

## HIV-1 中和モノクロナール抗体の誘導

研究分担者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨 HIV-1 中和抗体を小実験動物において誘導する抗原の開発を目的とした。広域中和エピトープとして知られている gp41 の脂質膜に近い領域（MPER）を標的とするために、HIV-1 様粒子から脂質膜を取り除いた Core-Env を抗原とした。小実験動物としてトランスジェニックラットを使用した。ラット血清による中和アッセイでは、サブタイプ A, AG, B, D の env を有するシュードウイルスに対し、100 倍で中和能を示すものがあった。Core-Env 抗原は、広域中和抗体誘導抗原として有効な可能性がある。

### A. 研究目的

HIV-1 を中和する抗体の誘導を小実験動物において可能とする抗原の開発を目的とした。HIV-1 の広域中和エピトープの一つ、membrane proximal external region (MPER) は粒子脂質膜に埋まっており容易に免疫系への提示が難しい。そこで粒子をディタージェントを含む蔗糖平衡密度勾配法で処理し、Core-Env を分離、抗原として利用した。

### B. 研究方法

HIV-1 の env は糖鎖に富み、抗体の接近を阻害し、さらに膜融合における env の構造変化により、env 自体の変異に加え、中和を難しくしている。gp41 の MPER は既存の広域中和ヒトモノクロナール抗体 2F5, 4E10 の標的であるが、MPER は脂質膜に埋没しているところが多く、抗原提示が難しい。そのため、HIV-1 様粒子からディタージェントにより脂質膜を取り除き、抗原とした。この Core-Env 抗原は MPER が表出しており、宿主膜蛋白が少ない、脂質膜を認識させない、複製サイクルに提示されない中和エピトープを提示するという長所を有する。

免疫抗原として NL4-3 由来の gag 及び各種 env 発現ベクターを 293T 細胞へトランスフェクションして HIV-1 様粒子を得た。HIV-1 粒子中のコアを解析するために、20%蔗糖をクッションに超遠心濃縮後、TritonX-100 を含む 30-80%蔗糖平衡密度勾配法により、Core-Env

を分離した。

ウエスタンブロット解析及び、ELISA による p24 の定量を行った。脂質二重膜を除いた Core-Env、HIV 粒子、Core のみをそれぞれトランスジェニックラットへ CpG DNA をアジュバントとして、皮下に 3 回免疫した血清を得た。HIV-1 サブタイプ A, AE, AG, B, C, D の env 発現ベクターを MAGIC5 細胞からクローニングした分離株クローン DNA から PCR を用いて作成した。ルシフェラーゼをゲノムとして有し、各サブタイプ env を有するシュードウイルスを作成した。各モノクロナール抗体と各シュードウイルスについて、293T 細胞へヒト CD4、CCR5、さらに FcR を発現させ感染価を指標として中和試験を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では特に臨床試料を使用していない。

### C. 研究結果

AG シュードタイプウイルスに対して、血清を入れないレーン（－）に比較し、モノクロナール抗体 2F5, 4E10 による抑制効果が明らかに認められた。また core または免疫前の血清 (pre-core) の感染価への影響は血清をいれない場合と同等であった。これらに比較し、core-env を免疫した血清の感染価に対する抑制効果はあったと考えられた（下図）。他にラットへ core-env を免疫した血清中にサブタイプ A, AG,



## 厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）

## 分担研究報告書

## HIV 感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究

## HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

研究分担者 庄司省三 熊本大学名誉教授、熊本保健科学大学 教授

**研究要旨** 本研究の目的は、HIV の主な初感染部位である粘膜からのウイルス感染を阻止することである。分担研究者は次の4原則を設定し、研究を進めている。エイズワクチン創製の4原則として

1. HIV に対する特異的な粘膜免疫を賦活できること。
2. HIV による免疫破綻を防止できること。
3. HIV の易変異原性に対処できること。
4. 2次免疫応答よりも速い、HIV のスピーディな感染に対処できること。

これまでに、項目 1-3 に関しては昨年度までに報告してきた。本年度は 4 項目である「2次免疫応答よりも速い、HIV のスピーディな感染に対処できること」に対して、Senju vaccine で基礎免疫後、Senju 抗原との一次構造、あるいは高次構造の類似性が存在すると思われる交叉免疫抗原（Wobbling X protein）で免疫することによって、交叉免疫応答が誘導されるため、抗 ENV 抗体と抗 CCR5 抗体が常時誘導できることを ELISA よび FACS 分析により証明できた。さらに、興味深いことに Wobbling X protein を直接基礎免疫することによっても、ENV および CCR5 の第二細胞外ループに結合できる抗体が誘導できることを新たに見いだした。

**A. 研究目的**

現行の抗 HIV 療法 (ART)により、エイズ発症を制御することが可能になったが、一端ウイルスを体内に侵入させてしまうと完全に排除することができない。ART を生涯にわたり継続しなければならぬことは、患者の心身への大きな負担となるばかりでなく、経済的負担も大きい。このことから、ART による HIV-1 感染後のウイルスの制御のみならず、ワクチンによる予防効果によって HIV-1 感染拡大を防ぐことは、厚生労働行政の観点からも重要になる。

そのような背景から研究分担者は、HIV-1 の伝播阻止を目的とした HIV 感染防止粘膜ワクチンの開発を目指している。その際、研究分担者は 1) 初発感染部位である粘膜に特化した粘膜免疫系の賦活、2) 免疫系の破綻の防止、3) 免疫攻撃からの逃避するウイルスへの対応、4) 個体へのスピーディなウイルス感染への対応、の 4 項目を達成することが重要になると考えた。それぞれの課題を達成するために、

- 1) M 細胞標的分子 TGDK によるワクチン抗原の効率的な M 細胞への送達および粘膜免疫の賦活化、
- 2) Rh-cDDR5 によって誘導される CCR5 の第 2 細胞外ループの前半領域である undcapeptidyl arch (UPA) を認識する抗体による CCR5<sup>+</sup>CD4 リンパ球のウイルス感染からの保護、
- 3) native な立体構造を保持した 3 量体 gp140 および変性 gp140 による多種多様な抗体の誘導、および
- 4) 交叉免疫の誘導を利用した抗体価の維持、を手段とすることを考えている。

本年度は、抗 ENV 抗体および抗 UPA 抗体を誘導できる交叉免疫抗原を用いてブーストすることにより、個体へのスピーディなウイルス感染への対応が可能であるかを検討した。

**B. 研究方法**Senju vaccine の調製

コア抗原（高分子 PEG）に TGDK、Rh-cDDR5、CpG-ODN、SIVmac239 gp140 を共有結合によってコ

ンジュゲートさせた (Fig. 1)。経口投与させるために、すべてをコンジュゲート後、溶液中に賦形剤として乳糖を加え凍結乾燥し得られた粉末を腸溶性カプセルに封入した。

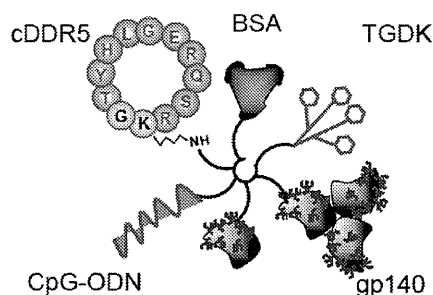


Fig. 1 Senju vaccineのモデル

Senju vaccine、Senju vaccine 誘導體、交叉免疫抗原のアカゲザルへの皮下免疫及び採取したサンプルの調製

抗原の皮下免疫は雌アカゲザルの鼠径部への皮下注射にて行った。対照群として PEG3500 を使用した。

初回免疫前から血清、糞便を回収し、血清は血液を採取後分離し、糞便は約 3g をアセトンパウダー化しそれぞれ-80℃で保存した。

ELISA

アカゲザルから回収したサンプルの Rh-cDDR5 及び gp140 に対する抗体の解析は ELISA を用いて行った。ELISA には、一次抗体として採取した血清および糞便抽出液を用いた。

in vitro におけるウイルス感染阻害効果の検討

DEAE dextran を含む SIVmac239 または HIV-1 (JR-FL 株、LAV 株)に、分子量 100,000 cut の透析膜で透析したアカゲザルの血清、Protein A で精製した抗体、または糞便抽出溶液を前処理し、カニクイザル由来 HSC-F 細胞またはインジケーター細胞である MAGIC-5 細胞もしくは Tzm-bl 細胞に接種した。なお、抗 Rh-cDDR5 抗体のみの効果を検討するために gp140 抗原を、一方、抗 gp140 抗体のみの効果を検討する場合は Rh-cDDR5 を前処理した。感染阻害の

評価は proviral DNA 量を qPCR assay で行う方法と、MAGIC-5 assay および Luc assay をおこなった。

(倫理面への配慮) 動物実験は熊本大学実験動物倫理委員会の指針に則って動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に最大限努力し行なった。

**C. 研究結果**

交叉免疫抗原による抗 ENV 抗体の誘導

鼠径部へ Senju vaccine を皮下免疫した雌アカゲザルに、交叉免疫抗原を接種し(Day 742)、血清中に誘導された抗 gp140 抗体の誘導を western blotting で確認した (Day 749, Fig. 2)。交叉抗原は、基礎免疫抗原とは構造的に全く異なる以下のような特徴を有する (55kDa (SDS-PAGE), Amino acid residues:~ 350 residues, N-linked glycosylation site : 3, O-linked glycosylation site : 3, Ser-phosphorylation site: 4, Disulfide bridge : 6)。Fig. 2 に示すように NIH AIDS research and Reference Reagent Program より分与いただいた SIVmac239 Envelope protein に反応する抗体が交叉免疫抗原による boost によって誘導されることが判った。

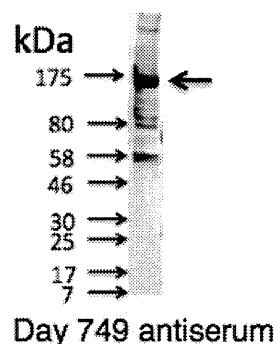


Fig. 2 交叉免疫抗原ブーストによる抗 gp140 抗体の誘導

交叉免疫抗原の立体構造は現在までに明らかにされていないために、その一次配列を SIV gp120 の一次配列とアラインメント後、相同部位を SIV gp120 の立体構造上に黄色でハイライトすると Fig. 3 のようになる。交叉抗原のブーストによって抗 ENV 抗体を誘導できる可能性として ENV の V1-V2 領域に相同

性の高い領域が集積していることが判る。交叉抗原は、このような V1-V2 領域を構造的にミミックしている可能性がある。

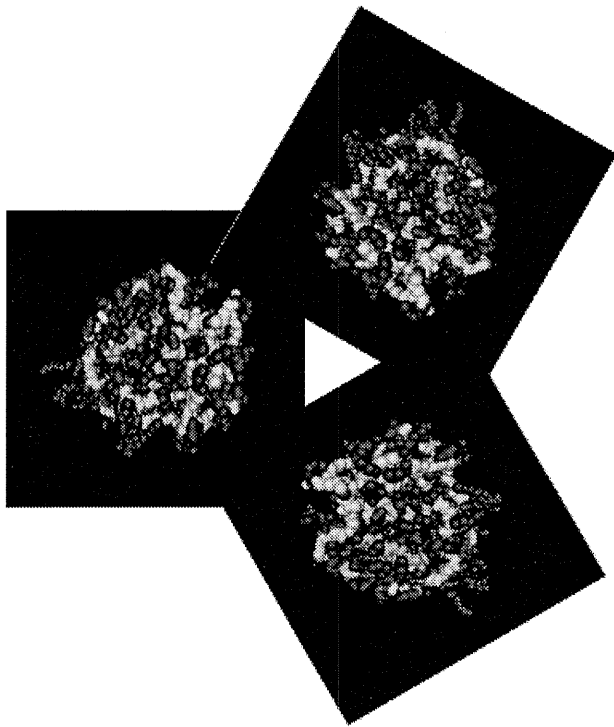


Fig. 3 交叉抗原と ENV タンパク質の相同性部位

#### 交叉免疫抗原によるプライミングとその効果

実際に交叉抗原によって抗 ENV 抗体と抗 CCR5 抗体を誘導できるのかを確認するために、コア抗原 (高分子 PEG) に TGDK と交叉抗原を共有結合によってコンジュゲートさせた抗原を調製した(Fig. 4)。

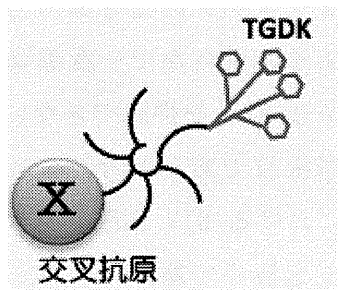


Fig. 4 TGDK ラベル交叉抗原

実際に、鼠径部に一頭あたり交叉抗原 1mg 相当の TGDK ラベル交叉抗原を免疫し、得られた抗血清中に ENV および CCR5 に対する抗体が誘導されている

かを検討したところ、交叉免疫抗原を接種した個体において抗 ENV 抗体と抗 CCR5 抗体が誘導されていることが判った(Fig. 5)。

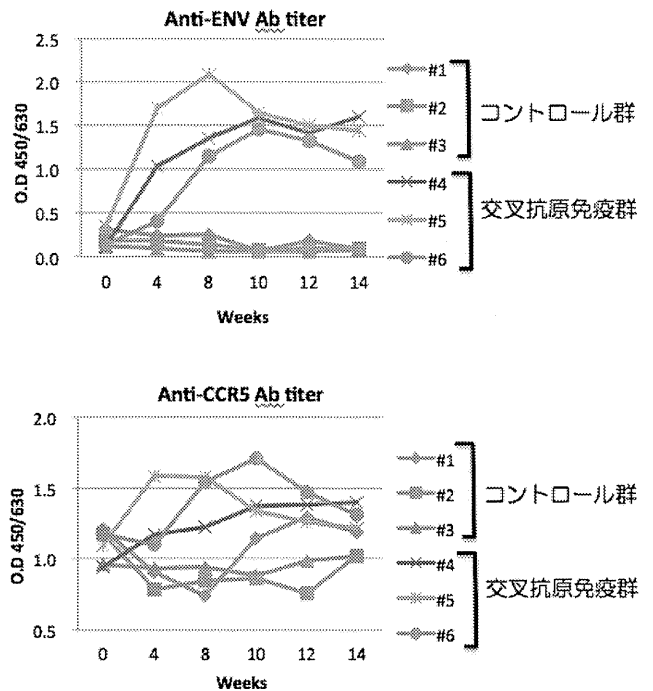


Fig. 5 抗 ENV 抗体と抗 CCR5 抗体の誘導 (ELISA)

最後に、誘導されている抗体が実際に ENV および CCR5 を認識しているかを FACS により解析した。

Fig. 6 に示すように、コントロール#2 および交叉免疫をされた#5 のサル の 4 週目の抗血清から IgG を精製後、SIV ENV 発現細胞として SIVmac239/CEM×174 細胞、サル由来の CCR5 発現細胞として HSC-F を用いて市販の抗 ENV 抗体および抗 CCR5 抗体を用いた競合実験を行った。Fig. 6 右に示すように、#5 の 4 週目の抗血清より得られた抗体の ENV 抗原に対する結合は、抗 gp130 抗体によって特異的にその結合が阻害され、ピークが左にシフトすることが判った。同様に Fig. 7 に示すように、#5 の 4 週目の抗血清より得られた抗体の CCR5 に対する結合は、抗 CCR5 抗体によってその結合が阻害され、ピークが左にシフトすることが判った。なお、コントロールとして用いた#2 個体から得られた抗体は、ENV および CCR5 に対して反応しな

った(Figs. 6 左および7左)。

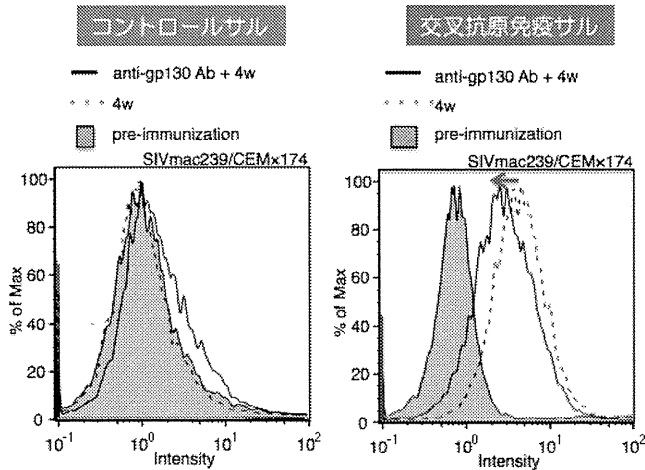


Fig. 6 交叉抗原免疫によって誘導された抗 ENV 抗体の特異性

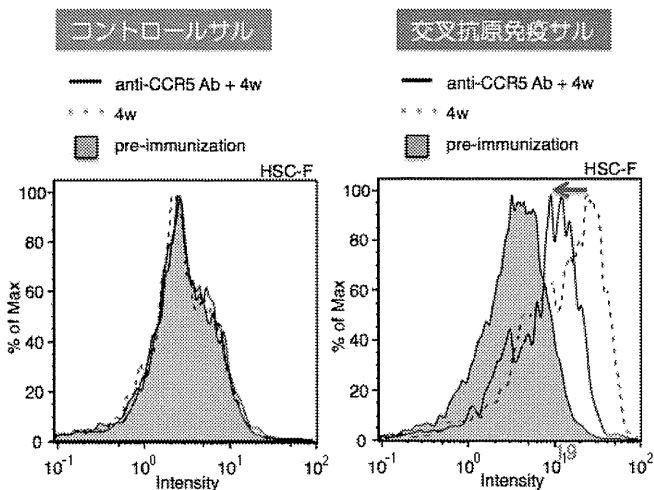


Fig. 7 交叉抗原免疫によって誘導された抗 CCR5 抗体の特異性

#### D. 考察

一般的に交叉免疫応答とは（特にインフルエンザウイルスの場合の例として）、「一つのウイルス株の接種で誘導した免疫応答が、クレードの異なる他のウイルス株に対しても中和活性を示すこと。」を意味するが、我々が考えている交叉免疫応答とは、「HIV-1の構成成分の免疫原性 moiety と構造生物学的にほぼ同じ moiety をもつ全く別の抗原タンパク質等により誘導された免疫反応が種々様々な HIV-1 株に対して結合・中和活性を示す。」こと意味している。分担研究者は、本年度分子量約 55kDa で 3 つの N-linked glycosylation site, と 3 つの O-linked glycosylation site,

さらに 4 つの Ser-phosphorylation site を有する交叉免疫抗原を見だし、実際 Senju vaccine によって基礎免疫された個体から抗 gp140 抗体を誘導させることに成功した。さらに、本抗原は安価に入手できることから Senju vaccine を基礎免疫後、ブーストのための抗原として利用できるほか、TGDK ラベル化後、プライミングする際にも用いることができることが判った。なお、本研究で見いだすことができた交叉抗原は、日常生活の中でも食事等により接種する可能性があることから、Senju vaccine によってプライミング後、定期的にブーストされる可能性があり、HIV が粘膜面に侵入してきた際に、既にウイルスの感染を阻止できるような粘膜免疫応答を誘導できていることが可能になるとと思われる。

#### E. 結論

本年度、個体へのスピーディなウイルス感染への対応として交叉免疫の誘導を利用して、抗 ENV 抗体および抗 CCR5 抗体を粘膜面に維持することが現実的に可能な戦略であることを示すことができた。

HIV は、粘膜から感染する。したがって、ワクチンによる予防効果を期待するのであれば、初発感染部位からの HIV の侵入を抑えることができるようなワクチン開発を本邦でも強力に推進すべきである。現時点で一度感染が成立してしまえば体から HIV を排除できない現実を考えると当然の選択肢であると考えられるが、現状として本邦における HIV 粘膜ワクチンの開発は世界的に見ても極めて遅れている。本研究は、本研究班で唯一粘膜を標的としたワクチン開発を実際に推進してきたものである。今後粘膜を標的としたワクチンを臨床開発へと発展させることを前提に、本邦での霊長類を用いた大規模な安全性試験の実施が行えるような、たゆまぬ国家レベルのサポートによる研究開発を図ること

が極めて重要で、HIV 粘膜ワクチンによる予防効果によって HIV-1 感染拡大を防ぐことは、厚生労働行政の観点からも極めて重要になると提言したい。

び M 細胞標的分子 TGDK の大量合成法に関して、それぞれ特許出願をおこなった(特願 2011-177385, 特願 2011-175781)。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takamune N, Irisaka Y, Yamamoto M, Harada K, Shoji S, and Misumi S.  
Induction of extremely low protein expression level by fusion of C-terminal region of Nef. *Biotechnology and Applied Biochemistry* (2012) in press.

### 2. 学会発表

1. HIV に対する粘膜免疫応答を誘導するワクチンの開発  
八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三  
第 10 回 次世代を狙う若手ファーマバイオフォーラム PBF2011 講演要旨集 p. 34  
2011/10/8-9 仙台
2. 交叉免疫抗原を介した抗 CCR5 抗体と抗 Env 抗体の誘導  
八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三  
日本エイズ学会誌 Vol. 13, No.4, p352, 2011  
2011/11/30-12/2 東京
3. HIV 感染抵抗者から学ぶ HIV ワクチン創製  
八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三、  
平成 23 年度日本薬学会九州支部大会講演要旨集 p.46 2011/12/10-11 福岡

## G. 知的財産権の出願・登録状況

Wobbling X protein (Molecular Mimicry Antigen)およ

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授

研究要旨 我々は有機合成化学を巧みに用いて、以前ワクチン創製であまり取りあげられなかった以下の3種をターゲットとして設定し、人工抗原分子を作製し、また、新規阻害剤を7種創製し、その評価を行っている。抜粋すると、1) HIV 表面蛋白 gp41 の立体構造変化をターゲットとして設定し、gp41 のC 端側ヘリカル領域の断片ペプチド C34 に親水性領域を付与し、膜融合の中間体構造である3量体を形成するようにアッセムブリーした形で化学合成した。このC34 の3量体は単量体と比べ100倍高い阻害活性を有しており、またワクチンとしてもマウスで中和抗体の誘導に成功した。また、gp41-N36 3量体構造を模倣した抗原分子をHIV 感染モデルラットで免疫し、抗体を誘導した。2) 宿主細胞側のコレセプターCXCR4 のN 端領域および2種の細胞外ループ (Ec11-Ec12) を人工テンプレート上に構築した分子を合成し、マウスに免疫し、抗体誘導を行った。いくつかの抗体は中和活性を示した。3) 宿主側のCD4 の小分子mimic の構造活性相関研究を行った。その際、HIV 侵入の阻害活性とgp120 構造変化の誘起効果を評価した。4) Vpr の断片から見出したインテグラーゼ阻害ペプチドのヘリックス増強ミメティックを合成し、構造活性相関を展開した。5) 抗HIV 活性があることを見出しているMatrix タンパクの断片に細胞膜透過性配列を付加したペプチドの構造活性相関研究を行った。

## A. 研究目的

エイズに関して現在までにワクチン創製の研究がかなり精力的に行われてきたが、根本的な治療法の確立には至っていない。我々はワクチン作製に対して、従来の概念とは全く異なる方向から図1に挙げた3種類のアプローチすることにした。1)あまり研究されていなかった標的細胞へのHIV の侵入時の立体構造変化に関わる蛋白 gp41 を認識する抗体を作製することにした。従来は、HIV 表面蛋白 gp120 上の表面に露出した領域を抗原としていることが多かった。しかし、ここ数年のHIV の標的細胞への侵入機構、種々の蛋白質が複雑に相互作用する動的超分子機構とよばれるメカニズムが明らかになってきたことにより、立体構造変化を起こ

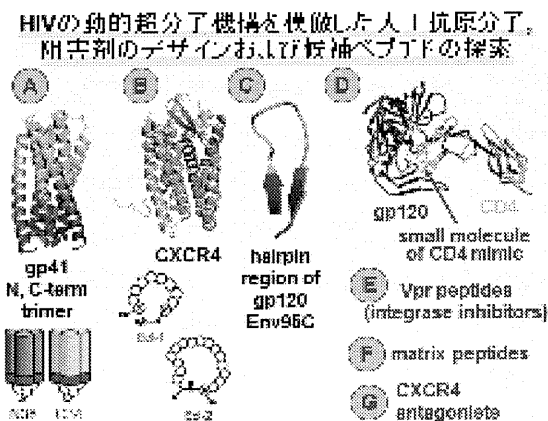
す蛋白をターゲットとし、構造変化の中間体を有機化学的に再構成した人工分子を抗原とすることにした。具体的には gp41 の3量体ヘリカル構造である。2) 一般のワクチンの常識では、抗原分子のターゲットとしてウイルス外皮蛋白等を基盤とするのが一般のワクチンの常識であるが、我々のワクチン創製のターゲットとしては常識にこだわらなかった。すなわち、標的細胞側のコレセプター(第二受容体)にターゲットを設定した。この利点として、レトロウイルスは非常に変異しやすいので、ワクチンによって誘導される抗体は変異してしまったウイルスを効率よく認識することができなくなるが、標的細胞側(宿主ヒト側)を抗原としてワクチンを作製した場合、宿主蛋白質は変



異しないと考えられるので、ワクチンが徐々に効かなくなるということがない。しかし、レセプターの生理的な作用をブロックすることによる副作用の可能性に十分注意しなければいけない。実際、具体例としてコレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を取りあげ、環化&構造固定化したペプチドミメティックを合成し、効率的な抗体誘導をはかることにした。3) 今まで多大な数のワクチンを作製したが、成功しなかった原因のひとつとして、gp120 のある領域の部分ペプチドを抗原として用いていた (中和抗体のエピトープはβ-ヘアピンループ構造を取っていることが多い) ために、この部分ペプチドがもとの gp120 上での本来の立体構造を再現できていなかった (もとのヘアピン構造を保持できなかった) ということが考えられる。そこで本研究では、いままでも鎖状ペプチドをベースに抗原として使い、鎖状を環状にし、立体構造を固定化したペプチドミメティックを合成した。具体的には、長期未発症の HIV 感染者の間で、CD4 binding/コレセプター-binding 領域が中和抗体のエピトープとして高く保存されている断片ペプチドを取りあげた。また、この領域はβ-ヘアピンループ構造にあたる領域であり、これまで鎖状のペプチドでは効率的に抗体が誘導できなかったため、β-ヘアピンループ構造を提示できるように環状構造に固定化したペプチドミメティックを合成した。

図1 3種のアプローチによるエイズワクチンおよび4種の HIV 阻害剤のデザイン

4) HIV-1 の gp120 が宿主細胞の CD4 と、ケモカインレセプター CCR5 もしくは CXCR4 のいずれかへ結合することにより、HIV は宿主細胞へ侵入する。そこで、CD4 の小分子 mimic 誘導体を合成し、HIV 侵入の動的超分子機構への影響や中和抗体等との併用の効果を検討した。また、CD4 mimic と CXCR4 アンタゴニスト T140 との hybrid を合成した。5) HIV に感染すると数年の無症候状態を経て、体内で徐々にウイルス数が増え、ゆっくり免疫不全を引き起こすので、宿主に寄生している期間が非常に長い。すなわち、HIV 自身の生命システムに、急激なウイルス数の増加を抑制するようなフィードバックシステムが備わっていると考えられる。本来ウイルスを構成する蛋白質にこのような自身の複製を抑制する機能をもった部分ペプチドが内在しているとも考えられる。すなわち、HIV 構成蛋白質全体ではもちろん抗 HIV 活性を持たないが、それに含まれる部分ペプチド断片に抗 HIV 活性がある可能性がある。その中で宿主 DNA にウイルス RNA の逆転写産物を挿入する酵素であるインテグラーゼが注目されている。これまでに我々は、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により、HIV 自身の遺伝子産物 Vpr の部分ペプチドからペプチド性インテグラーゼ阻害剤を見出している。この阻害活性を示すアミノ酸配列はタンパク質中で α-ヘリックス構造を形成しており、阻害活性の発現にはこの二次構造が重要であると示唆されている。また、見出された阻害ペプチドに細胞膜透過モチーフ octa-arginine を付加したペプチドは、細胞を用いた抗 HIV 活性試験で、HIV 複製を抑制した。しかし、octa-arginine はカチオン性が



非常に高く、細胞毒性を示すことが知られている。近年、二次構造を維持した状態のペプチドを共有結合で架橋することにより、細胞膜を透過することができるステイプルペプチドが報告されている。さらに、このステイプルペプチドは生体内の酵素にも安定であり、新しいペプチド医薬として期待されている。そこで、このペプチド性インテグラーゼ阻害剤をリード化合物として、生体内安定性や細胞膜透過性の向上を目的としたステイプルペプチドの構造活性相関研究を行うことにした。6) さらに、生体構成蛋白である細胞外マトリックスであるラミニンやフィブリンなどの高分子の蛋白質でも部分ペプチドに親分子とは違う活性があるものが報告されている (Kasai S, et al. *Biochemistry*, 46(13), 3966-3974, 2007)。そこで、matrix 断片と capsid 断片に細胞膜透過性配列を付加したペプチドより抗 HIV 活性を有する配列を探索した。7) 我々が以前から研究しているリード化合物、および既存の低分子アンタゴニストを構造上コンビネーションさせ、より有用な CXCR4 拮抗剤を分子設計した。以上これら 7 種のアプローチによりワクチン創製および抗 HIV 剤の創製を目標とした。

**B. 研究方法**

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(N および C 端側) 3 量体の合成と抗体誘導

N 端側 N36 の 3 量体はおよび C34 3 量体は前年度までに合成を終了している (図 2)。gp41 の N 端側に存在するヘリカル領域のペプチド N36 を 3 量体にアッセムブリーするための親水性領域を付加したペプチドをテンプレート上に配置し、3 量体とし抗原分子とした。そして、合成した抗原分子を用いてマウス、ラットにて抗体誘導を検討した。その血清の抗 HIV 活性を評価した。N36 の 3 量体は前年度にマウスでの

中和抗体誘導を確認しているので、HIV-1 感染ラットモデルを使用した (図 3)。

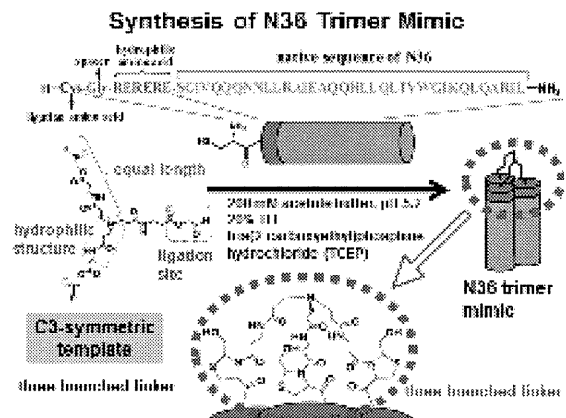


図 2 親水性領域を付加した gp41 の N36 3 量体の合成

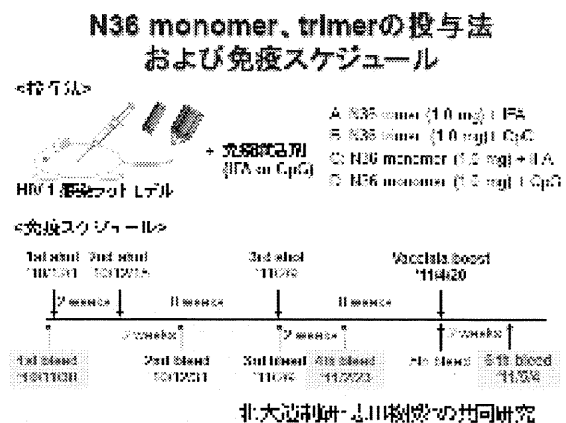


図 3 感染ラットモデルにおける N36 monomer, trimer の投与方法および免疫スケジュール

gp41 の C 端側に存在するヘリカル領域のペプチド C34 を 3 量体にアッセムブリーするための親水性領域を付加したペプチドをテンプレート上に配置し、三量体とし抗原分子とする。C34 天然アミノ酸配列に、水溶性を向上させるため親水性アミノ酸である Arg と Glu の繰り返し配列を付与した。またテンプレートとのコンジュゲーションの際の立体障害軽減のため、スペーサーとして Gly を導入した。さらに C3 対称性テンプレートとのコンジュゲーションに必要なライゲーション部位を導入するために C 末端をチオエステル化した設計とした (図 4)。そ

して、合成した抗原分子を用いてマウスにて抗体誘導を検討する。その血清の抗 HIV 活性を評価する。

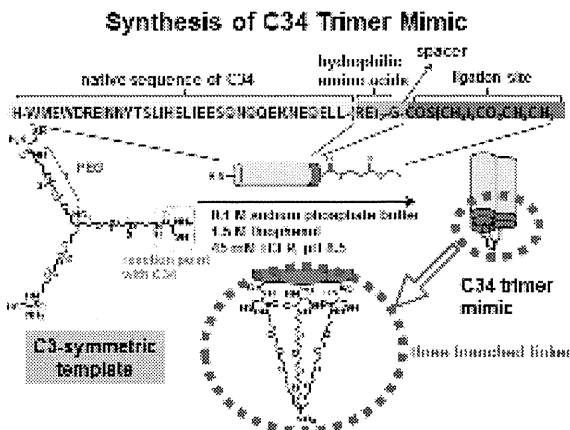


図4 親水性領域を付加した gp41 の C34 3 量体の合成

2) コレセプター CXCR4 の N 末端領域と細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を基にした抗原分子作製 & 抗体誘導

コレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) のみを合成し、Ecl1 については環化し、MAP 等に導入する。Ecl1 に関しては、水溶性の低さを改善するため、図5のように親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列の両端に付与した。また、合成法は2種の方法を採用した。一つめの方法は、Cys を2個導入し、1個は通常の脱保護条件で切断されないように Acm 基で保護した。N 末端にクロロアセチル基、C 末端に Cys(Trt) を導入する形でペプチド鎖を構築し、脱樹脂と脱保護後、Cys のチオール基とクロロアセチル基の反応により環化し、AgOTf によりもう1個の Cys の Acm 基を脱保護し、チオール基が1個フリーの形の環状ペプチドを生成する。これを用いて同様に MAP-テンプレートに導入する。二つめの方法は、Fmoc 固相合成法でペプチド鎖を構築し、脱樹脂後、アミド結合により環化し、側鎖の保護基の脱保護をした。生成した環状ペプチドには、導入しておいた

Cys のチオール基があり、これを用いて MAP-テンプレートに導入する。

MAP の各先端のアミノ基にクロロ (プロモ) アセチル基を導入し、チオール基を有する環状ペプチドを導入する。cyclic Ecl-1, 2 のコントロールとして直鎖ペプチド linear Ecl-1, 2 も合成した。そして、それらを用い抗体誘導実験および ELISA を行った。

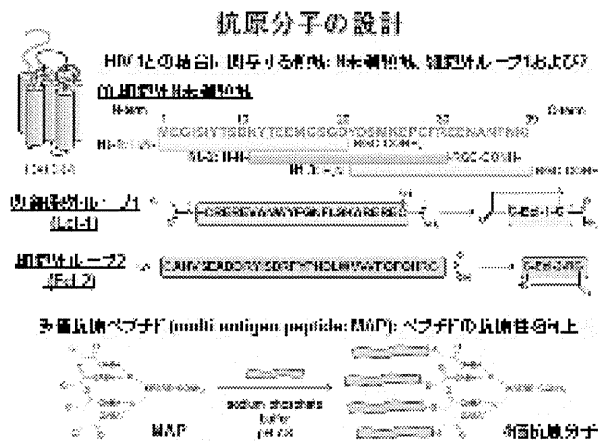


図5 コレセプター CXCR4 の N 末端領域と細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を基にした抗原分子の設計

3) gp120 の CD4 binding/ コレセプター binding 領域を抗原として抗体誘導の検討

長期末発症の HIV 感染者の間で中和抗体のエピトープとして高く保存されている、gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の断片ペプチドを、環化と構造固定化のコンセプトを用いて、前年度までに分子設計し、合成した。コントロールとして鎖状ペプチドも合成し、抗原分子を作製している。前年度までにマウスおよびウサギを用い、抗体誘導を検討したが、効率よく抗体誘導できなかった。そこで、この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから in vitro アフィニティー選択を行い、得られたクローンをもとにモノクローナル抗体を作製した。

4) CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果

NBD-556 に関して、今年度は 2 級アミンの窒素原子に種々の置換基を導入し、構造活性相関研究を行った。合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で評価した。FACS 解析により抗 V3 抗体 (KD-247) や CD4 induced 抗体の envelope への反応性の変化を sCD4 と NBD-556 で比較した。また、細胞毒性を MTT assay で調べた。

5) インテグラーゼ阻害剤

ペプチド性インテグラーゼ阻害剤をリード化合物として、生体内安定性や細胞膜透過性の向上を目的としたステイプルペプチドの構造活性相関研究を行った。側鎖にアリル基を有する非天然アミノ酸としてアルキルタイプとエーテルタイプの側鎖を有する 2 種類のアミノ酸を合成した。それらアミノ酸をリード化合物のペプチド鎖 2 ヲ所にそれぞれ導入し、オレフィンメタセシス反応により架橋し、二次構造を安定化したステイプルペプチドを合成した (図 6)。これらのステイプルペプチドは、天然のペプチドと比べ、ヘリシティ、安定性、プロテアーゼ耐性、細胞膜透過性などの改善を期待できる。これらのペプチドの構造評価のための CD スペクトルの測定、抗 HIV 活性試験、蛍光基を導入したステイプルペプチドを用いた細胞膜透過性実験を行った。

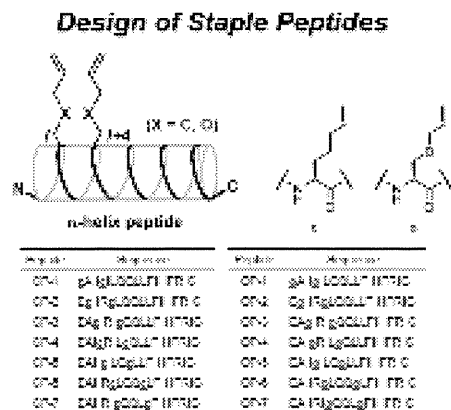


図 6 ペプチド性インテグラーゼ阻害剤をリードとしたステイプルペプチドの設計

6) マトリックスタンパク質、カプシドタンパク質のペプチド断片

マトリックス (MA) タンパク質は、MA 同士の相互作用、あるいは他の蛋白質との相互作用によりウイルス粒子を形成するので、複製をコントロールしていると考えられている (Cannon PM, et al. *J. Virol.*, 71(5), 3474-3483, 1997)。この MA の蛋白質相互作用をターゲットとし、抗 HIV 活性を有するペプチド配列を探索する。MA は 132 個のアミノ酸残基からなる蛋白質であり、主に  $\alpha$ -ヘリックス構造から構成されていることから、部分ペプチドは  $\alpha$ -ヘリックス構造を保持できるように 15 残基のアミノ酸ごとに分割し、また、分割点に活性モチーフが含まれる可能性を考慮し、部分ペプチドごとに 5 残基のオーバーラップを設け、MA を計 13 個の部分ペプチドとして設計する。さらに、各 MA 部分ペプチドの C 末端に Gly-Cys 配列を追加し、クロロアセチル基を有する細胞膜透過シグナル Octa-Arg を付加し、細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーを構築した (図 7, 8)。カプシド (CA) タンパク質についても、同様にライブラリーを用いて、抗 HIV-1 活性および細胞毒性試験を行った。

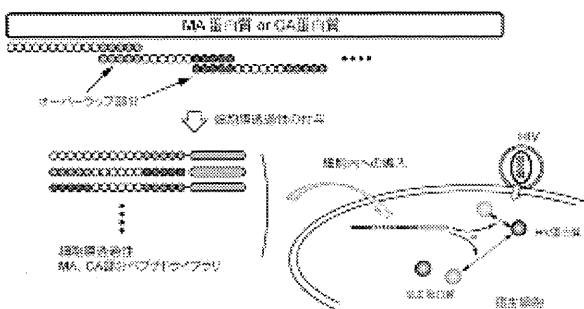


図 7 MA タンパク質および CA タンパク質断片からの抗 HIV 剤のデザイン

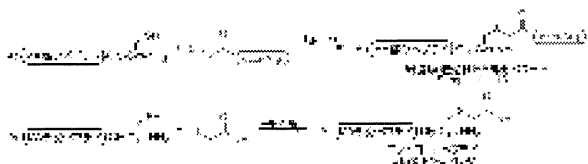


図 8 細胞膜透過性 MA 部分ペプチドおよびコントロールペプチドの分子設計

7) CXC4 アンタゴニスト

AMD3100 と二核鉛錯体をリード化合物として、キシレン骨格をテンプレートとし含窒素環状構造やピペリジン構造を配位としてライブラリーを構築した。そして、そのライブラリーを用いて抗 HIV 活性を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

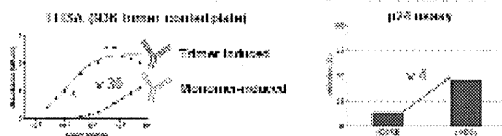
C. 研究結果

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(N および C 端側)3 量体の合成と抗体誘導

N36 の 3 量体は前年度までに合成を終了している。また、マウスで免疫し N36 の 3 量体を認識する抗体が誘導できたことを ELISA で確認し、N36 の 3 量体で免役して得られた血清は 3 量体の特異的に認識することを見出している。その得られた抗体の中和活性を評価したところ、単

量体で免役して得られた血清と比較したところ、強い中和活性が得られた (図 9)。gp41-N36 3 量体構造を模倣した抗原分子を HIV 感染ラットモデルで免疫し、抗体を誘導した (図 10, 11)。

N36 Trimerのワクチンとしての有効性評価



Trimer-induced antibodies showed 30 times higher affinity for trimer. Trimer induce antibodies with neutralizing activity superior to Monomer.

N36 Trimerの阻害剤としての有効性評価

	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (μM)
AZT	1.147	> 50
3TPA16 (Monomer)	1.4	> 10
3TPA16 (Trimer)	0.45	> 1

MFI assay in M1 cells using HIV-1 (NL4-3 strain)

図 9 N36 trimer のワクチンおよび阻害剤としての有効性評価

Serum titers (ELISA)

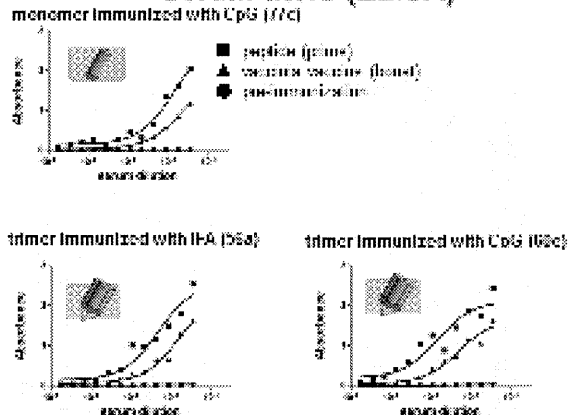


図 10 HIV 感染ラットモデルに N36 monomer, trimer を免疫したときの抗体誘導

立体構造を特異的に認識する抗体の誘導

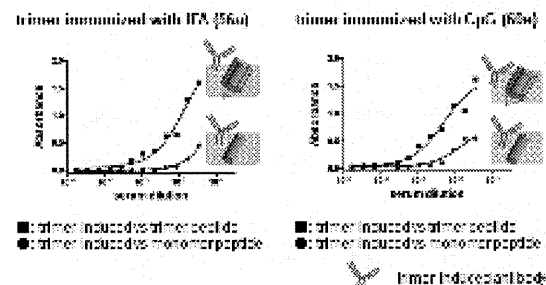


図 11 図 10 で得られた抗体の立体構造特異性の評価

今年度 gp41 の断片 (C 端側) C34 の 3 量体を合成した。人工テンプレートと親水性領域を付加した C34 peptide (CysGly-ArgGluArgGluArgGlu-C34) を化学合成し、C34 peptide の 3 量体の構築に成功した。HPLC で純度を確認し、MS で 3 量体形成を同定した。また、CD スペクトルを測定し、テンプレート上に 3 個配置させた C34 ではランダムコイル構造の割合が減少した。さらに、N36 peptide 存在下で C34 の 3 量体では 6-helical bundle を形成しにくいことが示唆された。また、マウスで免疫し C34 の 3 量体を認識する抗体が誘導できたことを ELISA で確認し、3 量体で免疫して得られた血清は 3 量体を特異的に認識することを見出した (図 12)。その得られた抗体の中和活性を評価したところ、強い活性が得られた (図 13)。

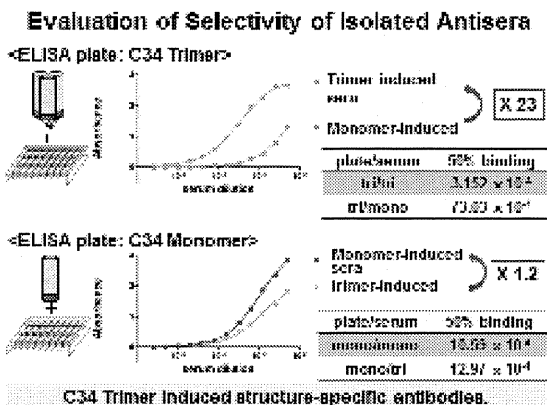
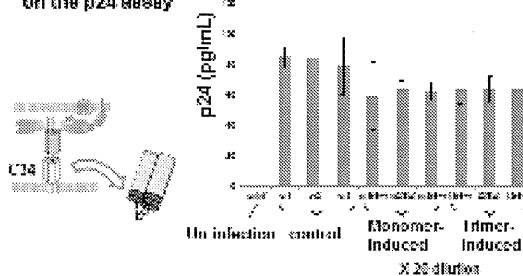


図 12 マウスに N36 monomer, trimer を免疫したときの抗体誘導と得られた抗体の立体構造特異性の評価

また、ワクチンとしてではなく阻害剤としての作用を評価した。C34 3 量体は単量体に比べ、TZM-bl 細胞-luciferase signal 評価を用いる侵入阻害活性で 100 倍、MT-4 細胞-p24 発現評価を用いる複製阻害活性で 20 倍、活性が高かった (図 14, 15)。

**Anti-HIV Activity of Induced Antibodies**

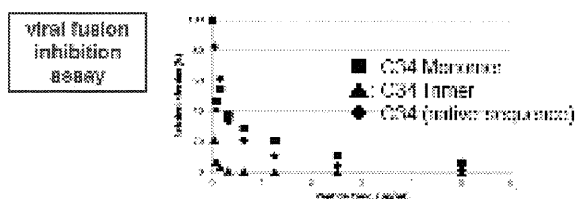
evaluation of HIV inhibition by produced antibodies on the p24 assay



C34 Trimer- or Monomer-induced antibodies have significant inhibitory activity.

図 13 得られた抗体の中和活性評価

**Anti-HIV Activity of C34 Antigenic Peptides (1)**



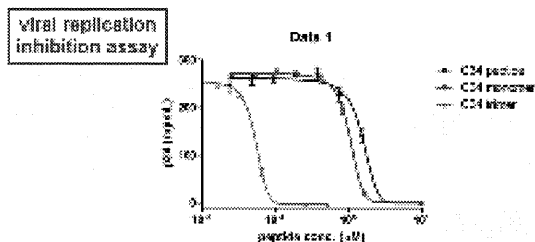
Infection percentages are based on luciferase activity in TZM-bl cells infected with HIV-1 (NL4-3 strain).

	C34 Monomer	C34 Trimer	C34
$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	0.745	0.025	0.286
$IC_{50}$ (nM)	745	25	286

x 100

図 14 C34 monomer, trimer の HIV 侵入阻害活性評価

**Anti-HIV Activity of C34 Antigenic Peptides (2)**



$IC_{50}$  values are based on production of p24 in MT-4 cells infected with HIV-1 (NL4-3 strain).

	C34 Monomer	C34 Trimer	C34
$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	1.06	0.0547	1.50

図 15 C34 monomer, trimer の抗 HIV 活性(複製阻害)評価

2)コレセプターCXCR4のN末端領域と細胞外ループ(Ecl1-Ecl2)を基にした抗原分子作製&抗体

誘導

Ecl に関して、水溶性の低さを改善するため、親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列の両端に付与した。研究方法の 1) で述べた、2 種類の合成法を用いて、CXCR4 の細胞外ループを合成し、環化し、エピトープ提示のためのテンプレートへ導入した。それぞれの方法で合成した Ecl-1&2 領域の環化ペプチド、liner Ecl-1&2 ペプチドを HPLC チャートで純度を確認し、マスペクトルで同定した。得られた抗原分子をマウスに投与し、ELISA によって抗体価の上昇を確認した。その結果、右上の Nt-1 では抗原分子を投与する前の血清と比較して顕著な抗体価の上昇が見られた。一方、左下の Nt-2 では MAP に導入した 4 価抗原分子でも抗体価は上昇しなかった。Nt-3 は単量体では抗体価が低かったのに対し、MAP に導入することで抗体価が上昇した(図 16)。以上の結果から、Nt-1 は最も高い抗原性を有し、MAP に集積させた Nt-3 はそれに次ぐ抗原性を示すことが明らかとなった。

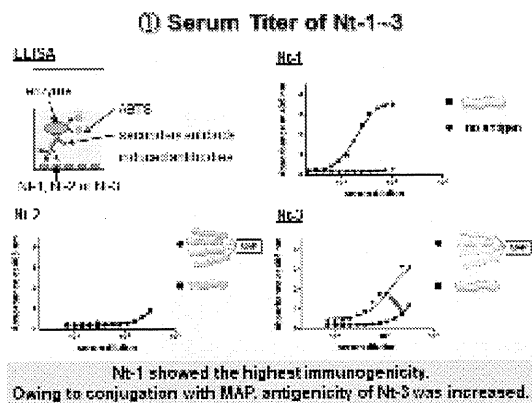
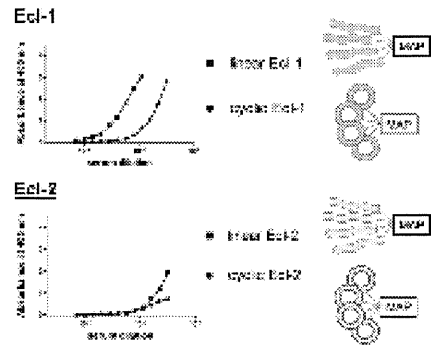


図 16 得られた抗原分子(N 末端領域)のマウス免疫による抗体誘導の評価

環化 Ecl-1 および 2 と、その比較実験として直鎖の Ecl-1 および 2 についても同様にマウスに投与し、得られた血清を用いて ELISA を行った。その結果、環状ペプチドよりも直鎖ペプチドの方が抗原性が高いことが明らかとなった(図 17)。

⑧ Serum titer of linear and cyclic Ecls



Linear Ecls showed stronger immunogenicity than cyclic Ecls.

図 17 得られた抗原分子(Ecl-1&2)のマウス免疫による抗体誘導の評価

N 末端領域および細胞外ループ由来の抗原分子を免疫して得られた血清を用いて抗 HIV 活性を評価した結果、Ecl-1 および Ecl-2 の直鎖ペプチドを免疫して得られた血清が顕著な抗 HIV 活性を示した。さらに精査した結果、Ecl-1 では免疫前の血清より免疫後の血清の方が 39% 高い抗 HIV 活性を示し、Ecl-2 では免疫前の血清より免疫後の血清の方が 25% 高い抗 HIV 活性を示した(図 18)。

Anti-HIV-1 Activity (Linear Ecl-1 and Ecl-2)

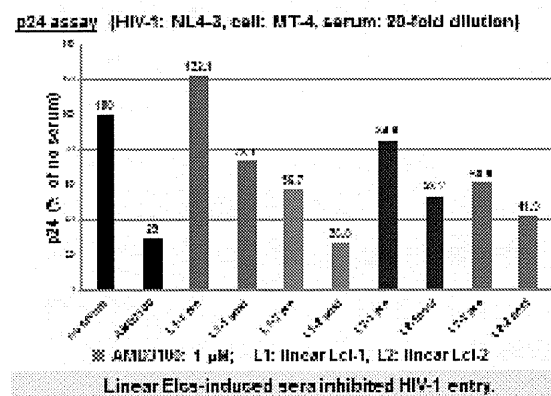


図 18 抗 HIV 活性 (Linear Ecl-1 and Ecl-2)

3) gp120 の CD4 binding/コレセプター binding 領域を抗原とした抗体誘導の検討  
前年度までに、gp120 の CD4/コレセプター binding 領域の環状ペプチドおよび、コトコ

ールとしての鎖状ペプチドを合成している。この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから *in vitro* アフィニティー選択を行い、アフィニティーを持ったクローンが得た。gp120 のヘアピン領域を認識するモノクローナル抗体得た。

#### 4) CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果および CD4 mimic と T140 との hybrid の合成

CD4 mimic 誘導体に関して、ピペリジン環部のテトラメチル基除去、2 級アミンの窒素原子への種々の置換基の導入による影響を調べた。合成した化合物の FACS 解析により gp120 構造変化誘起能を調べた。その結果、テトラメチル基除去による gp120 構造変化誘起能への影響は見られなかった。

次に、CD4 mimic 誘導体において、ピペリジン環および二級アミンを用いた gp120 構造変化誘起能に関する構造活性相関を調べた。その結果、有意な gp120 構造変化誘起能が見られた誘導体は共通してピペリジン環構造を有していた。ピペリジン環上の窒素原子を修飾したところ、すべてにおいて毒性の低下が見られた。また、窒素原子自体は修飾せず、その周りを嵩高くしたところ、毒性が低下した。よって、窒素原子上の水素原子が、毒性に大きく関与していることが示唆された。

フェニル部位には適度な大きさが必要であるが、インドールのような大きな芳香環を持つ化合物では、抗 HIV 活性が低下した。また、フェニル基をピリジニル基に変えても、抗 HIV 活性は大きく低下した。

#### 5) インテグラーゼ阻害剤

細胞膜透過性ペプチドを付与した LQQLLF モチーフペプチドの IN 阻害活性ペプチドのアラニンスキャンによる IN 阻害活性に重要なアミ

ノ酸残基を同定することにより Phe6, Ile7, Phe9, Ile11 が阻害活性の発現に重要であると考えられる。今年度、抗 IN 活性を示す Vpr 由来のペプチドに、2 種類の非天然アミノ酸を導入し、ステイプルペプチドを合成した。側鎖に酸素原子を含んでいる非天然アミノ酸の方が高い親水性を示したが、酸素原子を含んでいる事により、オレフィンメタセシス反応の効率が大幅に低下した。このことから、ステイプルペプチドを合成するには、アルキルタイプ非天然アミノ酸の方が適していると考えられる。また、CD スペクトル測定の結果より、WT を含め、合成したペプチドは高い  $\alpha$ -ヘリックス性を有していた。さらに、側鎖を架橋していないリニアペプチドよりも側鎖を架橋したステイプルペプチドの方がより高い  $\alpha$ -ヘリックス性を有していた。

抗 HIV 活性試験の結果では、CP-4S、CP-4L のみが活性を示した。しかし、現在まだ抗 IN 活性試験の結果が出ていないため、これらのペプチドのみがインテグラーゼと相互作用し、その機能を抑制するのか、または、これらのペプチドのみが細胞膜を透過するのか把握することが出来ない。そこで、今後、蛍光基を導入したステイプルペプチドを合成し、各ペプチドの細胞膜透過性を検討することにした。

#### 6) マトリックス蛋白のペプチド断片

前年度までに見出した Matrix 断片ペプチド由来の抗 HIV 活性リード化合物に関して、さらに精査することにより、MA fragment 9L が最も抗 HIV - 1 活性が高いことを確認した。また、含有アミノ酸をランダムにシャッフルさせた配列 9R-L で活性が見られないことを見出し、アミノ酸配列の順番が重要であることを示した。MT-4 細胞における細胞毒性を調べたところ、Octa-Arg と 15mer peptide の構成成分の影響で細胞毒性が発現されること



### 別紙 3

が示唆された。また、MA 部分ペプチドに細胞膜透過性を付与することによって細胞毒性を示さない濃度で HIV-1 の複製を阻害することができると考え、エンドソーム阻害剤クロロキンの添加によって、細胞毒性に影響を与えずに抗 HIV-1 活性を数倍増強することに成功した。このように、HIV-1 MA 由来のペプチドは抗 HIV-1 ペプチドのターゲットとして有用であり、これらを基にした抗 HIV 薬の開発が可能であることが示唆された。HIV-1 CA に関しても同様なライブラリーを構築中であり、合成を終了したものの中から CA 由来抗 HIV-1 ペプチドを見出した。

#### 7) CXCR4 アンタゴニスト

二核亜鉛錯体、大環状アミン等のヘテロな配位子を有する化合物は AMD3100 とほぼ同等の抗 HIV 活性を示した。これらは、低分子 CXCR4 アンタゴニストの新規リード化合物として有用である。

### D. 考察

エイズワクチン開発のためアプローチした 3 種のターゲットはいずれについても、創薬化学・ペプチド合成の巧みな技術を用い、抗原分子等を順調に合成できた。実際のマウスでの免疫による抗体誘導の実験に加え、感染ラットモデルを使った免疫も行った。

#### 1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド

親水性領域を付加した N36 3 量体および C34 3 量体のマウスでの中和抗体誘導に成功し、今後最適化を検討することにより、有用なワクチンになる可能性がある。現在、gp41-N36 3 量体構造を模倣した抗原分子を HIV 感染モデルラットで免疫している。また、阻害剤として C34 trimer は C34 monomer より強い抗 HIV 活性を有することが明らかとなった。

#### 2) コレセプター CXCR4 の N 末端領域と細胞外ループ (Ecl1-Ecl2)

cyclic Ecls よりも linear Ecls の方が高い抗原性を示し、得られた血清が抗 HIV-1 活性を有した。

#### 3) gp120 の CD4 binding/ コレセプター binding 領域

Fab ファージディスプレイライブラリーから、gp120 のヘアピン領域を認識するモノクローナル抗体得た。

#### 4) CD4 mimic 誘導体

CD4 mimic 誘導体のピペリジン環の窒素原子周辺、およびフェニル部位の構造活性相関を行った。高い抗 HIV 活性、高い gp120 構造変化誘導能を有する新規誘導体を見出した。

#### 5) インテグラーゼ阻害剤

ステイブル化により、高い IN 阻害活性を有する Vpr 断片ペプチドを見出した。これにより、ペプチドミメティックとしての有用性を示した。

#### 6) マトリックス蛋白のペプチド断片

Matrix 断片に細胞膜透過性配列を付加したペプチドの最適化を行い、活性配列も見出した。今後新規抗 HIV 薬への展開が可能であることが示唆された。

#### 7) CXCR4 アンタゴニスト

Privilege structure として xylene 骨格を有する CXCR4 アンタゴニストを見出し、有用な低分子の新規リード化合物になると考えられる。

## E. 結論

1) 合成した gp41 N36 trimer を用いて、HIV-1 感染ラットモデルに免疫し抗体誘導実験を行った。合成した gp41 C34 trimer はマウスで中和抗体を誘導した。C34 trimer は monomer よりも 100 倍強い HIV 侵入阻害活性を示した。

2) CXCR4 の細胞外領域由来のペプチドを合成し、マウスを用いた抗体誘導実験により、抗体を誘導することが明らかとなった。N 末端領域においては 1 残基目の Met から 10 残基目の Asp、および 31 残基目の Glu から 39 残基目の Ile の 2 つの領域がエピトープになりうると考えられる。また、細胞外ループにおいては、環状ペプチドよりも直鎖ペプチドの方が抗原性が高いことが明らかとなった。さらに、細胞外ループの直鎖ペプチドから誘導された抗血清は HIV-1 の侵入を阻害することが明らかとなった。本研究の結果より、細胞外ループの配列を基に抗原分子設計の最適化を行うことにより、宿主タンパク質由来のエイズワクチンを開発することができると考えられる。各種のターゲットにおいて、人工抗原分子を順調に合成できた。gp41-N36 3 量体および C34 3 量体についてはマウスで中和抗体の創製を確認し、感染モデルラットでも免疫している。コレセプター-CXCR4 の N 端、細胞外ループは効率的な合成を行い、マウスでの評価もを行い、中和抗体の誘導も確認した。

gp120 エピトープもファージでの抗体作製に成功した。また、CD4 mimic 誘導体の抗 HIV 活性および gp120 の構造変化誘起能に関する構造活性相関を行った。これらの結果は今後の HIV 抗体・ワクチン療法の研究において、重要な知見となると思われる。Vpr 断片および matrix、capsid 断片ペプチドより抗 HIV 活性を有する配列を見出し、新規 CXCR4 アンタゴニストも創出した。これらは新規抗 HIV 剤創

製に役立つと思われる。

## F. 謝辞

抗ウイルス活性の測定実験に関して、シンガポール大学、山本直樹教授、大庭賢二博士、国立感染症研究所エイズ研究センター、村上努室長、駒野 淳主任研究官、浦野恵美子博士、北海道大学 遺伝子病制御研究所、志田壽利教授、張 険峰助教、品川雅彦博士、熊本大学エイズ学研究センター、松下修三教授、吉村和久准教授、原田恵嘉博士にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

研究業績

原著論文

- 1) Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura H. Effects of DNA Binding of Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System. *Biochemistry*, in press
- 2) 玉村啓和. ケミカルバイオロジーを基盤とした抗 HIV 剤の創製. *薬学雑誌* (日本薬学会), 131(1)巻 頁 69~78, 2012 年
- 3) Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem*, 7: 205-208, 2012.
- 4) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Tanaka T, Chiba J, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins. *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 1468-1474, 2012.
- 5) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg Med Chem* 19 : 6735-6742, 2011.
- 6) Nomura W, Narumi T, Ohashi N, Serizawa Y, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H. Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C. *ChemBioChem* 12: 535-539,

- 2011.
- 7) Ohashi N, Wataru Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C $\delta$  as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding. *Bioconjugate Chem* 22: 82–87, 2011.
  - 8) Tsutsumi H, Abe S, Mino T, Nomura W, Tamamura H. Intense Blue Fluorescence in a Leucine Zipper Assembly. *ChemBioChem* 12: 691–694, 2011.
  - 9) Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists. *ChemMedChem* 6: 834–839, 2011.
  - 10) Nomura W, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Ikura T, Ito N, Tamamura H. Fluorescence-Quenching Screening of Protein Kinase C Ligands with an Environmentally Sensitive Fluorophore. *Bioconjugate Chem* 22: 923-930, 2011.
  - 11) Hashimoto C, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Tamamura H. The Success and Failures of HIV Drug Discovery. *Expert Opin Drug Discovery* 6: 1067-1090, 2011.
  - 12) Xu C, Liu J, Chen L, Liang S, Fujii N, Tamamura H, Xiong H. HIV-1 gp120 Enhances Outward Potassium Current via CXCR4 and cAMP-Dependent Protein Kinase a Signaling in Cultured Rat Microglia. *Glia* 59: 997-1007, 2011.
  - 13) Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, He M, Suzuki T, Fujino N, Kunishima H, Hata M, Nishimaki K, Aoyagi T, Tokuda K, Kitagawa M, Yano H, Tamamura H, Fujii N, Kaku M. The Increase in Surface CXCR4 Expression on Lung Extravascular Neutrophils and its Effects on Neutrophils During Endotoxin-Induced Lung Injury. *Cell Mol Immunol* 8: 305-314, 2011.
- (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 132-133, 2011.
- 3) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells. *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium*, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 134-135, 2011.
  - 4) Nomura W, Ohashi N, Mori A, Narumi T, Tanaka T, Masuda A, Tsutsumi H, Tamamura H. Novel Tag-probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins in Living Cells. *Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium*, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 40, 2011.
  - 5) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of a Bivalent Ligand for a Chemokine Receptor CXCR4 by Utilizing Polyproline Helix as a Linker. *Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium*, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 220, 2011.
  - 6) Narumi T, Bode JW.  $\alpha,\alpha$ -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of  $\alpha$ -Peptide  $\alpha$ -Ketoacids. *Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium*, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 178, 2011.
  - 7) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of CXCR4-derived Peptides Targeting the Development of AIDS Vaccines. *Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium*, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 103, 2011.

## 著書

- 1) Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Studies for Optimum Design of Artificial Zinc Finger Recombinases by Evaluation of Effects of DNA Binding Affinity and Linker Components on Recombination Efficiency. *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium*, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 130-131, 2011.
  - 2) Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura T. Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins. *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium*, Michal Lebl
2. 学会発表
    - 1) Yamamoto J, Tanaka T, Denda M, Shigenaga A, Nomura W, Tamamura H, Otake A. Design and Synthesis of Traceable Linker for Efficient Enrichment and Specific Labeling of Target Proteins. *22nd American Peptide Symposium*. Southern California, USA, June 25-30, 2011.
    - 2) Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Studies for Optimum Design of Artificial Zinc Finger Recombinases by

- Evaluation of Effects of DNA Binding Affinity and Linker Components on Recombination Efficiency. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25 -30, 2011.
- 3) Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25- 30, 2011.
  - 4) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25-30, 2011.
  - 5) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Yamamoto N, Chiba J, Tanaka T, Murakami T, Tamamura H. Identification of Anti-HIV Peptides Derived from Matrix Proteins. ACS Meeting Fall201, Denver, Colorado, USA, Aug 28 -Sep 1, 2011.
  - 6) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. HIV-1 Co-Receptor CXCR4-Derived Peptides Targeting AIDS Vaccines. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
  - 7) Nomura W, Ohashi N, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. Synthesis of C1b Domains of Protein Kinase C Having Solvatochromism and their Application to Bio-sensing. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
  - 8) Urabe A, Nomura W, Masuda A, Tamamura H. Sequence-Specific Recombination Enabled by a Pair of Zinc Finger Recombinases. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
  - 9) Narumi T, Arai H, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. SAR Study of Small Molecular CD4 Mimics Targeting the Dynamic Supramolecular Mechanism of HIV Entry and Their Hybrid Molecules with a CXCR4 Antagonist. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
  - 10) Arai H, Narumi T, Yoshimura K, Harada S, Aikawa H, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Design, Synthesis and Biological Evaluation of CD4 Mimics Targeting the Interaction with Asp368 and Val430 in Gp120. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
  - 11) Matsushita S, Ramirez K, Maruta Y, Harada S, Yamada Y, Tamamura H, Kuwata T, Yoshimura K. Cross-Subtype Reactivity and Neutralization Activity of a Panel of Human Monoclonal Antibodies Obtained from a Single Donor. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
  - 12) Narumi T, Seike S, Tamamura H. Synthetic Studies on (*Z*) and (*E*)-Chloroalkene Skeltons As Amide Bond Equivalents. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
  - 13) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. SAR Studies of Small Molecular CD4 Mimics Targeting the HIV Entry Mechanism. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
  - 14) Narumi T, Shishido M, Tamamura H. *N*-(Benzoyloxy)sulfonamides-Mediated Aziridination of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Unsaturated Enones. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
  - 15) Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Development of Artificial Recombinases for Genome Editing. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
  - 16) Nomura W, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic Antigens for Induction of Structure-Specific Antibodies against Trimer-Form of gp41. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
  - 17) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. CXCR4-Derived Peptides Targeting AIDS Vaccines. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
  - 18) Narumi T, Nomura W, Tamamura H. Several HIV Inhibitors Targeting Entry, Fusion, Integrase and Matrix. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
  - 19) Narumi T, Kambe C, Nomura W, Tamamura H. Development of Photochemically Removable Protecting Groups in Hydrophilic Environments: Synthesis and Photochemical Property of 8-Azacoumarins. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
  - 20) Yamamoto J, Tanaka T, Denda M, Ebisuno K, Shigenaga A, Nomura W, Tamamura H, Otaka A.