

氏 名 うえ だ さとし
 上 田 聡
 学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)
 学位記番号 薬 博 第 602 号
 学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 研究科・専攻 薬学 研究科創薬科学専攻
 学位論文題目 Synthetic Studies on Chemokine Receptor CXCR4 and Its Specific Antagonists
 (ケモカイン受容体 CXCR4 および特異的拮抗剤の合成研究)
 (主 査)
 論文調査委員 教授 藤井信孝 教授 竹本佳司 教授 富岡 清

論 文 内 容 の 要 旨

ケモカイン受容体 CXCR4 とその内因性リガンド CXCL12 との相互作用は癌転移, 慢性間接リウマチ等の難治性疾患に関与することが報告されているほか, T 細胞指向性 HIV-1 が細胞感染の際, CXCR4 を第二受容体として使用することが明らかにされている。そのため, CXCR4 と HIV-1 または CXCL12 との相互作用を阻害する化合物はこれら疾患に対する新規化学療法剤になることが期待されている。

1. 環状ペプタドテンプレートを用いる CXCR4-ケモカイン受容体特異的拮抗剤の低分子化研究

所属研究室ではこれまでにカプトガニの自己防御ペプチドである polyphemusin II より誘導された14残基からなるペプチド T140 が強力な CXCR4 アンタゴニスト活性を有することを見出している (Figure 1)。著者は T140 の必須ファーマコホアの空間配置の同定と分子サイズの低減を目的として環状ペプタドテンプレートを活用した新規 CXCR4 アンタゴニストの創製に取り組んだ。環状ペプタドの構成アミノ酸として T140 の4つの必須ファーマコホア Arg², Nal³, Tyr⁵, Arg¹⁴に加え, スペースとしての Gly を使用し, 高活性化合物の効率的な探索を目的として, 限定数のペプチドからなる直交型ライブラリーを活用することとした (Figure 2)。活性評価の結果, T140 と同等の CXCR4 アンタゴニスト活性, 抗 HIV 活性を示す低分子化合物 FC131 を見出すことに成功した (Figure 2)。

次に FC131 の誘導体を合成し, 活性評価を行ったところ, FC131 の Gly⁵ を D-Ala に置換した化合物 FC146 が高い活性を示す一方で, L-Ala 置換体 FC145 の活性は 1/10 に低下した (Table 1)。同様の傾向は FC131 の Arg² エピマーである

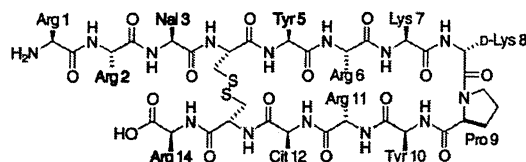


Figure 1. Structure of T140; bold=indispensable residues, Nal=L-3-(2-naphthyl)alanine, Cit=L-citrulline..

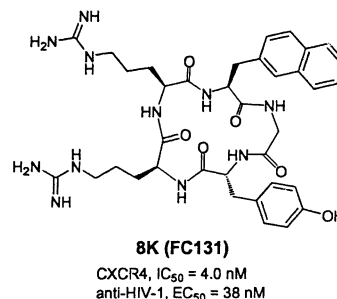
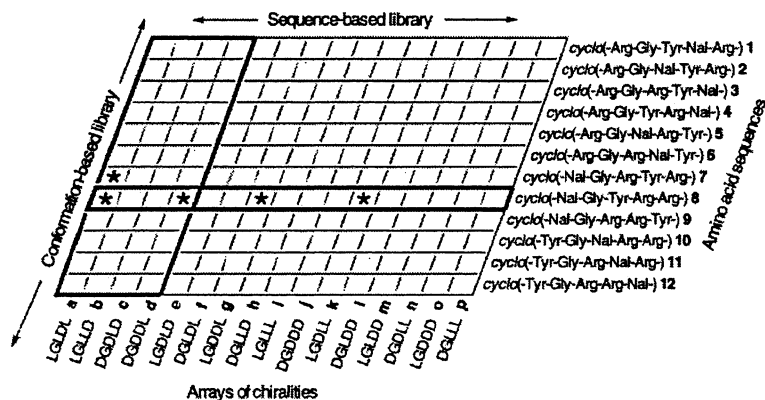


Figure 2. Design of two orthogonal libraries of cyclic peptides; L = L-amino acids, D = D-amino acids, G = glycine.

FC092 の誘導体 FC115, FC116 においても観察された。また, FC092 の Arg² 部位を N-メチル化した化合物 FC122 は親化合物 FC092 より活性が向上し, FC131 の 2 倍の高活性を示した。そこで, これらの構造と活性の相関関係を合理的に評価する目的で一連の化合物の NMR と分子動力学計算に基づく構造解析を行った。その結果, これらの化合物は, ペプチド主鎖アミド結合と, 隣接するアミノ酸β炭素との 1,3-プソイドアリアル反発の影響により, それぞれ特徴的な主鎖コンホメーションをとることが推定され, アミド結合の配向性と生物活性の間に相関関係が観察された。

2. CXCR4 の化学合成を指向した脂質二分子膜担持型ペプチド鎖連結法の開発

蛋白質の構造と機能の解明はゲノム情報の解読に続く重要な研究課題であり, 効率的な蛋白質調製法の整備が必要不可欠である。Native chemical ligation (NCL) はペプチド C 末端チオエステルと N 末端システインの化学選択的な縮合反応であり, 水溶性蛋白質の化学合成とその構造-機能相関研究に広く応用されているが, 7 回膜貫通型 GPCR に代表される膜蛋白質の化学合成はほとんど検討されていない。著者は, NCL の応用が困難であった膜貫通領域を有するペプチドフラグメントの縮合反応を, 生体内における膜蛋白質の存在環境である脂質二分子膜を反応場として利用することで上述のペプチドフラグメントの難溶解性が回避できるものと考え, 7 回膜貫通型 GPCR である CXCR4 を合成標的として脂質二分子膜上でのフラグメント縮合反応を検討した (Figure 2)。その結果, 縮合反応に用いる 2 種類の膜貫通ペプチドと, palmitoylcholine (POPC) から調整した multi lamella vesicle (MLV) を用いて反応を行うと効率的に目的の 2 回膜貫通型ペプチドが得られ, 既存の反応条件である 6M グアニジン存在下または SDS 存在下の反応に比べ反応効率が著しく向上することを明らかにした。また, 通常反応条件より 20 倍低濃度においても反応が効率的に進行した。このような脂質二分子膜を反応場とする反応の効率的な進行は, 疎水性の膜貫通ペプチドの脂質二分子膜上への濃縮効果によるものと考えられる。

Table 1. Biological activities of FC131 and its derivatives.

compound	sequence	IC ₅₀ (μM) ^a	EC ₅₀ (μM) ^b
FC131	cyclo(-D-Tyr ¹ -L-Arg ² -L-Arg ³ -L-Nal ⁴ -Gly ⁵ -)	0.16	0.004
FC145	cyclo(-D-Tyr ¹ -L-Arg ² -L-Arg ³ -L-Nal ⁴ -L-Ala ⁵ -)	20	0.17
FC146	cyclo(-D-Tyr ¹ -L-Arg ² -L-Arg ³ -L-Nal ⁴ -D-Ala ⁵ -)	0.49	0.011
FC092	cyclo(-D-Tyr ¹ -D-Arg ² -L-Arg ³ -L-Nal ⁴ -Gly ⁵ -)	0.37	0.008
FC115	cyclo(-D-Tyr ¹ -D-Arg ² -L-Arg ³ -L-Nal ⁴ -L-Ala ⁵ -)	10	0.092
FC116	cyclo(-D-Tyr ¹ -D-Arg ² -L-Arg ³ -L-Nal ⁴ -D-Ala ⁵ -)	0.67	0.011
FC122	cyclo(-D-Tyr ¹ -D-MeArg ² -L-Arg ³ -L-Nal ⁴ -Gly ⁵ -)	0.088	0.003

^aIC₅₀ values for the cyclic pentapeptides are based on inhibition of [¹²⁵I]SDF-1 binding to CXCR4 transfectants of CHO cells. ^bEC₅₀ values are based on the inhibition of HIV-induced cytopathogenicity in MT-4 cells.

Table 2. Results of chemical ligation of membrane-embedded peptides under several coupling conditions

Entry	Peptides (ligation sites)	Peptide conc. (mM)	Condition ^a	Yield (%) ^b
1	TM 2 + TM 3 (Leu - Cys)	0.05	POPC vesicle	85
2	TM 4 + TM 5 (Ile - Cys)	0.05	POPC vesicle	83
3	TM 6 + TM 7 (Gly - Cys)	0.05	POPC vesicle	88
4	TM 2 + TM 3 (Leu - Cys)	1	6 M guanidine	0
5	TM 4 + TM 5 (Ile - Cys)	1	6 M guanidine	0
6	TM 6 + TM 7 (Gly - Cys)	1	6 M guanidine	0
7	TM 2 + TM 3 (Leu - Cys)	1	1% SDS	< 10
8	TM 4 + TM 5 (Ile - Cys)	1	1% SDS	< 10
9	TM 6 + TM 7 (Gly - Cys)	1	1% SDS	81
10	TM 6 + TM 7 (Gly - Cys)	0.05	1% SDS	52

^a in the presence of 2% thiophenol and 2% TCEP in phosphate buffer (pH 7.8).

^b Yields are estimated from HPLC peak areas.

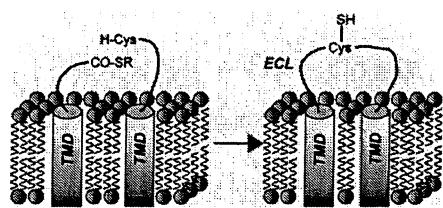
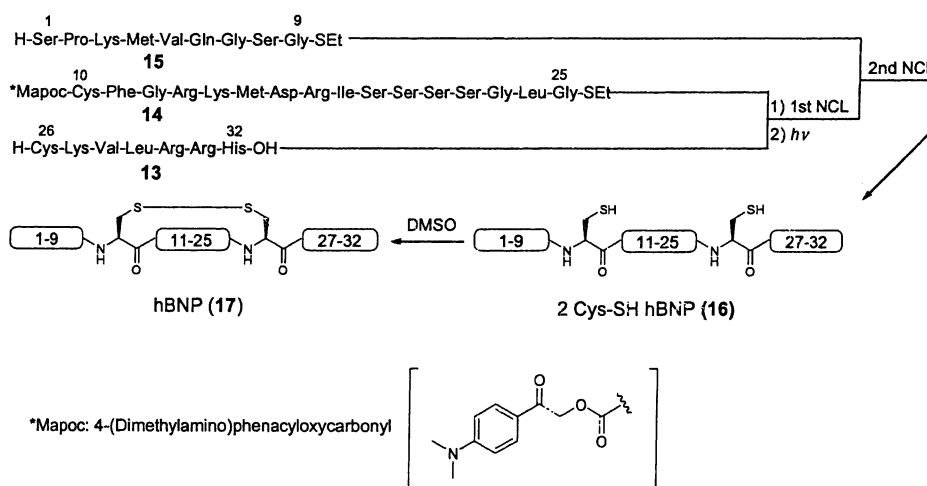
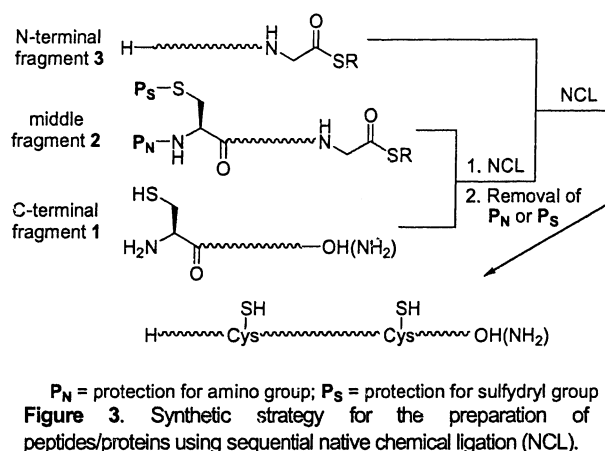


Figure 3. Synthetic strategy for membrane-embedded peptides.

3. 新規光感受性アミノ保護基の開発とペプチドフラグメントの one-pot 連続縮合反応への応用

上述の NCL を連続して繰り返すことによりさらに高分子量の膜蛋白質の調整が可能となるが, この際, 分子内環化反応等の副反応を抑制する目的で中間に配置されるペプチドフラグメントの N 末端システインのアミノ基またはチオール基の保護が必要となる (Figure 3)。膜蛋白質を合成の標的とする場合, 水系溶媒, 有機溶媒の双方に難溶解性を示す膜貫通ペプチドの取り扱いが困難を伴うため, 単純な操作で脱保護が可能で, 脱保護後の精製操作を必要としない光感受性保護基の利用が適していると考えられる。著者は N 末端システインのアミノ保護基として 4-(dimethylamino) phenacyloxy-carbonyl (Mapoc) 基を開発し, その応用実験として, 2 回の NCL を one-pot で連続して行い, 3 つのペプチドフラグメントを連結することで human brain natriuretic peptide (hBNP) の調製を行うこととした。hBNP は分子内に 2 つのシステ

イン残基が存在し、互いにジスルフィド結合を形成している。そこで、2つのペプチドフラグメント13, 14, 15を調製し、中間フラグメント14のN末端アミノ基にはMapoc基を導入した。各段階の反応条件を最適化することで、C末端フラグメント13と中間フラグメント14の縮合、照射によるMapoc基の除去、N末端フラグメント15との縮合、さらに生成した直鎖状ペプチド16のジスルフィド結合形成をone-potで行うことができ、高収率、高純度でhBNP-17が得ることができた (Figure 4)。



上記の研究は CXCR4 を分子標的とする創薬研究および膜タンパク質を含む長鎖ペプチド・蛋白質の合成研究に対して有用な基礎的知見を提供すると判断される。

論文審査の結果の要旨

ケモカインは白血球やリンパ球の細胞遊走を誘導するサイトカインの一群であり現在、ヒトでは約50種が知られている。これらのケモカインは7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体(7TM-GPCR)スーパーファミリーに属するケモカイン受容体に作用することで炎症や免疫応をはじめとする様々な生命現象に関与している。そのうち、ケモカインレセプターCXCR4は最も研究の進んだ受容体のひとつで、その唯一の内在性リガンドであるCXCL12との相互作用を通じて白血球の遊走や胎生期における器官形成などに関与している。CXCR4はまた病的にも重要な制御分子であり、CXCL12との相互作用は癌転移や慢性関節リウマチに関与することが報告されている。また、CXCR4はT細胞指向性HIV株の宿主細胞への感染過程における第二受容体として同定されている。このような背景からCXCR4の分子認識やシグナル伝達機構の理解に向け、リガンド、受容体双方からその構造-機能解析が展開されている。

著者はまずカプトガニ生体防御ペプチドの構造活性相関研究から見いだされたペプチド性CXCR4特異的拮抗剤T140の必須ファーマコホアの空間配置の解析データを基盤にして、分子サイズの低減を目的として環状ペプチドテンプレートを活用した新規CXCR4アンタゴニストの創出に取り組んだ。T140の4つの必須ファーマコホアArg², NaI³, Tyr⁵, Arg¹⁴に加え、スペーサーとしてのGlyを使用し、限定数のペプチドからなる直交型ライブラリーを活用することによりT140と同等のCXCR4アンタゴニスト活性、抗HIV活性を示す化合物FC131を見出すことに成功した。次にFC131をリード化合物とする構造活性相関研究を通じてArg²部位をN-メチル化した高活性化合物FC122を見いだした。さらに、こ

これらの構造と活性の相関関係を合理的に評価する目的で一連の化合物の NMR と分子動力学計算に基づく構造解析を行った結果、これらの化合物はペプチド主鎖アミド結合と、隣接するアミノ酸 β 炭素との 1,3-ブソイドアリル拘束の影響により、それぞれ特徴的な主鎖コンホメーションをとることを明らかにした。

ヒトゲノム解析によると約30%の遺伝子が膜タンパク質をコードしていると推測されている。なかでも7回膜貫通GPCRは現在の医薬品の約50%の創薬標的としても極めて重要な膜蛋白質であるが、細胞外刺激によるGPCRのシグナル伝達の分子メカニズムは明らかとされていない。このような背景から部位特異的ラベル化を可能とする化学合成による膜タンパク質調整法の確立は極めて重要な研究課題となっている。しかしながら、膜タンパク質の化学合成を困難なものとしている最も深刻な問題は膜貫通領域を有するペプチドフラグメントの疎水性が極めて高く Chemical Ligation の反応溶媒となる水系緩衝液や種々の有機溶媒に不溶性であることである。著者は、脂質二分子膜を膜貫通ペプチドの反応場として利用することでこの問題を回避することとした。難溶解性の膜貫通ペプチドを脂質二分子膜に埋め込み、親水性の細胞外ループ領域で Chemical Ligation により縮合反応を行うことによりループ部分を構築すれば効率的に2回膜貫通ペプチドが合成できる。この方法論をもとに CXCR4 ケモカイン受容体をモデルに膜貫通ペプチドの合成法を詳細に検討した。CXCR4 には3つの細胞外ループ領域にそれぞれシステイン残基が存在する。この3カ所を Ligation site として2つの膜貫通ドメインと1つの細胞外ループを有する一連の2回膜貫通ペプチドの合成を行うこととした。その結果、著者が開発した脂質膜を利用する条件では変性剤や界面活性剤を用いる従来法ではほとんど反応が進行しなかった立体障害の大きい結合部位でもほぼ定量的に反応が進行することを明らかにした。このような脂質二分子膜上で縮合反応を行うという手法を用いて、複数のペプチドフラグメントを順次縮合させることにより、さらに高分子量の膜蛋白質の構築が可能になると考えられるが、この目的のためには脱保護後の精製操作を必要としないような光感受性保護基が必要となる。そこで著者は、ジメチルアミノフェナシル型の新規光感受性保護基を開発し、ペプチドフラグメントの one-pot 連続縮合反応に応用することに成功した。

以上著者は、創薬標的として定評のある7TM-GPCRの一つであるケモカイン受容体 CXCR4 を分子標的とする医薬品化学的研究の一環として、その特異的拮抗剤の創出および CXCR4 の化学合成研究に関する基礎研究を行い低分子特異的拮抗剤を見いだすとともに、脂質二分子膜を反応場としたペプチドフラグメントの縮合反応を開発し、CXCR4 の二つの膜貫通領域と一つの細胞外ループを有する一連の二回膜貫通型ペプチドの合成に成功し、さらに複数回膜貫通型ペプチドの合成を可能にする光感受性アミノ保護基を開発した。

本論文に記載された内容はペプチドタンパク質化学のみならず医薬品化学的にも重要な基礎的知見を提供するものと判断される。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成19年2月22日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。