

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790100

研究課題名 (和文) 分子モデリングに基づく擬似対称型酵素阻害剤の分子設計

研究課題名 (英文) Molecular modeling based design of pseudo-symmetric enzyme inhibitors

研究代表者

日高 興士 (HIDAKA KOUSHI)

京都薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：30445960

研究成果の概要：基質遷移状態を模倣した理想的なヒドロキシルメチルカルボニル(HMC)構造とヒドラジド構造を融合した「HMC-ヒドラジド」を組み込む擬似対称型化合物をデザインした。HIV プロテアーゼとの複合体の分子モデリングを構築し、実際に HMC-ヒドラジド化合物を合成して、強力な HIV プロテアーゼ阻害剤へと導いた。また、本デザイン手法をマラリア原虫プラスメプシンの阻害剤にも応用し、対称型酵素でないアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤にも適応可能であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：酵素阻害剤、擬似対称型、分子モデリング、分子設計、アスパラギン酸プロテアーゼ、HIV プロテアーゼ、プラスメプシン、ヒドロキシメチルカルボニル

1. 研究開始当初の背景

HIVプロテアーゼ阻害剤は、その高い有効性からHIV感染の多剤併用療法(HAART)を可能とし、世界中のエイズ患者にとっての治療法に飛躍的な進歩をもたらした。しかし、HAARTによっても体内から完全にHIVを除去できないことから、生涯にわたる治療が不可欠となった。そのため長期治療における副作用や薬剤耐性ウイルスの出現など多くの問題が生じ、解決されないままである。これらの問題を克服するために、これまでの日

本独自の研究として、基質遷移状態概念に基づいたヒドロキシルメチルカルボニル(HMC)を組み込んだHIVプロテアーゼ阻害剤がデザインされ、X線結晶構造解析およびNMR解析によりHMCが理想的な基質遷移状態ミミックであることが証明されている (Kiso, Y., *et al. Biopolymers*, **51**, 59–68 (1999))。さらに阻害剤の低分子化にも成功し、既存薬耐性変異株にも高活性をもつジペプチド型阻害剤 (KNI-764, 又はJE-2147, AG-1776, SM-319777) を得ており、第2相の臨床試験にまで進んだ。

また、近年では1日1回投与で、しかも脂質代謝に関連する副作用がないと言われる Atazanavir が日本でも使用されるようになり、エイズ患者の期待が寄せられている。Atazanavir はヒドラジド構造を有する擬似対称型 (pseudo-symmetric) の化合物として特徴的である。そこで本研究では、HMC 構造とヒドラジド構造を融合した「HMC-ヒドラジド」を組み込むことで擬似対称型の化合物をデザインし、高活性な新規 HIV プロテアーゼ阻害剤を創製することにより、副作用や耐性問題の克服可能な抗 HIV 薬の開発を目指す。

HIV プロテアーゼ阻害剤研究は、新規化合物については近年報告が減少しつつあるが、耐性ウイルスの出現等の問題点から今後も重要と思われる。擬似対称型 HIV プロテアーゼ阻害剤については、これまで国外において精力的に研究がなされ、Atazanavir の臨床使用に至っている。本研究の「HMC-ヒドラジド」と称する遷移状態イソステアは、著者らが独自にデザインしたものであり、既に擬似対称型化合物へと応用し、 K_i 値が nM レベルの強い HIV プロテアーゼ阻害活性をもつ化合物をいくつか得ることに成功した (Hidaka, K., *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**(1), 93–96 (2003))。よって、「HMC-ヒドラジド」に基づいた擬似対称型化合物をデザインすることにより、副作用や耐性 HIV を克服する薬剤の開発につながるかと期待できる。

本研究の「HMC-ヒドラジド」構造は、HIV プロテアーゼ阻害剤に応用できたという研究成果から、他のアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤の設計にも「HMC-ヒドラジド」を進展できると考えられる。マラリアは年間約 200 万人が命を落とす感染症で、近年における地球温暖化や交通手段の発達によるマラリア感染地域の拡大や、クロロキンなどの既存薬に耐性を有するマラリア原虫の出現は深刻な問題となっている。マラリア原虫はヒト体内での生活環において、赤血球中でヘモグロビンを分解して生じるアミノ酸を栄養としており、この分解には原虫固有のアスパルティックプロテアーゼであるプラスメプシン (Plm) が関与している。これまでに HIV プロテアーゼと Plm との非常に類似した基質認識に着目することにより、HMC 構造に基づく HIV プロテアーゼ阻害剤が Plm 阻害活性および赤血球中での抗マラリア活性を示すことがわかっている。また近年 Plm と HMC 構造に基づく KNI-764 との X 線結晶構造が得られた (Clemente, J., *et al. Acta Crystallographica*, **D62** (3), 246–252 (2006))。そこで本研究の「HMC-ヒドラジド」構造を有する擬似対称型化合物を Plm 阻害剤の論理的デザインに発展し、既存薬とは異なる抗マラリア剤の開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、HMC 構造とヒドラジド構造を融合した「HMC-ヒドラジド」を組み込むことで擬似対称型の化合物をデザインし、分子モデリングに基づき高活性な新規 HIV プロテアーゼ阻害剤を創製することにより、副作用や耐性問題を克服できる抗 HIV 薬の開発を目指す。

また同様のアスパラギン酸プロテアーゼであるマラリア原虫由来酵素 Plm は基質認識が HIV プロテアーゼと非常に類似しており、HMC 構造に基づきデザインされた HIV プロテアーゼ阻害剤が Plm 阻害活性を示し、赤血球中での抗マラリア活性を示すことが分かっている。既に Plm と HMC 構造に基づく化合物との X 線結晶構造が得られている。そこで本研究の「HMC-ヒドラジド」構造を有する擬似対称型化合物を Plm 阻害剤の論理的デザインに発展させ、既存薬とは異なる抗マラリア剤の開発に役立てる。

3. 研究の方法

(1) HMC-ヒドラジド含有擬似対称型 HIV-プロテアーゼ阻害剤のデザインおよび合成

これまでに HMC 構造を擬似対称型化合物に組み込む分子設計のため、HMC 構造に基づくジペプチド型阻害剤 KNI-577 を用いた。すなわち KNI-577 の HMC の α 炭素とカルボニル炭素の間に C_2 回転軸を想定し、回転前の KNI-577 と 180 度回転した後の KNI-577 を重ね合わせた。次にそれぞれの P' 部位を除去し、残った部分を融合するために HMC-ヒドラジド構造を用いることにより KNI-1276 をデザインした。この方法を用いて、他の既存の高活性 HIV プロテアーゼ阻害剤を KNI-577 と置き換えることで、種々の化合物のデザインが可能である。そこで、既存の種々の高活性 HIV プロテアーゼ阻害剤をこのデザインにあてはめた擬似対称型化合物の合成を行った。合成は従来の保護基を用いたペプチド縮合法により行った。

(2) 2つの阻害剤を組み合わせた擬似対称型 HIV-プロテアーゼ阻害剤の合成

KNI-1276 のデザイン手法は、2つの阻害剤の組合せへと応用することができ、既に高い HIV プロテアーゼ阻害活性を示す化合物を得ることに成功している。そこで、分子モデリングの構築により可能と考えられる組み合わせを広げることにより、より優れた高活性 HIV プロテアーゼ阻害剤を合成した。従来の保護基を用いたペプチド縮合法により合成した。

(3) HMC-ヒドラジド含有擬似対称型プラスメプシン (Plm) 阻害剤のデザインおよび合成

基質分子認識に基づいた Plm 阻害剤を、

HMC-ヒドラジド構造を組み込んだ擬似対称型分子の設計手法および X 線結晶構造にあてはめてデザインし、擬似対称化合物の合成を行った。合成は従来の保護基を用いたペプチド縮合法により行った。

(4) 擬似対称型阻害剤と標的酵素との複合体の分子モデリング構築

分子モデリング計算には、モデリングソフト *MOE 2007.09* (CCG 社、カナダ) を用い、MMFF94x 力場を採用した。酵素の X 線結晶構造データには、HIV-1 プロテアーゼには PDB ID, 1HPX, そして Plm II には PDB ID, 1SME を使用した。阻害剤の HMC のカルボニル酸素が近い酵素の活性中心 Asp 残基は意図的にプロトン化させて用いた。予め MM 計算により安定化させた阻害剤から 20 Å の範囲を TIP3P 水分子で囲み、阻害剤と接触する酵素アミノ酸残基、フラップ領域、阻害剤に接触する水分子、これら以外を固定化して、MD シミュレーションを実行し、データを採取した。

(5) 酵素阻害活性の評価

上記デザインにより合成した擬似対称型化合物の HIV-1 プロテアーゼに対する阻害活性について、合成蛍光基質を用いて HPLC により基質断片を検出し、阻害率を定量した。また、Plm II に対する阻害活性については、蛍光基質を用いて加水分解速度を求め、 K_i 値を算出した。

4. 研究成果

(1) 上記の方法によるデザインを、既存の高活性 HIV プロテアーゼ阻害剤であるジペプチド型の KNI-727 と、トリペプチド型の KNI-272 を用いた擬似対称型化合物の合成を行った。KNI-727 を基にデザインした阻害剤は、これまでの KNI-577 を基にした阻害剤 (83% at 5 μ M) と比べて HIV-1 プロテアーゼ阻害活性が低下した (51% at 5 μ M)。一方で、トリペプチド型の KNI-272 を基にデザインした化合物は、阻害活性が非常に強いことが分かった (KNI-2114: 99% at 5 μ M, 92% at 50 nM, Fig. 1)。これら阻害剤は、HMC の立体がアロフェニルノルスタチン ((2*S*,3*S*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid) を有している。KNI-577 由来の擬似対称型化合物の場合では、HMC の水酸基の立体化学が異なるフェニルノルスタチン ((2*R*,3*S*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid) と比べて、阻害活性に大きな違いが見られなかった。そこで、これら新規阻害剤について同様にフェニルノルスタチンに変換した阻害剤を合成したところ、阻害活性は低

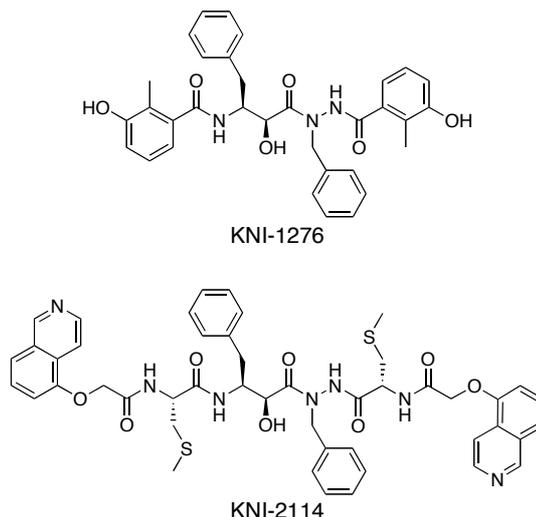


Fig. 1. KNI-1276 と KNI-2114 の構造

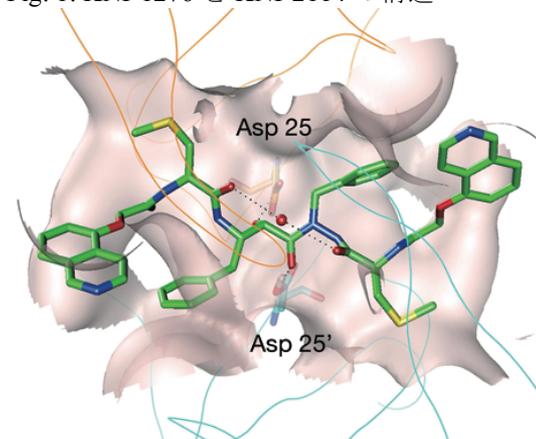


Fig. 2. HIV プロテアーゼ活性部位に結合する KNI-2114 の分子モデル

下することが分かった。このように、KNI-727 や KNI-272 の場合に、阻害活性に大きな差が見られるようになったことから、阻害剤のサイズが大きくなると、アロフェニルノルスタチンの立体が好まれ易くなると考えられる。

(2) 基質遷移状態概念に基づいたヒドロキシルメチルカルボニル(HMC)を組み込んだ HIV プロテアーゼ阻害剤と HIV-1 プロテアーゼとの相互作用が、これまで X 線結晶構造解析および NMR 解析により推察されていたが、中性子結晶構造解析により水素結合相互作用が明らかにされ、HMC が理想的な基質遷移状態ミミックであることが証明された。そこで、HMC-ヒドラジドを組み込んだ擬似対称型化合物のデザイン手法により合成した比較的強い HIV プロテアーゼ阻害活性を示す化合物と HIV-1 プロテアーゼとの複合体の分子モデリングを構築した。HMC と活性中心の 2 つの Asp 残基の相互作用を維持しながら、KNI-2114 は巧く結合できることが分かった (Fig. 2)。しかし、酵素と結合していな

いときの安定なコンフィメーションと比べて、ヒドラジド部分にはやや歪みがかかっていた。阻害剤が大きくなると、他の相互作用が大きくなるため、歪みを許容できる立体がアロフェニルノルスタチンに制限されてくると推察される。

(3) KNI-1276 のデザイン手法は2つの阻害剤の組合せへと応用できることから、KNI-577、KNI-727、KNI-272 を基に、分子モデリングの構築により可能な組み合わせについて、デザインし、合成した。また、これら化合物について HMC の水酸基の立体化学の異なるフェニルノルスタチン型も全て合成した。これら誘導体の HIV プロテアーゼ阻害活性の結果から、アロフェニルノルスタチンを有する誘導体のほうが、フェニルノルスタチン体よりも阻害活性が優れていた。このことも、前述の一つの阻害剤の擬似対称型化合物の結果と一致している。阻害活性は、比較的強いが、KNI-2114 を上回るものは得られなかった。

(4) 擬似対称型化合物の合成は、HMC の水酸基を保護する新規合成経路を確立した。そこで、Atazanavir のコア構造を HMC-ヒドラジドへと変換した擬似対称型化合物を合成した。HIV-1 プロテアーゼ阻害活性の評価より、阻害活性は Atazanavir と比べて低かったが、これらの擬似対称型化合物は有為な阻害活性をもつことが分かった。この場合では、アロフェニルノルスタチンを有する誘導体のほうが、フェニルノルスタチン体よりも阻害活性が低かった。このように、ヒドラジドの側鎖が長くなる場合は、HMC の立体選択性が変わることが分かった。

(5) HMC-ヒドラジドを組込むデザイン手法をマラリア原虫由来のプラスメプシンに応用して、擬似対称型化合物を合成した。プラスメプシン II 阻害活性を評価したところ、若干活性は低い、 K_i 値が μM レベルの有為な阻害活性を示した。よって、HMC-ヒドラジドを用いたデザイン手法が、他のアスパラギン酸プロテアーゼにも応用できること示された。

以上の結果から、HMC 構造とヒドラジド構造を融合した「HMC-ヒドラジド」を組み込んだ擬似対称型の化合物をデザインすることにより、高活性な新規 HIV プロテアーゼ阻害剤を創製することができた。分子モデリングにより HMC-ヒドラジド構造の特徴が観察されたことで、更に活性を向上できることが予想される。今後、変異プロテアーゼに対する検討を行うことで、耐性 HIV を克服する

阻害剤が創出できる可能性がある。阻害活性が比較的弱い、更にマラリア原虫プラスメプシンの阻害剤にも応用できたことは、HMC-ヒドラジドに基づく擬似対称型阻害剤が、対称型酵素のみでなく、様々なアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤に適応できることを示しており、大変興味深い結果である。

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 5 件)

- ① Motoyasu Adachi, Takashi Ohhara, Kazuo Kurihara, Taro Tamada, Eijiro Honjo, Nobuo Okazaki, Shigeki Arai, Yoshinari Shoyama, Kaname Kimura, Hiroyoshi Matsumura, Shigeru Sugiyama, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Yusuke Mori, Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso, and Ryota Kuroki: Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high resolution X-ray and neutron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (12), 4641–4646 (2009). 査読有り.
- ② Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Adam J. Ruben, Tsuyoshi Uemura, Mami Kamiya, Aiko Kiso, Tetsuya Okamoto, Yumi Tsuchiya, Yoshio Hayashi, Ernesto Freire, and Yoshiaki Kiso: Antimalarial activity enhancement in hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere-based dipeptidomimetics targeting malarial aspartic protease plasmepsin. *Bioorg. Med. Chem.*, **16** (23), 10049–10060 (2008). 査読有り.
- ③ Shingo Nakatani, Koushi Hidaka, Ei'ichi Ami, Koichiro Nakahara, Akihiko Sato, Jeffrey-Tri Nguyen, Yoshio Hamada, Yasuko Hori, Nobuyuki Ohnishi, Akinori Nagai, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, and Yoshiaki Kiso: Combination of Non-natural D-amino acid derivatives and allophenylnorstatine-dimethylthioproline scaffold in HIV protease inhibitors have high efficacy in mutant HIV. *J. Med. Chem.*, **51** (10), 2992–3004 (2008). 査読有り.
- ④ Ei'ichi Ami, Koichiro Nakahara, Akihiko Sato, Jeffrey-Tri Nguyen, Koushi Hidaka, Yoshio Hamada, Shingo Nakatani, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, and Yoshiaki Kiso: Synthesis and antiviral property of allophenylnorstatine-based HIV protease inhibitors incorporating D-cysteine derivatives as P2/P3 moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (15), 4213–4217 (2007). 査読有り.
- ⑤ Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Yumi Tsuchiya, Mami Kamiya, Adam J. Ruben, Ernesto Freire, Yoshio Hayashi, and Yoshiaki Kiso: Additional interaction of

allophenylnorstatine-containing tripeptidomimetics with malarial aspartic protease plasmepsin II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (11), 3048–3052 (2007). 査読有り.

研究者番号：

〔学会発表〕（計5件）

- ① 日高興士、香月紀子、木村徹、木曾良明：HIV プロテアーゼ周辺の水分子を標的としたアロフェニルノルスタチン型阻害剤の設計. 第22回日本エイズ学会学術集会, 大阪国際交流センター(大阪), 2008. 11.
- ② 柏本 啓介、日高興士、上村剛史、木村徹、Adam J. Ruben、Ernesto Freire、林良雄、木曾良明：プラメプシン阻害剤の抗マラリア活性向上に影響する置換基研究. 第13回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪), 2007. 8.
- ③ 日高興士、木村徹、阿見英一、中谷真悟、香月紀子、佐藤彰彦、中原宏一郎、林良雄、木曾良明：アロフェニルノルスタチンをスキャフォールドとする HIV プロテアーゼ阻害剤設計. 第21回日本エイズ学会学術集会, 広島国際会議場(広島), 2007. 11.
- ④ Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Yumi Tsuchiya, Mami Kamiya, Ernesto Freire, Ben M. Dunn, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: HIV protease and malarial plasmepsin inhibitors with hydroxymethylcarbonyl isostere. 5th General Meeting of the International Proteolysis Society (Conference and Cultural Center, University of Patras, Patras, Greece), 2007. 10.
- ⑤ 香月紀子、日高興士、木村徹、Hamdy M. Abdel-Rahman、松本光、田中良明、Keith F. McDaniel、Tatyana Dekhtyar、Lynn Colletti、林良雄、木曾良明：アミノ基導入によるジペプチドミメティックの抗HIV活性の改善. 第12回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪), 2007. 8.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高 興士 (HIDAKA KOUSHI)
京都薬科大学・薬学部・助手
研究者番号：30445960

(2) 研究分担者

該当無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当無し ()