

## 招 待 講 演

### ( 1 ) 膜レセプター蛋白質研究への新しい方法論の提言

砂本順三 ( 京都大大学院・工・合成・生物 )

### ( 2 ) 基質遷移状態からデザインされた阻害剤と プロテアーゼの分子認識機構

木曾良明 ( 京都薬大・薬品化学 )

# 1

## 膜レセプター蛋白質研究への新しい方法論の提言

砂本順三

京都大学工学研究科 合成・生物化学専攻

蛋白質化学はその構造・機能解明において今日目覚ましい進歩を遂げているにもかかわらず、あらゆる側面においてそのほとんどが可溶性蛋白質研究で占められている。それに引き換え、膜蛋白質研究はかなり立ち遅れの観がある。抗原・抗体反応、リガンド・レセプター結合、チャネル・キャリアー輸送、接着、情報伝達などの細胞生命維持に重要な機能発現の殆どは細胞膜上での膜蛋白質群によって司られていることを考えるとき、その研究の緊急性と重要性については論を待たない。可溶性蛋白質に比べて、この膜蛋白質研究の遅れの原因の一つとして、膜蛋白質の細胞膜からの単離、精製、人工系への再構成と機能再発現における困難さが考えられる。この問題の解決のため、標的蛋白質の遺伝子導入・発現法が開発され、確かに一応の成果はあがっている。また、膜蛋白質の有機溶剤による抽出または界面活性剤による可溶化とそれに続く人工系への再構成という手段も、現在広く採用されている方法の一つである。しかし、いずれにおいても技術・手法としての難しさや煩雑さ、また再構成後における膜蛋白質の本来の配向性、構造、機能の完全な保持の保証という点でまだまだ問題を抱えている。

いまもし、ある膜蛋白質またはそのサブユニットを含む膜蛋白質群を、その配向性・構造・機能を全く損なうことなく細胞膜から人工系へ直接移すことが出来れば、研究対象とする系の簡素化においても、また方法の簡便性においても膜蛋白質研究の飛躍的な進展が期待され、その貢献度の大きさは計り知れない。

我々は脂質2分子膜中での膜蛋白質の局在化、構造の保持、機能の発現には膜蛋白質の周囲に局在する境界脂質が極めて重要な役割を果たしていることに早くから着目し、まづ人工境界脂質(図1)を合成、開発した。その後それを組み込んだリポソームを用いて、細胞からの膜蛋白質の直接抽出・再構成を効率的に一段で可能とする「膜蛋白質直接抽出法」を世界に先駆けて確立した。しかし、この方法論を科学

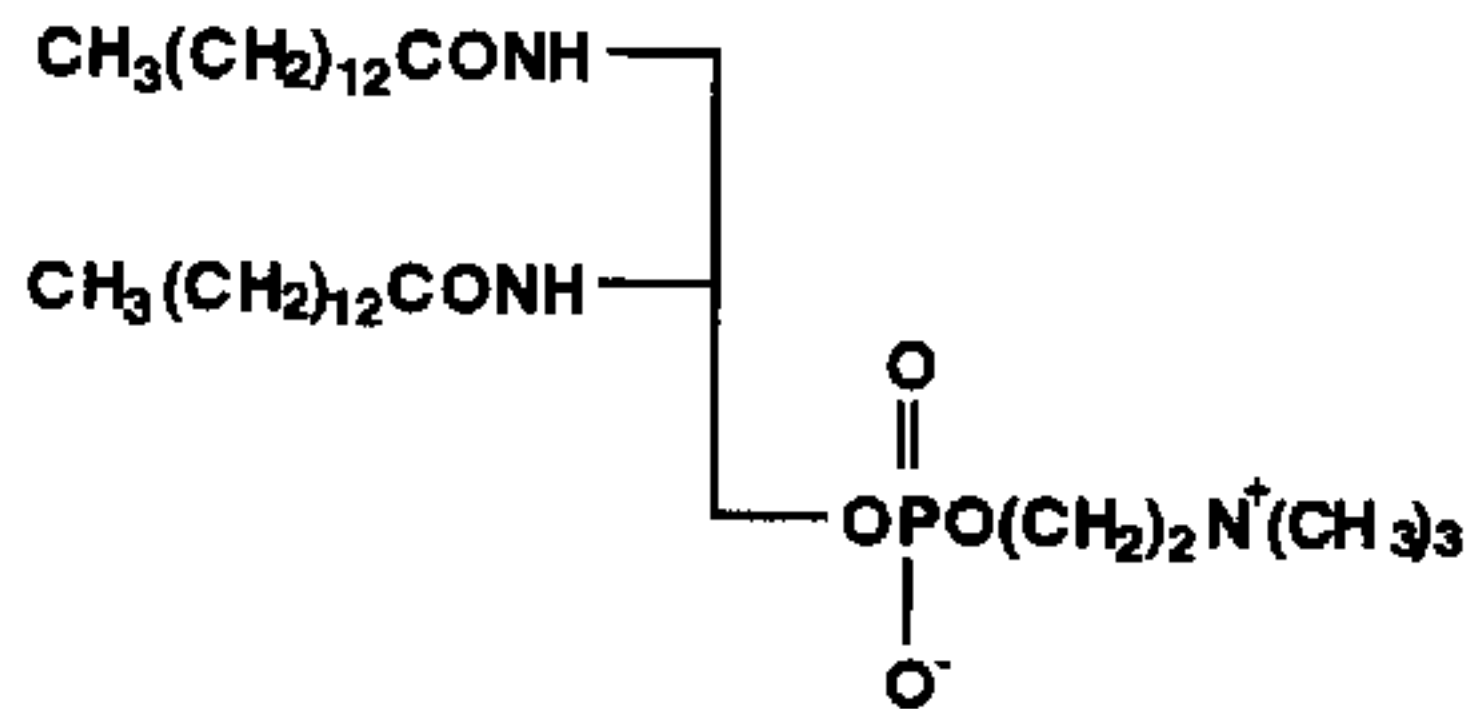


図 1. 人工境界脂質(1,2-dimyristamido-1,2-deoxyphosphatidylcholine (D<sub>n</sub>DPC, n=14))の化学構造

的裏づけに基づいた普遍的なものとするためには分子生物学, 細胞工学, 生物化学, 反応化学, 熱力学, 動力学の多角的見地から,

- (1) 細胞からリポソームへの膜蛋白質転移のメカニズムの解明
- (2) 境界脂質の役割の理解,
- (3) 膜中での蛋白質と脂質との相互作用エネルギーの理解,
- (4) 細胞-リポソーム間での脂質の交換, 融合, 食作用の検討
- (5) リポソームへ転移した蛋白質の分画, 精製法の確立など,

についての詳細な研究が必要である。

ESR, DSC, 蛍光偏光解消, <sup>2</sup>H-NMR, FT-IR, および単分子膜における表面圧測定などからD<sub>n</sub>DPCのキャラクタリゼーションを徹底的に行い, 期待どおりD<sub>n</sub>DPCが脂質膜中で確かに水素結合を形成し, それが膜の構造安定化に寄与していることを実証した。

その情報に基づいて, ヒトグリコフォリンのリポソーム中での再構成率を飛躍的に向上させ, 確かにD<sub>n</sub>DPCが膜蛋白質のための境界脂質として働いていることを重水素NMR法を駆使して初めて実験的に証明することに成功した。

このD<sub>n</sub>DPC人工境界脂質を組み込んだリポソームを適切な条件下に生細胞と共培養することにより, 細胞に大きな障害を与えることなく極めて優れた効率で, 種々の膜蛋白質を細胞からリポソームへ直接転移させうることを見いだした。それは, ヒト赤血球, ヒト血小板, B16メラノーマ, BALBRVD, その他の細胞において実証された。特に, このときリポソームへ転移後も膜蛋白質は元の配向性を殆どそのまま保持していることを証明しえた。

ヒト赤血球ではバンド3ならびにアセチルコリンエステラーゼの抽出を確認し、またABO, Rh D, MN, P<sub>1</sub>の血液型決定抗原の抽出とその検出感度の向上に成功した。ヒト赤血球およびそのゴーストを用いた系での動力学的検討から、この膜蛋白質の直接抽出機構のモデルを提出できた。

特にBALBRVDの場合には、本技術をもちいて癌抗原提示蛋白質の転移に成功し、それをリポソームワクチンとすることにより、実験動物レベルではあるがリポソームワクチンを用いた癌の免疫療法に世界で初めて成功した。その再現性は、ヒト肺癌移植動物モデルでも確認された。

単層培養B16メラノーマにおいても膜蛋白質をリポソームに転移させることに成功した。そのときのレセプター蛋白質の局在化(capping)効果の発見は、この蛋白質直接転移法の細胞レベルから組織レベルへの展開を可能にした。即ちこの修飾リポソームを用いて、カエルの舌の上皮に存在する味覚細胞から、細胞に決定的障害を与えることなく味覚レセプター蛋白質を直接リポソーム抽出することに成功した。これにより従来全く独立していた味覚に関する分子生物学研究と神経生理学研究の両者を結び付け、味覚機構に関する研究の方法論に新しい途を開いた。

#### 本講演課題に関連した演者の研究室からの発表論文 (年代順)

1. Fourier Transform Infrared Study on the Phase Transitions of a 1,2-Dimyristoylamido-1,2-deoxyphosphatidylcholine-Water System, T. Kawai, J. Umemura, T. Takenaka, M. Goto, and J. Sunamoto, *Langmuir*, 4, 449-452 (1988).
2. Synthesis and Characterization of 1,2-Dimyristoylamido-1,2-deoxy phosphatidylcholine as a Boundary Lipid Model., J. Sunamoto, M. Goto, K. Iwamoto, H. Kondo, and T. Sato, *Biochim. Biophys. Acta*, 1024, 209-219 (1990).
3. Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Interaction of Glycophorin with 1,2-Dimyristoylamido-1,2-deoxyphosphatidylcholine, J. Sunamoto, K. Nagai, M. Goto, and B. Lindman, *Biochim. Biophys. Acta*, 1024, 220-226 (1990).
4. Effective Transfer of Membrane Proteins from Human Erythrocytes to Artificial Boundary Lipid Containing Liposomes, J. Sunamoto, M. Goto, and K. Akiyoshi, *Chem., Lett.* 1249-1252 (1990).

5. Structural Stability of Lecithin Liposomes as Improved by Adding an Artificial Boundary Lipid, J. Sunamoto, M. Goto, and K. Akiyoshi, *Chem. Lett.*, 2141-2144 (1990).
6. Effective Transfer of Membrane Proteins from Intact Cells to Liposomes and Preparation of Liposomal Vaccines, J. Sunamoto, K. Akiyoshi, M. Goto, T. Noguchi, T. Sato, E. Nakayama, R. Shibata, and H. Shiku, in "Ann. N. Y. Acad. Sci. (Proceedings of the 10th Enzyme Engineering Conference)", **613**, 116-127 (1990).
7. Induction of *in vitro* and *in vivo* Anti-Tumor Responses by Sensitization of Mice with Liposomes Containing a Crude Butanol Extract of Leukemia Cells and Transferred Intermembranously with Cell Surface Proteins, R. Shibata, T. Noguchi, T. Sato, K. Akiyoshi, J. Sunamoto, H. Shiku, and E. Nakayama, *Int. J. Cancer*, **48**, 434-442 (1991).
8. Priming for *In vitro* and *In vivo* Anti HTLV-1 Cellular Immunity by Virus Related Protein Reconstituted into Liposome, Y. Noguchi, T. Noguchi, T. Sato, Y. Yokoo, S. Itoh, M. Yoshida, T. Yoshiki, K. Akiyoshi, J. Sunamoto, E. Nakayama, and H. Shiku, *J. Immunol.*, **146**, 3599-3603 (1991)
9. Direct Transfer of Membrane Proteins from B16 Melanoma Cell to Artificial Cell Liposome, J. Sunamoto, Y. Mori, and T. Sato, *Proc. Japan Acad.*, **68 (B)**, 69-74 (1992).
10. Direct Transfer of Tumor Surface Antigen-Presenting Protein (TSAP) from Tumor Cell to Liposome for Making Liposomal Vaccine, J. Sunamoto, T. Noguchi, T. Sato, K. Akiyoshi, R. Shibata, E. Nakayama, and H. Shiku, *J. Controlled Release*, **20**, 143-154 (1992).
11. Mixed Monolayers and Cast Films of Acylester- and Acylamido-Phospholipids, D. W. Grainger, J. Sunamoto, K. Akiyoshi, M. Goto, and K. Knutson, *Langmuir*, **8**, 2479-2485 (1992).
12. Effect of Artificial Boundary Lipid on the Membrane Dynamics of Human Glycophorin-Containing Liposome, M. Goto and J. Sunamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 3331-3334 (1992).
13. Recent Aspects in the Use of Liposomes in Biotechnology and Medicine, T. Sato and J. Sunamoto, in "Progress in Lipid Research", ed. by R. T. Holman, H. Sprecher, and J. L. Harwood, Pergamon Press, **31**, 345-372 (1992).
14. Effective Reconstitution of Cell Membrane Proteins into Artificial Cell Liposomes, J. Sunamoto, V. Rosilio, Y. Mori, K. Suzuki, M. Ishitobi, T. Sato and K. Akiyoshi, in "Progress in Pacific Polymer Sciences 2", ed. by Y. Imanishi, Springer, 223-233 (1992).
15. Transfer of Membrane Proteins from Human Platelets to Liposomal Fraction by Interaction with Liposomes Containing an Artificial Boundary Lipid, Y.

Okumura, M. Ishitobi, M. Sobel, K. Akiyoshi, and J. Sunamoto, *Biochim. Biophys. Acta*, **1194**, 335-340 (1994).

16. Taste Receptor Proteins Directly Extracted by Liposome from Intact Epithelium of Bullfrog Tongue, M. Nakamura, K. Tsujii, Y. Katsuragi, K. Kurihara, and J. Sunamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 415-422 (1994).

17. Membrane Protein Transfer from Human Erythrocyte Ghosts to Liposomes Containing an Artificial Boundary Lipid, K. Suzuki, Y. Okumura, T. Sato, and J. Sunamoto, *Proc. Japan Acad.*, **71 (B)**, 93-97 (1995).

18. Reconstitution of Membrane Proteins into Lipid Monolayer. Two-Step Transfer Technique: From Cell to Liposome, from Liposome to Lipid Monolayer, G. Glück, Y. Okumura, and J. Sunamoto, *Chem. Lett.*, 1031-1032 (1995).

19. Direct Transfer of Human Erythrocyte membrane Protein to Liposome, K. Suzuki, Y. Okumura, and J. Sunamoto, *Surface (Hyomen)*, **33**, 8-15 (1995).

20. Vertical Sectioning of Molecular Assemblies at Air/Water Interface Using Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscopy, G. Glück, H. Ringsdorf, Y. Okumura, and J. Sunamoto, *Chem. Lett.*, 209-210 (1996).

21. NMR Study of Choline Methyl Group of Phospholipids, Z. Zhou, Y. Okumura, and J. Sunamoto, *Proc. Japan Acad.*, **72 (B)**, 23-27 (1996).

22. Sensitization of Nude Mice Using Direct Liposome Transfer of Tumor Cell Antigens, T. Ariyasu, O. Ike, S. Hitomi, H. Wada, Y. Okumura, and J. Sunamoto, *J. Bioactive and Compatible Polym.*, **11**, 191-202 (1996).

23. Direct Extraction of A and B Blood Group Antigens from Human Red Cells by Liposomes, K. Suzuki, Y. Okumura, T. Sato, T. Yasuda, A. Oki, M. Oki, and J. Sunamoto, *Transfusion*, **36**, 966-968 (1996).

24. Anti-tumor Effect of Sensitizing Liposome Made by Simple Direct Protein Transfer Method, T. Ariyasu, O. Ike, S. Hitomi, Y. Okumura, J. Sunamoto, and H. Wada, *J. Bioactive and Compatible Polym.*, **11**, 191-202 (1996).

25. Supramolecular Assemblies of Functionalized Lipids, Y. Okumura and J. Sunamoto, *Supramolecular Science*, **3**, 171-176 (1996).

# 2

## 基質遷移状態からデザインされた阻害剤とプロテアーゼの分子認識機構

木曾良明

京都薬大・薬品化学

### 1. HIVプロテアーゼ

現在全人類的な課題となっているエイズ研究において、原因ウイルスであるHIVの増殖にレニンと同族のアスパルテックプロテアーゼが重要な役割を果たしていることがわかった(図1)。この事実は、HIV-1プロテアーゼを阻害することが有用なエイズ治療薬につながるという期待を持たせ、レニン阻害剤と同様の論理的デザインで抗エイズ薬の開発が可能であることを示している<sup>1-11)</sup>。

HIVは、それ自身の有するプロテアーゼの作用によって前駆体タンパク質からウイルスの酵素(プロテアーゼ自身、逆転写酵素、インテグラーゼ)と構造タンパク質を生成し、感染ウイルスへと導かれる(図1)。このステップはHIVの増殖に必須であり、HIVプロテアーゼを阻害することは、エイズの有効な治療法になると考えられる。

HIVプロテアーゼは99個のアミノ酸から成っており、25~27位にアスパルテック

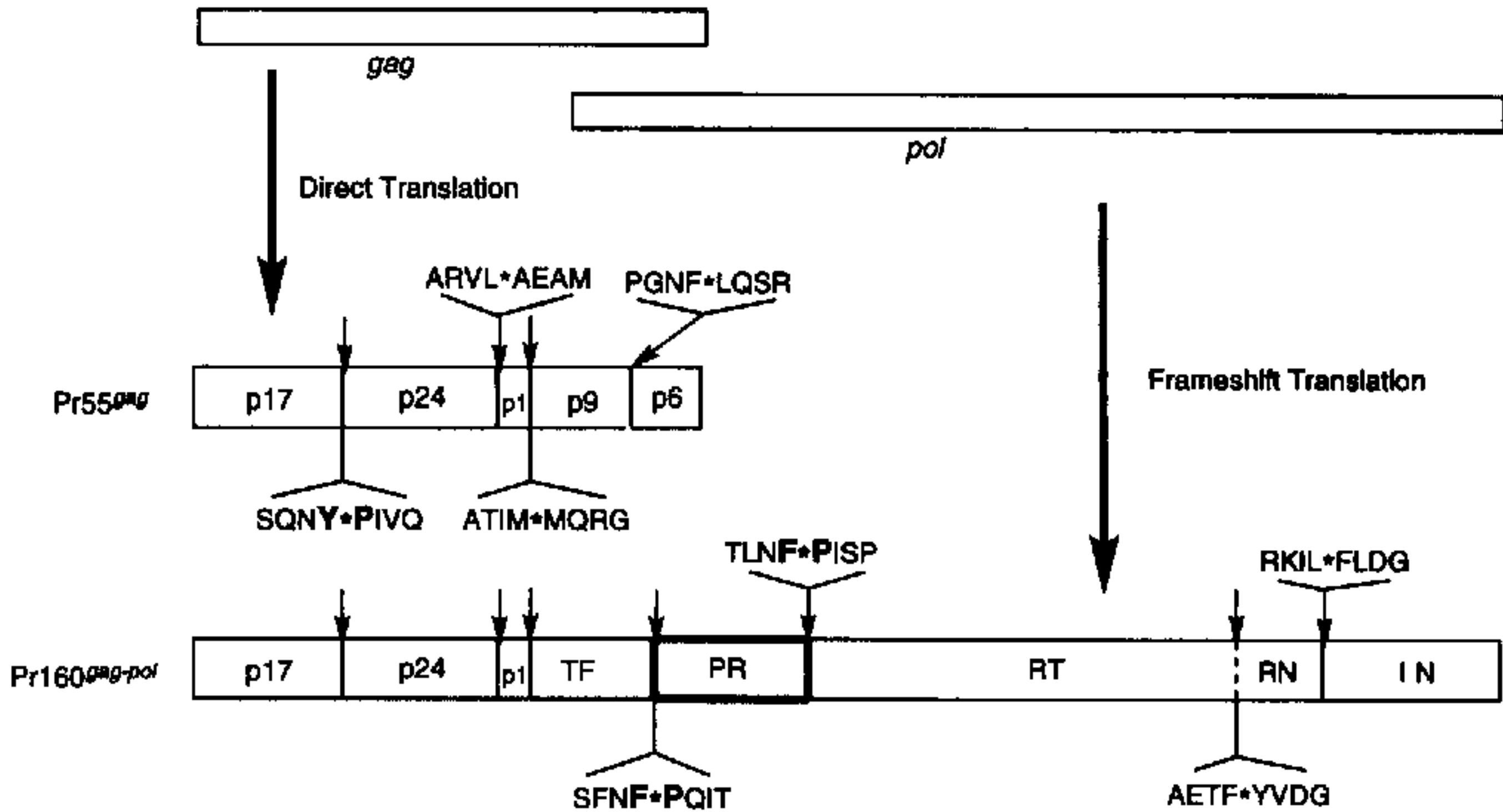


図1. HIV-1の重複したリーディングフレーム(上)とその翻訳により合成された前駆体タンパク質(中,下). プロテアーゼによる切断部位とアミノ酸配列を矢印で示した. gag, group-specific antigen; pol, polymerase; TF, transframe protein; PR, protease; RT, reverse transcriptase; RN, ribonuclease H; IN, integrase.

	10	20	30	40	50
HIV-1 (NY-5)	PQITLWQRPL	VTIKIGGQLK	EALLDTGADD	TVLEEMNLPG	RWKPKMIGGI
HIV-1 (SF-2)	-----	---R-----	-----	-----	K-----
Mutant HIV (KNI-272)	-----	-----	-----	-I-----	-----
HIV-2	--FS--K--V	--AY-E--PV	-V-----	SIVAGIE-GN	NYS--IV---
	60	70	80	90	99
HIV-1 (NY-5)	GGFIKVRQYD	QILIEICGHK	AIGTVLVGPT	PVNIIGRNLL	TQIGCTLNF
HIV-1 (SF-2)	-----	--PV-----	-----	-----	-----
Mutant HIV (KNI-272)	-----	-----	-----	---V-----	-----
HIV-2	----NTKE-K	NVE--VLNK-	VRA-IMT-D-	-I--F---I-	-AL-MS--L

図2. 各種 HIV-1 と HIV-2 プロテアーゼのアミノ酸配列. DTG はアスパルティックプロテアーゼに特徴的な活性中心に相当する 25~27 位 Asp-Thr-Gly

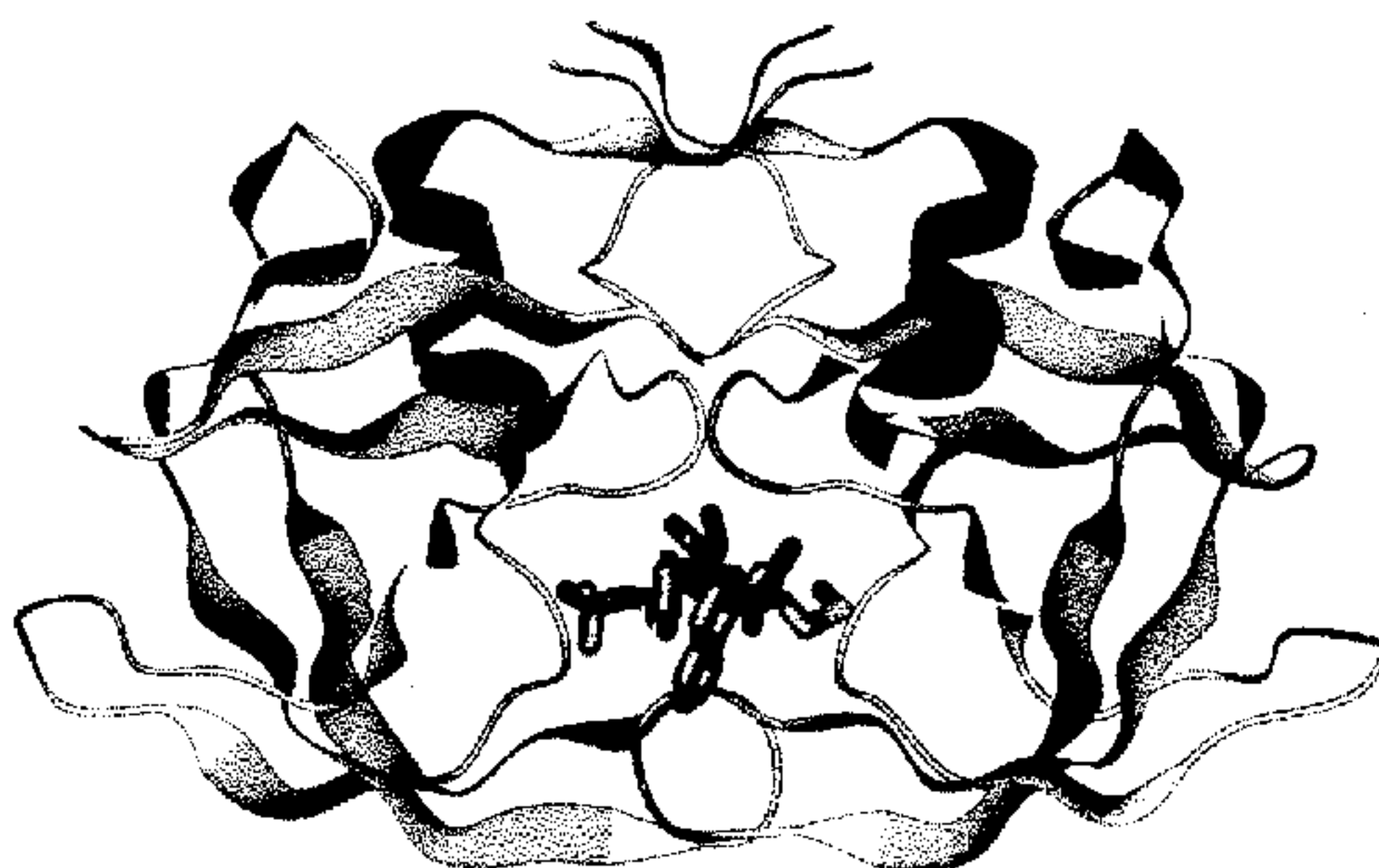


図3 HIV-1プロテアーゼとその活性中心に結合した阻害剤KNI-272との結晶構造<sup>23)</sup>

プロテアーゼ活性中心に特徴的な Asp-Thr-Gly 配列を持ち(図2), ホモダイマーを形成することによりその活性を発現している(図3). 活性中心アスパラギン酸が触媒的に作用して, テトラヘドラルな遷移状態を経て基質のペプチド結合を加水分解しており, 血圧調節に関与する酵素レニンや消化酵素ペプシンと同様の酵素反応機構を持つアスパルティックプロテアーゼに分類される.

## 2. HIVプロテアーゼ阻害剤

すでにレニンやペプシンなどのアスパルティックプロテアーゼの阻害研究<sup>12)</sup>において確立されていた基質遷移状態概念(図4)に基づいて, 副作用のないエイズ治療薬をめざし, HIVプロテアーゼの選択的阻害剤の開発が着手された. 特にHIVプロテアーゼの基質切断部位にはPhe-ProおよびTyr-Proという切断部位が含まれている(図1). このレトロウイルスプロテアーゼに特徴的なPhe-Pro部分に着目することにより高い選択性を持ち副作用の少ない抗HIV薬のデザインも可能になると考えられた.

基質遷移状態アナログとして, HIVプロテアーゼの基質ペプチド配列のPhe-Proペプ



チド結合にヒドロキシメチルカルボニル構造を持つ非天然型アミノ酸を組み込んだペプチドが合成された(図4)<sup>13-17</sup>. この遷移状態ミミックの水酸基は酵素活性中心アスパラギン酸と相互作用をしていることから, その立体化学は活性に重要であり, syn 体に相当するアロフェニルノルスタチン(allophenylnorstatine=Apns)を含むペプチド化合物KNI-93(図4)が強力かつ特異的なHIVプロテアーゼ阻害作用を持つことが見いだされた<sup>13</sup>.

### 3. プロテアーゼ活性中心をターゲットとした抗HIV薬

KNI-93は酵素阻害活性は強力であるがアミノ酸数7個のペプチドであるため生体内安定性及び細胞膜透過性に難点があり, T細胞を用いた系において抗ウイルス作用も示さない.

この点を克服するため種々のデザインと合成を行なってどのような構造が最良の活性をもつかの探索(リードオブチマイゼーション)を進めた. その結果, 疎水性と親水性の適正なバランスを持ちコンフォメーションが制約されたトリペプチドKNI-272( $K_i=0.0055\text{nM}$ )が見いだされた<sup>16-21</sup>.

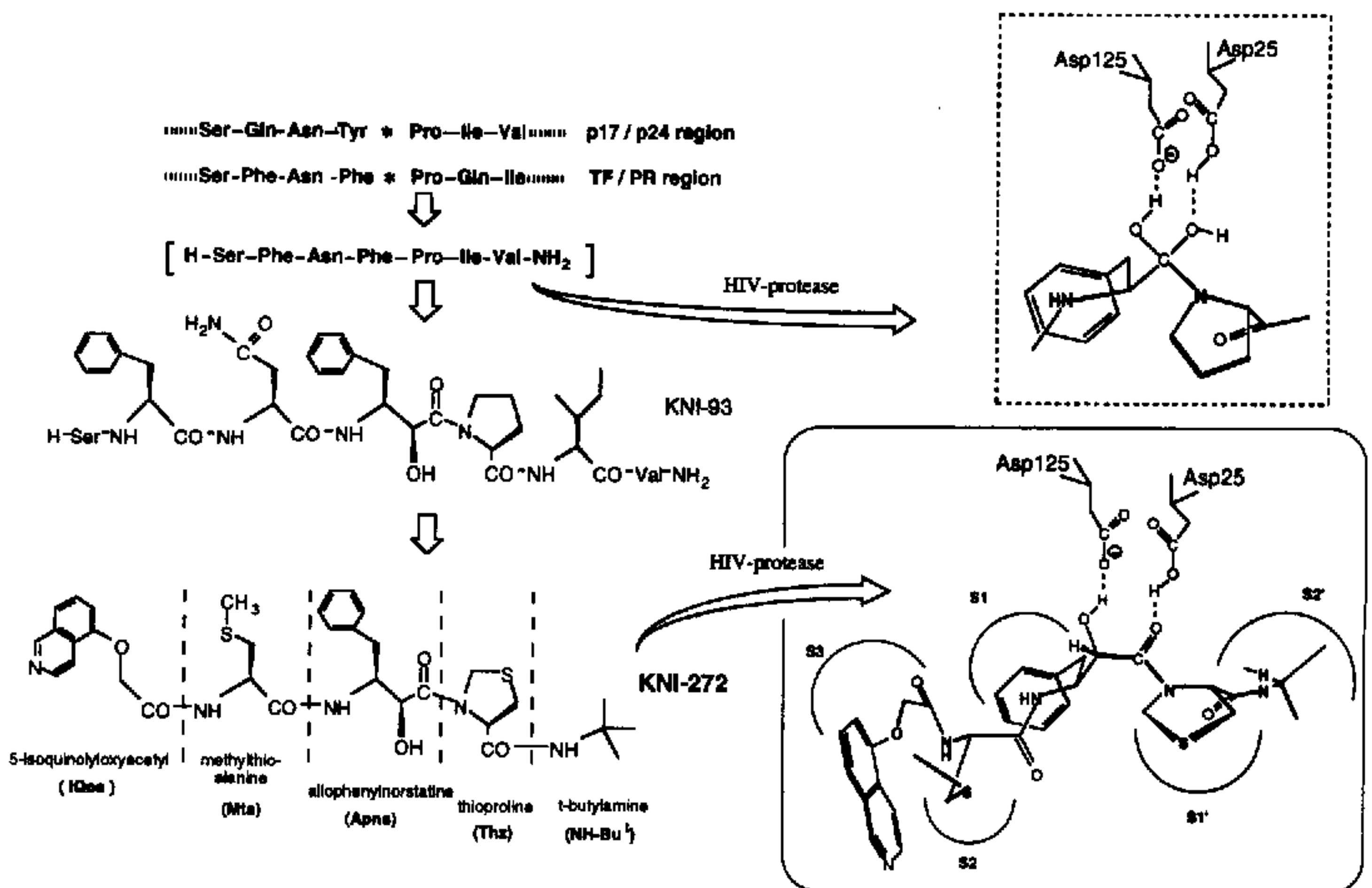


図4. HIVプロテアーゼ阻害剤の基質にもとづいたデザイン. 線内は基質遷移状態, 実線内は, KNI-272 とHIVプロテアーゼ活性部位との相互作用.

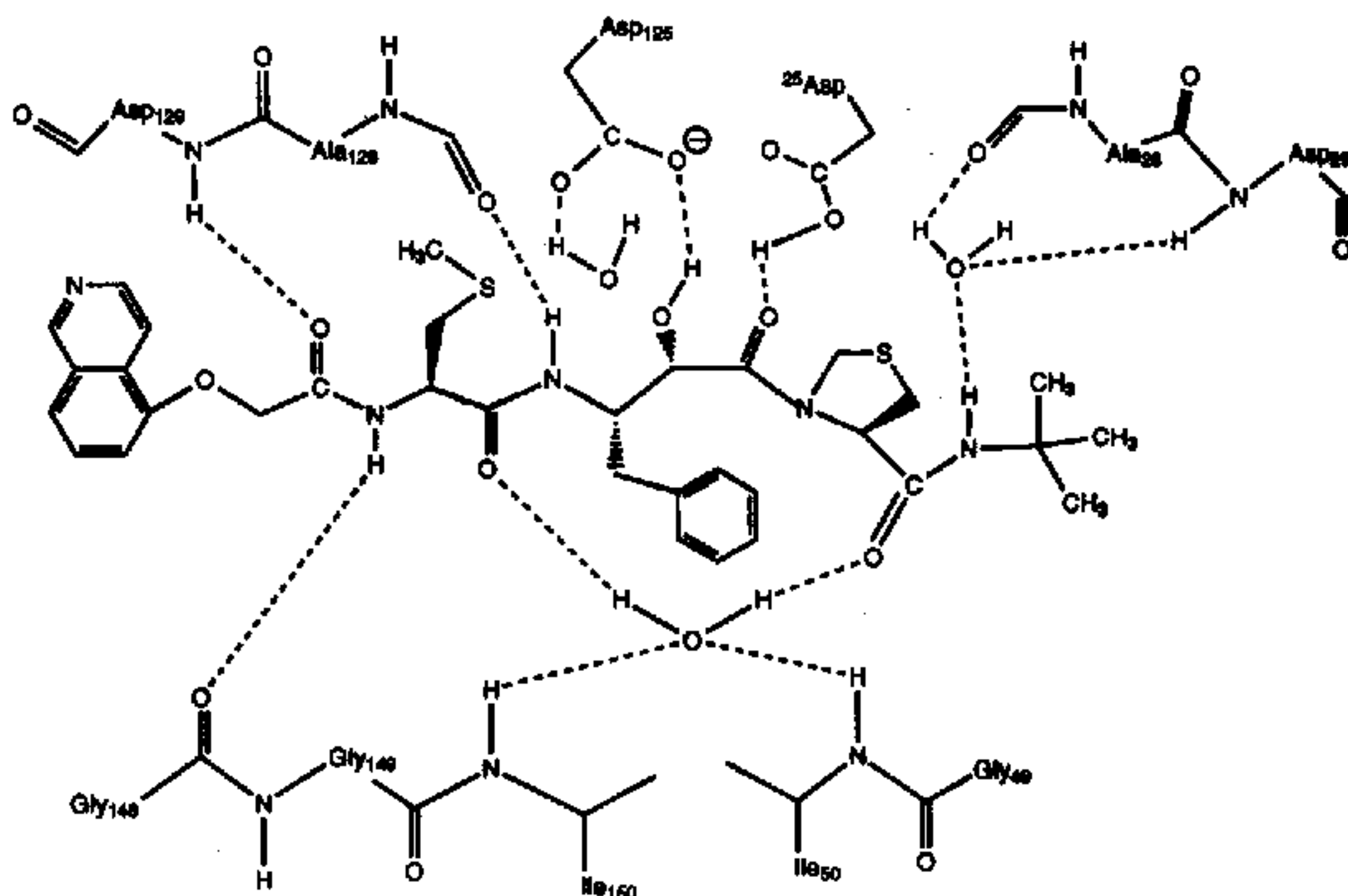


図5. KNI-272とHIV-1プロテアーゼ活性中心との相互作用

これは生体内で安定であり，末梢血単核細胞においてエイズ患者から分離された新鮮HIV-1の増殖に対しても強力な抗ウイルス作用( $IC_{50}$ 値が $0.01 \mu M$ )を示した。またHIVプロテアーゼ活性中心をターゲット(図3,5)とするメカニズム<sup>20-23)</sup>から明白なようにAZT耐性HIV-1やHIV-2を含む各種HIVにも活性を示す。特に，Phe-Proミミック構造である Apns-Thz(図4)を有するKNI-272は高い酵素選択性を示し細胞毒性も低かった( $TC_{50} > 80 \mu M$ )。

X線結晶構造解析，NMR構造解析ならびに分子モデリングにより，KNI-272中のヒドロキシメチルカルボニルアイソステアは活性中心アスパラギン酸と，基質遷移状態と同様の様式で相互作用していることがわかった。すなわち，ヒドロキシ基はAsp125のカルボキシルアニオンと水素結合しており，カルボニル基はプロトン化されたAsp25と水素結合している(図4,5)<sup>11,20,22)</sup>。このことは，ヒドロキシメチルカルボニルアイソステアが理想的な遷移状態ミミックであることを示唆している。

また，KNI-272の溶液中でのコンフォメーションが複合体中でのコンフォメーションとほとんど同じであること<sup>21)</sup>は，溶液中ですでに生物活性コンフォメーションに固定されていることを示唆しており，このプレオーガナイゼーションがKNI-272の高活性に寄与していると考えられる。

#### 4. 変異HIV-1プロテアーゼ

活性中心を攻撃していることから耐性ができにくいとされているHIVプロテアーゼ阻害剤と言えども，HIV-1プロテアーゼのアミノ酸配列の一部に変異がおこり，感受性の低下が生じることがわかってきた。

HIVプロテアーゼ阻害剤の長期使用によるHIV-1プロテアーゼの変異は数箇所でおこっているが，その酵素化学的研究によると，基質に対する親和性や酵素活性は一

般に低下し、また、変異ウイルスの病原性も低下すると報告されている。

KNI-272の場合においてもHIV-1は試験管内で比較的長期間にはあるが、プロテアーゼをコードする遺伝子内の変異により感受性が低下する(図2)。そのプロテアーゼでは84位IleがValに変異している。変異プロテアーゼは基質切断部位のPhe-Proをベースとしてミミックしている阻害剤のApsn-Thzに対する感受性が低下しており、恐らく基質のPhe-Proに対する感受性も低下していると推察される。実際に、変異プロテアーゼの酵素活性は低下しておりそのために感染性と病原性も低下している<sup>24)</sup>。

## 5. おわりに

プロテアーゼの機能や構造が明らかになるとともに、それをターゲットとする阻害剤のデザインも論理的にできるようになってきた。この際に強力な武器となるのが分子構造レベルでの酵素とリガンドの相互作用の解析である。すなわち、分子認識が原子レベルで理解できるようになってきたことが大きく寄与している。

## 文 献

- 1) 木曾良明, 三本勲: *BIO INDUSTRY*, 8, 704-710 (1991)
- 2) 木曾良明: *化学*, 47, 726-732 (1992)
- 3) Debouck, C.: *AIDS Res. Human Retroviruses*, 8, 153-162 (1992)
- 4) 木曾良明: *日本臨床*, 51, 139-145 (1993)
- 5) 林秀也ほか: *実験医学*, 11, 661-697 (1993)
- 6) 木曾良明: *ファルマシア*, 30, 246-248 (1994)
- 7) 木曾良明: *有機合成化学協会誌*, 52, 403-412 (1994)
- 8) 木曾良明: *Mebio*, 12, 78-86 (1995)
- 9) Kiso, Y.: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 362, 413-423 (1995)
- 10) 木曾良明: *医学のあゆみ*, 177, 962-968 (1996)
- 11) Kiso, Y. *Biopolymers*, 40, 235-244 (1996)
- 12) Iizuka, K., et al.: *J. Med. Chem.*, 33, 2707-2714 (1990)
- 13) Mimoto, T., et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 2465-2467 (1991)
- 14) Mimoto, T., et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 3088-3090 (1991)
- 15) Mimoto, T., et al.: *Peptide Chemistry 1991*, 395-400 (1992)
- 16) Mimoto, T., et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 40: 2251-2253 (1992)
- 17) Kato, R., et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 176-178 (1994)
- 18) Kageyama, S., et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 810-817 (1993)
- 19) Kageyama, S., et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*: 38, 1107-1111 (1994)
- 20) Baldwin, E. T., et al.: *Structure*, 3, 581-590 (1995)
- 21) Ohno, Y., et al.: *Bioorg. Med. Chem.*, 4, 1565-1572 (1996)
- 22) Wang, Y. -X., et al.: *Biochemistry*, 35, 9945-9950 (1996)
- 23) Wang, Y. -X., et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 12287-12290 (1996)
- 24) Kuroda, M. J., et al.: *Virology*, 210, 212-216 (1995)