

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	西川 裕輝
論文題目	Development of Novel Anti-viral Agents against Class I Viral Membrane Fusion Process （I型膜融合機構を標的とする新規抗ウイルス剤の創製研究）		
(論文内容の要旨)			
鳥インフルエンザ、新型インフルエンザ、重症急性呼吸器症候群（SARS）等、新型ウイルス感染症の突然の流行は大いなる脅威であり、人的交流のグローバル化はそれに拍車をかけ、感染を拡大させる恐れがある。また一方で、多剤耐性HIV-1株によるエイズの再流行も近未来の新たな問題となっている。近年、上記感染症を含めた抗ウイルス剤開発における新たな標的部位としてウイルスー標的細胞間の膜融合が注目されており、特にHIV-1膜融合については詳細な解明が行われている。 この膜融合メカニズムを概説すると以下ようになる。HIV-1外被タンパク質であるgp41が三量体を形成した状態で標的細胞にアンカリングした後、gp41に存在する2つのαヘリックス領域（HR1, HR2）が逆並行型に相互作用し、ヘアピン型6-ヘリカルバンドル構造を形成する。この構造変化によりHIVと標的細胞の膜が空間的に接近し、膜融合すなわち感染が成立する。以上のメカニズムは一般にI型膜融合（class I fusion）と称され、この6-ヘリカルバンドル構造形成阻害剤は膜融合をターゲットとした抗HIV剤になり得ると考えられる。事実、HR2領域に由来する36残基のペプチドT-20（Fuzeon）が欧米において、多剤耐性ウイルスに著しい臨床治療効果を示している。しかしながら、T-20耐性を獲得したウイルスが既に報告されており、これら耐性ウイルスを抑制し得る第二世代膜融合阻害剤の開発が急務となっている。 第一章・第一節では、T-20耐性HIV-1に対しても効果を示す第二世代膜融合阻害剤の創製について記述する。著者は、6-ヘリカルバンドル構造形成阻害剤としてHR2領域中34残基からなるペプチドC34を基盤分子として新規化合物を創出した。本化合物の分子設計概念は、HR2ペプチドが6-ヘリカルバンドル構造形成の際にHR1相互作用面と溶媒接触面に分割可能であると考え、これを合成化学的に具体化したものである。本概念に基づいて合成したペプチドSC34EKは野生株HIV-1だけでなくT-20耐性株に対しても天然配列のペプチドであるC34を凌ぐ強力な抗HIV作用を示した。また、HR1-HR2ペプチド間の熱安定性を円偏光二色性（CD）測定により評価したところ、SC34EKはT-20耐性株を想定した変異導入HR1ペプチドに対しても強力な結合親和性を維持していることが示唆された。さらに、SC34EKのHR1相互作用面に存在するアミノ酸は基盤分子であるC34と同様の位置に適切に空間提示され、溶媒接触面には親水性アミノ酸であるGlu、Lysが規則的に配置し側鎖間で静電的相互作用を形成していることをX線結晶構造解析により確認した。以上より、SC34EKはT-20耐性株に対しても強力な抗HIV活性を示し、T-20に続く第二世代膜融合阻害剤となり得ることが示唆された。			

第一章・第二節では、分子サイズの低減化を目的にした構造活性相関研究について記述する。第一章・第一節の知見をもとに、ヘリックス性とHR2ペプチドとの親和性を重視した短鎖ペプチドの分子設計研究を通じて得られた各種誘導体から、SC34EKと同等の抗HIV活性を有する29残基ペプチドSC29EKを見出し、活性発現のための最小配列を同定した。

第二章では、HIV-1膜融合阻害剤の新規生物活性評価法の確立について記述する。一般的に、抗ウイルス剤の生物活性評価は感染性を有するウイルスと宿主培養細胞を用いるため、高い封じ込めレベルの実験施設が必要であること、実験者への感染リスクが伴うといった問題が生じる。著者は、これらの問題点を解消すべく、安全かつ簡便な新規アッセイ法を構築した。その原理はHIV-1 gp41の6-ヘリカルバンドル構造形成を試験管内で模倣したものである。具体的には、HR1、HR2領域を大腸菌により融合タンパク質として別々に作製し、両者をプレート上で反応させる。HR2融合タンパク質には、あらかじめ発色反応に用いられるタグ等を融合させておくことで、HR1-HR2相互作用をアルカリフォスファターゼ（ALP）反応基質の発色により検出する。ウイルス／細胞を用いた方法との比較実験の結果、融合阻害ペプチドの効果を定量的に測定できることが明らかとなった。

第三章では、前述の溶媒接触面へのGlu、Lys導入およびスクリーニング法をHIV以外の他のI型膜融合機構を有するウイルスへと応用することにより上記方法論の一般化について記述する。本章ではI型膜融合機構を有するSARSコロナウイルス（SARS-CoV）を標的とし、X線結晶構造解析によるSARS-CoV HR1-HR2領域の6-ヘリカルバンドル構造を基にして α ヘリックス溶媒接触面へのGlu、Lys導入ペプチドのデザインを行った。SARS-CoV HR2においては35残基中、中心の17残基のみが α ヘリックスを形成し、両端は伸長した形を作ることから、 α ヘリックス領域のみにGlu、Lys導入を施したペプチドをデザインした。また、ペプチドの活性評価には第二章と同様のSARS-CoVのHR1とHR2を用いたELISAを構築した。その結果、Glu、Lys導入ペプチドは天然配列のペプチドと同程度の阻害活性を示した。感染性ウイルスを用いた評価系ではこのペプチドは実際の感染組織において優位に働く直接膜融合を介する系において高い抗ウイルス活性を示すという知見が得られ、効果的なSARS治療薬に成り得ることが示唆された。

以上、本研究により著者はHIV-1膜融合を標的とした新規阻害剤の創製およびこれら阻害剤の簡便な評価系の確立に成功した。本法はHIVやSARS-CoVのみならずI型膜融合機構を有する他のウイルスに対しても高い一般性、応用性を示し、今後の新規抗ウイルス剤開発に大いに資するものであると判断される。

(論文審査の結果の要旨)

新興・再興ウイルス感染症の突発的な流行はグローバル経済にも大きな影響を与えることから、これに対する有効な治療薬やワクチンの開発は創薬研究の立場からも喫緊の課題となっている。このような背景から、筆者はHIV-1等のI型膜融合機構を介して宿主細胞に感染するウイルスに対する膜融合阻害剤の開発研究に取り組んだ。

I型膜融合プロセスを経るウイルスの感染は、標的細胞にアンカリングしたエンベロープタンパク質がコイルドコイル構造を形成し、膜融合が促されることによって成立すると考えられている。HIV-1の感染においては表面タンパク質gp41が三量体を形成し、標的細胞にアンカリングした後にさらにgp41に存在する2つの α ヘリックス領域(N端側HR1およびC-端側HR2)が逆並行型に相互作用し、6-ヘリカルバンドル構造を形成する。この構造変化によりHIVと標的細胞の膜が空間的に接近し、膜融合すなわち感染が成立する。

筆者はgp41のHR2領域に位置するC34ペプチドを基盤として、ヘリックス構造の安定化と水溶性の向上を目的として、N端側のHR1領域と相互作用するアミノ酸(Z)を保存して溶媒接触面にE(Glu)およびK(Lys)を配置したEKモチーフ(ZEEZZKK)を導入したSC34EKを合成し、物理化学的および構造生物学的手法を用いてEKモチーフ導入の有効性を検証した。その結果、SC34EKはHR1領域ペプチドN36と強固な6-ヘリカルバンドル構造を形成していることをエックス線結晶解析により明らかにした。またCDスペクトルを用いた詳細な検討により、SC34EKは天然型C34と比較して6-ヘリカルバンドル構造の熱力学的安定性も大幅に向上していることを明らかにした。SC34EKはHIV-1野生株のみならず、現在HIV-1膜融合阻害剤として臨床応用されているT-20の耐性株に対しても強力な阻害活性を示し、EK-モチーフ導入の有効性が立証された。さらに著者はSC34EKの短鎖誘導体の構造活性相関研究を通じてEKモチーフを導入した29残基ペプチドSC29EKが親化合物と同等の強力な抗HIV-1活性を有することを明らかにし、高活性発現の最小単位として同定した。

次に著者はI型膜融合機構を標的とする抗ウイルス剤のELISAスクリーニング系について検討し、大腸菌で発現させたHR1領域とHR2領域を含む2種類の融合タンパク質の相互作用をアルカリフォスファターゼによる発色で検出するin vitroアッセイ系を確立した。本法は危険な感染性ウイルスを用いる必要がなく、DMSO濃度やpHによる影響を受けることも少ないことから低分子膜融合阻害剤のハイスループットスクリーニングにも有用な評価系として応用できると判断される。著者はこの評価系を応用してSARS-CoVの膜融合阻害剤のELISAスクリーニング系を構築し各種化合物を評価した。その結果、SARS-CoV膜融合タンパク質のHR2領域の α ヘリックス部分にEK-モチーフを導入した35残基ペプチドSR9EK13が天然のHR2と同程度の阻害活性をもつことを明らかにした。SARS-CoVは感染組織において優位に働く宿主細胞の膜表面からの直接的感染経路と、エンドサイトーシスを介して感染する間接的な感染経路が報告されているが、著者は膜融合阻害ペプチドSR9EK13が直接的感染経路

を顕著に抑制することおよびエンドサイトーシス経路には効果がないことを明らかにした。

I 型膜融合機構を標的とする著者の研究は各種の新興・再興ウイルス性感染症に対する膜融合阻害剤の開発研究に対して重要な基礎的知見を提供するものである。HIV-1およびSARS-CoVを標的として検証されたHR1領域へのEK-モチーフの導入はペプチド性膜融合剤の分子設計法として同様なメカニズムを利用する他のウイルスにも応用できるものと判断される。また著者が開発したウイルスも細胞も用いる必要のないELISA評価系は安全で簡便な膜融合阻害剤スクリーニング法として幅広く応用可能であると判断される。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成23年2月23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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降