

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) プロテアーゼ阻害物質の検索 及び遷移状態アナログ型阻害剤の開発に関する研究

学位論文内容の要旨

HIV 感染後に 10 年近く続く無症候期においても、HIV は体内で活発に増殖している。この間の CD4 陽性細胞の減少は、細胞新生により補われ、その数はかろうじて保たれているが、やがてこの均衡は崩れ、血中の CD4 陽性細胞数は著しく減少し、免疫不全状態 すなわち AIDS へと進行する。HIV 感染により CD4 陽性細胞が死滅する機構は、まだ十分に解明されていない。しかし、体内ウイルス量を減少させることにより、CD4 陽性細胞数は回復することから、その根本原因はウイルスの増殖そのものにあると考えられている。本研究は、感染性 HIV の産生に必須なウイルス自身の有するプロテアーゼ、HIV プロテアーゼの特異的阻害剤を検索し、ウイルスの増殖を抑制する抗 AIDS 薬の開発を目指したものであり、本論文の要旨は以下の項目である。

1. 組換え HIV-1 プロテアーゼの大腸菌による生産

阻害物質の検索に使用する組換え HIV-1 プロテアーゼを、大腸菌を用いて大量に生産する系を構築した。活性型 HIV-1 プロテアーゼは宿主大腸菌に対して致死的に作用するため、菌体増殖後に、T7 ポリメラーゼ依存的に外来蛋白の発現誘導が可能な、大腸菌 BL-21(DE3) を使用した。本従来法では、前駆体蛋白からの自己切断により、活性型 HIV-1 プロテアーゼを生産することは可能であった。しかしこの方法で、成熟型 HIV-1 プロテアーゼ発現ベクターを導入して生産性の向上をはかると、菌体増殖時に宿主大腸菌は死滅した。これは、発現誘導前でも T7 ポリメラーゼが少量産生されているためと考えられた。そこで、この菌体増殖時のプロテアーゼ産生を抑制する目的で、1) BL-21(DE3) 内に T7 プロモーターを持つベクターを共存させ、T7 ポリメラーゼの発現ベクターへの結合を競合阻害する 2) 発現ベクターを大腸菌 JM109 に導入し、菌体増殖後に T7 ポリメラーゼを有する M13 ファージを感染させて発現を誘導する系を構築し、成熟型 HIV-1 プロテアーゼの生産を試みた。その結果、従来法に比して、菌体当たりの HIV-1 プロテアーゼ産生量が約 10 倍となる新たな生産法が確立された。

2. 阻害物質検索法の確立

得られた組換え HIV-1 プロテアーゼを用い、阻害活性物質を検索、選択するシステムを構築した。大腸菌にて生産した HIV-1 コア前駆体蛋白を基質とし、切断反応を SDS-PAGE にて解析する方法は、HIV-1 プロテアーゼ阻害活性を迅速に検出する、一次スクリーニング系に適していた。また、得られた活性物質を定量的に評価するため、精製した酵素と合成基質を用い、HIV-1 プロテアーゼに対する阻害定数を測定する系を構築した。さらに他の生体内アスパルティックプロテアーゼに対する阻害活性の定量系を構築した。これにより、阻害活性の強度と阻害の酵素選択性を指標に、HIV-1 プロテアーゼ阻害物質を選択する手順が確立した。

3. ランダムスクリーニングによる阻害物質の検索

確立した検索手順により、天然物 および 低分子化合物を対象に、ランダムスクリーニングを実施した。天然物を対象とした検索において、阻害活性の認められた微生物培養上清サンプルのうち、カビ一株の培養上清中に含まれる阻害活性物質の本体を citrinin と同定した。低分子化合物の検索においては、ハロゲノメチルケトン基とフェニル基を併せ持つ、3 種のオキシム誘導体に阻害活性を見出した。これら化合物は他のアスパルティックプロテアーゼに対する阻害活性が弱く、その酵素阻害は HIV-1 プロテアーゼに対して特異的であった。コンピュータグラフィックスにより、化合物と HIV-1 プロテアーゼのコンプレックスのモデリングを行った結果、これら化合物は基質の部分構造として認識されうることを見出した。さらに、本化合物が HIV-1_{IIIB} 株持続感染細胞において、ウイルスの成熟を阻害することを確認した。

4. 遷移状態アナログ型阻害剤の活性検討

三共活性物質研究所と共同で、各種基本骨格を有する遷移状態アナログ型阻害剤をデザインし、合成した。これらについて、HIV-1 プロテアーゼ阻害活性を測定し、構造活性相関の検討から、基本骨格を選定し、部分構造の改良を行った。約 400 種の内、(2*S*,3*S*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid (AHPBA) 及び (2*R*,4*S*,5*S*)-5-amino-6-cyclohexyl-4-hydroxy-2-methylhexanoic acid (Cha-Ψ[H.E.]-Ala) 誘導体に、強い HIV-1 プロテアーゼ阻害活性を認めた。これらについては、HIV-1 プロテアーゼに対する阻害定数を求め、阻害の酵素特異性を定量的に検討し、さらに HIV-1_{IIIB} 株急性感染細胞系において抗ウイルス活性を検討した。その結果、AHPBA を基本骨格とし、強い HIV-1 プロテアーゼ阻害活性 及び 抗 HIV 活性を有し、かつ水溶性を示した R-87366 : (2*S*,3*S*)-3-[N-(Quinoxaline-2-carbonyl)-L-asparaginyl] amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-L-proline *tert*-butylamide を、さらなる検討の対象として選択した。

5. R-87366 の抗ウイルス活性作用機序の解析

R-87366 の抗ウイルス効果を詳細に検討する目的で、HIV-1_{IIIB} 株持続感染細胞からのウイルスの産生、成熟に対する R-87366 の添加効果を検討した。その結果、R-87366 はウイルスの放出量には影響を及ぼさず、放出ウイルスを未成熟な非感染性ウイルスとすることにより、その抗ウイルス活性を示す事が明らかとなった。

6. 臨床 HIV 株を用いた R-87366 の薬効濃度の検討

R-87366 の臨床 HIV 株に対する活性を検討した。R-87366 は、臨床 HIV 株が持続感染した細胞系、そして感染者 PBMC と健常人 PBMC の共培養系 (*ex vivo* assay) においても、抗ウイルス活性を示した。また、*ex vivo* assay において認められた、個体による R-87366 感受性の差が、ウイルスのプロテアーゼ領域のアミノ酸の相違に由来する可能性を見出した。この *ex vivo* assay の検討結果から、R-87366 の *in vivo* で保つべき有効血中濃度を 0.5 μ M と考察した。

7. R-87366 の安定性ならびに薬物動態の基礎検討

R-87366 の *in vivo* への適用の可能性を検討する目的で、その *in vitro* での安定性、および動物に静脈内投与した後の血中濃度推移を検討した。R-87366 は、バッファー中において安定であり、マウスの臓器ホモジネート中においても分解の徴候は認められなかった。静脈内投与後のマウスにおける血中半減期は 8 分と短かったが、カニクイザルに 5 mg/kg 静脈内投与した後の血中半減期は 65 分であり、投薬後 2 時間以上にわたり、有効血中濃度 0.5 μ M を維持した。この結果は、R-87366 が *in vivo* においても、その有効性を発揮することが期待される化合物であることを示すものであった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 谷 口 和 彌
副 査 教 授 菊 池 九二三
副 査 教 授 田 村 守

学位論文題名

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) プロテアーゼ阻害物質の検索 及び遷移状態アナログ型阻害剤の開発に関する研究

ヒト免疫不全症ウイルス (HIV) 感染症は、感染後約10年といわれる潜伏感染期に体内で活発に伝播増殖し続け、T細胞等のCD4陽性免疫担当細胞を死滅させている。体内のウイルス量が減るとCD4陽性細胞数が回復することから、発症の根本原因はウイルスの増殖そのものにあると考えられる。申請者は、体内でのHIVの伝播増殖を抑制することで、HIV感染症の進行、AIDSの発症を抑制できると考え、感染性HIVの産生に必須なHIVプロテアーゼを特異的に阻害する化合物の検索・デザイン・合成に取り組み、抗AIDS薬の開発をめざした。本論文はその開発研究過程を中心にまとめられており、3章からなっている。

第1章では、HIVプロテアーゼ阻害剤の検索系、阻害活性の定量系、および阻害活性の選択性を定量的に評価するための測定系の構築について述べられている。著者は、HIVプロテアーゼと、基質蛋白質としての前駆体コア蛋白質を、遺伝子クローニング法を用いて大腸菌体内に高能率で生産させる系を開発した。阻害剤の検索には、大量のHIVプロテアーゼを準備する必要があり、従来はウイルスの前駆体蛋白質を大腸菌体内に産生させ、自己分解過程を経てできあがったものを用いてきた。著者は、従来の方法でHIVプロテアーゼを直接菌体内に産生すると、大腸菌が死んでしまうという欠点を克服する新たな生産システムを考案して実用化し、従来法の10倍の生産量を確立することに成功した。このシステムは、HIVプロテアーゼに限らず、大腸菌に対して毒性を示す蛋白質の生産法として広く利用できるものと期待される。著者が構築した阻害剤開発システムは、大量のサンプルの検索に要求される迅速性、および選定された物質を評価するにあたっての定量性の両面で優れたものと評価できる。

第2章には、HIVプロテアーゼ阻害物質の検索とデザイン・合成という開発過程がまとめられている。2,000種におよぶ微生物の培養上清、約200種の低分子化合物を対象にした検索から、ハロゲノメチルケトン基とフェニル基を持つオキシム誘導体がHIVプロテアーゼ阻害物質として優れた能力を持ち ($K_i=2.1-6.3 \times 10^{-6} M$)、HIV感染モデル細胞系においてウイルスの成熟を阻害することを見いだした。コンピュータグラフィックスを用いたプロテアーゼとの結合様式の解析から、これら化合物が基質の部分構造として認識されて酵素と強く結合し、その結果HIVプロテアーゼが阻害されるという可能性を示した。これら化合物を高濃度で加えた場合、細胞を死滅させる作用が無視できなくなるので、この構造から出発して細胞毒性のない、より優れた阻害物質を開発する必要性が示された。

ここで得られた知識をもとに、著者は、酵素と強く結合して優れた阻害剤として働くことが

期待できる、ペプチド性の遷移状態アナログ型阻害剤の開発に取り組んだ。HIVプロテアーゼの基質特異性を最大限に活用するという基本姿勢にしたがい、フェニルアラニルプロリル結合から出発して約400種類の化合物について構造活性相関を検討した。その結果、プロテアーゼの特異的阻害効果 ($K_i=11\text{nM}$) とウイルスの増殖抑制効果に優れ ($\text{IC}_{90}=0.5\times 10^{-6}\text{M}$)、しかも水溶性が高い (4.2mg/ml , 25°C) 化合物R-87366: (2*S*,3*S*)-3-[N-(Quinoxaline-2-carbonyl)-L-asparaginy] amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-L-proline *tert*-butylamideの開発・合成に成功した。

第3章では、R-87366の抗ウイルス活性の作用機序と、臨床適用の可能性についての研究成果が記されている。著者は、R-87366が、HIVプロテアーゼを選択的に阻害することでウイルスの成熟を妨げ、非感染性にすることをウイルス感染モデル細胞系、および数例の臨床感染細胞系について証明した。また、R-87366の体液中での安定性を検討して、少量を静脈内に投与するという即効性の高い方式での抗AIDS薬として臨床適用の可能性を示した。

以上、著者の開発したHIVプロテアーゼに対する特異的阻害剤は、疎水性と親水性を合わせ持ち、新規な即効性の抗AIDS薬の開発に貢献するところが大きい。その開発過程で確立した新技術は、医薬品の開発、遺伝子工学的手法による有用蛋白質の能率的生産という分野の発展にも貢献するものである。本論文の内容の一部は、既に権威のある国内外の雑誌に発表され、高い評価を得ている。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。