

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590548

研究課題名(和文) 既存認可薬の作用点とは異なる部位を標的とした抗インフルエンザ薬の開発

研究課題名(英文) Development of inhibitors for endo-nuclease activity of influenza viruses

研究代表者

星野 忠次 (Hoshino, Tyuji)

千葉大学・薬学研究科(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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を標的として、薬物開発を進めた。初めに、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分子設計を行った。次に、有望と判断された化合物とその誘導体の有機合成を行った。有機合成によって得た化合物について、酵素阻害活性を生化学実験により測定した。さらに標的タンパク質と化合物との共結晶を作成して、X線結晶構造解析を行い、3種類の阻害剤の結合構造を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The endonuclease activity which lies in influenza polymerase acidic protein N-terminal domain (PAN) is a potent target for novel antiviral agents. We identified some novel inhibitors for PAN endonuclease activity. The binding mode of the inhibitory compounds to PAN was closely investigated by means of X-ray crystal structure analysis and molecular dynamics (MD) simulation. It was observed in the crystal structure that three molecules of the same kind of the inhibitor were bound to one PAN. Hence, the stability of inhibitor binding was examined by performing 100 ns MD simulation. During the MD simulation, three inhibitor molecules fluctuated at the respective binding site while all the molecules maintained interactions with the protein. MM/GBSA analysis suggested that the molecule located apart from the metal chelated site has a higher affinity than the others. Structural information of this study will provide a hint for designing and developing potent agents against influenza viruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：阻害剤 薬物スクリーニング X線結晶構造解析 計算機シミュレーション インフルエンザ ポリメラーゼ エンドヌクレアーゼ活性

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは毎年、冬期に流行し、多くの人的、社会的な被害をもたらす。さらに、インフルエンザパンデミックと呼ばれる世界的大流行が歴史的に繰り返され、そのたびに多くの犠牲者を出している。最近では、高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染が大きな脅威となっている。従って、これらの被害を未然に防ぐ、あるいは被害を最小限に抑えるための対策が必要不可欠である。

現在、インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス薬としては主にノイラミニダーゼ阻害薬が用いられている。ところが、これらの薬物に対する耐性ウイルスが多く報告されている。M2 タンパク質阻害薬も承認されているが、耐性ウイルスの蔓延のために現在ほぼ使われていない。最近、新たにポリメラーゼ阻害薬、ファビピラビルが日本において承認されたが、この薬は厚生労働大臣からの要請があったときのみ製造・供給されるものである。こういった状況から、新たな作用機序による抗ウイルス薬の開発が望まれている。

我々の研究グループでは、以前から HIV (Human Immunodeficiency Virus) の逆転写酵素に内在する RNase H 活性部位を標的として多くの化合物を合成してきた。この活性部位には 2 つの 2 価金属イオンが配位しており、その点でインフルエンザウイルスのポリメラーゼに内包されるエンドヌクレアーゼ活性部位と類似している。そこでこれまで合成された化合物群から、インフルエンザウイルスのエンドヌクレアーゼ活性阻害剤を探索することを計画した。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスのもつタンパク質、PA (Polymerase Acidic protein) の N 末端側約 200 残基にはエンドヌクレアーゼ活性があることが知られており、この部位は PA_N

と呼ばれている。 PA_N はその活性中心に 2 つの 2 価金属イオンを配位することでエンドヌクレアーゼ活性を示す。活性中心近傍には高度に保存されたアミノ酸残基が多く、また、エンドヌクレアーゼ活性はウイルスに必須の活性であることから、この部位は非常に有望な創薬標的である。そこで本研究では、インフルエンザウイルスのエンドヌクレアーゼ活性阻害薬を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

初めに、 PA_N のエンドヌクレアーゼ活性を阻害する化合物を生化学的スクリーニングにより見出す。次に、その化合物をリードとして構造の最適化を行い、高い阻害活性をもつ化合物を創出する。その際、一般的に Structure-Based Drug Design (SBDD) と呼ばれる手法を用いる。すなわち、X 線結晶構造解析に基づいて、阻害化合物とその標的タンパク質の結合構造を明らかにすることで、より合理的に阻害活性の高い化合物を設計・合成し、活性評価まで行う。さらに、計算化学的手法も取り入れ、原子レベルでの PA_N とその阻害化合物の相互作用を詳細に調べることで化合物設計のためのさらなる知見とする。理論的かつ多角的なこれらのアプローチにより化合物の構造最適化を推し進める点に特色がある。

4. 研究成果

(1) 化合物スクリーニング

研究グループで、これまでに合成してきた化合物群を利用して、 PA_N の阻害活性を示す化合物を同定することを試みた。まず大腸菌の系で PA_N タンパク質を発現・精製し、そのエンドヌクレアーゼ活性を確認した。そして、上記の化合物ライブラリから PA_N タンパク質のエンドヌクレアーゼ活性を阻害する化合物を生化学的スクリーニングにより探索した。スクリーニングに利用した化合物の数は、およそ 450 である。スクリーニングでは、一本鎖 DNA (ssDNA) を、精製した PA_N タンパク

質で切断し、切断された DNA を電気泳動で確認する手法で行った。切断反応の際には、化合物を混在させておく。もし化合物に PA_N の阻害活性があれば、ssDNA の切断が起こらないので、電気泳動後の ssDNA の分子量から、直ちに阻害活性の有無が判明する。

スクリーニングの結果、化合物 1, 2, 3 が阻害活性をもつことが判った (図 1)。

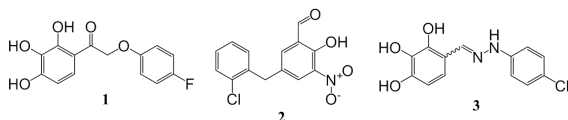


図 1 : インフルエンザウイルスのエンドヌクレアーゼ活性を阻害すると同定された 3 種類の化合物。

(2) 阻害化合物の活性測定

同定された図 1 に示す 3 つの化合物について FRET を利用したアッセイで PA_N の酵素活性の IC₅₀ 値を求めた (表 1)。FRET では、17 ~ 20 ベース程度の ssDNA の 5' 末端に蛍光物質 (FAM) を結合させ、反対の 3' 末端に光吸収物質 (BHQ) を結合させた核酸オリゴを準備する。PA_N タンパク質による核酸オリゴの切断が進むと、蛍光物質 (FAM) が結合した核酸オリゴの断片が生成するので、これを蛍光量として定量できる。もし阻害剤を混在した状況で測定を行うと、阻害能が計測できる。

細胞中での抗ウイルス活性 (EC₅₀) と細胞毒性 (CC₅₀) の測定に関しては、山本典生博士 (順天堂大学大学院医学研究科、国立感染症研究所) に依頼した。その結果、化合物には抗ウイルス活性があることが判った (表 1)。

表 1 : 化合物の阻害能

Compound	IC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
1	9.68 ± 1.19	11.76 ± 2.27	> 200
2	63.30 ± 5.72	11.46 ± 1.13	74.11 ± 1.61
3	8.26 ± 0.79	14.42 ± 3.85	> 200

(3) 結合構造の X 線結晶解析

同定された 3 つの化合物がどのように PA_N に結合しているのかを明らかにするため、X

線結晶構造解析を試みた。まず PA_N の単結晶を作出し、そこにそれぞれの阻害化合物をソーキングして共結晶とした。そして高エネルギー加速器研究機構のフotonファクトリーにおいて X 線回折測定を行い、構造を解析した。その結果、化合物 1, 2, 3 それぞれについて、分解能 1.9 程度で、PA_N との共結晶構造を得ることができた (図 2)。

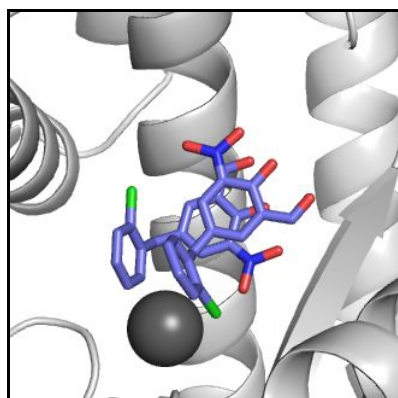
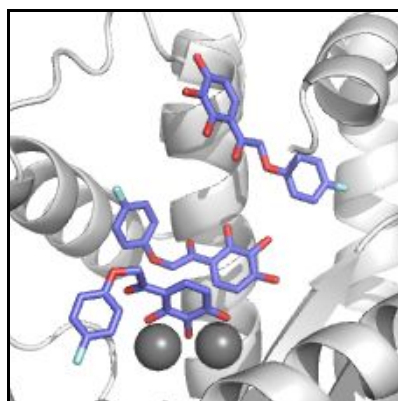


図 2 : 阻害化合物のインフルエンザウイルスのエンドヌクレアーゼ活性部位の結合構造。(上)(中)(下)は、それぞれ化合物 1, 2, 3 に対応。活性部位に配位している価金属イオンを球で示す。

X線結晶構造解析の結果より、3種類の活性化合物はそれぞれ独特な結合様式を持つことが明らかとなった。化合物1は3分子が同時に1つのタンパク質に結合していた。化合物2は2分子が結合している点に加え、Mn²⁺イオンが1つしか配位していない点特徴的である。阻害化合物が結合しているにも関わらず金属イオンが1つしか配位していないPA_Nの結晶構造は現在まで報告例がない。化合物3は金属イオンに配位していない点が非常に特徴的であり、このようなPA_Nと阻害化合物の共結晶構造も現在まで報告されていない。

(4) 分子動力学法による計算機解析

得られた3つの結晶構造についてさらに詳細に解析するため、結晶構造を初期構造として分子動力学(MD)シミュレーションをそれぞれ100ナノ秒行った。化合物1のMDシミュレーションでは、100ナノ秒の間、3つの化合物分子の内の分子1Cの構造の揺らぎが分子1A、分子1Bに比べて少なく、安定であった。さらにMDシミュレーションの結果を用いてMM/GBSA法により分子1A、分子1B、分子1Cの結合自由エネルギー変化(G_{bind})を計算した(表2)。この結果から、分子1Cが分子1A、分子1Bよりも安定に結合していることがより明らかとなった。

表2：化合物の結合自由エネルギー

	ΔG_{bind} (kcal/mol)
1A	-30.080 ± 3.068
1B	-34.830 ± 5.453
1C	-38.623 ± 3.602

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)

F. Qi, S. Fudo, S. Neya, T. Hoshino : A cluster analysis on the structural diversity of protein crystals, exemplified by human immunodeficiency virus type 1 protease, Chem. Pharm. Bull. 62, 2014, pp. 568-577. (査読有り)
doi.org/10.1248/cpb.c14-00095

T. Osajima, M. Suzuki, S. Neya, T. Hoshino : Computational and statistical study on the molecular interaction between antigen and antibody, J. Mol. Graphics Model. 53, 2014, pp.128-139. (査読有り)
doi:10.1016/j.jmgm.2014.07.005

T. Hoshino, Md. I. Mahmood, K. Mori, K. Matsuzaki : Binding and Aggregation Mechanism of Amyloid β -Peptides Onto the GM1 Ganglioside-Containing Lipid Membrane, J. Phys. Chem. B 117(27), 2013, pp. 8085-8094. (査読有り)
doi: 10.1021/jp4029062

M. I. Mahmood, X. Liu, S. Neya, T. Hoshino : Influence of lipid composition on the structural stability of G-protein coupled receptor, Chem. Pharm. Bull. 61(4), 2013, 426-437. (査読有り)
doi.org/10.1248/cpb.c12-01059

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, Chem. Pharm. Bull. 60(6), 2012, pp. 764-771. (査読有り)
doi.org/10.1248/cpb.60.764

H. Yanagita, N. Yamamoto, H. Fuji, X. Liu, M. Ogata, M. Yokota, H. Takaku, H. Hasegawa, T. Odagiri, M. Tashiro, T. Hoshino : Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function, ACS Chem. Biol. 7, 2012, pp.552-562. (査読有り)
doi: 10.1021/cb200332k

[学会発表](計 6 件)

不動 聡志, 米谷 陽子, 額賀 路嘉, 山本 典生, 鈴木 優章, 根矢 三郎, 星野 忠次: インフルエンザウイルスエンドヌクレアーゼ活性部位とその阻害化合物の共結晶構造解析, 日本薬学会代 135 年会, 26G-pm11S, 神戸(2015.3.26)

不動 聡志, 米谷 陽子, 額賀 路嘉, 山本 典生, 鈴木 優章, 根矢 三郎, 星野 忠次: インフルエンザウイルスエンドヌクレアーゼ活性部位とその阻害化合物の共結晶構造解析, スーパーコンピュータワークショップ 2015, 岡崎 (2015.1.29)

星野 忠次: 2価金属原子対を標的とした抗ウイルス薬の開発. 感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2013, 千葉 (2013.11.30)

星野 忠次: 計算機解析に基づくインフルエンザウイルス感染阻害薬物の開発. 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」地区ミニシンポジウム, 千葉 (2013.9.10)

不動 聡志, 石井 和彦, 小川 博史, 松浦 崇晃, 柳田 浩志, 額賀 路嘉, 鈴木 優章, 根矢 三郎, 星野 忠次: インフルエンザエンドヌクレアーゼ活性阻害物の探索とその結合構造解析, 日本薬学会第 133 年会, 29pmB-137S, 横浜 (2013.3.29)

不動 聡志, 尾瀧 将一, 小川 博史, Mahmood Md Iqbal, 星野 忠次: インフルエンザウイルスのエンドヌクレアーゼ活性部位に対する阻害化合物探索と結合構造解析. スーパーコンピュータワークショップ 2013, 岡崎 (2013.1.22)

〔その他〕

ホームページ等

千葉大学・薬学研究院・薬品物理化学研究室
<http://www.p.chiba-u.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

(2) 連携研究者

山本 典生 (YAMAMOTO norio)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 40323703