

## リバーズからフォワードへケミカルゲノミクスを活用した抗 HIV 剤の創製

## From Reverse to Forward Chemical Genomics: Development of Anti-HIV Agents

田中智博<sup>1)</sup>、橋本知恵<sup>1,2)</sup>、小森谷真央<sup>1,2)</sup>、野村 渉<sup>1)</sup>、鳴海哲夫<sup>1)</sup>、吉村和久<sup>3)</sup>、松下修三<sup>3)</sup>、  
村上 努<sup>4)</sup>、駒野 淳<sup>4)</sup>、大庭賢二<sup>4)</sup>、山本直樹<sup>4)</sup>、○玉村啓和<sup>1,2)</sup>

Tomohiro Tanaka<sup>1)</sup>, Chie Hashimoto<sup>1,2)</sup>, Mao Komoriya<sup>1,2)</sup>, Wataru Nomura<sup>1)</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1)</sup>, Kazuhisa  
Yoshimura<sup>3)</sup>, Shuzo Matsushita<sup>3)</sup>, Tsutomu Murakami<sup>4)</sup>, Jun Komano<sup>4)</sup>, Kenji Ohba<sup>4)</sup>, Naoki Yamamoto<sup>4)</sup>,  
and ○Hirokazu Tamamura<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>東京医科歯科大学・生体材料工学研究所、<sup>2)</sup>東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究部、

<sup>3)</sup>熊本大学・エイズ学研究センター、<sup>4)</sup>国立感染症研究所・エイズ研究センター

<sup>1)</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2)</sup>Graduate School of  
Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, <sup>3)</sup>Center for AIDS Research, Kumamoto  
University, <sup>4)</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

エイズ、およびその原因ウイルスである HIV の発見から 20 年以上経過しており、現在までに種々の抗エイズ薬が開発され臨床応用されているが、いまなおエイズを完全に治癒する治療法は見出されていない。現状では、耐性ウイルスの出現や副作用を軽減するため、複数の抗エイズ薬を併用する多剤併用療法 (HAART) が最も治療効果を挙げると考えられており、抗エイズ薬の種類、レパートリーを増やすことが創薬研究者に求められている。我々は以前から HIV の細胞への侵入段階を中心に、種々の抗 HIV 剤を創製してきた。特に HIV 感染症の後期に現れる HIV 株が利用する宿主細胞上のコレセプター CXCR4 の阻害剤の創製を精力的に行ってきた。また、コンビナトリアル設計に基づくプロテアーゼ阻害剤の創製や、他の侵入阻害剤や中和抗体等との併用を志向した CD4 mimic の創製も進めている。これらはすべて、受容体や酵素等の蛋白質をターゲットとした標的分子設定型のリバーズケミカルゲノミクスの手法を活用することにより抗 HIV 剤を創出している。そこで、新規な抗エイズ薬の創出のために、概念を根本的に変えて、ランダムライブラリーから抗 HIV 活性を指標にスクリーニングするというフォワードケミカルゲノミクスの手法を用い、有用なリード化合物の探索を行った。また、そのランダムライブラリーとして、HIV のすべての遺伝子産物のオーバーラップ断片ペプチド群を使用した。結果として、インテグラーゼ阻害剤等の抗 HIV 剤を見出すことができ、HIV 自身の中に HIV の複製を阻害するフィードバック様の自己制御システムが存在することが示唆された。このようにリバーズケミカルゲノミクスからフォワードケミカルゲノミクスの方法を取り入れ、いろいろなケミカルバイオロジー観点からリード化合物を探索し、種々の抗 HIV 剤の創製を行っている。また、HIV 感染者数が発展途上国で増加していることから、薬剤に比べて少ない投与回数で効果を示すワクチンの開発も重要と考えられ、これまでに試行されていなかった新規なワクチン標的を複数設定し、効果的な作用を示すワクチンの開発も進めている。

## HIV 侵入の動的超分子機構を基にしたエイズワクチン開発

## Development of AIDS Vaccines Based on Dynamic Supramolecular Mechanisms of HIV-1 Entry

○橋本知恵<sup>1,2)</sup>、野村 渉<sup>1)</sup>、中原 徹<sup>1,2)</sup>、田中智博<sup>1)</sup>、堤 浩<sup>1)</sup>、長谷山正樹<sup>1)</sup>、大庭賢二<sup>3)</sup>、  
鳴海哲夫<sup>1)</sup>、村上 努<sup>3)</sup>、山本直樹<sup>3)</sup>、玉村啓和<sup>1,2)</sup>

○Chie Hashimoto<sup>1,2)</sup>, Wataru Nomura<sup>1)</sup>, Toru Nakahara<sup>1,2)</sup>, Tomohiro Tanaka<sup>1)</sup>, Hiroshi Tsutsumi<sup>1)</sup>,  
Masaki Haseyama<sup>1)</sup>, Kenji Ohba<sup>3)</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1)</sup>, Tsutomu Murakami<sup>3)</sup>, Naoki Yamamoto<sup>3)</sup>,  
and Hirokazu Tamamura<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>東京医科歯科大学・生体材料工学研究所、<sup>2)</sup>東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究部、  
<sup>3)</sup>国立感染症研究所・エイズ研究センター

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

エイズの治療法として複数の抗 HIV 薬を投与する多剤併用療法 (HAART) が成果を上げているが、長期間の薬剤投与により生じる副作用が問題となっている。そこで、薬剤に比べて少ない投与回数で効果を示すワクチンの開発が期待されている。HAART においては作用点の異なる薬剤を組み合わせて用いることで強い抗 HIV 活性を示し、さらに薬剤耐性変異株の発現を抑えることが可能であることが示されている。本研究では、このような知見を基にワクチンの標的を複数設定することでより効果的な作用を示すワクチンを開発することを目的とした (図)。

第一の標的として、宿主細胞への感染初期過程の膜融合において重要な働きをする HIV-1 外被タンパク質 gp41 の N 末端側 helix 領域 N36 を選択した。N36 の三量体構造を模倣するために 3 本の等価なリンカーを有する C<sub>3</sub> 対称性テンプレートを合成し、thiazolidine ligation によってテンプレート上に N36 を集積させた抗原分子を合成した。第二の標的として、HIV-1 が宿主細胞に侵入する際に利用する第二受容体 CXCR4 の細胞外 N 末端領域および細胞外ループを選択した。細胞外 N 末端領域は、3 個のオーバーラップペプチドとして合成した。また、細胞外ループは直鎖のペプチドとして合成した後、ループ構造を模倣するためにペプチドを環化した。これらは抗原性を向上させるために多価抗原ペプチドテンプレート上に集積させて抗原分子とした。各抗原分子を免疫したマウスの血清を用いた ELISA 法により各抗原分子の抗原性が確認できた。また、HIV 侵入阻害試験により抗 HIV 活性を評価した。今後、各抗原分子を併用する効果についても検討を行う。

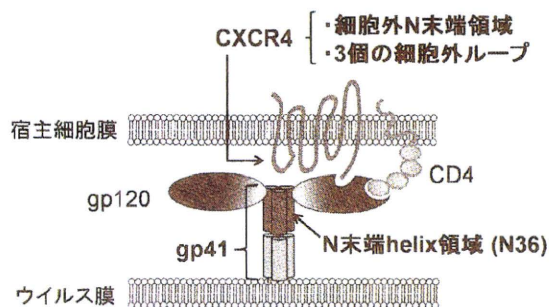


図. HIV-1 の宿主細胞への侵入過程  
(太字はワクチン開発における標的)



HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出

Screening and Development of Anti-HIV-1 Peptides from HIV-1 Matrix Protein

○小森谷 真央<sup>1,2)</sup>、村上 努<sup>3)</sup>、鈴木 慎太郎<sup>1)</sup>、鳴海 哲夫<sup>1)</sup>、野村 渉<sup>1)</sup>、山本 直樹<sup>3)</sup>、  
玉村 啓和<sup>1,2)</sup>

○Mao Komoriya<sup>1,2)</sup>, Tsutomu Murakami<sup>3)</sup>, Shintaro Suzuki<sup>1)</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1)</sup>, Wataru Nomura<sup>1)</sup>,  
Naoki Yamamoto<sup>3)</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京医科歯科大・生体材料工学研究所、<sup>2)</sup> 東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究部、<sup>3)</sup> 国立  
感染症研究所・エイズ研究センター

<sup>1)</sup> Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2)</sup> Graduate School of  
Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, <sup>3)</sup> AIDS Research Center, National Institute of  
Infectious Diseases

エイズの治療において現在、HIV 逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤を併用する多剤併用療法が成果を挙げている。しかし、この治療法には高額な治療費、重篤な副作用、耐性ウイルスの出現といった問題点があり、新たな作用点を持つ薬剤が必要とされている。ウイルス構造タンパク質 Gag の構成成分であるマトリックス (MA) タンパク質の部分ペプチドを作製し、抗 HIV 化合物を探索しようと考えた。主に $\alpha$ -ヘリックス構造から構成される全長 132 アミノ酸の MA について、15 残基の部分ペプチドを設計した (図 1)。この部分ペプチドは二次構造の維持と活性モチーフの分断の回避を目的として 5 残基ずつオーバーラップ部分を設けた。作用点の解析を目的として膜透過性配列であるオクタアルギニン配列を各ペプチド配列の C 末端側に付加した。オクタアルギニンは N 末端をクロロアセチル化し、部分ペプチドの C 末端に導入したシステインとの縮合を行った。細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーに対するコントロールペプチドとして C 末端のシステインをキャッピングした部分ペプチドライブラリーも調製した (図 2)。計 26 種の部分ペプチドライブラリーの抗 HIV 活性および細胞毒性について評価した結果、顕著な抗 HIV-1 活性を有する部分ペプチドを見出した。今後は活性を示した配列を基にペプチドライブラリーを再構築し、作用メカニズムの解明と同時により高活性なペプチド配列の構築を目指す。

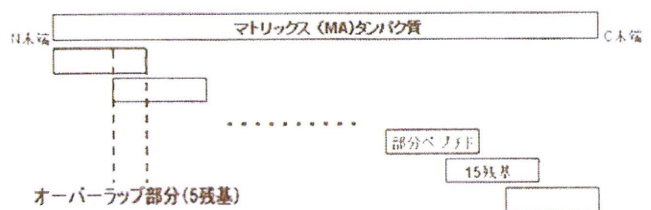


図 1. MA 部分ペプチドライブラリー

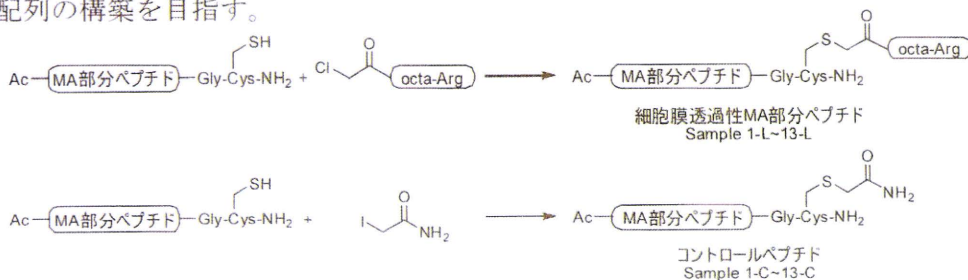


図 2. 細胞膜透過性 MA 部分ペプチドおよびコントロールペプチドの合成

新規アミド結合等価体の創製研究:  
クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究

**Novel Alkene Dipeptide Isosteres: Synthetic Study of Chloroalkene Isosteres**

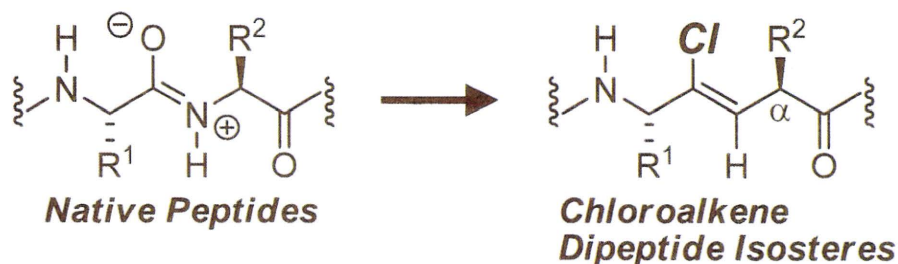
○鳴海哲夫<sup>1)</sup>、清家俊輔<sup>1)</sup>、野村渉<sup>1)</sup>、玉村啓和<sup>1,2)</sup>

○Tetsuo NARUMI<sup>1)</sup>, Shunsuke Seike<sup>1)</sup>, Wataru Nomura<sup>1)</sup>, and Hirokazu Tamamura<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所、<sup>2)</sup> 東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究所

<sup>1)</sup> Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2)</sup> Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

ペプチドリード創薬において、主鎖骨格を形成するペプチド結合や構成分子であるアミノ酸側鎖に起因するペプチド性（易水解性や凝集性）を解決するペプチドミメティックの創製は重要な研究課題である。これまでに、酵素によるペプチドの加水分解機構に基づいた酵素基質遷移状態模倣型ペプチドミメティックが考案され、がんやエイズ、アルツハイマー型痴呆症など難治性疾患に対する医薬品創製において、重要な役割を果たしている。一方、ペプチドの基底状態を模倣したペプチドミメティックはいまだ有効なものが見出されていないのが現状である。このような状況において、我々は有効な基底状態模倣型ペプチドミメティックとして期待されるアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究、およびそれらを基盤とした創薬研究を展開してきた。アルケン型ジペプチドイソスターはペプチド結合の共鳴構造に基づいてデザインされたペプチドミメティックであり、天然のジペプチドとの高い構造的相同性や加水分解酵素に対する安定性などが特徴として挙げられる。今回、我々は新たな基底状態模倣型ペプチドミメティックとして、ペプチド結合をクロロオレフィンで置換したクロロアルケン型ジペプチドイソスターを設計し、短工程でかつ様々な置換基を導入可能な効率的合成法の開発を目指し、 $\alpha$ 位置換基の立体選択的導入およびクロロアルケン骨格の構築について検討した。その結果、有機銅試薬による One-Pot 還元反応/不斉アルキル化反応によるアプローチおよび  $S_N2'$ 型アルキル化反応によるアプローチの2種類の側鎖官能基導入法を開発した。今後は更なる柔軟な合成法へ展開し、生理活性ペプチドへ応用することで、クロロアルケン型ジペプチドイソスターの機能評価を行う予定である。





### Development of Crosslink-Type ZIP Tag-Probe Pairs as Novel Fluorescent Imaging Tools

野村 渉<sup>1)</sup>、○大橋南美<sup>1)</sup>、蓑 友明<sup>1,2)</sup>、森あつみ<sup>1)</sup>、鳴海哲夫<sup>1)</sup>、増田朱美<sup>1,2)</sup>、堤 浩<sup>1)</sup>、  
玉村啓和<sup>1,2)</sup>

Wataru Nomura<sup>1)</sup>, Nami Ohashi<sup>1)</sup>, Tomoaki Mino<sup>1,2)</sup>, Atsumi Mori<sup>1)</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1)</sup>, Akemi Masuda<sup>1,2)</sup>,  
Hiroshi Tsutsumi<sup>1)</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>1,2)</sup>,

<sup>1)</sup>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、<sup>2)</sup> 東京医科歯科大学 疾患生命科学研究部

<sup>1)</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,

<sup>2)</sup> Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

細胞内におけるタンパク質の機能（発現状態や細胞内局在など）を調べるためには、タンパク質の挙動を経時的に追跡する必要がある。本研究室では、3本鎖ロイシンジッパー構造を基に設計した ZIP タグ-プローブペアの開発に取り組んでいる。これまでにタグとプローブの特異的会合に伴って蛍光波長・強度が大きく変化するプローブ分子を開発し、これを用いて生細胞でのタンパク質イメージングに成功している。タグとプローブの会合は非共有結合によるものであるが、分子間に共有結合を形成させて安定化することで、生細胞中のタンパク質に対してパルスチェイス実験などの時間分解解析が行えると考えられる。本研究では共有結合によりタグとプローブを結合させるクロスリンク型 ZIP タグ-プローブペアの開発に取り組んだ。

まず、タグ-プローブ間でクロスリンク反応を行うために、システイン残基をもつタグペプチドとN末端にクロロアセチル基をもつペプチドをそれぞれ Fmoc 固相合成法により合成した (Figure 1)。クロスリンク反応は反応点の距離が反応速度に影響すると考えられるため、クロロアセチル基との間にグリシン (Gly) 0-2 個からなるリンカーを持つプローブを合成した。これらを用いてクロスリンク反応による共有結合の形成を確認し、それらの反応速度について検討した。またクロスリンク型タグ-プローブペアについて CD スペクトル測定および蛍光滴定実験により安定性を試験した。その結果、Gly1 個からなるリンカーをもつプローブが最も迅速な結合形成を示した。

また、非共有結合型タグ-プローブペアと比較して、TM 値、蛍光応答能、および解離定数においてクロスリンク型タグ-プローブペアの安定性の向上が確認できた。以上のことから、タグ-プローブ間の会合に共有結合を導入することで安定性が向上したクロスリンク型 ZIP タグ-プローブペアを構築可能であり、細胞内での安定性についても今後検討する予定である。

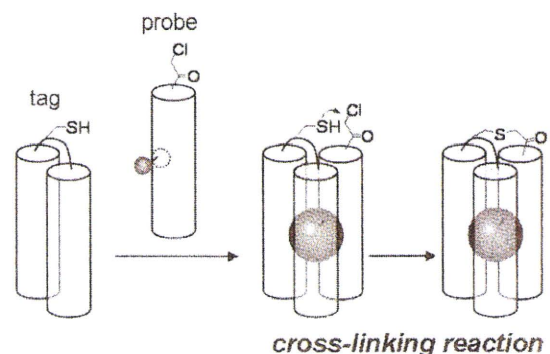


Figure 1. Crosslink-type tag-probe pair system.

## 堅固なリンカーを有する二価結合型 CXCR4 リガンドの開発と応用

## Development and Application of Bivalent-type CXCR4 Ligands with Rigid Linkers

○田中智博、野村渉、鳴海哲夫、増田朱美、玉村啓和

○Tomohiro Tanaka, Wataru Nomura, Tetsuo Narumi, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura

東京医科歯科大学・生体材料研究所

Institute of Biomaterial and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

現存する医薬品のうち 40% が G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) を標的としており、魅力的な創薬標的である。近年、多くの GPCR はホモまたはヘテロ二量体で存在することが報告されているが、生細胞中における GPCR 二量体の構造及び機能の詳細に関しては明らかでない部分が多い。そこで、本研究では GPCR であるケモカイン受容体 CXCR4 を標的とした二価結合型リガンドを創製し、それらを用いて GPCR 二量体の構造及び機能の解明を試みた。多くの GPCR は構造が明らかでないため、二量体構造に対して適切なリガンド間の距離を保つ二価結合型リガンドの理論的な構築は困難であった。そこで、CXCR4 結合リガンドである環状ペプチド (FC131) を堅固な構造を有するポリプロリンリンカーで架橋した二価結合型 FC131 誘導体を設計・合成した (図 1)。ポリプロリンリンカーの長さは一定に保たれているため、適切なリガンド間距離の場合に結合親和性の増大がみられると考えられた。FC131 のグリシンをシステインに置換した cFC131 を構築し、リンカーを導入した。CXCR4 結合活性を評価した結果、リガンド間距離が 5.5-6.5 nm の場合に二価型結合形成による相乗的な結合活性の上昇が見られた。この二価結合型リガンドを用いて GPCR 二量体化の機能を解析するため、Ca<sup>2+</sup>流入活性の評価を行った。更に、CXCR4 ががん細胞において過剰に発現していることに着目し、二価結合型リガンドのがん細胞特異的プローブとしての応用を検討した (図 2)。この方法によって CXCR4 の二量体状態の推定が可能であることが示されたことからさらに高い親和性を持つ二価結合型リガンドの開発が可能であると期待される。また、この手法は他の既存の GPCR リガンドにも適用可能であり、さらなる GPCR の機能解明に有用であると考えられる。

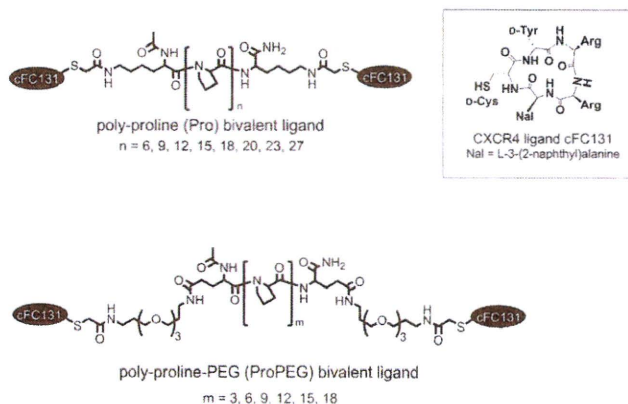


図 1. cFC131 及び二価結合型 CXCR4 リガンドの設計

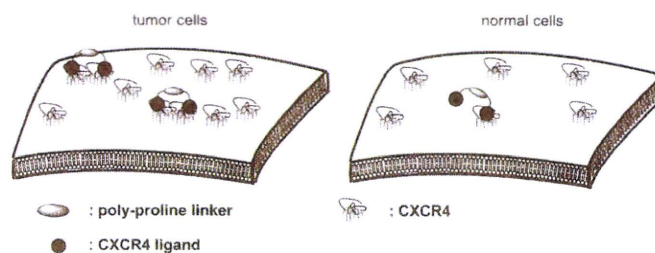


図 2. 二価結合型リガンドのがん細胞特異的な認識



## 亜鉛フィンガー融合型 DNA 組換え酵素のデザイン

## Design of Sequence-Specific Zinc Finger Recombinase

○増田 朱美<sup>1,2)</sup>、野村 渉<sup>1)</sup>、奥田 毅<sup>1,2)</sup>、玉村 啓和<sup>1,2)</sup>○Akemi Mausuda<sup>1,2)</sup>、Wataru Nomura<sup>1)</sup>、Tsuyoshi Okuda<sup>1,2)</sup>、Hirokazu Tamamura<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup> 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所、<sup>2)</sup> 東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究所<sup>1)</sup> Institution of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,<sup>2)</sup> Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

亜鉛フィンガータンパク質 (ZFP) は各モジュールが約 30 アミノ酸からなる $\beta\beta\alpha$ 構造を形成し、 $\alpha$ ヘリックスのアミノ酸側鎖が DNA 3 塩基と相互作用する。この特徴を利用し、3 塩基のコード配列に対応するモジュールを組み合わせて標的 DNA 配列に結合する ZFP を作製することができる。標的配列に対して高い特異性で結合する ZFP は多岐に渡る応用が考案されているが、その中でも DNA を修飾する酵素との融合タンパク質として用いた遺伝子治療の可能性が注目されている。DNA 組換え酵素は標的とする遺伝子配列の両端で二量体を形成し、さらに四量体として会合する際に組換え反応が起きる。この反応は能動的に起きるため標的遺伝子のノックアウト法として利用できる (図)。本研究では ZFP 融合型 DNA 組換え酵素 (RecZFP) を用いた標的 DNA 配列の切除反応について、反応効率の向上に向けた酵素デザインの検討を行った。具体的には、ZFP と酵素ドメイン間のリンカー配列及び ZFP の DNA 結合親和性のそれぞれが組換え反応効率に及ぼす影響について大腸菌内での反応について検討を行い、その結果をもとに哺乳類細胞内における反応効率についても同様に検討を行った。大腸菌内の反応では酵素の触媒ドメインが作用するスペーサー配列を介して両端に 2~6 モジュールがつながった ZFP の結合配列がある標的配列を 700 塩基程度離れた位置に置いたモデルプラスミドを用いた。作製した ZFP の結合親和性を ELISA 法により評価した後、融合型酵素 (RecZFP) として標的配列上流に遺伝子をコードしたプラスミドを大腸菌内へ導入した。導入後の反応時間を一定として組換え反応を定量した結果、ZFP モジュール数や酵素のリンカー長が反応効率に影響することが明らかになった。哺乳類細胞内での反応については、ゲノム上に標的配列の間にプロモーター配列と蛍光タンパク質のコード遺伝子を導入した安定発現細胞株を用いて蛍光タンパク質の減少比率から組換え反応を評価した。RecZFP を導入後、一定時間培養した細胞の蛍光強度を FACS で測定した結果、コントロール細胞と比較して蛍光強度が減少することが明らかになった。これらの知見に基づき、活性の高い ZFP 融合型 DNA 組換え酵素のデザインが可能になるとともに様々な遺伝子関連疾患への応用が期待される。

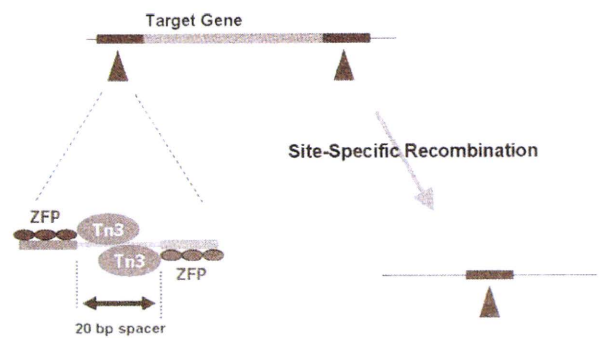


図. RecZFP による組換え反応について

## 2価結合型リガンドの新規デザインによる CXCR4 の細胞表面における機能解析

○野村 渉<sup>1</sup>・田中 智博<sup>1</sup>・増田 朱美<sup>2</sup>・鳴海 哲夫<sup>1</sup>・玉村 啓和<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東京医歯大・生材研、<sup>2</sup>東京医歯大院・疾患生命研)

Elucidation of CXCR4 function on cellular surface by designed novel bivalent ligands. (*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University<sup>1</sup>, Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University<sup>2</sup>*) NOMURA, Wataru; TANAKA, Tomohiro; MASUDA, Akemi; NARUMI, Tetsuo; TAMAMURA, Hirokazu

現存する医薬品のうち約 60%が膜表面に存在する分子を標的としており、そのうちの半数が G 蛋白質共役型受容体 (GPCR)を標的としている。このように魅力的な創薬標的であるにも関わらず、細胞膜表面における GPCR の構造及び機能の詳細に関しては明らかでない部分が多い。特に GPCR の 2 量化は機能発現に重要であるとされているが、直接的証明はこれまでなされていない。本研究ではケモカイン受容体 CXCR4 を標的とした 2 価結合型リガンドを創製し、GPCR 量体の構造及び機能の解明を試みた。2 量体構造に対して適切なリガンド間の距離を保つ 2 価結合型リガンドの理論的な構築を可能にするため、CXCR4 結合リガンドである環状ペプチド (FC131) を堅固な構造を有するポリプロリンリンカーで架橋した 2 価結合型 FC131 誘導体を設計・合成した。FC131 のグリシンをシステインに置換した cFC131 を構築し、リンカーを導入した。CXCR4 結合活性を評価した結果、リガンド間距離が 5.5-6.5 nm の場合に 2 価型結合形成による相乗的な結合活性の上昇が見られた。CXCR4 はがん細胞において過剰に発現していることに着目し、2 価結合型リガンドのがん細胞特異的のプローブとしての応用を検討した (図 1)。蛍光標識した 2 価結合型リガンドの細胞表面の CXCR4 に対する認識をフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡によって評価した結果、細胞表面の CXCR4 発現量を確認し、特に発現の高いがん細胞株で高い特性を示すことが明らかになった。この手法は他の既存の GPCR リガンドにおいても適用可能であるため、更なる GPCR の機能解明に有用であると考えられる。

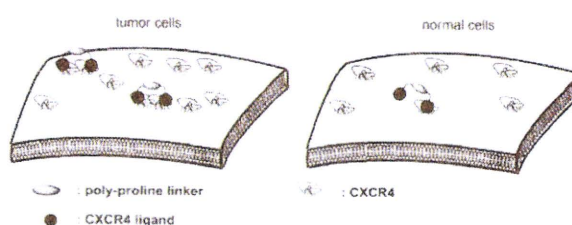


図 1. 2 価結合型リガンドのがん細胞特異的な認識



## マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチド

(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研、<sup>2</sup>国立感染研・エイズ研セ、<sup>3</sup>Yong Loo Lin Sch. Med., Nat'l. Univ. Singapore)

小森谷 真央<sup>1</sup>、村上 努<sup>2</sup>、鳴海 哲夫<sup>1</sup>、野村 渉<sup>1</sup>、山本 直樹<sup>3</sup>、○玉村 啓和<sup>1</sup>

## 【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り、新たな作用点を持つ薬剤が必要とされている。我々は以前から抗 HIV 剤の研究に取り組んでおり、侵入阻害剤 CD4 ミミック<sup>1</sup>、コレセプター阻害剤 CXCR4 アンタゴニスト<sup>2</sup>、インテグラーゼ阻害剤<sup>3</sup>を創製し、また、立体構造認識型の HIV ワクチン<sup>4</sup>を創製してきた。このような背景のもと、本研究ではウイルス構造タンパク質 Gag の構成成分であるマトリックス (MA) タンパク質に注目した。これまでに MA の部分ペプチドが抗 HIV 活性を示すことが報告されているが、その作用点や作用機序について十分な研究は行われていない。そこで本研究では、MA の部分ペプチドを作製し、抗 HIV 化合物を探索しようと考えた。

## 【方法】

$\alpha$ -ヘリックス構造を有する全長 132 アミノ酸の MA について、15 残基の部分ペプチドを設計した (Figure 1)。この部分ペプチドは二次構造の維持と活性モチーフ分断の回避を目的として 5 残基ずつオーバーラップ部分を設けた。さらに、作用点の解析を目的として、部分ペプチドの C 末端に導入したシステインと N 末端をクロロアセチル化したオクタアルギニン配列 (細胞膜透過性配列) との縮合を行うことで細胞膜透過性を付加した。また、細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーに対するコントロールペプチドとして C 末端のシステインをキャッピングした部分ペプチドライブラリーも調製した。計 26 種の部分ペプチドライブラリーについて抗 HIV 活性および細胞毒性を評価する。

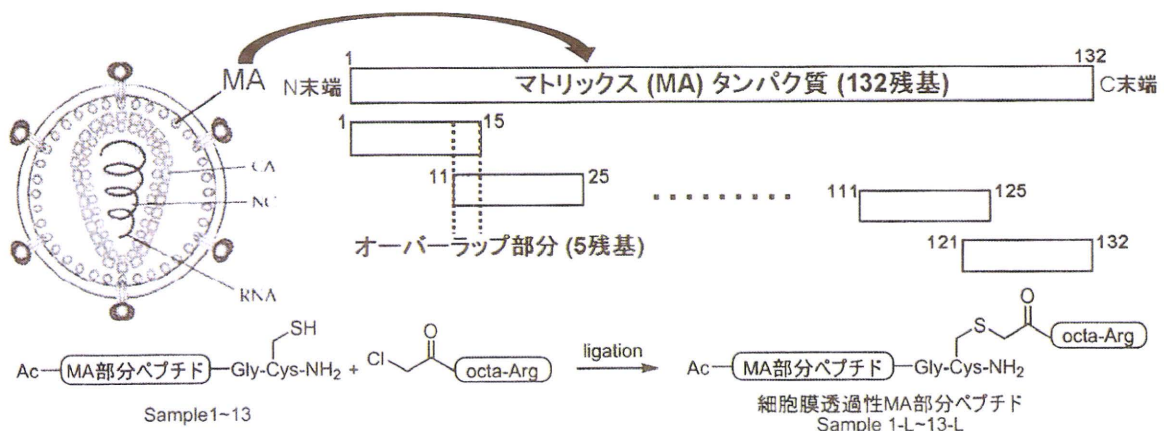


Figure 1. Design of overlapping peptide libraries derived from HIV-1 matrix (MA) and preparation of their cell penetrative peptides with an octa-Arg sequence.

## 【結果・考察】

X4HIV-1 である NL4-3 を MT-4 細胞に感染させる試験、R5HIV-1 である NL(AD8)または JR-CSF を PM1/CCR5 細胞に感染させる試験の両方において micro M のオーダーでウイルス複製を顕著に阻害する部分ペプチドを見出した。また、細胞膜透過性を付与したペプチドがコントロールペプチドに比べて、有意な抗 HIV 活性を示した。現在、実際に細胞内に導入されたか否かもペプチドに蛍光色素を付加して検証中である。今後は、活性を示した配列を基に新たなペプチドライブラリーを再構築し、より高活性なペプチドの探索を目指す。このように HIV 自身の蛋白質から抗 HIV 剤を探索することで、抗 HIV 剤の創製のひとつのオプションの可能性を追求する。

## 【参考文献】

1. Yamada, Y., Tamamura, H. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 354–358; Narumi, T., Tamamura, H. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5853–5858.
2. Tamamura, H. et al. *Expert Opin. Drug Discovery* **2008**, *3*, 1155–1166.
3. Suzuki, S., Tamamura, H. et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5356–5360; Suzuki, S., Tamamura, H. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6771–6775.
4. Nakahara, T., Tamamura, H. et al. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 709–714.

## Novel Anti-HIV Peptides Based on Matrix Proteins

Mao Komoriya<sup>1</sup>, Tsutomu Murakami<sup>2</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Wataru Nomura<sup>1</sup>, Naoki Yamamoto<sup>3</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, <sup>3</sup>Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore

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 involving CD4 mimics and co-receptor CXCR4 antagonists, and HIV integrase inhibitors. In the present study, based on the screening of overlapping peptide libraries derived from HIV matrix (MA), effective leads of anti-HIV peptides were searched. Some peptide leads having an octa-Arg sequence, which functions as cell penetrating signals, showed significant anti-HIV activity. These anti-HIV agents might be useful compounds in consideration of cocktail therapy of AIDS.



## シンポジウム5-2

## Zinc Finger 融合酵素を用いた革新的ウイルスゲノム改変技術の開発

野村 渉

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

レトロウイルスやヒトヘルペスウイルスなどが宿主細胞中に DNA の形で存在する感染症に対して、ウイルスゲノムを標的とした治療法の開発研究が行われてきている。遺伝子的な治療においては標的遺伝子に対する特異性が問題となるが、そのような問題点を克服する技術として亜鉛フィンガータンパク質の活用が注目されている。亜鉛フィンガータンパク質は DNA 結合タンパク質であり、その構造的な特徴に基づいてアルファヘリックスのアミノ酸を組み合わせることで任意の DNA 塩基配列に対して結合するドメインを構築することが可能である。このドメインを用いた融合酵素とすることで天然の酵素とは異なる配列特異性を有するテーラーメイド酵素を作製できる。このような例が示されている DNA 修飾酵素としては DNA 切断酵素、DNA 組換え酵素、DNA メチル化酵素などが挙げられる。DNA 切断酵素については FokI 制限酵素の触媒ドメインと亜鉛フィンガードメインを融合することで標的とするゲノム遺伝子の切断が行われ、切断点においては非同相組換えが誘発されて高い確率で変異が導入される。これによって標的とするタンパク質のノックダウンが可能となる。この反応を利用した遺伝子操作はこれまでに行われてきたノックアウト実験に比べて容易なことから、様々な応用例が報告され始めている。DNA 組換え酵素では切断反応とは異なり能動的な組換え反応によって標的とする遺伝子配列を欠損させることが可能である。すなわち、反応後の遺伝子配列を制御することが可能であるという点において優れている。抗ウイルスという観点からは例としてエピソームとして感染細胞中に存在する場合はその複製点を標的とする戦略や、宿主ゲノムに挿入されたプロウイルス遺伝子を欠損させる戦略といった新規な概念が考案されている。感染症において遺伝子を標的とした治療はウイルスゲノムの宿主細胞からの駆逐が可能となるため、その有用性が示されることで革新的な感染症治療法の実現に向けた起爆剤となると期待される。本発表では亜鉛フィンガータンパク質を用いた融合タンパク質研究の最近の動向とその活用について概要を述べるとともに演者の最新の成果について発表させていただく。

## 9G-am05

化合物による活性誘導が可能なジンクフィンガーヌクレアーゼの創製  
 野村 渉<sup>1</sup>, 増田 朱美<sup>2</sup>, 卜部 亜里沙<sup>1</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 玉村 啓和<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東京医歯  
 生材研, <sup>2</sup>東京医歯大院疾患生命研)

【目的】ジンクフィンガーヌクレアーゼは標的配列特異的に DNA 二重鎖切断できる酵  
 素であり、遺伝子機能の阻害などに広く応用が期待されている。一方で、ヌクレアーゼの  
 高い活性から非特異的な切断による細胞毒性が問題となっている。本研究ではヌクレアー  
 ゼの活性を化合物で制御可能な系の構築による細胞毒性の低下を目的とした。

【方法】タンパク質ドメインの二量体化制御には FKBP-FRB-ラパマイシンの複合体を利  
 用した。ジンクフィンガーヌクレアーゼドメイン、FokIドメインのそれぞれに FKBP, FRB を融合させた  
 酵素を構築した。それぞれのドメインは *in vitro* 翻訳系で作製し、標的となる DNA 配列を  
 含む DNA フラグメントを用いて DNA 切断活性に関する検討を行なった。

【結果および考察】FKBP を融合したジンクフィンガーヌクレアーゼドメインは高い DNA 結合活性を  
 示すことが明らかになった。FRB を融合した FokIドメインは DNA 結合活性が見られな  
 かった。それぞれの融合ドメインの  
 存在下で標的 DNA フラグメント  
 が加えられた場合、ラパマイシンの添  
 加時にのみ標的配列での DNA  
 二重鎖切断が誘導されることが  
 確認された。この方法を哺乳類細  
 胞内で応用することで、効率的な  
 システムモデルの作製、および  
 疾病原因遺伝子の阻害が行  
 えると期待できる。

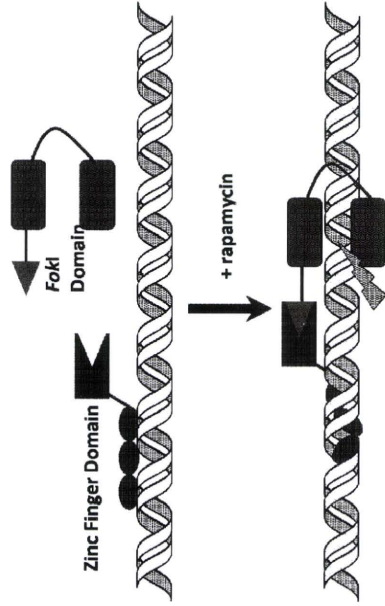


図. ラパマイシンによる活性制御について

口頭発表 29G-am05

29日 10:12~10:24

G会場 グランシップ 9F 904

化学系薬学 (Chemical Divisions) ケミカルバイオロジー1

座長: 閼間 孝介 (理研基幹研)

化合物による活性誘導が可能なジンクフィンガーヌクレアーゼの  
 創製

○野村 渉<sup>1</sup>, 増田 朱美<sup>2</sup>, 卜部 亜里沙<sup>1</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 玉村 啓和<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>東京医歯大生材研, <sup>2</sup>東京医歯大院疾患生命研)



## 9G-am06

細胞内タンパク質の挙動解明を志向したタグ・プローブシステムの開発  
 森あつみ<sup>1</sup>, 野村 渉<sup>1</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 大橋 南美<sup>1</sup>, 増田 朱美<sup>1</sup>, 玉村 啓和<sup>1</sup>  
 東京医歯大・生材研)

【目的】 これまでに本研究室では3本鎖ロイシンジッパー構造を基に設計・合成したZIP タグ・プローブペアを用いて細胞表面の膜タンパク質の蛍光イメージングに成功している。本研究では細胞内に発現しているタンパク質の挙動を蛍光イメージングによって観察するために、膜透過性を付加した合成プローブ分子を利用した新規タグ・プローブペアの開発を行った。

【方法】 環境応答性蛍光色素をもつプローブにオクタアルギニン配列を導入して細胞膜透過性を付加した。プローブペプチドはFmoc ペプチド固相合成法により合成了後、蛍光滴定実験によりタグとの結合親和性を評価した。細胞内でのタグ・プローブペア形成は、タグ配列を付加した標的タンパク質を哺乳類細胞で発現する系を用いて共焦点顕微鏡により確認した。

【結果・考察】 合成したプローブペプチドとタグペプチドの結合は抗原抗体反応と同等の

親和性を示した。タグ配列を有するタンパク質を一過発現させた哺乳類細胞に対してプローブ分子を導入すると、タグ・プローブペアの形成による蛍光の増大が確認された。よって、本システムの細胞内タンパク質におけるイメージングツールとしての有用性が示された。

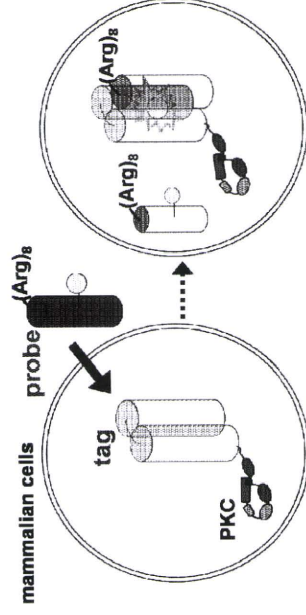


図.タグ・プローブペアを利用した細胞内タンパク質の可視化について

口頭発表 29G-am06

29日 10:24~10:36

G会場 グランシップ 9F 904

化学系薬学 (Chemical Divisions) ケミカルバイオロジー2

座長:小島 直人 (阪大院薬)

細胞内タンパク質の挙動解明を志向したタグ・プローブシステムの開発

○森あつみ<sup>1</sup>, 野村 渉<sup>1</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 大橋 南美<sup>1</sup>, 増田 朱美<sup>1</sup>, 玉村 啓和<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研)

## 0Y-am01

ンクフィンガーヌクレアーゼによるEBウイルス複製阻害効果の検討  
 村 涉<sup>1</sup>, Oト部 亜里沙<sup>1</sup>, 近藤 麻美<sup>2</sup>, 増田 朱美<sup>3</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 梁 明秀<sup>2</sup>,  
 村 啓和<sup>1,3</sup> ( <sup>1</sup>東京医歯大生材研, <sup>2</sup>横浜市大医研, <sup>3</sup>東京医歯大研疾患生命研 )

【目的】EBウイルスはエピソームとして宿主細胞に潜伏感染し、免疫低下とともに様々な病態を引き起こす。これまでの対策としては対症療法のみであるため、新規なウイルス舌性抑制方法として本研究ではウイルス遺伝子の複製開始点 (OriP) を標的としたジンクフィンガーヌクレアーゼの利用を検討することにした。

【方法】OriP を標的とするジンクフィンガードメインを 3 組構築し、それぞれについてELISA 法により DNA 結合活性を評価した。最も高い活性を示したドメインについて FokI 酵素ドメインとの融合体を構築した。融合酵素の DNA 二重鎖切断活性を *in vitro* で確認した。ウイルス複製阻害については EB ウイルスの潜伏感染モデルである Akata 細胞に gG 刺激を与える方法により行なった。

【結果および考察】構築したジンクフィンガードメインのうち 100 (nM) より強い活性を有する組み合わせを 1 組得た。これを基に構築したジンクフィンガーヌクレアーゼは標的 DNA 配列において DNA 二重鎖切断活性を示した。ウイルス複製はジンクフィンガーヌク

レアーゼの二量化条件において最も高く抑制されることが明らかになった。今後、潜伏感染に関与するウイルスタンパク質と競合などを詳細に検討することにより、阻害効果が高められようと考えている。

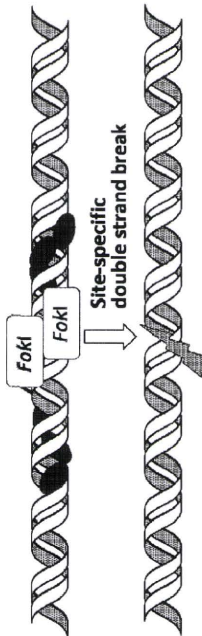


図. ジンクフィンガーヌクレアーゼによる DNA 切断反応について

口頭発表 30Y-am01

30 日 9:00~9:12

Y 会場 ツインメッセ静岡 中央棟4F 406-407  
 生物系薬学 (Biological Divisions) タンパク質  
 座長: 中谷 良人 (昭和大薬)

## ジンクフィンガーヌクレアーゼによるEBウイルス複製阻害効果の検討

野村 涉<sup>1</sup>, Oト部 亜里沙<sup>1</sup>, 近藤 麻美<sup>2</sup>, 増田 朱美<sup>3</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 梁 明秀<sup>2</sup>, 玉村 啓和<sup>1,3</sup>

( <sup>1</sup>東京医歯大生材研, <sup>2</sup>横浜市大医研, <sup>3</sup>東京医歯大研疾患生命研 )

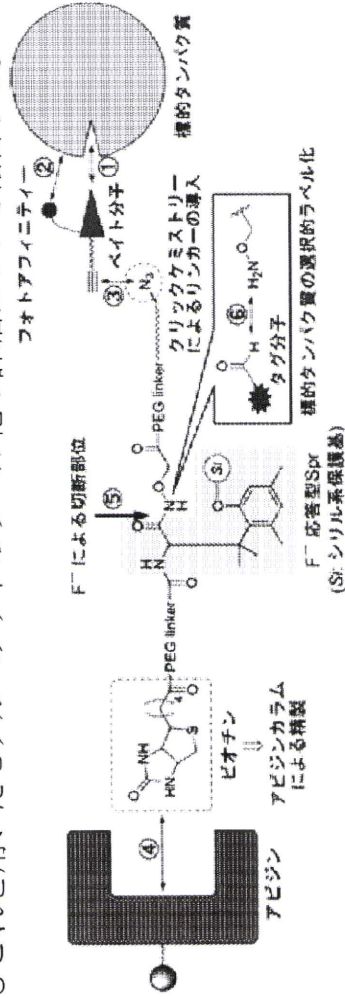


1P-0182

ポスター発表 31P-0182

的タンパク質の効率的濃縮と同定を指向したトレーサブルリンカーの開発  
 山本 純<sup>1</sup>, 前田 奈美<sup>1</sup>, 田中 智博<sup>2</sup>, 傳田 将也<sup>1</sup>, 重永 章<sup>1</sup>, 野村 涉<sup>2</sup>,  
 村 啓和<sup>2</sup>, 大高 章<sup>1</sup>(<sup>1</sup>徳島大院薬,<sup>2</sup>東京医歯大生材研)

【目的】 生理活性物質の標的タンパク質を単離する手法として、標的タンパク質  
 ・ビオチン修飾した後、アビジンカラムで濃縮する方法が汎用される。しかし、  
 の方法にはアビジンカラムからの溶出効率の低さという問題点がある。このた  
 ら、標的タンパク質—ビオチン間に特定の条件下において切断可能なリンカーを  
 入れし溶出効率を上げる試みが行われてきた。今回、温和な条件での切断および  
 的タンパク質の選択的ラベル化が可能なたレーサブルリンカーの開発を行った。  
 【方法・結果】 我々は、外部刺激に応答してアミド結合切断反応を誘起するアミ  
 酸 (Spr: Self-processing residue) に関する研究を行ってきた<sup>1</sup>。今回、フッ化物イ  
 ンに反応する Spr を導入したトレーサブルリンカーの開発を行った。リンカー切  
 後に再生するアミノオキシ基はアルデヒドと選択的に反応するため、標的タン  
 パク質の選択的ラベル化が可能となる設計である。本発表では、リンカーの合成  
 及びこれを用いたモデルペプチドのラベル化の詳細について報告する。



<sup>1</sup>) Shigenaga, A.; Tsuji, D.; Nishiohira, N.; Tsuda, S.; Itoh, K.; Otsuka, A. ChemBioChem 2007, 8, 1929-1931.

P 会場 ツインメッセ静岡 南館・北館1F 大展示場  
 化学系薬学 (Chemical Divisions) 有機化学

標的タンパク質の効率的濃縮と同定を指向したトレーサブルリン  
 カーの開発

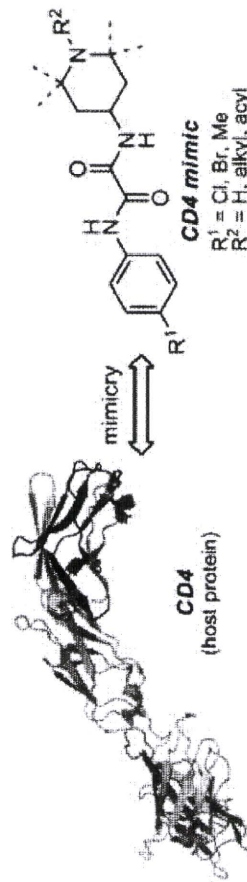
○山本 純<sup>1</sup>, 前田 奈美<sup>1</sup>, 田中 智博<sup>2</sup>, 傳田 将也<sup>1</sup>, 重永 章<sup>1</sup>, 野村 涉<sup>2</sup>,  
 玉村 啓和<sup>2</sup>, 大高 章<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>徳島大院薬,<sup>2</sup>東京医歯大生材研)

1P-0419

V-1 外被タンパク質の構造変化を誘起する低分子 CD4 ミミックの創製研究  
 海 哲夫<sup>1</sup>, 新井 啓之<sup>1</sup>, 落合 千裕<sup>1</sup>, 吉村 和久<sup>2</sup>, 原田 惠嘉<sup>2</sup>, 野村 涉<sup>1</sup>,  
 下 修三<sup>2</sup>, 〇玉村 啓和<sup>1</sup>(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研,<sup>2</sup>熊本大・エイズ学研セ)

【目的】 HIV は外被タンパク質が宿主細胞上にある複数のタンパク質 CD4 や  
 CXCR5/CXCR4 といったコレセプターとダイナミックな構造変化を起こしながら、  
 相互作用する動的超分子機構によりヒトの宿主細胞に感染する。その第一段階で  
 ある HIV の外被タンパク質 gp120 と CD4 の相互作用様式の解析を目的として、  
 gp120 と相互作用する HIV 侵入阻害剤 CD4 ミミック誘導体を合成し、その生物活  
 性について評価した。

【方法・結果】 CD4 ミミックは gp120 と相互作用することで、gp120 に可溶性 CD4  
 結合時と類似した構造変化を誘起する。そこで、gp120 の構造変化に伴い露出する  
 CD4i site を認識する CD4i 抗体 4C11 を用いて、CD4 ミミック誘導体処理した  
 PM1/JR-FL 細胞表面における gp120 の構造変化を解析した。4C11 の結合量につい  
 ては、FITC を結合させた IgG 抗体にて蛍光標識し、FACS にてその蛍光強度を測  
 定した。その結果、芳香環パラ位の置換基およびピペリジン環が gp120 の構造変  
 化に大きく寄与していることが示唆された。また、これら部位への更なる構造活  
 性相関研究について報告する。



ポスター発表 31P-0419

31 日 9:45~15:30

P 会場 ツインメッセ静岡 南館・北館1F 大展示場  
 化学系薬学 (Chemical Divisions) 医薬化学

HIV-1 外被タンパク質の構造変化を誘起する低分子 CD4 ミミック  
 の創製研究

鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 新井 啓之<sup>1</sup>, 落合 千裕<sup>1</sup>, 吉村 和久<sup>2</sup>, 原田 惠嘉<sup>2</sup>, 野村 涉<sup>1</sup>,  
 松下 修三<sup>2</sup>, 〇玉村 啓和<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研,<sup>2</sup>熊本大・エイズ学研セ)



