

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月17日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011年度

課題番号：21590506

研究課題名（和文） 変異型HIV-1プロテアーゼに対する阻害剤の創出

研究課題名（英文） Development of anti-HIV agents for the viral variants

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

研究成果の概要（和文）：

薬剤耐性を持つ変異ウイルスに薬効を持つ薬物の創出に向けて、HIV-1プロテアーゼのI84VならびにV82A変異体に対し強い増殖阻害効果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。数種の阻害剤候補薬物については合成が完了し、合成化合物の活性評価を実施した。今後、最も有望と思われる化合物の合成と活性評価の結果を受けて、必要に応じて改良を加える予定である。

研究成果の概要（英文）：

In order to produce the anti-HIV agents effective for the viral variants, we carried out in silico drug design, organic synthesis, and assay of the compound potency. The designed compounds were intended to be targeted on the I84V and V82A mutants of HIV-1 protease. Several compounds were synthesized, and some of the intermediates of the designed compounds showed anti-viral activity. It is required to enhance the compound potency greatly. Accordingly, the modification of the derivatives should be performed to produce a potent agent in our future work.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：分子・阻害剤開発

1. 研究開始当初の背景

HIVは、逆転写酵素、インテグラーゼ、HIVプロテアーゼという3種類の酵素を持つ。これらの酵素は、いずれもHIV感染症に対する医薬品の標的とされ、その阻害剤は抗HIV薬として認可され、既にHIV感染症治療に使用されている。ところが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深刻な問題となっている。現在、抗HIV薬によりエイズの発症を遅らせることはできるようになったが、抗HIV薬の長期服用による薬剤耐性ウイルスの発生はほとんど免れない状況にある。

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薬剤の開発である。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、これまでに国外で認可されている。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。むしろ積極的に特定の変異ウイルスに対抗できる薬剤を開発することも、HIV感染症には有効と思われる。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可能になると期待される。

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、一種類ではなく、I84V, 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重要である。

研究の長期構想に対して、本申請の研究課題では、I84VならびにI82A変異体に対し強い薬効を示すプロテアーゼ阻害剤の創出を目的とする。具体的には、(A)阻害剤を計算機で設計し、(B)設計薬物を合成し、(C) *in vitro* で薬効を評価確認する。

3. 研究の方法

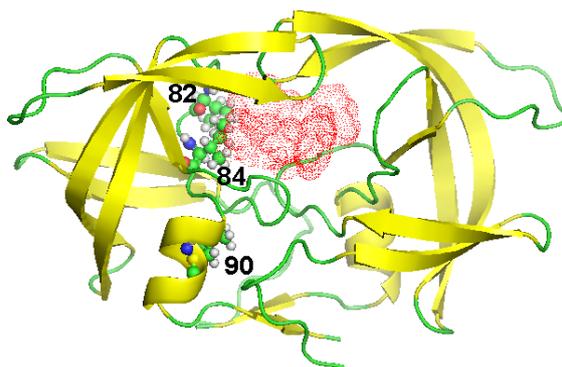
本研究は、(A)阻害剤の計算機での設計、(B)設計された薬剤の合成、(C)合成された薬剤の薬効評価に大別される。(A)阻害剤の計算機での設計では、I84VあるいはI82Aによる反応ポケットの構造歪みをもとに、反応ポケットの歪み構造にフィットするように、薬剤の骨格ならびに官能基を配置する。異なる官能基の選択により、凡そ50の薬物候補を考案し、分子動力学理論に立脚した計算機解析を進めて、有望な化合物構造を見出す。(B)設計された薬剤の合成では、(A)で設計した化合物を有機合成する。既存のHIVプロテアーゼ阻害剤は、水素を除いた原子数が40~50ぐらいのものが多い。これは経口薬としては、比較的分子量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I84VあるいはI82A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

(A)阻害剤の計算機での設計

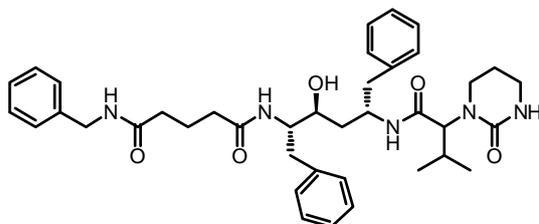
本研究では、コンピューター解析の結果に立脚して、薬物設計を行った。例えば、ネルフィナビルという阻害剤に対して薬剤耐性を生じるアミノ酸変異としてD30Nが知られている。荷電アミノ酸のアスパラギン酸(D)から無荷電のアスパラギン(N)に変異すると、ネルフィナビルとの水素結合が失われるため、薬物-酵素結合能が弱くなる。一方、I84VやV82A変異のように荷電変化を伴わない場合については、反応ポケットに独特な構造変化が生じていることが多い。この構造変化は微少であり、実験では捉えることは容易でない。本研究ではコンピューターシミュレーションにより、微少な構造変化を解き明かし、変形構造にフィットする薬物形状をもって、新規阻害剤の設計指針とした。下図に示すようにI84VやV82A変異は活性部位(ドット表示)に隣接し、薬物と活性ポケットのフィットネスを直接低下させる。つまりI84VやV82A変異は、D30N変異とは異なる機序で薬剤耐性を起こす。



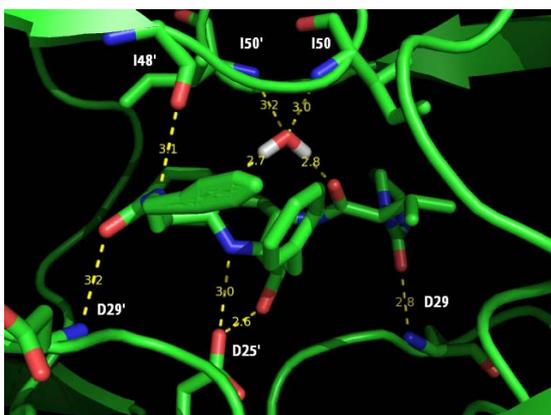
設計手順として、(1)反応ポケットの歪み構造にフィットするように、薬剤の骨格ならびに官能基を配置した。プロテアーゼは、酵素としての働きを持つ限りペプチドを補足する形状から大きく変形することはない。薬剤には、多少の歪に合わせてコンフォメーションの変化が可能のように柔軟性を持たせるように特に注意した。

(2) 薬剤耐性を生じる変異としてD30Nも良く知られている。D30N変異により、30番目のアミノ酸は電荷を失うので、薬物との結合親和性が低下する。このように静電相互作用に強く依存した薬物は、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。但し、29番目の残基はプロテアーゼの2量体化に関与するために変異を起こさない。そこで29番目の残基との静電相互作用は積極的に取り入れた。

(3) 設計した薬物について、薬物と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。上記の手続きで、決定した候補化合物の1つを以下に示す。



次図は、候補化合物が結合ポケットの中で形成する水素結合を、MDシミュレーションの結果に基づき表示したものである。一候補化合物は、ホモ2量体の両側とバランスよく水素結合を形成していることが分かる。ASP29、ASP29'はタンパク質のフォールディングに関与する残基であり、アミノ酸耐性変異が起らない残基である。

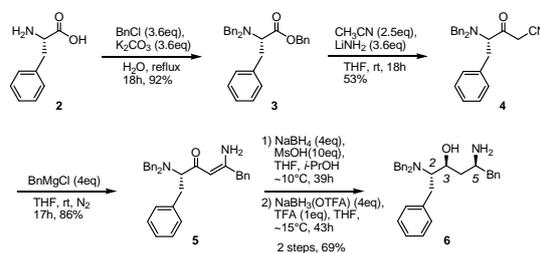


(B)設計された薬剤の合成

次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** から候補化合物を合成するにあたり、最短で3あるいは5工程からなる合成経路を検討した。3工程からなる合成経路では、反応途中で保護基として用いた Bn 基の脱保護反応が進行しなかった。そこで、ルートを変更し、5工程からなる合成経路にした。合成ルートを見直したことで *N*-Boc 中心骨格からの脱 Bn 化に成功した。最終工程の反応までを行ったが、収量が不十分で、複数の測定法により候補化合物の生成を確認するには至っていない。従って今後、さらに合成研究を継続する必要がある。



(C)合成された薬剤の薬効評価

設計・合成された薬物と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、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、LB培地中(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。発色基質には

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た部位が含まれている。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、発色基質を用いた活性測定において、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。

合成化合物の中間体ならびに一部の候補化合物について、ウイルスの増殖を阻止する能力があるかどうかを測定した。測定は名古屋国際医療センターの杉浦互博士に依頼した。測定の結果、一部には比較的弱い抗ウイルス活性があることが確認された。

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. S. Matsuyama, A. Aydan, H. Ode, M. Hata, W. Sugiura, T. Hoshino;
Structural and Energetic Analysis on the Complexes of Clinically-isolated Subtype C HIV-1 Proteases and Approved Inhibitors by Molecular Dynamics Simulation, Journal of Physical Chemistry B, 査読あり、114 巻、2010 年、521-530 頁
2. H. Yanagita, E. Urano, K. Matsumoto, R. Ichikawa, Y. Takaesu, M. Ogata, T. Murakami, H.G. Wu, J. Chiba, J. Komano, T. Hoshino;
Structural and Biochemical Study on the Inhibitory Activity of Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H Function of HIV-1 Reverse Transcriptase, Bioorganic Medicinal Chemistry, 査読あり、19 巻、2011 年、816-825 頁
3. H. Yanagita, S. Fudo, E. Urano, R. Ichikawa, M. Ogata, M. Yokota, T. Murakami, H. Wu, J. Chiba, J. Komano, T. Hoshino;
Structural Modulation Study of Inhibitory Compounds for RNase H Activity of HIV-1 Reverse

Transcriptase, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 査読あり、60 巻、2012 年、印刷中

[学会発表] (計1件)

1. 藍檀愛, 萩原洋子, 鈴木優章, 根矢三郎, 星野忠次; V82A, I84V 変異を標的とした HIV-1 プロテアーゼ阻害薬の設計、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bukka/index.html>

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