

機関番号：34306  
 研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790121  
 研究課題名 (和文) 水素結合架橋水を配置する擬似対称型プロテアーゼ阻害剤の設計研究  
 研究課題名 (英文) Design of pseudo-symmetric protease inhibitors setting hydrogen-bonding bridging water molecules  
 研究代表者  
 日高 興士 (HIDAKA KOUSHI)  
 京都薬科大学・薬学部・助教  
 研究者番号：30445960

研究成果の概要 (和文)：独自の遷移状態ミミックである「HMC-ヒドラジド」を用いて、複数の架橋水を配置する擬似対称型 HIV プロテアーゼ阻害剤を設計した。合成した擬似対称型化合物は多数の変異を導入した HIV プロテアーゼに対して阻害活性は低下したが、両末端にオキサミド構造を有する誘導体の活性低下が比較的小さいことが分かった。また、合成した擬似対称型化合物は HTLV-I プロテアーゼ阻害活性をもつことを見いだした。

研究成果の概要 (英文)： Pseudo-symmetric protease inhibitors which have unique “HMC-hyrazide” as a transition state mimic to set multiple bridging waters were designed. Although the synthetic pseudo-symmetric compounds exhibited some reduction of inhibitory activity against multi-mutated HIV protease, the activity reduction of derivatives with oxamide at both terminals were relatively less. The pseudo-symmetric compounds also exhibited HTLV-I protease inhibitory activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：感染症、酵素、阻害剤、分子設計、分子認識、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、架橋水

#### 1. 研究開始当初の背景

HIV 感染治療に HIV プロテアーゼ阻害剤が使われて多剤併用療法(HAART)が可能となり、エイズ患者の死亡率は劇的に低下した。現在ではエイズが慢性疾患と扱われるまでになってきたが、HAART によっても体内から完全に HIV を除去することはできない。このため、長期治療での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ている。これらの問題の克服に向けた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

キシメチルカルボニル(HMC)を組み込む HIV プロテアーゼ阻害剤がデザインされ、中性子結晶構造解析により HMC と活性中心の2つのアスパラギン酸とが水素結合相互作用することが証明されている。一方、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。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化合物をデザインし、新規な高活性 HIV プロテアーゼ阻害剤を創製することにより、薬剤耐性や副作用の間を克服できる抗 HIV 薬の開発を目指す。

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を合成し、 $K_i$  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ている (Hidaka, K., *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**(1), 93–96 (2003))。また、最近著者らは、HMC を持つ基質型阻害剤 KNI-764 に D-アミノ酸誘導体を組合せた結果、Nelfinavir や Ritonavir に耐性を示す HIV に対して活性が向上する化合物を見いだした (Nakatani, S., *et al. J. Med. Chem.*, **51**, 2992–3004 (2008))。種々の変異 HIV プロテアーゼとの複合体の分子モデリングを構築し、分子動力学計算を行ったところ、D-アミノ酸部分と酵素との間に水素結合相互作用を介して安定に結合する、新たな架橋水 (bridging water) が観察された。このような架橋水の配置により阻害剤は間接的に酵素と結合するため、プロテアーゼのアミノ酸残基の変異に影響し難い相互作用として有用と考えられ、大変興味深い。そこで、D-アミノ酸誘導体のような架橋水を配置する構造を「HMC-ヒドラジド」に導入し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と期待できる。

また本研究の「HMC-ヒドラジド」構造は、既に 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発展できると考えられる。既に HIV プロテアーゼと基質認識が似ているマラリア原虫アスパラギン酸プロテアーゼであるプラスメプシンと HMC 構造に基づく KNI-764 との X 線結晶構造が得られており、HMC 構造の有用性が分かってきた。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に架橋水を配置する構造を導入する考えを、プラスメプシン阻害剤の論理的デザインへと発展させ、既存薬とは異なる抗マラリア剤が開発できると期待できる。

## 2. 研究の目的

水素結合架橋水を配置する構造を導入した「HMC-ヒドラジド」に基づく擬似対称型化合物のデザインと合成を行い、酵素阻害活性を評価することにより、「HMC-ヒドラジド」のアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤への有用性を明らかにする。HIV プロテアーゼ阻害剤としては、これまでの成果をもとに「HMC-ヒドラジド」構造の水酸基の 2 種類

の立体と阻害活性の比較を詳細に検討し、阻害活性に好ましい水酸基の立体を求め、高活性化合物を獲得する。得られた高活性化合物の HIV プロテアーゼ複合体分子モデルを構築し、変異プロテアーゼとの新たな架橋水の形成を含めた構造最適化を行い、副作用や耐性問題の克服が可能な抗 HIV 薬の開発に役立てる。また、「HMC-ヒドラジド」を用いる阻害剤設計手法を HIV プロテアーゼと基質認識が類似する他のアスパラギン酸プロテアーゼに応用することにより、「HMC-ヒドラジド」の有用性を広げる。

## 3. 研究の方法

(1) 水素結合架橋水を配置する擬似対称型 HIV プロテアーゼ阻害剤のデザインと合成

HMC 構造を擬似対称型化合物に組み込む分子設計には、HMC 構造に基づく既存の高活性の基質型ジペプチド型阻害剤を用いた。すなわち、HMC の  $\alpha$  炭素とカルボニル炭素の間に  $C_2$  回転軸を想定し、回転前の阻害剤と 180 度回転した後の阻害剤を重ねさせた。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擬似対称型化合物をデザインした。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。水酸基の立体の異なるジアステレオマーを同様の方法にて合成した。

耐性 HIV に対して活性が向上する D-アミノ酸誘導体を導入した阻害剤と酵素との複合体の分子モデルの MD 計算の結果、2 つ安定な架橋水が相互作用することが新たに観察されている。その D-アミノ酸誘導体の構造にあるスルフォニル基が架橋水の配置に関与することから、スルフォニルの様な水素結合受容体となる官能基を擬似対称型分子に導入すると、4 つの架橋水を配置できると予想した (図 1)。そこで、種々の架橋水が配置可能な構造を取り入れた擬似対称型化合物合成を行った。従来の保護基を用いたペプチド縮合法により合成した。

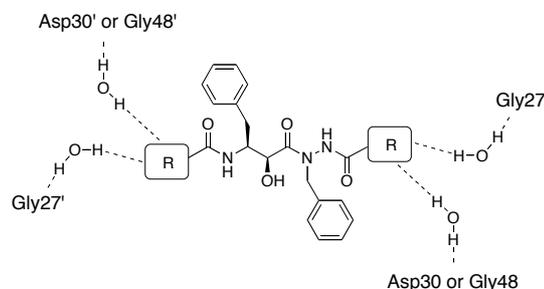


図 1. 架橋水を配置する擬似対称型化合物の分子設計。

(2) 擬似対称型阻害剤の HIV プロテアーゼ結合モデルの構築および架橋水の同定

分子モデリング計算には、モデリングソフト *MOE 2009.10* (CCG 社、カナダ) を用い、*MMFF94x* 力場を採用した。HIV-1 プロテアーゼの X 線結晶構造データには、PDB ID, 1HPX を使用した。構築した阻害剤の HMC のカルボニル酸素が近い活性中心 Asp 残基は意図的にプロトン化させ、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 シミュレーションによりデータを採取し、安定に存在する架橋水を観察した。

(3) 野生型および変異 HIV プロテアーゼ、HTLV-I プロテアーゼに対する阻害活性評価

HIV-1 プロテアーゼ阻害活性は、合成蛍光ペプチド基質を用いて HPLC により基質断片を検出し、阻害率を定量した。野生型 HIV プロテアーゼに対して強い阻害活性を示す擬似対称型化合物については、ロピナビル耐性由来の L10F/V32I/M46I/I47V/Q58E/I84V の 6 つの変異を導入した変異 HIV プロテアーゼ (A17mut) を用い、野生型酵素と同様の方法にて阻害活性を測定した。HTLV-I プロテアーゼ阻害活性は、L40I 変異を導入した HTLV-I プロテアーゼを用い、固有の合成蛍光基質を用いて基質断片を HPLC により検出し、阻害率を定量した。

#### 4. 研究成果

(1) 種々の既存の高活性基質型 HIV プロテアーゼ阻害剤を用いて、種々の擬似対称型化合物をデザインし、合成を行った。得られた擬似対称型化合物の HIV-1 プロテアーゼ阻害活性を測定したところ、阻害剤濃度 50 nM で 90% 以上の阻害活性を示す化合物を同定した。酵素阻害活性が比較的高かった擬似対称型化合物については、HMC の水酸基の立体が異なるジアステレオマーを合成し、阻害活性の比較を検討したところ、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) である阻害剤のほうが、フェニルノルスタチン ((2*R*,3*S*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid) よりも強く、二つのジアステレオマーの阻害活性の違いに大きな差は無いことが分かった。

D-アミノ酸誘導体のように架橋水が配置可能な構造を取り入れた擬似対称型化合物として、スルフォニル誘導体を導入した擬似対称型化合物をデザインし、合成した。しかし、スルフォニル誘導体を導入した擬似対称型化合物 (図 2、KNI-2181) は野生型 HIV-1 プロテアーゼ阻害活性が 50 nM で検出できなかった。このことから、ヒドラジド側に新たに導入したもう一

方のスルフォニル誘導体が酵素との結合に適さないことが示された。

(2) 次に、スルフォニル誘導体の様な 2 つの水素結合受容体の酸素を有する他の官能基として、置換アミノオキサミド構造に着目した。このオキサミド部分の 2 つのカルボニル酸素がスルフォニル誘導体の酸素と同様に 4 つの架橋水を形成できると考えられるので、両末端にオキサミド構造を有する擬似対称型化合物を設計し、合成した。その結果、酵素阻害活性を示す阻害剤を幾つか同定した。中でも、KNI-2125 (図 2) は比較的強い野生型 HIV-1 プロテアーゼ阻害活性 (86% at 50 nM) を示した。KNI-2125 の HIV-1 プロテアーゼ結合モデルを構築したところ、オキサミドのカルボニル部分とアミド NH 部分が 3 つ架橋水を形成することが予想された (図 3)。

(3) 合成した擬似対称型阻害剤について、ロピナビル耐性株由来の 6 つの耐性変異部位をもつ HIV プロテアーゼ (A17mut) に対する活性評価を行った。野生型と変異体酵素の阻害活性を比較したところ、オキサミド構造をもたない擬似対称型化合物は変異プロテアーゼに対して阻害活性が大きく低下したが、オキサミド構造をもつ誘導体は変異プロテアーゼに対して活性低下の程度小さかった。また、基質型阻害剤の KNI-272 の活性は野生型プロテアーゼではオキサミド誘導体よりも優れるが、変異型プロテアーゼに対してはオキサミド誘導体のほうが阻害活性は高く、活性の逆転が見られた。

(4) 合成した擬似対称型阻害剤の HTLV-I プロテアーゼに対する活性を評価したところ、比較的弱い (〜10% at 50 nM)、阻害活性を示した。

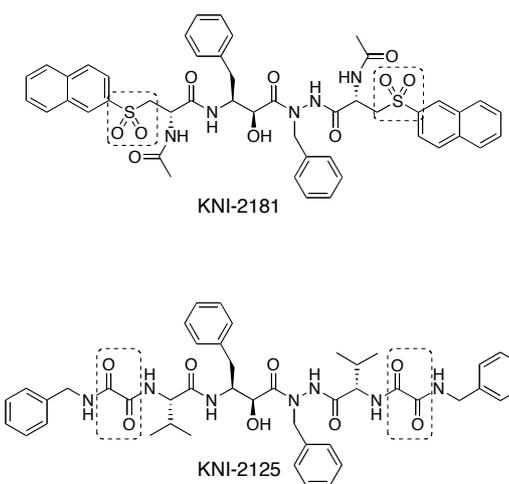


図 2. KNI-2181 および KNI-2125 の構造。

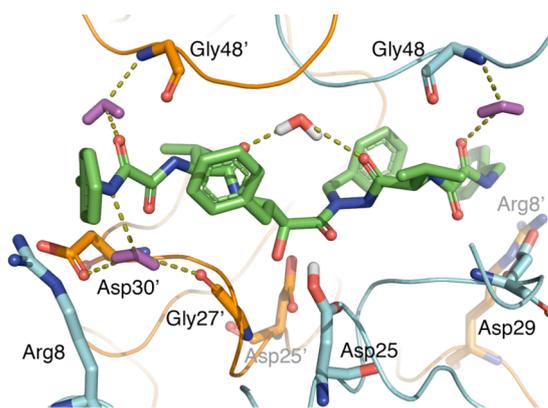


図3. 野生型 HIV プロテアーゼとオキサミド誘導体 KNI-2125 との結合モデル. マゼンタで示す水分子は MD シミュレーションの際に観察された架橋水.

以上の結果から、「HMC-ヒドラジド」を組み込む擬対称型化合物をデザインする上で、両末端にオキサミドカルボニルを用いることにより、高活性な新規 HIV プロテアーゼ阻害剤を創製できた。分子モデルの MD シミュレーションにより安定に存在する 3 つの架橋水が観察され、オキサミド構造には架橋水の形成能力があると予測される。また、薬剤耐性 HIV 由来の変異プロテアーゼに対して、オキサミド構造の有用性が示されたことから、今後、もう一つの架橋水を配置させ、合計 4 つの架橋水を配置するような分子設計を進めることにより、耐性 HIV を克服する阻害剤が創出できると期待できる。また、他の対称型アスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤への応用も可能であることが示された。

#### 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 3 件)

- ① Noriko Shimizu, Shigeru Sugiyama, Mihoko Maruyama, Yoshinori Takahashi, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Koushi Hidaka, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Ryota Kuroki, Yusuke Mori and Hiroyoshi Matsumura: Crystal Growth Procedure of HIV-1 Protease-Inhibitor KNI-272 Complex for Neutron Structural Analysis at 1.9 Å Resolution. *Crystal Growth & Design*, **10** (7), 2990–2994 (2010). 査読有り
- ② Yuko Kawasaki, Eduardo E. Chufan, Virginie Lafont, Koushi Hidaka, Yoshiaki Kiso, Mario Amzel and Ernesto Freire: How much binding affinity can be gained by filling a cavity?

*Chem. Biol. Drug Design*, **75** (2), 143–151 (2010). 査読有り

- ③ Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Hamdy M. Abdel-Rahman, Jeffrey-Tri Nguyen, Keith F. McDaniel, William E. Kohlbrenner, Akhteruzzaman Molla, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Ryota Kuroki, Noriko Katsuki, Yoshiaki Tanaka, Hikaru Matsumoto, Jun Wang, Yoshio Hayashi, Dale J. Kempf and Yoshiaki Kiso. Small-sized human immunodeficiency virus type-1 protease inhibitors containing allophenylnorstatine to explore the S<sub>2</sub>' pocket. *J. Med. Chem.*, **52** (23), 7604–7617 (2009). 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① 戸田侑紀, 且高興土, 濱田貴司, 木曾良明: 薬剤耐性変異を導入した HIV プロテアーゼを標的とする擬対称型阻害剤の構造活性相関研究. 日本薬学会第 131 年会, ツインメッセ静岡 (静岡), 2011.3.
- ② 且高興土, 安達基泰, 黒木良太, 濱田貴司, Rajesh Sankaranarayanan, 木村徹, 木曾良明: ロピナビル耐性株由来の変異を導入した HIV プロテアーゼ誘導体の解析. 第 24 回日本エイズ学会学術集会, 高輪グランドプリンスホテル(東京), 2010. 11.
- ③ 且高興土, 安達基泰, 黒木良太, 濱田貴司, Rajesh Sankaranarayanan, 木村徹, 木曾良明: ロピナビル耐性株由来の HIV プロテアーゼ変異体とアロフェニルノルスタチン阻害剤の相互作用解析. 第 29 回メディスナルケミストリーシンポジウム, 京都テルサ(京都), 2010. 11.
- ④ 且高興土, 安達基泰, 黒木良太, 濱田貴司, Rajesh Sankaranarayanan, 木村徹, 木曾良明: ロピナビル耐性を獲得した変異 HIV プロテアーゼに対するアロフェニルノルスタチン阻害剤の活性評価. 第 24 回近畿エイズ研究会学術集会, 大阪市立総合医療センター (大阪), 2010.6.
- ⑤ 且高興土, Jeffrey-Tri Nguyen, 濱田貴司, 安達基泰, 黒木良太, 木村徹, 木曾良明: 架橋水および水和を利用する HIV プロテアーゼ阻害剤研究. 第 23 回日本エイズ学会学術集会, 名古屋国際会議場(名古屋), 2009. 11.
- ⑥ 且高興土: アロフェニルノルスタチンを骨格とする感染症治療薬設計. 若手研究者シンポジウム, 次世代創薬, 第 28 回メディスナルケミストリーシンポジウム, 東京大学山上会館(東京), 2009. 11.
- ⑦ Koushi Hidaka, T. Hamada, M. Adachi, R. Kuroki, T. Kimura, Y. Kiso: HIV protease inhibitor design to employ water molecules. Sixth General Meeting of the International Proteolysis Society, Surfers Paradise

Marriott Resort & Spa (Gold Coast, Australia), 2009.10.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labo/yakuhin/publicns.html>

## 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・助教

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 ( )

研究者番号：