

蛍光性 diacylglycerol-lactone 誘導体の合成と機能評価

Synthesis and Evaluation of Fluorescent Diacylglycerol-lactone Derivatives

○大橋南美¹⁾、奥田善章^{1,2)}、野村 渉¹⁾、堤 浩¹⁾、芹澤雄樹¹⁾、伊倉貞吉²⁾、伊藤暢聡²⁾、
吉田清嗣³⁾、Nancy E. Lewin¹⁾、Peter M. Blumberg¹⁾、玉村啓和^{1,2)}

Nami Ohashi,²⁾ Yoshiaki Okuda,^{1,2)} Wataru Nomura,¹⁾ Hiroshi Tsutsumi,¹⁾ Yuki Serizawa,¹⁾
Teikichi Ikura,²⁾ Nobutoshi Ito,²⁾ Kiyotsugu Yoshida,³⁾ Nancy E. Lewin,⁴⁾ Peter M. Blumberg,⁴⁾
Hirokazu Tamamura,^{1,2)}

¹⁾ 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所、²⁾ 東京医科歯科大学・疾患生命科学研究部、
³⁾ 東京医科歯科大学・難治疾患研究所、⁴⁾ Laboratory of Cancer Biology and Genetics, Center
for Cancer Research, NCI, NIH

¹⁾ Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²⁾ School of
Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, ³⁾ Medical Research Institute, Tokyo
Medical and Dental University, ⁴⁾ Laboratory of Cancer Biology and Genetics, Center for Cancer
Research, NCI, NIH

Protein kinase C (PKC)は、セリン/スレオニン特異的なリン酸化酵素であり、細胞内シグナル伝達系において重要な役割を果たしている。PKCが持っているC1bドメインは、シグナル伝達系のセカンドメッセンジャーとしてはたらく diacylglycerol (DAG)の結合標的部位である。このC1bドメインは、腫瘍プロモーターの結合部位でもあり、がん治療薬創製のターゲットとして注目されている。

当研究室では、Marquezらによって開発された方法に基づき、天然のリガンドであるDAGの誘導体を環化することにより、DAG- γ -lactone 誘導体を合成している。これらのPKCへの結合活性は、放射性同位体(RI)でラベル化された[20-³H]PDBuをプローブとした競合結合阻害アッセイを用いて評価している。

本研究では、DAG-lactone 誘導体のR₁またはR₂に蛍光基を導入した蛍光性 DAG-lactone 誘導体を合成し、[20-³H]PDBuに代わる競合プローブの開発を行った(Fig.1)。この蛍光性 DAG-lactone が PKC-C1b ドメインとの結合に伴って蛍光変化を生じた(Fig.1a)ので、その結果リガンド候補品の競合的結合を蛍光変化として検出することができた (Fig.1b)。この方法では、RI アッセイでは必要な余剰プローブ除去操作が不要あり、[20-³H]PDBuにかわる有用なスクリーニングプローブとして期待される。

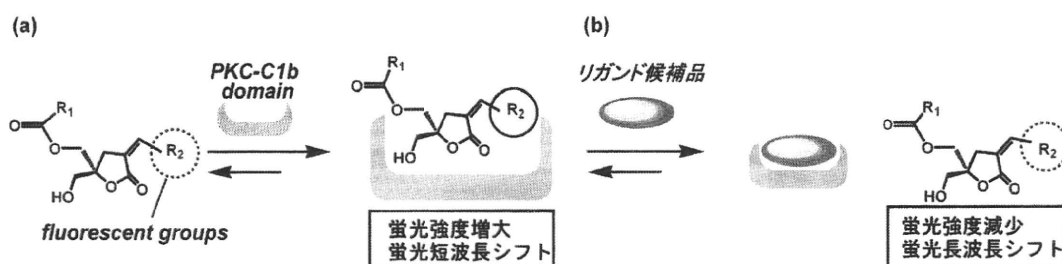


Fig. 1. (a) 蛍光性 DAG-lactone と PKC-C1b ドメインとの結合
(b) 蛍光性 DAG-lactone に対するリガンド候補品の競合的結合

フォワードケミカルジェネティクスを応用した HIV インテグラーゼ阻害剤の創製

Development of HIV Integrase Inhibitors Based on Forward Chemical Genetics

中西 勇太^{1,2)}、堤 浩¹⁾、駒野 淳³⁾、田中 智博¹⁾、中原 徹^{1,2)}、大橋 南美¹⁾、野村 渉¹⁾、山本 直樹³⁾、○玉村 啓和^{1,2)}

Yuta Nakanishi,^{1,2)} Hiroshi Tsutsumi,¹⁾ Atsushi Komano,³⁾ Tomohiro Tanaka,¹⁾ Toru Nakahara,^{1,2)}
Nami Ohashi,¹⁾ Wataru Nomura,¹⁾ Naoki Yamamoto,³⁾ ○Hirokazu Tamamura,^{1,2)}

¹⁾東京医歯大・生材研、²⁾東京医歯大・疾患生命、³⁾国立感染研・エイズ研

¹⁾Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²⁾School of Medical Science, Tokyo Medical and Dental University, ³⁾AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

AIDS 治療薬としては逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤を 2, 3 剤併用する療法 HAART が成果をあげているが、耐性ウイルスの出現や副作用などの問題により新規の阻害機序を持つ薬の開発が急務となっている。そういった中で、膜融合阻害剤やコレセプター CCR5 の阻害剤、インテグラーゼ阻害剤等も登場してきており、抗エイズ薬のレパートリーは年々着実に増えてきおり、これらはエイズ患者の延命効果に貢献すると思われる。これまで開発されてきた抗エイズ薬はターゲット設定型の創薬研究で生まれたものがほとんどである。そこで我々は、今までの概念を全く切り換えて、フォワードケミカルジェネティクスを活用し、ランダムライブラリーから目的活性を持った化合物、すなわち抗エイズ薬を見つけるという手法を応用した。その結果、今回ペプチド性インテグラーゼ阻害剤を HIV の遺伝子産物から見出すことに成功した。

我々は、HIV 遺伝子産物であるタンパク質由来のアミノ酸配列をもとにしたオーバーラッピングペプチドライブラリー（アミノ酸 10~17 残基）から、*in vitro* において阻害活性を有する化合物を探索した。その結果、HIV 自身が有するアクセサリータンパク質である Vpr 由来の部分ペプチドライブラリーからインテグラーゼ阻害ペプチドを同定した。そこで、インテグラーゼは細胞内で作用するので、これらのペプチドに細胞膜透過モチーフペプチドである octa-arginine を付加することで細胞膜透過性を付与させ、cell を用いた抗 HIV 活性の検討も行った結果、HIV 複製を抑制した。今回はさらにアミノ酸置換を含む構造活性相関によりさらに高活性ペプチドを得ることができた。このペプチドは新たな抗 HIV 治療薬のリード化合物として期待できる。

新規タグプローブシステムの開発と タンパク質蛍光イメージングへの応用

Development and Application of a New Tag-Probe System for the Fluorescent Imaging of Proteins

○堤 浩¹・阿部 清一郎^{1,2}・蓑 友明^{1,2}・野村 渉¹・玉村 啓和^{1,2}

○Hiroshi Tsutsumi¹, Seiichiro Abe^{1,2}, Tomoaki Mino^{1,2}, Wataru Nomura¹, Hirokazu Tamamura^{1,2}

東京医科歯科大学¹ 生体材料工学研究所² 大学院疾患生命科学部

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) に代表される蛍光プローブは、細胞中のタンパク質を蛍光イメージングするためのツールとして非常に有用である。近年、遺伝子工学的に標的タンパク質にタグとなるペプチドあるいはタンパク質を付加し、タグ特異的に結合する蛍光性プローブ分子を用いて標的タンパク質を蛍光ラベル化する方法が新たに提唱され、さまざまなタグプローブ分子ペアの開発が精力的に行われている。これらのタグプローブペアは、翻訳後の任意の時間に種々の蛍光プローブ分子を作用させることにより標的タンパク質の時空間的な「染め分け」を可能とすることから、パルスチェイス実験などにおいて有用なツールとなると期待されている。我々は、これまでにロイシンジッパーペプチドの特性を利用し、タグとの結合に伴ってプローブの蛍光波長および蛍光強度が顕著に変化する新規の蛍光変化型タグプローブペア (ZIP タグプローブペア) の開発を行ってきた。ZIP タグプローブペアはループにより連結した逆平行 2 本鎖の α -ヘリックスペプチドタグと、親水/疎水の環境に応答して蛍光波長と蛍光強度が変化する蛍光色素である 4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) を有する 1 本鎖 α -ヘリックスペプチドプローブから構成されている。蛍光滴定実験の結果、この ZIP タグプローブペアは抗原-抗体反応に匹敵する結合親和性を有し、3 本鎖のロイシンジッパー構造を形成したときに NBD がロイシンジッパー構造内部の疎水性コアに選択的に配置されることにより、30 nm 以上の蛍光波長シフトと 18 以上の蛍光強度の増大を示す。これによりタグプローブ複合体と遊離のプローブの識別が容易になり、ZIP タグプローブペアは洗浄操作が不要なタンパク質イメージングツールであると考えられる。本研究では ZIP タグプローブペアを用い、膜タンパク質の一つである CXCR4 の蛍光イメージングに成功したので報告する (図 1)。また、NBD に代わる蛍光色素として 7-Diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid (DEAC) を導入した ZIP タグプローブペアは、結合に伴って 50 倍以上の蛍光強度増大を示すことも明らかとなったので、これらの詳細について本発表であわせて報告する。

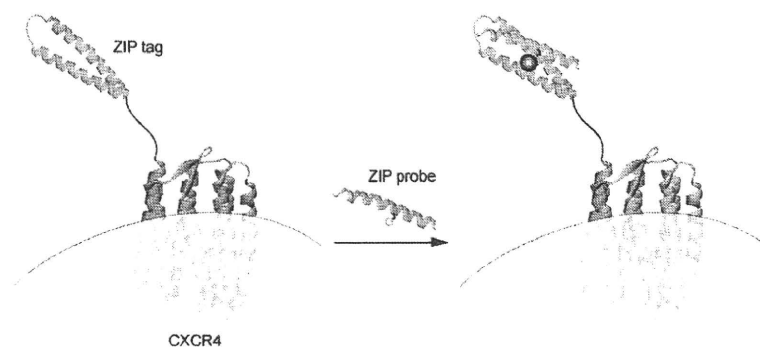


図 1 ZIP タグプローブペアを用いた CXCR4 の蛍光イメージング

P-6 遺伝子機能制御に向けたプログラム可能な DNA メチル化酵素の創製 Development of a programmable DNA methylase toward targeted gene silencing

○野村 渉¹・増田 朱美^{1,2}・奥田 毅^{1,2}・Carlos F. Barbas, III³・玉村 啓和^{1,2} (1 東京医科歯科大・生体材料工学研究所, 2 東京医科歯科大・疾患生命研, 3 Dept. Mol. Biol., The Scripps Res. Inst.)
○Wataru Nomura¹, Akemi Masuda^{1,2}, Tsuyoshi Okuda^{1,2}, Carlos F. Barbas, III³, Hirokazu Tamamura^{1,2} (1 Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Med. Dent. Univ., 2 School of Biomed. Sci., Tokyo Med. Dent. Univ., 3 Dept. Mol. Biol., The Scripps Res. Inst.)

シトシン塩基のメチル化はヒストンの脱アセチル化を促進し、それによってクロマチン構造変化が誘起され、遺伝子発現の抑制を行う。DNA メチル化パターンは細胞の世代間をまたいで再生されるため、DNA のメチル化によって永久的な遺伝子発現の抑制が可能となる。そのため、特定の標的 DNA でのメチル化制御は、その標的遺伝子を抑制するために非常に有効な手段となり得る。これまで、DNA メチル化酵素と亜鉛フィンガーモチーフを融合することで、配列特異的な DNA メチル化を行う試みがなされてきた。しかし、DNA メチル化酵素に由来する DNA 認識能によって、非特異的なメチル化が高い頻度で観察されることが問題であった。

本研究では、酵素ドメインを二分割し、それぞれを亜鉛フィンガードメインとの融合体とする分割型 DNA メチル化酵素をデザインした。この酵素では、各亜鉛フィンガードメインがメチル化標的配列の両端にそれぞれ結合する。それによる近接効果によって酵素ドメインが再会合して標的配列がメチル化されると考えた。構築した分割型酵素を大腸菌内で発現させ、その DNA メチル化機能を HhaI 制限酵素切断、Bisulfite シークエンス法などによって解析した。その結果、標的遺伝子上の CpG 配列のみが高い特異性をもってメチル化されることが明らかになった。

本研究結果は、標的遺伝子配列に特異的な DNA メチル化反応、及び亜鉛フィンガーモチーフによる標的 DNA での酵素ドメインの再会合が *in vivo* で行われた初の例であり、今後の哺乳類細胞内でのメチル化反応への応用が期待される。

キナーゼの細胞内局在機構解明のためのツールとしてのケージド化合物

(¹東京医歯大・生材研、²東京医歯大・院医歯学総合、³Laboratory of Cancer Biology and Genetics, NCI, NIH、
⁴東京医歯大・院生命情報、⁵東京医歯大・難治研、⁶東邦大・理)

○野村 渉¹・芹澤 雄樹^{1,2}・大橋 南美^{1,2}・Nancy E. Lewin³・奥田 善章^{1,4}・鳴海 哲夫¹・吉田 清嗣⁵・Peter
 M. Blumberg³・古田 寿昭^{1,6}・玉村 啓和^{1,2}

Caged molecules as tools for translocation analysis of protein kinases in cell (*Inst. Biomater. Bioeng., Tokyo Med. Dent. Univ.*¹, *Grad. School of Med. and Dent. Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.*², *Lab. Cancer Biol. Genetics, NCI, NIH*³, *School of Biomed. Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.*⁴, *Med. Res. Inst., Tokyo Med. Dent. Univ.*⁵, *Dept. Biomol. Sci., Toho Univ.*⁶)
 NOMURA, Wataru¹; SERIZAWA, Yuki^{1,2}; OHASHI, Nami^{1,2}; Nancy E. LEWIN³; OKUDA, Yoshiaki^{1,4}; NARUMI, Tetsuo¹; YOSHIDA, Kiyotsugu⁵; Peter M. BLUMBERG³; FURUTA, Toshiaki^{1,5}; TAMAMURA, Hirokazu^{1,2}

プロテインキナーゼ C (PKC) はジアシルグリセロール (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。演者らはケージド基で保護した PKC 特異的リガンドを創製し、紫外光照射による PKC 活性化の時間・空間的な制御を試みた。DAG を環化することによって結合活性を上昇させた DAG-ラクトンの重要なファーマコフォアである水酸基を光分解性保護基である 6-Bromo-7-methoxycoumarin (Bmc) または 6-Bromo-7-hydroxycoumarin (Bhc) により保護したケージド DAG-ラクトン誘導体を合成した。ケージド DAG-ラクトンを緩衝液中で紫外光照射し、Bmc 基の脱保護及び DAG-ラクトンの出現を HPLC 分析により確認した。また、その結果から分解反応 (Figure 1A) の量子収率等を算出した。ケージド DAG-ラクトンの PKC δ 活性化能について、試験管内での ³H[PDBu] (ホルボールエステル) との競合阻害活性、リン酸化アッセイ、および CHO-K1 細胞内における GFP 融合 PKC δ の細胞内局在変化 (Figure 1B) によって検討した。その結果、ケージド DAG ラクトンはいずれの場合も PKC δ に対する結合活性および活性化能を持たず、紫外光照射によってケージド基を脱保護した場合においてのみ PKC δ に対する結合活性を出現させ、活性化も行うことが確認された。以上のことから、ケージド DAG-ラクトンへの紫外光照射による脱保護、それに伴う結合活性の回復を用いて PKC δ の活性化を時間・空間的に制御できる可能性が示された。

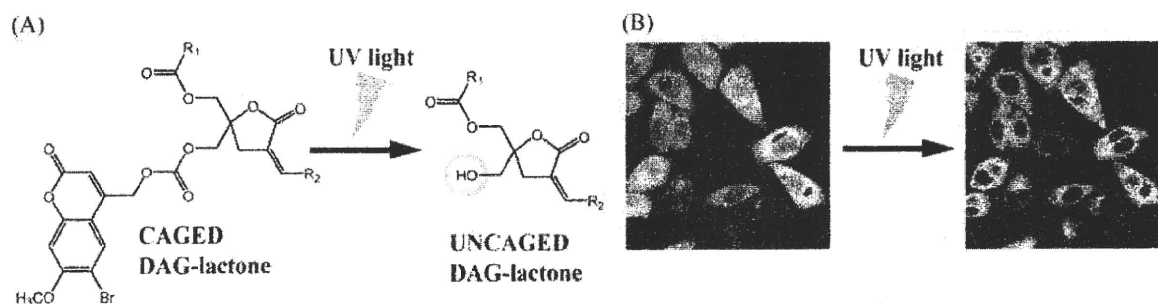


Figure 1. Uncaging of DAG-lactones (A) and activation of translocation (B) by UV irradiation.

Y-06 SYNTHESIS OF AN ANTIGEN PEPTIDE INDUCING NEUTRALIZING ANTIBODIES SPECIFIC TO THE GP41 TRIMERIC FORM

Aki Ohya¹, Toru Nakahara¹, Wataru Nomura¹, Kenji Ohba², Tomohiro Tanaka¹, Chie Hashimoto¹, Tetsuo Narumi¹, Tsutomu Murakami², Naoki Yamamoto², and Hirokazu Tamamura^{1,3}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, ³School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

The antibody therapy of AIDS is a promising treatment. As a new approach for this therapy, artificial antigen molecules were synthesized based on the dynamic structures of envelope proteins during HIV-1 entry. HIV-1 gp41 plays a pivotal role in membrane fusion process of HIV-1 initial infection, and is divided by the N-terminal helix region (N36) and the C-terminal helix region (C34). In membrane fusion process, a six-helical bundle that consists of a trimeric coiled-coil of N36 surrounded by C34 in an antiparallel fashion is formed. Thus, the antibody which recognizes N36 trimer in a structure-specific manner could block HIV-1-entry. To construct a peptidomimetic of N36 trimer, the N36 peptides, which were synthesized by solid-phase peptide synthesis, were assembled on a three-blanced template. The template is C3-symmetric form with three equivalent linkers. The equivalency of linker length is important for the formation of triplet helix which is truly corresponding to a gp41 pre-fusion form. This synthetic approach uses thiazolidine ligation for chemoselective coupling of Cys-containing unprotected N36RE (N36REGC) with aldehyde scaffold-containing three arms, which produces triN36e. The antiserum produced by immunization of an N36 trimeric form antigen showed structural preference in binding to N36

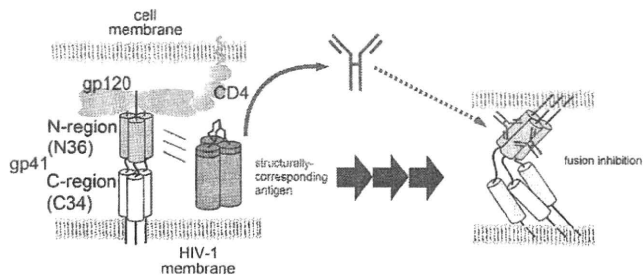


Figure. Development of a structurally corresponding antigen of an HIV-1 protein gp41 and fusion inhibition by induced antibodies specific to gp41 trimer

trimer. Moreover, it was revealed that the antiserum has more potent inhibitory activity against HIV-1 infection than that of N36 monomer. Our results imply an effective strategy of HIV vaccine design based on the correspondence to the native structure of proteins correlated to HIV fusion mechanisms.

O-14 FROM REVERSE TO FORWARD CHEMICAL GENOMICS: DEVELOPMENT OF ANTI-HIV AGENTS

Tomohiro Tanaka¹, Wataru Nomura¹, Tetsuo Narumi¹, Kazuhisa Yoshimura²,
Shuzo Matsushita², Tsutomu Murakami³, Jun Komano³, Naoki Yamamoto³,
and Hirokazu Tamamura^{1,4}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan, ³AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, ⁴School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

Recently, highly active anti-retroviral therapy (HAART), which involves a combinational use of reverse transcriptase inhibitors and HIV protease inhibitors, has brought us a great success in the clinical treatment of AIDS patients. However, HAART has serious clinical problems including the emergence of multi-drug resistant HIV-1 strains. These drawbacks encouraged us to find novel drugs and increase repertoires of anti-HIV agents with various action mechanisms. The recent disclosing of the dynamic supramolecular mechanism in HIV-entry has provided potentials to find a new type of drugs. To date, we have synthesized HIV-entry inhibitors, especially coreceptor CXCR4 antagonists. In addition, protease inhibitors based on a combinatorial design, and CD4 mimics in consideration of synergic effects with other entry inhibitors or neutralizing antibodies have been developed. The development of the above anti-HIV agents is based on the concept of reverse chemical genomics, in which target molecules are fixed. On the other hand, based on the concept of forward chemical genomics, in which active compounds are searched according to the screening of random libraries, effective peptide leads such as integrase inhibitors have been discovered. As such, from a point of view on chemical biology, anti-HIV leads have been found utilizing reverse and forward chemical genomics. Furthermore, antibody-based therapy is still thought to be a promising treatment for AIDS. Thus, peptidic antigen molecules based on artificial remodeling of the dynamic structures of surface proteins in HIV-entry have been synthesized and evaluated for induction of neutralizing antibodies. These anti-HIV agents might be important and useful compounds in consideration of cocktail therapy of AIDS. In addition, the present concept of chemical biology for the development of anti-HIV agents would be essential for drug discovery in medicinal chemistry.

P-087 CAGED DAG-LACTONES FOR STUDY OF CELLULAR SIGNALING IN A SPATIAL- AND TEMPORAL-SPECIFIC MANNER

Wataru Nomura¹, Yuki Serizawa^{1,2}, Nami Ohashi^{1,2}, Yoshiaki Okuda^{1,3}, Tetsuo Narumi¹, Kiyotsugu Yoshida⁴, Toshiaki Furuta^{1,5}, and Hirokazu Tamamura^{1,2,3}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, ²Graduate School of Medical and Dental Sciences, ³School of Biomedical Science, ⁴Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ⁵Faculty of Science, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

Photo-activatable protecting groups have been demonstrated their compatibility in a cell biology field as tools for discovery of physiological functions such as cell signaling. Protein kinase C (PKC) has 11 family members. Our research is focused on PKC δ , which is correlated to diverse diseases such as tumor progression and neurological disorders. This kinase is located on upstream of signaling for cell proliferation or transcription, thus it is difficult to detect the effects of ligand binding in time-resolved ways. It is known that the response to ligand binding could be detected by observing translocation in cytosol. Isozyme-specific ligands must be synthesized in a systematic manner. This structure-activity relationship approach is very powerful strategy for the discovery of optimized ligands, however, the mechanisms of cellular signaling occurred by ligand binding is still unclear. To tackle these problems, photo-activatable groups (6-bromo-7-methoxycoumarin (Bmc) and 6-bromo-7-hydroxycoumarin (Bhc)) were attached to the ligands giving "caged compounds". The synthetic caged molecules showed a 100- to 400-fold decrease in binding affinity for PKC, compared to the corresponding parent compounds. The effects on PKC translocation by the binding of compounds were assessed by confocal laser scanning microscopy. The results indicated that caged compounds have no effects on translocation of PKC and that the translocation occurs after photo-irradiation by specific wave lengths (365 nm for Bmc and

405 nm for Bhc). This method could be applied to detect the signaling which is caused by ligand binding in a spatial- and temporal-controlled manner. The present data could reveal details of cellular signaling correlated to PKC activation.

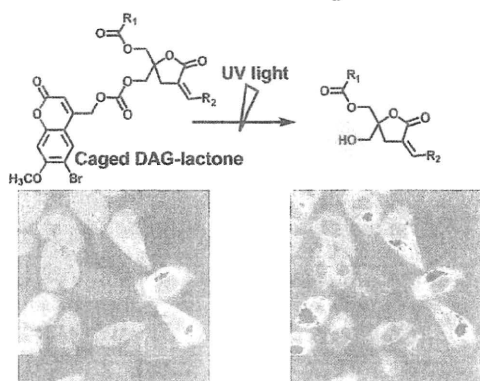


Figure. Schematic representation of photo-triggered uncaging reaction of caged DAG-lactones and translocation of PKC δ upon uncaging.

Nami Ohashi¹, Wataru Nomura¹, Tetsuo Narumi¹, Yoshiaki Okuda^{1,2}, Teikichi Ikura², Nobutoshi Ito², Kiyotsugu Yoshida³, Nancy E. Lewin⁴, Peter M. Blumberg⁴, and Hirokazu Tamamura^{1,2}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²School of Biomedical Science, ³Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan, ⁴Laboratory of Cancer Biology and Genetics, Center for Cancer Research, NCI, NIH, Bethesda, MD 20892, USA.

Protein kinase C (PKC), which is a serine/threonine protein kinase and has 11 isozymes, mediates signal transduction correlated to cell growth, differentiation, apoptosis, etc. Regarding its central roles in cellular signaling, PKC is a promising target for drug discovery. Currently, several PKC-directed drugs are progressed in clinical trials. The PKC activation is triggered by binding of ligands such as diacylglycerol (DAG)/phorbol esters (tumor promoters) to C1 domains. Thus, ligands with high binding affinity could be lead compounds for the drug development. To evaluate ligand binding or to search a new lead compound, two different approaches utilizing fluorescent sensing were developed instead of conventional methods using radioisotops. The first method utilizes the synthetic δ C1b domain derivatives bearing an environmentally responsive fluorescent group (Dansyl). The results indicated that this method could detect ligand binding affinity by change of fluorescent intensity and wavelength shift. The second method involves competitive ligand replacement by a fluorophore-labeled DAG-lactone. The fluorophore is a coumarin derivative, which is also environmentally sensitive. More than 10 compounds were tested to evaluate the compatibility of the above method. The obtained data showed that this detection is correlated to that of radioisotope methods. To evaluate the advantage of fluorescent-utilized methods, multi-well plate assays were performed. The results suggested the fluorescent ligand method could be utilized for screening of new compounds. Take together, the combinational use of these fluorescent-labeling methods would lead to detailed and reliable evaluation of lead compounds for PKC ligands.

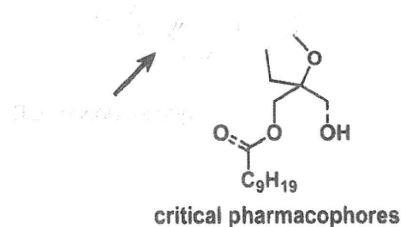


Figure. A fluorescent-labeled DAG-lactone utilized in a competitive ligand replacement method. A green part indicates a fluorescent group and blue circles show the pharmacophore of DAG-lactones.

ペプチドライブラリーを基にした HIV-1 インテグラーゼに対する阻害剤の創製

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

○中西 勇太^{1,2}、中原 徹^{1,2}、鈴木 慎太郎¹、田中 智博¹、大橋 南美¹、堤 浩¹、
鳴海 哲夫¹、野村 渉¹、駒野 淳³、山本 直樹³、玉村 啓和^{1,2}

【背景】

今日、HIV-1 感染者に対する治療薬として、プロテアーゼ阻害剤、逆転写酵素阻害剤、膜融合阻害剤を組み合わせた多剤併用療法 **Highly active anti-retroviral therapy (HAART)** が成果を上げている。しかしながら、薬剤耐性ウイルスの出現や副作用などの問題が残されており、新規の作用機序を持つ治療薬の開発が求められている。

【方法】

新たな標的候補として HIV-1 のライフサイクル中で宿主ゲノム遺伝子に HIV-1 プロウイルス遺伝子を挿入する作用を持つ酵素であるインテグラーゼ (IN) に注目した。HIV-1 の *gag, pol, env, vpu, vpr, rev, tat* 遺伝子産物のアミノ酸配列を基にして合成されたペプチドライブラリーを用いて、IN 阻害活性のあるペプチドのスクリーニングを行った。その結果、Vpr 配列中から IN 阻害ペプチドモチーフを同定し、**octa-arginine motif** を配列に付与することによって培養細胞レベルで HIV-1 複製が抑制されることを実証した。今回はこの配列を基に、更に高い活性を有するペプチドを探索するためにアミノ酸置換による構造活性相関を行った。具体的なアプローチとして (1) LQQLLF モチーフペプチド (野生型 (WT) 配列: Ac-EAIIRILQQLLFIHFRIG·RRRRRRRR-NH₂) 配列中の様々な位置にグルタミン酸 (E)、リジン (K) の組み合わせ (EXXXK 配列) を導入し、2 アミノ酸側鎖間の静電的相互作用によって α ヘリックス性の変化による IN 阻害活性への影響についての検討、(2) アラニンスキャンによる IN との相互作用における重要なアミノ酸残基の検討を行った。(1) では固相合成法によって得られた 7 種類のペプチドについて CD スペクトル測定を行い、アミノ酸配列が α ヘリックス性に与える影響について検討した。また、(2) では LQQLLFIHFRIG 配列のアミノ酸それぞれをアラニンに置換したペプチドを合成し、IN 阻害活性への影響について検討した。また、これらの実験で得られた結果を基に IN とモチーフペプチドの結合様式について検討を行った

【結果・考察】

EK モチーフ導入ペプチドの CD スペクトル測定結果より、EK モチーフの導入によって α ヘリックス性に変化が起こることが明らかになった。この結果を基に阻害活性への影響について検討を行ったが、具体的な相関関係は明かではなかった。しかし、いずれのペプチド配列においても WT 同様の α ヘリックス性が確認され、IN 阻害活性において α ヘリックスモチーフが IN との相互作用に重要であるこ

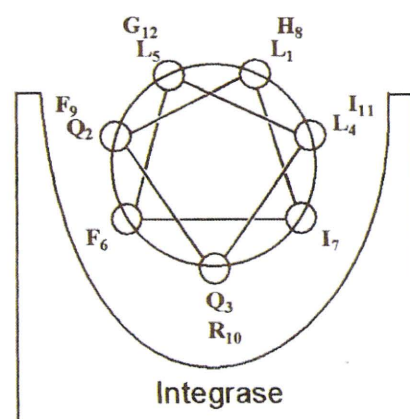


Figure 1. 予測された LQQLLF モチーフペプチドの結合モデル

とが示唆された。次に、INとの相互作用に重要であるアミノ酸残基を決定するためにアラニンスクリーニングの手法を用いて LQQLLFIFHRIG 配列について 1 アミノ酸ずつ置換を行った。その結果、F⁶、I⁷、F⁹、I¹¹ が IN 阻害活性に重要であることが明らかになった。これらの結果を基に Figure 1 で示すようなコンフォメーションで IN と結合している可能性が示唆された。今回同定されたペプチド配列は新たな抗 HIV 治療薬開発のリード化合物として今後構造の固定化や結合部位の同定、非ペプチド化および小分子化による高機能化が期待される。

Development of inhibitors against HIV-1 integrase based on peptide libraries

Yuta Nakanishi^{1,2*}, Toru Nakahara^{1,2}, Shintaro Suzuki¹, Tomohiro Tanaka¹, Nami Ohashi¹, Hiroshi Tsutsumi¹, Tetsuo Narumi¹, Wataru Nomura¹, Jun Komano³, Naoki Yamamoto³, Hirokazu Tamamura^{1,2}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, ³AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

Highly active anti-retroviral therapy (HAART) is frequently adopted as clinical treatment for AIDS or HIV-1-infected patients. HAART has brought us a great success in the chemotherapy of patients by a combination of two or three different agents among reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. However, there still remain several serious problems such as the emergence of the viral strains with multi-drug resistance (MDR), considerable adverse effects and high costs. Thus, development of novel drugs possessing action mechanisms different from the above inhibitors would be currently desirable. As such, we focus on HIV-1 integrase and explore finding of effective compounds with inhibitory activity against integrase.

Previously, we have successfully found inhibitory peptides against HIV-1 integrase, which are identified from the Vpr-derived peptide library by an *in vitro* screening experiment. Then, an octa-arginine sequence was added to Vpr-derived peptides with integrase inhibitory activity to introduce these peptidic inhibitors into cells. These cell-membrane permeable inhibitors exhibited significant inhibitory activity of HIV replication *in vivo*. In this study, we have developed higher potent peptidic inhibitors against the integrase through experiments involving the systematic replacement of amino acids for structure-activity relationship studies, suggesting that these peptides are novel lead compounds of anti-HIV agents.

合成二価型リガンドを用いた CXCR4 二量体構造の解析研究

(¹東京医歯大・生材研、²東京医歯大・疾患生命研) ○田中 智博¹、野村 渉¹、鳴海 哲夫¹、
玉村 啓和^{1,2}

【背景】

CXCR4はG蛋白質共役型受容体(GPCR)ファミリーに属するケモカイン受容体である。CXCR4はエイズやがん転移、関節リウマチなど多くの難治性疾患に関わっていることが知られており、魅力的な創薬標的の一つである。近年、多くの研究からCXCR4の多様な生理活性はホモ・及びヘテロ・二量体化により制御されていることが示唆されている。しかしながら、生細胞中における天然のCXCR4二量体の構造や生理学的意義に関しては未だに解明されていない部分が多い。そこで、本研究ではCXCR4二量体を標的とした新規二価型リガンドを合成し、CXCR4二量体の構造の解析研究を行った。

【方法】

以前、我々は強力なCXCR4アンタゴニストFC131を開発している。そこで、このFC131を種々の長さのリンカーで架橋した二価型FC131誘導体を合成・設計した。リンカーには一定の長さを有する安定なロッド構造を有するポリプロリン(PP)リンカーを選択し、また、PEG修飾型ポリプロリン(PEG-PP)リンカーも併せて合成することで、リンカー構造の柔軟性がCXCR4との結合に与える影響も同時に検討した(Figure 1)。合成した種々の鎖長を有する二価型FC131誘導体の結合活性をCXCR4の内因性リガンドである¹²⁵I-SDF-1αとの競合阻害実験により評価した。

【結果・考察】

これらの合成した15種の二価型FC131誘導体はリンカーの性質に関わらず、リンカー長がある範囲の時に高いCXCR4結合活性を示した。これらの結果はCXCR4二量体におけるFC131結合サイトの距離を示していると考えられ(Figure 2)、今後のCXCR4二量体構造解明や二価型リガンドの創製に有用な知見を与えるものである。

【参考文献】

1. Babcock, G. J.; Farzan, M and Sodroski, J. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 3378–3385.
2. Handl, H. L.; Sankaranarayanan, R.; Josan, J. S.; Vagner, J.; Mash, E.; Gillies, R. J and Hruby, V. J. *Bioconjugate Chem.* 2007, 18, 1101-1109.
3. Daniels, D. J.; Lenard, N. R.; Etienne, C. L.; Law, P.; Roerig, S. C. and Portoghese, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 19208–19213.

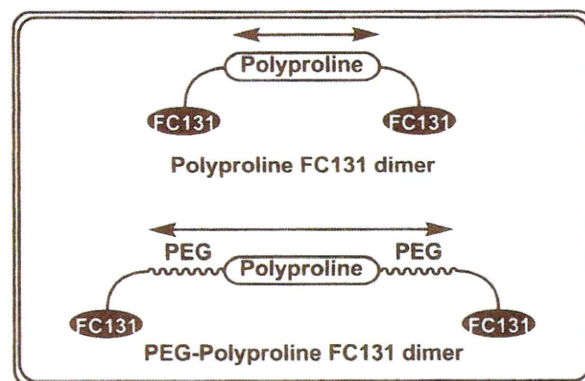


Figure 1. ポリプロリン及びPEG修飾型ポリプロリンFC131二量体の構造

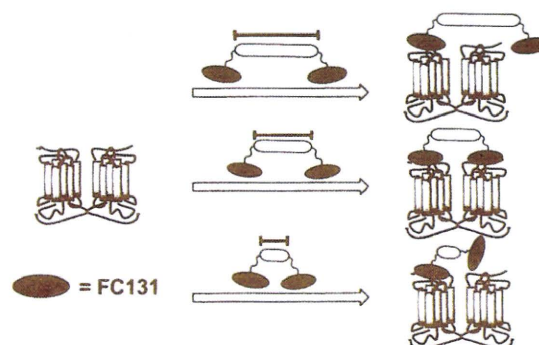


Figure 2. CXCR4二量体と二価型リガンドとの結合の模式図

Chemical biology approach utilizing novel bivalent ligands for GPCR CXCR4 leads to the elucidation of a dimeric structure

Tomohiro Tanaka^{1*}, Wataru Nomura¹, Tetsuo Narumi¹, Hirokazu Tamamura^{1,2}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

The chemokine receptor CXCR4 is a membrane protein, which belongs to the G-protein coupled receptor (GPCR) family. Interaction of CXCR4 with its endogenous ligand, stromal-cell derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12, induces various physiological functions: chemotaxis, angiogenesis, neurogenesis, *etc.* in an embryonic stage. On the other hand, CXCR4 is relevant to multiple diseases: AIDS, cancer metastasis, progression of leukemia, rheumatoid arthritis, *etc.* in adulthood. Recent studies have indicated a pivotal role of homo- and hetero-oligomerization of CXCR4 in cancer metastasis.

These studies were mostly performed with BRET analysis. The results indicated the limitation of this method in the elucidation of the native state of receptors in living cells because of the conformational or functional changes due to the mutations.

Estimation of the precise distance between receptors in a dimer form will bring us the efficient development of bivalent ligands of GPCRs, which have advantages in binding affinity and specificity. However, challenges in design of bivalent ligands have showed its difficulty because of the unclearness in dimeric forms of GPCRs. Therefore, there is an increasing demand for a novel strategy for this analysis.

In this study, we designed and synthesized novel CXCR4 bivalent ligands with two FC131 analogues [*cyclo*(D-Tyr-Arg-Arg-Nal-D-Cys-)] (Nal = L-3-(2-naphthyl)alanine) connected by a polyproline or a PEGylated polyproline linker. A cyclic pentapeptide FC131 [*cyclo*(D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-)] was previously found as a potent CXCR4 antagonist. The linkers were expected to sustain a certain constant distance between the ligands. Our bivalent ligands with various linkers were applied to measure the distance between two binding sites of ligands in CXCR4 dimers.

Here, we present experimental results concerning the native state of CXCR4 dimer utilizing our bivalent ligands, leading to a clear comprehension of the precise structure. This approach could be utilized to other GPCRs as a molecular measure in design of bivalent ligands. Furthermore, an application of fluorescent-labeled bivalent ligands to cancer diagnosis will be discussed.

HIV-1 第二受容体 CXCR4 を基にした合成抗原分子の開発

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

○橋本 知恵^{1,2}、野村 渉¹、田中 智博¹、鳴海 哲夫¹、大庭 賢二³、山本 直樹³、
玉村 啓和^{1,2}

【背景】

HIV が AIDS の原因ウイルスとして特定されてから 25 年以上が経過し、様々な抗 HIV 薬が開発されてきた。現在、HIV 感染者および AIDS 患者の治療において抗 HIV 薬（プロテアーゼ阻害剤や逆転写酵素阻害剤）を複数組み合わせる多剤併用療法（highly active anti-retroviral therapy: HAART）が大きな効果を上げているが、根治は難しく、薬剤耐性ウイルスの出現や高額な治療費などの二次的問題も生じている。そのため、予防、治療効果が高いと考えられる AIDS ワクチンの開発が行われてきたが成功には至っていない。本研究では、従来行われてきた HIV 側を標的とする方法ではなく、宿主細胞側第二受容体 CXCR4 の細胞外 N 末端領域を標的とする新規なワクチンによって HIV の侵入を阻害する方法の開発に取り組んだ。

【方法】

CXCR4 の細胞外領域となる N 末端領域と 3 個の細胞外ループのうち、HIV-1 と宿主細胞との結合に重要である N 末端領域を標的とする抗体誘導のために、オーバーラップする 3 配列に断片化した N 末端領域（細胞膜に遠い方から Nt-1, 2, 3 とする）を Fmoc 固相合成法により作製した。また、効率良く抗体誘導を行うために、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。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、ELISA 法によって抗体価を評価した。さらに、CXCR4 を高発現する細胞を用いてリガンド競合阻害実験を行い、誘導された抗体の CXCR4 に対する結合活性も評価した。

【結果・考察】

Nt-2, 3 を用いた免疫で抗体誘導が確認され、より細胞膜に近い Nt-3 を基にした抗原分子が Nt-2 よりも高い抗体誘導能を示すことが明らかになった。また、リガンド競合阻害実験によって、Nt-3 で誘導された抗体が CXCR4 結合活性を有することが確認された。今後、誘導された抗体を含む血清を用いて中和活性を評価することで、宿主側因子を標的とするワクチンデザインが有効な方法であることを示すことができると考えられる。

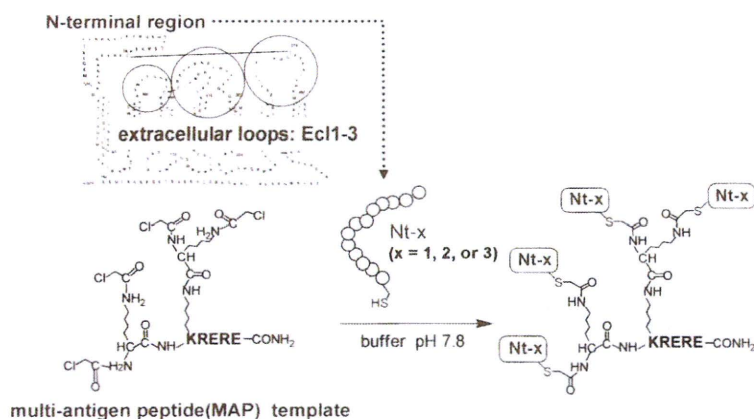


Figure 1. CXCR4 の N 末端領域断片ペプチドの MAP コンジュゲート体の作製

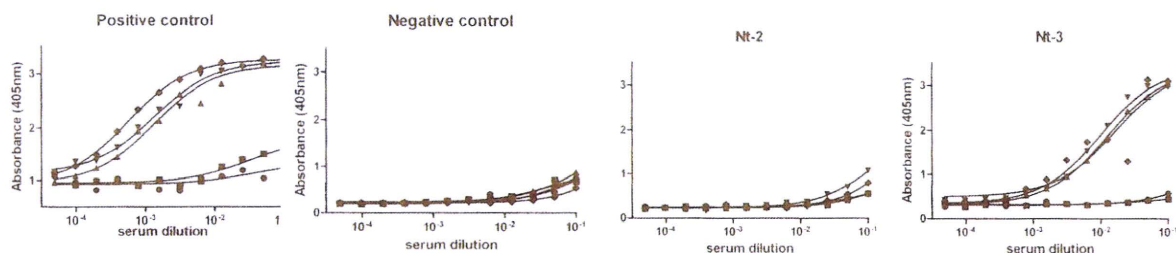


図 2. ELISA 法による抗体価の評価 左から positive control, negative control, Nt-2, Nt-3 を抗原とした免疫 1 週間前(●),免疫 1 週(■), 3 週(▲), 5 週(▼), 7 週(◆)における抗体価

Development of synthetic antigen molecules based on HIV-1 co-receptor CXCR4

Chie Hashimoto^{1,2*}, Wataru Nomura¹, Tomohiro Tanaka¹, Tetsuo Narumi¹, Kenji Ohba³,
Naoki Yamamoto³, Hirokazu Tamamura^{1,2}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, ³AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

To treat AIDS or HIV-infected patients, a therapy designated as highly active anti-retroviral therapy (HAART) has achieved a remarkable clinical success to date. In the therapy, reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors are used in combinations. However, these antiretroviral agents cannot remove virus completely from infected individuals and escape mutations of virus strains occurred during the treatment. Thus, demands for different strategies of AIDS chemotherapy are increasing.

HIV-1 vaccine is a promising alternative treatment of AIDS. Despite enormous efforts in basic and clinical researches, the development of HIV-1 vaccine targeting viral proteins is greatly hampered by viral mutation. Therefore, the second receptor CXCR4 on host cells was selected as a new target. CXCR4 is composed of an extracellular N-terminal region and three extracellular loops (Ecl 1, 2, and 3). The N-terminal region contains by 39 amino acid residues, and was segmented into three parts (Nt-1, 2, and 3) as antigen molecules. The peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS). For an efficient induction of antibodies, these peptides were conjugated to a multi-antigen peptide (MAP) template. The antigen molecules, Nt-2 and 3 were inoculated into mice and sera were collected at regular intervals. The induction of antibodies in the sera was monitored by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results indicated antibodies were induced strongly by Nt-3. Additionally, a competitive binding assay suggested that the induced antibodies significantly bind to CXCR4. The synthetic antigens based on cellular proteins of host cells would lead to development of efficacious vaccine of AIDS.

PKC リガンドの蛍光を用いた洗浄不要型アッセイ法の開発

(¹東京医歯大・生材研、²東京医歯大・疾患生命研)○奥田 善章^{1,2}、野村 渉¹、鳴海 哲夫¹、大橋 南美¹、玉村 啓和^{1,2}

【背景】

Protein kinase C (PKC)は11種類のアイズォイムからなるセリン・スレオニン特異的リン酸化酵素であり、生理的条件下では diacylglycerol (DAG)をセカンドメッセンジャーとして細胞増殖や分化、アポトーシスにおいて重要な作用を示す。代表的な腫瘍プロモーターである phorbol dibutyrate (PDBu)も PKC をターゲットとして作用することが知られており、PKC はがん治療薬の標的分子として注目されている。

当研究室では、天然のリガンドである DAG の誘導体を環化することにより、PKC との結合に必要な官能基（ファーマコフォア）を空間的に固定化し、結合活性を上昇させるという Marquez らの戦略に基づき、PDBu に匹敵する結合活性を持った DAG-lactone 誘導体を合成している (Figure 1)。これらの PKC への結合活性は、放射性同位体(RI)でラベル化された[20-³H]PDBu をプローブとした競合阻害アッセイを用いて評価している。しかし、RI を使用したアッセイには専用の設備などを必要とし、被爆の危険性もあるため、より簡便で安全なアッセイ系が必要とされている。そこで本研究では、DAG-lactone 誘導体の R₂に環境応答性蛍光基を導入した蛍光性 DAG-lactone 誘導体を合成し、[20-³H]PDBu に代わる競合プローブとしての利用が可能か検討を行った。

【方法】

環境応答性蛍光基で修飾した DAG-lactone 誘導体が PKC との結合に伴って蛍光変化を起こす場合、リガンド候補化合物の競合的結合を蛍光変化として検出することが可能である。従って、RI アッセイで必要な洗浄操作が不要となるため、非常に簡便で [20-³H]PDBu に代わる有用なプローブになると期待できる。また簡便な検出方法であるため、大量の候補化合物を用いるスクリーニングのためのプローブとしても応用が可能である。

合成した蛍光性 DAG-lactone 誘導体が PKC のリガンド結合部位である C1b ドメインに対して、十分な結合活性を保持していることを[20-³H]PDBu との競合阻害実験により確認した。次に蛍光滴定実験を行い、蛍光性 DAG-lactone 誘導体の C1b ドメインとの結合に伴う蛍光波長の変化を追跡した。構築した系が競合阻害活性を検出するために利用可能であることを検討するために PKC C1b ドメインへの結合活性が既知である数種類の化合物について蛍光性プローブを用いたアッセイを行った。さらに化合物スクリーニングへの応用のためにマルチウェルプレート上における結合活性評価について検討を行った。

【結果・考察】

合成した蛍光性リガンドが C1b ドメインと結合することで蛍光波長が短波長側にシフトし、かつ蛍光強度が顕著に増大することが明らかとなった (Figure 2a)。さらに PDBu との競合阻害実験を行ったところ、PDBu の濃度依存的に蛍光強度の減少と長波長シフトが見られた (Figure 2b)。このことから、リガンド候補化合物の競合的結合を蛍光の変化として検出するための蛍光性プローブとして用いることが可能であると示された。C1b ドメインへの結合が既知の化合物を用いた競合阻害アッセイでは RI を用いたアッセイ法による結果と高い相関性を示す結果が得られた。また、このことはマルチウェルプレートを用いた系でも同様に示された。

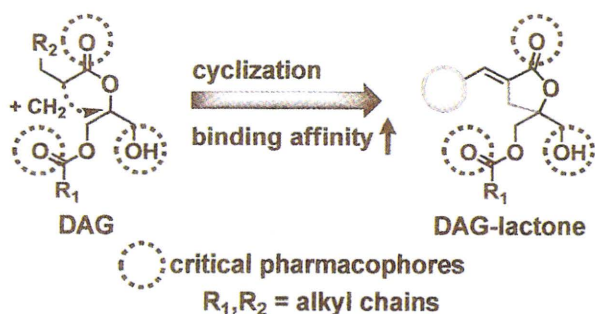


Figure 1. DAG-lactone の創出と R₂ への環境応答性蛍光基の導入

このように環境応答性蛍光基を有するプローブとして DAG-lactone 誘導体が機能し、非常に簡便な操作によって化合物の結合活性を評価できることが示唆された。

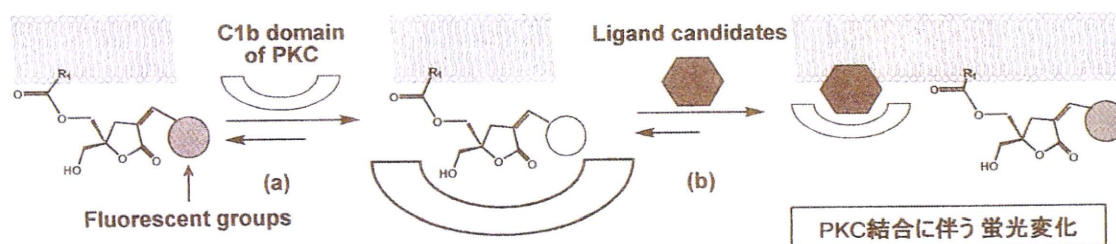


Figure 2. C1b ドメインへの蛍光性 DAG-lactone の結合(a)とリガンド候補化合物との拮抗による蛍光変化(b)

Development of fluorescent-based wash-free assay methods for PKC ligands

Yoshiaki Okuda^{1,2*}, Wataru Nomura¹, Tetsuo Narumi¹, Nami Ohashi¹, Hirokazu Tamamura^{1,2}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

Protein kinase C (PKC) is serine/threonine-specific kinase. Under physiological condition, PKC is activated by binding of diacylglycerol (DAG) as a second messenger and the activation is correlated to important cellular signaling such as cell growth, differentiation, and apoptosis. PKC is also known as the target of tumor promoters such as phorbtor dibutylate (PDBu). Thus, PKC is one of the attractive targets in cancer drug development.

DAG-lactone derivatives have been developed based the strategy that the pharmacophores of DAG is steadied by cyclization. The resulting DAG-lactones show increased binding affinity for PKC as phorbtor esters such as PDBu. The binding affinity of PKC ligands have been evaluated by competitive assay against radio isotope (RI) labeled ligand, [³H]PDBu. For high-throughput screening of PKC ligands, simple assay is required as an alternative method to RI assay. In this study, fluorescent DAG-lactones were designed and synthesized by substitution of environment-sensitive fluorescent group for R₁ or R₂ group. The fluorescent DAG-lactone showed spectrum changes by binding to PKC and addition of competitive ligand, PDBu. The results indicated the synthetic DAG-lactone could be utilized as a fluorescent probe for binding to PKC C1b domain. Evaluation of binding affinity of known PKC ligands by fluorescent titration showed a reasonable correlation to RI assays. Furthermore, it was proved that the competitive assay could be applied to the assay on multi-well plates. The present results suggest that the environment-sensitive fluorescent probe would be utilized for high-throughput screenings of drug leads targeting PKC.

HIV-gp41 の三量体構造に特異的な中和抗体を誘導する人工抗原ペプチド

(¹東京医歯大・生材研、²東京医歯大・疾患生命研、³国立感染研・エイズ研セ) ○大矢 亜紀¹、
 中原 徹^{1,2}、野村 渉¹、大庭 賢二³、田中 智博¹、橋本 知恵^{1,2}、鳴海 哲夫¹、
 村上 努³、山本 直樹³、玉村 啓和^{1,2}

【背景】

現在、エイズの治療として数種の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤を組み合わせる多剤併用療法 (HAART) が効果的であるが、耐性ウイルスの出現や高額な治療費等の問題がある。新しい治療薬として HIV ワクチンの開発が期待されているが、今なお困難を極めている。我々は新しい作用点である感染の初期過程の膜融合に注目し、HIV ワクチンを開発することを目指した。

【方法】

HIV-gp41 の helix 領域にある N36 3 量体構造は感染初期過程の膜融合で重要な働きをする。そこで、その構造を特異的に認識する抗体を誘導するための抗原分子を合成し、誘導された抗体により膜融合及び感染を阻害することができると考えた (Figure 1)。まず、3 量体構造を保持させるために等価なリンカーを持つ C₃ 対称性の新規低分子テンプレートを作成した。テンプレート上に N36 ペプチドを thiazolidine ligation によって導入することで N36 3 量体構造を模倣した抗原分子を創製した。マウスを用いた抗体誘導実験によって抗体誘導能、および産生される抗体の選択性を確認した。

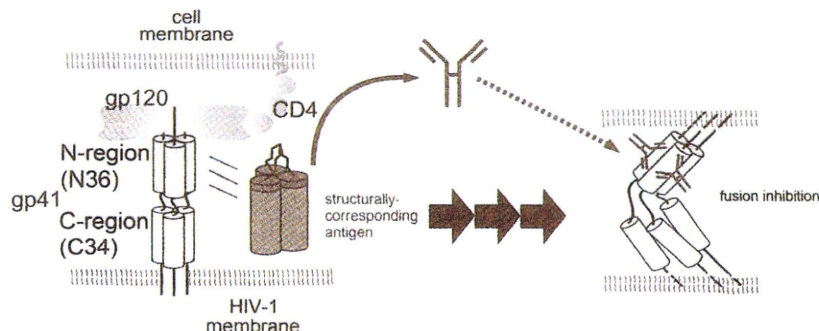


Figure 1. Development of an antigen peptide inducing neutralizing antibodies specific to the HIV-gp41 trimer

【結果・考察】

合成した人工抗原分子の CD スペクトル測定を行った。その結果、三量体では単量体よりも α -ヘリックス性が増加することが明らかになり、新規低分子テンプレート上での N36 3 量体構造の形成が示唆された。また、C34 と混合させると α -ヘリックス性が増加した。C34 3 量体は膜融合過程において N36 3 量体と相互作用し 6 量体を形成することが知られており、合成した抗原分子は天然の構造を反映していることが示された。マウスを用いた免疫実験では抗体誘導が確認された。3 量体型抗原から得られた血清では N36 単量体よりも N36 3 量体に対する抗体価が高いことから、3 量体構造を特異的に認識する抗体が誘導されていることが示された。また、この血清は N36 単

量体免疫から得られた血清よりも高い中和活性を示した。最近になって HIV-1 感染者のメモリー B 細胞から得られた抗体が抗原構造認識能を有し、強い中和活性を有することが Burton らによって報告された^[1]ことから立体構造特異的抗体を誘導する抗原分子デザインは HIV ワクチンとして有効であると考えられる。

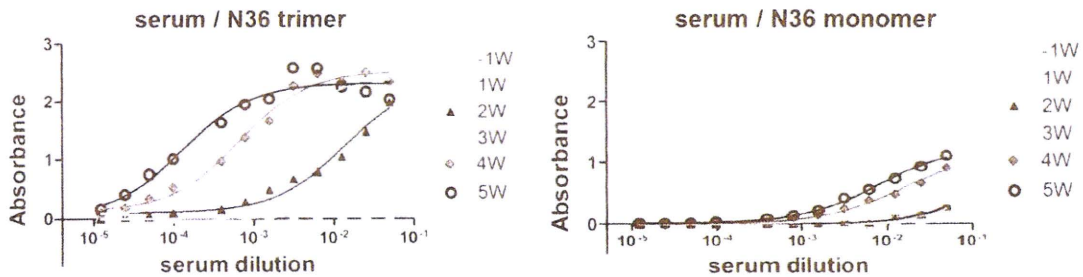


Figure 2. Results of Serum titer ELISA of antibodies induced by N36 trimeric antigen

Development of an antigen peptide inducing neutralizing antibodies specific to the HIV-gp41 trimer

Aki Ohya^{1*}, Toru Nakahara^{1, 2}, Wataru Nomura¹, Kenji Ohba³, Tomohiro Tanaka¹, Chie Hashimoto^{1, 2}, Tetsuo Narumi¹, Tsutomu Murakami³, Naoki Yamamoto³, Hirokazu Tamamura^{1, 2}

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, ³AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

Highly active anti-retroviral therapy (HAART), which utilizes a combination of HIV protease inhibitors and reverse transcriptase inhibitors, is an effective therapy of AIDS. However, HAART involves serious problems such as the emergence of multi-drug resistant strains and the high cost of therapy. As a new approach for AIDS therapy, artificial antigen molecules were synthesized based on the dynamic structures of envelope proteins during HIV-1 entry. HIV-1 gp41 plays a pivotal role in membrane fusion process of HIV-1 initial infection, and contains the N-terminal helix region (N36). Thus, the antibody which recognizes N36 trimer in a structure-specific manner could block HIV-1-entry. To construct a mimetic of N36 trimer, the synthesized N36 peptides were assembled on a C3-symmetric template. The antiserum produced by immunization of an N36 trimeric form antigen showed higher affinity for N36 trimer than for N36 monomer. Moreover, it was revealed that the antiserum has more potent inhibitory activity against HIV-1 infection than that of N36 monomer. Our results indicate the effectiveness of antigen design for to HIV vaccine.

[1] L. M. Walker, et. al., *Science*, 3 September 2009 (10.1126/science.1178746).

8TG-am05

イズワクチンを指向した宿主受容体 CXCR4 由来抗原分子の創製
 橋本 知恵^{1,2}, 野村 渉¹, 田中 智博¹, 中原 徹^{1,2}, 鳴海 哲夫¹, 大庭 賢二³,
 上 努³, 山本 直樹³, 玉村 啓和^{1,2} (¹東京医歯大・生材研, ²東京医歯大院・疾患
 命科学教育部, ³感染研・エイズ研セ)

【目的】これまで HIV-1 を標的としたエイズワクチン開発研究が展開されてきたが、
 HIV-1 の易変異性から成功には至っていない。また、現在行われている複数の抗 HIV 薬
 を投与する多剤併用療法は、治療費が高価であり、長期間の投与により副作用も生じてし
 まう。そのため、投与回数が少なく経済的に負担の軽いワクチンの開発が望まれている。
 本研究では変異しやすい HIV-1 ではなく、宿主細胞への侵入時に HIV-1 が利用する受容
 体の 1 つである CXCR4 を取り上げた。

【方法】CXCR4 の細胞外領域は N 末端領域と 3 つの細胞外ループからなる。このうち、
 HIV-1 との結合に重要とされている 39 アミノ酸残基からなる N 末端領域を基に抗原分
 子の創製を行った。N 末端領域をオーバーラップする 3 種類のペプチド Ni-1m~3m (m:
 monomer) に分けて合成することとした (図)。また、ペプチドの抗体誘導能向上のため
 めにテンプレート上に Ni-1m~3m を集積させた 4 価抗原分子 Ni-1q~3q (q: quadrivalent)
 を設計した。これらをマウスに免疫し、ELISA 法により抗体誘導能を評価した。

【結果および考察】ELISA 法の結果、Ni-1 の配列は顕著な抗体誘導能を示し、それに
 次いで Ni-3 の配列も抗体誘導能を示した。しかし、Ni-2 の配列は顕著な抗体誘導能を
 示さなかった。また、誘導
 された抗体を用いて、
 CXCR4 結合試験および
 HIV 侵入阻害試験を行い、
 宿主由来タンパク質を標的
 としたワクチンデザインの有
 効性を検討した。

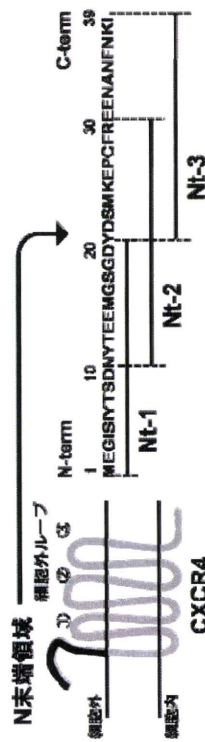


図. 3 種類の CXCR4 N 末端領域断片ペプチド

口頭発表 28TG-am05

28 日 9:48~10:00

T-G 会場 津島会場 1F B12

化学系薬学 医薬品設計1

浦野 泰照 (東大院薬)

エイズワクチンを指向した宿主受容体CXCR4由来抗原分子の創製

Synthesis of Host Receptor CXCR4-based Antigen Molecules for AIDS Vaccine

○橋本 知恵^{1,2}, 野村 渉¹, 田中 智博¹, 中原 徹^{1,2}, 鳴海 哲夫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東京医歯大院・疾患生命科学教育部, ³感染研・エイズ研セ)