

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：37409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790124

研究課題名(和文) Pr55Gagの膜移行を阻害する抗エイズ薬

研究課題名(英文) Design and synthesis of anti-HIV agents that inhibit the Pr55Gag membrane localization

研究代表者

安楽 健作 (Anraku, Kensaku)

熊本保健科学大学・保健科学部・講師

研究者番号：80389543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：Pr55Gagはホスファチジルイノシトール4,5-2リン酸{PI(4,5)P2}を介して宿主の細胞膜に結合することによりHIV-1ウイルス粒子を形成する。研究代表者らは、PI(4,5)P2よりも高度にリン酸化された人工PI(2,3,4,5,6)5リン酸アナログを種々合成し、それらとPr55Gagの細胞膜結合部位であるMA蛋白質との結合活性を評価した。その結果、MA蛋白質に対して、同等の炭素鎖をもつPI(4,5)P2よりも約70倍強く結合するDi-C7-PI(2,3,4,5,6)P5(化合物2)を見出した。本研究はPr55Gagの膜移行を阻害する化合物創製の基礎になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pr55Gag of human immunodeficiency virus, the principal structural component required for virus assembly, is known to bind D-myo-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2). The N-terminus of Pr55Gag, MA domain, plays a critical role in the binding of Pr55Gag to the plasma membrane. We designed and synthesized PI(2,3,4,5,6)P5 analogs comprising highly phosphorylated inositol and variously modified diacylglycerol to examine the MA-binding property. The binding affinity for MA of Di-C7-PI(2,3,4,5,6)P5 (compound 2) is 70-fold higher than that of PI(4,5)P2 having the similar carbon length, suggesting the possibility of the PIP5 analog to block the Pr55Gag membrane binding by competing with PI(4,5)P2 in the MA-binding.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：抗エイズ薬 Pr55Gag PI(4,5)P2

1. 研究開始当初の背景

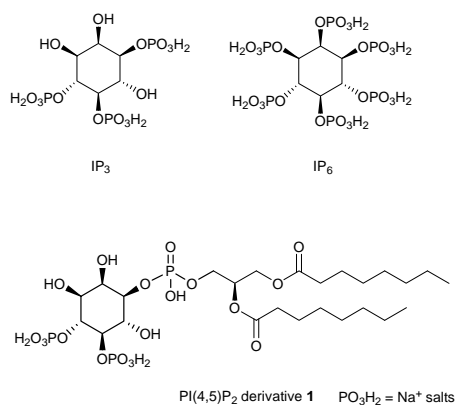
Pr55^{Gag} は、ホスファチジルイノシトール 4,5-2 リン酸 {PI(4,5)P₂} を介して宿主の細胞膜に結合することにより HIV-1 ウイルス粒子を形成する。このとき、Pr55^{Gag} 膜結合部位である MA 蛋白質には、ジアシルグリセロール部位と結合する疎水性領域とともに、イノシトールリン酸部位と結合する塩基性アミノ酸が集積する領域が存在する。そこで、高リン酸化体であるイノシトール 6 リン酸 (IP₆) にジアシルグリセロール部位を導入したアナログを合成できれば、Pr55^{Gag} と PI(4,5)P₂ との結合を阻害でき、新規の抗エイズ薬になりうると考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者は、さきにイノシトールリン脂質類と MA 蛋白質との結合評価系を、BIAcore を使用して構築している。本評価系は、様々なイノシトールリン脂質ならびにイノシトールリン酸と MA 蛋白質との解離定数を算出することができる。本研究では、BIAcore を用いて、IP₆ と MA 蛋白質との解離定数をはじめに求めることにした。さらに、IP₆ 部位に種々修飾を入れたジアシルグリセロール部位を、リン酸ジエステル結合を介して導入した PI(2,3,4,5,6)P₅ リン酸アナログを合成し、それらと MA 蛋白質との結合活性を見ることを目的とした。

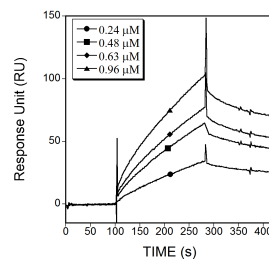
3. 研究の方法

(1) IP₆、IP₃、および水溶性アナログである PI(4,5)P₂ (**1**) と MA 蛋白質との結合解析
市販の IP₆、IP₃、および水溶性アナログ PI(4,5)P₂ (**1**) を用いて結合活性を評価した。



MA 蛋白質の発現は、C 末端に flag タグを挿入した pEF-Gag(p17)cFLAG ベクターを使用した。発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、抗 flag アガロースビーズを用いて MA 蛋白質を精製した。蛋白質の定量は、SDS-PAGE における MA 蛋白質と蛋白質マーカーとのバンド強度の比較もとに算出した。BIAcore においては、はじめ

にビオチン化イノシトール 4 リン酸をストレプトアビジンセンサーチップ上に固定化した。0.24、0.48、0.64、0.96 μM の MA 蛋白質を調製し、25 °C、流速 20 μl min⁻¹ の条件で結合を 3 分間、つづいて解離を 3 分間測定した。

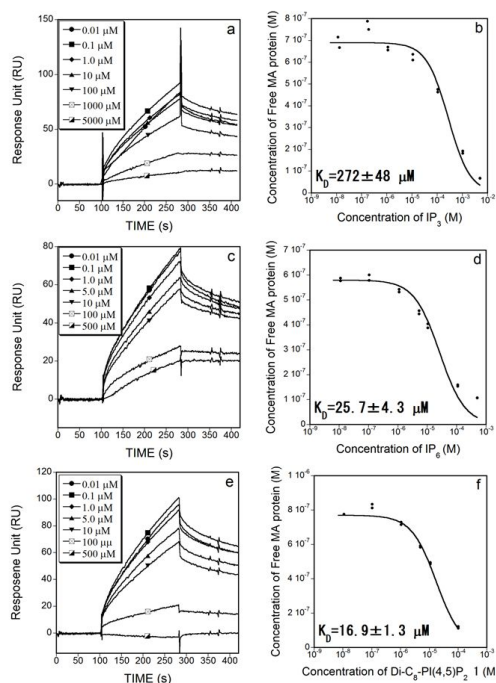


平衡解離定数 K_d は、IP₆-MA、IP₃-MA、および水溶性アナログである **1**-MA 複合体において競合法をもとに算出した。様々な濃度の競合剤 (IP₆、IP₃、**1**) を含む溶液と一定濃度の MA 蛋白質を前もってインキュベーションし、それらを、IP₄ を固定化したセンサーチップ上に注入した。縦軸にフリーの MA 蛋白質濃度を、横軸に競合剤濃度としてプロットし、フィッティングを行うことで K_d を算出した。

4. 研究成果

(1) IP₆、IP₃、水溶性アナログである PI(4,5)P₂ (**1**) と MA タンパク質との結合解析

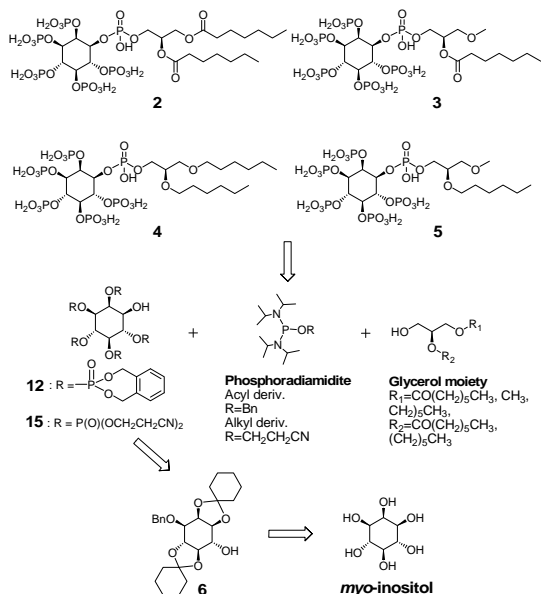
下図 a,c,e に結合と解離を示すセンサーグラムを、b,d,f に競合曲線を示す。結果として IP₃-MA において $K_d=272 \mu\text{M}$ が、IP₆-MA において $K_d=25.7 \mu\text{M}$ 、さらに水溶性アナログ **1**-MA において $K_d=16.9 \mu\text{M}$ が得られた。よって、高リン酸化化合物である IP₆ が、ジアシルグリセロール部位をもたなくても水溶性アナログである PI(4,5)P₂ (**1**) に匹敵する結合能をもつことがわかった。



(2)PI(2,3,4,5,6)5 リン酸アナログの設計

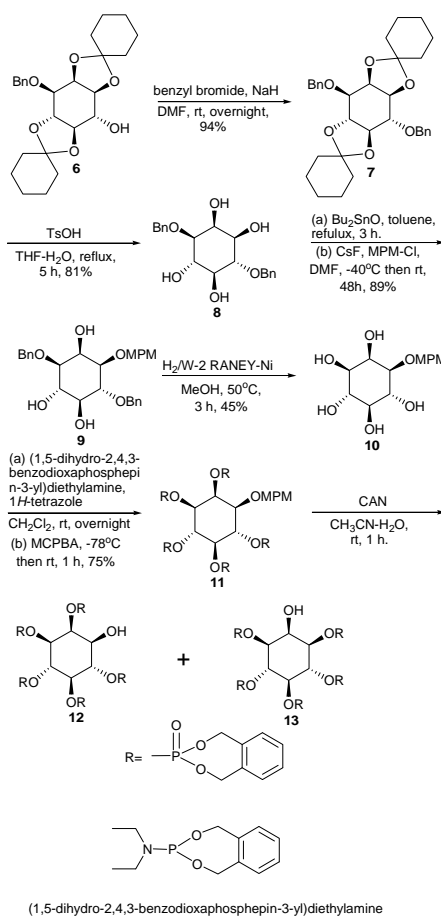
IP₆ の 1 位に、修飾を加えたグリセロール部位を導入した化合物を目的化合物とした。脂肪酸側鎖を比較するためにジアシル型(化合物 **2**)とジアルキル型(化合物 **4**)の側鎖をもつアナログを設計した。これまでの研究から PI(4,5)P₂ がもつ 1'アシルおよび 2'アシルのなかで、2'アシルだけが MA 蛋白質との結合に参与することが示唆されている。そこで、1'アシルをメトキシ基に変換した 1'-O-メチル-2'-アシル/アルキル誘導体(化合物 **3** と化合物 **4**)をそれぞれ設計した。

アナログの合成戦略として、ミオイノシトールがもつ 6 つの水酸基を保護と脱保護を繰り返すことで、イノシトール部位を合成し、別に合成したアシル及びアルキル部位を、2 置換型ホスホラアミダイトを用いて結合させ、脱保護を行うことで目的物を得ることとした。

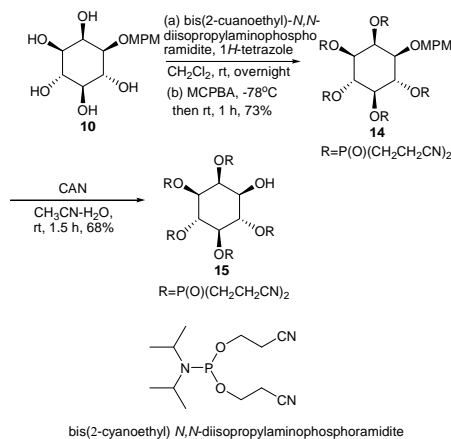


(3)イノシトール部位の合成

ミオイノシトールを原料としてイノシトール部位(**12**)を合成した。Billingtonらの手法を用いて、DL-3-O-benzyl-1,2;4,5-di-O-cyclohexilidene-myo-inositol **6** を合成し、ベンジル化することで **7** を、さらに脱アセタール化することで **8** を得た。化合物 **8** の cis-1,2-diol においてスタニレンアセタール化を経由することで、1 位だけを選択的にパラメトキシベンジル化した **9** を得た。W-2 ラネーニッケルを用いて、2 つの芳香環の中でベンジル基のみを脱保護し、1 置換型ホスホラアミダイトを用いてリン酸基を導入した **11** を得た。最終的に CAN を用いてパラメトキシベンジル基を脱保護できたが、精製段階で、1 位から 2 位にリン酸基が転位した化合物が得られた。生成した **12** と **13** を分離精製することができなかつたため、そのままグリセロール部位と結合させたあとで精製する計画に変更した。

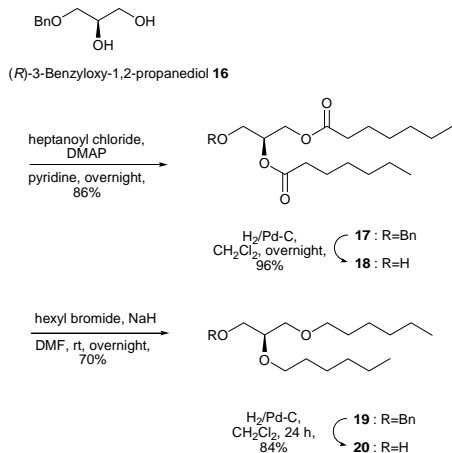


アルキル型の誘導体においては、別な合成経路を用いてイノシトール部位を合成した。すなわち、化合物 **10** を 2'-シアノエチル型のホスホラアミダイトを用いて結合させ **14** を得て、CAN を用いてパラメトキシベンジル基を脱保護した **15** を得た。

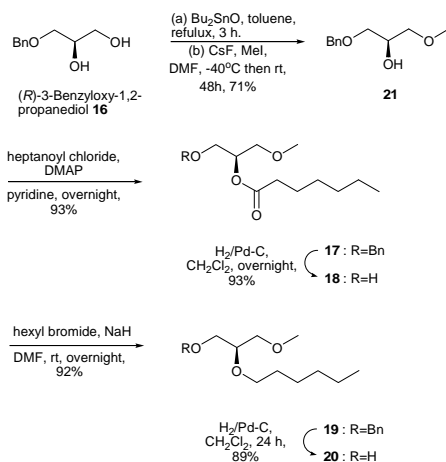


(4)グリセロール部位の合成

ジアシルグリセロールおよびジアルキルグリセロール部位の合成は共に (R)-3-benzyl-1,2-propanediol **16** を原料とした。2 所アルコールにアシル鎖を導入した **17** を得て、脱ベンジル化を行い、**18** を得た。同様に、**16** をヘキシルオキシ化した化合物 **19** を得て、脱ベンジル化した **20** を得た。

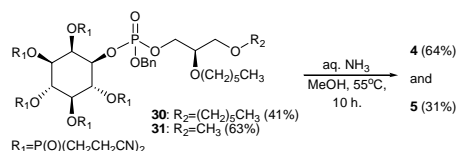
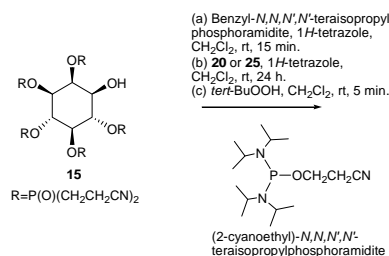
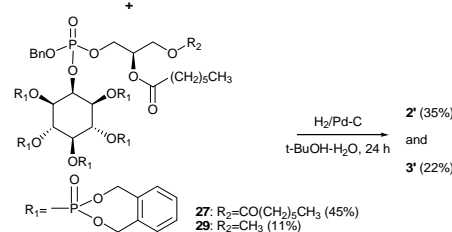
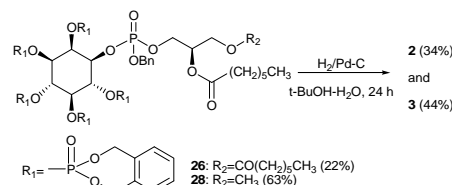
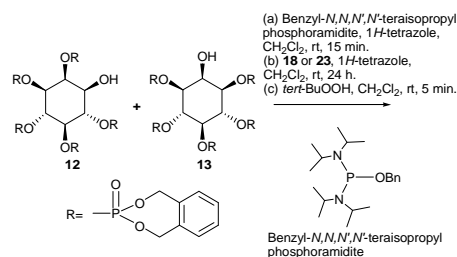


1'位のアシル基をメトキシ化したグリセロール部位の合成についても同様に **16** を原料として合成した。スタニレンアセタール化を経由して、メトキシ基を導入した化合物 **21** を得て、さらにアシル化、脱ベンジル化を経由して化合物 **23** を得た。同様の手法を用いて **25** を得て、計 4 種類のグリセロール部位を合成した。



(5) イノシトール部位とグリセロール部位との結合反応

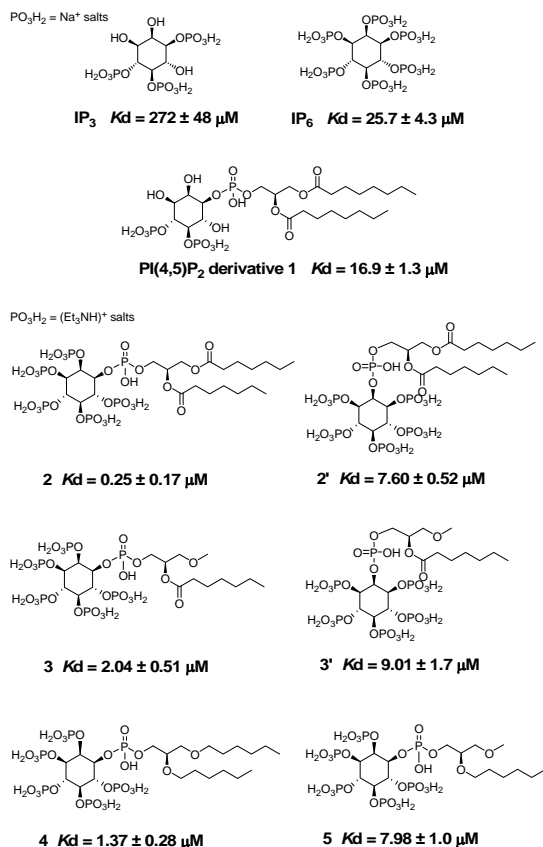
アシル型のグリセロール部位とイノシトール部位との結合反応は 2 置換型のホスホラアミダイトを使用した。化合物 **18** を 2 置換型の benzyl-*N,N,N',N'*-teraisopropylphosphoramidite を用いて、イノシトール部位である **12**、**13** と結合させ、化合物 **26** と **27** を得た。さらに接触還元を行うことで、トリエチルアンモニウム塩として **2** と **2'** を得ることができた。なお、モノアシル体 **3**、**3'** においては同様の手法を用いて合成した。一方で、グリセロール部位 **20** もしくは **25** においては (2-cyanoethyl)-*N,N,N',N'*-teraisopropylphosphoramidite を用いて、イノシトール部位 **15** と結合させ、脱保護を行うことで **4** と **5** を得ることができた。



(6) 各アナログにおける結合活性

各アナログと MA 蛋白質との解離定数を (1) と同様の手法を用いて算出した。種々合成した化合物の中で、ジアシルグリセロール体である **2** と MA との結合において $K_d = 0.25 \mu\text{M}$ が得られ、**1** ($K_d = 16.9 \mu\text{M}$) よりも約 70 倍、また IP6 ($K_d = 25.7 \mu\text{M}$) よりも約 100 倍強く結合した。したがって、IP6 部位とジアシルグリセロール部位の両部位をもつ PI(2,3,4,5,6)5 リン酸アナログが、MA 蛋白質に強く結合することがわかった。また、化合物 **2'** ($K_d = 7.60 \mu\text{M}$) は **3** ($K_d = 2.04 \mu\text{M}$) よりも 3 倍弱く MA 蛋白質に結合し、**3'** ($K_d = 9.01 \mu\text{M}$) とほぼ同程度の親和性で結合した。これらの結果は、1 位にグリセロール部位を導入した **2** や **3** と比較して、異性化体である **2'** と **3'** は結合親和性が弱まることを示している。さらに、アルキル型の **4** ($K_d = 1.37 \mu\text{M}$) は **1** よりも 18 倍強く MA 蛋白質に結合し、**2** よりも 5 倍程度弱く結合した。これらの結果よりアル

キル鎖よりアシル鎖の方がMA蛋白質との結合に重要であることが示された。なお、化合物 5 ($K_d=7.98 \mu\text{M}$) はほぼ、2' や 3' と同程度の親和性を示した。結果として、 $2 < 4 < 3 < 5 = 2' < 3' < 1 < \text{IP}_6 < \text{IP}_3$ の順でMA蛋白質に結合することが分かった。この結果より、1) イノシトール6リン酸を持つこと、2) グリセロール部位をイノシトールの1位に導入すること、3) モノアシル体よりもジアシルグリセロール体であること、4) アルキル体よりもアシル体であることがMA蛋白質との結合に重要であることが示された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Hiroshi Tateishi, Kensaku Anraku, Ryoko Koga, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka, Design and synthesis of lipid-coupled inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate derivatives exhibiting high-affinity binding for HIV-1 MA domain., *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 12, 2014, 5006-5022.

福永佳緒莉, 上田翔平, 菊池亮, 大川原正, 安楽健作, 偽痛風診断への応用を目的としたピロリン酸カルシウム測定の基礎的検討. 保健科学研究誌, 査読有,

11, 2014, 9-16.

Rafiqul Islam, Md. Imran Hossain, Yoshinari Okamoto, Tomohisa Nagamatsu, Kensaku Anraku, and Tadashi Okawara, Facile synthesis of 2-phenylquinoline-4-carboxamide derivatives with variant structural features. *HETEROCYCLES*, 査読有, 89, 2014, 693-708.

Kensaku Anraku, Kiku Nonaka, Toshitaka Yamaga, Takatoshi Yamamoto, Min-Chul Shin, Masahito Wakita, Ayaka Hamamoto, Norio Akaike, Removal of Toxin (Tetrodotoxin) from Puffer Ovary by Traditional Fermentation. *Toxins*, 査読有, 5, 2013, 193-202.

Takashi Masuda, Kensaku Anraku, Mitsuhiro Kimura, Kaori Sato, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, A Versatile Intermediate for the Systematic Synthesis of All Regioisomers of *myo*-Inositol Phosphates. *Synthesis*, 査読有, 5, 2012, 909-919.

[学会発表](計 10 件)

立石大, 安楽健作, 古賀涼子, 岡本良成, 藤田美歌子, 大塚雅巳, HIV-1 Gag のイノシトールリン脂質結合部位を標的とした膜移行阻害剤の合成, 日本薬学会第 134 年会, 2014.3.28., 熊本大学(熊本) 立石大, 安楽健作, 古賀涼子, 岡本良成, 藤田美歌子, 大塚雅巳, HIV-1 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体の合成と評価, 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2013.11.20., アステールプラザ(広島) Kensaku Anraku, Hiroshi Tateishi, Mikako Fujita, Takashi Morii, Yasuo Mori, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Inositol phosphates in calcium signaling and HIV replication: design, synthesis and functional analysis, DPhG Annual Meeting (Germany), 2013.10.11. Albert-Ludwigs-University Freiburg (Germany) 立石大, 安楽健作, 古賀涼子, 藤田美歌子, 大塚雅巳, HIV-1 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体, 日本薬学会第 133 年会, 2013.3.28., パシフィコ横浜(神奈川)

安楽健作, 立石大, 古賀涼子, 東大志, 本山敬一, 有馬英俊, 大塚雅巳, 藤田美歌子, HIV-1 MA 蛋白質と強く結合するイノシトールリン脂質誘導体の合成と評価, 日本薬学会第 133 年会, 2013.3.29., パシフィコ横浜(神奈川) 園田祥子, 安楽健作, 古賀涼子, 田口祐, 井上純一郎, 岡本良成, 藤田美歌子, 大

塚雅巳, 亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤 SN-1 の作用機序解明を目指した研究, 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012.12.8., 熊本大学(熊本)

筑葉晃一, 工藤康太, 舩田岳史, 安楽健作, 大塚雅巳, PH ドメイン蛋白質と結合し膜に移動させる *myo*-イノシトール誘導体の合成, 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012.12.8., 熊本大学(熊本)

藤田美歌子, 古賀涼子, 金丸陽亮, 江島智彦, 園田祥子, 安楽健作, 田口祐, 井上純一郎, 大塚雅巳, 亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤による NF- κ B 活性化経路の遮断, 第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2012.11.28., タワーホール船堀(東京)

立石大, 安楽健作, 大塚雅巳, 藤田美歌子, HIV-1 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体, 第 26 回日本エイズ学会学術集会, 2012.11.24., 慶応義塾大学日吉キャンパス(神奈川)

安楽健作, 舩田岳史, 筑葉晃一, 立石大, 岡本良成, 藤田美歌子, 大塚雅巳, イノシトールリン酸を基盤とした生物機能性分子の設計と合成, 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2012.11.6., タワーホール船堀(東京)

〔図書〕(計 2 件)

Kensaku Anraku, Mikako Fujita, Takashi Morii, Yasuo Mori, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Nova Science Publishers, Inositol: Synthesis, Functions, and Clinical Implications.: 278, 2013, 193-214.

杉内博幸, 安楽健作, 近代出版, メディカルサイエンス・臨床化学検査学・病態生化学の視点から.: 430 ,2013 ,205-217.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kumamoto-hsu.ac.jp/departments-of-information/teacher-introduction.html/604-anraku.html>

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunsigouseiHP/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安楽 健作 (KENSAKU ANRAKU)

熊本保健科学大学・保健科学部医学検査学科・講師

研究者番号: 80389543