

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13786

研究課題名(和文) ウイルスカプシドを基盤とした新規ナノ分子運搬容器の開発

研究課題名(英文) Studies toward a synthesis of virus capsids

研究代表者

塚野 千尋 (Chihiro, Tsukano)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：70524255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウイルスの代表的構造である正二十面体構造を有するRNAファージMS2のキャプシドを合成標的に選択して、その合成を試みた。RNAファージMS2は大腸菌に感染するウイルスで、最も原始的なものに分類される。その構造はウイルスの中でも単純で、外殻のキャプシドは180分子のタンパク質からなる正二十面体構造をとる。本研究ではキャプシドを構成する129残基のアミノ酸からなるタンパク質の合成を検討し、三つのフラグメントの連結を想定し、これらの固相合成に成功した。また、フラビウイルス属のウイルスのキャプシドタンパク質の合成法を確立し、ssDNAの添加によりキャプシドが形成することを確認した。

研究成果の概要(英文)：A synthesis of a virus capsid of RNA phage MS2 has been investigated. The three fragments were synthesized for the capsid.

研究分野：合成化学

キーワード：キャプシド

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは細胞に感染しない限り自己複製できないため生命体とは定義されないナノスケールの有機化合物構造体である。その構造はDNA(またはRNA)とそれを覆う殻であるキャプシドおよびエンベロープからなり、比較的単純である(図1)。近年、球状

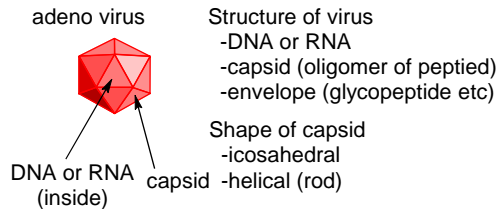


図1 ウイルスキャプシドの構造

ウイルスから核酸を除いたウイルスの殻(キャプシド)はナノスケールの反応容器や、遺伝子治療のための核酸キャリアーとして注目を集めている。例えば Douglas らはキャプシド内部でポリタングステンの合成(*Science* 2006 年)やラジカル重合(*Nat. Chem.* 2012 年)に成功している。また、Kang らはキャプシド内部に Gd(III)キレート剤を取り込み細胞内へ運搬させることを報告している(*Biomacromolecules*, 2013 年)。このように、ウイルスのキャプシドは機能性分子として注目されている。一方で、キャプシドの調製は天然ウイルスの分解か、遺伝子組み換えした大腸菌を用いたリコンビナントに依存している。リコンビナント法は目的とするある一つのペプチドを大量合成するには適しているが、多様なキャプシドを合成するためには、大腸菌にそれぞれ新しい遺伝子配列を導入する必要がある。化学合成法(固相合成法)はアミノ酸を一つ一つ伸張するため、多様なキャプシドを並列して合成できる点やペプチドの一部を修飾・構造改変できる点でリコンビナント法より優れている。しかし、現在のウイルスキャプシドを用いた研究では化学合成法を用いたキャプシド調製法は煩雑であるためほとんど利用されていない。

天然のキャプシドを模して人工キャプシドを化学合成する研究は、いくつかのグループにより展開されているが、基本的にはキャプシドの一部のみを模している。一方、天然のキャプシド自体モチーフにその部分構造を改変する研究はほとんど注目されていない。これはキャプシドタンパク質が 100 残基以上あるため、化学合成が煩雑である点と、生物学的手法(リコンビナント等)で調製する方が容易である点に起因している。しかしながら、Dawson らにより native chemical ligation (NCL)法が報告されて以来、100 残基程度のペプチドを化学合成する手法の発展は目覚ましく、203 残基の HIV-1 プロテアーゼの化学合成も Kent らにより報告されている(*Angew. Chem. Int. Ed.* 2007 年)。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルスのキャプシドを構成するコートタンパク質およびその構造改変体を化学的に合成することを目的としている。これを再構成して、物性を明らかにすることができれば、様々な機能性キャプシドを創出することが期待できる。本研究を基盤に、合成した天然型・非天然型キャプシドの大きさ等の構造的特徴を評価し、キャプシド内部への小分子導入とキャリアーとしての機能を検討する足がかりを得る。

3. 研究の方法

本研究では以下の方法で正二十面体構造を有する RNA フェージ MS2 のキャプシドを迅速に化学合成する。さらに、その合成経路を基盤として小分子運搬に適したキャプシドを開発する。

キャプシドのコートタンパク質のフラグメント(ペプチド断片)を固相合成法により調整する。

Native chemical ligation 法によりフラグメント連結する。

キャプシドの再構成と構造評価

RNA フェージ MS2 は 1961 年に A. J. Clark らにより単離された大腸菌に感染するウイルスで、最も原始的なものに分類される。その構造はウイルスの中でも単純で、180 分子のコートタンパク質からなる正二十面体キャプシド(外殻)と、その中に位置する核酸(RNA)と塩基性成分スペルミジン約 1000 分子からなる。キャプシドを構成するコートタンパク質は 129 アミノ酸からなり、ヒスチジンを含まない点特徴的である(図2、*Nature*, 1972, 237, 82.)。正二十面体キャプシドは、このコートタンパク質が二量体を作り、さらに 90 個集まって形成される。MS2 キャプシドは外殻の直径が 27.4 nm、内部空洞の直径は 17 nm であることが X 線結晶構造解析により明らかにされている。RNA フェージ MS2 はその構造に加えて、ゲノムや感染機構まで多くの研究がなされているため、RNA フェージ MS2 のキャプシドを最初の合成標的に選択した。それら知見は、キャプシドの合成・再構築や

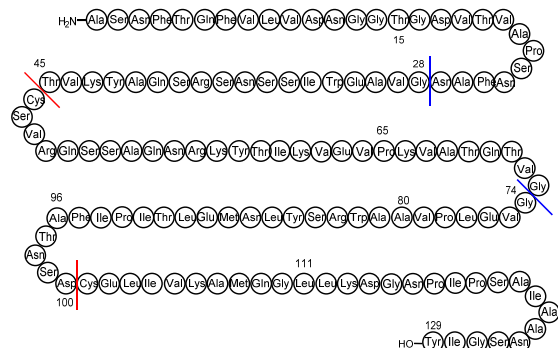


図2 RNA phage MS2のコートタンパク質のアミノ酸配列

小分子運搬に適した構造改変キャプシドの開発に役立つはずである。

○合成計画

RNA フェージ MS2 ウイルスの 129 残基キャプシドコートタンパク質を合成するために、図 3 赤線に示した位置での連結を想定し、3 個のペプチドフラグメント(1-45, 46-100, 101-129 残基)を Fmoc 固相合成法により合成することを計画した。これら 3 つのフラグメントは樹脂から切り出し、保護基を除去した後、Dawson らが報告している手法 (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 6851) を参考に Native chemical ligation (NCL) 法によりフラグメント連結する。すなわち、システインを N 末端もつフラグメント A と、チオエステルを C 末端に持つフラグメント B をそれぞれ固相合成と切り出し、および変換によって調整する。続いて、チオエステル反応性の差を上手く利用して NCL 法で連結する (Scheme 1)。得られたフラグメント A B (1-100 残基) を引き続いて、フラグメント C と NCL 法を用いて連結し、コートタンパク質(1-129 残基)を合成する。

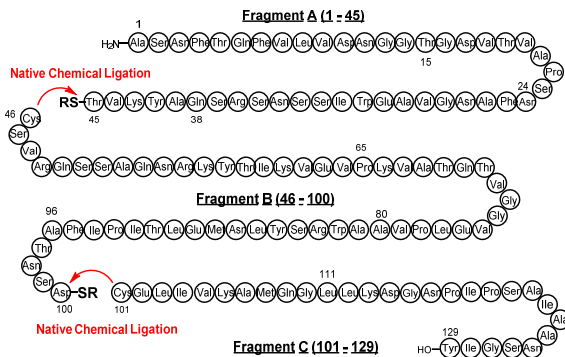
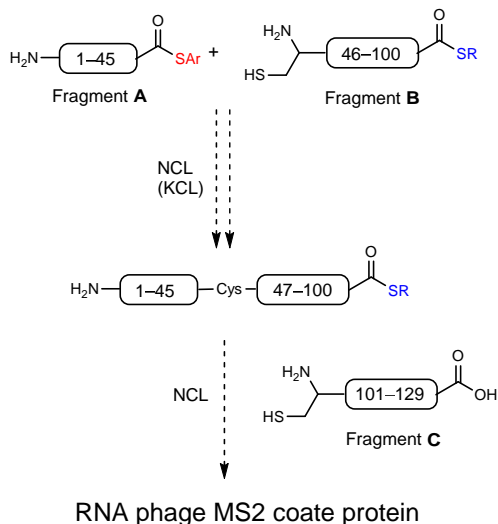


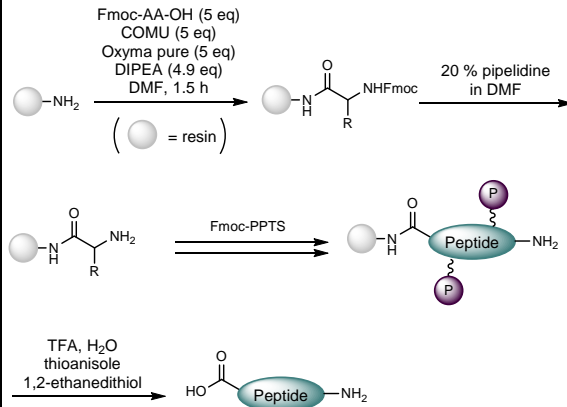
図 3 RNA phage MS2の合成計画



Scheme 1. Synthesis of RNA phage MS2 coat protein.

○Fmoc 固相合成法

縮合剤として COMU、縮合活性化剤として Oxyma pure を用いて、N 末端を伸長した。酸条件による脱保護が可能となるよう、側鎖の官能基が Trt, Boc, Pbf 基により保護されたアミノ酸を用いることとした。合成が完了した後は、TFA, H₂O, thioanisole, 1,2-ethanedithiol を用いた酸条件で脱保護と切り出しを行った (Scheme 2)。



Scheme 2. The method of Fmoc-PPTS

4. 研究成果

(1) フラグメント C の合成

まず、最も鎖長の短いフラグメント C より合成を開始した。C 末端から Fmoc 固相合成法で Fragment C を合成した (図 4)。三種類の resin (H-link amide, Clear amide resin, NovaSyn resin) を用いて、Cys (99) まで伸長した。純度、分子量の解析は Asn (114) と Cys (99) の時点で少量脱保護し、HPLC と MALDI を用いて行った。合成完了後のペプチド鎖の純度は H-link amide, Clear amide resin, Novasyn resin の順に高かった。フラグメント C の合成に成功し、H-link amide を用いることが本合成に適していることを明らかにした。

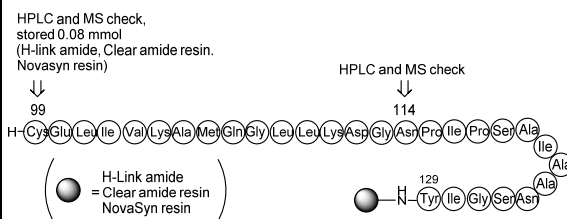


図 4 Fragment C の合成

(2) フラグメント A の合成

次にフラグメント A の合成に取りかかった。フラグメント A では C 末端にチオエステルを構築する必要があるため、後にチオエステルへと変換できる Dawson linker (3,4-ジアミノ安息香酸) を resin に縮合してから、伸長する事とした。文献の方法に従い、市販の 3,4-ジアミノ安息香酸をアセトニトリルと aq. NaHCO₃ の混合溶媒中、Fmoc-OSu と反応

させ、Fmoc 保護体へと誘導した後、resin と縮合した。アニリンがニンヒドリン反応で呈色してしまうため、Dawson linker の定着率は Fmoc 定量を用いて判断し、80%以上の定着を確認した。

二種類の resin (H-link amide, Clear amide resin) を用い、Fmoc 固相合成法でペプチドの合成を試みた(図5)。本フラグメントはC末端にチオエステルを構築する必要があるため Dawson linker を resin に縮合してから、ペプチドを伸長した。途中 Gln(6)で Clear amide resin を用いたペプチドが縮合しにくくなったため、H-link amide のみで残りの合成を完了した。純度の解析は Ala(1)、Glu(14)、Val(29)の時点で HPLC を用いて行った(図5)。合成したフラグメントAの純度

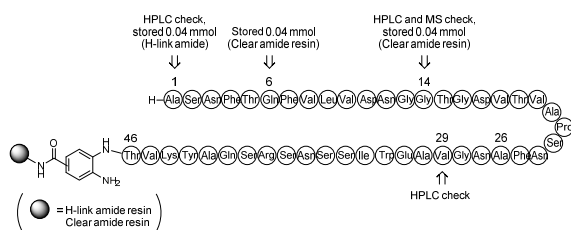


図5 Fragment Aの合成

を解析したところ、純度が低下することが明らかになった。この結果より Kaiser test で判別できない縮合しにくいアミノ酸配列が存在することが予測された。

高純度のフラグメントを得るために、通常の方法では縮合困難なアミノ酸残基の同定を検討したところ、Phe⁷、Thr⁵ のアミノ酸導入段階において純度が低下している事が明らかになった。これらのアミノ酸の導入について、縮合剤と濃度に関して条件の最適化を試みた。縮合剤に HBTU、HATU、COMU を用いて検討し、COMU/Oxyrna (0.9 M) の条件が最も効率良く Phe⁷ を導入できたため、本条件を最適とした。一方で、Thr⁵ の導入では側鎖の水酸基を保護している ^tBu 基が立体障害となり目的の縮合体を得ることはできなかった。この問題を解決するために、無保護 Thr および pseudoproline を有するペプチド鎖での縮合を検討したが、良い結果を与えなかった。

そこで、フラグメントAは合成に問題のないそこでフラグメントD (Gly¹⁴-Thr⁴⁵) と比較的に合成の難しいフラグメントE (Ala¹-Gly¹³) のセグメント縮合で合成することとした。フラグメントE (Ala¹-Gly¹³) は Fmoc-SPPS で合成した後、HFIP で処理して保護ペプチドとして得る。その後、Fmoc-SPPS で合成した Dbz 基と Pseudoproline (Gly¹⁴-Thr¹⁵) を有するフラグメントD (Gly¹⁴-Thr⁴⁵) と縮合させる。立体障害が少なく反応が速やかに進行する点と、エピメリ化の恐れが無い点から Gly-Gly の位置でのセグメント縮合を選択した。フラグメントDについては、先と同様に固相合成法により合成した。現在、フラグメ

ントEの合成とフラグメントDとの連結を検討中である。

(3)フラグメントBの合成

フラグメントCの合成と同様に三種類の resin (H-link amide, Clear amide resin, NovaSyn resin) を用いて合成を検討した。本フラグメントもチオエステルが必要であるため、Dawson linker を導入してから伸長を行った。途中 Gln(54)で Clear amide resin, NovaSyn resin) を用いたペプチドが縮合しにくくなったため、これら樹脂が本合成に不適であることが明らかになったので、H-link amide のみで残りの合成を完了した。純度と分子量の確認は Cys(46)、Ala(68)で、HPLC と MALDI を用いて行った。合成したフラグメントBは現在精製中である。

(4)フラビウイルス属ウイルスのキャプシドタンパク質の化学合成

上述の知見をもとに、連携研究者の協力のもと、フラビウイルス属の一種のウイルスのキャプシドタンパク質の化学合成を検討した。このキャプシドタンパク質も MS2 キャプシドと同様にホモ二量体を形成し、核酸成分の添加により二量体が集合してキャプシドを形成する。

まず、N末端セグメント(1-48)とC末端セグメント(49-100)を合成した。N末端セグメントは、Dawson リンカーを用いて望みのチオエステルへ変換させることにより得た。C末端セグメントはFmoc固相合成法により合成した。両フラグメントを native chemical ligation (NCL) により連結後、脱硫して目的のキャプシドタンパク質を得た。続いて、得られたキャプシドタンパク質(50 mM)に対して3:1のモル比となるように ssDNA を添加することによりキャプシド形成を試みた。サイズ排除ゲルろ過クロマトグラフィー等による分析を経てキャプシド粒子の形成を確認した。

(5)白金およびパラジウム触媒を用いた新規ペプチド合成の検討

ペプチドの合成にパラジウムや白金触媒反応が適用できるか検討した。

パラジウム触媒反応について、カルバミン酸クロリドの酸化的付加と続くC-H官能基化によりオキシインドールを構築する方法を開発している。本法を応用して、アミンユニットとカルバミン酸クロリドユニットの連結を検討したが、これら反応が進行しないことが明らかとなった。

また、白金触媒によるアルキニルアミドの7-エンド-環化および銅触媒によるヨウ化ビニルを分子内に持つアミドの環化により1,4-ジアゼピン骨格を構築する方法を開発していた。本手法を用いればデヒドロアミノ酸ユニットが合成可能である。種々検討した

が、これら白金や銅触媒を用いる反応の適用は難しいことが明らかとなった。一方で銅触媒を用いる方法はアミド結合を分子内に持つ核酸系抗生物質の合成に適用できた。

(6) まとめ

以上をまとめると RNA phage MS2 の化学合成に着手し、必要な三つのフラグメント A、B、C を Fmoc 固相合成法で合成した。今後の課題として、高純度のフラグメントを合成することが挙げられる。

また、フラビウイルス属のウイルスのキャプシドタンパク質の NCL を用いた化学合成法についても検討した。キャプシドタンパク質の合成法を確立し、ssDNA の添加によりキャプシドが形成することを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tsukano, C., Palladium(0)-Catalyzed Benzylic C(sp³)-H Functionalization for the Concise Synthesis of Heterocycles and Its Applications, *Chem. Pharm. Bull.*, **65**, 409-424 (2017). (査読あり)

Nakamura, H.; Yoshida, T.; Tsukano, C.; Takemoto, Y., Synthesis of CPZEN-45: Construction of the 1,4-Diazepin-2-one Core by the Cu-catalyzed Intramolecular Amidation of a Vinyl Iodide, *Org. Lett.* **18**, 2300-2303 (2016). (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

塚野 千尋、中村 斐有、吉田 拓馬、竹本 佳司、CPZEN-45 の全合成、第 110 回有機合成シンポジウム(早稲田大学国際会議場、東京都新宿区)平成 28 年 11 月 10-11 日。

塚野 千尋、パラジウム触媒反応および脱芳香環化を基軸とした複雑な生物活性天然物の全合成、日本薬学会第 136 年会(パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)平成 28 年 3 月 27 日(受賞講演)。

Chihiro Tsukano, Masataka, Okuno, Takeshi Nanjo, Nobusuke Muto, Yoshiji Takemoto, Palladium-Catalyzed Amidation by Chemoselective C(sp³)-H functionalization: Concise Route to Oxindoles and its application, The 25th ISHC Congress (University of California, Santa Barbara, USA), Aug 23-28, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

所属研究室での研究業績(発表論文、学会発表)に関する情報は下記ホームページ参照
http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/orgchem/04_ron.html
http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/orgchem/05_gak.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚野 千尋 (TSUKANO, Chihiro)
京都大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 70524255

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大石 真也 (OISHI, Shinya)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 80381739

(4) 研究協力者

なし