

## 第15回日本エイズ学会 学会賞（シミック賞）受賞研究

シオノギ医科学研究所の思い出と HIV-1 インテグラーゼ阻害剤  
ドルテグラビルの創薬へとつながった基礎研究Memories of the Shionogi Institute for Medical Science and  
Basic Research Leading to Drug Discovery of the  
HIV-1 Integrase Inhibitor Dolutegravir

吉 永 智 一

Tomokazu YOSHINAGA

塩野義製薬株式会社創薬疾患研究所

Drug Discovery &amp; Disease Research Laboratory, SHIONOGI &amp; CO., LTD.

日本エイズ学会誌 21: 67-69, 2019

京都大学ウイルス研究所所長を退官された故日沼頼夫京都大学名誉教授を招いて1989年4月に基礎研究所としてシオノギ医科学研究所が設立された。設立当初は大半が20代の若い研究者であり、毎日ランチタイムセミナーが開催され、当番の研究員が自分の選んだ論文を紹介し、分野を超えて活発な議論が行われており大学のような雰囲気であった。いちばん前列で眼を閉じて聴いておられた日沼先生から、眼光鋭く「どうしてこの論文を選んだのか？」とダメ出しされることもあり、良い研究を見極める眼を養っていただいた。この良き雰囲気は第2代所長である畑中正一京都大学名誉教授へと引き継がれた。

筆者は1990年4月に入社し、前年の秋に米国立衛生研究所(NIH)への留学から戻られた藤原民雄研究員の率いる抗ウイルスグループに配属された。藤原研究員はNIHの水内清先生の研究室でレトロウイルスのインテグレーションの研究をされ、染色体に組み込まれるウイルスDNA前駆体はサークル状ではなく、直鎖状の構造をしていることを解明されていた<sup>1)</sup>。当時抗ウイルス部門では感染系アクセシによる抗HIV物質の探索と非核酸系逆転写酵素の阻害剤のSAR研究を行っていた。筆者は抗HIV物質の作用機作解析の一環として、インテグラーゼの基礎研究を担当することとなった。

研究を開始して間もなく、HIV DNAの両末端にあるLong terminal repeat (LTR)の末端の配列約20塩基対を合成したオリゴヌクレオチドと精製した組み換えインテグラーゼを試験管内で反応させるとインテグレーション反応が起きる

著者連絡先：吉永智一（〒561-0825 豊中市二葉町3-1-1 塩野義製薬株式会社創薬疾患研究所）

2019年3月15日受付

ことが論文報告<sup>2)</sup>された。この系を確立後、インテグレーションに必要な配列の解析をインテグレーションの各段階、すなわちDNA結合、3'プロセッシング、ストランドトランスファーの3段階に分けてより詳細な解析を行った。タンパク質とDNAとの結合を解析する手法としてはゲルシフトアッセイ（モービリティシフトアッセイ）が一般的であるが、インテグラーゼは溶けにくい上に、DNAを加えると沈殿する傾向があり、非変性ゲルでの解析はうまくいかなかった。そこで、短波長のUVを照射することでDNAに開裂をおこし、生じたラジカルが近傍にリジンやタイロシンなどのアミノ酸がある場合に共有結合を作る現象を利用してDNAとタンパク質の相互作用を解析する方法を試してみた。UV照射後の反応液をSDS-PAGEに電気泳動して解析したところ、インテグラーゼ(32Kd)と1本鎖DNA(7Kd)を足し合わせた大きさとほぼ同じサイズの3本のバンドを検出でき(図1)、これらのうちいちばんサイズが大きなバンドaが活性型IN-DNA複合体に由来するバンドであることを見出した<sup>3)</sup>。

1993年にシオノギ医科学研究所の抗ウイルス部門は創薬第一研究所と合体し、抗ウイルス剤の創薬研究が本格化した。1995年に非核酸系逆転写酵素阻害剤capravirine (S-1153)<sup>4)</sup>の創薬に成功し、開発部門へバトンタッチした。研究所ではインテグラーゼ阻害剤の創薬に本格的に取り組むこととなり、ハイスループットアクセシ系を立ち上げて化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した。上述したUVクロスリンク法を用いてヒット化合物を2次評価した際、バンドaが消失する化合物が真のヒットであろうと予想をたてていたが、残念ながらバンドaが消失するような化合物は1個も得られなかった。逆にバンドaが増強され

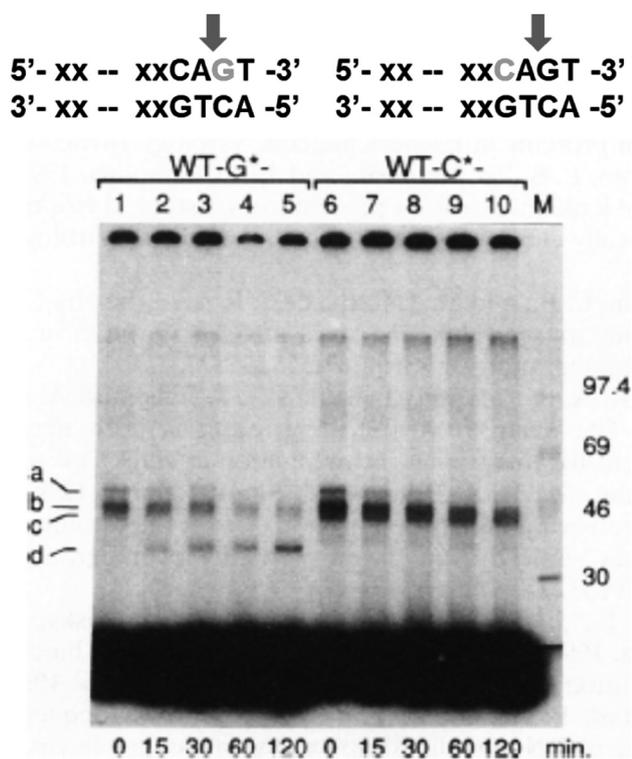


図 1 UV クロスリンク後の複合体は活性を維持しており、インテグレーション反応後新たなバンド d を生じる Yoshinaga T, Kimura-Ohtani Y, Fujiwara T. J Virol. 1994 Sep ; 68 (9) : 5690-7. Fig.7 を改変して引用. 配列の灰色の文字がラジオアイソトープによる標識部位. 3'プロセッシング反応で矢印の場所で切断される. 図の下の数字は UV クロスリンク後の反応時間 (分).

る化合物としてジケトカルボン酸が見つかり、予想に反していたがこの化合物が真のヒットであろうと判断して SAR 研究を進めることとなった。この SAR 研究の中で 2-メタル結合ファーマコフォアモデルを見出し、S-1360 を経てドルテグラビルへとつながっていくのであるが、詳細は別のところで述べているのでそちらをご覧ください<sup>5,6)</sup>。

ハイスループットアッセイ系を構築して、化合物ライブラリーをスクリーニングすると通常相当数の化合物群がヒットする。しかし、ゴール (上市) にたどり着ける “真のヒット” は 1~2 個である。ヒットの見極めは経験豊富なケミストの眼にゆだねられることも多い。その際の基準はヒット化合物の化学的特徴であり、化学的安定性や構造展開性などが好ましくないときは、真のヒットが切り捨てられてしまう場合もある。ハイスループットアッセイ系は多検体を定量的に扱うことを目的に構築されるので、反応の詳細ではなくアウトプットしか見ていないことも多く、異なる作用機作の化合物が同じアウトプットを出す可能性がある。そのため、薬理担当者としては、ターゲットの働き

や特性をよく理解した上で、スクリーニングに用いたアッセイ系以外に作用機作を解析するための 2 次評価系を構築しておくことが重要で、作用機作の観点から真のヒットを見出すことが使命である。幸いこのプログラムの場合は基礎研究の時間が与えられ、UV クロスリンク法によってジケトカルボン酸化合物が真のヒットと同定することができた。しかし、残念ながら近年は、時間の制約が厳しく、十分な基礎研究をする間もなく創薬プログラムが開始され、スクリーニング自体は機械化によりあっという間に終わってしまう。そのため適切なヒット選定がされずにプログラムが終了している可能性がある。創薬を成功させるためには地道な基礎研究が非常に大切だと痛感している。

### 謝辞

シオノギに入社してから HIV インテグラーゼ研究をご指導いただいた故日沼頼夫先生、畑中正一先生に深く感謝いたします。入社時の直属長であり、つねに暖かく見守っていただいた藤原民雄研究員、佐藤彰彦研究員はじめ抗ウイルス部門、感染症部門のみなさんに感謝いたします。

利益相反：塩野義製薬株式会社の従業員である。

### 文 献

- 1) Fujiwara T, Mizuuchi K : Retroviral DNA integration : structure of an integration intermediate. Cell 54 : 497-504, 1988.
- 2) Sherman PA, Fyfe JA : Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity. Proc Natl Acad Sci USA 87 : 5119-5123, 1990.
- 3) Yoshinaga T, Kimura-Ohtani Y, Fujiwara T : Detection and characterization of a functional complex of human immunodeficiency virus type 1 integrase and its DNA substrate by UV cross-linking. J Virol 68 : 5690-5697, 1994.
- 4) Fujiwara T, Sato A, el-Farrash M, Miki S, Abe K, Isaka Y, Kodama M, Wu Y, Chen LB, Harada H, Sugimoto H, Hatanaka M, Hinuma Y : S-1153 inhibits replication of known drug-resistant strains of human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob Agents Chemother 42 : 1340-1345, 1998.
- 5) 吉永智一：HIV-1 インテグラーゼ阻害剤 ドルテグラビルの創薬と開発. ファルマシア 53 : 565-569, 2017.
- 6) 吉永智一, 宍戸貴雄, 吉田立：ウイルス疾患の創薬 2-メタル結合ファーマコフォアモデルに基づく成功例. 生体の科学 69 : 339-344, 2018.

## 著者寸描

吉永智一（よしなが ともかず）



1988年3月 京都大学理学部卒業  
1988年4月 京都大学大学院理学部修士課程入学  
1990年3月 京都大学大学院理学部修士課程修了  
1990年4月 塩野義製薬入社、医科学研究所勤務  
2001年5月 京都大学大学院にて博士号取得（理学）  
2001年7月 米国 National Institutes of Health へ留学  
2002年8月 帰国、塩野義製薬医科学研究所勤務  
2006年4月 創薬研究所感染症部門 抗ウイルス2グループ長  
2012年4月 塩野義製薬創薬・疾患研究所感染症部門 抗ウイルス1グループ長  
2018年4月 塩野義製薬創薬疾患研究所感染症・免疫部門 HIV 感染症グループ長  
現在に至る