

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790043

研究課題名(和文) 未知の薬剤耐性予測を目的としたインシリコ薬剤耐性評価法の確立

研究課題名(英文) Development of in silico drug resistance evaluation based on the target protein structures

研究代表者

川下 理日人 (Kawashita, Norihito)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00423111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染症治療において薬剤耐性の出現は不可避の課題であり、それゆえ薬剤耐性評価は重要な位置を占める。そこで薬剤耐性ウイルスの簡便な評価法として、蛋白質の変異情報と既知結晶構造のみを用いたドッキングスタディによる手法を以前開発した。本研究ではこの手法の適用範囲拡大を目的として、HIV-1プロテアーゼ阻害薬のアタザナビル及びノイラミニダーゼ阻害薬のオセルタミビルに本手法を適用し、アタザナビルでは強い耐性を持つものについて十分な評価ができた。また、オセルタミビルについてはB型およびH1N1、H3N2、H5N1亜型の評価を行い、B型とH1N1亜型の強耐性変異体について評価を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：Emergence of drug resistant virus in treatment of viral infections is an unavoidable problem and the evaluation of drug resistant is an important theme among that. We developed a new evaluation method for drug resistant virus with a docking study, using known crystal structure and the mutation information. We applied this method to atazanavir and oseltamivir for the purpose of extending the scope of this method. Evaluating resistance to atazanavir for 30 kinds HIV-1 protease, including wild type and 29 variants, it was possible to assess the strong atazanavir-resistant protease. Further, we also applied this method to the H1N1 subtype and B type neuraminidase, to each type including wild type, resistant variant and strong resistant variant, it was possible to evaluate the strong resistant variants of H1N1 subtype and B type neuraminidase.

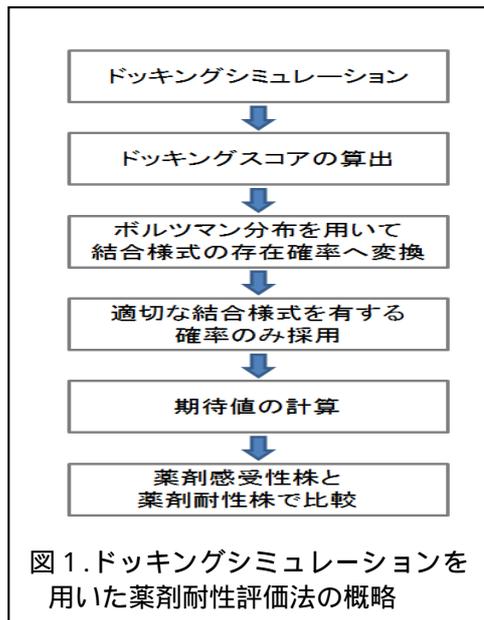
研究分野：計算化学、分子設計学

キーワード：ウイルス 感染症 薬剤耐性 ドッキングシミュレーション 配列解析

1. 研究開始当初の背景

近年のウイルス感染症治療において、抗 HIV 薬はエイズを致死性の疾患から慢性疾患へと変化させ、抗インフルエンザ薬は計 4 種のノイラミニダーゼ阻害剤が臨床利用されるなど、抗ウイルス剤は絶大な成果を挙げている。その一方、抗ウイルス薬を用いた薬物療法には、それらのウイルスが耐性変異を獲得することでその効果が減弱される薬剤耐性が問題となっている。例えば、インフルエンザの場合、ノイラミニダーゼの 275 番目が His から Tyr に変異することによるオセルタミビル耐性変異が次々と発見され、2008 ~ 2009 年シーズンには大部分の H1N1 亜型においてこの変異を有することが報告された。¹⁾ さらに、2009 年に発生した新型インフルエンザにおいても例外ではなく、同年 7 月には既にオセルタミビル耐性ウイルスが検出されている。²⁾

これらの薬剤耐性を速やかに発見できないまま治療が継続されると、患者の症状改善に至らない上、更なる耐性ウイルスの出現をもたらす可能性がある。それゆえ、薬剤耐性の早期同定は、抗ウイルス療法において非常に重要な位置を占める。そのような背景下、申請者らは近年、ドッキングシミュレーションとボルツマン分布を組み合わせた薬剤耐性評価法を考案し、オセルタミビル耐性変異を有する結晶構造やホモロジーモデリングを用いて構築した一部の蛋白質に対して適用可能であることを報告した。³⁾ 本法の概略を図 1 に示す。本法はドッキングシミュレーションで得られた各結合様式のスコアを存在確率へと変換し、それらの和である期待値を用いて薬剤感受性株と薬剤耐性株で比較することで薬剤耐性を評価する手法である。



本法の特長として、薬剤耐性の定性的な評価を簡便に実施可能なこと、未知の変異ウイルスに対しても薬剤耐性の有無を予測する

ことが可能なことがあげられる。未知の変異に対する薬剤耐性予測に関してはほとんど報告例が無く、将来出現する可能性のある薬剤耐性変異には現状全くの無力であるため、その対策が望まれている。そこで、申請者は本研究課題において、本手法の適用範囲を種々のモデリング蛋白質や種々の抗ウイルス薬にも拡張すると共に、未知の変異ウイルスにも同様の薬剤耐性評価を行うことで、それらが出現した際の対策を提示したい。

2. 研究の目的

抗ウイルス薬治療では常に薬剤耐性の問題に悩まされているため、薬剤耐性を速やかに評価する必要がある。それゆえ、申請者らはドッキングシミュレーションとボルツマン分布を組み合わせたインシリコで簡便に薬剤耐性評価を行う手法を開発し、現在その適用範囲の拡張を試みている。本手法の特長は未知の薬剤耐性変異に対しても評価が可能なことであり、それらの情報を蓄積することにより、未知の薬剤耐性に前もって対抗策を講じることができる。

よって本申請課題では、申請者ららの考案した薬剤耐性評価法を、抗インフルエンザ薬や抗インフルエンザ薬などの抗ウイルス薬およびそれらの標的蛋白質に対して適用し、薬剤耐性情報の蓄積や将来起こりうる新規薬剤耐性変異の予測を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 手法の概要

本手法ではドッキングシミュレーションで得られたスコアに対してボルツマン分布を適用することにより、これを該当するドッキングポーズの取りうる確率へと変換して評価を行う。

まず、耐性を比較する変異体についてホモロジーモデリングなどを用いて構造を作成しドッキングを行う。続いて、ドッキングで得られたスコアを自由エネルギーとみなしてボルツマン分布に従った確率を計算する。そしてドッキングで得られたポーズのうち適切に結合しているポーズの確率の和を期待値として、それぞれの変異体について計算された期待値を比較する。

本研究でのホモロジーモデリングやドッキングシミュレーションについては、MOE (CCG 社)⁴⁾ を利用して行った。

(2) プロテアーゼとアタザナビルへの適用

変異体に関しては STANFORD UNIVERSITY HIV DRUG RESISTANCE DATABASE より 30 種類の most common mutation を選択した。⁵⁾ プロテアーゼとアタザナビルの共結晶構造の PDB ファイル (PDBID:2AQU⁶⁾) をもとにホモロジーモデリングにより各変異体を作成した。

作成したモデルに対して、Protonate 3D により水素原子を付加し、MMFF94x を力場として構造最適化を行い、ここで得られた構造を初期構造としてドッキングを行った。ドッキングは Triangle matcher を用いて配置された構造のうち、リガンドの位置が初期位置から 2 以内のポーズのみを grid min で最適化し、London dG を用いてスコアリングした。ここではリガンドの位置としてリガンドの各原子の座標の平均の位置を用いた。

初期構造のリガンドの位置からの距離が何かしらのカットオフ値以下となるポーズを適切なポーズとして期待値を計算した。カットオフ値を徐々に変化させながら期待値を計算し、30 種類の期待値の分散が最も大きくなる距離をカットオフ値とした。

(3) ノイラミニダーゼとオセルタミビルへの適用

変異体は H1N1 亜型、H3N2 亜型、H5N1 亜型、B 型それぞれ耐性の強いもの(>10 fold resistance)と弱いもの(<10fold resistance)を選択し、さらに耐性変異が入っていない野生株 (WT) も用いて期待値の計算を行った。用いた変異体と耐性の強さを表 1 に示す。また、WT の配列情報として H1N1 型、H3N2 型、H5N1 型、B 型についてそれぞれ NCBI の influenza A, 及び B の overview^{7,8)}を参照した。

表 1 各変異体のオセルタミビルに対する耐性の強さ⁹⁾

変異体	B 型 E119G	B 型 I222T	H1N1 型 E119V	H1N1 型 I222V
WT に対する耐性の強さ	31	6-7	1727	3
変異体	H3N2 型 Q136K	H3N2 型 R292K	H5N1 型 V149A	H5N1 型 H274Y
WT に対する耐性の強さ	1	>10000	4	911-2502

ホモロジーモデリングの際の構造は H1N1 型と H5N1 型については PDBID:3B7E¹⁰⁾の構造、H3N2 型については PDBID:4GZP¹¹⁾の構造、B については PDBID:4CPY¹²⁾の構造を参照した。4GZP の構造を重ね合わせてリガンドの位置を決定し、Protonate 3D により水素原子の付加を行い、MMFF94x を力場として構造最適化を行った。最適化した構造に対して Site Finder を用いて結合ポケットを探索し、ドッキングを行った。ドッキングは Triangle matcher により配置を行い、得られた構造すべてを MMFF94x で最適化した。スコアリングには London dG を用いた。

得られたスコアを用いて確率を計算し、リガンドの初期構造を基準とした RMSD とリ

ガンドの位置からの距離のそれぞれについてカットオフ値を設定してカットオフ値以下のポーズの期待値を計算した。カットオフ値はプロテアーゼの時と同様に期待値の分散が最も大きくなる値を採用した。また、リガンドの位置はプロテアーゼの時と同様に分子に含まれる原子の座標の平均の位置とした。

4. 研究成果

(1) プロテアーゼとアタザナビル

リガンドの位置が初期構造から 0.97 Å 以内の期待値の分散が最大となった。このときの耐性の強さと計算された期待値のプロットを図 2 に示す。耐性の非常に強いものは期待値が小さく計算されており、十分な耐性評価ができていたことがわかった。一方、耐性の中等度以下のものについては期待値の大小が一定せず、十分な評価ができていないことが分かった。

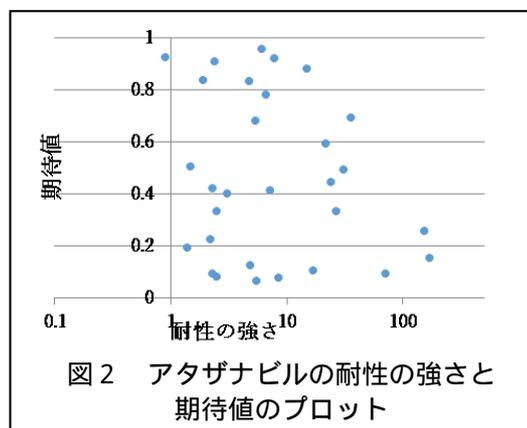


図 2 アタザナビルの耐性の強さと期待値のプロット

(2) ノイラミニダーゼとオセルタミビル

B 型は RMSD が 3.02Å、およびリガンドの位置が 0.79 Å 以内で期待値の分散が最大となった。また、H1N1 型は RMSD が 2.74 Å 以内、リガンドの位置が 1.35 Å 以内で期待値の分散が最大となった。それぞれの耐性の強さと期待値のプロットを図 3 に示す。H3N2 型と H5N1 型については現在検討中である。その結果、B 型と H1N1 型については耐性の非常

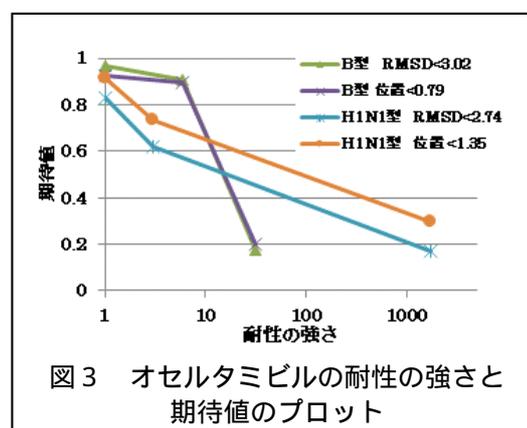


図 3 オセルタミビルの耐性の強さと期待値のプロット

に強い変異体の期待値は低く計算され、十分な耐性評価が可能であることがわかった。

(参考文献)

- 1) WHO, "Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir", 18 Mar., (2009).
- 2) CDC, MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., **58**, 893-896, (2009).
- 3) Kawashita, N. et al., *Antiviral Res.*, **90**, A71, (2011).
- 4) *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, (2013).
- 5) STANFORD UNIVERSITY HIV DRUG RESISTANCE DATABASE
<http://hivdb.stanford.edu/>
- 6) José C. Clemente *et al.* Analysis of HIV-1 CRF_01_A/E Protease Inhibitor Resistance: Structural Determinants for Maintaining Sensitivity and Developing Resistance to Atazanavir. *Biochemistry*. 2006, **45**(5), 5468-5477.
- 7) Influenza A virus overview
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10290>
- 8) Influenza B virus overview
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/4843>
- 9) Nguyen HT *et al.* Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antiviral Therapy*. **17**(1), pt B, 159-173 (2012).
- 10) Xiaojin Xu *et al.* Structural Characterization of the 1918 Influenza Virus H1N1 Neuraminidase. *J. Virol.*, **82**(21), 10493-10501, (2008).
- 11) Zhu X. *et al.* Influenza virus neuraminidases with reduced enzymatic activity that avidly bind sialic acid receptors. *Journal of Virology*. **86**(24), 13371-13383, (2012).
- 12) Vanessa Escuret *et al.* A Novel I221L Substitution in Neuraminidase Confers High-Level Resistance to Oseltamivir in Influenza B Viruses. *J. Infect. Dis.* **210**(8), 1260-1269, (2014).

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 13 件)

- 1) Watanabe Y., Arai Y., Daidoji T., Kawashita N., Ibrahim M. S., El-Gendy Eel-D., Hiramatsu H., Kubota-Koketsu R., Takagi T., Murata T., Takahashi K., Okuno Y., Nakaya T., Suzuki Y., Ikuta K.
Characterization of H5N1 influenza virus variants with hemagglutinin mutations isolated from patients. *MBio*, **6**, e00081-15 (2015).
- 2) Yasugi M., Kubota-Koketsu R., Yamashita A., Kawashita N., Du A., Misaki R., Kuhara M., Boonsathorn N., Fujiyama K., Okuno Y., Nakaya T., Ikuta K.

Emerging Antigenic Variants at the Antigenic Site Sb in Pandemic A(H1N1)2009 Influenza Virus in Japan Detected by a Human Monoclonal Antibody. *PLoS ONE*, **8**, e77892, (2013).

- 3) Watanabe Y., Ibrahim M. S., Ellakany H. F., Kawashita N., Daidoji T., Takagi T., Yasunaga T., Nakaya T., Ikuta K.
Antigenic analysis of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 sublineages co-circulating in Egypt. *J. Gen. Virol.*, **93**(10), 2215-2226, (2012).

〔学会発表〕(計 32 件)

- 1) 上田智弘、川下理日人、岡本晃典、高木達也
ドッキングスタディとボルツマン分布を組み合わせた薬剤耐性変異評価法の開発
第 37 回情報化学討論会、豊橋、2014.10
- 2) Kawashita N., Ueda T., Tian Y.-S., Okamoto K., Takagi T.
Development of in silico drug resistance evaluation to anti-HIV drugs based on the target protein structures
28th International Conference on Antiviral Research, Rome, 2015.5

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

- 1) 名称 : Novel epitope and mechanism of influenza virus hemagglutinin-antibody interaction
発明者 : Kurosawa Y., Iba Y., Ohshima N., Yokoyama S., Shirouzu M., Fujii Y., Sumida T., Ikuta K., Nakamura S., Kawashita N., Nishimura M., Yamashita A., Okuno Y., Kubota-Koketsu R., Okubo M.
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : US 20140086927 A1 20140327
出願年月日 : 2013 年 9 月 24 日
国内外の別 : 国際 (US)
- 2) 名称 : Novel epitope and mechanism of antigen-antibody interaction in an influenza virus
発明者 : Kurosawa Y., Iba Y., Ohshima N., Yokoyama S., Shirouzu M., Fujii Y., Sumida T., Ikuta K., Nakamura S., Kawashita N., Nishimura M., Yamashita A., Okuno Y., Kubota-Koketsu R., Okubo M.
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : WO 2014049520 A2 20140403
出願年月日 : 2013 年 9 月 24 日
国内外の別 : 国際 (PCT)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b015/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川下 理日人 (KAWASHITA, Norihito)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00423111