

平成21年5月1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007－2008 年度

課題番号：19590467

研究課題名（和文） 変異体ウイルスに効く抗エイズ薬の創出

研究課題名（英文） Development of anti-HIV chemicals effective for the virus conferring drug resistance

研究代表者

氏名（ローマ字）：星野 忠次（Tyuji Hoshino）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：90257220

研究成果の概要：

薬剤耐性を持つ変異ウイルスに最大の薬効を持つ薬物の創出に向けて、HIV-1プロテアーゼのL90M変異体に対し強い薬効を示すプロテアーゼ阻害剤の開発を進めた。阻害剤の化学構造を計算機で設計し、設計された薬物について、有機合成を行った。合成経路は全9工程の反応とした。最終合成物の収量が少ないため、現在、合成を続け、反応生成物構造の確認を進めている。反応中間物については、薬物活性の測定を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：変異体ウイルス、薬剤耐性、分子動力学計算、プロテアーゼ阻害剤、薬物設計、有機合成

1. 研究開始当初の背景

HIV は遺伝子変異を起こしやすく、このために抗 HIV 薬が効かなくなる現象、いわゆるウイルスの薬剤耐性の獲得が、臨床では深刻な問題となっている。薬剤耐性の問題を回避するために、抗 HIV 薬の開発には2つの動向がある。一つは、従来からの逆転写酵素阻害剤や HIV プロテアーゼ阻害剤とは異なり、別の部位に標的を定めた抗エイズ薬の開発である。HIV のウイルスが宿主細胞に侵入する過程を阻止する薬剤などが、これまでに発表

されている。但し、このような新規に開発された薬剤に対しても、早くも薬剤耐性ウイルスの発生が報告されている。もう一方のアプローチは、薬剤耐性ウイルスにも薬効を大きく低下させない第2世代抗 HIV 薬と呼ばれる薬剤の開発である。但し、これらの薬剤は野生株も含め、広範に薬効を保つように設計されることが多く、変異ウイルスに対する作用が十分ではない。本申請では、特定の変異ウイルスに対抗できる薬物を開発する。現在では、米国企業を中心に先進各国で抗エイズ薬

の開発が進められている。本申請で提案するような薬物が開発できれば、そのインパクトは極めて大きい。

2. 研究の目的

本研究の長期的構想は、野生株のHIVではなく、薬剤耐性を持つ変異ウイルスに最大の薬効を持つ薬物を創出することである。薬剤耐性を生じるアミノ酸変異は、種類ではなく、D30N, L90M, G48Vなど幾つかの深刻な変異が知られている。将来的には、それぞれの変異ウイルスに薬効を持つ複数の薬剤群を揃えて、患者の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目標である。このように薬剤のレパートリーを揃えることにより、HIVをコントロールし、HIV患者が生涯に亘り、エイズ発症を抑制できるような医療の在り方が必要と考えている。

研究の長期的構想に対して、本申請の研究課題では、L90M変異体に対し強い薬効を示すプロテアーゼ阻害剤を創出することを目的とする。具体的には、(A)阻害剤を計算機で設計し、(B)設計薬剤を合成し、(C) *in vitro* で薬効を評価確認する。研究期間内では、L90M変異体に的を絞り、設計、合成、評価を繰り返し、世界に先駆けて、変異体ウイルスを標的とした薬剤創出を達成することを目指す。

3. 研究の方法

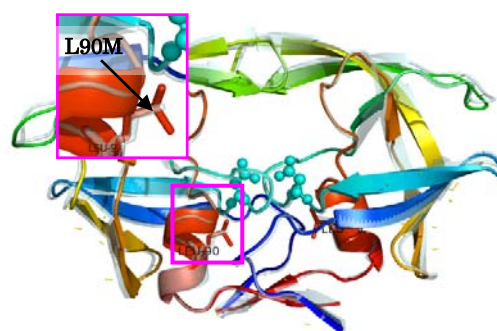
本研究は、(A)阻害剤の計算機での設計、(B)設計された薬剤の合成、(C)合成された薬剤の薬効評価に大別される。(A)阻害剤の計算機での設計では、L90Mによる反応ポケットの構造歪みをもとに、反応ポケットの歪み構造にフィットするように、薬剤の骨格ならびに官能基を配置する。異なる官能基の選択により、凡そ50の薬物候補を考案し、分子動力学理論に立脚した計算機解析を進めて、有望な化合物構造を見出す。(B)設計された薬剤の合成では、(A)で設計した化合物を有機合成する。既存のHIVプロテアーゼ阻害剤は、水素を除いた原子数が40~50ぐらいのものが多く、これは経口薬としては、比較的分子量が大きい部類に属する。プロテアーゼ阻害剤は翻訳後の前駆体ペプチドを模倣するような薬物構造となるので、直線的なコンフォメーションを取るものが多く、設計する薬剤もやはり炭素鎖やペプチド結合を骨格の軸にしたものが中心になる。(C)合成された薬剤の薬効評価では、設計・合成された薬物と

L90M変異型プロテアーゼとの結合親和性を調べる。同時に野生株のプロテアーゼと設計合成薬剤との親和性も調査する。結合親和性を測定する手段として、プロテアーゼの精製を進めた上で、等温滴定熱量計を使用する。

4. 研究成果

(1)阻害剤の計算機での設計

L90M変異体では、プロテアーゼタンパクの90残基目ロイシンがメチオニンに置換されている。L90M変異は多くの薬剤に対して出現しており、多剤耐性変異ウイルスにも多く見られる。下図で、ヘリックス構造中の矢印がL90M残基である。野生株との重ね合わせで表示してある。阻害薬は、OH基を下にして、アスパラギン酸残基(D25, D25')に挟まれるように結合し酵素機能を阻害する。



阻害剤の設計では既存薬が発展してきた流れを参考にした。すなわち、RTVを改良しLPVが生まれ、APVからDRVが開発された経緯を参考に、本研究ではLPVをもとに阻害剤を設計していくこととした。

設計手順として、①反応ポケットの歪み構造にフィットするように、薬剤の骨格ならびに官能基を配置した。プロテアーゼは、酵素としての働きを持つ限りペプチドを補足する形状から大きく変形することはない。薬剤には、多少の歪に合わせてコンフォメーションの変化が可能なように柔軟性を持たせるように特に注意した。

②薬剤耐性を持つ変異として、D30Nも良く知られている。野生株では、30番目のアスパラギン酸(D)の側鎖の持つ負電荷が、阻害剤の正電荷部分と電気的な相互作用により引き付け合っている。D30N変異により、30番目のアミノ酸は電荷を失うので、結合親和性が低下する。このように電気的な相互作用に強く依存した薬剤は、ウイルスの遺伝子変異による薬剤耐性に著しく弱いので、これを避けるように特に注意をした。

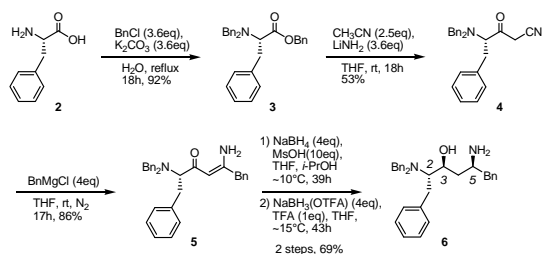
③設計した薬物について、薬物とL90M変異型プロテアーゼとの複合体モデルを構築

する。この複合体モデルに対し分子動力学計算を適用した。生体温度・水溶媒条件下でのシミュレーションを通じて、薬物とプロテアーゼが十分になじんだ構造を作成する。この構造を用いて薬物のプロテアーゼに対する結合エネルギーを算出し、薬効を予測した。

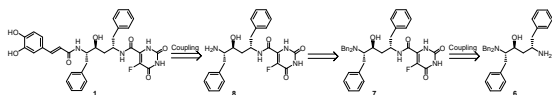
以上の手続きで、50種の化合物分子とL90M変異プロテアーゼとのMDシミュレーションを行い、第一候補化合物、第二候補化合物を決定した。

(2)設計された薬剤の合成

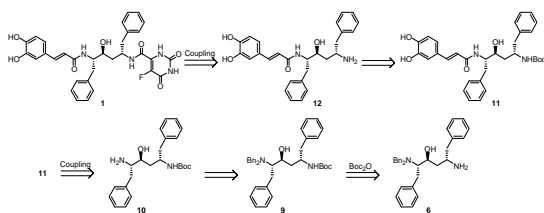
下記に示すスキームに従って中心骨格の合成を試みた。合成反応により、候補化合物の中心骨格となる化合物**6**を得た。反応上生成しうる他の三種のジアステレオマーはエタノールを用いて再結晶することで取り除いた。生成物における立体の帰属はNMRスペクトルにより判断した。



上記で得られた化合物**6**から候補化合物**1**を合成するにあたり、最短で3工程からなる合成経路を考えた。



まず候補化合物**1**は、アミノオロチンアミド体**8**とカフェ酸との連結により導き、**8**はベンジルアミノオロチンアミド体**7**のBn基をPd等により還元することで得られ、**7**をオロチン酸と化合物**6**との連結から得られるものとした。しかし、実際にこのルートで反応を進めたところ、**7**の脱Bn化は進行しなかった。そこで、ルートを変更し、高価であるオロチン酸の使用を控えることも兼ねた、以下のような5工程からなる合成経路にした。



最終工程でオロチン酸を連結させて**1**を導き、シナムアミド体**12**はシナムアミド-N-Boc体**11**のBoc基を酸で除去することで得られるものとした。さらに、**11**はアミノ-N-Boc体**10**とカフェ酸との連結により得られるものとし、**10**はベンジルアミノ-N-Boc体**9**を還元反応に付すことで得られるものとした。そして、**9**は化合物**6**をBoc化することで容易に得られるものとした。抜本的なルートの変更はせず、基質の違いによりPd還元反応性に差が出ると考えた。合成ルートを見直したことでN-Boc中心骨格**9**の脱Bn化に成功した。最終工程のアミド化反応を行ったが、収量が不十分で、複数の測定法により候補化合物**1**の生成を確認するには至っていない。また、シナムアミド体**12**の精製法も改善の余地があるため、今後、さらに合成研究を進める必要がある。

(3)合成された薬剤の薬効評価

設計・合成された薬物とL90M変異型プロテアーゼとの結合親和性を等温滴定熱量計で調べるために、L90M変異型プロテアーゼの発現精製を行った。

(発現)プロテアーゼ発現ベクターを導入した大腸菌を、全3LのLB培地(Amp濃度1.6mg/mL)で16時間培養した後、IPTGを投入し、さらに3時間培養した。菌液を遠心沈殿した後に、2M尿素の入ったMESバッファで懸濁した。再度、遠心沈殿した後に、8M尿素の入ったMESバッファで、タンパク質を抽出した。

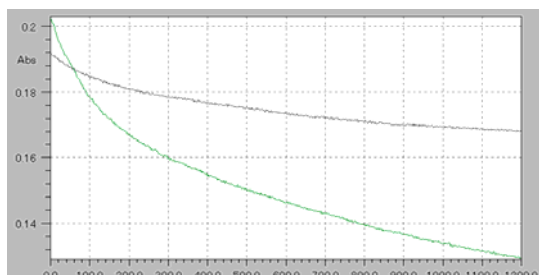
(精製)HIV-1プロテアーゼは等電位点が8.6であるので、初めにpH6.0のMESバッファで陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、溶出画分を回収した。次にpH8.0のTrisバッファで陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、素通り画分を回収した。次にゲルろ過クロマトグラフィーで最終精製を行った。

(再構成)酢酸バッファに交換した後に、4°Cで透析法により徐々に酢酸濃度を減少させることで、プロテアーゼのリフォールディングを行った。

(活性確認)発色基質

(K-A-R-V-Nle-p-nitroPhe-E-A-Nle-amide)を用いて吸光計により測定した。HIV-1プロテアーゼは前駆体タンパク質ペプチドを切断するという酵素機能を持っている。上記の基質は切断部位の一つであるキャプシド/ヌクレオキャプシド部位を模倣し、一部をp-nitroPheに置換

したものである。プロテアーゼ活性により発色基質の切断反応が進行すると吸光度が減少するので、酵素活性を確かめることができる。実際に、下図に発色基質を用いた活性測定を示す。横軸は測定時間、縦軸は吸光度である。プロテアーゼ存在下では、非存在下に比べて吸光量が著しく減少したため、本測定により酵素活性があることが確認できた。



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4件)

1. H. Fuji, M. Suzuki, S. Neya, T. Hoshino; Development of Software Program Predicting the Binding Site and the Binding Mode of Ligands Against a Target Protein, e-Journal of Surface Science and Nanotechnology, 査読あり、6巻、2008年、241-245頁
2. H. Ode, S. Matsuyama, M. Hata, S. Neya, J. Kakizawa, W. Sugiura, T. Hoshino; Computational Characterization of Structural Role of the Non-active Site Mutation M36I of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease, Journal of Molecular Biology, 査読あり、370巻、2007年、598-607頁
3. H. Ode, S. Matsuyama, M. Hata, T. Hoshino, J. Kakizawa, W. Sugiura; Mechanism of Drug Resistance Due to N88S in CRF01_AE HIV-1 Protease Analyzed by Molecular Dynamics Simulations, Journal of Medicinal Chemistry, 査読あり、50巻、2007年、1768-1777頁
4. 星野忠次, 大出裕高; HIVプロテアーゼ阻害剤とウイルスの薬剤耐性、分子構造

から考える薬物の作用機序(11)、医薬ジャーナル、査読なし、43巻、2007年、5-11頁

[学会発表] (計4件)

1. 中里俊文, 高村斉, 清水愛, 大出裕高, 杉浦互, 鈴木優章, 根矢三郎, 原田真至, 西田篤司, 星野忠次; L90M変異を標的としたHIV-1プロテアーゼ阻害薬の薬物設計と合成、日本薬学会、2009年3月26日、京都
2. 星野忠次, 辰巳絢子, 篠原祐子, 大出裕高, 杉浦互; コンピューターによる薬剤耐性HIV-1に対する薬効予測の試み、日本エイズ学会、2008年11月26日、大阪
3. 松山翔, 大出裕高, 柿澤淳子, 杉浦互, 星野忠次; 臨床検体由来SubtypeC HIV-1 proteaseの薬剤耐性機構に関する構造化学的研究、日本エイズ学会、2007年11月29日、広島
4. 中里俊文, 高村斉, 大出裕高, 清水愛, 杉浦互, 星野忠次; L90M変異体に阻害作用をもつ抗HIV薬の設計・合成、日本エイズ学会、2007年11月28日、広島

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

畑 晶之

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：50241972

(3) 連携研究者