

インシリコ創薬の手法を用いた 超強力な抗サイトメガロウイルス薬の開発

¹北陸大薬, ²岐阜大工

○藤本和宏¹, 根間大貴¹, 二ノ宮真之², 瀨瀬守², 定成秀貴¹, 武本眞清¹, 大黒徹¹, 村山次哉¹

In silico structure-based design of novel anti-human cytomegalovirus compounds

○Kazuhiro J. Fujimoto¹, Daiki Nema¹, Masayuki Ninomiya², Mamoru Koketsu², Hidetaka Sadanari¹, Masaya Takemoto¹, Tohru Daikoku¹, Tsugiya Murayama¹

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University, Japan

² Department of Chemistry and Biomolecular Science, Gifu University, Japan

【Abstract】 A novel type of antiviral agent for human cytomegalovirus (HCMV) is required, because the appearance of ganciclovir (GCV) resistant viruses has been reported. Tricin has been shown to suppress HCMV replication. However, its anti-HCMV potency is not greater than that of GCV. We tried to develop novel compounds with much greater anti-HCMV activity than GCV. A molecular docking study predicted that 6F-tricin binds to cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) much stronger than triclin. Based on these results, 6F-tricin was synthesized, and then its anti-HCMV effect was analyzed. As a result, the 50% effective concentration (EC₅₀) of 6F-tricin was 0.126 nM, corresponding to about 1/200 and 1/400 of EC₅₀ of GCV (27.5 nM) and triclin (54.3 nM), respectively. Moreover, 6F-tricin had no cytotoxicity against HEL cells at concentrations up to 10 μM. We also found that the strong binding affinity of 6F-tricin is attributed to its specific binding orientation in the binding site.

【序】 ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は臓器移植患者や免疫不全患者に対して重篤な日和見感染症を引き起こすウイルスである。HCMV に対して最も使用されている薬剤はガンシクロビル (GCV) であるが、近年、GCV 耐性を獲得したウイルスの出現が頻繁に報告されており、GCV とは作用機序の異なる新薬の開発が喫緊の課題となっている。これに対し、イネ科植物、特にクマザサに多く含まれるトリシン (Fig. 1a) は GCV とは異なる作用機序で抗 HCMV 効果を発揮するため、新薬の候補として期待されている。しかしながら、トリシンの抗 HCMV 効果は GCV と比較して低いことが分かっているため、トリシンそのものを抗 HCMV 薬として利用することは適切ではないと考えられる。そこで本研究ではトリシンの構造を改変することによって GCV よりも強力な抗 HCMV 薬を作成することを試みた。

【方法 (実験・理論)】 本研究では人工蜂コロニーアルゴリズムを基盤としたドッキングシミュレーション法 (FIABCps 法[1]) を用いてトリシン誘導体の設計を行った。FIABCps 法は、多くのドッキングシミュレーションソフトで採用されている遺伝的アルゴリズムと比べ、高

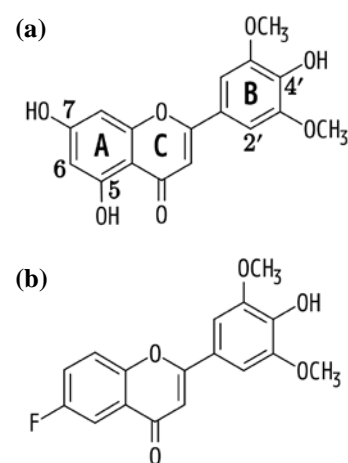


Fig. 1. Chemical structures of (a) triclin and (b) 6F-tricin.

精度でリガンドの結合様式を予測できることが示されている[1]。本研究では、まずトリシンに対してフッ素を導入することで構造の改変を行った。次にデザインしたトリシン誘導体とサイクリン依存性キナーゼ9 (CDK9) とのドッキングシミュレーションを実施し、CDK9 に対する親和性の評価を行った[2]。さらに、ドッキングシミュレーションの結果において結合エネルギー (相互作用) が負に大きなものに対しては100ns の分子動力学 (MD) シミュレーションを実行した。これにより、タンパク質の動き (誘導適合) の効果を考慮した形でリガンドの結合に関する評価を行った。

【結果・考察】 ドッキングシミュレーションの結果、本研究で設計したトリシン誘導体の中で 6F-トリシン (**Fig. 1b**) の親和性が最も高くなることが予測された[3]。Table 1 に示すように、6F-トリシンの結合エネルギー (-7.04 kcal/mol) はトリシン (-5.77 kcal/mol) よりも負に大きくなることが分かった。また 1000 回のシミュレーションの平均値においても同様の結果が得られた。

これらの計算結果に基づいて、実際に 6F-トリシンの合成を行い、さらに HCMV 感染細胞を用いた評価実験を行った。その結果、6F-トリシンの 50%効果濃度 (EC₅₀) は 0.126 nM であった。またトリシンについても EC₅₀ 測定したところ 54.3 nM であった。したがって、6F-トリシンはトリシンより約 400 倍も強力な抗 HCMV 効果を有することが分かった。さらに GCV についても測定を行ったところ、EC₅₀ は 27.5 nM となった。したがって、6F-トリシンの抗 HCMV 効果は GCV と比べて約 200 倍強いことが明らかとなった。次に 6F-トリシンの細胞毒性に関する評価を行った。その結果、6F-トリシンの濃度を 10 μM まで上昇させても細胞毒性が現れないことが確認できた。以上の結果から、インシリコ創薬の手法を用いて設計された 6F-トリシンは強い抗 HCMV 効果を発揮することが細胞実験で示され、さらに 6F-トリシンの細胞毒性は極めて低いことが分かった。

なぜ 6F-トリシンは CDK9 に対して親和性が高いのかを理解するため、相互作用エネルギーをアミノ酸毎に分割して解析を行った。その結果、Asp167 に対して 6F-トリシンはトリシンよりも強く相互作用していることが分かった。また Lys48 に対する相互作用エネルギーは 6F-トリシンの場合では負の値になるのに対し、トリシンの場合では正の値になることが分かった。次に各リガンドの結合様式を解析したところ (**Fig. 2**)、結合ポケット中での 6F-トリシンの向きはトリシンとは異なっており、さらに 6F-トリシンと Asp167 の間で形成される特異的な水素結合が相互作用エネルギーの違いを生成していることが分かった。

【参考文献】

- [1] S. Uehara, K. J. Fujimoto, S. Tanaka, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 16412-16417 (2015).
 [2] H. Sadanari, K. J. Fujimoto, Y. Sugihara, T. Ishida, M. Takemoto, T. Daikoku, T. Murayama, *FEBS Open Bio* **8**, 646-654 (2018).
 [3] K. J. Fujimoto, D. Nema, M. Ninomiya, M. Koketsu, H. Sadanari, M. Takemoto, T. Daikoku, T. Murayama, *Antivir. Res.* **154**, 10-16 (2018).

Table 1. CDK9-ligand binding energies (kcal/mol).

Compound	Lowest value ^a	Mean value ^b
Tricin	-5.77	-5.56
6F-tricin	-7.04	-6.56

^aThe lowest value of the 1,000 runs. ^bMean value calculated with the 1,000 binding energies.

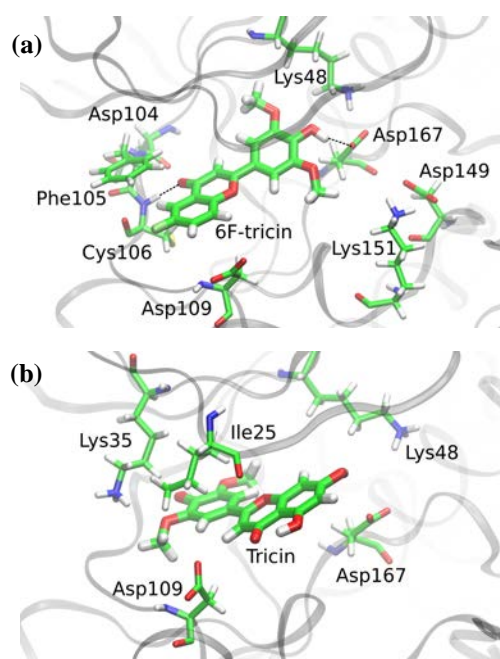


Fig. 2. Binding conformations of (a) 6F-tricin and (b) tricin in the binding site of CDK9.