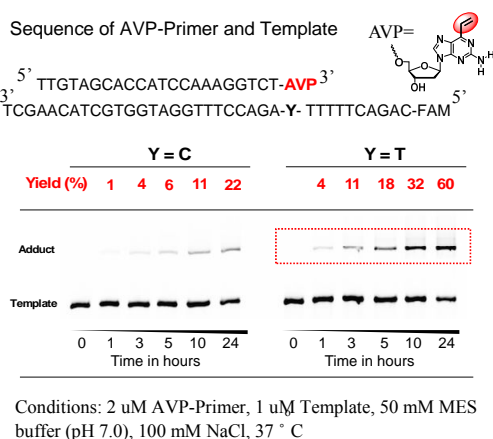


図3 AVP を持つオリゴと標的に対する反応性

次に、アルキル化された 2 本鎖をゲルで単離し、HIV 逆転写酵素によるプライマー伸長反応を行った。その結果を図 4 に示している。天然型のプライマーでは、dNTP を 4 種類入れたときに、全長の DNA が伸長していることがわかる。一方、プライマーをテンプレートと架橋させた場合には dNTP を 4 種類加えたときに、一番短い生成物が主生成物として得られている。

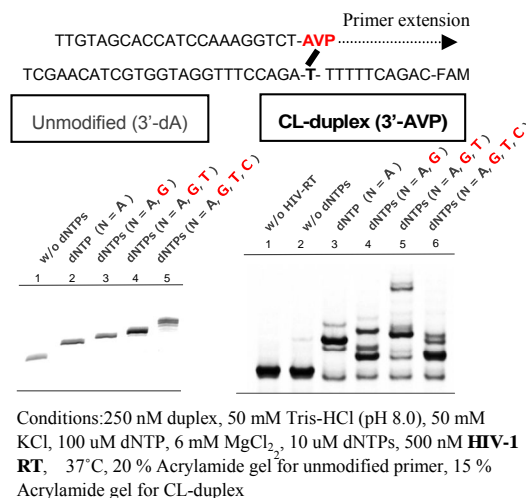
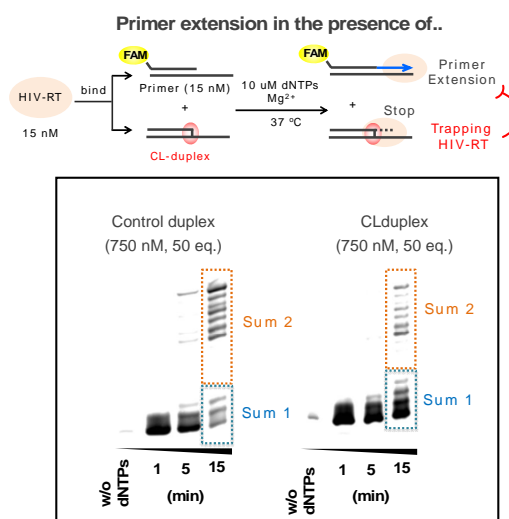


図3 HIV-1 逆転写酵素を用いたプライマー伸長反応

この主生成物は dATP のみを加えて伸長反応を行った時よりもさらに短い瀬生物が得られており、架橋によりプライマー伸長反応が阻害されていることを示す結果である。どこで伸長が止まっているのかは明らかではないが、dNTP を 4 種類加えたときに、一番伸長が阻害されていることは非常に興味深い。



$$\% \text{ Inhibition Efficiency} = \frac{\text{Sum 1}}{\text{Sum 1} + \text{Sum 2}} \times 100$$

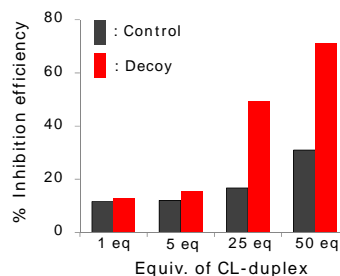


図4 デコイ CL-DNA による HIV-1 逆転写酵素阻害

次に、架橋反応した 2 本鎖 DNA がデコイと

して働き、HIV-1 逆転写酵素を阻害する可能性について検討した。すなわち、通常のプライマーとテンプレートを含む反応系に、架橋反応した 2 本鎖 DNA を加え、HIV-1 逆転写酵素が阻害されるかどうかについて調べた。

その結果、架橋した 2 本鎖は濃度依存的に HIV-1 逆転写酵素を阻害することがわかった。これらの結果は、架橋反応性核酸が HIV-1 逆転写酵素を阻害できることを示している。当初の目的であった除去修復反応の阻害に関しては、用いた HIV-1 逆転写酵素には除去修復反応を起こす活性がなく、現在のところ、検討できてはいない。今後、酵素の活性についても検討する必要があると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

- (1) K. Yamada, S. Ishiyama, K. Onizuka, F. Nagatsugi, Synthesis and properties of Cross-linkable DNA duplex using 4-Amino-2-Oxo-6-vinyl-1,3,5-Triazine, *Tetrahedron*, 査読有 **2017**, 73, 1424-1435 (2017.3) DOI: 10.1016/j.tet.2017.01.043.
- (2) Akisawa Takuya, Yamada Ken, Nagatsugi Fumi, Synthesis of peptide nucleic acids (PNA) with a crosslinking agent to RNA and effective inhibition of dicer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有 **2016**, 26, 5902-5906, DOI:10.1016/j.bmcl.2016.11.002
- (3) Nagatsugi Fumi, Development of the Strategy for Chemical Modifications to Nucleic Acids, *Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan*, 査読有 **74(5)**, 494-504 (2016)
- (4) Sato, N., Tsuji, G., Sasaki, Y., Usami, A., Moki, T., Onizuka, K., Yamada, K. and Nagatsugi, F. A new strategy for site-specific alkylation of DNA using oligonucleotides containing an abasic site and alkylating probes. *Chem. Commun.*, 査読有, **51**, 14885-14888 (2015). DOI:10.1039/c5cc03915k.
- (5) Kusano, S., Ishiyama, S., Lam, S.L., Mashima, T., Katahira, M., Miyamoto, K., Aida, M. and Nagatsugi, F. Crosslinking reactions of 4-amino-6-oxo-2-vinyl pyrimidine with guanine derivatives and structural analysis of the adducts. *Nucleic Acids Research*, 査読有 **43**, 7717-7730 (2015) DOI: 10.1093/nar/gkv797
- (6) Akisawa, T., Ishizawa, Y., Nagatsugi, F. Synthesis of Peptide Nucleic Acids Containing a Crosslinking Agent and Evaluation of Their Reactivities, *Molecules*, 査読有 **20**, 4708-4719 (2015) DOI:10.3390/molecules20034708
- (7) Kikuta, K., Piao, H., Brazier, J., Taniguchi, Y., Onizuka, K., Nagatsugi, F. and Sasaki, S. Stabilization of the i-motif structure by the intra-strand cross-link formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有 **25**, 3307-3310 (2015) .DOI:10.1016/j.bmcl.2015.05.064

[学会発表](計 72 件)

- (1) 永次 史、鬼塚和光、山田 研、遺伝子発現制御を制御する化学的手法の開発、アライアンス医療材料・デバイス・システムグループ G3 分科会、北海道大学、札幌、北海道 2016/12/2-3
- (2) F. Nagatsugi, K. Odaira, K. Yamada, Yamada, Development of the Chemical Tools for the Alkylation to Nucleic Acid Binding Protein, The Fourth Asian Chemical Biology Conference (ACBC2016), 85 Sky Tower Hotel, Kaohsiung, TAIWAN, 2016/11/28-12/1 invited
- (3) F. Nagatsugi, K. Odaira, K. Yamada, Preparation of "Cross-Linkable duplex" using the Oligonucleotide Containing 4-amino-2-oxo-6-vinyl-1,3,5-triazine, The First A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub, Hotel LEOPALACE Hakata, Fukuoka Japan, 2016/09/22-24 invited
- (4) F. Nagatsugi, Development of the Middle-size Molecules for Alkylation to Highly Ordered Structures of Nucleic Acids, The 2nd International Symposium on Middle Molecular Strategy, Senri Life Science Center, Osaka, Japan, 2016/07/02 invited
- (5) 小平 健太、石山 翔午、山田 研、永次 史、核酸結合性タンパク質を標的とした新規架橋反応性塩基の合成と評価、第 27 回万有シンポジウム、仙台国際センター、(宮城県、仙台市) 2016/6/25
- (6) 山田 研、小平 健太、石山 翔午、鬼塚和光、永次 史、核酸結合性蛋白質との架橋反応を目指したビニルトリアジン誘導体の開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、京都テルサ(京都府京都市) 2016/6/10-12
- (7) F. Nagatsugi, N. Sato, Kobayashi, Y. Sasaki, K. Onizuka, K. Yamada, Selective Reactions to Nucleic Acids with Higher Ordered Structure, 12 th International Symposium on Organic Reactions, Kyoto Terasa, Kyoto, Japan, 2016/04/22 invited
- (8) 小平 健太、石山 翔午、山田 研、永次 史、核酸結合性タンパク質を標的とした新規架橋 反応性核酸誘導体の合成、日本化

- 学会 第 96 春季年会、同志社大学 京田  
辺キャンパス(京都府京田辺市)  
2016/3/24-27
- (9) 山田 研、永次 史、架橋二重鎖を用いた  
酵素的 DNA 伸長反応の阻害日本化学会  
日本化学会 第 96 春季年会、同志社大学  
京田辺キャンパス(京都府京田辺市)  
2016/3/24-27
- (10) Fumi Nagatsugi, Development of the New  
Probes for the Selective Chemical  
Modification to Higher Ordered Structured  
Nucleic Acids, Asian Chemical Biology  
Initiative, Jakarta, Indonesia, Sultan Hotel  
2016/01/30 invited
- (11) Norihiro Sato, Tomohito Kobayashi,  
Yoshihiro Sasaki, Kazumitsu Onizuka, Ken  
Yamada, Fumi Nagatsugi, Development of  
the strategy for the selective chemical  
modification in a hydrophobic site in DNA  
or RNA, Pacificchem 2015, 2015/12/15-20,  
Hawaii, USA
- (12) 永次 史、秋澤拓也、架橋反応性塩基を  
持つ擬相補的 PNA の合成と 2 本鎖 DNA  
に対する反応性評価、第 1 回日本核酸医  
薬学会年会、京都テルサ(京都府京都市)、  
2015/11/30-12/2
- (13) 永次 史、核酸結合蛋白質に対する架橋  
形成反応の開発、アライアンス医療材  
料・デバイス・システムグループ G3 分  
科会、大阪大学中の島センター(大阪府  
大阪市) 2015/11/12-13
- (14) Nagatsugi F., Hagihara S., Kusano S.,  
Development of the Effective Chemical  
Strategy for Regulation of Gene  
Expression. Pharmaceutical Science  
Symposium 2015, 2015/10/16-17,  
Sakura-Hall, Sendai, Miyagi, Japan
- (15) Fumi Nagatsugi, Development of the  
crosslinking reactions to RNA for  
application in cells, Pharmaceutical Science  
Symposium 2015, 2015/10/16-17,  
Sakura-Hall, Sendai, Miyagi, Japan 招待講  
演
- (16) 小平健太、石山翔午、山田研、鬼塚和光、  
永次 史、核酸結合性タンパク質との架  
橋反応を目指したビニルトリアジン誘導  
体の合成、第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2015、  
タワーホール船堀(東京都江戸川区)  
2015/10/14-16
- (17) Fumi Nagatsugi, Shuhei Kusano, Shogo  
Ishiyama, Sik Lok Lam, Tsukasa Mashima,  
Masato Katahira, Development of the  
selective crosslinking reactions to  
8-oxoguanine The 42<sup>th</sup> International  
Symposium on Nucleic Acids Chemistry,  
Egret Himeji, Himeji Japan, 2015/9/23-25
- (18) 永次 史、効率的遺伝子発現制御を目指  
した選択的化学反应の開発、第 3 2 回有  
機合成セミナー、ニューウェルシティ湯  
河原(静岡県熱海市)、2015/9/15-17 招待  
講演
- (19) 山田 研、石山 翔午、鬼塚 和光、永次 史、  
核酸結合性蛋白質との反応を目指したビ  
ニルトリアジンを有する核酸誘導体の開  
発、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、  
熊本大学工学部・黒髪南キャンパス(熊  
本県熊本市)、2015/9/10-12
- (20) 宇佐美 彬、佐藤憲大、鬼塚和光、永次  
史、RNA を高次構造選択的に化学修飾す  
る小分子プローブの開発、第 9 回バイオ  
関連化学シンポジウム、熊本大学工学  
部・黒髪南キャンパス(熊本県熊本市)、  
2015/9/10-12
- (21) 鬼塚和光、Hazemi Madoka Eurika、永次  
史、生化学ツールのための架橋形成した  
天然擬似 2 本鎖 RNA の合成、第 9 回バ  
イオ関連化学シンポジウム、熊本大学工  
学部・黒髪南キャンパス(熊本県熊本市)、  
2015/9/10-12
- (22) 佐々木欣宏、佐藤 憲大、辻 巖一郎、茂  
木 琢真、鬼塚 和光、永次 史、DNA 高  
次構造選択的にアルキル化する小分子の  
開発、第 9 回バイオ関連化学シンポジウ  
ム、熊本大学工学部・黒髪南キャンパス、  
(熊本県熊本市)、2015/9/10-12
- (23) Yusuke Abe, Ken Yamada, Yuta Ida, and  
Fumi Nagatsugi, Synthesis and Evaluation  
of the Reactivity of  
7-Deaza-6-vinylguanosine Derivatives,  
Tohoku University Campus Asia Program  
Summer School 2015, 2015/8/28-30,  
Tohoku Univ. Aobayama Campus, Sendai,  
Miyagi, Japan
- (24) Tomohito Kobayashi, Kazumitsu Onizuka,  
Fumi Nagatsugi, Synthesis of vinyltriazine  
derivatives aiming at alkylation to U-U  
mismatch structure in RNA, Tohoku  
University Campus Asia Program Summer  
School 2015, 2015/8/28-30, Tohoku Univ.  
Aobayama Campus, Sendai, Miyagi, Japan
- (25) Yoshihiro Sasaki, Norihiro Sato, Genichiro  
Tsuji, Ken Yamada, Fumi Nagatsugi,  
Development of small molecular probes for  
selective alkylation of the higher-order  
structure of nucleic acids, Tohoku  
University Campus Asia Program Summer  
School 2015, 2015/8/28-30, Tohoku Univ.  
Aobayama Campus, Sendai, Miyagi, Japan
- (26) 秋澤 拓也、永次 史、遺伝子の発現を  
効率よく制御可能な架橋反応性ペプチド  
核酸(PNA)の開発、日本ケミカルバイオ  
ロジー学会 第 10 回年会、東北大学 川  
内萩ホール(宮城県仙台市) 2015/6/10-12
- (27) 山田 研、石山 翔午、鬼塚和光、永次 史、  
核酸結合性蛋白質との架橋反応を目指し  
たビニルトリアジン誘導体の開発、日本  
ケミカルバイオロジー学会 第 10 回年

会、東北大学 川内萩ホール（宮城県仙台市） 2015/6/10-12

- (28) 秋澤 拓也、永次 史、架橋反応性ペプチド核酸（PNA）を用いた遺伝子発現制御法の開発、第26回万有シンポジウム、仙台国際センター（宮城県仙台市） 2015/6/6

〔その他〕

<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/nagatsugi/>

## 6. 研究組織

(1) 永次 史（NAGATSUGI, Fumi）  
東北大学・多元物質科学研究所・教授  
研究者番号：90208025