

研究課題: HIV Gag 蛋白質と関連因子の治療標的構造の解明に向けた統合的研究

研究分担者: 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・ケミカルバイオロジーを巧みに用いて、Gag を標的とする治療標的部位の探索、候補因子の特定に関する研究を行っている。本研究の目的は Gag に関連する抗 HIV 活性リード化合物の創出、候補分子の構造活性相関の情報基盤の提供、Gag 機能制圧、等である。今年度の研究成果は、1) カプシドタンパク質(CA)を網羅するペプチドライブラリーをすべて合成した。2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体を合成した。3) 候補化合物の細胞内導入法を検討し、oligo-Arg 技術に加えて、stapling 技術の有用性を見出した。

A . 研究目的

ウイルスタンパク質 Gag からプロセッシングにより生じるカプシド (CA) に着目し、部分ペプチドライブラリーから抗 HIV-1 活性を有する配列を探索し、それぞれの CA 部分ペプチドの抗 HIV-1 活性および細胞毒性について検討を行う。これにより、候補分子の構造活性相関の情報を得、Gag 機能制圧研究をおこなう。

B . 研究方法

1) CA 部分ペプチドライブラリーの設計、合成

全長 231 残基の CA タンパク質を N 末端側から 15 残基ずつに分割し、Sample 1~Sample 23 の CA 部分ペプチドライブラリーを設計した (表 1)。また、この分割の際に活性モチーフの分断を回避するため、5 残基ずつのオーバーラップ部分を設けた。さらに、スペーサーとして Gly, octa-Arg や 2-iodoacetamide との reaction point として Cys を導入した (図 1)。

表 1. CA 部分ペプチドの配列

	Sequence
S1	H ₂ N-PIVQNLQGQMVHQAIGC-CONH ₂
S2	Ac-HN-VHQAISPRTLNAWVKGC-CONH ₂
S3	Ac-HN-NAWVKVVEEKAFSPEGC-CONH ₂
S4	Ac-HN-AFSPEVIPMFSALSEGC-CONH ₂
S5	Ac-HN-SALSEGATPQDLNTMGC-CONH ₂

S6	Ac-HN-DLNTMLNTVGGHQAAGC-CONH ₂
S7	Ac-HN-GHQAAMQMLKETINEGC-CONH ₂
S8	Ac-HN-ETINEEAAEWDRLHPGC-CONH ₂
S9	Ac-HN-DRLHPVHAGPIAPGQGC-CONH ₂
S10	Ac-HN-IAPGQMREPRGSDIAGC-CONH ₂
S11	Ac-HN-GSDIAGTTSTLQEIQIGC-CONH ₂
S12	Ac-HN-LQEIQIGWMTHNPPIPGC-CONH ₂
S13	Ac-HN-NPPIPVGEIYKRWIIGC-CONH ₂
S14	Ac-HN-KRWIILGLNKIVRMYGC-CONH ₂
S15	Ac-HN-IVRMYSPTSILDIRQGC-CONH ₂
S16	Ac-HN-LDIRQGPKEPFRDYVGC-CONH ₂
S17	Ac-HN-FRDYVDRFYKTLRAEGC-CONH ₂
S18	Ac-HN-TLRAEQASQEVKNWMGC-CONH ₂
S19	Ac-HN-VKNWMTETLLVQNANGC-CONH ₂
S20	Ac-HN-VQANANPDSKILKALGC-CONH ₂
S21	Ac-HN-ILKALGPGATLEEMMGC-CONH ₂
S22	Ac-HN-LEEMMTASQVGGPGGC-CONH ₂
S23	Ac-HN-VGGPGHKARVLGC-CONH ₂

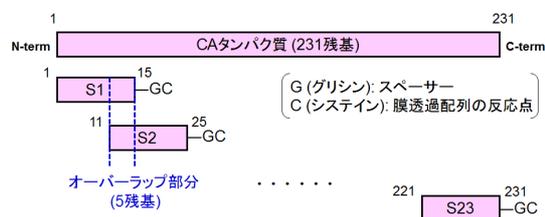


図 1. CA 部分ペプチドライブラリーの設計

CA 部分ペプチドは、Fmoc 固相合成法により合成した。合成の際に NovaSyn® TGR resin (novabiochem 社製) を用いて部分ペプチドの C 末端をアミド化し、最後に N 末端をアセチル化した。固相合成後、TFA によるアミノ酸側鎖の脱保護および脱樹脂を行った。その後、HPLC で精製を行い、ESI-TOF MS により目的物を同定した。合成スキームを図 2 に示す。

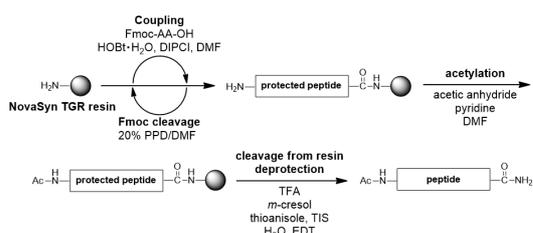


図 2. CA 部分ペプチドの合成スキーム

合成した CA 部分ペプチドを細胞内へ導入するため、細胞膜透過性を有する octa-Arg 配列を付加した (Sample 1L~23L)。octa-Arg の N 末端にあるクロロアセチル基と CA 部分ペプチドの C 末端に導入した Cys のチオール基との化学選択的反応により合成した (ligation)。また、細胞膜透過性 CA 部分ペプチドに対するコントロールとして、C 末端の Cys のチオール基を 2-iodoacetamide でキャッピングしたコントロール

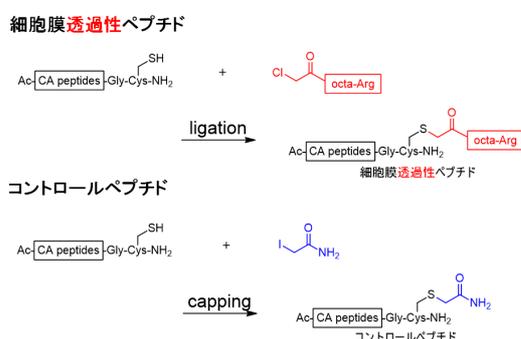


図 3. 細胞膜透過性 CA 部分ペプチドおよびコントロールペプチドの分子設計

ペプチド (Sample 1C~23C) も合成した (capping) (図 3)。

2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成

S9, S10 は CypA binding loop であることから、阻害活性をもつことが考えられる。しかし、S9, S10 がループの途中で分断しているため活性が出ない可能性がある。そこで、新たな部分ペプチドを設計し、同様に合成を行った(図 4)。

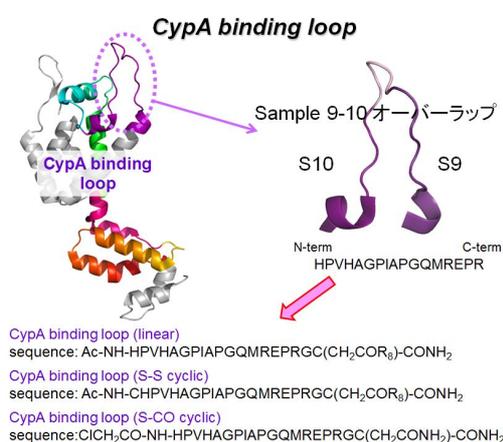


図 4. Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体

3) 候補化合物の細胞内導入法としての stapling 技術の検討

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 stapling 技術が報告されている。さらに、このステイプルペプチド (staple peptide) 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、これから見い出される CA 部分ペプチド由来の候補化合物の細胞内導入に応用できるかどうかを評価するため、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検討を行った。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。それらアミノ酸をペプチド性インテグラーゼ阻害剤のペプチド鎖2カ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5)。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、細胞膜透過性実験を行った。

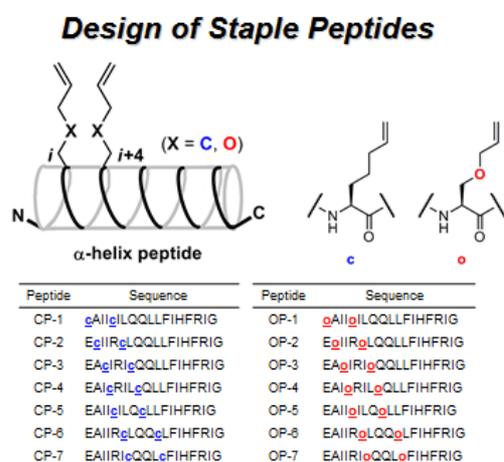


図5. ペプチド性インテグラーゼ阻害剤を基にしたステイプルペプチドのデザイン

(倫理面への配慮)

今年度の研究に関して、倫理面に該当する事項はない。

C. 研究結果

1) CA部分ペプチドライブラリーの設計、合成

今年度、CA部分ペプチドライブラリーの合成をすべて終了した。合成した細胞膜透過性CA部分ペプチド1L-23LのESI-TOF MSのデータと収率を表2に示した。ほぼすべてのペプチドで収率よく、合成することができた。

表2. 細胞膜透過性CA部分ペプチド1L-23LのESI-TOF MSデータと収率

	calcd. for [M+H ⁺]	found	yield (%)
1L	3140.77	3141.84	57
2L	3226.86	3226.87	13
3L	3239.78	3239.99	34
4L	3131.68	3132.78	51
5L	3041.60	3041.65	64
6L	3048.63	3048.59	20
7L	3207.70	3207.65	82
8L	3316.73	3316.81	51
9L	3071.72	3071.69	85
10L	3104.70	3104.74	81
11L	3027.63	3027.64	62
12L	3267.77	3269.01	74
13L	3301.92	3301.87	49
14L	3410.04	3411.28	42
15L	3298.87	3298.82	34
16L	3339.86	3341.06	83
17L	3485.90	3485.91	32
18L	3297.78	3297.74	56
19L	3267.79	3267.83	35
20L	3118.80	3119.05	57
21L	3080.72	3080.79	43
22L	2970.54	2970.54	86
23L	2597.54	2597.47	69

2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loopの環状ペプチド誘導体の合成

本環状ペプチド誘導体に関しても同様に収率よく、合成することができた。また、同定はESI-TOF MS測定により行った。

3) 候補化合物の細胞内導入法としてのstapling技術の検討

octa-Argペプチドを付与したインテグラーゼ(IN)阻害活性ペプチド中のPhe6, Ile7, Phe9,

Ile11 が阻害活性の発現に重要であると考えられる。このペプチドに、アルキルタイプとエーテルタイプの側鎖を有する 2 種類の非天然アミノ酸を導入し、ステイブ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は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、アルキルタイプの非天然アミノ酸の方がステイブルペプチド合成に適していると考えられた。また、CD スペクトルより、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ブルペプチドの方がより高い α -ヘリックス性を有していた。抗 HIV 活性試験の結果では、いくつかのステイブルペプチドが活性を示した。また、蛍光基を導入したステイブルペプチドは、イメージングにより細胞膜透過性を有することが明らかになった。

D. 考察

有機合成化学・ケミカルバイオロジーの巧みな技術を用い、Gag を標的とする治療標的部位の探索のための目的化合物等を順調に設計、合成できた。

- 1) CA 部分ペプチドライブラリーの設計、合成
カプシドタンパク質(CA)を網羅するペプチドライブラリーのすべてを、抗 HIV 活性試験に供与できる十分量合成した。現在、分担研究者である村上博士に活性評価を依頼中である。
- 2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成
本環状ペプチド誘導体についても同様に抗 HIV 活性試験に供与できる十分量合成した。現在、分担研究者である村上博士に活性評価を依頼中である。
- 3) 候補化合物の細胞内導入法としての細胞内導入法の検討

ステイブル化により、細胞内で高い 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、細胞内導入法として細胞内導入法の有用性を示した。

E. 結論

Gag を標的とする治療標的部位の探索、抗 HIV 活性リード化合物の創出、候補分子の構造活性相関の情報基盤の提供を目指して、今年度は十分な研究成果を得た。具体的には、有機合成化学・ケミカルバイオロジーを巧みに用いて、1) カプシドタンパク質(CA)を網羅するペプチドライブラリーの合成、2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成、3) stapling 技術による候補化合物の細胞内導入法の確立等を行った。

抗ウイルス活性の測定実験に関して、国立感染症研究所エイズ研究センター、村上努室長、藤野真之博士にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

F. 知的所有権の取得状況

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 玉村啓和. ペプチドミメティックスを活用した抗HIV剤の創製. MEDCHEM NEWS(日本薬学会 医薬化学部会) 24(1)巻 頁14~19、2014年
- 2) Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Tamamura H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org. Lett.* in press.
- 3) Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21(24): 7884–7889, 2013.
- 4) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* 21(22): 6878–6885, 2013.
- 5) Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, Igarashi T. Generation of a Replication-competent Simian-human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the

Presence of a Small Molecule CD4 Mimic. *J. Gen. Virol.* 94(12): 2710–2716, 2013.

6) Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Metifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, Tamamura H. Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Product. *ACS Chem. Biol.* 8(10): 2235–2244, 2013.

7) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4. *ChemMedChem* 8(10): 1668-1672, 2013.

8) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized CHR-derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 21(15): 4452–4458, 2013.

9) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents. *Bioorg. Med. Chem.* 21(9): 2518–2526, 2013.

10) Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers. *ChemMedChem* 8(1): 118-124, 2013.

11) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Peptide-based Ligand Screening and Functional Analysis of Protein Kinase C. *Biopolymers: Peptide Science* 100(6): 613-620, 2013.

2. 学会発表等

(1) Tamamura H. Peptide-based Chemical Biology & Medicinal Chemistry. Joint Symposium between Chulalongkorn University and IBB/TMDU on Biomedical Materials and Engineering. Oct 25, 2013, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

(2) Tamamura H. Peptide-based Chemical Biology for the Elucidation of a Dimerization State of a GPCR CXCR4 and the Development of Recognition Probes for Cancerous Cells. The 17th Korean Peptide Protein Society Symposium. Nov 29, 2013, Seoul National University, Seoul, Korea.

(3) 玉村啓和:ケミカルバイオロジーとペプチド科学. 第17回ペプチドフォーラム - ケミカルバイオロジーを先導する明日のペプチド科学:新しい接点と可能性を探る -. 2013年6月18日、東京.

(4) 玉村啓和:HIV 感染防止 AIDS 発症防止についての基礎研究. 東京コンソーシアム教員研究セミナー - 大学院紹介講演会「疾患予防」 -. 2013年7月11日、東京.

(5) 玉村啓和:ターゲットタンパク質を特異的に認識するプローブの創製. 生命分子機能研究会2013 学術集会「生命分子・ペプチド創薬の医療へのインパクト」. 2013年9月19-20日、長浜.

(6) 玉村啓和:種々の作用点をターゲットとした抗HIV 剤の創製. 平成25年度厚生労働科学研究

費補助金 創薬基盤推進研究事業 第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「新しい作用機構の抗ウイルス薬開発への取り組み—ウイルス感染症に挑む—. 2013年12月9日、東京.

(7) Nomura W, Ohashi N, Métifiot M, Fujino M, Pommier Y, Murakami T, Tamamura H. Stapled Peptides as HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. Nov 6 -8, 2013, Osaka, Japan.

(8) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Honda Y, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized C34-Related Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. Nov 6 -8, 2013, Osaka, Japan.

(9) 橋本知恵、野村 渉、鈴木貴晴、鳴海哲夫、駒野 淳、村上 努、山本直樹、玉村啓和:HIV-1 外被タンパク質 gp41-CHR 三量体構造を模倣した膜融合阻害剤の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会. 2013年6月19-21日、東京.

(10) 松本大地、橋本知恵、高野 皓、藤野真之、相川春夫、野村 渉、村上 努、山本直樹、玉村啓和:ウイルスカプシド配列を基にした抗 HIV-1 ペプチドの創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会. 2013年6月19-21日、東京.

(11) 松本大地、橋本知恵、藤野真之、野村 渉、村上 努、山本直樹、玉村啓和:フォワードケミカルジェネティクスをウイルスカプシドに応用した抗 HIV-1 ペプチドの創製. 第57回日本薬学会関東支部大会. 2013年10月26日、東京.

(12) 野村 渉、橋本知恵、鳴海哲夫、藤野真之、村上 努、玉村啓和: HIV-1 外被タンパク質 gp41-CHR の二量体構造を基盤とした膜融合阻害剤の有用性. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013年11月20-22日、熊本.