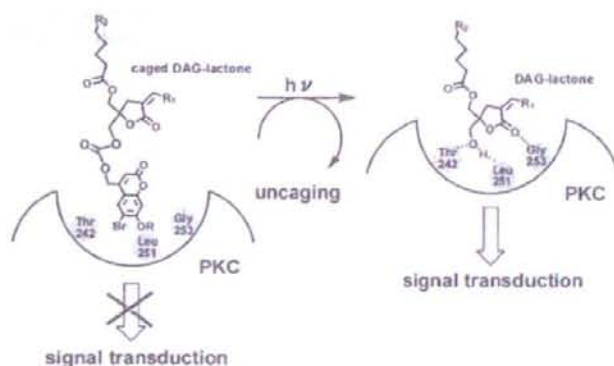


P-142 DEVELOPMENT OF CAGED DIACYLGLYCEROL-LACTONE DERIVATIVES AND THEIR APPLICATIONS

Yuki Serizawa¹, Wataru Nomura¹, Nami Ohashi¹, Yoshiaki Okuda^{1,2}, Hironori Matsumoto^{1,2}, Hiroshi Tsutsumi¹, Toshiaki Furuta^{1,3}, and Hirokazu Tamamura^{1,2}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ³Faculty of Sciences, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

Caged compounds are molecules designed so that their biological activity will be temporary disappeared and then reactivated by applying external triggers such as ultraviolet light. These compounds receive widespread attention as temporary and spatially controlled probes of cell-based processes. Protein kinase C (PKC), which is a serine/threonine-specific protein kinase, plays a pivotal role in cell signaling by functioning as a central signal transducing element. These signals are generated by a broad range of ligands which produce the lipid second messenger, diacylglycerol (DAG). Marquez et al have developed DAG-lactone derivatives with a significant increase in binding affinity for PKC as possible templates for the construction of conformationally constrained analogues of DAG. In the present study, caged DAG lactones were synthesized and their photochemically properties were characterized. We confirmed that caged DAG-lactones are photolysed by ultraviolet light irradiation with HPLC analysis and that uncaged DAG-lactones activate PKC by imaging analyses using a confocal microscope system. These results indicate that activity control of DAG-lactones with photo-removable protecting groups could be a useful tool for elucidation of activation mechanism of PKC in mammalian cells.



P-146 SITE-SELECTIVE CYTOSINE METHYLATION BY A SPLIT DNA METHYLASE

Wataru Nomura¹, Hirokazu Tamamura¹, and Carlos F. Barbas, III²

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²Departments of Chemistry and Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037, U.S.A.

Covalent modification of DNA, such as cytosine methylation, can induce heritable gene silencing. If epigenetic modifications can be specifically targeted, new approaches to transcriptional therapy should result. To address this challenge, we sought to design methyltransferases that would act only at a desired site by adapting the sequence-enabled assembly strategy. Methyltransferase HhaI (M.HhaI) was split into two domains and N-, C-terminal domains were fused to HS2 and HS1 zinc finger domains, respectively. Detection of site-specific methylation was performed by using HhaI restriction enzyme digestion. Moreover, the site-specific methylation was determined by bisulfite sequencings. Our split DNA methylase performed site-specific CpG methylation in living cells without any background methylation when appropriately assembled at the target site. This is the first successful application of the sequence-enable enzyme reassembly approach in vivo. This split domain re-assembly strategy will allow creation of programmable zinc finger methylases that act at any specific CpG site in the mammalian genome. Programmable methylases should orchestrate heritable gene silencing and should find application in DNA tagging approaches and in nanotechnology.

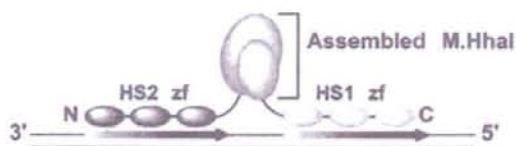


Figure. Schematic representation of split-methylase binding to the target DNA.

HIV 侵入の動的超分子機構を標的とした CD4 mimic

(¹東京医歯大・生材研、²熊本大・エイズ学研セ、³東京医歯大・疾患生命研) 山田 裕子¹、
吉村 和久²、落合 千裕¹、田中 智博¹、柴田 潤二²、畑田 真紀子²、堤 浩¹、野村 渉¹、
松下 修三²、○玉村 啓和^{1,3}

【背景】

AIDS および HIV 感染症の治療法としては一般に逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を 2,3 剤用いる highly active anti-retroviral therapy (HAART) が用いられており、多大な成功を収めている。しかし、耐性ウイルスが生じる、根治できない、副作用がある等の問題点があり、別の作用点の薬も 3 種ほど登場している。我々は以前から HIV 侵入段階に着目しており、コレセプター CXCR4 のアンタゴニストを中心に種々の阻害剤を創製してきた。今回は、低分子型 CD4 mimic である NBD-556 を取りあげ¹⁾、その構造活性相関研究および HIV 侵入の動的超分子機構への影響や CXCR4 アンタゴニスト、中和抗体等との併用の効果を調べた。

【方法】

NBD-556 の構造活性相関に関しては分子内に含まれる芳香環 (CD4 の Phe43 に対応すると考えられる) 部分が gp120 の cavity に相互作用し、芳香環の p-位付近に比較的大きな空間が存在すると推定されるため、芳香環の p-位に種々の置換基を導入した誘導体を合成し、各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を評価した。さらに、CD4 mimic の存在下での、CXCR4 アンタゴニスト (T140) や抗 V3 抗体、CD4 induced 抗体の gp120 への反応性を調べた。

【結果・考察】

高活性の誘導体が数個見つかリ、また構造活性相関の情報も得られた。また、CD4 mimic の存在下では、非存在下よりも gp120 への反応性が上昇し、sCD4 の存在下と同様の効果が見られた。これにより NBD 誘導体が gp120 のコンフォメーション変化を誘起することが示唆された。また、CD4 mimic と T140 や抗 V3 抗体あるいは CD4 induced 抗体の併用は抗ウイルス活性を増強した。

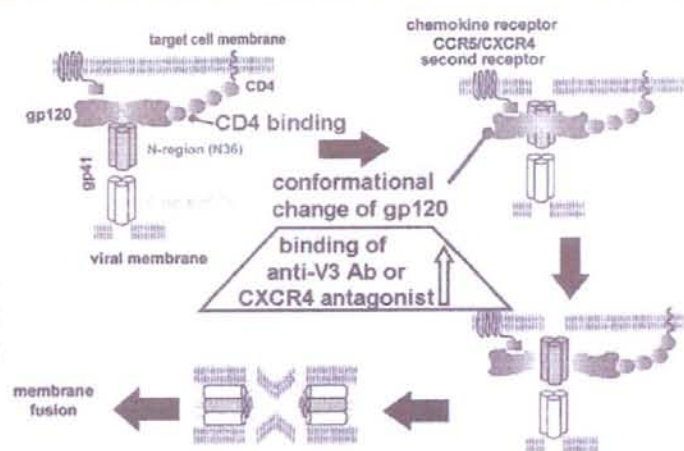


Fig. 1 Induction of change of the gp120 conformation by CD4 binding in HIV-1 entry

ここで得られた低分子型 CD4 mimic 誘導体は gp120 の構造変化を誘導し、中和抗体のエピトープを表面に露出させると考えられる。また、これらは HIV 侵入のダイナミックな超分子機構に作用する有用なツールになると示唆され、多剤併用療法を視野にいたった抗エイズ薬の創製研究に有用であると思われる。

【参考文献】

1. Arne S, et al. Thermodynamics of binding of a low-molecular weight CD4 mimetic to HIV-1 gp120. (2006) *Biochemistry*, 45, 10973-10980.

CD4 mimic small molecules targeted for dynamic supramolecular mechanism of HIV entry

Yuko Yamada¹, Kazuhisa Yoshimura², Chihiro Ochiai¹, Tomohiro Tanaka¹, Junji Shibata², Makiko Hatada², Hiroshi Tsutsumi¹, Wataru Nomura¹, Shuzo Matsushita², Hirokazu Tamamura^{1,3*}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²Center for AIDS Research, Kumamoto University, ³School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

To date, highly active anti-retroviral therapy (HAART), which utilizes a combination of HIV protease inhibitors and reverse transcriptase inhibitors, has brought us a great success and hope in the clinical treatment of HIV-infected patients. However, HAART involves serious clinical problems such as the emergence of multi-drug resistant strains. These drawbacks encouraged us to develop brand-new drugs with novel action mechanisms. Recently, a molecular mechanism involved in HIV-entry and -fusion into host cells has been disclosed in detail. The elucidation of the dynamic supramolecular mechanism in HIV-entry and -fusion has provided insights into new type of drugs that can block HIV infection. Based on this finding, we have developed entry inhibitors such as coreceptor CXCR4 antagonists, T22 and T140. In this study, we focused on CD4 mimic small compounds, such as NBD-556¹⁾, and performed their structure-activity relationship study. In addition, effects on the dynamic supramolecular mechanism of HIV entry and a combinational use with CXCR4 antagonists or neutralizing antibodies were investigated.

NBD analogues having various substituents on the phenyl ring were synthesized, and their anti-HIV activity was evaluated. Some compounds showed potent anti-HIV activity. In addition, NBD analogues showed highly synergic effects with an anti-gp120 antibody and with T140. In the FACS analysis, in the presence of NBD analogues, the anti-gp120 antibody strongly binds to the HIV envelope. It suggests that CD4 mimic compounds induce a conformational change of gp120.

CD4 mimic compounds might expose the epitope region of gp120, which was hidden inside. These compounds would be important probes directed to the dynamic supramolecular mechanism of HIV Entry, and useful lead compounds for cocktail therapy of AIDS.

27H-pm11

ケージド DAG-ラクタクトンによるプロテインキナーゼ C の活性化制御

○野村 渉¹, 芹澤 雄樹^{1,2}, 大橋 南美¹, Nancy E. LEWIN³, 堤 浩¹, 吉田 清嗣⁴, Peter M. BLUMBERG⁵, 古田 寿昭⁵, 玉村 啓和^{1,2} (1)東京医歯大生材研, (2)東京医歯大附疾患生命, (3)Laboratory of Cancer Biology and Genetics, NCI, National Institutes of Health, (4)東京医歯大難治研, (5)東邦大理)

プロテインキナーゼ C (PKC) はジアラシルグリセロール (DAG) をセカンドメッセンジャーとするセリン・スレオニン特異的リン酸化酵素であり、がんやアルツハイマー病の治療薬創製の標的酵素として注目されている。演者らは PKC の活性化を光照射によって時間・空間的に制御することが可能なケージド化合物の開発を試みた。DAG を環化することによって結合活性を上昇させた DAG-ラクタクトンの重要なブラーマアである OH 基を光分解性保護基である 6-Bromo-7-methoxycoumarin (Bmc) 基により保護したケージド DAG-ラクタクトンを合成した。ケージド DAG-ラクタクトンは緩衝液中で紫外光照射により Bmc 基が脱保護され、DAG-ラクタクトンが出現することを HPLC 分析により確認した。また、その結果から分解反応の量子収率等を算出した。リン酸化アッセイによって、ケージド化した DAG-ラクタクトンでは PKC δ は活性化されず、光照射後の脱保護体では活性化されることが明らかにされた。さらに、ケージド DAG-ラクタクトンでは CHO-K1 細胞に発現した GFP 融合 PKC δ の細胞内局在変化を誘起せず、PKC δ 活性化は起こらないことが確認された。以上のことより、PKC δ のリン酸化活性化反応、および細胞内局在変化はケージド化 DAG-ラクタクトンへの光照射による脱保護、それに伴う結合活性の回復を用いることで制御可能であることが示された。



図. ケージド化した DAG-ラクタクトンの光照射による脱保護反応と PKC δ の局在変化の誘起

口頭発表

27H-pm11 27日 15:36~15:48

H会場 国立京都国際会館 1F Room H

化学系薬学 医薬品設計3

座長: 影近 弘之 (東京医歯大)

ケージド DAG-ラクタクトンによるプロテインキナーゼ C の活性化制御

Regulation of Protein Kinase C Activation by Caged DAG-Lactones

○野村 渉¹, 芹澤 雄樹^{1,2}, 大橋 南美¹, Nancy E. LEWIN³, 堤 浩¹, 吉田 清嗣⁴, Peter M. BLUMBERG⁵, 古田 寿昭⁵, 玉村 啓和^{1,2}

(1)東京医歯大生材研, (2)東京医歯大附疾患生命, (3)NCI, National Institutes of Health, (4)東京医歯大難治研, (5)東邦大理)

Institutes of Health, (4)東京医歯大難治研, (5)東邦大理)

Institutes of Health, (4)東京医歯大難治研, (5)東邦大理)

Institutes of Health, (4)東京医歯大難治研, (5)東邦大理)

Institutes of Health, (4)東京医歯大難治研, (5)東邦大理)

27H-pm10

PKC C1b ドメインの合成およびその蛍光性誘導体を用いた新規スクリーニング法の開発

○大橋 南美¹, 野村 涉¹, 加藤 舞^{1,2}, 堤 浩¹, 糸谷 恭子¹, 伊倉 貞吉², 伊藤 暢聡², 吉田 清嗣³, Nancy LEWIN⁴, Peter BLUMBERG⁴, 玉村 啓和^{1,2} (東医歯大生材研,²東医歯大院疾患生命,³東医歯大難治研,⁴NCI, NIH)

口頭発表

27H-pm10 27日 15:24~15:36

H会場 国立京都国際会館 1F Room H

化学系薬学 医薬品設計³

座長: 影近 弘之 (東京医歯大)

PKC C1bドメインの合成およびその蛍光性誘導体を用いた新規スクリーニング法の開発

Synthesis of PKC C1b domains and development of a novel screening method using their fluorescent derivatives.

○大橋 南美¹, 野村 涉¹, 加藤 舞^{1,2}, 堤 浩¹, 糸谷 恭子¹, 伊倉 貞吉², 伊藤 暢聡², 吉田 清嗣³, Nancy LEWIN⁴, Peter BLUMBERG⁴, 玉村 啓和^{1,2}

(¹東医歯大生材研, ²東医歯大院疾患生命, ³東医歯大難治研, ⁴NCI, NIH)

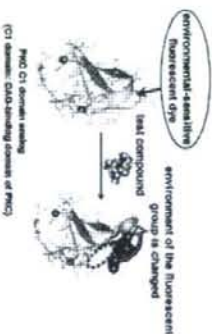


図. 蛍光基の周辺環境変化によるリガンド結合の検出

【目的】 蛍光を用いた検出が容易な化合物評価法はハイスループットスクリーニングへの応用が期待できる。迅速かつ容易な化合物スクリーニング法は、創薬を指向した化合物合成プロセスの効率化につながる。演者らは、がんプロモーターであるホルボールエステルの受容体である Protein Kinase C (PKC) に着目し、検出に蛍光を用いた PKC リガンド結合評価法の開発を行なった。

【方法】 約 50 アミノ酸からなる PKC リガンド結合領域 (C1b ドメイン) を効率的に合成するために、2 つの断片をそれぞれ Fmoc 固相合成法で作製後、Native Chemical Ligation (NCL) 反応によって全長とした。また、環境応答性蛍光基を導入した Fmoc-Lys-OH 誘導体を用いて、同様に蛍光ラベル体を合成した。合成した C1b ドメインの性質は、リガンドであるホルボールエステルに対する結合活性や CD スペクトル解析で調べた。また、リガンド結合による蛍光スペクトル変化を測定した。

【結果および考察】 Fmoc 固相合成法と NCL により、効率良く天然型 C1b ドメインと蛍光ラベル C1b ドメインを創製できた。これらの C1b ドメインはリコンビナント C1b ドメインと同様の CD スペクトルを示し、天然配列のものと同等のリガンド結合活性を有することが確認された。さらに、作製した蛍光性 C1b ドメインにリガンドを加えたところ顕著な蛍光スペクトル変化がみられ、リガンド結合活性を評価できることが明らかになった。よって、蛍光性 C1b ドメインのリガンドスクリーニングツールへの応用の可能性が示唆された。

26Q-am207

蛍光性 CXCR4 特異的リガンドの開発：スクリーニング及びイメージングへの展開

○田中 智博¹、野村 渉¹、田部 泰章^{1,2}、堤 浩¹、糸谷 恭子¹、大庭 賢二¹、村上 努³、山本 直樹³、玉村 啓和^{1,2}(¹東京医歯大・生材研、²東京医歯大・疾患生命、³国立感染症研・エイズ研セ)

【目的】近年、ケモカイン受容体 CXCR4 は、HIV 感染症、がん転移、慢性関節リウマチ等の種々の疾病に関わっていることが明らかになり、創薬のマルチターゲットとして注目されている。そのため、種々のアノタゴニストが合成されているが、既存の RI (ラジオアイソトープ) ラベルリガンドを用いたスクリーニング系ではコストや安全面から、それら多数の合成品を一挙にスクリーニングすることが困難である。そこで、われわれはより安価で安全な蛍光ラベル CXCR4 リガンドを用いた新規スクリーニング系の開発を行った。

【方法・結果】以前、われわれは CXCR4 アノタゴニスト活性を持つ 14 残基のペプチド T140 の開発に成功している。そこで、CXCR4 の蛍光プローブとして T140 誘導体である Ac-TZ14011 の Lys⁸ に蛍光基を導入した FI-Ac-TZ14011 を設計・合成した。合成した FI-Ac-TZ14011 のスクリーニング用ラベル体として機能を検討するため、その結合活性を RI アッセイで評価した。その結果、FI-Ac-TZ14011 は高い特異性と結合活性を有することが明らかになった。更に、FI-Ac-TZ14011 を用いて新規化合物のスクリーニングを行ったところ、RI リガンドを用いたアッセイ結果と高い相関性を示した。これらの結果から FI-Ac-TZ14011 は CXCR4 アノタゴニストの効率的なスクリーニングを行う非常に有用なツールとして機能することが明らかになった。さらに、FI-Ac-TZ14011 を用いて、CXCR4 発現細胞のイメージングを行った。

ポスター発表

26Q-am207 26 日 10:00~11:00

化学系薬学 医薬化学1

Q 会場 国立京都国際会館 1F ファクサスホール1

蛍光性CXCR4特異的リガンドの開発：スクリーニング及びイメージングへの展開

Development of Fluorescent CXCR4 Specific Ligand: Application for Screening and Imaging

○田中 智博¹、野村 渉¹、田部 泰章^{1,2}、堤 浩¹、糸谷

恭子¹、大庭 賢二³、村上 努³、山本 直樹³、玉村 啓和

^{1,2}

(¹東京医歯大・生材研、²東京医歯大・疾患生命、³国立感染症研・エイズ研セ)

26Q-am205

HIV-1 コレセプター CXCR4 を基にした人工設計型抗原分子の開発

○橋本 知恵^{1,2}, 堤 浩¹, 田中 智博¹, 中原 徹^{1,2}, 野村 涉¹, 大庭 賢二³, 村上 努¹, 山本 直樹^{1,2}, 玉村 啓和^{1,2} (東京医歯大¹, 生材研,² 東京医歯大・疾患生命科学研究所,³ 国立感染症・エイズ研究センター)

ポスター発表

26Q-am205 26日 10:00~11:00

Q会場 国立京都国際会館 1F ネットスホール1

化学系薬学 医薬化学1

HIV-1 コレセプター CXCR4 を基にした人工設計型抗

原分子の開発

Development of Artificial Antigen Molecules Based on HIV-1 Co-receptor

CXCR4

○橋本 知恵^{1,2}, 堤 浩¹, 田中 智博¹, 中原 徹^{1,2}, 野村

涉¹, 大庭 賢二³, 村上 努³, 山本 直樹³, 玉村 啓和^{1,2}

(¹ 東京医歯大¹生材研, ² 東京医歯大²疾患生命科学研, ³ 国立
感染症・エイズ研究セ)

【目的】現在、HIV 感染者への治療においてプロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤を複数組み合わせた多剤併用療法が大きな効果を上げてきている。しかし、根治は難しく、薬剤耐性ウイルスの出現などの新たな問題も生じている。そのため、HIV ワクチン開発が待ち望まれているが、HIV に対して真に有効なワクチンの開発は未だ成功していない。本研究では、変異を起しやすく、HIV 側ではなく、HIV が宿主細胞に侵入する際に標的となる第二受容体 CXCR4 を標的としたワクチン開発に取り組んだ。

【方法】CXCR4 の細胞外領域となる N 末端領域と 3 つの細胞外ループのうち、N 末端領域を標的とする抗体誘導のためにオーナーラックする 3 配列に断片化した N 末端領域 (Nt-1, 2, 3) を Fmoc 固相合成法により作製した。また、効果の良い抗体誘導のため

に、合成したペプチドを多価抗原ペプチド (multi-antigen peptide: MAP) テンプレート上に導入した。このように合成した抗原分子をマウスに免疫し、抗体誘導実験を行った。免疫後、定期的に血清を採取し、抗原ペプチドに対する ELISA 法により抗体の誘導を確認した。

【結果および考察】Nt-2, 3 を用いた免疫で抗体の誘導が確認できた。血清を用いたリガンド競合阻害実験によって、Nt-3 で誘導された抗体の CXCR4 結合活性も確認された。さらに、抗 HIV 活性評価の結果についても発表したい。

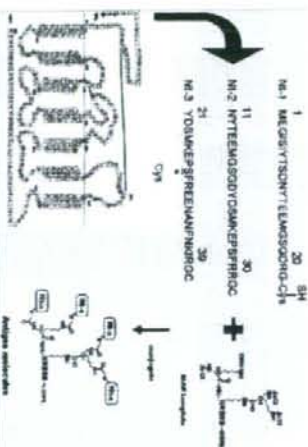


図. CXCR4 の N 末端領域断片ペプチドの MAP コンジュゲートの作成

配列特異的 DNA 組換え酵素における DNA 結合親和性及びほす組み換え反応効率への影響

野村 渉¹, ○増田 朱美^{1,2}, 加藤 舞^{1,2}, 大庭 賢二³, Carlos F BARBAS, III⁴, 山本 直樹³, 玉村 啓和^{1,2} (1)東医歯大生材研, (2)東医歯大院疾患生命, (3)感染研エイズ研セ, (4)スクリプス研)

ポスター発表

26Q-pm067 26 日 14:30~15:30

会場 国立京都国際会館 1F ネットクスホール1
生物系薬学 生物化学 1

配列特異的DNA組換え酵素におけるDNA結合親和性及びほす組み換え反応効率への影響

Effects of DNA binding affinity of zinc finger protein on DNA recombination efficiency

野村 渉¹, ○増田 朱美^{1,2}, 加藤 舞^{1,2}, 大庭 賢二³,

Carlos F BARBAS, III⁴, 山本 直樹³, 玉村 啓和^{1,2}

(1)東医歯大生材研, (2)東医歯大院疾患生命, (3)感染研エイズ研セ,

(4)スクリプス研)

亜鉛フィンガータンパク質 (Zinc Finger Protein; ZFP) はβα構造を形成するモジュールのαヘリックスと側鎖が3塩基と非共有結合を形成してDNA配列に特異的な結合を行う。ZFPをDNA結合ドメインとしたDNA修飾酵素が作製可能であり、DNA組換え酵素では標的DNAにおける組換え反応を起こし、標的とする遺伝子をノックアウトできることが示されている。しかし、そのような反応におけるDNA結合親和性と組換え反応の反応効率の相関関係はこれまでに明らかにされていなかった。本研究において、演者らは亜鉛フィンガータンパク質が認識するDNA配列の長さやDNA組換え反応の反応効率の関係について検討を行った。



図ZFP融合型DNA組換え酵素の反応。A-Dは標的配列を示し、それぞれで酵素ドメインが二量化する。

約20塩基対のヌペーサー配列を有する標的配列で組換え酵素ドメインが二量体形成できるように結合するZFPを作製した。それらのDNA結合親和性はELISA法で評価した。4~6個のモジュールを連結したZFPではモジュール数の増加に応じてそのDNA結合親和性も上昇することが示された。このDNA結合親和性の変化がZFP融合型DNA組み換え酵素の反応効率に与える影響を検討するために、DNA組換え酵素をコードするプラスミド上に標的配列を導入した。このプラスミドを用いて大腸菌内でDNA組換え酵素を発現し、一定時間反応させた。酵素活性は組換え産物を定量化して評価した。本研究の結果を基にすることで、より効率の高いDNA組み換え酵素を構築できると期待される。