

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07138

研究課題名（和文）エンドヌクレアーゼ活性を標的とした新規抗インフルエンザ薬の開発

研究課題名（英文）Development of Inhibitors for Influenza Endonuclease Activity

研究代表者

星野 忠次（Hoshino, Tyuji）

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：90257220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼに内包されているエンドヌクレアーゼ活性部位を標的として、インフルエンザ治療薬候補化合物の開発を行った。化合物スクリーニングにより同定した化合物には、共通してピロガロールと呼ばれる骨格構造が含まれていたため、ピロガロール骨格を持つ化合物に絞って開発を進めた。結晶構造解析の結果に基づいて、幾つかの変換構造を考案した。化合物と活性部位との結合親和性を計算機上で結合スコアとして算出し、算出したスコア値を参考に合成する化合物構造を決定した。今回、合成した化合物の中に、最初に同定した化合物よりも阻害活性の高いものが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザ治療薬としては、オセルタミビル、ザミナビル、ペラミビルなどが知られている。これらの薬物は、ウイルスのノイラミニダーゼという酵素を標的としている。また緊急時のみの処方となるが、RNAポリメラーゼ活性を阻害するファビピラビルも認可されている。一般にウイルスは容易にアミノ酸変異が起こるために、薬の効かない薬剤耐性ウイルスが出現し、臨床で深刻な問題となる。ウイルスの薬剤耐性に対処するためには、複数の薬剤群を揃えて、最適な薬剤を選択できるようにすることが肝要であり、本研究は、将来的な抗ウイルス薬物治療の発展につながる。

研究成果の概要（英文）：An influenza inhibitor candidate was developed by targeting an endonuclease active site included in the RNA polymerase of influenza virus. Since the compounds identified by the compound screening commonly contained a skeleton called pyrogallol, the development was advanced on the compound with the pyrogallol skeleton. Based on the results of crystal structure analysis, several transformation structures were devised. The binding affinity between the compound and the active site was calculated as a binding score on a computer, and the compound structure to be synthesized was determined by referring to the calculated score. Among the synthesized compounds, a compound with a high inhibitory activity compound was identified.

研究分野：物理化学

キーワード：抗ウイルス薬 インフルエンザ 医薬品設計 結晶構造解析 有機合成 計算機解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

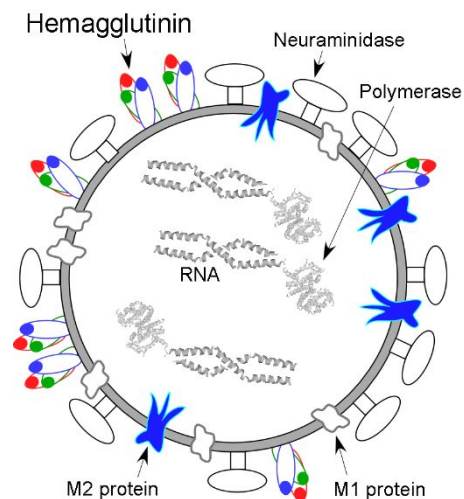
### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは、RNAを編集増幅するためのポリメラーゼを持っている。ポリメラーゼには、RNAを複製するためのポリメラーゼ活性ドメインに加えて、宿主の持つmRNAを切断して利用するためのエンドヌクレアーゼ活性ドメインが内包されている。エンドヌクレアーゼ活性ドメインには、2つの2価金属が包含され、これが核酸を切断するという触媒機能の根底となっている。

2009年の新型インフルエンザの世界的蔓延は、大きな社会的混乱を招いた。また高病原性鳥インフルエンザの出現は、深刻な社会危機を招くと危惧されている。一般にウイルスは容易にアミノ酸変異が起こるために、薬の効かない薬剤耐性ウイルスが出現し、臨床では深刻な問題となる。ウイルスの薬剤耐性に対処するためには、複数の薬剤群を揃えて、ウイルス型に合わせて、最適な薬剤を選択できるようにすることが肝要である。

### 2. 研究の目的

インフルエンザ治療薬として、ウイルスのポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を標的とした薬物を創出する。エンドヌクレアーゼ活性ドメインには、2つの2価金属が包含されている。2価金属は生体に多く存在し、生命活動に必須な物質であるにも関わらず、2価金属の結合したインフルエンザウイルスのポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を選択的に阻害する低分子化合物を設計し、エンドヌクレアーゼ活性部位を標的とした阻害剤として機能し得る物質を確かに作出できるか否かが、本研究では重要になる。インフルエンザウイルスのエンドヌクレアーゼ活性を標的とした薬物として、バロキサビル・マルボキシルが上市された。ところが、比較的、容易に薬剤耐性ウイルスが出現することが知られている。従って、標的部位では、開発する薬物がバロキサビルと異なる結合構造を取ることも重要な設計指針である。



インフルエンザウイルスの模式図

### 3. 研究の方法

エンドヌクレアーゼ活性を標的とした阻害剤を創出するため、結晶構造解析・理論計算・有機合成・生化学実験を融合させ、次の手順で研究を進めた。

1. 活性化化合物と標的タンパク質との結合構造を、X線結晶解析により解き明かす。
2. 改変化合物と標的タンパク質との相互作用を計算機で解析して、薬物の分子設計を行う。
3. 計算機解析により有望と判断された化合物構造とその誘導体の有機合成を行う。
4. 化合物の阻害能を、精製した標的タンパク質を使用し、蛍光プローブを用いて測定する。
5. 阻害活性測定の結果を、化合物の設計と合成に反映させ、候補薬物の最適化を繰り返す。
6. 化合物の存在下で、インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染能を定量化する。
7. 化合物存在下でヒト由来細胞を培養し、化合物に有意な細胞毒性がないことを確認する。

### 4. 研究成果

#### (1) 計算機解析

結晶構造解析の結果に基づいて、幾つかの変換構造を考案した。化合物と活性部位との結合親和性を計算機上で結合スコアーとして算出し、算出したスコアー値を参考に合成する化合物構造を決定した。化合物と標的タンパク質の結合親和性を、独自計算ソフトウェア orientation で算出した。薬物スクリーニングや薬物設計では、同一のタンパク質を標的として、化学構造の異なる多数の化合物について、結合構造や結合親和性を求めて比較する機会が多い。Orientation は並列計算に馴染みやすく、論理的な薬物設計を行うことができる。

結合親和性の計算値を参考に、官能基付加や官能基置換をした修飾化合物など、活性増加の見込める改変分子構造を多数考案した。独自計算ソフトウェアでは、東京大学等の大型計算機センターを利用することで、同時に数百種類の化合物構造の計算が1週間程度で実行できた。並列計算機を駆使して予測評価を繰り返して、有望な化合物構造を見出した。

## (2) 有機合成

化合物合成を行うと、ピロガロール骨格への修飾が合成条件によって困難な場合があることが判明した。ピロガロールを含む化学構造について、有機合成における反応条件を探索した結果、目的とした化合物の骨格構造が比較的容易に得られる合成経路を見つけることができた。阻害候補化合物の合成では、ピロガロール骨格以外の部分構造を合成し、最後にルイス酸を用いて、フリーデル・クラフツ反応でピロガロールに縮合させる方法が有効である。縮合させる部分構造自体がフリーデル・クラフツ反応を起こさないように構造を設計しておくことで、比較的広い種類の化学構造を作成できた。特にピロガロールの水酸基をメトキシ基にすることで、化学的に反応しやすい部分構造でも合成できることが判った。メトキシ基は、最終的に水酸基変換する

## (3) 阻害活性の測定

標的タンパク質のエンドヌクレアーゼ酵素活性は、RNA だけでは無く 1 本鎖 DNA も切断するので、1 本鎖 DNA を基質として使用した。20 塩基程の 1 本鎖 DNA の一方の末端に蛍光物質 (FAM) を、もう一方の末端に光吸収物質 (BHQ) を結合させたプローブを使用して、酵素活性によるプローブ DNA の切断を観察することで、酵素阻害活性の測定を行った。異なる濃度の化合物存在下で、プローブ切断酵素反応の速度をプレートリーダーで測定することで、化合物の阻害能 ( $IC_{50}$  値) を求めた。結晶構造解析と計算機解析を組み合わせることで、効率よく阻害活性の向上した化合物を得ることができるようになった。

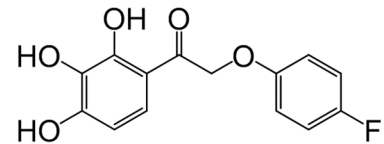
## (4) 結晶構造解析

結晶構造解析については、RNA ポリメラーゼのドメイン A の N 末側の 200 残基弱のエンドヌクレアーゼ部位を部分タンパク質として発現して精製した。タンパク質と合成化合物を混合させて、共結晶を成長させた。X 線回折実験は、シンクロトロン放射光を用いて行い、2.0 Å の分解能で回折像が得られた。また合成して得られた化合物について、X 線共結晶構造解析を進めた。新規の化合物を混合してタンパク質結晶を成長させると、化合物の種類により結晶の成長状況が異なったが、一つの化合物については、十分な分解能で回折像が得られた。本研究で、共結晶が常時作出できるようになり、十分な分解能で複合体構造が解けている。X 線回折実験は、つくば高エネルギー加速器研究機構内のフォトンファクトリー施設で高輝度シンクロトロン X 線源を用いて行った。

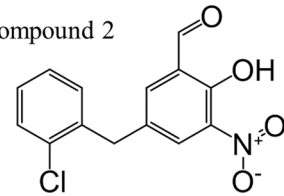
## (5) 細胞による感染阻害活性の測定

研究協力者の東海大学の山本典生博士に依頼して、合成化合物の存在下で、インフルエンザウイルスが他の細胞へ感染する能力を定量化した。タンパク質レベルの阻害活性は、H1N1 型のインフルエンザウイルスのアミノ配列を持つ組み換えタンパク質で測定した。

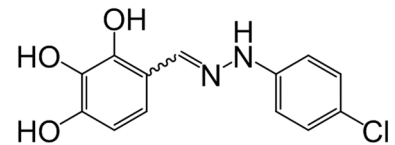
(a) compound 1



(b) compound 2



(c) compound 3



同定済みの阻害化合物。芳香環に複数の OH 基が結合したピロガロール構造が、阻害効果を発揮する主要骨格となっている。ピロガロール骨格は反応性に富むために、メトキシ基による保護をして反応を進めた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Guo Yan, Qu Liang, Nishida Noritaka, Hoshino Tyuji	4. 巻 21
2. 論文標題 Electrostatic Potentials around the Proteins Preferably Crystallized by Ammonium Sulfate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Crystal Growth & Design	6. 最初と最後の頁 297 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.cgd.0c01136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Qu Liang, Qiao Xinyue, Qi Fei, Nishida Noritaka, Hoshino Tyuji	4. 巻 61
2. 論文標題 Analysis of Binding Modes of Antigen?Antibody Complexes by Molecular Mechanics Calculation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 2396 ~ 2406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.1c00167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitahara Mariko, Fudo Satoshi, Yoneda Tomoki, Nukaga Michiyoshi, Hoshino Tyuji	4. 巻 19
2. 論文標題 Anisotropic Distribution of Ammonium Sulfate Ions in Protein Crystallization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Crystal Growth & Design	6. 最初と最後の頁 6004 ~ 6010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.cgd.9b00256	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Qu Liang, Fudo Satoshi, Matsuzaki Katsumi, Hoshino Tyuji	4. 巻 67
2. 論文標題 Computational Study on the Assembly of Amyloid -Peptides in the Hydrophobic Environment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 959 ~ 965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00171	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Qi Fei, Yoneda Tomoki, Neya Saburo, Hoshino Tyuji	4. 巻 122
2. 論文標題 Simulation Time Required for Diminishing the Initial Conformational Deviations among Protein Crystal Structures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 8503 ~ 8515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b04800	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤 聡、米田 友貴、額賀 路嘉、山本 典生、星野 忠次
2. 発表標題 インフルエンザのエンドヌクレアーゼ活性を阻害する化合物の合成と結合構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院薬学研究院 薬品物理化学研究室 <a href="http://www.p.chiba-u.jp/lab/bukka/index.html">http://www.p.chiba-u.jp/lab/bukka/index.html</a> 千葉大学大学院薬学研究院薬品物理化学研究室 <a href="http://www.p.chiba-u.jp/lab/bukka/index.html">http://www.p.chiba-u.jp/lab/bukka/index.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山本 典生  (Yamamoto Norio)  (40323703)	東海大学・医学部・教授   (32644)	抗ウイルス活性測定

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------