

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790145

研究課題名（和文） HIVおよびHTLVプロテアーゼを標的とした擬似対称型阻害剤の開発研究

研究課題名（英文） Development of pseudo-symmetric inhibitors targeted HIV and HTLV proteases

研究代表者

日高 興士 (HIDAKA KOUSHI)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：30445960

研究成果の概要（和文）：HIVプロテアーゼの基質アミノ酸配列から開発された阻害剤を、「HMC-ヒドラジド」を用いる擬似対称型阻害剤の設計方法に当てはめ、強力な新規阻害剤を得た。X線結晶構造解析から5つの架橋水の配置を確認した。更にベンジルオキサミド誘導体の末端の置換基を探索し、薬剤耐性変異 HIVプロテアーゼに対して有効な誘導体を得た。また、基質型の強いHTLVプロテアーゼ阻害剤が得られたので、擬似対称型への設計が期待される。

研究成果の概要（英文）：Application of HIV protease inhibitors developed from substrate amino acid sequence to designing method of pseudo-symmetric inhibitors using “HMC-hydrazide” succeeded in obtaining new and potent inhibitors. We confirmed the position of five bridging water molecules in the complex by X-ray crystallography. We explored substituents at the terminals of the inhibitor to find effective compounds for drug resistant mutant protease. We also obtained potent substrate-based HTLV protease inhibitors, which are promising to apply for the pseudo-symmetric inhibitor design.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：医薬分子設計

1. 研究開始当初の背景

(1) HIV感染治療にHIVプロテアーゼ阻害剤が使われるようになり、多剤併用療法(HAART)が可能となったため、世界のエイズ患者の死亡率は劇的に低下し、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。ゆえに、HIVプロテアーゼ阻害剤は、治療法において飛躍的な進歩をもたらしたと言える。しかし、HAARTによっても体内から完全にHIVを除去できず、生涯にわたる治療が不可欠であるた

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、解決されないままである。これらの問題を克服するため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ている。このHMCを有する阻害剤とHIVプロテアーゼ複合体について、X線結晶構造解析とNMR解析に続き、最近、中性子結晶構造解析が世界に先駆けて成功され、

実際に水素結合相互作用が観察されたことから、HMCイソステアが理想的な遷移状態ミミックであることが実証された(Adachi, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106 (12), 4641 (2009))。更に、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相の臨床試験まで進んだ。一方、現在では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。このヒドラジド構造とHMC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、既にHIVプロテアーゼ阻害剤に有用であることがわかり、他のアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤設計に応用できると考えられる。

(2)成人T細胞白血病(ATL)やHTLV-I脊髄症(HAM)を引き起こす病原ウイルスHTLV-Iは、日本をはじめ、カリブ海やアフリカでも感染が拡大しつつある。しかし、現在の化学療法や放射線治療は悪性リンパ腫の一時的な対症療法でしかなく、新たな治療薬の開発が望まれている。HTLV-Iが成熟するために必要なHTLV-Iプロテアーゼは、HIVプロテアーゼと同じC₂対称型のアスパラギン酸プロテアーゼであり、基質認識も類似している。

2. 研究の目的

基質遷移状態概念のHMC構造とヒドラジド構造を融合した独自の「HMC-ヒドラジド」を組み込むことで擬似対称型の化合物を設計し、新たな高活性HIVプロテアーゼ阻害剤を創製することにより、長期にわたるHIV感染

治療での副作用や耐性出現の問題を克服できる抗HIV薬の開発を目指す。また、「HMC-ヒドラジド」構造を用いる阻害剤設計手法をHTLV-Iプロテアーゼの阻害剤設計へと発展させ、予後が不良で治療が困難である成人T細胞白血病(ATL)やHTLV-I脊髄症(HAM)に対し、根本的な新規治療薬の創製を目指す。

3. 研究の方法

(1) 基質型阻害剤のヒドロキシメチルカルボニル(HMC)の α 炭素とカルボニル炭素の間にC₂回転軸を想定し、回転前と180度回転後の構造を重ね合わせ、次に各々のP'部位を除去し、HMC-ヒドラジド構造で連結させて擬似対称型阻害剤をデザインした。阻害剤の両末端構造には、HIVプロテアーゼとの結合モデルの分子動力学計算の結果から架橋水が配置できると想定されたオキサミド構造を採用した。この擬似対称型阻害剤の構造から、N-末端のオキサミド置換基、P₂/P₂'部位のアミノ酸、P₁'のヒドラジド置換基を変換した種々の阻害剤を設計した。

(2) 合成はベンジルヒドラジンを出発物質としてZ-アミノ酸をペプチド縮合剤により縮合させ、次いでBoc-アロフェニルノルスタチン誘導体を混合酸無水物法により縮合させた。Boc-基を除去し、Z-アミノ酸を縮合させ、両末端のZ-基を除去した後、各種オキサミド誘導体を縮合させ、一連の誘導体を得た。HPLC精製を行い、MS測定により同定し、最終化合物とした。

(3) 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/リトナビル耐性HIV(A17株)に由来する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

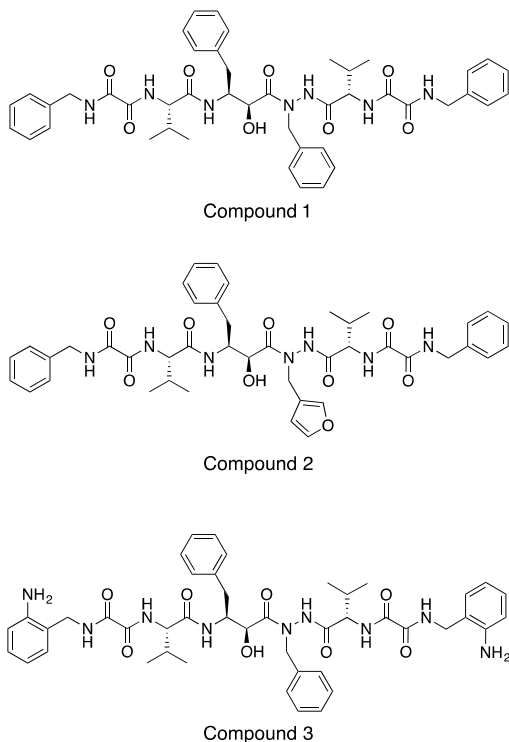


図 1. オキサミド末端をもつ擬似対称型阻害剤の構造。

両方の N-末端をベンジルオキサミドに固定して P2/P2' 部位のアミノ酸を変換した中で、バリンの誘導体の野生型 HIV-1 プロテアーゼ阻害活性が最も高かった。また、P1' のヒドラジド置換基を 3-フラニルメチルに変換した誘導体は、ベンジル体と同様の nM レベルの阻害活性を示すことが分かった(ベンジル体の化合物 1 阻害率 86%, 3-フラニルメチル体の化合物 2 阻害率 88% at 50 nM、図 1)。N-末端のオキサミド基を変換した誘導体の中ではアミノ基で置換したベンジルオキサミドが有効で、特に *o*-アミノ基で置換した誘

導体は(化合物 3、図 1)、野生型 HIV プロテアーゼに対しては既存の基質型阻害剤 KNI-272 よりも活性が低い、薬剤耐性変異プロテアーゼに対しては KNI-272 を上回る活性を示すことを見いだした(KNI-272 野生型 96%, 耐性変異型 10%; 化合物 3 野生型 89%, 耐性変異型 20% at 50 nM)。

これら擬似対称型阻害剤の HTLV-I プロテアーゼ阻害活性は比較的弱かったことから、オキサミド構造のベンジル構造自体が HTLV プロテアーゼに適さなかったと考察される。しかしながら、基質型阻害剤の構造変換を進めた結果、nM レベルの強力な阻害剤をいくつか得ることができた(KNI-10635 IC₅₀ 6.4 nM, KNI-10838 IC₅₀ 5.7 nM)。今後、これら阻害剤を基にした擬似対称型阻害剤の設計を行うことにより、阻害活性の向上が期待できる。

また、擬似対称型阻害剤化合物 1 と野生型 HIV プロテアーゼの複合体の X 線結晶構造解析に成功した(図 2)。分子動力学計算では架橋水が 4 つ存在することを予測していたが、実際の X 線結晶構造では 5 つの架橋水の存在が確認された。今後、これらの架橋水の位置を特定した阻害剤設計を行うことで、HIV および HTLV プロテアーゼの高活性阻害剤が獲得できると期待される。

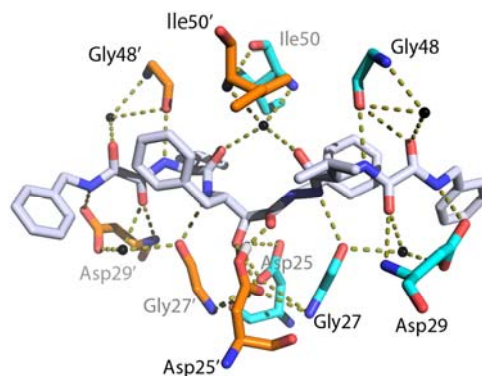


図 2. 化合物 1 と HIV-1 プロテアーゼの複合体 (X 線結晶構造, Asp25' は意図的にプロトン化) における水素結合の様子。図中の黒球は観察された 5 つの架橋水。

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 6 件)

- ① Jeffrey-Tri Nguyen, Keiko Kato, Henri-Obadja Kumada, Koushi Hidaka, Tooru Kimura and Yoshiaki Kiso: Maintaining potent HTLV-I protease inhibition without the P3-cap moiety in small tetrapeptidic inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**(6), 1832-1837 (2011). 査読有,
DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.01.048
- ② Jeffrey-Tri Nguyen, Keiko Kato, Koushi Hidaka, Henri-Obadja Kumada, Tooru Kimura and Yoshiaki Kiso: Design and synthesis of several small-size HTLV-I protease inhibitors with different hydrophilicity profiles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**(8), 2425-2429 (2011). 査読有,
DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.02.066
- ③ Henri-Obadja Kumada, Jeffrey-Tri Nguyen, Taeko Kakizawa, Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Development of [Ile40]HTLV-I protease inhibition assay using novel fluorogenic and chromogenic substrate. *J. Pep. Sci.*, **17**(8), 569-575 (2011). 査読有,
DOI: 10.1002/psc.1375
- ④ 木曾良明, 日高興士: ペプチド化学を基盤とした統合創薬科学. *化学工業*, **63**(4), 258-263 (2012). 査読無,
<http://www.kako-sha.co.jp/kagakubacknорight.htm>
- ⑤ Koushi Hidaka, Yuki Toda, Yuko Tsuda, and Yoshiaki Kiso: Oxamide replacement in pseudo-symmetric HIV protease inhibitor involving multiple bridging water molecules. *Peptide Science*, 2012 49th, 271-272 (2013). 査読有,
<http://www.prf.or.jp/psb.html>
- ⑥ Koushi Hidaka, Yuki Toda, Motoyasu Adachi, Ryota Kuroki, Yoshiaki Kiso: Use of substituted oxamide structure in designing pseudo-symmetric HIV protease inhibitors to employ multiple bridging water molecules. *PEPTIDES 2012*, 404-405 (2013). 査読無,
<http://www.eurpepsoc.com/symposia-proceedings/>

[学会発表] (計 5 件)

- ① 戸田有紀, 日高興士, 濱田貴司, 黒木良太, 木曾良明: 薬剤耐性変異 HIV プロテアーゼを標的とする擬似対称型阻害剤研究. 第 25 回近畿エイズ研究会学術集会(京都), 2011 年 6 月 18 日.
- ② Koushi Hidaka, Yuki Toda, Takashi Hamada, Motoyasu Adachi, Ryota Kuroki, Yoshiaki Kiso: Design of multiple bridging water-assisted pseudo-symmetric HIV prptase inhibitors. 7th General Meeting of the International Proteolysis Society (San Diego, USA), 2011 年 10 月 16-20 日.
- ③ Koushi Hidaka, Yuki Toda, Motoyasu Adachi, Ryota Kuroki, Yoshiaki Kiso: Use of substituted oxamide structure in designing pseudo-symmetric HIV protease inhibitors to employ multiple bridging water molecules. 32th European Peptide Symposium (Athens, Greece), 2012 年 9 月 2-7 日.
- ④ Koushi Hidaka, Yuki Toda, Yuko Tsuda, and Yoshiaki Kiso: Oxamide replacement in pseudo-symmetric HIV protease inhibitor involving multiple bridging water molecules. 49th Japanese Peptide Symposium (Kagoshima, Japan), 2012 年 11 月 7-9 日.
- ⑤ 日高興士, 戸田有紀, 木曾良明: 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の設計. 第 26 回日本エイズ学会学術集会(横浜), 2012 年 11 月 24-26 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kobegakuin.ac.jp/information/public/teacher/pharmacy/hidaka.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高 興士 (KOUSHI HIDAKA)
神戸学院大学・薬学部・講師
研究者番号: 30445960

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し