



Title	Rev蛋白核外移行阻害天然物をシースとする論理的設計に基づく抗HIVリードの探索
Author(s)	塩見, 敦
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49191">https://hdl.handle.net/11094/49191</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

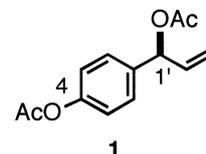
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	しおみ あつし 塩見敦
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 21950 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	Rev 蛋白核外移行阻害天然物をシースとする論理的設計に基づく抗 HIV リードの探索
論文審査委員	(主査) 教授 村上 啓寿 (副査) 教授 田中 徹明 教授 北 泰行 教授 小林 資正

## 論文内容の要旨

現在、薬剤耐性ウイルスの出現がエイズ治療の深刻な問題となっており、新規作用機序に基づく抗 HIV 剤の開発が緊急課題とされている。Rev 蛋白の核外移行は HIV-1 の増殖に必須のプロセスであり、Rev 蛋白の核外移行を阻害する化合物は、新規作用機序を有する抗 HIV 薬リード化合物として非常に有望である。そこで、著者らの研究室では、この Rev 蛋白の核外移行過程に着目し、NES 含有蛋白の核外移行阻害活性を評価するアッセイ系を用い、既に、生薬“ダイコウリョウキョウ”より Rev 蛋白の核外移行阻害物質として 1'-acetoxychavicol acetate (ACA, **1**) を単離し、本活性化合物が 2  $\mu$  M で 81% の抗 HIV 活性を示すことを確認している。また、競合実験によって **1** が、輸送担体 CRM1 の 529 番目の Cys 残基に結合し、Rev 蛋白の核外移行を阻害することも明らかにしている。

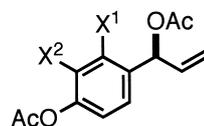


そこで、著者は、**1** をシースとした抗 HIV リード化合物の探索研究に着手した。まず、**1** の構造活性相関研究を行うため、オキサザボロリジンを用いた不斉還元を鍵反応とした立体選択的な合成ルートを確認し、そのルートにしたがい合成した各種アナログの活性を比較することで、1' 位の絶対配置および両 acetyl 基が活性発現に重要であることを明らかにした。次に、**1** の両 acetyl 基は血清中で容易に代謝されるため、*in vivo* 試験において顕著な活性の低下が考えられた。そこで、acetyl 基をより代謝され難いと推察される alkoxy carbonyl、carbamoyl 基に変換したアナログを合成し、その安定性と核外移行阻害活性について評価したところ、carbamoyl 基を有するアナログのみに安定性の向上が認められたが、いずれのアナログも活性は減弱していた。

また、ACA が、輸送担体 CRM1 の Cys 残基に作用し核外移行阻害活性を示すことから、Cys 残基のモデルとして *N*-acetyl-L-cysteine methyl ester を用い、**1** と混合したところ 3 種のシステイン付加体が得られることを見出した。一方、血清中でほとんど代謝を受けない carbamoyl 基を 4 位水酸基に有するアナログからはシステイン付加体は得られず、これが活性を示さない一因であると示唆された。すなわち、ACA アナログが核外移行阻害活性を有するためには、4 位水酸基上の官能基の加水分解が必須のステップであることが推察された。

先の検討により、**1** の活性発現には、4 位 acetoxy 基の加水分解が必須であること、および 1' 位 cysteine 付加成績体が約 1 : 1 のジアステレオマー混合物であることから、キノンメチド中間体を經由する活性発現メカニズムが推

察された。そこで、4位 **acetoxyl** 基の加水分解を **STEP 1**、続くキノンメチド中間体の生成を **STEP 2** として、各 **STEP** の活性化エネルギーを分子軌道計算によって算出した。その結果、**STEP 1** の活性化エネルギー (**E1**) が **STEP 2** (**E2**) を上回り、4位 **acetoxyl** 基の加水分解が律速段階であることが判明した。さらに、4位 **acetoxyl** 基を有するアナログの **E1** をそれぞれ算出したところ、核外移行阻害活性との間に良好な相関性が認められた。そこで、**E1** に比較的大きな影響を与えると考えられる芳香環上にハロゲンを導入したアナログ **2a-2d** について **E1** を算出した。反応性が向上していると計算されたアナログを合成したところ、核外移行阻害活性の向上が認められ、本法によるアナログの設計の有効性が証明された。



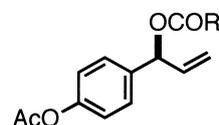
**2a** ( $X^1, X^2 = F$ )

**2b** ( $X^1 = H, X^2 = F$ )

**2c** ( $X^1 = H, X^2 = Cl$ )

**2d** ( $X^1 = H, X^2 = Br$ )

一方、ACAの標的蛋白 **CRM1** に対する結合様式を解明することができれば、論理的なアナログの設計に有用である。しかし、ヒト **CRM1**(**hCRM1**) の全長 X線構造は報告されておらず、結晶構造の報告されている相同性の高い蛋白も見出されなかったことから、著者らは、フォールド認識法により **hCRM1** のモデル構造を構築した。構築したモデル **hCRM1** に対し、反応点である **Cys** 残基のチオール基と **1** あるいはアナログの 1' 位とを共有結合により結合させた状態で分子動力学計算によるドッキングスタディを行ったところ、核外移行阻害活性と計算した相互作用エネルギーに相関性が見出され、本結合様式モデルが活性アナログ設計の有用なツールとなることが示唆された。そこで、より安定な複合体を形成すると算出されたアナログを合成し、活性の増強したアナログ **3**、**4**、**5** を見出した。

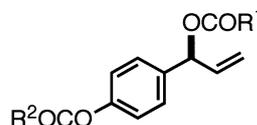


**3** ( $R = NH^iPr$ )

**4** ( $R = ^nPen$ )

**5** ( $R = ^tHex$ )

次に、**CRM1** との結合部位近傍のアミノ酸残基である **Cys498** のチオール基、および **Asp523** のカルボニル基との水素結合による親和性の向上を目的として末端に水酸基を有するアナログを、また、**Ph570**、**Ph572** のベンゼン環との  $\pi$ - $\pi$  相互作用により親和性の向上を期待してベンゼン環を導入したアナログを設計・合成した。これらのアナログの中で、**6**、**7** に活性の向上が認められた。

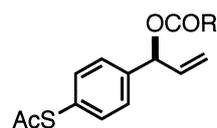


**6** ( $R^1 = (CH_2)_2, R^2 = Me$ )

**7** ( $R^1 = (CH_2)_5, R^2 = Br$ )

さらに、著者は、**CRM1** のモデル構造の **ACA** 結合部位において、**Lys532** のアミノ基による4位-*O*-**acetyl** 基への求核攻撃によりキノンメチド中間体の形成が促進され、続いて **Cys529** のチオール基と反応することを推察している。そこで、4位 **acyloxyl** 基を環構造とすることで結合部位での **Lys** 残基との反応性を維持し、血清中のエステラーゼに対する安定性の向上を指向して、活性部位でキノンメチド中間体生成の期待されるラクトン及びビクマリン構造を有するアナログを設計・合成したが、いずれも活性は大きく減弱していた。

また、著者は、**acetyl** より血清中で安定であり、活性部位に到達後 **Lys532** の求核攻撃を受けるような4位およびその近傍の官能基の探索し、**thiophenyl acetate** が **phenyl acetate** より血清中において安定であったことから、次に、4位に **thioester** 基を有する2種のアナログ **8**、**9** を合成し、**HeLa** 細胞内における **Rev** 蛋白核外移行阻害について **ACA** と同等の活性が認められたことから、**ACA** より血清中で安定であり活性を維持したアナログを見出すことができた。



**8** ( $R = Me$ )

**9** ( $R = NH^iPr$ )

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、薬用植物由来の Rev 蛋白核外移行阻害天然物をシーズとする抗 HIV リード化合物の探索に着手し、以下の研究成果を得た。

1. 1'-(*S*)-Acetoxychavicol acetate (ACA, **1**) の立体選択的合成法を確立し、合成アナログの構造活性相関解析から、1' 位の絶対配置と両 acetyl 基が活性発現に必須であることを明らかにした。
2. ACA の 4 位水酸基上の官能基の加水分解が核外移行阻害活性発現に必須であることを明らかにした。
3. 分子軌道計算と活性データとの比較から、ACA の活性発現にはキノン中間体の生成の段階が重要なステップであることを提示した。さらに、本ステップに対する分子軌道計算を基にアナログ設計を行うことで、**1** より活性の向上したベンゼン環上にハロゲン原子を有するアナログを見出した。
5. ヒト CRM1 の立体モデルを構築し、ドッキングスタディによる相互作用エネルギーに基づいたアナログ設計を行うことで、活性の増強したアナログを見出した。
6. *In vivo* で有効なアナログの創製を目的に、**1** より良好な血中安定性を示すチオエステルアナログを見出し、本アナログが **1** と同等の活性を示すことを明らかにした。

本研究成果は、Rev 蛋白核外移行阻害天然物から、生体内での安定性が向上した抗 HIV リード化合物を見出したものであり、動物モデルでも有効なリード化合物探索の重要な指標になると考えられる。したがって、本論文は薬学博士を授与するに相応しい内容であると結論した。