

200808016A

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 H19-政策創薬-一般-007

HIV吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型HIV化学療法剤の開発

平成20年度 総括研究報告書

平成21年3月

研究代表者 松岡 雅雄

(京都大学ウイルス研究所・教授)

目 次

I. 総括研究報告	
HIV吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型	----- 1
HIV化学療法剤の開発に関する研究	
研究代表者・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. 研究代表者・松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	----- 4
研究分担者・児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・助教）	
2. 研究分担者・藤井信孝（京都大学大学院薬学研究科・教授）	----- 1 5
研究分担者・大石真也（京都大学大学院薬学研究科・助教）	
3. 研究分担者・村上努（国立感染症研究所・エイズ研究センター室長）	----- 2 6
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 3 0
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 3 4

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤の開発に関する研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄

研究要旨

耐性 HIV の出現は治療上大きな脅威であり、その克服には新たな標的に対する抗 HIV 剤の開発が必要である。本研究では、これまでに同定した侵入阻害活性を有する多数の小分子リード化合物、及び T-20 より強力に耐性ウイルスにも有効なペプチド製剤を基に、HIV 吸着・膜融合過程を標的とした強力かつ安全な新規抗 HIV 剤を開発し、多数の HIV 感染者が利用可能な多剤耐性克服型化学療法を確立する。

分担研究者氏名・所属機関名及び
所属分野における職名：

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・助教)
児玉栄一(京都大学ウイルス研究所・助教)
村上努(国立感染症研究所・エイズ研究センター第三室長)
谷口 雅彦(富士写真フイルム株式会社 R&D 統括本部有機合成化学研究所・主任研究員)

らに発展させ、現在、米国等で使用され、耐性 HIV も検出されるようになった T-20 に代わるペプチド製剤と小分子化合物の 2 つの薬剤開発を行う。これらの開発によって長期にわたり HIV 複製を抑制しうる多剤併用療法の確立を目指す。さらに本申請では融合の前段階であるコレセプターとの結合阻害剤の開発もあわせて行い、ウイルスの細胞への侵入全体を多段階で阻害する有効で副作用の少ない併用療法の確立も目指す。

A. 研究目的

多剤併用療法 (HAART) は HIV 感染症をコントロール可能としたが、依然 HIV の駆逐は不可能であり、耐性ウイルスの出現は治療上大きな脅威となっている。HIV 外皮 (Env) 蛋白質 gp41 に由来するペプチド製剤 T-20 (Fuzeon; Trimeris/Roche 社) は HIV の融合を阻害し、臨床応用され大きな効果を上げている。しかし、T-20 はペプチド製剤であり経皮投与に限られるという欠点を有しており、また治療費の高騰という問題がある。この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り、同時に安価で強い活性を持つペプチドの開発が必要である。

本研究の目的は、宿主細胞への HIV 感染における初期段階である細胞侵入を阻害する薬剤の開発である。侵入にはレセプターへの吸着、その後 gp120 が解離することによって gp41 が活性化される膜融合の過程がある。本研究グループでは、平成 19 年度までの本事業において後者の膜融合阻害剤の開発を行ってきており、有効なペプチド薬の開発で特許申請を行っている。また小分子化合物でもリードとなりうる化学構造を有する化合物の同定を行ってきた。これらの研究成果をさ

B. 研究方法

細胞、ウイルス

HeLa-CD4/CCR5LTR-β-galactosidase (MAGI) およびヒト glioma 由来 NP-2 細胞に HIV レセプターである CD4/CXCR4/CCR5 を導入した NCK45 細胞を使用した。T-20 耐性 HIV-1 クローンは site-directed mutagenesis 法を用いて作製した。

抗ウイルス剤

gp41 由来のペプチドである N36、T-20、C22、C29 と C34 および SC22EK、SC29EK、SC34EK、SC35EK、DS5000、AZT および ddC を使用した。CXCR4、CCR5 アンタゴニストである T-140 と TAK-779 はそれぞれ京都大学薬学部、米国 NIH より分与を受けた。

Circular dichroism スペクトルの測定

SC29EK と N-HR 由来のペプチド N36 との結合親和性は circular dichroism (CD) により解析した。

構造解析

gp41 HR2 の S138 変異をペプチドに導入することにより抗 HIV-1 活性の増強を認めており、このアミノ酸変異を導入した 6-helical bundle 構造の N-領域/C-領域相互作用様式を、X 線構造で解析した。

低分子膜融合阻害剤の開発研究

低分子膜融合阻害剤の基本骨格合成は、市販の化学試薬を利用して、有機合成化学における常法により行った。シリカゲルクロマトグラフィーによる精製後、¹H-NMR および質量分析によって、目的とする化合物の同定を行った。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

C. 研究結果

S138 変異の意義と T-20/S138A の効果

T-20 耐性の責任変異として HR1 に存在する変異、N43D があり、それに伴う 2 次変異として HR2 領域に S138A が存在する。S138A は T-20 のアミノ酸配列中に存在するため S138A を導入した T-20、T20_{S138A} を合成しその抗 HIV 活性を検討したところ、野生株だけでなく T-20 耐性株に対しても活性の増強を認めた。S138 の意義を明らかとするために他の生理的アミノ酸 18 種類に置換したところ、S、A に準ずる側鎖が小さいアミノ酸においては活性が維持されたが、T-20 耐性株に対する効果は減弱した。活性は側鎖の大きさに逆相関していることが明らかとなった。

C34 耐性変異による抗 HIV 活性の上昇

我々は以前に C34 に対する耐性機序を解析し HR2 領域に 2 次変異として N126K を同定している。この N126K を導入した C34_{N126K} ペプチドを作成し、抗 HIV 活性を検討した。野生型だけでなく、C34 耐性ウイルスの複製をも抑制した。HR2 N126K 変異が HR1 との親和性向上に関与することが明らかになっており、HR2 内のアミノ酸変異を利用した融合阻害ペプチドは、HR1 との結合増強により強力な抗 HIV-1 活性を発揮し有用な治療薬となりうることが示唆された。

T-20_{S138A} に対する耐性変異

T-20_{S138A} に対する耐性変異の同定のために dose escalating 法にて耐性ウイルスを誘導した。耐性誘導には T-20 耐性である HIV-1_{N43D/S138A} を用いた。HR1 に L33S、HR2 に E137K が導入され、耐性を獲得した。

ペプチド性膜融合阻害剤の構造最適化研究

C-領域部分ペプチドと N-領域部分ペプチドから構成される複合体の熱力学的安定性

と C-領域部分ペプチドの抗 HIV 活性とは、相関があることが知られている。C-領域部分ペプチドの 138 位に対する構造最適化研究を行った。また、138 位の Ser から Ala への置換により、HIV-1 野生株 (HIV-1 NL4-3) および T-20 耐性株 (HIV-1 NL4-3_{D36D/V38A}, HIV-1 NL4-3_{D36G/N43D}) に対する抗 HIV 活性の向上が認められたことから、その機序を解明するために X 線構造解析および自由エネルギー計算を行った。Ala 置換体は T_m 値及び EC_{50} 値が高く、膜融合阻害剤として優れていることが示唆された。N-領域部分ペプチド N36 と C-領域部分ペプチド C34 との 6-helix bundle 構造が X 線構造解析されており、本研究ではこの C34 の 138 位の Ser を Ala に置換した 6-helix bundle 構造 (N36/C34_{S138A}) を決定した。N36 と C34_{S138A} が互いに逆平行型に相互作用して、空間群 P321 の対称性により、結晶格子内に 6-helix bundle 構造を 2 組形成していた。Ala 置換部位に着目すると、置換前と置換後で構造がほとんど変化していなかった。そこで、N36/C34 および N36/C34_{S138A} の構造に対して分子力学計算および PBSA (Poisson-Boltzmann Surface Area) モデルを用いて自由エネルギー計算を行い、S138A の置換基効果を見積もった。138 位の Ser から Ala への置換は C-領域部分ペプチドの脱溶媒和エネルギー (ΔG_{solv}) を増大させ、6-helix bundle 構造形成に有利に働くことが示唆された。

膜融合阻害剤の非ペプチド化研究

本研究グループは、高活性 HIV-1 膜融合阻害剤として見出した SC35EK の C-末端 6 残基を欠失させた SC29EK が、SC35EK と同等の抗 HIV 活性を示すことを明らかにしている。本研究では、生体内で容易に分解されるペプチド結合を、生物学的等価体 (ジペプチドイソスター) へ変換することによる膜融合阻害剤 SC29EK の非ペプチド化に取り組んだ。代表的なジペプチドイソスターとしてペプチド結合をアルケンで置換した (E)-アルケン型ジペプチドイソスター (EADI) やフルオロアルケンで置換した (Z)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスター (FADI) が挙げられる FADI では、ペプチド結合のカルボニル酸素に相当するフッ素原子が水素結合アクセプターとして機能し、抗 HIV 活性発現に重要な α -ヘリックス構造を形成することが期待される。SC29EK は α -ヘリックス構造を安定化させる X-EE-XX-KK モチーフを有する。そこで、Lys-Lys に相当する FADI を合成し、ペプチド二次構造に対する影響を EADI との比較も含

めて検討した。SC29EK の4か所の Lys-Lys 部位に FADI、EADI を導入した誘導体、FADI 含有 SC29EK-F1~F4、EADI 含有 SC29EK-E1~E4 は、通常の Fmoc 固相合成法により合成した。一連の誘導体の抗 HIV 活性を MAGI アッセイにより評価した。FADI、EADI 共に置換部位が N 末端に近づくにつれて活性が減弱し、N36 との混合 CD スペクトル及び T_m 値との相関が認められた。全ての置換部位において、FADI 含有誘導体は対応する EADI 含有誘導体より強力な抗 HIV 活性を示す傾向が認められた。特に、6-helical bundle の安定性に差が認められた SC29EK-F3 と SC29EK-E3 の間に最も顕著な活性の差が認められ、SC29EK-F3 が弱いながらも活性を示したのに対し、SC29EK-E3 では活性が失われた。

融合阻害小分子化合物の探索

融合阻害活性を有する小分子化合物を同定していたが、更に活性が強い化合物を探索した。30000 種類以上の化合物を検討し、 EC_{50} が 100nM 前後の強い抗 HIV 活性を有する化合物を複数見出している。

KRH-3955 の抗 HIV-1 活性

KRH-3955 は、X4, R5X4 HIV-1 の活性化 PBMC における複製を強力に (EC_{50} : 1~4 nM) 抑制した。一方、R5 HIV-1 に対しては抗ウイルス活性を示さなかった。また KRH-3955 は薬剤耐性ウイルスに対しても優れた抑制活性を示した。

hu-PBL-SCID mice を用いた HIV-1 感染モデルにおける抗ウイルス活性

感染前に単回経口投与した KRH-3955 は、hu-PBL-SCID mice 腹腔内における NL4-3 の感染・複製をほぼ完全に抑制した。

CXCR4 阻害剤との相互作用に影響を与える CXCR4 アミノ酸の同定

CXCR4 の細胞外領域、膜貫通領域と推定される中で細胞外領域に近接する領域に存在する主に酸性アミノ酸をアラニンに置換した点変異体を作製し 293 細胞に導入して安定発現株を樹立した。CXCR4 阻害剤が変異 CXCR4 と抗 CXCR4 抗体 12G5 の結合阻害活性に与える影響を測定することによって、阻害剤と相互作用する CXCR4 中のアミノ酸を推定した。その結果、KRH-3955 は His²⁸¹ と相互作用すると推定された。一方、AMD3100 は過去の論文で報告されているとおりその相互作用するアミノ酸は Asp¹⁷¹、Asp²⁶²、Glu²⁸⁸ であり KRH-3955 の作用するアミノ酸との重なりは認められなかった。

D. 考察

今年度の研究において T-20 などの融合阻害剤に対する耐性変異の内、HR2 に存在する 2 次変異をペプチドの導入することにより、抗 HIV-1 活性の上昇、耐性ウイルスへの抑制効果が認められることを明らかにした。このような活性の変化は HR1 由来ペプチドとの結合力の増加によることを明らかにした。

融合阻害ペプチドの非ペプチド化の実験では Lys-Lys 部位に FADI、EADI を導入した誘導体を作成し抗 HIV-1 活性を検討したが、活性は低下しており、今後の検討が必要である。

KRH-3955 は経口投与が可能な CXCR4 阻害剤であり、X4 HIV-1 の複製を *in vitro*, *in vivo* で強力に抑制した。KRH-3955 は各種耐性ウイルスにも有効であり、今後の開発が待たれる。

E. 結論

今年度の研究から耐性変異を利用し融合阻害ペプチド製剤の活性増強、耐性ウイルスへの効果発現に成功すると共に CXCR4 阻害剤の開発が着実に進んでいる。耐性変異による活性増強機構の解明にも成功しており、今後、研究を推進して行く。

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

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤の開発に関する研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
研究分担者：京都大学ウイルス研究所 児玉 栄一

研究要旨

多剤耐性 HIV 感染症を克服するために HIV の細胞侵入過程を標的とした薬剤の開発を行った。本年度は耐性変異をペプチドデザインに応用し、融合阻害剤耐性 HIV に効果を示すペプチドの作製に成功した。また、このペプチドに対する耐性ウイルスを誘導した。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のエンベローブタンパクである gp120 と gp41 はウイルスの宿主細胞への吸着・侵入において重要な役割を果たしている。gp120 は細胞表面上の CD4 レセプター、続いて CXCR4 や CCR5 等のコレセプターと結合することにより構造変化を起こし、それによって gp41 が活性化され N 末端の疎水性アミノ酸部位が細胞膜に貫通する。融合の過程で、gp41 の N 末端側ヘリックス(HR1)と C 末端側ヘリックス(HR2)が相互作用し六量体を形成することでウイルスと細胞膜を接近させ、膜融合を起こすと考えられている。

本研究ではこの HIV の細胞内侵入を阻害する薬剤を網羅的に探索・開発し、現在臨床で問題となっている逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤耐性 HIV を効率よく抑制することを目的としている。そのため初年度においてスクリーニング効率の向上と作用機序の解明のために新たなスクリーニング系を確立した。この方法によって CCR5 を利用して感染する実験室株や臨床分離株などを効率よく簡便にスクリーニングできることを示した。また一方で、有効な薬剤デザインのために T-20 耐性ウイルスの解析も併せて行っている。T-20 は gp41 の六量体の形成を阻害することで膜融合を抑制すると考えられており、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に耐性を持つ HIV-1 の複製も強く抑制する。しかしながら、gp41 の 38 番目のアミノ酸がバリンからアラニンに変異した V38A 変異や 43 番目のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に変異した

N43D 変異が導入された T-20 耐性ウイルスが出現しており、T-20 の効果を減弱させることを *in vitro* において明らかにしてきた。一方で C-HR 由来のペプチドの一つである C34 は *in vitro* において T-20 より効果的にウイルスの融合を阻害することが知られており、我々は C34 をアミノ酸置換することによって高親水性で高活性の誘導体を作製することにも成功している (SC34EK)。さらに SC34EK の活性を残したまま小分子化することにも成功した (SC29EK)。

今年度は臨床で問題となりつつある T-20 耐性を克服するために昨年度とは異なるペプチドデザインを確立し、その効果を検討した。

B. 研究方法

細胞

HeLa-CD4/CCR5LTR- β -galactosidase (MAGI) 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清(FCS)、0.2 mg/ml G418、0.1 mg/ml ハイグロマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium 中で培養した。MT-2 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清(FCS)を含む RPMI1640 培地で培養した。

抗ウイルス剤

gp41 由来のペプチドである T-20 とその誘導体、C34 および SC34EK、SC35EK は化学合成により作製した。ddC は Sigma-Aldrich 社より購入した。CXCR4、CCR5 アンタゴニストである T-140 と TAK-779 はそれぞれ京都大学薬学部、米国 NIH より分与を受けた。

T-20 耐性ウイルスの作製

pNL4-3 に存在するユニークサイトにはさま

れる NheI-BamHI 断片 (1215 bp, gp120 V4 領域から gp41 の細胞外 domain を含む) をクローニングした pSLgp41WT を作製した。これに対して site directed mutagenesis を行い、変異を有する NheI-BamHI 断片を pNL4-3 に戻すことで目的の変異を有するクローンを作製した。これらクローンを 293T 細胞に遺伝子導入し、48 時間後にウイルスを回収した。

抗 HIV-1 活性の評価

抗 HIV-1 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator assay を用いた。10⁴ cells/well の HeLa-CD4/CCR5LTR- β -galactosidase (MAGI) 細胞を 96 well flat microtiter culture plate で培養し、翌日に HIV-1 クローンと抗ウイルス剤を加える。ウイルスを加えてから 48 時間培養後 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) によって感染細胞を染色した。呈色した細胞数を数えコントロールとの比較によってその濃度における HIV-1 の細胞への感染阻害率を求めた。抗 HIV-1 活性は HIV-1 の複製を 50% 阻害する濃度 (EC₅₀) を算出し評価した。

Circular Dichroism スペクトルの測定

T-20 と N-HR 由来のペプチド N36 との結合親和性を直接測定することは困難であるため、T-20 の代わりに C34 を使用し、circular dichroism (CD) により親和性を検討した。CD スペクトルはペプチド(等モルの C 末端側ヘリックスと N 末端側ヘリックス)を PBS に溶かし、分光計で測定した。PBS のみのモル楕円率の波長 [θ] を基準として、各複合体の [θ] は 25°C において測定した。結合したペプチドの熱安定性は 222 nm における CD スペクトルの変化を見ることで評価した。0.5°C 刻みに測定し、熱変性過程の中間を融解温度 T_m として求めた。

T-20_{S138A} に対する耐性ウイルスの誘導

ウイルスは pNL4-3 を 293T 細胞にトランスフェクトし、作成する。SC34EK を 50% ウイルス複製阻止濃度から培養液に加え、その状態でウイルス複製を繰り返す。細胞変性効果が十分に見られるようになった場合、培養液に加える薬剤濃度を 2 倍に増加させ、さらに培養を続ける (dose escalating method)。ある一定濃度を超える濃度でもウイルスが複製してくるようにな

ったら、感染細胞の一部を回収し、DNA を抽出、PCR 法でウイルスのエンベロープ領域を増幅し、その塩基配列を決定する。

変異が導入されていた場合、その感受性の変化、および上記と同様に pNL4-3 にその変異を site directed mutagenesis 法で導入し、感受性変化から、変異の意義を同定する。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

C. 研究結果

新規分子クローンの構築

NL4-3 株では gp41 の 36 番目のアミノ酸はアスパラギン酸(D)だが、ほとんどの HIV-1 株ではこのアミノ酸がグリシン(G)である。D を有するウイルスは複製能が低下することが報告されていることから site-directed mutagenesis 法を用いて pNL4-3 の 36 番目のアミノ酸を G へ戻し、これに種々の耐性変異を導入したものを抗 HIV-1 活性の評価に用いた。このウイルスを用いることにより、これまで十分なウイルス力価が得られなかったウイルスにおいても比較的安定に十分な力価を得ることが可能となった。この NL4-3_{D36G} を HIV-1_{WT} として、臨床で T-20 耐性変異として報告されている変異 V38A、N43D、N43D/S138A を導入した。これらのウイルスはそれぞれ 10、20、35 倍の T-20 感受性低下を示した (Table 1)。D36G を持つウイルスは T-20 に対して約 10 倍程度の感受性増加が認められたが、D36G を有するウイルスをコントロールとした場合、T-20 耐性度には影響がなかった。

2 次変異 S138A の影響

gp41 HR2 由来ペプチドである T-20 に対して高度耐性を付与する責任変異として HR1 に存在する変異、N43D が挙げられるが、N43D に対する 2 次変異 S138A は HR2 領域に同定されている。初めに S138A が代償変異として HIV-1 複製能に及ぼす影響について検討を行った (Fig. 1)。その結果、S138A は N43D によって減弱した HIV-1 複製速度を著明に改善させ、アラニンへの置換が感染性の維持に合理的な変異であることが明らかになった。

S138 変異を導入した T-20 の効果

S138AはT-20のアミノ酸配列中に存在するためS138Aを導入したT-20、T20_{S138A}を化学合成しその抗 HIV 活性を検討したところ、野生株に対して感受性を上げただけでなく、T-20 耐性株に対しても感受性を維持した(Table 1)。S138 の意義を明らかとするために他の生理的アミノ酸 18 種類に置換したところ、S、A に準ずる側鎖が小さいアミノ酸においては活性が維持されたが、T-20 耐性株に対する効果は減弱した。活性は側鎖の大きさに逆相関していた。また、K、E、D 等のチャージを持つアミノ酸や側鎖が大きな Y、F では活性がほとんど消失していた。

S138 置換ペプチドの HR1 に対する結合性

代償変異であるアラニン及び他のアミノ酸に置換したペプチドは活性がことなることから、その機序として gp41 N-HR に対する結合性の変化を考え、S138 置換ペプチドを作製し、N-HR との結合能を circular dichroism (CD) により検討した。T-20 は in vitro binding assay において HR1 との結合性が乏しいため、T-20 の代わりに 12 アミノ酸 N 末端側を含む HR2 の代表的なペプチド C34 に S138 置換を導入し、HR1 の代表的な N36 との親和性を CD によって解析した。耐性 HIV-1 に対して T-20_{S138A}、T-20_{S138L} ペプチドは若干の感受性低下を示すものの T-20 と比較して感染を効果的に阻害した(Table 2)。HR1 の代表ペプチド N36 と、HR2 を代表するペプチド C34、S138 を置換した C34_{S138X} の親和性を求めると、C34_{S138A}、C34_{S138L} は C34 よりも強固な N36 との結合能を示し、N43D を導入した N36 (N36_{N43D}) との検討においても同様の結果が得られた。また、N43D と同等の T-20 耐性度を示す V38A を導入した N36_{V38A} においても同様の結果が得られ、これらの融解温度と抗 HIV-1 活性には相関性が認められた。

C34 耐性変異の応用

以前我々のグループは T-20 誘導体である C34 に対する耐性機序を解明している。C34 耐性ウイルスの HR2 領域に S138A のような2次変異として N126K が導入されていたことから、この N126K を導入した C34_{N126K} ペプチドを作成した。このペプチドの抗 HIV 活性を検討したところ、野生型だけにとどまらず、C34 耐性ウイルスの複製をも抑制することが明らかとなった(Table 3)。

HR2 N126K 変異が HR1 との親和性向上に関与することが明らかになっていることと併せ、HR2 内のアミノ酸変異を利用した融合阻害ペプチドは、HR1 との結合増強により強力な抗 HIV-1 活性を発揮し有用な治療薬となりうることが示唆された。

T-20_{S138A} に対する耐性を付与する変異の誘導

T-20_{S138A} に対する耐性変異の同定のために dose escalating 法にて耐性ウイルスを誘導した。耐性誘導には T-20 耐性である HIV-1_{N43D/S138A} を用いた。HR1 に L33S、HR2 に E137K が導入され、耐性を獲得した(Fig. 1)。

D. 考察

これまでのペプチド性融合阻害剤創製とは異なり、アミノ酸をたった1つ変えることで耐性を克服することが可能となることを明らかとした。この機序としては、我々のグループ、他のグループがこれまで報告してきたように HR1 に対する親和性の増加によるものではあるが、それをアミノ酸1つの変異によって可能とする点が他の研究と大きく異なる。

これまでのペプチド創製では、多数のアミノ酸を変更する必要があった。我々が以前報告した SC34EK や T-20EK では HR1 との相互作用にとって必要ではない溶媒接触面のアミノ酸残基をグルタミン酸 (E) とリジン (K) に置換させている。これらの置換は C34 のアミノ酸配列の i と i+4 の位置にあり、それにより XEEXXKK (X は置換されていないアミノ酸) モチーフの繰返しとなっている。SC34EK は 2 個の完全な XEEXXKK モチーフと 3 個の不完全な XEEXXKK モチーフを持ち、元の配列である C34 と比べて抗 HIV-1 活性が増強されていた。この活性増加の理由として helicity の強化が挙げられ、これを維持しながら 29 アミノ酸まで小分子化できることを昨年報告した(SC29EK)。一方、T-20EK ではアミノ酸数を減らすと活性と逆相関が見られ、36 アミノ酸よりも小分子化が困難であった。我々が作製した EK シリーズのペプチドは配列の約 30% を変更したものであるが、米国 Trimeris/Roche 社が開発を進めている T-20 由来ペプチドは約 50% を改変し、またアミノ酸数を減らすことはできていない。おそらく T-20 対応配

列の中、特に両端に活性維持部位が含まれていると考えられる。この点に関しては C 末側のトリプトファンに富む部位がこれまで詳細に調べられて来たが、N 末側に関する報告はまだまだ少ないのが現状である。今後 N 末側の解析が必要と考えられた。

これらのペプチドは少なくとも 30%以上のアミノ酸を変更しており、感染者に投与するに当たり吸収性、安定性、抗原性、有効性、毒性などほぼすべての臨床試験を新規薬剤と同様にやり直す必要がある。そのため、開発には莫大な費用と時間が必要であり、早期臨床応用は困難である。しかしながら我々が見出した耐性変異を導入した T-20 等は実際に T-20 投与によって出現してきた自然界に存在する HIV-1 の配列であり、これら薬理学的問題は比較的少なくなり、有効な薬剤の早期臨床応用を加速させると考えられる。

この 1 アミノ酸変異導入による活性増強は T-20 に限らず C34 でも認められた。このことは我々が提唱した新しい耐性克服型のペプチド創製がある程度普遍的に応用することができることを示唆する。第 2 世代の融合阻害剤が開発されても HIV-1 はおそらくそれに対しても耐性を獲得すると予想されるが、その場合においても導入された耐性変異を導入することにより、耐性ウイルスの複製を抑制しうると考えられ、ペプチド配列の設計をより簡便化することが可能となる。耐性変異の導入パターンがある程度症例をかさねることで明らかになればあらかじめその配列をもつペプチドを作製しておくことも可能であろう。

他のペプチド性薬剤としてアボトーシス抑制タンパクである Bcl-2 の α -helix ドメインを模したペプチドが注目されているが、これの投与が開始されれば HIV-1 同様、がん細胞も耐性を獲得してくると考えられる。耐性変異がこの α -helix ドメインに導入されていた場合、T-20 と同様に耐性変異を導入したペプチドデザインが可能である。

E. 結論

本年度、T-20 のアミノ酸を 1つ変更することで T-20 耐性を克服できることを明らかとした。野生型 HIV-1 に対してもその強い活性が維持されて

おり第二世代のペプチド誘導阻害剤の候補として期待される。

F. 健康危険情報

基礎的研究であり該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiroki Nishikawa, Shota Nakamura, Eiichi Kodama, Saori Ito, Keiko Kajiwara, Kazuki Izumi, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Akira Otaka, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka

Electrostatically constrained α -helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (in press)

2) Eiichi Kodama, Masaya Orita, Naoyuki Masuda, Osamu Yamamoto, Masahiro Fujii, Tetsuro Ohgami, Shunji Kageyama, Mitsuaki Ohta, Toshifumi Hatta, Hiroshi Inoue, Hiroshi Suzuki, Kenji Sudo, Yasuaki Shimizu, and Masao Matsuoka Binding modes of the novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, YM-215389 and YM-228855, to HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 19:133-141, 2008

3) Hiroki Nishikawa, Eiichi Kodama, Ayako Sakakibara, Ayako Fukudome, Kazuki Izumi, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Novel screening systems for HIV-1 fusion mediated by two extra-virion heptad repeats of gp41. *Antiviral Research* 80:71-76, 2008

4) Satoshi Ueda, Manabu Kato, Shinsuke Inuki, Hiroaki Ohno, Barry Evans, Zi-xuan Wang, Stephen C. Peiper, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hideko Nagasawa, Shinya

- Oishi, Nobutaka Fujii. Identification of novel nonpeptide CXCR4 antagonists by ligand-based design approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18:4124-4129, 2008
- 5) Hiroki Nishikawa; Shinya Oishi; Mizuno Fujita; Kentaro Watanabe; Rei Tokiwa; Hiroaki, Ohno; Eiichi Kodama; Kazuki Izumi; Keiko Kajiwara; Takeshi Naitoh; Masao Matsuoka; Akira Otaka; Nobutaka Fujii Identification of minimal sequence for HIV-1 fusion inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16:9184-9187, 2008
- 6) Atsushi Kawamoto, Eiichi Kodama, Stefan G. Sarafianos, Yasuko Sakagami, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Yuko Iwai, Hiroyuki Hayakawa, Hirotomo Nakata, Hiroaki Mitsuya, Eddy Arnold, and Masao Matsuoka. 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40:2410-2420, 2008
- 7) Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Stefan G. Sarafianos, Matthew M. Schuckmann, Yasuko Sakagami, Masao Matsuoka, Masafumi Takiguchi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka. Amino acid mutation, N348I, in the connection subdomain of HIV-1 Reverse Transcriptase Confers Multi-class Resistance to Nucleoside and Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Journal of Virology* 82: 3261-3270, 2008
- 8) Oishi S, Masuda R, Evans B, Ueda S, Goto Y, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Wang Z, Peiper SC, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Synthesis and Application of Fluorescein- and Biotin-labeled Molecular Probes for Chemokine Receptor CXCR4. *ChemBioChem* 9:1154-1158, 2008thesis and Application of Fluorescein- and Biotin-labeled Molecular Probes for Chemokine Receptor CXCR4. *ChemBioChem* 9:1154-1158, 2008
- 9) Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Watanabe Y, Ohata Y, Doi S, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M. Broad Anti-Retroviral activity and Resistance Profile of a Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor, Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *Journal of Virology* 82: 764-774, 2008
- 10) Kajiwara K, Kodama E, Sakagami Y, Naito T, Matsuoka M. A Dual-Reporter Phenotypic Assay for Human Immunodeficiency Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 792-795, 2008
- 11) Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Watanabe K, Tanaka M, Ohno H, Izumi K, Sakagami Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Design of a Novel HIV-1 Fusion Inhibitor That Displays a Minimal Interface for Binding Affinity. *Journal of Medicinal Chemistry* 51: 388-391, 2008
- 12) Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N and Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. *Journal of Virology* 82: 588-592, 2008

2. 学会発表

Kazuya Shimura, E Kodama, D Nameki, Y Sakagami, S Oishi, N Fujii, M Matsuoka. Resistant Profile of the Electrostatically Constrained Next-generation HIV-1 Fusion Inhibitors. CROI 2009. Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009.

蜂谷敦子、嶋根和毅、児玉栄一、小泉寛和、湯永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一: 逆転酵素 connection と RNase H subdomain の多様性と薬剤感受性に及ぼす影響: 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008 年 11 月 26-28 日

嶋根和毅、児玉栄一、松岡雅雄: HIV-1 Rev-derived peptide は Rev と CXCR4 の dual-target inhibitor として作用する: 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008 年 11 月 26-28 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

Table 1. Antiviral activity of T-20-derived peptides against T-20-resistant gp41 recombinant viruses

	EC ₅₀ (nM)			
	HIV-1 _{WT} *	HIV-1 _{V38A}	HIV-1 _{N43D}	HIV-1 _{N43D/S138A}
T-20	2.4 ± 0.6	23 ± 8.2 (9.6)	49 ± 10 (20)	84 ± 16 (35)
<i>small</i>				
T-20 _{S138G}	1.3 ± 0.5 (0.5)	65 ± 8.8 (27)	141 ± 26 (59)	185 ± 68 (77)
T-20 _{S138A}	0.6 ± 0.1 (0.3)	3.6 ± 1.7 (1.5)	3.5 ± 0.9 (1.5)	3.2 ± 1.0 (1.3)
<i>hydrophobic</i>				
T-20 _{S138V}	0.4 ± 0.2 (0.2)	31 ± 14 (13)	22 ± 3.5 (9.2)	23 ± 5.7 (9.6)
T-20 _{S138L}	0.7 ± 0.1 (0.3)	13 ± 6 (5.4)	2.9 ± 0.7 (1.2)	2.2 ± 0.4 (0.9)
T-20 _{S138I}	0.5 ± 0.1 (0.2)	4.9 ± 2 (2)	2.9 ± 0.8 (1.2)	2.4 ± 0.6 (1)
T-20 _{S138M}	0.7 ± 0.2 (0.3)	4.4 ± 0.1 (1.8)	1.7 ± 0.5 (0.7)	1.2 ± 0.4 (0.5)
T-20 _{S138P}	446 ± 167 (186)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)
<i>nucleophilic</i>				
T-20 _{S138T}	0.9 ± 0.2 (0.4)	39 ± 8.5 (16)	161 ± 35 (67)	124 ± 43 (52)
<i>aromatic</i>				
T-20 _{S138F}	9.4 ± 2.6 (4)	203 ± 89 (85)	393 ± 119 (164)	478 ± 116 (200)
T-20 _{S138Y}	25 ± 9 (10)	516 ± 223 (215)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)
T-20 _{S138W}	29 ± 14 (12)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)
<i>amide</i>				
T-20 _{S138N}	19 ± 4 (8)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)
T-20 _{S138Q}	34 ± 11 (14)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)
<i>acidic</i>				
T-20 _{S138D}	210 ± 94 (88)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)
T-20 _{S138E}	283 ± 80 (118)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)
<i>basic</i>				
T-20 _{S138H}	210 ± 85 (88)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)
T-20 _{S138K}	708 ± 145 (295)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)
T-20 _{S138R}	362 ± 114 (150)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)	> 1000 (> 416)

Anti-HIV activity was determined with the MAGI assay.

*To improve the replication kinetics, D36G mutation, observed in majority of HIV-1 strains, was introduced into the NL4-3 background used in this study (reference virus).

The data shown are mean values and standard deviations (SD) that were obtained from the results of at

least three independent experiments.

Shown in parentheses are the fold increase in resistance (increase in EC₅₀ value) calculated by comparison to a reference virus. Increases of over 10-fold are indicated in bold.

Table 2
Melting temperature (T_m) for the formed 6-helix bundle

Peptide	T_m (°C)		
	N36	N36 _{V38A}	N36 _{N43D}
C34	53.7	42.8	35.6
C34 _{S138A}	59.6	47.3	40.0
C34 _{S138L}	57.8	47.8	46.8
C34 _{S138T}	49.6	39.5	NA*
C34 _{S138W}	48.6	44.1	31.4
C34 _{S138P}	47.8	45.3	NA*

Thermal stabilities, defined as the midpoint of the thermal unfolding transition (T_m) values, of the potential 6-helix bundles of N- and C-HR peptides, were determined.

*NA; not available due to less formation of 6-helix bundles.

Table 3. Antiviral activity of C34_{N126K} peptides against C34-resistant gp41 recombinant viruses

	EC ₅₀ (nM)	
	HIV-1 _{WT} *	HIV-1 _{ΔV4/I37K/N126K/L204I} †
C34	1.6 ± 0.35	114 ± 29 (71)
C34 _{N126K}	0.95 ± 0.22 (0.6)	1.1 ± 0.5 (0.7)

Anti-HIV activity was determined by the MAGI assay.

*To improve the replication kinetics, the D36G mutation, observed in majority of HIV-1 strains, was introduced into the NL4-3 background used in this study (reference virus).

†C34 resistant HIV-1 was constructed with the reference virus as described². ΔV4 indicates 5 amino acids deletion (FNSTW) in the V4 region of gp120.

The data shown are mean values and standard deviations (SD) that were obtained from the results of at

least three independent experiments.

Shown in parentheses are the fold increase in resistance (increase in EC₅₀ value) calculated by comparison to a reference virus. Increases of over 10-fold are indicated in bold.

Supplemental Figures

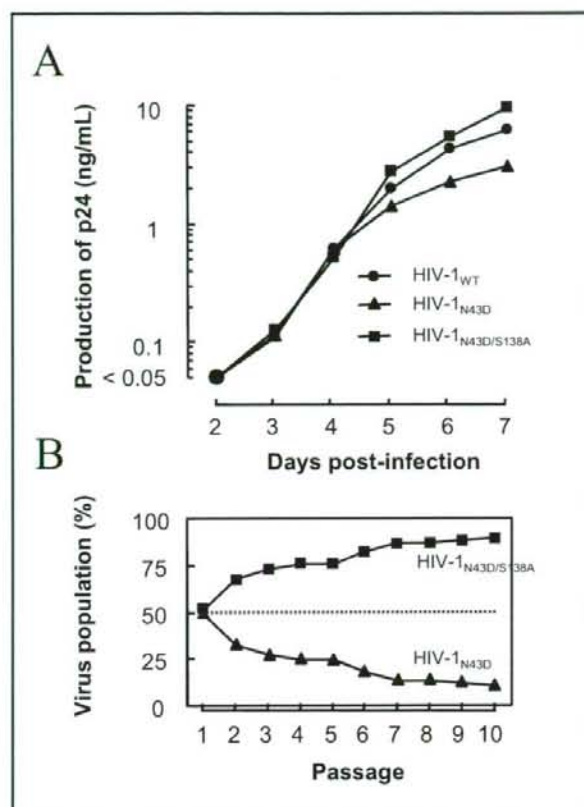


Fig. 1 Replication kinetics of T-20-resistant variants

(A) To improve replication kinetics, the D36G polymorphism, observed in majority of HIV-1 strains, was introduced into the NL4-3 background used in this study (a reference virus, HIV-1_{WT}). Supernatants were collected on days 2 through 7 from infected MT-2 cells and were evaluated for levels of p24 antigen. HIV-1_{WT} containing the N43D mutation (HIV-1_{N43D}; red squares) showed reduced replication kinetics compared with HIV-1_{WT} (blue circles). Introduction of S138A into HIV-1_{N43D} to generate HIV-1_{N43D/S138A} (purple triangles) restored the replication kinetics. (B) Additionally, due to the use of competitive HIV-1 replication assays (CHRA), HIV-1_{N43D/S138A} demonstrated more efficient replication kinetics than HIV-1_{WT}. We performed the CHRA three times independently and obtained similar results. The representative data are shown.

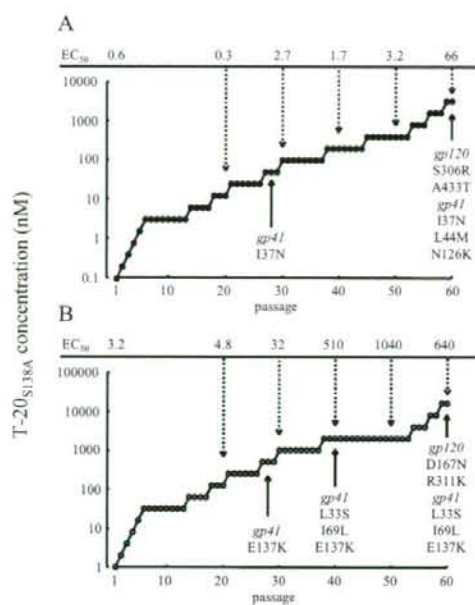


Fig. 2 Induction of T-20_{S138A}-resistant HIV-1 from HIV-1_{WT} (A) and HIV-1_{N43D/S138A} (B). At the indicated passage number, proviral DNA extracted from infected MT-2 cells was sequenced. Deduced amino acid substitutions are shown. The EC₅₀ of HIV-1 variants selected by T-20_{S138A} at the indicated passage number were determined using MAGI.

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤の開発に関する研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
研究分担者：京都大学大学院薬学研究科 藤井 信孝
大石 真也

研究要旨 gp41 由来 C-領域部分ペプチドの 138 位の残基に対する構造最適化研究のための、強力なペプチド性膜融合阻害剤を簡便に同定する評価系を構築した。さらに、gp41 由来 N36/C34_{S138A} 複合体の X 線結晶構造解析および自由エネルギー計算を行い、Ser138 の Ala への置換による抗 HIV-1 活性向上のメカニズムを解明した。また、ペプチド結合を生物学的等価体へと変換し、その機能評価を行った。

分担研究項目 1：ペプチド性膜融合阻害剤の構造最適化研究

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。この膜融合過程において、エンベロープタンパク質 gp41 の α ヘリックス構造をとる N-および C-領域が逆並行型に相互作用し、6-helix 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。

C-領域部分ペプチドである C34 は、gp41 の N-領域と安定な 6-helix bundle 構造を形成することで HIV 感染を阻害すると考えられている。一方、T-20 (Fuzeon) は、C34 と同様のメカニズムによって膜融合過程を阻害すると考えられている C-領域部分ペプチドであり、臨床応用されている唯一のペプチド性膜融合阻害剤であるものの、詳細な作用機序については明確な知見が得られていない。近年、T-20 耐性ウイルスが出現し、薬剤耐性ウイルスに効果を示す新規阻害剤が求められていることから、本研究では、T-20 耐性ウイルスにも有効なペプチド性膜融合阻害剤の構造最適化を簡便に行える評価系構築に取り組んだ。また、X 線構造解析からペプチド性膜融合阻害剤の相互作用様式を解明し、構造最適化の指針を得ることを目指した。

B. 研究方法

C-領域部分ペプチドと N-領域部分ペプチドから構成される複合体の熱力学的安定性と C-領域部分ペプチドの抗 HIV 活性とは、相関があることが知られている。そこで、Fig. 1a に示すように、各種 C-領域部

分ペプチドの混合物と His タグで修飾した N-領域部分ペプチドを緩衝溶液中で混合し、平衡状態とした後、その複合体を Ni-NTA で回収することで、より強力なペプチド性膜融合阻害剤を同定する評価系を考案した。そして、C-領域部分ペプチドの 138 位に対する構造最適化研究を通じて本評価系の検証を行った。また、138 位の Ser から Ala への置換により、HIV-1 野生株 (HIV-1 NL4-3) および T-20 耐性株 (HIV-1 NL4-3_{D36D/V38A}, HIV-1 NL4-3_{D36G/N43D}) に対する抗 HIV 活性の向上が認められたことから、その機序を解明するべく、X 線構造解析および自由エネルギー計算を行った。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

まず、研究グループでこれまでに開発したペプチド性膜融合阻害剤 SC35EK や T-20EK の 138 位を一残基置換した SC35EK_{S138X} 及び T-20EK_{S138X} の混合物、N-末端に His タグを配した N-領域部分ペプチド (His)₆-N36_{D36G} 及び (His)₆-N54_{D36G} を Fmoc 固相合成法により合成した。SC35EK_{S138X} 及び T-20EK_{S138X} の混合物は、split-mix 法 (Fig. 1b) で調製し、精製を経ずに、各置換体を LC-MS によって検出した。

次に、SC35EK_{S138X} や T-20EK_{S138X} の混合物に (His)₆-N36_{D36G} または (His)₆-N54_{D36G} を緩衝溶液中で混合、平衡化させた後、His タグを利用して Ni-NTA で複合体を回収した。得られた複合体を 50%酢酸で解離させた後に LC-MS を用いて定量解析を行い、SC35EK_{S138X} や T-20EK_{S138X} 混合物の初濃度

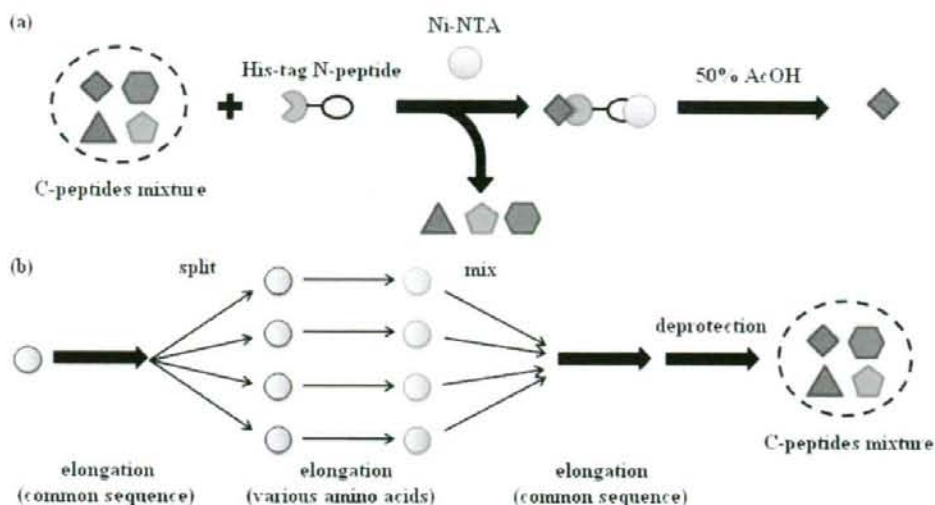


Fig. 1. (a) Screening of HIV/cell fusion inhibitors by pull-down assay. (b) Preparation of C-peptides mixture by split and mix synthesis.

との比較により各置換体の回収率を算出した。その際、本手法が評価系として機能するように、緩衝溶液中の N-領域部分ペプチド ((His)₆-N36_{D36G} または (His)₆-N54_{D36G}) の濃度を 10 μM に固定し、C-領域部分ペプチド一残基置換 (SC35EK_{S138X} や T-20EK_{S138X}) 混合物の初濃度を検討した。この一残基置換混合物と N-領域部分ペプチドとの濃度比が約 20 : 1 の場合には、一部の置換体が高い回収率で検出されたが、強力な抗 HIV 活性を示すにも関わらず回収率の低い置換体があった。一方、全ての置換体が複合体を形成することが可能な濃度比 (約 0.6 : 1) に設定したところ、全ての置換体の回収率が同程度となり、複合体安定性の比較が困難であった。さらに濃度比を検討したところ、濃度比を約 2 : 1 にした場合、回収率は複合体の熱力学的安定性 (T_m 値) や抗 HIV 活性 (EC_{50} 値) と相関を示した (Table 1 & Fig. 2)。

Table 1 に示すように、Ala 置換体は T_m 値及び EC_{50} 値が高く、膜融合阻害剤として優れていることが示唆された。そこで、Ala の置換を導入した 6-helix bundle 構造の N-領域/C-領域相互作用様式を、X 線構造解析により明らかにし、その置換基効果を調査した。

これまでに N-領域部分ペプチド N36 と C-領域部分ペプチド C34 との 6-helix bundle 構造が X 線構造解析されており、本研究ではこの C34 の 138 位の Ser を Ala に置換し

Table 1. The anti-HIV activity and the thermal stability of SC35EK_{S138X}, T-20EK_{S138X}

X	SC35EK _{S138X}			T-20EK _{S138X}		
	Recovery rate (%)	T_m (°C)	EC_{50} (nM)	Recovery rate (%)	T_m (°C)	EC_{50} (nM)
A	11.5	86.4	1.2	10.0	80.1	0.34
D	0.0	59.7	15	1.5	56.5	330
E	1.8	66.2	15	2.2	61.0	230
F	4.0	72.9	1.5	5.8	64.6	2.8
G	11.6	79.1	1.9	9.6	76.7	0.38
H	2.4	62.9	1.9	3.2	58.5	35
I	11.3 ^a	84.6	1.3	10.4 ^a	79.7	0.37
K	0.0	53.5	8.2	0.8	50.6	330
L	11.3 ^a	83.2	0.93	10.4 ^a	77.6	0.44
M	12.5	84.1	0.68	9.9	79.0	0.24
N	4.3	69.0	2.2	3.5	65.7	4.8
P	0.1	56.1	35	0.2	55.5	44
Q	2.1	65.9	2.4	2.2	60.0	7.9
R	0.0	52.3	280	1.5	49.4	320
S	11.5	81.6	1.0	10.0	78.8	1.1
T	11.7	79.7	1.8	10.0	75.9	0.39
V	12.1	79.9	1.9	9.4	76.0	0.30
W	0.9	66.4	3.1	5.2	62.0	20
Y	2.3	68.0	1.9	4.7	61.1	5.0

^a Combined yield of S138I and S138L mixtures.

た 6-helix bundle 構造 (N36/C34_{S138A}) を決定した。Fig. 3 に示すように N36 と C34_{S138A} が互いに逆平行型に相互作用して、空間群 P321 の対称性により、結晶格子内に 6-helix bundle 構造を 2 組形成していた。Ala 置換部位に着目すると、置換前と置換後で構造がほとんど変化していなかった (Fig. 4)。そこで、N36/C34 および N36/C34_{S138A} の構造に対して分子力学計算および PBSA

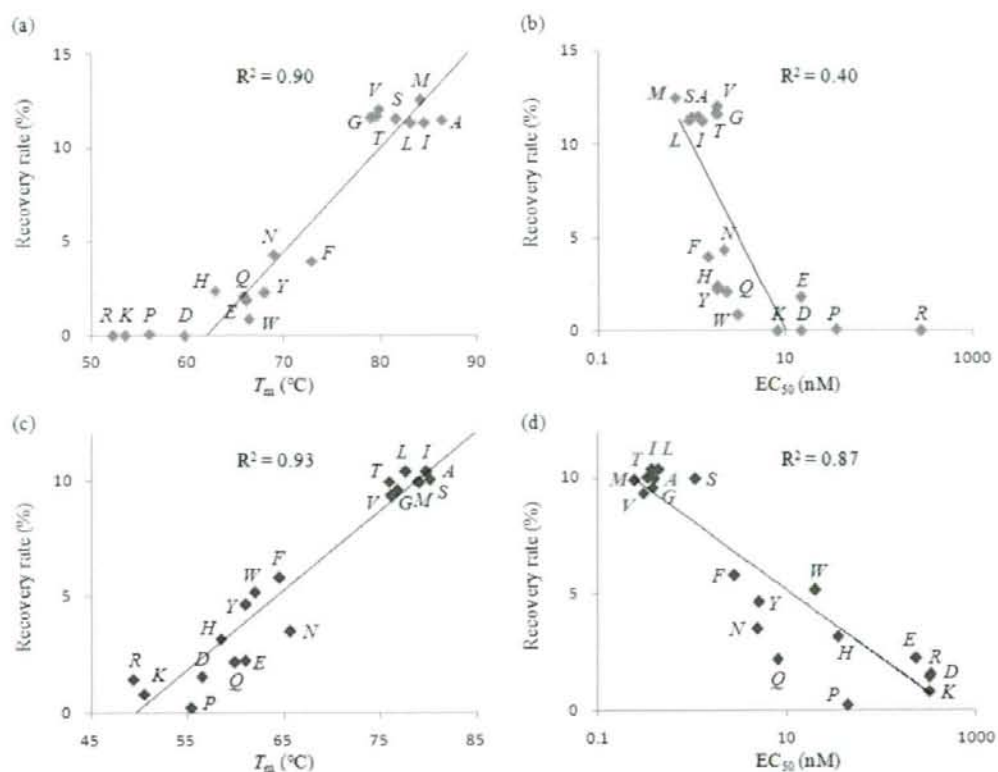


Fig. 2. Correlation between the recovery rate and the thermal stability, or the anti-HIV activity. (a, b) SC35EK_{S138X} (c, d) T-20EK_{S138X}.

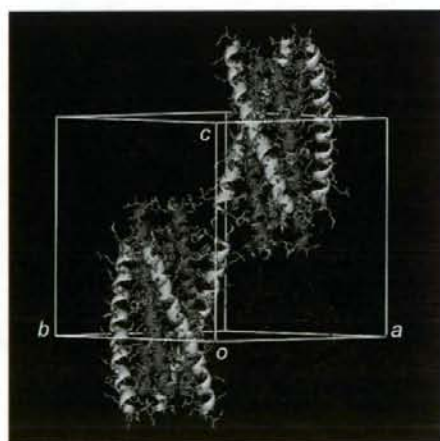


Fig. 3. Crystal structure of the N36/C34_{S138A} complex. N36 and C34_{S138A} helices are colored green and yellow, respectively. The crystal was indexed to space group $P321$ with unit cell dimensions of $a = b = 49.09$ Å, $c = 56.40$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$, and $\gamma = 120^\circ$.

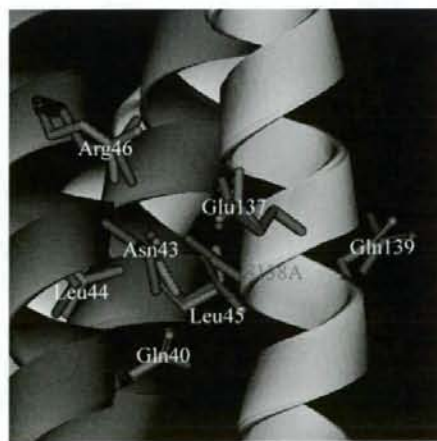


Fig. 4. Superposition of the crystal structure of the N36/C34 complex with that of the N36/C34_{S138X} complex. N36 and C34_{S138X} (X = S or A) helices are colored green and yellow, respectively. In Addition, the stick model side-chains of N36/C34 and N36/C34_{S138A} are colored blue and red, respectively.

Table 2. Results of free energy calculation by MM (molecular mechanics) and PBSA (Poisson-Boltzmann surface area) method

	C34	C34 _{S138A}
ΔG_{MM}	190.64	203.08
ΔG_{dW}	-132.07	-141.32
ΔG_{ele}	322.71	344.40
ΔG_{solv}	-251.06	-278.06
ΔG_{bind}	-60.42	-74.98

All energy values are given in kcal/mol. C34 and C34_{S138A} peptides capped with standard Ac and NMe groups.

(Poisson-Boltzmann Surface Area) モデルを用いて自由エネルギー計算を行い、S138Aの置換基効果を見積もった (Table 2)。

D. 考察

本研究において構築した評価系では、Fig. 2に示すように、SC35EK_{S138X}やT-20EK_{S138X}の回収率が T_m 値や EC_{50} 値と相関を示したことから、強力な抗 HIV 活性を有する膜融合阻害ペプチドの同定が可能であることが示唆された。SC35EK_{S138X}がT-20EK_{S138X}よりも「回収率と EC_{50} 値との相関」において良好でなかった (SC35EK_{S138X}: $R^2 = 0.40$; T-20EK_{S138X}: $R^2 = 0.87$)。このことは、SC35EK_{S138X}の T_m 値と EC_{50} 値との相関が低いことに起因していると考えられる (SC35EK_{S138X}: $R^2 = 0.65$; T-20EK_{S138X}: $R^2 = 0.87$)。

回収率が高かった置換体は、側鎖に水酸基を有する残基 (Ser や Thr)、または、疎水性かつ比較的小さい残基 (Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Val) を持つものであり、SC35EK_{S138X}及びT-20EK_{S138X}に同一の傾向が認められた。その中でもAlaに置換したものは、HIV-1 野生株およびT-20 耐性株に対して抗 HIV 活性を向上させたことから、その置換基効果を調査するためにX線構造解析および自由エネルギー計算を行った。

これまでにX線構造解析されたHIV-1野生型の6-helix bundle構造 (N36/C34: PDB code 1AIK) と、C-領域部分ペプチドC34の138位のSerをAlaに置換した6-helix bundle構造 (N36/C34_{S138A}) とを構造比較すると、Fig. 4が示すように、両者の構造はほとんど変化していなかった (特に置換部位周辺)。このことから、N-領域部分に対しての138位側鎖の結合親和性が複合体の熱力学的安定性 (抗 HIV 活性) に直接的な影響を及ぼしていると考えられる。

また、自由エネルギー計算によると、Table 2が示すように、138位のSerからAlaへの置換はC-領域部分ペプチドの脱溶媒和エネルギー (ΔG_{solv}) を増大させ、6-helix bundle 構造形成に有利に働くことが示唆された。

E. 結論

強力な抗 HIV 活性を有する膜融合阻害ペプチドの同定を簡便に行える評価系の構築を行った。また、N-領域部分ペプチドN36とC-領域部分ペプチドC34_{S138A}との共結晶を作成し、X線構造解析により構造決定した。そして、自由エネルギー計算により、Ser138をAlaに置換した際の抗 HIV 活性向上は脱溶媒和エネルギーの上昇に起因していることが示唆された。

分担研究項目2: 膜融合阻害剤の非ペプチド化研究

A. 研究目的

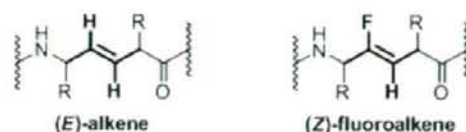


Fig. 5. Structures of EADI and FADI.

研究グループは、高活性 HIV-1 膜融合阻害剤として見出した SC35EK の C-末端 6 残基を欠失させた SC29EK が、SC35EK と同等の抗 HIV 活性を示すことを明らかにしている。本研究では、生体内で容易に分解されるペプチド結合を、生物学的等価体 (ジペプチドイソスター) へ変換することによる膜融合阻害剤 SC29EK の非ペプチド化に取り組んだ。代表的なジペプチドイソスターとしては、ペプチド結合をアルケンで置換した (E)-アルケン型ジペプチドイソスター (EADI) やフルオロアルケンで置換した (Z)-フルオロアルケン型ジペプチドイソスター (FADI) が挙げられる (Fig. 5)。中でも FADI では、ペプチド結合のカルボニル酸素に相当するフッ素原子が水素結合アクセプターとして機能し、抗 HIV 活性発現に重要な α ヘリックス構造を形成することが期待される。しかしながら、高度に官能基化された FADI の立体選択的合成は容易でないことから、生理活性ペプチドへの応用例は未だに少なく、ペプチド二次構造に対