

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

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、有機合成化学を基盤として行った。目的は抗 HIV 活性化合物の創出、候補化合物の構造活性相関の情報提供、Gag の機能制圧である。今年度の研究成果は、1) 以前抗 HIV 活性が見られたマトリックスタンパク質(MA)の部分ペプチドの最適化を行った。2) カプシドタンパク質(CA)を網羅する合成ペプチドライブラリーの抗 HIV 活性を、村上努博士(国立感染症研究所、エイズ研究センター)に評価していただいた。3) 細胞膜透過性ユニットを付与したいいくつかの CA 部分ペプチドに顕著な抗 HIV 活性が見られ、構造活性相関の基盤情報が得られた。

A. 研究目的

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、有機合成化学を基盤として行う。目的は抗 HIV 活性化合物の創出、候補化合物の構造活性相関の情報提供、Gag の機能制圧である。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マトリックスタンパク質(MA)、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。

B. 研究方法

1) MA 部分ペプチドの最適化

以前、全長 132 残基の MA タンパク質を N 末端側から 15 残基ずつに分割し、MA 部分ペプチドライブラリーを設計、合成した。なお、合成した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

加している。その中で、高活性を示した MA-8L と 9L について、最適化を行った(図 1)。

GSEELRSLYN[**TIAVL**]YSVHQRIDVK (MA-8, MA-9 をカバーする全配列: 25 残基)

SEELRSLYN[**TIAVL**]Y

EELRSLYN[**TIAVL**]YS

ELRSLYN[**TIAVL**]YSV

LRSLYN[**TIAVL**]YSVH

RSLYN[**TIAVL**]YSVHQ

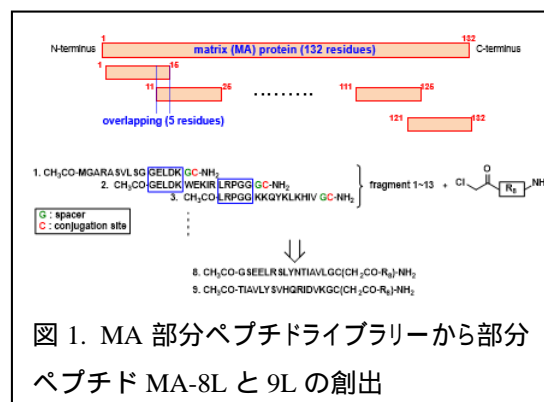
SLYN[**TIAVL**]YSVHQR

LYN[**TIAVL**]YSVHQRI

YN[**TIAVL**]YSVHQRID

N[**TIAVL**]YSVHQRIDV

図 2. 新たな MA 部分ペプチドライブラリー (MA-8L と 9L の間の配列)の設計



具体的に MA-8L と 9L の間の配列 ~ の部分



ペプチドを設計した(図2)。また、以前と同様、スペーサーとして Gly、octa-Arg との reaction point として Cys を導入した(図3)。MA 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4に示す。合成した MA 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。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(図3)。

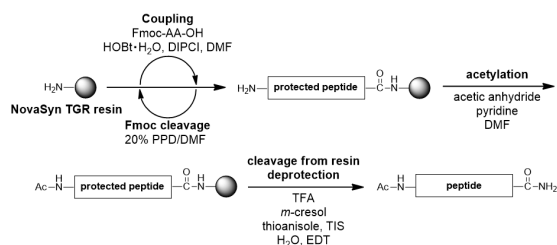


図4. MA 部分ペプチドの合成スキーム

2) CA 部分ペプチドライブラリーの調製

前年度より、全長 231 残基の CA タンパク質をカバーする CA 部分ペプチドライブラリーを構築し、上述の MA 部分ペプチドの合成と同様にそれぞれに細胞膜透過性配列 octa-Arg を付加した(CA-1L~23L)。なお、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ペプチド(CA-1C~23C)も調製した(図5)。

No.	CA 部分ペプチドの配列
-----	--------------

1	H ₂ N-PIVQNLQGQMVHQAIGC-CONH ₂
2	Ac-HN-VHQAI SPRTLNAWVKGC-CONH ₂
3	Ac-HN-NAWVKVVEEKAFSPEGC-CONH ₂
4	Ac-HN-AFSPEVPMFSALSEGC-CONH ₂
5	Ac-HN-SALSEGATPQDLNTMGC-CONH ₂
6	Ac-HN-DLNTMLNTVGGHQAAGC-CONH ₂
7	Ac-HN-GHQAAMQMLKETINEGC-CONH ₂
8	Ac-HN-ETINEEAAEWDRLHPGC-CONH ₂
9	Ac-HN-DRLHPVHAGPIAPGQGC-CONH ₂
10	Ac-HN-IAPGQMREPRGSDIAGC-CONH ₂
11	Ac-HN-GSDIAGTTSTLQEIQGC-CONH ₂
12	Ac-HN-LQEIQGWMTHNPPIPGC-CONH ₂
13	Ac-HN-NPIPVGEIYKRWIIGC-CONH ₂
14	Ac-HN-KRWIILGLNKIVRMYGC-CONH ₂
15	Ac-HN-IVRMYSPSILDIRQGC-CONH ₂
16	Ac-HN-LDIRQGPKEFRDYVGC-CONH ₂
17	Ac-HN-FRDYVDRFYKTLRAEGC-CONH ₂
18	Ac-HN-TLRAEQASQEVKNWMGC-CONH ₂
19	Ac-HN-VKNWMTETLLVQNANGC-CONH ₂
20	Ac-HN-VQANPDSKTILKALGC-CONH ₂
21	Ac-HN-ILKALPGATLEEMMGC-CONH ₂
22	Ac-HN-LEEMMTASQGVGGPGGC-CONH ₂
23	Ac-HN-VGGPGHKARVLGC-CONH ₂

図5. CA 部分ペプチドライブラリーの配列。細胞膜透過性ペプチドは各番号の配列の C 末端 Cys のチオール基に octa-Arg を付加(CA-1L~23L)、コントロールペプチドはチオール基を acetamide でキャッピング(CA-1C~23C)した。

3) 細胞膜透過性の検討

本研究では、部分ペプチドを細胞内へ導入するために、細胞膜透過性配列 octa-Arg を付加している。しかし最近、二次構造を維持し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(staple peptide)が使用されている。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、ステイプルペプチドを応用できるかどうかを検討した。ペプチド性インテグラーゼ阻害剤をモデルとして、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(図 6)。

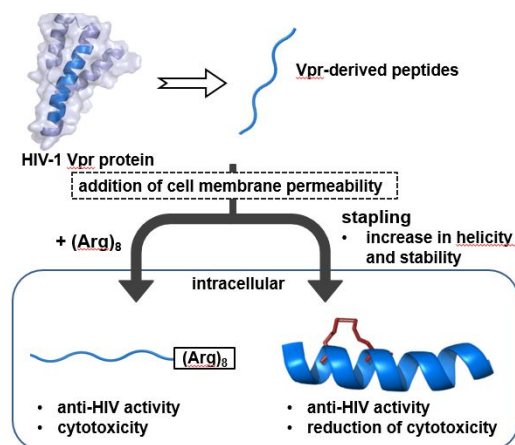


図 6. ペプチド性インテグラーゼ阻害剤を基にしたステイプルペプチドのデザイン

(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) 新たな MA 部分ペプチドの合成

以前高活性を示した MA-8L と 9L の間の配列 ~ の部分ペプチドの合成を、今年度までにすべて終了した。合成した細胞膜透過性 MA 部分ペプチド ~ の ESI-TOF MS のデータと収率を表 1 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。なお、ネガティブコントロールとして、MA-9L のアミノ酸配列をシャッフルさせたペプチド 9R を合成した。

表 1. 新たな MA 部分ペプチドの ESI-TOF MS データと収率

compd	calcd. for [M+H ⁺]	found	yield (%) ^a
	1970.98	1972.76	17
	1970.98	1973.48	11
	1941.00	1943.61	2
	1949.02	1951.05	7
	1963.99	1966.08	16
	1963.99	1966.13	15
	1990.05	1992.23	18
	1991.99	1994.19	18
	1927.99	1930.14	1
9R	1942.05	1944.16	trace

^a 樹脂からの全工程収率

2) 新たな MA 部分ペプチドの活性試験

合成した細胞膜透過性 MA 部分ペプチド ~ の抗 HIV-1 活性および細胞毒性の評価を村上努博士(国立感染症研究所、エイズ研究センター)に依頼した。これらの評価には MT-4 細胞、NL4-3 株を使用する MTT アッセイを用い、アッセイにはクロロキン 5 μM 添加した(表 2)。以前の MA 部分ペプチドライブラリーのアッセイでは、MT-4 細胞が薬剤に対して感受性が高く、抗 HIV-1 活性を示す濃度に至るまでに細胞毒性を示した。この原因として、エンドサイトーシスにより細胞内に導入された MA 部分ペプチドがエンドソームから細胞質に放出されにくいこと、アルギニン残基数が多いことが挙げられる。そこで、本研究ではクロロキンを添加したアッセイ系に変更した。クロロキンは、弱い塩基性であるため、エンドソーム内に H⁺が取り込まれる。そのためエンドソーム内の濃度が上昇し、エンドソーム膜が破られることで MA 部分ペプチドが細胞質に放出される。

表 2. 新たな MA 部分ペプチドの抗 HIV 活性

と細胞毒性

compd	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
	>9.0	9.0
	>7.2	7.2
	1.8	9.4
	>5.9	5.9
	0.80	4.5
	1.0	3.7
	0.65	5.2
	0.80	5.5
	2.0	10
MA-9L	0.78	4.5
9R	>4.8	4.8

結果として、MA-8Lと9Lの間の配列ではC末端側の部分ペプチドのほうが高活性を示し、～の部分ペプチドがMA-9Lとほぼ同等の抗HIV活性を示した。

3) CA部分ペプチドライブラリーの活性試験

合成したCA部分ペプチドライブラリーの抗HIV-1活性および細胞毒性の評価を村上努博士(国立感染症研究所、エイズ研究センター)に依頼した。これらの評価にはMT-4細胞、NL4-3株を使用するMTTアッセイを用いた。今回は、最初のスクリーニングであるためアッセイにクロロキンを添加しなかった。表3には、C末端Cysのチオール基にocta-Argを付加した細胞膜透過性ペプチド(CA-1L~23L)のみを記載した。いくつかの部分ペプチドに顕著な抗HIV活性が見られた。とくに、N端側のCA-1L, 2Lと6L, 15Lは高活性を示した。

表3. 細胞膜透過性CA部分ペプチドの抗HIV

活性と細胞毒性

compd	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
1L	4.5	>50
2L	8.8	>50
3L	50	>50
4L	41	>50
5L	35	>50
6L	9.3	>50
7L	46% inh. at 50 μM	>50
8L	15	>50
9L	33% inh. at 50 μM	>50
10L	35	>50
11L	35% inh. at 50 μM	>50
12L	>50	>50
13L	>35	35
14L	>9	9
15L	4.6	9.3
16L	33	>50
17L	>25	25
18L	>50	>50
19L	47% inh. at 50 μM	>50
20L	33	>50
21L	>50	50
22L	46% inh. at 50 μM	>50
23L	36% inh. at 50 μM	>50
AZT	0.078	>100
AMD3100	0.033	>50
SCH-D	>5	>5

4) 細胞膜透過性の検討

インテグラーゼ(IN)阻害活性ペプチド中に、アルキルタイプの側鎖を有する非天然アミノ酸を導入し調製したステイブルペプチドとocta-Argペプチドを付与したペプチドを検討した。CDスペクトルより、リニアペプチドやocta-Argペプチドを付与したペプチドよりも側鎖を架橋したステイブルペプチド

ドの方がより高い α -ヘリックス性を有していた。蛍光イメージングにより、顕著な細胞膜透過性を有することが明らかになった。

D. 考察

Gag を標的とする治療標的部位の探索、目的化合物の設計、合成ができ、有機合成化学およびケミカルバイオロジーの技術の有用性を示した。いくつかの MA および CA 部分ペプチドに顕著な抗 HIV 活性が見られ、構造活性相関のデータが得られた。二次構造を維持するように共有結合で架橋したステイブルペプチドは、細胞膜を透過することができ、細胞で抗 HIV 活性を示す化合物を創出できた。

E. 結論

Gag を標的とする治療標的部位の探索、MA/CA 由来の抗 HIV リード化合物の最適化、細胞内導入の効率化、リード化合物の構造活性相関の情報基盤の提供を目指して、十分な研究成果を得ることができた。

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) Ohashi N, Nomura W, Minato N, Tamamura H. Screening for Protein Kinase C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Chem. Pharm. Bull.* 62(10): 1019–1025, 2014.
- 2) Masyuk M, Abdueilmula A, Morosan-Puopolo G, Ödemis V, Rehimi R, Khalida N, Yusuf F, Engele J, Tamamura H., Theiss C, Brand-Saberi B. Retrograde Migration of Pectoral Girdle Muscle Precursors Depends on CXCR4/SDF-1 Signaling. *Histochem. Cell. Biol.* 142(5): 473–488, 2014.
- 3) Yamamoto J, Maeda N, Komiya C, Tanaka T, Denda M, Ebisuno K, Nomura W, Tamamura H.

Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A. Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker. *Tetrahedron* 70(34): 5122–5127, 2014.

4) Takano H, Narumi T, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Nomura W, Tamamura H. Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups. *Tetrahedron* 70(29): 4400–4404, 2014.

5) Yamamoto J, Denda M, Maeda N, Kita M, Komiya C, Tanaka T, Nomura W, Tamamura H. Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A. Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins. *Org. Biomol. Chem.* 12(23): 3821–3826, 2014.

6) Narumi T, Tsuzuki S, Tamamura H. Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level ab Initio Calculations. *Asian J. Org. Chem.* 3(4): 497–503, 2014.

7) 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.* 16(4): 1184–1187, 2014.

8) 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. *Peptide Science*, 57-58, 2014.

9) 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. *Peptide Science*, 337-338, 2014.

10) Nomura W, Masuda A, Tamamura H. Creation of Zinc Finger Nucleases Targeting Telomerase Promoter Region. *Peptide Science*, 241-242, 2014.

11) 野村渉、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プ。化学工業 特集「ペプチド化学の新潮流(1)」(化学工業社 川崎) 65巻、11号、頁8~14、2014年(11月)

2. 学会発表等

(1) Tamamura H. Chemical Biology Studies on the Elucidation of a Dimerization State of a GPCR CXCR4 and the Development of Recognition Probes for Cancerous Cells. Seminar in University of Cologne, Sep 11, 2014, Cologne, Germany.

(2) Tamamura H. Development of peptide-lead anti-HIV agents. The 15th Akabori Conference 2014: Japanese-German Symposium on Peptide Science, Sep 7-9, 2014, Boppard, Germany.

(3) Nomura W, Hashimoto C, Fujino M, Murakami T, Ohashi N, Tamamura H. Multimerized Peptides Derived from the C-Terminal Region of HIV-1 gp41 as Fusion Inhibitors. The 33rd European Peptide Society Symposium, Aug 31-Sep 5, 2014, Sofia, Bulgaria.

(4) Nomura W, Métifiot M, Ohashi N, Fujino M, Mizuguchi T, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Murakami T, Tamamura H. Cell-permeable

Stapled Peptides with Integrase Inhibitory Activity Derived from HIV Gene Products. The 15h Kumamoto AIDS Seminar, Oct 1-3, 2014, Kumamoto, Japan.

(5) Yamada Y, Hashimoto C, Otsuki H, Hirota Y, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. The 15h Kumamoto AIDS Seminar, Oct 1-3, 2014, Kumamoto, Japan.

(6) Irahara Y, Kotani M, Harada S, Narumi T, Yamada Y, Hirota Y, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H. A New Type of Small CD4 Mimic Molecules Targeting an HIV Envelope Protein gp120. The 15h Kumamoto AIDS Seminar, Oct 1-3, 2014, Kumamoto, Japan.

(7) Kotani M, Hirota Y, Irahara Y, Harada S, Yamada Y, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H. Structure-activity Relationship Studies of CD4 Mimic Molecules. The 15h Kumamoto AIDS Seminar, Oct 1-3, 2014, Kumamoto, Japan.

(8) 玉村啓和. エイズ発症防止と疾患予防科学. 東京医科歯科大学大学院 生命理工学系専攻「疾患予防科学コース」ミニシンポジウム「疾患予防科学で何を学ぶのか」疾患予防のための理工学: その魅力と大学院キャリアセミナー「研究紹介セミナー」, 2014年7月19日, 東京.

(9) 本田柚子奈, 野村 渉, 武富昇平, 大橋南美, 橋本知恵, 玉村啓和. HIV-gp41 の膜融合阻害ペプチドの二量体化を基にした誘導体の創製研究. 第 58 回日本薬学会関東支部大会, 2014年10月4日, 東京.

(10) Honda Y, Mizuguchi T, Nomura W, Tamamura H. Development of Dimeric Peptide Derivatives Based on gp41 Fragments as HIV-1 Fusion Inhibitors. 第 51 回ペプチド討論会, 2014年10月22-24日, 徳島.

(11) 野村 渉, 大橋南美, 水口貴章, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 村上 努, 玉村啓和. ステープルペプチドを活用した HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第 32 回メデイシナルケミストリーシンポジウム, 2014年11月26-28日, 神戸.

(12) 野村 渉, 水口貴章, 大橋南美, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 駒野 淳, 村上 努, 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害活性を持ったステープルペプチド. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日, 大阪.