

厚生労働科学研究研究費補助金

政策創薬総合研究事業

課題番号 H16-創薬-006

HIV融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

平成16-18年度 総合研究報告書

平成19年3月

主任研究者 松岡 雅雄

(京都大学ウイルス研究所・教授)

目 次

I. 総合研究報告	
HIV融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の 開発に関する研究	----- 1
主任研究者・松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 主任研究者・松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	----- 4
分担研究者・児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・助手）	
2. 分担研究者・藤井信孝（京都大学大学院薬学研究科・教授）	----- 12
分担研究者・大石真也（京都大学大学院薬学研究科・助手）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 36
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 44

HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄

研究要旨

多剤併用療法の著しい効果により HIV 感染症はコントロール可能な疾患となっているが、長期の薬剤服用は耐性ウイルスの出現という負の側面を有する。このため HIV 感染症に対する新規治療薬開発の必要性が高まっている。インテグラーゼ阻害剤、吸着阻害剤は臨床開発が進んでいるが、融合阻害剤の開発に関しては Fuzeon 以外には開発が進んでいない。本研究により開発が進められている融合阻害剤は耐性ウイルスにも強い抗 HIV 活性を有しており、臨床応用されれば HIV 感染者の治療上、有望な治療薬となると期待される。

本研究において抗 HIV 活性の生物学的解析、耐性ウイルスの研究結果を合成にフィードバックすることにより、従来の融合阻害剤に比し格段に効果の強い融合阻害剤の合成に成功した。融合阻害活性を有するペプチドは耐性ウイルスに対する活性を著しく増強し、低分子化にも成功しており、今後の臨床応用が期待される。融合阻害活性を有する低分子化合物は、抗 HIV 活性の強い化合物の合成には至っていないが、異なる構造のリード化合物の同定に成功しており、今後の展開が期待される結果を得たものと考えている。融合阻害小分子化合物は、既に同定したリード化合物を基盤に今後、更に抗 HIV 活性が強い化合物の創出を行う。

分担研究者氏名・所属機関名及び
所属機関における職名：

藤井信孝（京都大学大学院薬学研究科・教授）
大石真也（京都大学大学院薬学研究科・助手）
児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・助手）

A. 研究目的

不治の病と考えられた HIV 感染症は複数の抗 HIV 剤を組み合わせた highly active antiretroviral therapy (HAART) の著しい効果によりコントロール可能な疾患へと変貌している。しかし、HIV の根絶は不可能なままであり、そのコントロールには長期の服薬が絶対条件である。このような長期の服用に伴い耐性ウイルスの出現は避けられない問題となっており、耐性ウイルスに対しては新たな複製ステップを標的とする新規薬剤が有効である。

我々の研究グループは HIV 外皮タンパク質 gp41 により引き起こされる細胞・HIV 膜融合 (fusion) を新たな分子標的として新規阻害剤の開発を進めている。本研究の目的は未だ解明が進んでいない HIV 細胞融合の分子機序を明らかにし新薬開発のための分子基盤を確立することである。融合ステップをターゲットにした新規抗 HIV 剤の開発は耐性ウイルス克服に有効であるばかりでなく HAART 療法の強化、感染予防薬としての可

能性をも有するものと期待される。

B. 研究方法

1) 抗 HIV 活性は MAGI 細胞、p24 測定で検討し、耐性ウイルスは dose-escalation 法で誘導した。

2) 耐性ウイルスはプラスミドクローン pNL4-3 を基本として site directed mutagenesis 法を用いて臨床分離耐性株でみられた主要な変異を導入し組み換えウイルスを作製した。

3) C34 誘導体および T20 誘導体をはじめとするペプチドは、Fmoc 固相合成法の常法によって合成した。また、非ペプチド化を指向したペプチドイソスターの合成、および低分子膜融合阻害剤の基本骨格となる誘導体は、通常の化学合成法により成果発表論文に記載の方法でそれぞれ合成した。

(倫理面への配慮)

基礎研究であり、特段の配慮を必要とする実験は実施していない。

C-D. 研究結果と考察

1) 融合阻害活性を有するペプチドの創製と低分子・非ペプチド化

研究グループでは、CHR 由来ペプチドの一つである C34 をリード化合物とした抗 HIV ペプチドの創製研究を展開し、極めて強力な抗 HIV 活性を示す SC34、SC34EK、SC35EK を見出していた。この分子設計概念

を T-20 に適用した誘導体、すなわち、 α ヘリックス性の向上を指向した X-EE-XX-KK ユニット (X = CHR のアミノ酸残基; E = Glu; K = Lys) を導入した T-20EK が、T-20 に比較して約 8 倍強力な抗 HIV 活性を示すことを明らかにした。CD スペクトル測定の結果、T-20EK において α ヘリックス性の指標として用いられる 222 nm 付近で負の極大を示すスペクトルが観察され、T-20EK の α ヘリックス性が T-20 に比べ期待通り上昇していることが認められた。T-20EK では、結晶構造から推定される T-20 の溶媒接触面に位置する残基の置換により抗 HIV 活性が上昇したことから、溶媒接触面に位置する残基は T-20 の膜融合阻害に直接関与していないことが示唆された。興味深いことに、T-20EK は、T-20 耐性株に認められる N43D 変異を有するウイルス実験株に対しても抗 HIV 活性を保持していることを確認した。

一方、SC35EK の低分子化、非ペプチド化についての検討を行った。C34 の C 末端側は NHR との相互作用にそれほど関与していないという知見をもとに、SC35EK から C 末端の 6 残基を除去した SC29EK、13 残基を除去した SC22EK をそれぞれ合成し、抗 HIV 活性を評価したところ、SC29EK は SC35EK に匹敵する抗 HIV 活性を、SC22EK も高い活性を保持していることを明らかにした。次いで、低分子化したペプチド SC29EK、SC22EK について、非水解性イソスターの利用による非ペプチド化を試みた。このうち、SC29EK の C 末端側にオルニチン誘導体を適用した SC29EKOrn1-4 および SC22EK の C 末端側にアルケン型イソスターを適用した SC22EK1 が、それぞれ元のペプチドよりは弱いながらも抗 HIV 活性を保持していることを確認した。

2) 膜融合プロセスと融合阻害剤に対する耐性ウイルス出現の分子機序解明への展開

C34 に対する耐性ウイルスを誘導し gp41 では計 7 つのアミノ酸置換が認められた。そのうち I37T、I37K および N126K が耐性化に関与し、特に I37K が耐性責任変異であった。I37K は C34 の結合を弱めることによって耐性化に寄与していた。Rev responsive element (RRE) 領域に変異が起こるため、ウイルスは 2 次変異によって RRE の RNA 構造を維持していることが明らかとなった。

N 末由来のペプチド N36 に対する耐性変異を誘導し、gp120 領域に P183Q、gp41 領域に D36G/N126K/E137Q の変異が導入されて

いた。それぞれの変異を有する感染性クローンウイルスを作製し、N36 の感受性を検討したところ、N126K と E137K がおのおの 3 倍程度の耐性を付与していることを明らかとした。

SC34 の耐性ウイルスを分離した。SC34 耐性ウイルスは gp41 領域に 12 個の変異が導入されており、約 350 倍耐性化していた。導入された変異のうち、I37K、Q56R、N126K、N163D だけが単独で耐性を示したが、その程度は 5 倍以下と非常に弱く SC34 に対して HIV は容易に耐性化できないと考えられた。SC34 のアミノ酸配列を一部入れ替えた SC34EK は SC34 耐性 HIV に対して感受性が約 5 倍しか低下せず非常に類似したペプチドが交差耐性を示さないことが明らかとなった。これらのことから、EK 置換の部位を変えることによって交叉耐性を抑えることが可能であることが示唆された。

以上の研究で明らかとなった耐性機序を基盤に耐性ウイルスに有効である融合阻害ペプチドの創製を行い T-20 および T-20EK の 138 位について構造活性相関研究を行ったところ、それぞれ Ala 置換体が最も高い活性を示し、リード化合物である T-20 に比べ 50 倍以上強力な抗 HIV 活性を示す誘導体 T-20EK/S138A を見出した。

3) Alpha screen を用いたスクリーニングシステム

膜融合阻害剤の候補化合物となる低分子化合物をスクリーニングするための評価系の確立を行った。スループットの高いスクリーニングを可能にするために、洗浄操作を必要としない連続的な試薬の分注による均一系での反応でアッセイを行うことが可能な AlphaScreen™ システムを活用し化学合成ペプチドを利用したアッセイ系を構築した。HR-1 (NHR) 領域上の T-20 の結合領域および C34 の結合領域にそれぞれ存在する疎水性ポケットに結合し、6-helical bundle 構造を阻害する化合物を見出すためのスクリーニングシステムを、ビオチン標識および His タグ標識ペプチドを利用することによりそれぞれ構築した。

4) 融合阻害活性を有する低分子化合物の同定と展開

分担研究者らによって合成された化合物を MAGI 法と ELISA 法にて検討したところ、MAGI 法では抗 HIV 活性を検出できたが ELISA 法では検出されなかった 11 薬剤を見出した。これらのうち 3 剤は 1 μ g/ml 以下で

効果を示しており、今後の臨床応用へ向けた開発が期待される。

加えて、最近、respiratory syncytial virus (RSV) の膜融合阻害剤がインドールもしくはベンズイミダゾール骨格を有する低分子化合物であることに着目し、これらの骨格を有する化合物 118 種類についてスクリーニングを実施した。その結果、 $EC_{50} = 40\mu\text{M}$ と $70\mu\text{M}$ の抗 HIV 活性を示した化合物の共通骨格がインドールであったことから、これらの関連誘導体への合成展開に向けて、効率的なインドール誘導体合成法の確立を検討した。その結果、アレン化合物の合成に関する研究の過程において、エチルアニリン誘導体、パラホルムアルデヒド、ジイソプロピルアミンを触媒量の臭化銅 (I) 存在下で反応させると、2-(アミノメチル)インドール誘導体が高収率で得られることを見出した。この三成分カップリング環化ドミノ反応による新規骨格合成法は、 R^1-R^4 の置換基を自由に選択することが可能であり、本法を用いたリード化合物の最適化研究を効率的に実施することが可能となった。

E. 結論

本研究期間において融合阻害剤に対する耐性 HIV の分子機構を明らかにすると共に、その情報を合成にフィードバックすることにより耐性ウイルスにも有効な融合阻害剤の開発に成功した。ペプチドの低分子化にも成功しており、今後、臨床応用が期待される。また融合阻害活性を有する小分子リード化合物を同定しており、今後の展開が期待される。本研究は当初の目的をほぼ達成したと考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

別添

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 別添
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
分担研究者：京都大学ウイルス研究所 児玉 栄一

研究要旨

①HIV-1膜融合ペプチドに対する耐性機構を明らかにすることで薬剤開発に有用な情報を得た。新規化合物スクリーニング法を確立し、抗 HIV 活性を示す新規化合物を同定した。②またペプチド性融合阻害剤にアミノ酸置換を行い低分子化とただだけでなく耐性 HIV に対しても効果をのこすことを可能とした。

A. 研究目的

Human immunodeficiency virus (HIV)に対する化学療法が導入されてから約 20 年が経過しようとしている。この間、多くの逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が開発、臨床使用され著明な効果が見られるようになってきているが、多剤耐性 HIV の出現によって治療効果が著しく低下させられることは大きな問題である。さらに新規薬剤においてもその影響を受けるものがあり、多剤耐性 HIV に有効な新規の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発にとどまらず、新しい分子標的に対する薬剤の開発が必要不可欠である。

これまでも新規の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が継続的に開発されてきている。一方で、コレセプター吸着阻害剤、融合阻害剤、インテグラーゼ阻害剤等が研究、開発されてきているが、現在臨床応用された薬剤は融合阻害剤のみである。本邦では、まだ承認されていないものの HIV 外皮蛋白質 gp41 に由来するペプチド T-20 (Trimeris-Roche 社、Fuseon) は HIV と宿主細胞との融合を阻害し、現在、米国やヨーロッパ等で臨床応用され大きな効果を上げている。しかし T-20 は合成ペプチド製剤であるため治療費の大幅な増大につながり安価で強い活性を持つペプチドの開発が急務である。一方でペプチド製剤は経皮投与に限られるため経口投与可能な融合阻

害活性を有する小分子化合物の開発は最重要課題である。

本研究では未だ解明が進んでいない HIV 細胞融合の分子機序を明らかにし、新薬開発のための分子基盤を確立する。gp41 をターゲットにした新規抗 HIV 剤の開発は耐性ウイルス克服に有効であるばかりでなく HAART 療法の強化、感染予防薬としての可能性をも有するものと期待される。本研究期間内において、分担研究者らによって合成された融合阻害ペプチドと小分子化合物の活性評価、作用機序の解明、有効な融合阻害剤 N36、C34 とその誘導體 SC34 に対する耐性ウイルスの性状解明、ELISA (Enzyme linked immunosolvent assay)を応用した迅速で簡便なスクリーニング法の確立、を中心に行った。gp41 をターゲットにした新規抗 HIV 剤の開発は耐性ウイルス克服に有効であるばかりでなく HAART 療法の強化、感染予防薬としての可能性をも有するものと期待される。

B. 研究方法

1) 使用したペプチド

T-20 と比べて非常に強い抗 HIV 活性を有する SC34EK とその C 末側 5 アミノ酸を欠失させた SC29EK とさらに 7 アミノ酸欠失させた SC22EK を使用した。コントロールとして EK 置換を行っていない C34、C29、C22 も使用した。T-20 の低分子化を目的とし、

T-20 のアミノ酸配列を SC34 誘導体と同様に EK による置換を試みた。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性は HeLa-CD4/LTR- β -galactosidase (MAGI)細胞を用いて既報にしたがって行った。また、長期にわたる HAART によって薬剤耐性を獲得した臨床分離株を HIV 感染患者から分離し、これらに対する SC34 誘導体の効果を健常人末梢リンパ球 (PBMC) で検討した。効果判定は PBMC 培養上清中に放出された HIV 粒子中の p24 量から判定した。

3) N36 および C34 誘導体に対する耐性ウイルスの誘導、解析

耐性ウイルスを NL4-3 株と MT-2 細胞を用いた dose escalating 法によって誘導し、その責任変異を同定した。これらの変異が融合にどのような意義を持つかを感染性リコンビナント HIV において検討した。これらの変異が融合に重要な意義を持つ α -helix 構造にどのような変化をもたらすのかを circular dichroism 解析し、結合能の変化を T_m 値から解析した。N36 耐性株に関しては立体構造を決定した。

4) 耐性ウイルスの作製

耐性ウイルスはプラスミドクローン pNL4-3 を基本として site directed mutagenesis 法で現在まで報告された臨床分離耐性株でみられた主な変異を導入し、293T 細胞に遺伝子導入し、その培養上清から回収した。

5) HIV 細胞融合の非感染系モデルの確立 gp41 領域の N-terminus heptad repeat (N-HR: N36)と C-HR (C34)を大腸菌を用いてそれぞれ MBP と GST の融合蛋白として合成した。ELISA 用 96 ウェルプレートに精製した GST-C34 (100 μ M) を 4°C で 12 時間固層化し PBS で洗浄後、BSA を用いてブロッキングを行った。MBP-N36 (100 μ M) を 37°C 1 時間反応させた。反応後、PBS でプレートを洗浄し GST-C34 に結合した MBP-N36 をアルカリホスファターゼ標識された抗 MBP 抗体によって検出した。

(倫理面への配慮)

基礎研究しか行っておらず、特に配慮は要らないと考えられた。

C. 研究結果

1) N36 の耐性機序

C 末由来のペプチド T-20 に対する耐性機序は検討されているが、N 末由来のペプチドに関しては全く報告されていない。そのため我々は N36 に対する耐性ウイルスを dose escalating 法にて誘導した。約半年培養することにより、N36 に対して 10 倍程度耐性を示すウイルスが分離できた。このウイルスの env 領域すべて (約 2.5 kb) の塩基配列を決定したところ、gp120 領域に P183Q、gp41 領域に D36G/N126K/E137Q の変異が導入されていた。それぞれの変異を有する感染性クローンウイルスを作製し、N36 の感受性を検討したところ、N126K と E137K がおのおの 3 倍程度の耐性を付与していることを明らかとした。一方 gp120 の P183Q と gp41 の D36G 変異は感受性に影響を与えていなかった。立体構造上大きな変化は見られなかったが、E137Q によって新しい水素結合ループが形成されており、これが耐

Table 1. N36耐性誘導で見られた変異のN36感受性

mutation	EC ₅₀ (nM)		
	N36	C34	ddC
WT	200	2.8	505
<i>gp120</i>			
P183Q	343 (1.7)	2.7 (0.9)	414 (0.8)
<i>gp41</i>			
N126K	550 (2.8)	11.3 (4)	515 (1)
E137Q	636 (3.2)	3.0 (1.1)	500 (1)
N126K/E137Q	731 (3.7)	12.2 (4.4)	642 (1.3)
QGKQ*	573 (2.9)	14.7 (5.3)	634 (1.3)

pNL4-3を変異導入に用いた。*gp120: P183Qおよびgp41: D36G/N126K/E138Q変異を含む。薬剤感受性はMAGI法で検討した。

性をもたらしていると考えられた (Table 1)。

2) C34耐性ウイルスの解析

N36 と同様に C34 存在下で 93 経代することによって C34 に対して 84 倍耐性のウイルスを分離した。この耐性ウイルスの gp120 では連続する 5 アミノ酸が欠失しており (Δ FNSTW)、また、gp41 では計 7 つのアミノ酸置換が認められた。そのうち I37T、I37K および N126K が耐性化に関与し、特に I37K が耐性責任変異であった。

しかし、高度耐性化にはアミノ酸変異の蓄積が必要であることが示された。複製能解析の結果、A30V、D36G および L204I は複製能の向上に関与し gp120 に認められた Δ FNSTW は耐性度の上昇と複製能の向上の両方に関与していた。これらの結果から、耐性化に関与する変異が先に挿入され、それらによる複製能低下を回復させる変異が出現するという変異の導入形態をとることが示された。また、耐性責任変異である I37K は C34 との結合力を弱めるが、C-HR に存在する N126K は、I37K を有する変異 N-HR との結合力を回復させることが peptides binding assay により明らかとなった。A30 と D36 における塩基置換は、env やウイルスゲノム RNA を細胞核外へ輸送する Rev タンパクが結合する Rev responsive element (RRE) 領域中に存在し I37 の置換によって変化した RRE の 2 次構造を補正するための 2 次変異と考えられた。gp41 コード領域は RRE のみならず、tat や rev の一部をコードしていることから HIV は融合阻害剤に対する変異を容易に導入することはできないと推測された。

3) SC34 誘導体耐性ウイルスの誘導

同様にその誘導体である SC34 の耐性ウイルスを分離した。SC34 耐性ウイルスは gp41 領域に 12 個の変異が導入されており、約 350 倍耐性化していた。導入された変異のうち、I37K、Q56R、N126K、N163D だけが単独で耐性を示したが、その程度は 5 倍以下と非常に弱く SC34 に対して HIV は容易に耐性化できないと考えられた。SC34 のアミノ酸配列を一部入れ替えた SC34EK は SC34 耐性 HIV に対して感受性が 5 倍程度しか低下せず非常に類似したペプチドが交差耐性を示さないことが明らかとなった。これらのことから、EK 置換の部位を変えることによって交叉耐性を抑えることが可能であることが示唆された。

4) SC34 誘導体の T-20 耐性 HIV に対する効果

SC34 誘導体を臨床治療に応用するために T-20 耐性 HIV に対して効果を示すのかどう

かを検討した。T-20 耐性に寄与する変異、V38A、N43D、N43K を有する pNL4-3 由来の HIV 感染性クローンに対しても SC34 および SC34EK は低い交差耐性を示すものの、T-20 で見られるような高度耐性化は引き起こさなかった (Table 1)。このことから SC34 シリーズは C34 耐性 HIV だけでなく T-20 耐性 HIV にも効果を示すことを確認した。

5) 小分子化 SC34EK の抗 HIV 効果

T-20 と比べ約 70 倍活性を有する SC34EK の C 末側 5 残基を欠失させた SC29EK の抗 HIV 効果は SC34EK と同等であり、さらに T-20 耐性ウイルスに対してもその強い効果を失わなかった。一方、EK 置換を行っていない C29 は弱い活性しか示さず、また、T-20 耐性株に対して効果を示さなかった (Table 2)。これらのことから EK 置換は活性を増強させるだけでなく交差耐性に関しても効果的であることが判明した。さらに 7 アミノ酸欠失させた SC22EK も効果は低下するものの、T-20 と同程度の効果を維持していた。しかし、34 残基を有していても非ペプチド化されたものはその効果が著しく低下した。

Table 2. SC29EK の T-20 耐性株への効果

mutation	EC ₅₀ (nM)			
	C29	SC29EK	C34	SC34EK
WT	52 ± 18	1.9 ± 0.02	6.5 ± 1.8	2.7 ± 0.7
N43D	>1000	3.0 ± 0.6	9.3 ± 3.5	2.2 ± 0.4
N43D/S138A	>1000	4.1 ± 0.6	16 ± 5.5	1.6 ± 0.4
V38A	504 ± 193	3.4 ± 0.9	9.2 ± 2.0	1.5 ± 0.3

WT としてほとんどの HIV-1 で見られる D36G 置換が導入されているウイルス (NL4-3 由来) を使用した。薬剤感受性は MAGI 法で検討した。

6) FCS による活性の変化

SC34 誘導体の血清蛋白との相互作用を検討した。通常の実験に用いる牛胎児血清 (FCS) の濃度 10% を基準として、5、25、50% 存在下で抗 HIV 活性を測定した。臨床で用いられ、血清蛋白の影響を受けにくい逆転写酵素阻害剤 ddC と融合阻害剤 T-20 と比べ、SC34EK は FCS の濃度による活性の変化は少なかった (Figure 1)。

7) 多剤耐性臨床分離株への効果

日本で分離された多剤臨床分離株 3 株と感受性株 1 株に対する抗 HIV 効果を p24 法で検討した。現在日本では融合阻害剤が使用

されていないこともあり、ウイルス株間での感受性にばらつきはあるもののすべてのウイルス株において T-20 と SC34 誘導体は感受性であった。また、臨床分離株の gp41 領域のアミノ酸配列を決定したところ、SC34 誘導体が結合する N-helix 領域のアミノ酸配列は高度に保存されていたが、C-helix 領域はアミノ酸配列に置換が見られた (Figure 2)。

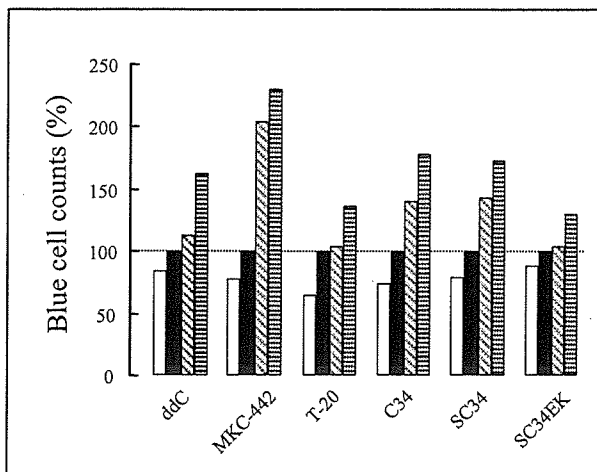


Figure 1. FCS 濃度の抗 HIV 活性に対する影響
MAGIアッセイにおいて10% FCSで EC₅₀を示す薬剤濃度での HIV の感染性を100%とした。FCS濃度を5(白)、10(黒)、25(斜)、50(横)としてその感染性の変化を棒グラフで表した。

8) T-20EK の抗 HIV 効果

T-20 に SC34EK で用いた EK 置換を導入し、水溶性に乏しい T-20 が水溶性となり、高濃度での調整が可能となっただけでなく、その抗 HIV 活性も約 5 倍上昇することを見出した。また T-20 耐性 HIV に対する効果を検討したところ、N43D 変異を有する HIV-1 に対して 1.5 倍、V38A を有する HIV-1 に対して 4 倍程度の感受性低下が認められたが、もとの T-20 が 15 倍、14 倍に耐性化したことと比べ明らかに耐性 HIV の複製を阻害していた。

9) D36G 変異の影響

HIV sequence database (Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA)によると gp41 アミノ酸配列で 36 番目の G が D である HIV は HIV-2 を含めても NL4-3 でしか見られず、NL4-3 特有の変異であることが以前より知られており、我々が昨年報告した C34 や SC34 耐性ウイルスにおいても D36G 変異が導入され、また比較的長期間 (約半年) MT-2 細胞で継代を続けると自然に 36G に変化してしまうことが判明している。こ

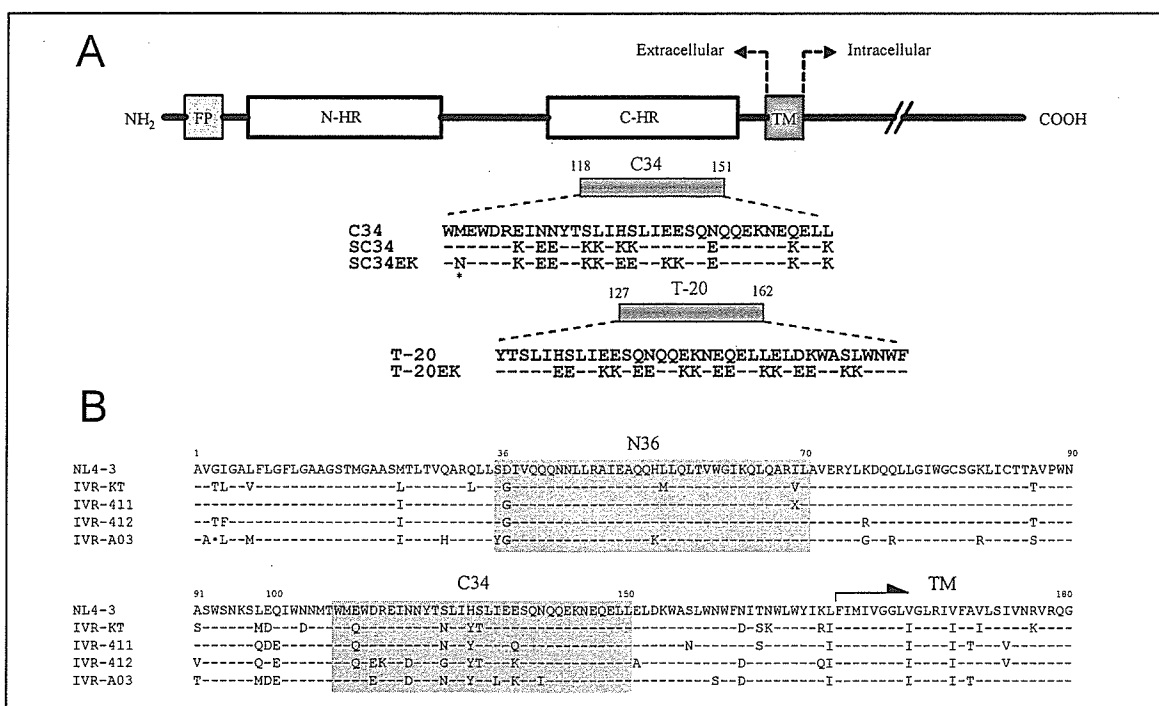


Figure 2. SC34 誘導体と臨床分離株の gp41 アミノ酸配列。
(A) HIV gp41 の構造を示す。Fusion peptide (FP), N-terminal heptad repeat region (N-HR), C-terminal heptad repeat region (C-HR), transmembrane domain (TM) と C34 および SC34 のアミノ酸配列を示す。SC34EK における * は norleucine を示す。アミノ酸番号は NL4-3 株を基にしている。(B) 臨床分離株 (KT, IVR411, IVR412, IVR-A03) のアミノ酸配列を示す。N36 と C34 に相当する部位を灰色で示す。NL4-3 株と同じ配列はハイフンで、アミノ酸欠出はドットで示した。IVR411 で見られる X はイソロイシンとバリンの配列を持つウイルスが共存していることを示す。

のことから、NL4-3 特有の変異である G36D は複製において負の影響を及ぼすと考え、NL4-3 と 36 番目を野生型に変更した NL4-3_{D36G} の複製能を比較した。NL4-3_{D36G} は NL4-3 と比べ複製能が約 2 倍優れていた。また、T-20 耐性変異である N43D 変異が導入されると複製能が NL4-3 と比べ 1/50 程度まで低下したが、D36G をもつ N43D は NL4-3 の 80% 程度の複製能を示した。NL4-3_{D36G} と比較すると 40% 程度と複製能は低いものの D36G がもたらす複製能の改善は大きい。興味深いことに T-20 耐性臨床分離株ではほとんどみられない N43K では D36G による効果はほとんど見られなかった。

1 0) HIV 細胞融合 ELISA によるスクリーニング

簡便かつ迅速に HIV 細胞融合活性を検出するために ELISA によって gp41 の N-および C-HR 結合を検出する方法を確立した。この方法でコントロールして使用した SC34EK は細胞とウイルスを用いて測定する MAGI 法とほぼ同レベルで測定が可能であった。他の融合阻害ペプチドも同様に測定可能であったが、臨床応用されている T-20 はこの方法では 100 μ M まで検討したが測定することができなかった。そのため MBP-N36 を C 末側に延ばした MBP-N36-89 を作成して検討したところ弱いながら T-20 の活性測定が可能となった。この方法を用いて小分子化合物をスクリーニングしたが今年度は有効な分子を同定するにはいたらなかったが、スクリーニングに使用する融合ペプチドの長さを変更することによってペプチドおよび今までに同定した小分子化合物の主な結合部位を大まかに予想することが可能となった。このことによって今までは耐性 HIV を誘導することによって推定していた作用機序の解明や、結合部位の同定を比較的容易にすすめることが可能になった。

1 1) 低分子融合阻害剤

分担研究者らによって合成された化合物を MAGI 法と ELISA 法にて検討したところ、

MAGI 法では抗 HIV 活性を検出できたが ELISA では検出されなかった 11 薬剤を見出した。これらのうち 3 剤は 1 μ g/ml 以下で効果を示し、この薬剤の標的を現在検討中である。

D. 考察

HIV-細胞融合阻害活性を有する C34 耐性ウイルスの誘導・解析から耐性に直接関与する 1 次変異 (C34 の結合力低下と競合力増加) と低下したウイルス複製能を補正する 2 次変異 (gp41 変異によって変化した RRE 構造の安定化) の役割を明らかにし、さらに C34 の誘導体である SC34 の耐性 HIV を誘導した。SC34 耐性 HIV は C34 耐性 HIV よりも耐性変異の導入を必要とし、そのアミノ酸変異数は 10 を超える。このことは生体内でも SC34 に対する耐性を獲得しにくいことを示す。さらに明らかな primary mutation が存在しないことは同時に複数のアミノ酸変異を導入しなければいけないことを示し、このことから耐性化が困難であると考えられた。

3 個の融合阻害ペプチドに対する耐性ウイルスを解析することにより以下のような薬剤開発に有益な情報を得た。まず N36 耐性に関与する変異は N126K と E138Q であったが、N126K は C34 耐性 HIV でも見出された変異であり、gp41 内における HR-1 と HR-2 の結合性を上昇させることがわかっている。E138Q も外部からの阻害剤としての N36 よりも gp41 内でおこる結合競合性を増加させていた。つまり、外部から加えられた N36 は培養液中で生理学的な HR-1 と違う形態で存在すると考えられる。今後、これらを検証し、この研究から得られた結果を新しい N36 誘導体の作製に応用したい。

C34 耐性ウイルスの誘導・解析から耐性に直接関与する 1 次変異 (C34 の結合力低下と競合力増加) と低下したウイルス複製能を補正する 2 次変異 (gp41 変異によって変化した RRE 構造の安定化) の役割を明らかにした。この耐性機構は本研究により初

めて明らかにされたものである。また、このようなアミノ酸をコードするだけでなく RNA 機能分子としても働くという gp41 コード領域の特性は、この部位の変異で耐性を獲得することがウイルスにとっても容易ではないことを示しており抗 HIV 剤としての有利な点である。HIV は RT 阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に対しては多数の変異を導入し多剤耐性となるが複数の融合阻害剤に対する耐性を獲得することは容易ではないと考えられる。

SC34 耐性ウイルスにおいても C34 耐性 HIV で見られたようにアミノ酸をコードするだけでなく RNA 機能分子としても働く RRE の機能を回復する変異が導入されていた。このこともこの部位の変異で耐性を獲得することがウイルスにとっても容易ではないことを示しており抗 HIV 剤としての有利な点である。HIV は RT 阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に対しては多数の変異を導入し多剤耐性となるが複数の融合阻害剤に対する耐性を獲得することは容易ではないと考えられる。我々は現在米国、ヨーロッパで使用されている T-20 を上回る薬剤の同定を目指しており、現時点で SC34 および SC34EK などのペプチドが候補として目標を満たしている。また SC34 耐性ウイルスの誘導実験からアミノ酸配列が非常に類似したペプチド SC34EK が交差耐性を示さないことは興味深い結果である。すなわちアミノ酸の配列を入れ替えることで交差耐性化を防ぐペプチドデザインが可能であることを示している。さらにこの EK 置換は T-20 でも有効で今後の研究において医薬品としての適合化研究を計ることの意義は大きいと判断する。

D36G 変異は C34 耐性ウイルスでも報告され、さらに今回の N36 耐性ウイルスでも誘導されてきた。また、薬剤非存在下であっても誘導されることから、融合阻害剤と関連性はないと考えられたが、この D36G が導入されるためには何らかの HIV にとってメリットがなければならない。今回我々はその HIV におけるメリットが複製

速度であることを示した。そのため、臨床分離株ではほとんどが D36G 変異を有している。またこの変異を有しているウイルスは複製上 N43D 変異を誘導しやすいことを見出した。このことは何故、T-20 耐性ウイルスにおいて N43D が多く分離されるかという理由にもなると考えられた。

小分子化合物に関してもベンゾイミダゾール環を有する有効な候補を既に見出しており、現在、抗 HIV 活性の高い化合物の合成を目指して研究を進めている。HIV 細胞融合の非感染系モデルの確立から T-20 作用機序が従来考えられていたものとは異なる可能性を見出し、この解析をさらに推し進めることで T-20 の融合阻害機構を明らかにできるものとする。当研究事業は標的細胞との膜融合というウイルスにとって非常に重要な現象に着目しているが、この現象はウイルスゲノム解読の進行、構造生物学的な視点からもウイルスの種類を問わず比較的類似したタンパク質相互作用によって成立していることが明らかとなりつつある。このことは、膜融合といった共通性の高い段階を標的とする創薬研究は、ある特定のウイルスに対する薬剤開発に寄与するのみならず、多種多様なウイルスに対する抗ウイルス剤開発において普遍性の高い革新的方法論を提供すると考えられる。

本研究の遂行によって新たな融合阻害剤を開発し、耐性ウイルスにも有効かつ耐性が出現しない治療法の確立を目指す。今後、この仮説を確認するペプチドを作成し耐性が出現しない HIV-細胞融合阻害剤を開発したい。

E. 結論

本研究期間において 3 個の HIV-1 膜融合ペプチドに対する耐性機構を明らかにし、薬剤開発に有用な情報を得た。小分子化合物スクリーニングのための ELISA 系を確立し、実際に抗 HIV 活性を示す新規化合物を同定した。また N36 との相互作用に必須でないと推測されたペプチド性 HIV-1 膜融合阻害剤 SC34EK の C 端側残基を除去するこ

とにより HIV 膜融合阻害性ペプチドの低分子化に成功し、この EK 置換は他のペプチドにも応用可能であるだけでなく耐性 HIV に対する効果ももたらした。これらの結果は当初の目的をほぼ達成したと考えられた。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kajiwara K, Kodama E, Matsuoka M. A novel colorimetric assay for CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency viruses. *Antivir Chem Chemother* 17: 215-223, 2006.
- Saita Y, Kodama E, Orita M, Kondo M, Miyazaki T, Sudo K, Kajiwara K, Matsuoka M, Shimizu Y. Structural Basis for the Interaction of CCR5 with a Small Molecule, Functionally Selective CCR5 Agonist. *J Immunol*, 177: 3116-3122, 2006.
- Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, Ito Y, Kawakami H, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Ikeda S, Kodama E, Matsuoka M, Shinkai H. Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. *J Med Chem* 49:1506-1508, 2006.
- Ohrui H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, Mitsuya H. 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma. *Nucleic Acids Symp Series* 50:1-2, 2006.
- Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M. Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions. *J Virol*. 79:764-770, 2005
- Fan J, Kodama E, Koh Y, Nakao M, Matsuoka M. Halogenated thymidine analogues restore the expression of silenced genes without demethylation. *Cancer Res*. 65:6927-6933, 2005.
- Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Shintani M, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M. Studies of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 2: synthesis and structure-activity relationships of 2-cyano and 2-hydroxy thiazolidenebenzenesulfonamide derivatives. *Bioorg Med Chem*.13:949-961, 2005.
- Futaki S, Nakase I, Suzuki T, Nameki D, Kodama E, Matsuoka M, Sugiura Y. RNase S complex bearing arginine-rich peptide and anti-HIV activity. *J Mol Recognit*, 18:169-174, 2005.
- Kitano K, Kohgo S, Yamada K, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, Kodama E, Matsuoka M, Mitsuya H, Ohrui H. Attempt to reduce cytotoxicity by synthesizing the L-enantiomer of 4'-C-ethynyl-2'-deoxypurine nucleosides as antiviral agents against HIV and HBV. *Antivir Chem Chemother*, 14: 161-167, 2004.
- Kohgo S, Yamada K, Kitano K, Iwai Y, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, Kodama E, Matsuoka M, Mitsuya H, Ohrui H. Design, efficient synthesis, and anti-HIV activity of 4'-C-cyano- and 4'-C-ethynyl-2'-deoxy purine nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23: 671-690, 2004.
- Hachiya A, Gatanaga H, Kodama E, Ikeuchi M, Matsuoka M, Harada S, Mitsuya H, Kimura S, Oka S. Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human

immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology*, 327: 215-224, 2004.

Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Nakahara H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M. Studies of nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 1: Design and synthesis of thiazolidenebenzenesulfonamides. *Bioorg Med Chem*, 12:6171-6182, 2004.

Hayakawa H, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, Kodama E, Mitsuya H, Ohru H. Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1. *Antiviral Chem Chemother*, 15:169-187, 2004.

2. 学会発表

Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M. In Vitro Antiviral Activity and Resistance Profile of a Novel HIV Integrase Inhibitor JTK-303/GS-9137. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, Sep 27-30, 2006.

Kodama E, Masuda N, Orita M, Yamamoto O, Fujii M, Kageyama S, Ohta M, Hatta T, Inoue H, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, and Matsuoka M. HIV-1 Acquires Resistance to New NNRTI, Thiazol Derivatives, through Steric Hindrance with Multiple Mutations. 12th Conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, MA, Feb. 22-25, 2005.

Kodama E, Mabuchi N, Otaka A, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M. Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific.

Kobe, Japan, Jul 1-5, 2005.

Kodama E. HIV-1 fusion inhibitor-resistance and development of the new inhibitors. The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy. Nov 17-19, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願：2006-204827 N36 結合ペプチドの製造方法

特願：2006-290241 抗 HIV 剤

特願：2004-007 4'-C-置換-2-ハロアデノシン誘導体

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

主任研究者：京都大学大学院薬学研究科 松岡 雅雄
分担研究者：京都大学大学院薬学研究科 藤井 信孝
大石 真也

研究要旨 X-EE-XX-KK 分子設計概念を基盤にして創出した強力な HIV-1 膜融合阻害剤 SC35EK のエックス線結晶解析結果をもとに、分子サイズの低減化および部分的非ペプチド化を行うとともに、T-20 耐性株にも強力な活性を示す新規膜融合阻害剤 T-20EK を創出した。また、耐性株の gp41 CHR のアミノ酸配列をもとに合理的にデザインした誘導体が、当該耐性株に対する高い活性を示すことを明らかにした。さらに、これらの化学合成ペプチドを活用することにより、新規低分子 HIV-1 膜融合阻害剤の探索のための AlphaScreen™ システムを用いた新規ハイスループットスクリーニングシステムを構築した。

一方、膜融合阻害剤の非ペプチド化を目的として、アミド結合の極性、静電的特性、水素結合能を具備したフルオロアルケン型イソスターの立体選択的合成法を確立するとともに、インドール骨格を有する低分子膜融合阻害剤の構造最適化研究を効率的に実施するための新規インドール骨格構築法を確立した。

分担研究項目 1：融合過程を標的とする新規治療薬の創製

X 線構造解析に基づく SC35EK の低分子化と非ペプチド化（平成 16 年度）

A. 研究目的

HIV-1 が感染を成立させる際、ウイルスと標的細胞間の膜融合は必須の過程である。この膜融合過程において、HIV-1 エンベロープ蛋白質 gp41 の N 末端および C 末端側 α ヘリックス領域（それぞれ NHR, CHR）が逆平行型に相互作用し、6-helical bundle を形成することが必要であり (Figure 1)、これらの領域は高度に変異を起こした HIV においても高く保存されている。これに基づき、6-helical bundle 構造形成阻害剤は多剤耐性克服型抗 HIV 剤の創薬標的として大きな注目を集めている。

研究グループでは、CHR 由来ペプチドの一つである C34 を基盤とした抗 HIV ペプチドのデザイン・合成研究を展開してきた。その結果、極めて強力な抗 HIV 活性を示し、かつ水

溶性の高いペプチドとして SC35EK を開発するに至った (Table 1)。ここでは、 α ヘリックス構造をとる C34 ペプチドを NHR 相互作用面と溶媒接触面に差別化する戦略を採用した。この戦略は、CHR 上の NHR との相互作用面を形成するアミノ酸残基を X とした場合、この X 残基を α ヘリックス構造の一方の面へ提示することを目的とし、X-EE-XX-KK (E = Glu, K = Lys) の繰り返し配列を利用するものである (Figure 2)。ここで、 $i, i + 4$ の関係に Glu, Lys 残基を配置することにより側鎖間の塩橋形成による α ヘリックス性の向上および水溶性の向上も期待できる。平成 16 年度は、SC35EK の低分子化について検討するとともに、生体内安定性の向上を目的として α ヘリックス性に寄与している EE, KK ユニットの非ペプチド化を試みることにした。

B-D. 研究方法・結果および考察

まず、SC35EK の低分子化について検討を行った。我々も含めいくつかの研究グループ

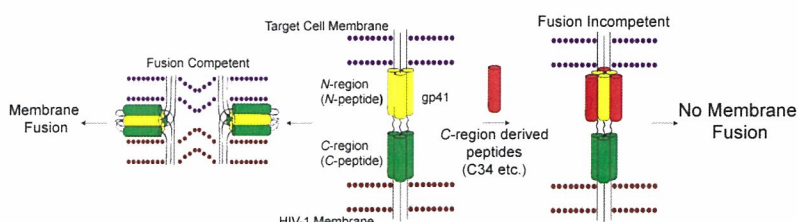


Figure 1. Mechanism of HIV-1/cell fusion and inhibition by C-peptide.

Table 1. Anti-HIV activity of C34 and SC35EK.

Peptides	Sequences	IC ₅₀ (nM)
C34	WMEWDREINNYTSLIHSLEESQEQKNEQELL	0.68
SC35EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQKKNEEELKK	0.39

IC₅₀ values are the concentrations for 50% inhibition of HIV-1 infection to HeLa cells based on MAGI assay.

	C-terminus	interactive region	N-terminus	IC ₅₀ (nM)	relative potency
N36	LIRAQLQKLI	IGWVTLQLLHQQAEIARLLNNQQVIDS			
C34		WMEWDREINNYTSLIHSLEESQEQKNEQELL		0.68	1
C28		WMEWDREINNYTSLIHSLEESQEQK			0.0078
SC35EK		WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQKKNEEELKK		0.39	1
SC29EK		WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQKKN		0.46	0.85
SC22EK		WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS		60	0.0065

Figure 3. Downsizing of SC35EK by deletion of C-terminal region.

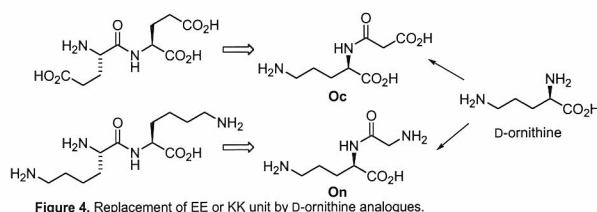


Figure 4. Replacement of EE or KK unit by D-ornithine analogues.

Table 2. Anti-HIV activity of SC29EK analogues.

Peptides	Sequences	IC ₅₀ (nM)
SC29EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQKKN	0.46
SC29Orn1-1	WocwDonIEEYTKKIEELIKKSEEQKKN	>1000
SC29Orn1-2	WEEWDKKIOcYTOnIEELIKKSEEQKKN	>1000
SC29Orn1-3	WEEWDKKIEEYTKKIocLIOnSEEQKKN	>1000
SC29Orn1-4	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSocQQOnN	54.2
SC29Orn2-1	WEEWDKKIEEYTKKIocLIOnSocQQOnN	>1000
SC29Orn2-2	WEEWDKKIOcYTOnIOcLIOnSEEQKKN	>1000
SC29Orn2-3	WocwDonIOcYTOnIEELIKKSEEQKKN	>1000
SC29Orn2-4	WocwDonIEEYTKKIEELIKKSocQQOnN	>1000
SC29Orn2-5	WEEWDKKIOcYTOnIEELIKKSocQQOnN	>1000
SC29Orn2-6	WocwDonIEEYTKKIocLIOnSEEQKKN	>1000

による X 線構造解析の研究から、C34 と N36 は Figure 3 で示す領域で相互作用しており、C34 の C 末端側は NHR との相互作用にそれほど関与していないという知見が得られている。このため、そこで、SC35EK から C 末端の6残基を除去した SC29EK、13 残基を除去した SC22EK をそれぞれ合成し、抗 HIV 活性を評価した。その結果、SC29EK は SC35EK に匹敵する抗 HIV 活性を、SC22EK も高い活性を保持していた。

つづいて、低分子化したペプチド SC29EK、SC22EK 中の EE および KK 配列は NHR との相互作用に直接関与していないため、非水解性イソスターへの置換が比較的容易に行えるのではないかと推測し、生体内での安定性の向上を目的としてこれらの配列の非ペプチド化を試みた。イソスターはペプチド結合を除去することによる α ヘリックス性の低下を最小限にとどめることを重視し、デザインした。以下二つのタイプのイソスターについて検討を行った。

最初に、側鎖の電荷を維持したまま、EE あ

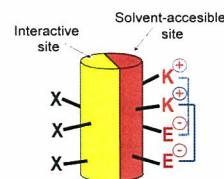


Figure 2. Design concept of SC35EK.

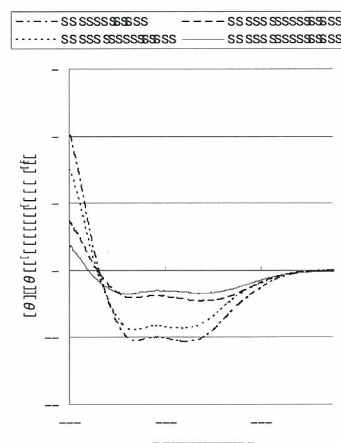


Figure 5. CD spectra of the mixtures of N36-SC22EK analogues.

Table 3. Anti-HIV activity and melting temperatures of SC29EK analogues.

Peptides	Sequences	T _m (°C)	IC ₅₀ (nM)
SC29EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQKKN	64.4	0.46
SC29Orn1-1	WocwDonIEEYTKKIEELIKKSEEQKKN	50.2	>1000
SC29Orn1-4	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSocQQOnN	60.2	54.2
SC29Orn2-4	WocwDonIEEYTKKIEELIKKSocQQOnN	47.6	>1000

るいは KK 間のペプチド結合を飽和炭化水素鎖へと置換することを考え、EE あるいは KK に相当するユニットとして Oc (N^α-malonyl-D-ornithine) および On (N^α-glycyl-D-ornithine) をデザインした (Figure 4)。Oc は D-ornithine の α アミノ基に malonic acid を、On は glycine をそれぞれ縮合することにより、数工程で得られた。続いて、これらのユニットを組み込んだ SC29EK 誘導体を合成し、抗 HIV 活性を評価した (Table 2)。その結果、ほとんどの化合物で活性の大幅な低下がみられたが、C 末端側の EE、KK 配列を Oc、On に置換した SC29Orn1-4 は顕著な活性を保持した。

次に、これらの誘導体の活性の有無が NHR との相互作用による複合体形成能力と関与していることを確認するため、CD による物理学的検討を行った。SC29EK 誘導体 SC29Orn1-1 - 2-6 を等モルの N36 と混合し、CD を測定した結果、SC29Orn1-1、1-4 および 2-4 と N36 の等モル混合物のみが α ヘリックス構造に特徴的なスペクトルを示した

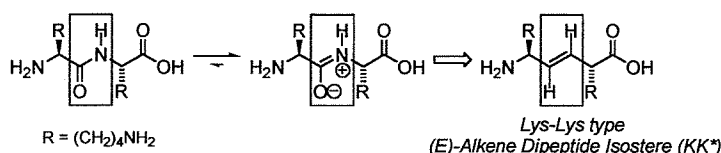


Figure 6. Replacement of an amide bond in Lys-Lys by (E)-alkene unit.

Table 4. Anti-HIV activity and melting temperatures of SC22EK analogues.

Peptides	Sequences	IC ₅₀ (nM)	T _m (°C)
SC22EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKS	60	65.2
SC22KK1	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKK*S	168	64.2
SC22KK2	WEEWDKKIEEYTKK*IEELIKKS	>1000	52.8
SC22KK3	WEEWDKK*IEEYTKKIEELIKKS	>1000	53.0
ddC**		441	

** dideoxycytidine: nucleoside reverse transcriptase inhibitor

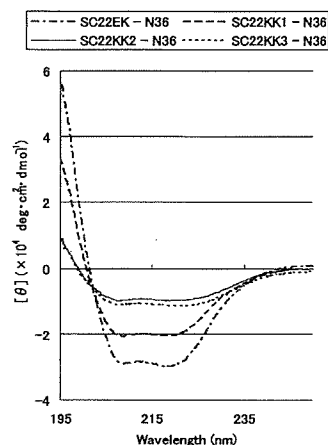
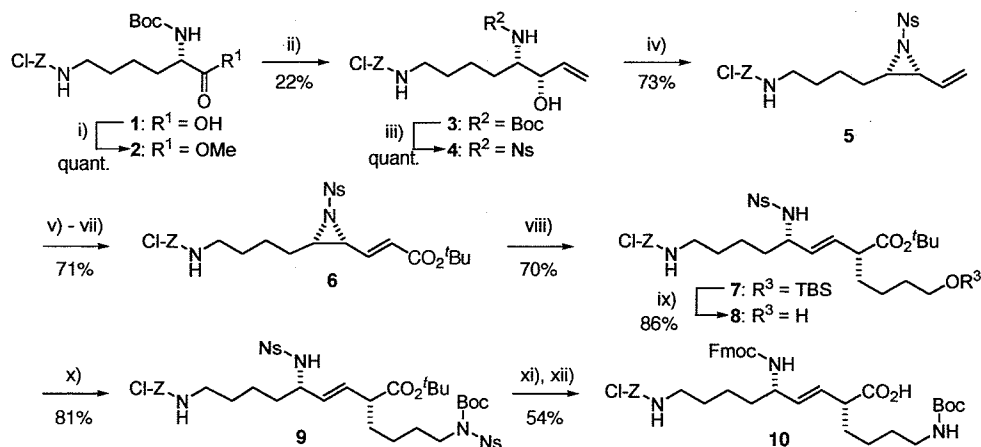


Figure 7. CD spectra of the mixtures of N36-SC22EK analogues.

Scheme 1. Synthesis of Lys-Lys type alkene dipeptide isostere.



Reagents: i) MeI, KHCO₃, DMF; ii) DIBAL-H, toluene, CH₂Cl₂, then LiCl, ZnCl₂, CH₂=CHMgCl, THF; iii) 4 M HCl-dioxane, then NsCl, 2,4,6-collidine, CHCl₃; iv) DIAD, Ph₃P, THF; v) O₃ gas, AcOEt; vi) Me₂S; vii) (EtO)₂P(O)CH₂CO₂^tBu, LiCl, DIPEA; viii) TBSO(CH₂)₂Cu(CN)Li•Li•2LiCl, Et₂O, THF; ix) TBAF, THF; x) BocNHNS, DIAD, Ph₃P, THF; xi) PhSH, K₂CO₃, DMF, then Fmoc-OSu, DMF; xii) 4 M HCl-dioxane, then (Boc)₂O, Et₃N, THF.

(Figure 5)。さらに、これらの誘導体と N36 のそれぞれ単独の CD 測定値の算術和と等モル混合物の CD 測定値を比較したところ、単独時と比べて混合時における α ヘリックス性の増大が確認された。このことから、これらの誘導体は N36 と相互作用し、複合体を形成していることが示唆された。また、これまでの他の C34 誘導体-N36 複合体は超遠心を用いた分子量測定および X 線構造解析の結果から、6 量体で存在することが明らかとなっており、先の 3 種の誘導体と N36 の等モル混合物も 6-helical bundle 構造を形成しているものと推測した。

そこで、SC29EK1-1, 1-4, 2-4 と N36 複合体の安定性を調べるために、複合体構造の熱力学的安定性の指標となる転移温度 T_m 値を測定した。4 - 90 °C における $[\theta]_{222}$ を測定し、4 °C の時を 6-helical bundle 構造が 100% folding、90 °C の時を 100% unfolding とみなし、

50% unfolding にあたる温度を T_m 値と定義した。測定の結果、これらの誘導体と N36 の等モル混合物の T_m 値と誘導体の IC₅₀ 値との間には相関関係が認められた (Table 3)。このことから、SC29EK 誘導体の抗 HIV 活性はこれまでの C34 誘導体と同様に、NHR との相互作用により形成される複合体の安定性に依存していることが示唆された。

また、N36 との複合体の形成が確認された 3 つの誘導体の配列から、両末端の EE、KK 配列のイソスターへの置換は α ヘリックス性に与える影響が比較的小さいと推測された。この理由の一つとして、末端部分の置換は内部の置換に比べてペプチド主鎖間の水素結合の消失が少ないことが考えられる。加えて、SC29EK は α ヘリックス性が高いため、イソスター導入部で α ヘリックス構造が部分的に壊れていても、末端部分であれば全体としては α ヘリックス構造を維持できるためではないか

と考察した。この仮説が正しいならば、N 末端の配列を置換しても複合体形成能力は保持されると考えられる。しかしながら、実際には複合体の安定性は大きく低下した。これは、C34 の N36 との複合体形成において特に重要であることが示唆されている C34 の N 末端部の 2 個の Trp および Ile の N36 trimer の C 末端側にある疎水性ポケットへの結合がその周辺の残基を置換したことで妨げられたことに起因するのではないかと推測される。

つづいて、別のタイプのイソスターでの置換を検討した。ペプチド結合と構造相同性が高い等価体として(E)-アルケンジペプチドイソスター(EADI)が知られている。そこでまず、生体内のペプチダーゼに認識されやすいことが報告されている KK 部分について対応する EADI の合成を行い、ペプチドへ導入することとした (Figure 6)。

KK 型 EADI の合成を Scheme 1 に示した。Boc-Lys(Cl-Z)-OH **1** を出発原料として、メチルエステル化、Grignard 反応を経て、既知のアリルアルコール **3** へと誘導した。続いて、**3** の Boc 基を Ns 基へと変換し、分子内光延反応によりアジリジンを形成させた後、オゾン酸化、Horner-Emmons 反応を行い、鍵合成基質である β -アジリジノ- α,β -不飽和エステル **6** に導いた。これを有機銅試薬による *anti*- S_N2' 型反応に付すことにより、立体選択的に **7** を得た。次いで、脱 TBS 化したアルコール誘導体 **8** を光延反応によりアミン誘導体 **9** へと誘導し、Ns 基の切断後、Fmoc 化、酸による Boc 基および *tert*-ブチル基の除去後、再 Boc 化を行うことにより、Lys-Lys 型 EADI **10** を合成した。

次に、得られた KK 型 EADI (KK*) をペプチドへと導入した。SC29EK 誘導体の構造活性相関研究の結果から SC29EK の C 末端部分は NHR との相互作用にそれほど関与していないという知見が得られたことから、さらなる低分子化を目指して、リード化合物として SC22EK を選択した。SC22EK の KK 部分へイソスターを導入した 3 種類の誘導体の合成を行い、抗 HIV 活性を評価した (Table 4)。その結果、C 末端の KK 残基を置換した誘導体 SC22KK1 は SC22EK より活性が低下したものの、抗 HIV 薬として市販されている逆転写酵素阻害剤 dideoxycytidine より高い活性を示した。

SC22EK 誘導体と N36 の等モル混合物について CD 測定を行ったところ、3 種類すべて

の誘導体と N36 の等モル混合物で複合体の形成が示唆された (Figure 7)。さらに、これらの誘導体と N36 複合体の熱力学的安定性の指標となる T_m 値の算出を行ったところ、SC22KK1-N36 複合体は比較的高い T_m 値を示したのに対し、SC22KK2-N36、SC22KK3-N36 複合体の T_m 値は低いものであった (Table 4)。このことから、SC29EK 誘導体の場合と同様に、SC22EK 誘導体においても抗 HIV 活性の発現は NHR との複合体形成能に依存すると推測された。

また、KK 型 EADI の SC22EK への導入において、C 末端の残基を置換した誘導体で活性が保持されたことは、SC29EK へのイソスターの導入の結果と同様であった。これらの結果から、配列によらず、C 末端側の残基の置換はある程度許容されうると推測された。これは前述の通り、末端の配列のイソスターへの置換は α ヘリックス性に及ぼす影響が比較的小さいことおよび、C 末端部分は NHR との相互作用において重要な gp41 trimer の疎水性ポケットとの結合に対する寄与が比較的小さいことに起因するのではないかと考えられる。

E. 結論

NHR との相互作用に必須でないと推測された SC35EK の C 末端側の残基を除去することにより SC35EK の低分子化に成功した。さらに、低分子化したペプチド SC29EK および SC22EK をリード化合物として、 α ヘリックス誘起配列である EE, KK ユニットの生体内安定型イソスターへの置換を検討し、高い抗 HIV 活性を保持した部分的非ペプチド化誘導体を見い出した。また、構造活性相関研究の結果から、誘導体の抗 HIV 活性は 6-helical bundle 構造形成能に依存することを推定するとともに、SC29EK および SC22EK の C 末端の EE, KK ユニットの種々のイソスターへ置換され得るという知見を得ることができた。

1-2 : AlphaScreen システムを活用した新規阻害剤のハイスループットスクリーニングシステムの構築と新規誘導体の活性評価への応用 (平成 17 年度)

A. 研究目的

HIV-1 感染におけるウイルスと標的細胞間の膜融合過程において、HIV-1 エンベロープ蛋白質 gp41 の N 末端側 (HR1) および C 末端

側(HR2)の α ヘリックス領域は逆平行型に相互作用し、6-helical bundleを形成する。近年、HIV-1膜融合剤阻害剤として臨床応用されている enfuvirtide (DP-178, T20, 商品名: Fuzeon)は、この過程を阻害する36残基からなるペプチドであり、多剤耐性克服型抗 HIV 剤になりうる薬剤として注目を集めている。

研究グループでは、これまでに enfuvirtide の約20倍の活性を有する35アミノ酸残基からなるペプチド SC35EK を見だし、低分子化研究により29残基のSC29EKでも同等の活性が保持されることを明らかにしている。平成17年度は、低分子膜融合阻害剤の開発を目的として、HR1とHR2の結合を阻害する低分子化合物をスクリーニングするための評価系の確立に取り組んだ。

B. 研究方法

HR1とHR2の結合において、HR2はHR1三量体の外側に結合する。HR1三量体には、N末端領域とC末端領域に、2ヶ所のHR2のトリプトファンに富んだ配列を認識するポケットが存在し、enfuvirtideはN末端側の、C34やSC35EKはC末端側のポケットを含む配列を認識して3-helical bundleとそれぞれ結合すると考えられている。

研究グループでは、スループットの高い化合物の展開を可能にするために、洗浄操作を必要としない連続的な試薬の分注による均一系での反応でアッセイを行うことが可能なAlphaScreen™システムを活用することとした。AlphaScreen™システムは、2つのビーズに結合した分子が近傍に位置する際に、単波長光照射によって発生する一重項酸素の作用により得られる蛍光を検出するシステムで、さまざまなタグ化タンパク質等を利用して均一系でのアッセイ系が可能である。研究グループでは、HR1およびHR2の化学合成ペプチドを利用したアッセイ系を構築するべく、これに適用可能なヒスチジンタグ検出システムを用いることとした。アッセイ系に用いるHR1およびHR2に相当するペプチドは、N末端ビオチン標識体およびN末端His6標識体として、それぞれ化学合成した。この際、enfuvirtideの結合領域とSC35EKの結合領域それぞれについてスクリーニング可能になるよう、下表のペプチドを調製し、アッセイ系への利用について以下検討を行った。

表1: アッセイ系に用いた化学合成ペプチド

HR1 領域(N末端ビオチン標識ペプチド)	
Biotin=HR1(536=571)	
Biotin-HR1(536=581)	
Biotin-N36(HR1(546=581))	
HR2 領域(N末端His6標識ペプチド)	
His6-C34(HR2(628=661))	
His6-SC35EK	
His6-T20(HR2(638=673))	
His6-T20EK	

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

(1) アッセイ系の構築

まず、C34やSC35EKのように、HR1のC末端側のポケットに結合して阻害活性を示す低分子化合物を探索するための評価系として、biotin-N36とHis6-C34もしくはHis6-SC35EKの等モル濃度の組み合わせについて検討した(図1)。その結果、His6-C34を用いた際には80nM以上、His6-SC35EKを用いた際には40nM以上のペプチド濃度の時に、HR1ペプチドとHR2ペプチドの結合に基づくシグナルが検出された。続いて、T20のようにHR1のN末端側のポケットに結合して阻害活性を示す化合物探索のための評価系として、biotin-HR1(536-571)とHis6-T20もしくはHis6-T20EKの等モル濃度の組み合わせについて検討を行った。しかしながら、いずれの系においてもペプチド濃度が30 μ Mであってもシグナルが検出されなかった。研究グループでは、この原因が、ペプチドHR1(536-571)が安定な3-helical bundle構造をとらず、T20およびT20EKが結合できないためであると考え、biotin-HR1(536-571)に代えて、C末端側のポケットの領域も含むbiotin-HR1(536-581)を用いた系について検討を行った。その結果、His6-T20を用いた系では、シグナルの検出が見られなかったものの、His6-T20EKを用いた系では、800nM以上の濃度でシグナルの検出が見られた。

(2) ポジティブコントロールを用いた阻害実験

上記の実験をもとに、biotin-N36/His6-SC35EK、biotin-N36/His6-C34およびbiotin-HR(536-581)/His6-T20EK相互作用について、それぞれ150nM、300nM、1.5 μ Mのタグ化ペプチドを用いて、ポジティブコントロールとなる阻害剤による阻害実験を行った。阻害剤と

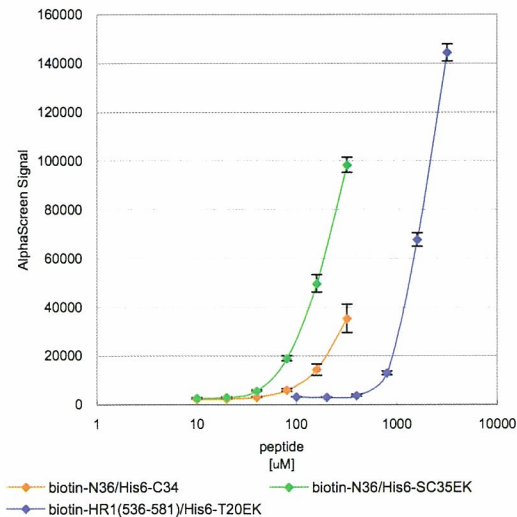


図1: HR1 ペプチドと HR2 ペプチドの結合

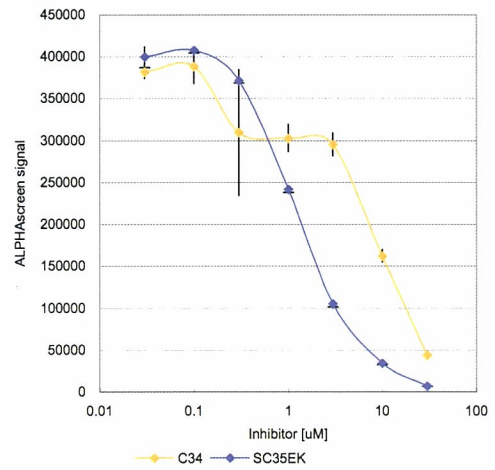


図3: biotin-N36/His6-C34 相互作用の阻害活性

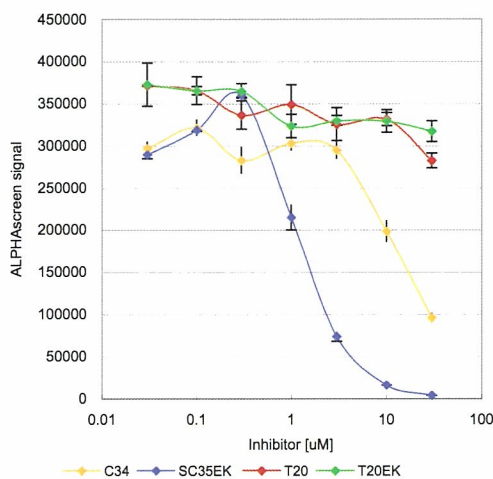


図2: biotin-N36/His6-SC35EK 相互作用の阻害活性

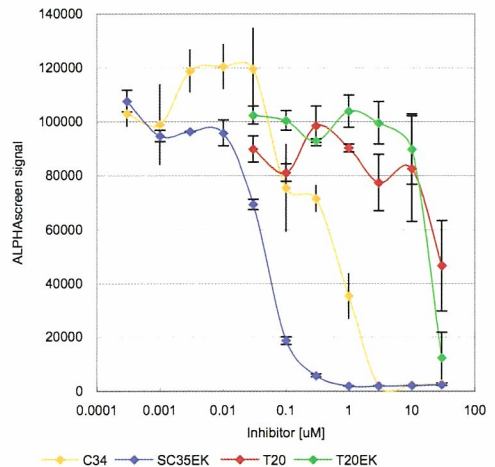


図4: biotin-HR1(536-581)/His6-T20EK 相互作用の阻害活性

して、C34、SC35EK、T20 および T20EK を用いた。

まず、biotin-N36/His6-SC35EK を用いた系では、C34 および SC35EK が、それぞれ $IC_{50} = 10-30$ 、 $1-3 \mu M$ 程度の阻害効果を示した(図2)。一方、T20 および T20EK は $30 \mu M$ でも阻害効果を示さなかった。

同様に、biotin-N36/His6-C34 を用いた系についても阻害実験を行ったところ、C34 および SC35EK が、それぞれ $IC_{50} = 10$ 、 $1-3 \mu M$ 程度で阻害効果を示した(図3)。

続いて、biotin-HR1(536-581)/His6-T20EK を用いた系で阻害実験を行ったところ、T20 および T20EK により、それぞれ $IC_{50} = 30$ 、 $10-30 \mu M$ 程度の阻害活性が得られた(図4)。しかしながら、 $10 \mu M$ 以上の濃度ではこれらの阻害剤が可溶化しているかは不明であり、非

特異的相互作用による阻害効果の可能性も否定できない。興味深いことに、この系では、C34 および SC35EK もまた、それぞれ $IC_{50} = 30-100 \text{ nM}$ 、 $0.3-1 \mu M$ 程度の強力な阻害活性を示した。HR1 領域のビオチンタグペプチドとして C34 および SC35EK を認識する領域を含む biotin-HR1(536-581)を用いたため、この結合に伴う阻害活性が見られたものと考えられる。

D. 考察

AlphaScreen システムを用いたスクリーニング系を構築するにあたり、3種類の合成ペプチドの組み合わせからなる系において、アッセイに用いることが可能なシグナルが検出された。シグナル検出に必要とされたペプチド濃度をもとに、HR1 領域と HR2 領域のペプチド間の

親和性は、N36/SC35EK > N36/C34 >> HR1(536-581)/T20EK と推測される。

ポジティブコントロールを用いた阻害実験からは、T20 や T20EK といった HR1 の N 末端領域を認識するペプチドの評価には、biotin-HR1(536-581)/His6-T20EK の系のみが有効であることが明らかとなった。

一方、C34 や SC35EK といった HR1 の C 末端領域を認識するペプチドの評価にはすべてのペプチドの組み合わせが利用可能である。しかしながら、biotin-HR1(536-581)/His6-T20EK の系において C34 や SC35EK が高感度で阻害活性を検出できたのは、C34 や SC35EK が HR1 に対して高親和性であり、かつ T20EK と重複した認識部位を有しているためであることから、HR1 の C 末端側のポケットのみに結合親和性を有する低分子化合物の活性評価には適していないと判断された。Biotin-N36/His6-SC35EK および biotin-N36/His6-C34 の系の間では、結合親和性を補うために異なるペプチド濃度を使用しているため、感度に大きな違いはなく、相互作用の阻害活性を評価するためにはいずれの系を使うことも可能であると考えられる。

E. 結論

平成 17 年度の研究により、AlphaScreen™ システムを用いた 2ヶ所の結合部位に対する HIV-1 膜融合阻害剤探索に用いることが可能な新規スクリーニング系を確立した。本スクリーニング系を用いることにより、研究グループが保有する化合物ライブラリーのスクリーニングの実施が可能になるとともに、関連誘導体の簡便な生物活性評価が可能になった。

1-3: 耐性株に有効な新規膜融合阻害剤のデザインと構造活性相関研究 (平成 18 年度)

A. 研究目的

HIV-1 は標的細胞への膜融合を介して細胞内へ侵入し感染を成立させる。この膜融合

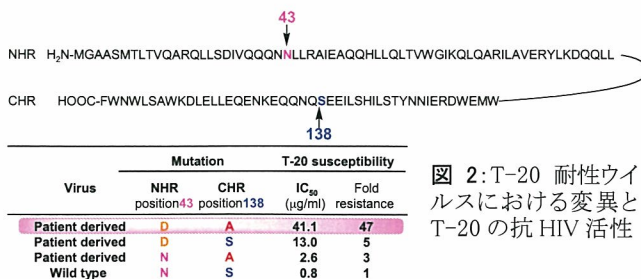


図 2: T-20 耐性ウイルスにおける変異と T-20 の抗 HIV 活性

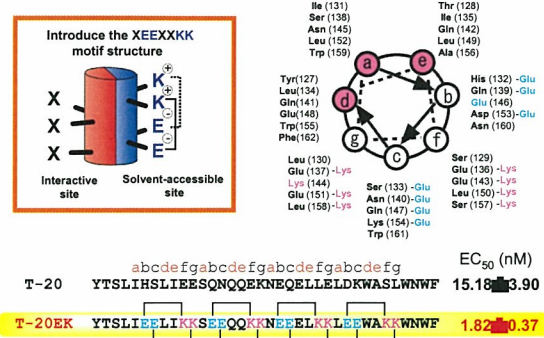


図 1: T-20EK のデザインと抗 HIV 活性

過程において、エンベロープタンパク質 gp41 の 2 つの α ヘリックス構造である N-および C-領域(それぞれ NHR, CHR)が逆並行型に相互作用し、6-helical bundle 構造を形成後、ウイルス膜と標的細胞膜が近づき感染が成立すると推定されている。CHR 由来ペプチドの一つである C34 は、gp41 の NHR と安定な 6-helical bundle を形成することで HIV 感染を阻害すると考えられている。一方、enfuvirtide (T-20, Fuzeon) は、C34 と同様のメカニズムによってこの過程を阻害すると考えられている CHR の部分ペプチドであり、現在臨床応用されている唯一の膜融合阻害剤であるものの、詳細な感染阻害メカニズムについては明確な知見が得られていない。研究グループでは、T-20 の α ヘリックス性の向上による抗 HIV 活性の上昇と溶媒接触面のアミノ酸置換による活性発現に重要なアミノ酸残基の同定を目的とし、新規 T-20 誘導体 T-20EK をデザインした。さらに、T-20 耐性 HIV 臨床分離株の変異アミノ酸部位に基づく新規膜融合阻害剤の開発を行うこととした。

B. 研究方法

研究グループでは、CHR 由来ペプチドの一つである C34 をリード化合物とした抗 HIV ペプチドの創製研究を展開し、これまでに極めて強力な抗 HIV 活性を示す SC35EK を見出ししている。これは、C34 に Glu と Lys 残基間の塩橋による α ヘリックス性の向上を指向した

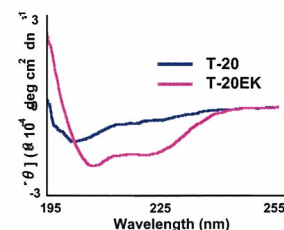


図 3: T-20 および T-20EK の CD スペクトル