

# 抗ウイルス活性ペプチドの 培養微生物による生産プロセスの確立

JSTイノベーションプラザ京都における育成研究 平成18年度採択課題

「ペプチド性新興・再興ウイルス膜融合阻害剤の大量生産法の確立と創薬展開」



代表研究者 京都大学大学院 薬学研究科 教授

## 藤井 信孝

近年、バイオ医薬品の実用化が急速に進み、タンパク質・ペプチド性化合物の低コストでの生産プロセスの確立が求められている。本プロジェクトでは、酵母・麹菌等の醸造微生物を利用した高効率大量発現系と活性ペプチド部分配列の抽出のための化学的プロセスを組み合わせた抗ウイルス活性ペプチドの大量生産法を確立した。

### ■ 研究内容、研究成果

#### ● 抗ウイルス活性ペプチドの開発

HIV膜融合阻害剤Fuzeonは、従来の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性を獲得したHIV株に有効なペプチド性薬剤である。しかしながら、すでにFuzeonに対する薬剤耐性株の出現が報告され、この耐性株はウイルスのエンベロープタンパク質gp41中のアミノ酸変異によりFuzeonの結合親和性を低下させるとともに、HIV感染に関わるタンパク質の折りたたみ構造を維持することが報告されている。本研究では、こうした薬剤の投与に伴うウイルスタンパク質の変異情報をもとに新たなペプチドをデザインし、Fuzeon耐性株にも有効であることを明らかにした。また、ネコの免疫不全症候群の発症に関わるFIVのエンベロープタンパク質のアミノ酸配列をもとに、FIVによる膜融合作用を抑制する新規活性ペプチドを見出した。

#### ● 組換えタンパク質からの活性ペプチド配列の回収技術の開発

通常、発現生産により得られるペプチド・タンパク質は、ペプチダーゼによる分解を受けやすい末端非修飾型として供給される。本研究では、発現生産により得られる不均一

な融合タンパク質から、化学的処理により均一な抗HIV活性ペプチド配列を単離するプロセスを確立した。得られたペプチドの活性配列両末端には、生体内で長期間にわたり生物活性を期待できる修飾基が付加されている。また、より安価な活性ペプチド配列の精製を実現するイオン交換クロマトグラフィーによるプロセスを確立した。

#### ● ペプチド高生産技術の開発と清酒酵母・麹菌による発現生産技術の確立

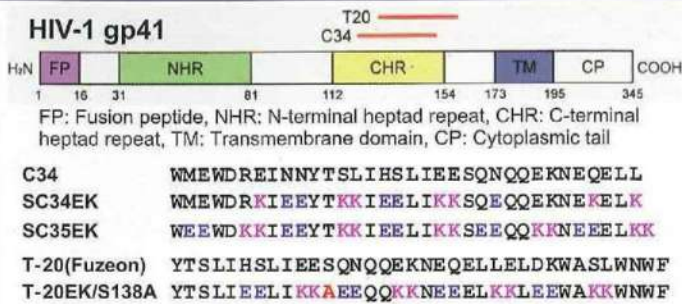
従来のペプチドホルモン製剤とは異なり、Fuzeonをはじめとする抗ウイルス活性ペプチドの薬用量は極めて大きく、均一なペプチド原料の大量供給が必要とされる。本研究では、従来の固相合成法と液相合成法を組み合わせた化学合成により生産されている抗HIV活性ペプチドを、醸造微生物（清酒酵母・麹菌）を用いた発現生産プロセスにより供給するための技術開発を行った。効率的な分泌発現のための各種リーダータンパク質のうち麹菌由来のエンドグルカナーゼCelAが有用であることを明らかにするとともに、活性配列を含む融合タンパク質を高収率で獲得する培養条件を確立した。

### ■ 今後の展開、将来の展望

感染症はいまだに発展途上国を中心に死亡原因の上位を占め、新たな治療薬開発が求められている疾患である。本プロジェクトにより確立された手法は、特に生産コストが高いタンパク質・ペプチド製剤の医薬品原末を安価かつ安定的に供給する方法の1つとして、先進国における医療経済上の課題

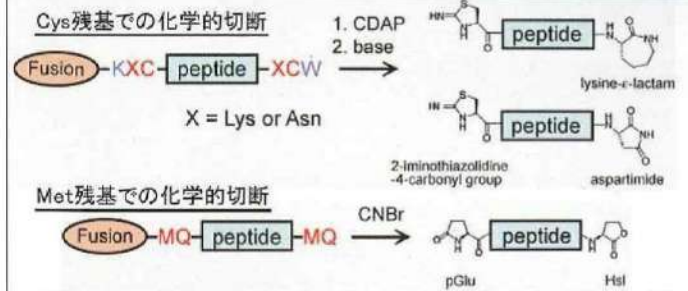
の解決や発展途上国への安価な治療薬の供給に役立つことが期待される。引き続き、JST等の支援を得ながら、京都大学と月桂冠株式会社の共同研究を進展させ、抗ウイルス活性ペプチドの製品化・事業化を展開する。

### HIV-1エンベロープタンパク質gp41の構造と配列



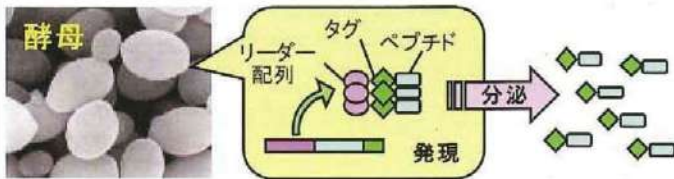
HIV膜融合阻害剤にαヘリックス誘起モチーフと薬剤耐性関連アミノ酸置換を導入することで、より強力な抗HIV活性を示すペプチドを開発した。

### 組換えタンパク質の化学処理によるエキソペプチダーゼ耐性型抗HIV活性ペプチド生産



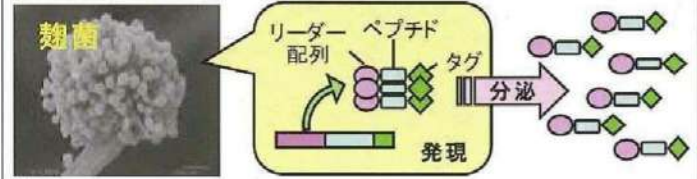
組換えタンパク質を化学処理することにより活性ペプチド配列の両末端を環化したペプチドを得る方法を確立した。この両末端環化ペプチドは、化学合成した抗HIV活性ペプチドと同様の生物活性と物理学的特性を有する化合物である。特許出願中

### 酵母を用いた抗HIV活性ペプチド発現生産



αファクタープレプロ配列と麹由来のCelAをリーダー配列に用いて、株、培地組成、培養条件等を検討し、酵母での抗HIV活性ペプチド分泌発現に成功した。特許出願中

### 麹菌を用いた抗HIV活性ペプチド発現生産



エンドグルカナーゼ(CelA, CelB), βグルコシダーゼ(Bgl7)をリーダー配列に用いて、培地組成、培養条件等を検討し、麹での抗HIV活性ペプチドの分泌発現に成功した。また、CelAが最も良好なリーダー配列であることを見出した。特許出願中

## 研究体制

代表研究者 京都大学大学院 薬学研究科 教授 藤井 信孝

研究者 梶原 一美(科学技術振興機構), 田中 智子(科学技術振興機構), 常盤 礼(科学技術振興機構)  
 松岡 雅雄(京都大学), 枥倉 匡文(京都大学), 児玉 栄一(京都大学), 大石 真也(京都大学), 辻本 元(東京大学),  
 遠藤 泰之(鹿児島大学), 秦 洋二(月桂冠), 堤 浩子(月桂冠), 大浦 新(月桂冠), 水本 真紀子(月桂冠)

共同研究機関 東京大学, 鹿児島大学, 月桂冠株式会社

## 研究期間

平成19年4月～平成22年3月