

200908007B

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

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
(H19-政策創薬-一般-007)

平成19-21年度 総合研究報告書

研究代表者 松岡 雅雄
(京都大学ウイルス研究所・教授)

平成22 (2010) 年 3月

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 HIV 化学療法剤の開発-----1
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

1. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授）-----6
大石 真也（京都大学薬学研究科・助教）
2. 児玉 栄一（東北大学病院・助教）-----34
3. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）-----48

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・刊行物・別刷

1. 松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）-----51
児玉 栄一（東北大学病院・助教）
2. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授）-----164
大石 真也（京都大学薬学研究科・助教）
3. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）-----215

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 教授 松岡雅雄

研究要旨

抗 HIV 薬による HIV 感染者の治療成績は大きく向上したが、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 HIV 阻害活性を有する多数の小分子リード化合物、及び T-20 より強力な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 剤を開発し多剤耐性克服型化学療法の確立を目指した。

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・講師)

児玉栄一(東北大学医学部感染症科・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)

A. 研究目的

複数の抗 HIV 薬を組み合わせる多剤併用療法 (HAART) の導入によりヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) 感染者の予後は改善し、早期に発見し治療すれば、コントロール可能な感染症へと変貌した。しかし HIV-1 の体内からの根絶は不可能であり、長期に渡る薬剤の服用は必須である。このため薬剤の長期毒性に加えて耐性ウイルスの出現が治療上の大きな問題となっている。また、発展途上国をはじめとする新規薬剤が行き届かない各国での耐性ウイルスの出現は大きな脅威であり、グローバルな視点から安全かつ安価で有効な新規抗 HIV 剤の開発が急務となっている。

我々は、HIV 吸着・膜融合の動的機構の解明を進め、これを基盤とする HIV 侵入阻害剤 (第二受容体拮抗剤) や HIV 膜融合阻害剤の開発において先駆的研究を推進するとともに、多数の創薬リード化合物を創出してきた。これまでに申請者らが取り組んで来た HIV 侵入・膜融合阻害剤の開発に関する基礎研究、および数種の開発候補化合物を基盤として

多剤耐性 HIV 株を標的とする化学療法剤の開発を目指した。各種のペプチド性化合物・低分子リード化合物の構造最適化を図ると共に、作用メカニズム解析および既知薬剤の耐性株への評価を行った。これらの研究のうち、特に融合阻害剤についてはすでに有用なペプチドを同定し、複数の特許出願を行っている。加えて、小分子リード化合物の発見、作用機序解明などで様々な成果をあげてきた。本申請ではこれまでに見出している一連のリード化合物の構造情報を基盤として、富士フイルム(株)と連携しながら強力な吸着・融合阻害活性を有する化合物を創製し、有用な基礎研究成果をさらに発展させることを目的とした。

B. 研究方法

細胞

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 pNL4-3 に変異を導入し作製した。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。

抗ウイルス剤とペプチド

gp41 由来のペプチド (N36、T-20、C34、SC22EK、SC29EK、SC34EK、SC35EK) は化学合成により作製した。DS5000、AZT および ddC は Sigma-Aldrich 社より購入した。

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。また固定化抗 CD3 抗体で刺激し、IL-2 存在下で増殖させた末梢血単核球を標的細胞として HIV-1 を MOI=0.001 で感染させ、種々の濃度の薬剤存在下で7日から10日培養した。抗 HIV-1 活性は培養上清中の p24 抗原量を市販の ELISA を用いて測定後算出した。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

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

SDF-1 α 結合阻害活性の測定

CXCR4 を強制発現させた CHO 細胞を用いて薬剤存在、非存在下で細胞に結合した ¹²⁵I-SDF-1 α の放射活性を測定した。

各種抗 CXCR4 抗体結合阻害活性の測定

Molt-4 細胞に結合した CXCR4 抗体量を FACS にて定量した。

CXCR4 阻害剤との相互作用に影響を与える CXCR4 中のアミノ酸の同定

CXCR4 点変異体を安定発現させた 293 細胞を使用し、CXCR4 阻害剤が変異 CXCR4 と抗 CXCR4 抗体 12G5 と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。

事前内服による感染予防効果の検討

カニクイサルに SHIV-KS661_c を感染させる AIDS モデルにおいて KRH-3955 を 100 mg/kg で感染 24 時間前に投与 (対照薬剤: TDF/FTC は、30/20 mg/kg を感染 24 時間前と感染直前の 2 回投与) 後、10 AID50 の SHIV-KS661_c を経直腸感染させ、12 週にわたって観察した。

新規ペプチド合成法

化学合成により得られたモデルペプチドにより、Cys または Met を含む 2 残基のペプチド配列を付加した抗 HIV 活性配列の切り出し条件を解析した。次に、大腸菌による組換えタンパク質の発現系を確立し、融合タンパク質を用いて、組換えタンパク質の精製方法、融合タンパク質からの環化型ペプチドの切り出し条件の精査、環化型ペプチドの精製方

法等を検討した。

抗 HIV-1 活性を有する小分子化合物の合成法
報告されている酸化的アミジン化反応を用いてベンズアルデヒドを 2-phenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine 誘導体に変換後、官能基化反応に付すことで、PD 404182 と同様の多環式複素環骨格が得られると考え、実験を進めた。

構造解析

gp41 における N-領域の Asn43 が Asp にアミノ酸変異すると、T-20 耐性を獲得することが報告されている。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 線構造解析した。

新規ペプチド性膜融合阻害剤評価系

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。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。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。

抗 HIV-1 活性を有する化合物合成法

抗 HIV 活性を有する小分子化合物を同定しており、その合成方法に関して検討を行った。

(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

融合阻害ペプチドの抗 HIV-1 活性

gp41 36 番目のアミノ酸は大部分の HIV-1 株 (グリシン) と比べて NL4-3 株ではアスパラギン酸 (D) となっており、ウイルス複製を障害していると考えられる。pNL4-3 の 36 番目のアミノ酸をグリシンへ戻し、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 NL4-3-D36G を HIV-1_{WT} として T-20 耐性株に対しての SC29EK の活性を解析した。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 HIV-1_{WT} に導入した。C34 から 5 アミノ酸小分子化した C29 の抗 HIV-1 活性は C34 と比較して減弱しており、T-20 耐性 HIV-1 に対しても効果を示さなかった。一方 SC29EK は HIV-1_{WT} や T-20 耐性 HIV-1 に対して SC34EK と同等の抗 HIV-1 活性を示した。この結果から SC34EK より 5 アミノ酸短い SC29EK も同等の抗 HIV-1 効果を有することが明らかとなった。

N36 との結合親和性

SC29EK が有する強い抗 HIV-1 活性のメカニズムを明らかにするため、N36/SC29EK 複合体の CD 解析を行った。N36/SC29EK の CD スペクトルは N36/C34 や N36/SC35EK と同様に [·]₂₂₂ 付近において極小値をとる α -ヘリックス構造に特徴的なスペクトルを示していた。また N36/C22 複合体ではほとんど α -ヘリックス構造をとっていないと考えられた。T-20 耐性変異の入った N36 と SC29EK との複合体 (N36_{V38A}/SC29EK、N36_{N43D}/SC29EK) の CD スペクトルは、N36/SC29EK のスペクトルと同じであることから SC29EK は変異の入った N36 に対しても結合力を維持していると考えられた。

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。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 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。T20_{S138A} は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。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。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。

CXCR4 阻害剤 KRH-3955 の抗 HIV-1 活性

KRH-3955 は、用いた X4、R5X4 HIV-1 の活性化 PBMC における複製を EC₅₀: 1-4 nM で抑制した。また、活性化 PBMC や MT-4 細胞に対して 25 mM まで顕著な細胞毒性を示さなかった。

SDF-1 α 結合阻害活性

KRH-3955、AMD3100、の SDF-1 α 結合に対する IC₅₀ (nM) はそれぞれ、0.8、281.1 であった。

各種抗 CXCR4 モノクローナル抗体結合阻害活性

KRH-3955 は N 末端を認識する抗体以外の抗体の CXCR4 発現細胞への結合を強く阻害した。一方、コントロールとして用いた CXCR4 阻害剤 AMD3100 は、ECL 1 と 2 を認識する抗体で

ある 12G5 の結合は抑制したが、それ以外の抗体結合の阻害は弱いかほとんど認められなかった。

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

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。

KRH-3955 による抗 CXCR4 抗体 12G5 結合阻害活性の測定

Molt-4 細胞を on ice で薬剤処理した後、細胞を洗浄し、抗体反応後結合した CXCR4 抗体量を FACS にて定量した。KRH-3955 (10 nM) では、薬剤処理した後細胞を洗浄し、遊離した薬剤を除去しても、12G5 結合を顕著に阻害した。対照的に、AMD3100 では細胞の洗浄によってその阻害活性をほぼ失っていた。KRH-3955 は持続的に抗 CXCR4 抗体の結合を阻害することが示された。

事前内服による感染予防効果の検討

KRH-3955 を 100 mg/kg で感染 24 時間前に投与した 3 頭の末梢血 CD4 数は、感染後 3 ヶ月経ってもウイルス感染時のレベルを維持していた。一方、対照薬剤の TDF/FTC では、感染後 3 ヶ月において 3 頭中 2 頭の末梢血 CD4 数はウイルス感染時のレベルを維持していたが、1 頭は感染後 1 ヶ月で急激な末梢血 CD4 数の減少を起こした。

構造解析

HIV-1 野生株および T-20 耐性株における gp41 の N-領域部分ペプチド (N36/N43D) と C-領域部分ペプチド (C34) を調製し、共結晶化実験を行った。その結果、N36/N43D と C34 との複合体の結晶を得ることに成功した。得られた結晶について X 線構造解析を行ったところ、N36/N43D と C34 が 3:3 の比で結晶構造を構成しており、互いのペプチドが逆平行型に相互作用していた。そして、空間群 *P*321 の対称性により、結晶格子内に 6-helical bundle 構造が二組存在していた。T-20 耐性変異部位に着目すると、Asp43 は、Arg46 と

塩橋を形成し、Glu137 とは水分子を介した水素結合により連結していた。

ペプチド合成法の確立

抗 HIV 活性ペプチドの両側に Met-Gln 配列を付加した融合タンパク質をデザインし、融合タンパク質から臭化シアンによる切り出しと Gln の pGlu への環化を行い、N 末端に pGlu と C 末端に Hsl を有する抗 HIV 活性ペプチドの調製を試みた。この結果、70%ギ酸、0.1 N 塩酸、0.1 NTFA で溶出した His タグ融合 M-(Q-SC35EK-M)₃-Q から、それぞれ 1.7 mg (収率 7.9%)、2.8 mg (収率 12.4%)、2.0 mg (収率 8.9%) の pGlu-SC35EK-Hsl が得られた。組換えタンパク質から調製する抗 HIV 活性ペプチドは、血中での安定性向上を目的としたエンドキャップ構造が付与されるように設計されている。これらのペプチドの抗 HIV 活性を、化学合成により調製した標品を用いて MAGI アッセイで評価し、HIV-1(NL4-3)の感染を 50%阻害する濃度 (50% effect concentration) として算出した。いずれも強力な抗 HIV 活性が認められ、両末端の構造が抗 HIV 活性に影響しないことが確認できた。

新規合成法の確立

カルバゾールおよびイソキノリン誘導体の効率的合成法、ピリミドベンゾチアジン誘導体の効率的合成法を確立した。

D. 考察

本研究班では、新規の抗 HIV 薬の開発を目指し、吸着・膜融合過程に焦点を当てて開発研究を進めた。平成 19-21 年度の研究により、1) 新たなスクリーニング系の確立、2) 耐性変異を利用した耐性ウイルスに有効なペプチド性融合阻害剤の開発、3) 耐性機序の構造生物学的解析、4) 経口吸収可能な CXCR4 阻害剤の開発とその作用機序の解明、5) 融合阻害活性、抗 HIV 活性を示す小分子化合物の合成法確立 などの成果を上げた。

現在、研究室レベルで最も良く使用されている NL4-3 に存在する変異を野生株に戻すことにより融合阻害活性の正確な測定を可能にできたことは、融合阻害剤開発にと

って有意義であった。また NP2 細胞株を使い X4, R5HIV-1 両者のアッセイが簡便に行えるようになり、スクリーニング系としての有用性が高まったものと考えられる。

現在、臨床応用されているペプチド製剤 T-20 に対しても耐性ウイルスの出現が報告されている。本研究で我々は T-20 耐性 2 次変異を利用して新たな融合阻害剤の創出に成功した。構造解析から、その機序も明らかにしている。交差耐性を示さないペプチド性融合阻害剤の合成が可能であり、今後、耐性が出現しにくい薬剤の開発に繋がるのが期待される。

このようなペプチド性融合阻害剤の合成は、コストがかかるという側面があったが、我々は合成ステップを減らし、化学切断でペプチドを合成する方法を確立した。形質転換に用いるオリゴ DNA を変えることにより前年度までの研究において得られた薬剤耐性株のアミノ酸変異を導入したペプチドが簡便に合成可能であることから、次々に出現しうる薬剤耐性株の対する新規薬剤に共通のユニバーサルな合成法として利用することが可能である。

HIV-1 は CD4 とケモカイン受容体 (CCR5 あるいは CXCR4) をレセプターとして細胞に侵入する。これまで CCR5 阻害剤は臨床応用され大きな成果を上げているが、臨床で使用されている CXCR4 阻害剤はない。今回、開発された KRH-3955 は強力な抗 HIV 活性を有するだけでなく、経口吸収性に優れており、今後の開発が期待される。特にヒト化マウス、サルにおいて優れた抗 HIV-1 効果を示したことは、今後の臨床開発を促進する結果である。

E. 結論

本研究グループによる研究により、吸着・融合過程を標的とする新規抗 HIV-1 阻害剤としてペプチド性融合阻害剤、CXCR4 阻害剤が開発された。融合阻害剤に対する耐性変異を利用することによって、より強力に耐性ウイルスにも有効な融合阻害剤の創出に成功しており、今後の開発が期待できる。またペプチドの新たな合成方法を確立し、効率的な薬

剤合成へ道を拓いた。融合阻害活性、抗 HIV-1 活性を有する小分子化合物の新規合成法を確立し、これからの合成展開へ繋がる成果となった。

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

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

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

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 T-20 耐性株由来 gp41 N36/N43D-C34 複合体および N36/C34_{S138A} 複合体の X 線結晶構造解析を行い、耐性獲得のメカニズムと強力な活性を示す新規膜融合阻害剤のデザインへの指針を与える 6-helical bundle の相互作用様式を解明した。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、また、ペプチド結合を生物学的等価体へと変換した誘導体の機能評価を行った。さらに、非ペプチド性抗 HIV 剤創製を目指した構造最適化研究のための、カルバゾール骨格、イソキノリン骨格等の複素環骨格の新規効率的な多品目合成法を確立した。

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

1 - 1 . T-20 耐性株由来 gp41 N36/N43D-C34 複合体の構造解析（平成19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。この膜融合過程において、エンベロープタンパク質 gp41 の α -helix 構造をとる N-および C-領域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。C-領域部分ペプチドである C34 は、gp41 の N-領域と安定な 6-helical 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、Fuzeon (T-20) 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

性株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 耐性獲得のメカニズムを X 線構造解析により解明し、構造最適化の指針を得ることを目指した。

B. 研究方法

gp41 における N-領域の Asn43 が Asp にアミノ酸変異すると、T-20 耐性を獲得することが報告されている。そこで、これら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 線構造解析により明らかにし、T-20 耐性獲得のメカニズムを調査した。

現在、T-20 は臨床応用されているにも関わらず、N-領域部分ペプチドとの複合体（6-helical bundle 構造）の結晶構造を決定した報告例はなく、この複合体の結晶化は非常に困難であると推察される。これまでに N-領域部分ペプチドの N36 と C-領域部分ペプチドの C34 との 6-helical bundle 構造が X 線構造解析されており、Fig. 1 に示すように、これらのペプチドは T-20 耐性獲得に関与するアミノ酸変異部位を有している。

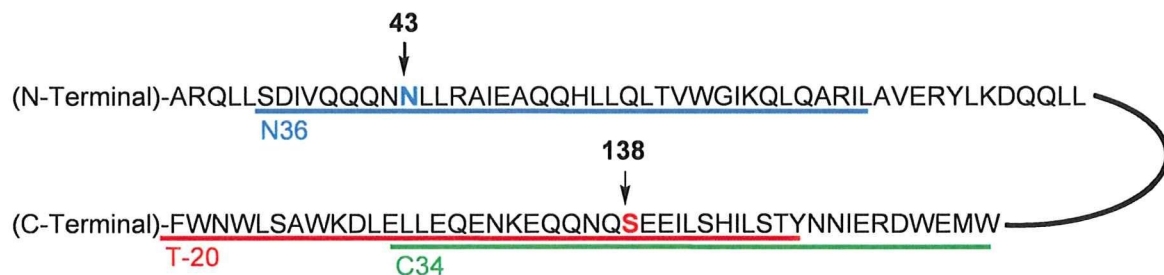


Fig. 1 Amino-acid sequence of gp41

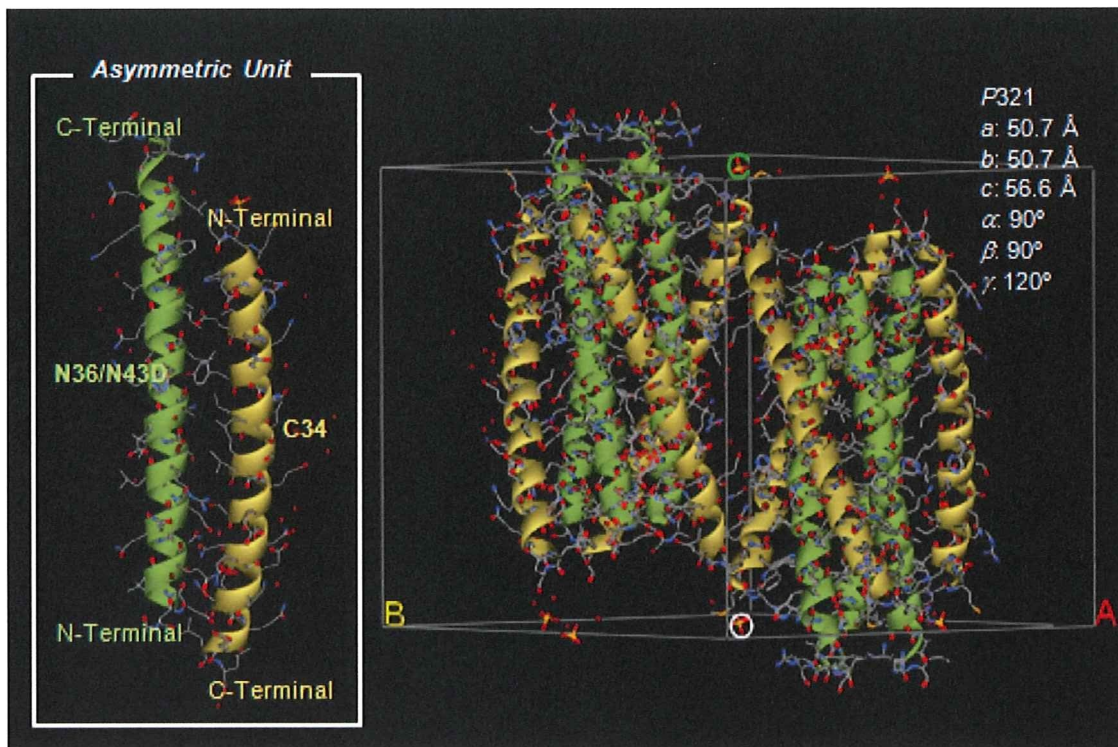


Fig. 2 Crystal structure of N36/N43D·C34 complex

そこで、研究グループでは N36/N43D および C34 の複合体（6-helical bundle 構造）の X 線構造解析を行った。

（倫理面への配慮）

該当事項なし

C. 研究結果

HIV-1 野生株および T-20 耐性株における gp41 の N-領域部分ペプチド（N36/N43D）と C-領域部分ペプチド（C34）を Fmoc 固相合成法により調製し、等量の各ペプチド混合条件下、共結晶化実験を行った。その結果、N36/N43D と C34 との複合体の結晶を得ることに成功した。得られた結晶について X 線構造解析を行ったところ、Fig. 2 に示すように N36/N43D と C34 が 3:3 の比で結晶構造を構成しており、互いのペプチドが逆平行型に相互作用していた。そして、空間群 *P321* の対称性により、結晶格子内に 6-helical bundle 構造が二組存在していた。T-20 耐性変異部位に着目すると、Asp43 は、Arg46 と塩橋を形成し、Glu137 とは水分子を介した水素結合により連結していた (Fig. 3)。

D. 考察

これまでに構造解析された HIV-1 野生株

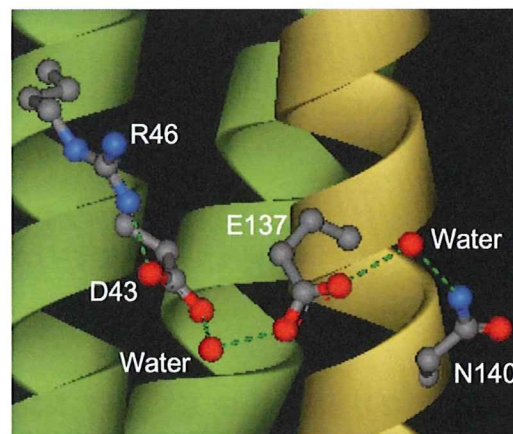


Fig. 3 Highlight view around Asp43 in the crystal structure of N36/N43D·C34

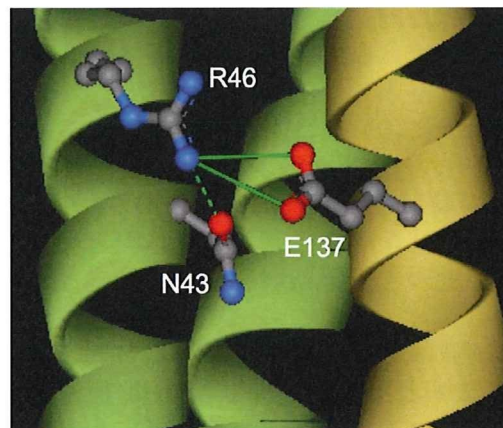


Fig. 4 Highlight view around Asn43 in the crystal structure of N36·C34

における 6-helical bundle 構造 (N36-C34) 中では、N-領域にある Arg46 と C-領域にある Glu137 が塩橋を形成しており、さらに N-領域にある Asn43 が Arg46 と水素結合している (Fig. 4)。Asn43 は Glu137 と近接しているため、Asn43 の Asp への変異は N-領域と C-領域との間に静電反発を生じさせ、6-helical bundle 構造形成を阻害すると推察される。構造解析の結果、Fig. 3 が示すように、Glu137 の側鎖が構造変化を起こし、水分子を介した水素結合により Asp43 と結合していたが、静電反発は遠距離まで働く相互作用であることから、N-領域と C-領域との親和性は弱まっていることが示唆された。すなわち、N-領域にある Asn43 の Asp への変異は、T-20 と N-領域との複合体 (6-helical bundle 構造) 形成を阻害し、T-20 耐性を獲得すると考えられる。また、C-領域部分ペプチドの 137 位の構造最適化により、T-20 耐性株に対する阻害活性を回復する新規膜融合阻害剤創製の可能性が示唆された。

E. 結論

T-20 耐性変異を有する N-領域部分ペプチドである N36/N43D と C-領域部分ペプチドである C34 との共結晶を作成し、X 線構造解析により構造決定した。この構造情報から、Asn43 が Asp にアミノ酸変異した際の T-20 耐性獲得メカニズムが原子レベルで明らかになった。

1 - 2 . T-20 耐性株由来 gp41 N36/ C34-S138A 複合体の構造解析と新規膜融合阻害剤探索系の確立 (平成 20 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

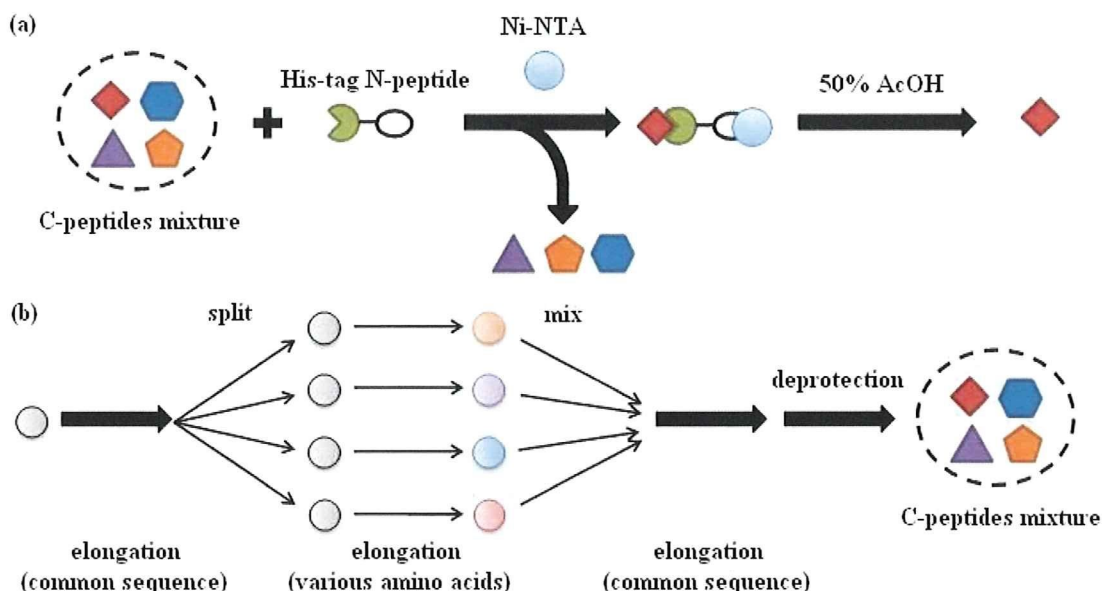


Fig. 1. (a) Screening of HIV/cell fusion inhibitors by pull-down assay. (b) Preparation of C-peptides mixture by split and mix synthesis.

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

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.

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

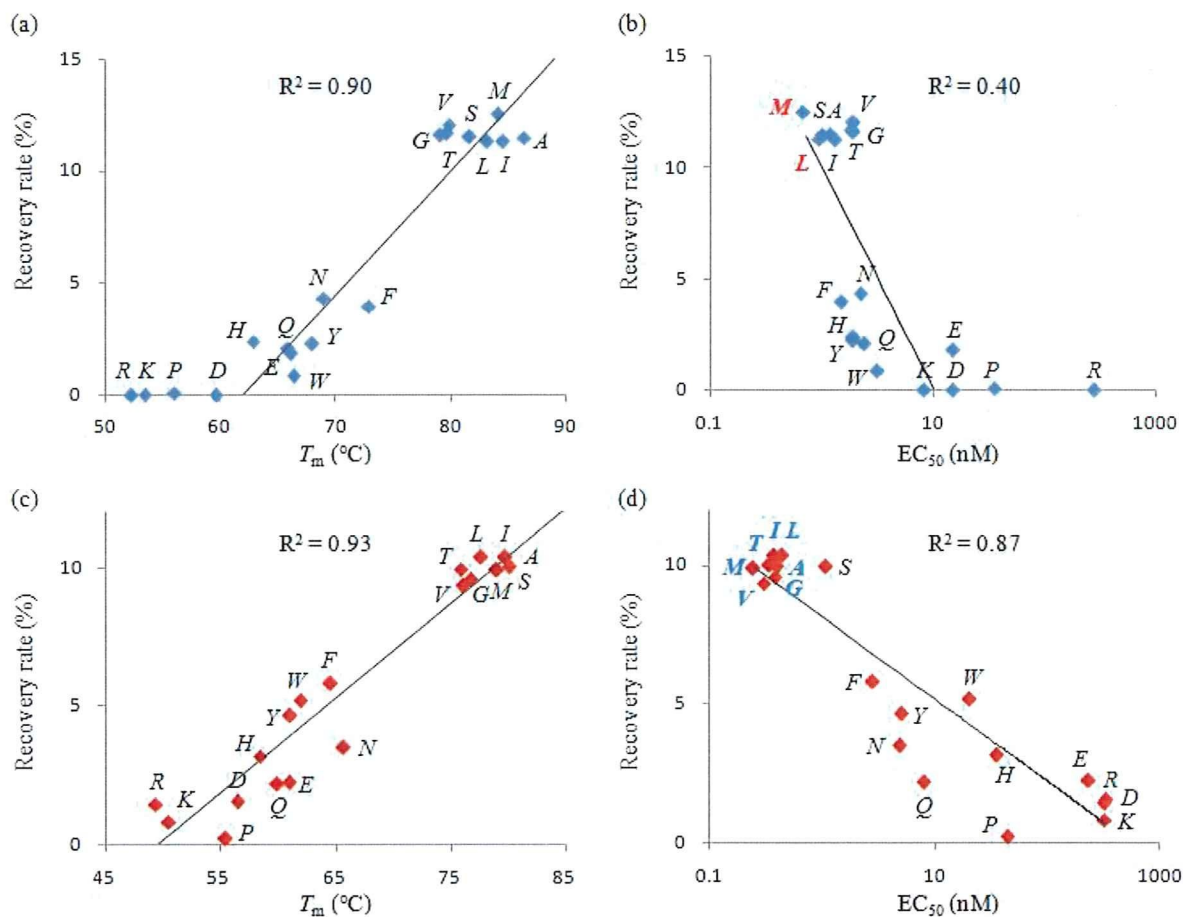


Fig. 2. Correlation between the recovery rate and the thermal stability, or the anti-HIV activity. (a, b) SC35EK_{S138X} (c, d) T-20EK_{S138X}.

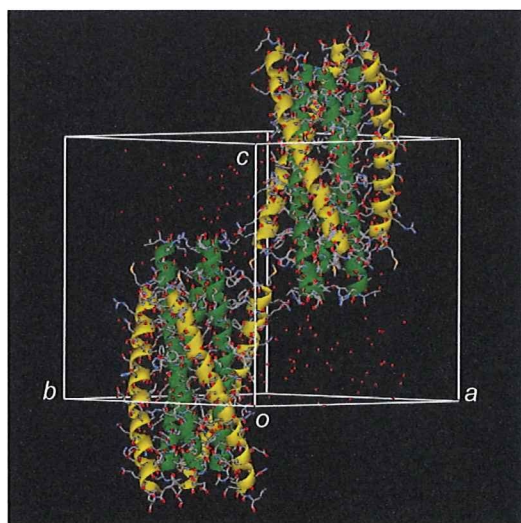


Fig. 3. Crystal structure of the N36/C34_{S138A} complex. N36 and C34_{S138A} helices are colored green and yellow, respectively. The crystal was indexed to space group $P321$ with unit cell dimensions of $a = b = 49.09 \text{ \AA}$, $c = 56.40 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, and $\gamma =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

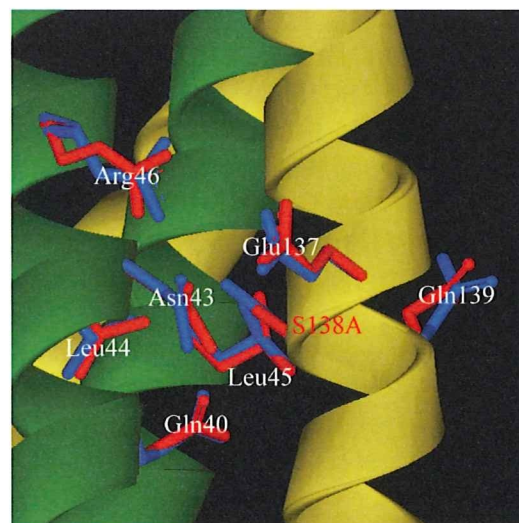


Fig. 4. Superposition of the crystal structure of the N36/C34 complex with that of the N36/C34_{S138X} complex. N36 and C34_{S138X} (X = S or A) helices are colored green and yellow, respectively. In Addition, the stick model side-chains of N36/C34 and N36/C34_{S138A} are colored blue and red, respectively.

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 (Table 2)。

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_{vdW}	-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.

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。

1 - 3. 膜融合阻害剤の非ペプチド化研究 (平成 20 年度)

A. 研究目的

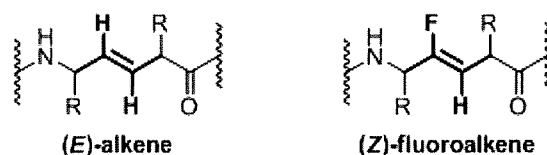
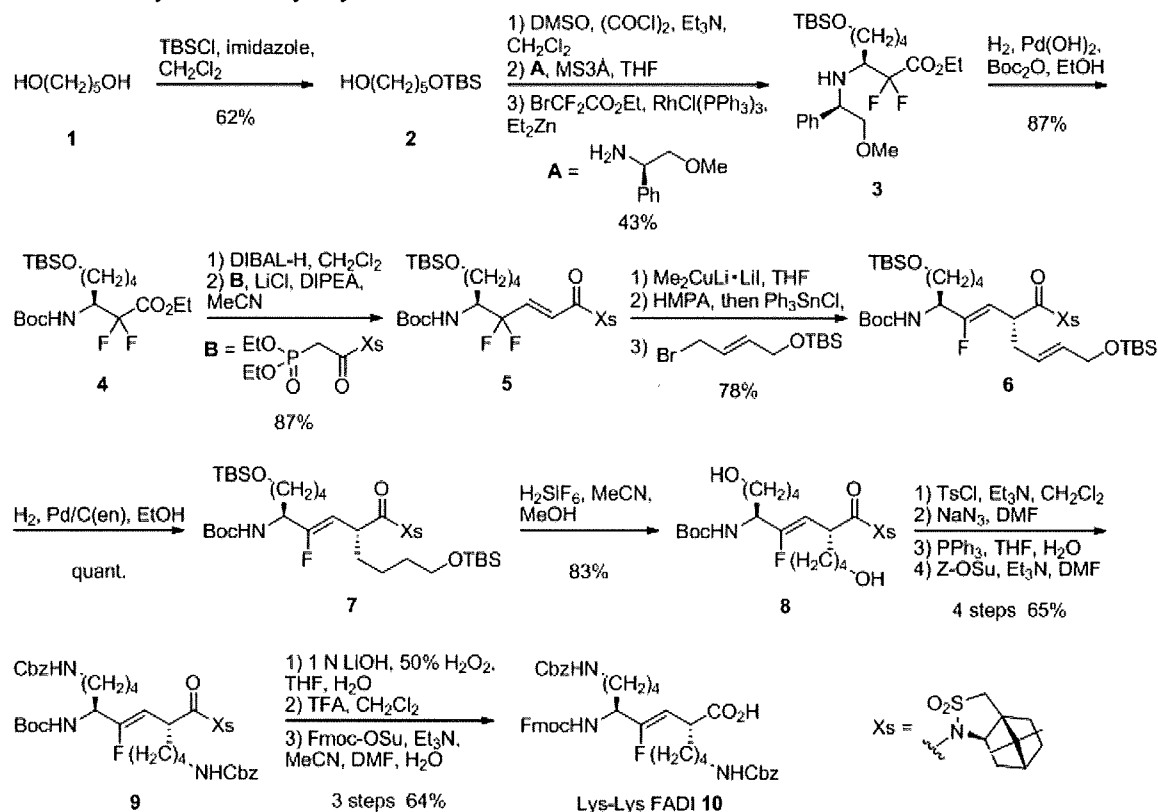


Fig. 1. Structures of EADI and FADI.

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. 1)。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

Scheme 1. Synthesis of Lys-Lys FADI



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する影響などの機能評価もほとんどなされていない。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。

B. 研究方法

X-EE-XX-KK モチーフの Lys-Lys に相当する FADI や EADI を化学合成し、Fmoc 固相合成法で SC29EK に導入した。そして、 α ヘリックス構造形成を CD スペクトル測定により、抗 HIV 活性発現に重要な 6-helix bundle 構造形成を T_m 値測定により、抗 HIV 活性を MAGI アッセイにより、それぞれ評価した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

Lys-Lys 型 FADI 10 の合成を Scheme 1 に示す。まず、市販の 1,5-pentanediol 1 を出発物質として、一方の水酸基を TBS 基で保護

したアルコール 2 に対し、Swern 酸化、不斉補助基 A を用いた Reformatsky-Honda 型の反応によりアミン 3 を中程度の収率で得た。続いて Boc₂O 存在下、接触還元によりキラル補助基を除去して Boc 体 4 とし、DIBAL 還元、Oppolzer 型不斉補助基を有するホスホネート B との Horner-Wadsworth-Emmons 反応によってエノン 5 を得た。エノン 5 を、有機銅試薬を用いたジアステレオ選択的一電子還元-アルキル化に付すことにより、単一の異性体として α -アルキルサルタム 6 を得た。Pd/C-エチレンジアミン複合体により側鎖アルケンを選択的に還元した後、TBS 基の脱保護、水酸基のアジドを経由した Cbz 保護アミン 9 への変換、次いで不斉補助基の除去、Boc 基の Fmoc 基への変換により目的の FADI 10 を合成した。

続いて Lys-Lys 型 EADI 19 の合成を Scheme 2 に示す。Boc-Lys(Cl-Z)-OH 11 から誘導したアリルアルコール 13 の分子内光延反応によりビニルアジリジン 14 を得た。続いてオゾン酸化、ホスホネート C との Horner-Wadsworth-Emmons 反応によってアジリジンエノエート 15 へと誘導した。アジリジンエノエート 15 に対する *anti*-S_N2' 反応によって側鎖を導入し、 β,γ -不飽和エステル 16 を得た。続いて TBS 基の脱保護、

Scheme 2. Synthesis of Lys-Lys EADI

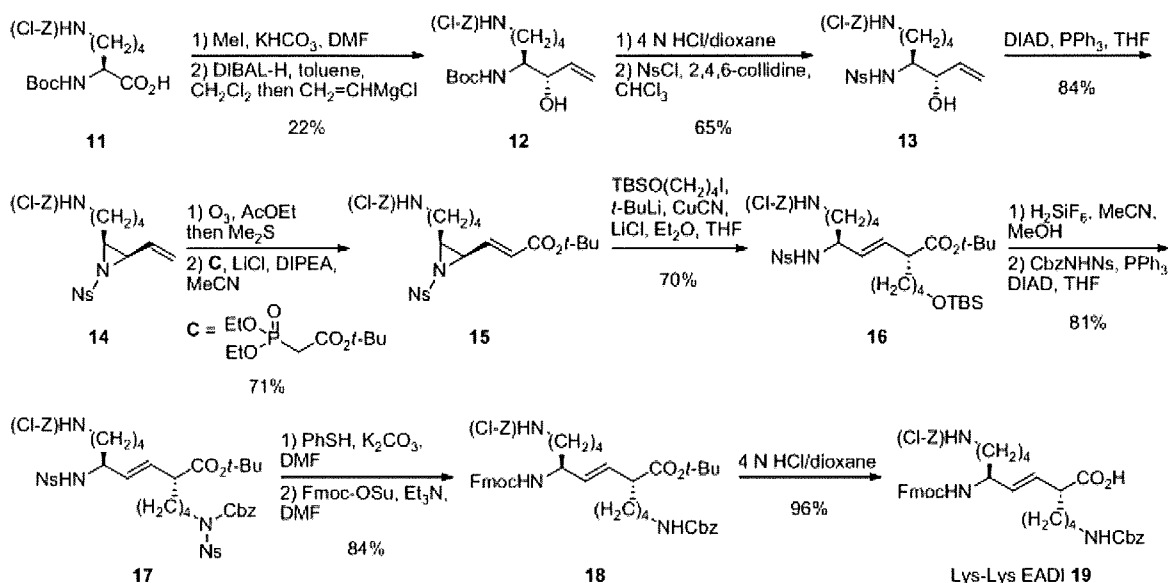


Table 3. Sequences of SC29EK and its derivatives

Peptide	Sequence ^a	
SC29EK	<u>W</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>N</u>	
SC29EK-F1	SC29EK-E1	<u>W</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>N</u>
SC29EK-F2	SC29EK-E2	<u>W</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>N</u>
SC29EK-F3	SC29EK-E3	<u>W</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>N</u>
SC29EK-F4	SC29EK-E4	<u>W</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>N</u>

^a Underlined residues indicate Lys-Lys FADI or EADI.

光延反応による水酸基の保護アミンへの変換で **17** へと誘導した後、Ns 基の脱保護、Fmoc 化、*t*-Bu 基の除去により、目的の EADI **19** を合成した。

SC29EK の 4 か所の Lys-Lys 部位に FADI、EADI を導入した誘導體、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 (Table 1)。

合成した一連の SC29EK 誘導體に対する CD スペクトル測定の結果、SC29EK の Lys-Lys 部位への FADI や EADI の導入は α ヘリックス性の低下をもたらした (Fig. 2)。

SC29EK 誘導體の 6-helix bundle 構造形成能を調べるため、N-領域部分ペプチド N36 との複合体の T_m 値を測定した結果 (Table 4)、FADI および EADI の導入部位が N-末端側に近づくにつれ N36 との結合親和性が低下することが明らかとなった。FADI と EADI との比較においては SC29EK 配列中央部に導入した場合 (SC29EK-F3 および -E3) において顕著な差が認められた。

また、一連の誘導體の抗 HIV 活性を

MAGI アッセイにより評価した (Table 2)。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 含有誘導體は対応する EADI 含有誘導體より強力な抗 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。

Table 2. Thermal stability of 6-helix bundle structures consisting of N36 and SC29EK derivatives

Peptide	T_m (°C)		
	FADI	EADI	
SC29EK	67.4		
SC29EK-F1	SC29EK-E1	64.8	64.1
SC29EK-F2	SC29EK-E2	60.9	62.2
SC29EK-F3	SC29EK-E3	49.5	40.1
SC29EK-F4	SC29EK-E4	44.1	43.9

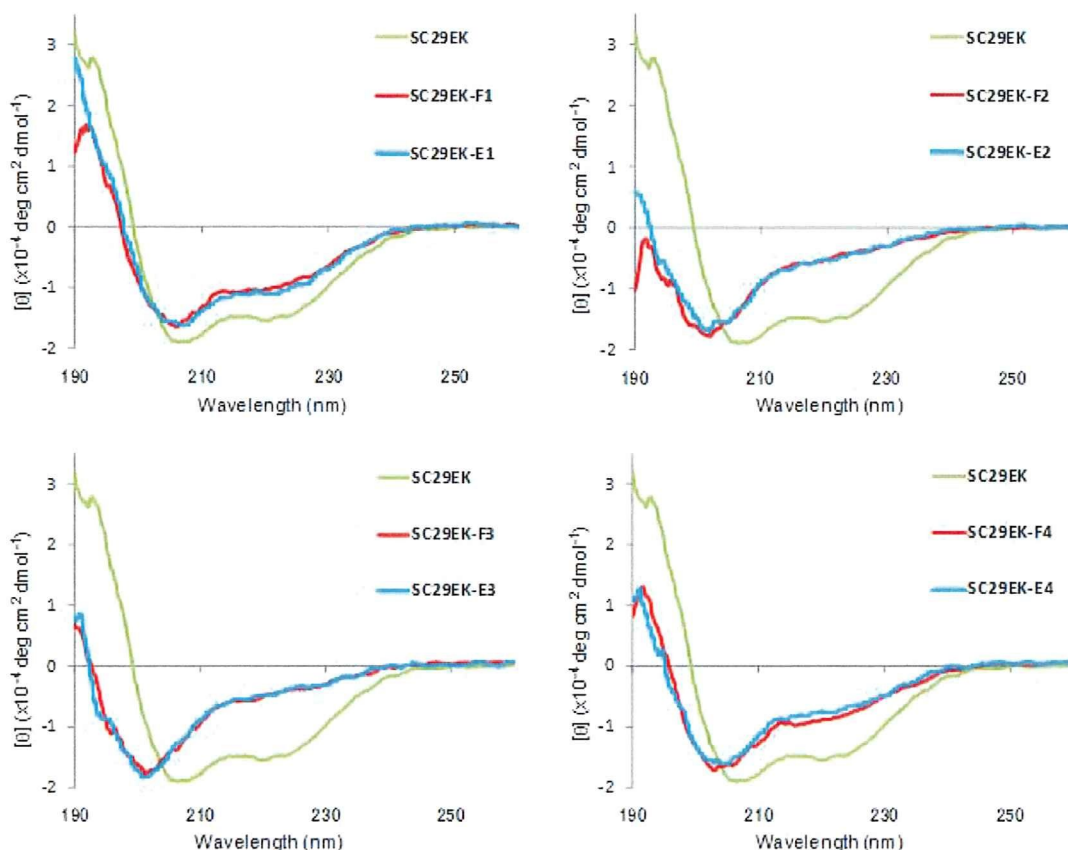


Fig. 2. CD spectra of SC29EK and its derivatives.

Table 3. Anti-HIV activity of SC29EK and its derivatives against HIV-1 NL4-3 strain

Peptide	EC ₅₀ (nM) ^a	
	FADI	EADI
SC29EK	2.2 ± 0.2	
SC29EK-F1, -E1	37 ± 6	43 ± 7
SC29EK-F2, -E2	663 ± 242	865 ± 317
SC29EK-F3, -E3	599 ± 96	> 10000
SC29EK-F4, -E4	5216 ± 202	> 10000

^a EC₅₀ was determined as the concentration that blocked HIV-1 replication by 50%.

D. 考察

SC29EK の Lys-Lys 部位への FADI および EADI の導入により α ヘリックス性が低下したことから、FADI および EADI は α ヘリックス構造形成に関与するペプチド主鎖の水素結合を十分に模倣できていないと考えられる。また、FADI および EADI の導入部位が N-末端側に近づくにつれ N36 との結合親和性を低下させたことから、その部位のペプチド結合が N36 との相互作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。

FADI および EADI の導入部位が N-末端側に近づくにつれ抗 HIV 活性が減弱していたが、全ての導入部位において FADI 含

有 SC29EK が EADI 含有 SC29EK よりも高い抗 HIV 活性を示した。このことから、FADI の導入は EADI の導入と比較して生理活性 (α ヘリックス) 構造をとるのに有利であり、FADI は EADI よりも優れたペプチドイソスターであることが実証された。

E. 結論

Lys-Lys 型 FADI および EADI をジアステレオ選択的に化学合成し、高活性 HIV-1 膜融合阻害剤 SC29EK の X-EE-XX-KK α ヘリックス誘起モチーフに導入した。SC29EK の Lys-Lys 部位への FADI 導入は EADI の導入と同様に α ヘリックス性の低下をもたらし、フルオロアルケンでは α ヘリックス構造に必要な水素結合を十分に模倣できない可能性が示唆された。しかしながら、FADI 置換 SC29EK は EADI 置換 SC29EK と比較して SC29EK の抗 HIV 活性を維持したことから、ペプチド結合のカルボニル酸素 (水素結合アクセプター) を模倣することの重要性が示された。



Fig. 1. Peptide preparation



Scheme 1. Preparation of anti-HIV peptide from fusion proteins

1 - 4. ペプチド性膜融合阻害剤の発現生産プロセスの開発（平成 21 年度）

A. 研究目的

ペプチドを化学合成する際には、側鎖や末端の化学修飾が可能である半面、大量の有機溶媒を必要とするために環境負荷が高く、高コストであるといった問題点がある。一方、遺伝子組換え技術を応用した場合には、有機溶媒等は必要とせず、培養スケールに応じて必要量の目的ペプチドを得ることが可能になる。しかしながら、異種ペプチドの多くは、融合タンパク質として発現させるために付加配列が残存し、この部分を除去するために高価な酵素を使用することが多い。また、培養により得られたペプチドを修飾することは容易ではなく、N 末端アミノ基・C 末端カルボキシル基となる一般的な非修飾型のペプチドは、*in vivo* においてペプチダーゼにより容易に分解されると考えられる (Fig. 1)。

研究グループでは、SC34EK、SC35EK、T-20EK/S138A の 3 種類の抗 HIV 活性ペプチドについて、組換え技術により目的のペプチドを融合タンパク質として取得後、融合タンパク質から目的のペプチドを切り出すと同時に両末端を環化させることでキャッピング官能基を付与する手法の開発に取り組んだ。(Scheme 1) この方法の特徴は、目的のペプチドの前後にシステイン (Cys) 残基またはメチオニン (Met) 残基を含む 2 残基のペプチド配列を付加するだけで、高価な酵素を必要とせず、比較的マイルドな条件下で反応を行える点にある。さらに、取得後のペプチドには余分な配列が含まれず、両末端を環化させることで *in vivo* での安定性の向上が期待される。

B. 研究方法

まず、化学合成により得られたモデルペプチドにより、Cys または Met を含む 2 残基のペプチド配列を付加した抗 HIV 活性配列の切り出し条件を精査した。次に、大腸菌による組換えタンパク質の発現系を確立し、融合タンパク質を用いて、組換えタンパク質の精製方法、融合タンパク質からの環化型ペプチドの切り出し条件の精査、環化型ペプチドの精製方法等を検討した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

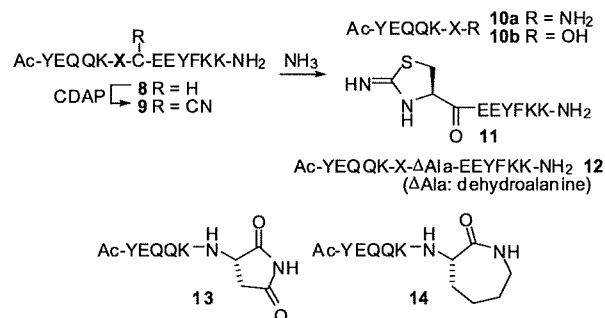
C-1. システインを介する化学的切断

① モデルペプチドを用いたシステインを介する化学的切断法の条件設定

融合タンパク質からのペプチドの切り出し方法として、Cys のチオール基をシアノ化後、塩基処理を行うことで、N 末端にイミノチアゾリジン構造を、C 末端にアミドを形成する反応が知られている。本プロジェクトでは、Cys の 1 残基前の X 位を 19 種類のアミノ酸に置換したモデルペプチドを合成し、X 位のアミノ酸のアミド形成への影響を精査した。この結果、X をリジン (Lys) またはアスパラギン (Asn) とした時、C 末端にリジンラクタムまたはアスパルチミドを有するペプチドが収率よく得られることを見出した (Table 1)。また、S-シアノシステインからの切断とリジンラクタム形成反応を効率的に進行させる塩基性条件について精査し、1 M K_2CO_3 存在下、最も効率よく環化体が見出された。

この条件をもとに、抗 HIV 活性ペプチド

Table 1. Cleavage reaction of *S*-cyanocysteine-containing peptides **9** by aqueous NH₃^a



X	Conversion (%) ^b	X	Conversion (%) ^b
Gly	50	Ser	68
Ala	62	Thr	71
Val	36	Asp	45
Leu	53	Glu	46
Ile	46	Asn	79 ^c
Pro	42	Gln	65
Met	66	Lys	82 ^d
Phe	63	Arg	71
Tyr	55	His	64
Trp	57		

^a All cleavage reactions were carried out in 3 M NH₃ for 20 min at 20 °C.

^b The conversion yields were calculated based on the combined peak areas of peptides **10a** and **11** by RP-HPLC analysis. ^c Including C-terminal aspartimide product **13** (**10a**:**13** = 53:47). ^d Including C-terminal ϵ -lactam product **14** (**10a**:**14** = 22:78).

の両側に Lys-Cys 配列または Asn-Cys 配列を付加した融合タンパク質をデザインし、融合タンパク質から CDAP によるシアノ化とこれにつづく塩基処理により、N 末端にイミノチアゾリジン構造と C 末端にラクタム環構造を有する抗 HIV 活性ペプチドの調製を試みた。

② チオレドキシシン (TRX) 融合タンパク質からの SC34EK の切り出し

大腸菌で発現、精製した TRX-KKC-SC34EK-KCW および TRX-KNC-SC34EK-NCW を脱塩後、0.5 mM TCEP 存在下、0.1N 酢酸中で 10 mM CDAP と室温 30 分間反応させ、Cys のチオール基をシアノ化した。シアノ化後、脱塩、凍結乾燥し、0.3 M K₂CO₃ 水溶液中で 30 分間塩基処理を行い、融合タンパク質からの切り出しを行った。反応後、RP-HPLC による精製を行い、目的の両末端環化 SC34EK を得た。また、各ステップでの反応生成性を LC-MS 分析に供し、反応生成物を確認・同定した。

TRX 融合 KKC-SC34EK-KCW を用いてシアノ化、切り出しを行った際の LC-MS による解析結果を Fig. 2 に示す。TRX 融合 KKC-SC34EK-KCW (図中 1) は、シアノ化

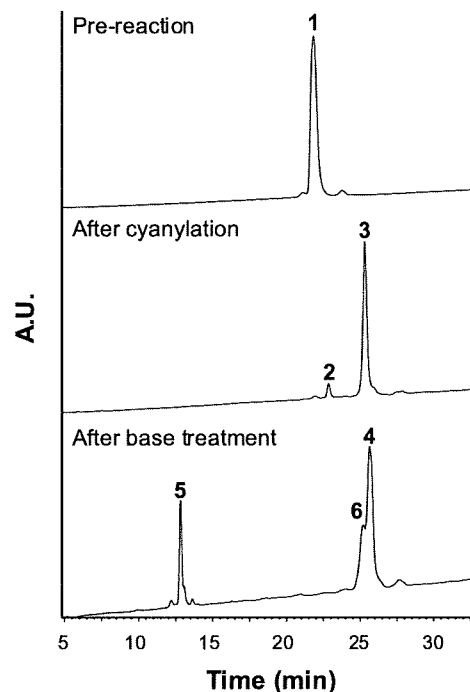


Fig. 2. Chromatogram of reaction products from TRX-fused protein

処理後には 4 つの Cys がすべてシアノ化されたタンパク質 (図中 2) と、2 つの Cys がシアノ化されたタンパク質 (図中 3) が得られた。これらのタンパク質を塩基処理することによって、SC34EK の両末端が環化した cc-SC34EK(K) (図中 5) が得られた。

この結果、TRX-KKC-SC34EK-KCW 6.8 mg から 0.4 mg の cc-SC34EK(K) (収率 24%) を、TRX-KNC-SC34EK-NCW 6.8 mg から 0.3 mg の cc-SC34EK(N) (収率 21%) を得た。それぞれ 1 L の培養液から、4.8 mg および 3.3 mg の目的ペプチドが得られた。

③ TRX 融合タンパク質からの SC35EK の化学処理による切り出し

TRX-KKC-SC35EK-KCW および TRX-K-(C-SC35EK-K)₃-C を 0.5 mM TCEP 存在下、0.1 N 酢酸中で 5 mM CDAP でシアノ化後、脱塩、凍結乾燥し、0.3 M K₂CO₃ 水溶液中で塩基処理により切り出しを行った。さらに、TRX-K-(C-SC35EK-K)₃-C については、シアノ化の際の条件を検討し、7 M 尿素 (変性剤) 存在下でも反応を行った。反応後、RP-HPLC による精製を行い、cc-SC35EK(K) を得た。この結果、TRX-KKC-SC35EK-KCW 6.4 mg から 0.2 mg

のcc-SC35EK(K) (収率15%)を得た。また、TRX-K-(C-SC35EK-K)₃-C 7.7 mgからは0.4 mgのcc-SC35EK(K) (収率10%)を得、尿素存在下で反応を行った場合には、5.1 mgから0.3 mgのcc-SC35EK(K) (収率14%)を得た。それぞれ1 Lの培養から、2.8 mg、3.7 mg、5.1 mgの目的ペプチドが得られた。

④ TRX 融合タンパクからの T-20EK/S138A の化学処理による切り出し

cc-T-20EK/S138A(K) および cc-T-20EK/S138A(N)への切り出し条件を精査し、収率を算出した。精製・脱塩したTRX-FKC-T-20EK/S138A-KCY および TRX-FNC-T-20EK/S138A-NCYを、0.5 mM TCEP存在下、0.1 N酢酸中で5 mM CDAPでシアノ化後、脱塩、凍結乾燥し、0.1 M K₂CO₃水溶液中で塩基処理を行い、融合タンパクからの切り出しを行った。反応後、RP-HPLCによる精製を行い、目的の両末端環化T-20EK/S138Aを得た。この結果、TRX-FKC-T-20EK/S138A-KCW 5.4 mgから0.2 mgのcc-SC34EK(K) (収率11%)を、TRX-FNC-T-20EK/S138A-NCY 11.3 mgから0.6 mgのcc-T-20EK/S138A(N) (収率32%)を得た。それぞれ1 Lの培養から、1.3 mgおよび6.7 mgの目的ペプチドが得られた。

C-2. メチオニンを介する化学的切断

① モデルペプチドを用いたメチオニンを介する化学的切断法の条件設定

融合タンパクからのペプチドの切り出し方法として、Met 残基のチオエーテル基を70%ギ酸中で臭化シアンと作用させ、メチオニン残基での切断とC末端のホモセリンラクトン (Hsl) の形成を行う反応は、古くから知られていた。本プロジェクトでは、目的ペプチドの両末端が環化構造をとるように、Met 残基の前にグルタミン (Gln) を配置し、上記の反応と平行して、Gln がピログルタミン酸 (pGlu) へ環化する条件をモデルペプチド MQ-SC7EK-MQ を用いて精査した。反応溶媒についても検討した結果、還元剤である TCEP 存在を加えることで、これまで一般的に用いられてきた毒性の高いギ酸中だけでなく、0.1M 塩酸や0.1M TFA などの強酸希薄溶液中においても、反応が進行する条件を見出した。

この条件をもとに、抗 HIV 活性ペプチドの両側に Met-Gln 配列を付加した融合タンパク質をデザインし、融合タンパク質から

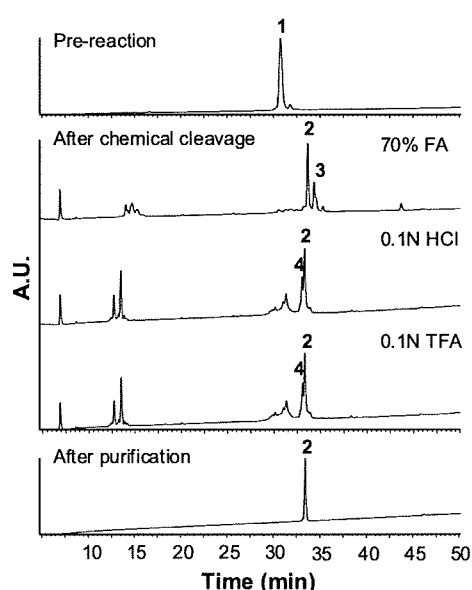


Fig. 3. Chromatogram of reaction products from His tag fused protein.

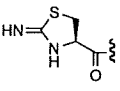
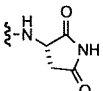
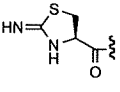
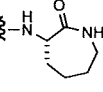
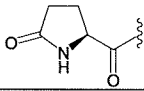
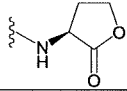
臭化シアンによる切り出しと Gln の pGlu への環化を行い、N 末端に pGlu と C 末端に Hsl を有する抗 HIV 活性ペプチドの調製を試みた。

② Hisタグ融合タンパクからのSC35EKの化学処理による切り出し

Hisタグ融合MQ-SC35EK-MQを用いて、化学処理によるタンパク質からの抗HIV活性ペプチドの回収を試みた。大腸菌で発現・精製したHisタグ融合MQ-SC35EK-MQを、Met残基に対して100当量のBrCNと10当量のTCEP存在下、70%ギ酸、0.1 N塩酸、0.1 Nトリフルオロ酢酸 (TFA) 中でそれぞれ60°C、2時間反応させ、タグタンパク質からの切り出しと、N末端のGlnのpGluへの環化を行った。反応後、RP-HPLCによる精製を行い、目的のpGlu-SC35EK-Hslを得た。また、各ステップでの反応生成性をLC-MS分析に供し、反応生成物を確認・同定した。

Hisタグ融合MQ-SC35EK-MQを用いて、各酸溶媒中で切り出しを行った際のLC-MSによる解析結果をFig. 3に示す。Hisタグ融合MQ-SC35EK-MQ (図中1) は、いずれの酸溶媒を用いた場合にも、目的のpGlu-SC35EK-Hsl (図中2) が主生成物として得られた。一方、70%ギ酸を用いた場合には、ホルミル化を受けたpGlu-SC35EK-Hsl (図中3) のピークが確認された。また、0.1N塩酸やTFAを用いた場合には、C末端のHslが開環してホモセリン (Hse) になったpGlu-SC35EK-Hse (図中4)

Table 2. Sequences and anti-HIV activity of N- and C-terminally capped SC34EK and SC35EK analogs.

peptide	R ¹	R ²	EC ₅₀ (nM) ^a	T _m (°C)
SC34EK	Ac	NH ₂	0.60 ± 0.10	71.2
SC34EK	H	OH	0.68 ± 0.11	-
SC34EK			0.48 ± 0.13	71.0
SC34EK			0.58 ± 0.24	71.0
SC35EK	Ac	NH ₂	0.50 ± 0.16	75.8
SC35EK	H	OH	2.43 ± 0.22	62.5
SC35EK			0.57 ± 0.24	73.6

^aEC50 was determined as the concentration that blocked HIV-1 replication by 50% in a MAGI assay.

のピークが確認された。

この結果、70%ギ酸、0.1 N 塩酸、0.1 N TFA で溶出した His タグ融合 MQ-SC35EK-MQ から、それぞれ 10.4 mg (収率 16.6%)、7.8 mg (収率 15.2%)、8.7 mg (収率 14%) の pGlu-SC35EK-Hsl が得られた。

③ タンデム型Hisタグ融合タンパクからのSC35EKの化学処理による切り出し

Hisタグ融合M-(Q-SC35EK-M)₃-QからのpGlu-SC35EK-Hslの切り出し条件を精査し、収率を算出した。70%ギ酸、0.1 N塩酸、0.1 N TFA で溶出した His タグ融合 MQ-SC35EK-MQをMet残基に対して100当量のCNBrと10当量のTCEP存在下、それぞれ60°C、2時間反応させ切り出しを行った。反応後、RP-HPLCによる精製を行い、目的のpGlu-SC35EK-Hslを得た。また、各ステップでの反応生成物をLC-MSに供し確認・同定した。この結果、70%ギ酸、0.1 N塩酸、0.1 N TFAで溶出したHisタグ融合M-(Q-SC35EK-M)₃-Qから、それぞれ1.7 mg (収率7.9%)、2.8 mg (収率12.4%)、2.0 mg (収率8.9%) のpGlu-SC35EK-Hslが得られた。

C-3. 化学的切断法により得られる両末端環状型膜融合阻害剤の抗 HIV 活性評価

組換えタンパク質から調製する抗 HIV 活性ペプチドは、血中での安定性向上を目

的としたエンドキャップ構造が付与されるように設計されている。これらのペプチドの抗 HIV 活性を、化学合成により調製した標品を用いて MAGI アッセイで評価し、HIV-1(NL4-3)の感染を 50%阻害する濃度 (50% effect concentration) として算出した (Table 2)。いずれも強力な抗 HIV 活性が認められ、両末端の構造が抗 HIV 活性に影響しないことが確認できた。

D. 考察

ペプチド性膜融合阻害剤は、従来、固相合成法と液相合成法を組み合わせ化学合成により生産が行われてきた。このため生産に関わる費用が著しく高く、治療薬供給コストが高い原因の1つとなっている。

本法では、アミノ酸原料の化学修飾を必要としない発現生産プロセスによりペプチド鎖を伸長後、化学的処理により抗 HIV 活性配列のみを獲得するという点で、ペプチド合成のためのステップを短くできる利点がある。また、得られたペプチドは、その N 末端側と C 末端側の両方に環状構造からなる修飾基を有し、血中に存在するエキソペプチドダーゼによる分解を回避することが可能である。さらに、形質転換に用いるオリゴ DNA を変えることにより前年度までの研究において得られた薬剤耐性株のアミノ酸変異を導入したペプチドが簡便に合成可能であることから、次々に出現しうる