

厚生労働科学研究研究費補助金

政策創薬総合研究事業

課題番号 H16-創薬-006

HIV融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

平成18年度 総括研究報告書

平成19年3月

主任研究者 松岡 雅雄

(京都大学ウイルス研究所・教授)

目 次

I. 総括研究報告	
HIV融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の 開発に関する研究	----- 1
主任研究者・松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 主任研究者・松岡雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	----- 4
分担研究者・児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・助手）	
2. 分担研究者・藤井信孝（京都大学大学院薬学研究科・教授）	----- 8
分担研究者・大石真也（京都大学大学院薬学研究科・助手）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 22

HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄

研究要旨

抗 HIV 剤を組み合わせた highly active antiretroviral therapy (HAART) により HIV 感染者の予後は著明に改善したが HAART によっても HIV の根絶は不可能であり長期に亘る服用が必要である。このため耐性ウイルスの出現は避けられず耐性ウイルスにも有効な新規の抗 HIV 剤の開発が必要とされている。我々は HIV-融合過程を標的とする薬剤開発を目指し研究を進めている。本年度は SC34EK を小分子化した SC29EK が野性株と耐性株に対する強い効果を維持することを見出した。N36 に対する耐性変異を同定し、T-20 耐性で N43D が多く見られる理由として D36G 変異が関与することを示した。T-20 耐性株にも強力な活性を示す新規膜融合阻害剤 T-20EK を創出した。さらに、耐性株の gp41 CHR のアミノ酸配列をもとに合理的にデザインした誘導体が、当該耐性株に対する高い活性を示すことを明らかにした。また、膜融合阻害剤の非ペプチド化を目的としたフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成法を確立するとともに、インドール骨格を有する低分子膜融合阻害剤の構造最適化研究を効率的に実施するための新規インドール骨格構築法を確立した。

分担研究者氏名・所属機関名及び
所属機関における職名：

藤井信孝（京都大学大学院薬学研究科・教授）
大石真也（京都大学大学院薬学研究科・助手）
児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・助手）

A. 研究目的

不治の病と考えられた HIV 感染症は複数の抗 HIV 剤を組み合わせた highly active antiretroviral therapy (HAART) の著しい効果によりコントロール可能な疾患へと変貌している。しかし、HIV の根絶は不可能なままであり、そのコントロールには長期の服薬が絶対条件である。このような長期の服用に伴い耐性ウイルスの出現は避けられない問題となっている。このような耐性ウイルスに対しては新たな複製ステップを標的とする新規薬剤が有効である。

我々の研究グループは HIV 外皮タンパク質 gp41 により引き起こされる細胞・HIV 膜融合 (fusion) を新たな分子標的として新規阻害剤の開発を進めている。既に米国等で臨床応用されている HIV gp41 由来ペプチド T-20 は大きな効果を上げているものの高価であり治療費の大幅な増加という問題がある。このため、より安価で強い活性を持つペプチドの開発が必要である。一方で、ペプチド製剤は経皮投与に限られるという欠点を有しており、経口投与可能な融合阻害活性を

有する小分子化合物の開発が待ち望まれている。

本研究の目的は未だ解明が進んでいない HIV 細胞融合の分子機序を明らかにし新薬開発のための分子基盤を確立することである。融合ステップをターゲットにした新規抗 HIV 剤の開発は耐性ウイルス克服に有効であるばかりでなく HAART 療法の強化、感染予防薬としての可能性をも有するものと期待される。

B. 研究方法

1) T-20 耐性ウイルスの作製

プラスミドクローン pNL4-3 に site directed mutagenesis 法により T-20 耐性ウイルスで見られた主な変異を導入した。NL4-3 特有のアミノ酸変異である G36D を野生型である G に変更したものをを用いて組換えウイルスを作製した。主な T-20 耐性関連株として V38A, N43D と N43D に付随しその耐性度をさらに高くする S138A を組み合わせたクローンを作製した。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性は HeLa-CD4/LTR-β-galactosidase (MAGI)細胞を用いて解析した。臨床分離株に対する効果は培養上清中の p24 を測定して解析した。

3) N-HR 由来ペプチドの耐性機序の解明

N-HR 由来ペプチドである N36 に対する耐性 HIV を dose escalating によって誘導した。誘

導されたウイルスの env 領域の塩基配列を決定した。導入された変異を有する pNL4-3 クローンを作製し、その N36 感受性を検討した。

4) C34 誘導体および T20 誘導体をはじめとするペプチドは、Fmoc 固相合成法の常法によって合成した。また、非ペプチド化を指向したペプチドイソスターの合成、および低分子膜融合阻害剤の基本骨格となる誘導体は、通常の化学合成法により成果発表論文に記載の方法でそれぞれ合成した。

(倫理面への配慮)

基礎研究であり、特段の配慮を必要とする実験は実施していない。

C. 研究結果

1) 新規融合阻害ペプチド T-20EK の創出と抗 HIV 効果

SC34EK で用いた EK 置換を T-20 に導入することにより T-20 が水溶性になると共に抗 HIV 活性も約 5 倍上昇することを見出した。T-20 耐性 HIV に効果を検討した。N43D 変異を有する HIV-1 に対して 1.5 倍、V38A を有する HIV-1 に対して 4 倍程度の感受性低下が認められたが、T-20 が 15 倍、14 倍に耐性化したことと比べ明らかに耐性 HIV の複製を阻害していた。このような効果の機序として CD スペクトル測定の結果、T-20EK において α ヘリックス性の指標として用いられる 222 nm 付近で負の極大を示すスペクトルが観察され、T-20EK の α ヘリックス性が T-20 に比べ期待通り上昇していることを確認した。Trp161 を Glu に置換した T-20EK4 および T-20EK5 は著しい活性の低下を示したため、Trp161 が抗 HIV 活性の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に T-20 および T-20EK の 138 位をシステムイン以外の天然アミノ酸で置換した T-20/S138X および T-20EK/S138X を合成し、抗 HIV 活性を評価した。その結果、いずれの誘導体においても酸性アミノ酸 (Asp, Glu) や塩基性アミノ酸 (Lys, His, Arg) 置換体において大幅な活性の低下が認められたが、Ala や Ile といった電荷を持たない側鎖の比較的小さいアミノ酸で置換した場合において高い抗 HIV 活性を示した。Ala 置換体がどちらのペプチドにおいても最も高い活性を示し、T-20EK/S138A はリード化合物である T-20 に比べ 50 倍以上強力な抗 HIV 活性を示した。T-20 耐性ウイルス (DG/N43D) に対する抗 HIV 活性を評価したところ、

T-20/S138A および T-20EK/S138A は耐性株に対しても強力な抗 HIV 活性を示した。

2) SC34EK の低分子化・非ペプチド化

強い抗 HIV 活性と耐性ウイルスへの効果を有する SC34EK の低分子化を試みた。SC34EK の C 末側 5 残基を欠失させた SC29EK の抗 HIV 効果は SC34EK と同等であり、T-20 耐性ウイルスに対しても強い効果を維持していた。しかし、EK 置換を行っていない C29 は弱い活性しか有さず、また、T-20 耐性株に対して効果が認められなかった。以上の結果から EK 置換は活性増強と共に交叉耐性にも有効である事が示された。

高活性 HIV-1 膜融合阻害剤として見出された SC35EK 誘導体および T-20EK 誘導体について、昨年度に引き続き非ペプチド誘導体への構造変換を目的として、アルケン型ジペプチドイソスターの導入について検討を行った。研究グループでは SC35EK および T-20EK に共通して存在する X-EE-XX-KK モチーフの Lys-Lys に相当するフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成を行った。

3) N36 に対する耐性機構

C 末由来のペプチドに対する耐性機序に関する報告はあるが、N 末由来のペプチドに対する耐性機構に関しては、これまで報告がない。本年度は N36 に対する耐性ウイルスを N36 dose escalating 法にて誘導した。約半年培養することにより、N36 に対して 10 倍耐性を示すウイルスを分離した。このウイルスの env 全領域 (約 2.5 kb) の塩基配列を決定し、gp120 領域に P183Q、gp41 領域に D36G/N126K/E137Q の変異が導入されていることを明らかにした。それぞれの変異を有する感染性クローンウイルスを作製し、N36 の感受性を検討したところ、N126K と E137K が各々 3 倍程度の耐性を付与していた。

4) 低分子融合阻害剤の開発

最近、respiratory syncytial virus (RSV) の膜融合阻害剤がインドールもしくはベンズイミダゾール骨格を有する低分子化合物であることに着目し、本研究によりこれらの骨格を有する化合物 118 種類についてスクリーニングを実施した。その結果、 $EC_{50} = 40\mu\text{M}$ と $70\mu\text{M}$ [MAGI assay(IIIB)] の抗 HIV 活性を示した化合物の共通骨格がインドールであったことから、これらの関連誘導体への合成展開に向けて、効率的なインドール誘導体合成法の確立に取り組んだ。

D. 考察

前年度までの研究成果として現在、臨床で使用されている T-20 より強力な抗 HIV 活性を有する SC34EK を創出した。今年度は、この SC34EK の小分子化を行い、SC34EK は 29 アミノ酸まで小分子化してもその抗 HIV 活性は保たれ耐性 HIV に対する活性も維持されていた。また、今年度は SC34EK で有効であった EK 置換を T-20 にも応用し、T-20EK を作製し、T-20 耐性株に対する効果を解析した。T-20EK も SC34EK 同様に効果が増強しただけでなく、耐性 HIV の複製を抑制することが可能であった。また耐性ウイルスから得られた情報を基に T-20EK/S138A の開発に成功した。T-20EK/S138A は優れた抗ウイルス活性のみならず耐性ウイルスに対しても有効であった。このように本研究から耐性ウイルスの情報を基盤として新たな融合阻害剤を開発するという戦略が確立されたことは今後の抗 HIV 剤開発にとって大きな武器になるものと考えられる。

耐性ウイルスの解析では N36 耐性機序を解明し、新たな知見を得ることができた。N36 耐性に関与する変異は N126K と E138Q であったが、N126K は C34 耐性 HIV でも見出された変異であり、gp41 内における HR-1 と HR-2 の結合性を上昇させることがわかっている。E138Q も結合性を上昇させ、外部からの阻害剤としての N36 よりも gp41 内でおこる結合性を増加させペプチドの結合を阻害しているものと考えられる。このように両ペプチドに対する耐性変異が同様の機構で起こっていることが示された。

今年度の研究からペプチド合成を基盤として融合機構に新たな知見が得られた。結晶構造から推定される T-20 の溶媒接触面に位置する残基 (b,c,f,g) を Glu もしくは Lys に置換した T-20EK では、抗 HIV 活性が上昇したことから、この位置する残基は T-20 の膜融合阻害に直接関与していないことが示唆された。このことは T-20 が C34 と同様に gp41 NHR と安定な 6-helical bundle 構造を形成することで、HIV 感染を阻害している可能性を示唆しており、未だ完全に解明されていない T-20 の阻害メカニズムに対して有益な知見であると考えられる。

また、T-20 耐性 HIV 株に対し、ウイルスの変異に合わせた合成ペプチド T-20/S138A は、再び抗ウイルス活性を示した。138 位の Ala 置換は CHR 由来ペプチドの種類によらず 6-helical bundle 構造の安定化に寄与する

ことで、活性発現に重要な役割を果たしており、このような T-20 耐性 HIV 臨床分離株で確認された変異アミノ酸部位は膜融合阻害剤を開発する上で重要な構造最適化の標的的部位になりうるものと示唆された。

研究グループでは、ペプチド性膜融合阻害剤の候補化合物 SC35EK 誘導体および T-20EK 誘導体の非ペプチド化を目的として、 α -ヘリックス構造に不可欠な水素結合形成が期待できるフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法を確立した。今後の非ペプチド化に向けて大きな成果であると考えられる。

また、低分子膜融合阻害剤の構造活性相関研究を展開するための基盤技術として、ホルムアルデヒド、二級アミン、エチルアニリンの銅触媒による三成分カップリング、連続する環化反応により様々な官能基を有する新規 2-(アミノメチル)インドール化合物の効率的合成法を確立した。

E. 結論

今年度の研究から耐性機構の解析から合成への情報フィードバックにより、より強力な耐性ウイルスにも有効な融合阻害剤が開発できたと共に、新規抗 HIV 剤開発の戦略が確立された。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

別添

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | 別添 |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄

分担研究者：京都大学ウイルス研究所 児玉 栄一

研究要旨

SC34EK を小分子化した SC29EK は SC34EK で見られた野性株と耐性株に対する強い効果を維持することを見出した。N36 に対する耐性変異を同定し、T-20 耐性で N43D が多く見られる理由として D36G 変異が関与することを示した。

A. 研究目的

Human immunodeficiency virus (HIV) に対する化学療法が導入されてから約 20 年が経過しようとしている。この間、多くの逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が開発、臨床使用され一定の効果が見られるようになってきているが、阻害剤クラス内における多剤耐性 HIV の出現は、治療効果を著しく低下させてしまう。さらに新規薬剤においてもその影響を受けるものがあり、多剤耐性 HIV に有効な新規の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発にとどまらず、新しい分子標的に対する薬剤の開発が必要不可欠である。

本研究では新規阻害標的として HIV 外皮蛋白質 gp41 を選択しその阻害剤の開発を行うことを目的としている。合成ペプチド製剤である T-20（Trimeris-Roche 社、Fuseon）は HIV と宿主細胞との融合を阻害し、現在、米国やヨーロッパ等で臨床応用され大きな効果を上げている。しかしペプチド製剤であるため治療費の大幅な増加という問題があり安価で強い活性を持つペプチドの開発が必要である。一方でペプチド製剤は経皮投与に限られるという欠点を有しており経口投与可能な融合阻害活性を有する小分子化合物の開発は最重要課題である。最終年度である本年度は我々の研究チームで本研究事業において開発されたペプチド製剤についてその臨床応用を視野に入れた基礎的研究を行った。

B. 研究方法

1) T-20 耐性ウイルスの作製

T-20 耐性ウイルスはプラスミドクローン pNL4-3 を基本として site directed mutagenesis 法で現在まで報告された臨床分離耐性株でみられた主な変異を導入し、293T 細胞に遺伝子導入し、その培養上清から回収した。本年度は、NL4-3 特有のアミノ酸変異である G36D を野生型である G に変更したものをを用いて組換えウイルスを作製した。主な T-20 耐性関連株として V38A, N43D と N43D に付随しその耐性度をさらに高くする S138A を組み合わせたクローンを作製した。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性は HeLa-CD4/LTR- β -galactosidase (MAGI)細胞を用いて既報にしたがって行った。また、長期にわたる HAART によって薬剤耐性を獲得した臨床分離株を HIV 感染患者から分離し、これらに対する SC 誘導体の効果を健常人末梢リンパ球で検討した。効果判定は PBMC 培養上清中に放出された HIV 粒子中の p24 量から判定した。

3) 使用したペプチド

T-20 と比べて非常に強い抗 HIV 活性を有する SC34EK とその C 末側 5 アミノ酸を欠失させた SC29EK とさらに 7 アミノ酸欠失させた SC22EK を使用した。コントロールとして EK 置換を行っていない C34, C29, C22 も使用した。

4) HIV 細胞融合の非感染系モデルによるスクリーニング

HIV gp41 領域の N-terminus heptad repeat (N-HR: N36)と C-HR (C34)をそれぞれ MBP と GST の融合蛋白として大腸菌で合成し、これらの結合を ELISA で検出するスクリーニング法を確立しており、これを応用し、今年度合成した小分子化合物をスクリーニングした。さらに使用する N 領域のペプチドの長さを変更し、小分子化合物の結合サイトを検索した。

5) T20 のアミノ酸の変更

T-20 の低分子化を目的とし、T-20 のアミノ酸配列を SC34 誘導体と同様に EK による置換を試みた。

6) N-HR 由来ペプチドの耐性機序の解明
N-HR 由来ペプチドである N36 に対する耐性 HIV を dose escalating によって誘導した。誘導されたウイルスの env 領域の塩基配列を決定した。導入された変異を有する pNL4-3 クローンを作製し、その N36 感受性を検討した。

(倫理面への配慮)

基礎研究しか行っておらず、特に配慮は要らないと考えられた。

C. 研究結果

1) SC29EK の抗 HIV 効果

T-20 と比べ約 70 倍活性を有する SC34EK の C 末側 5 残基を欠失させた SC29EK の抗 HIV 効果は SC34EK と同等であり、さらに T-20 耐性ウイルスに対してもその強い効果を示した。一方、EK 置換を行っていない C29 は弱い活性しか示さず、また、T-20 耐性株に対して効果を示さなかった。これらのことから EK 置換は活性を増強させるだけでなく交差耐性に関しても効果的であることが判明した (Table 1)。

Table 1. SC29EKのT-20耐性株への効果

mutation	EC ₅₀ (nM)			
	C29	SC29EK	C34	SC34EK
WT	52±18	1.9±0.02	6.5±1.8	2.7±0.7
N43D	>1000	3.0±0.6	9.3±3.5	2.2±0.4
N43D/S138A	>1000	4.1±0.6	16±5.5	1.6±0.4
V38A	504±193	3.4±0.9	9.2±2.0	1.5±0.3

WTとしてほとんどのHIV-1で見られるD36G置換が導入されているウイルス(NL4-3由来)を使用した。薬剤感受性はMAGI法で検討した。

2) T-20EK の抗 HIV 効果

昨年度、T-20 に SC34EK で用いた EK 置換を導入することにより T-20 が水溶性となり、高濃度での調整が可能となっただけでなく、その抗 HIV 活性も約 5 倍上昇することを見出した。本年度は SC29EK と同様に T-20 耐性 HIV に効果を示すかどうかを検討した。N43D 変異を有する HIV-1 に対して 1.5 倍、V38A を有する HIV-1 に対して 4 倍程度の感受性低下が認められたが、T-20 が 15 倍、14 倍に耐性化したことと比べ明らかに耐性 HIV の複製を阻害していた。また、T-20 は HIV-2 に対する感受性が低下する (20 倍以上) が、T-20EK ではその影響は見られなかった。

3) N36 の耐性機序

C 末由来のペプチドに対する耐性機序はいろいろと調べられてきているが、N 末由来のペプチドに関してはほとんど報告されていない。そのため我々は N36 に対する耐性ウイルスを N36 dose escalating 法にて誘導した。約半年培養することにより、N36 に対して 10 倍耐性を示すウイルスを分離した。このウイルスの env 領域すべて (約 2.5 kb) の塩基配列を決定したところ、gp120 領域に P183Q、gp41 領域に D36G/N126K/E137Q の変異が導入されていた。それぞれの変異を有する感染性クロンウイルスを作製し、N36 の感受性を検討したところ、N126K と E137K がおのおの 3 倍程度の耐性を付与していることを明らかとした。一方 gp120 の P183Q と gp41 の D36G 変異は感受性に影響を与えていなかった (Table 2)。

Table 2. N36耐性誘導で見られた変異のN36感受性

mutation	EC ₅₀ (nM)		
	N36	C34	ddC
WT	200	2.8	505
<i>gp120</i>			
P183Q	343 (1.7)	2.7 (0.9)	414 (0.8)
<i>gp41</i>			
N126K	550 (2.8)	11.3 (4)	515 (1)
E137Q	636 (3.2)	3.0 (1.1)	500 (1)
N126K/E137Q	731 (3.7)	12.2 (4.4)	642 (1.3)
QGKQ*	573 (2.9)	14.7 (5.3)	634 (1.3)

pNL4-3を変異導入に用いた。*gp120: P183Qおよびgp41: D36G/N126K/E138Q変異を含む。薬剤感受性はMAGI法で検討した。

4) D36G による NL4-3 の複製能の向上
HIV sequence database (Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA)によると gp41 アミノ酸配列で 36 番目の G が D である HIV は HIV-2 を含めても NL4-3 にしか認められず、NL4-3 特有の変異であることが以前より知られている。我々が昨年報告した C34 や SC34 耐性ウイルスにおいても D36G 変異が導入され、また比較的長期間 (約半年) MT-2 細胞で継代を続けると自然に 36G に変化してしまうことが判明している。このことから、NL4-3 特有の変異である G36D は複製において負の影響を及ぼすと考え、NL4-3 と 36 番目を野生型に変更した NL4-3_{D36G} の複製能を比較した。NL4-3_{D36G} は NL4-3 と比べ複製能が約 2 倍優れていた。また、T-20 耐性変異である N43D 変異が導入されると複製能が NL4-3 と比べ 1/50 程度まで低下したが、D36G をもつ N43D は NL4-3 の 80% 程度の複製能を示した。NL4-3_{D36G} と比較すると 40% 程度と複製能は低いものの D36G がもたらす複製能の改善は大きい。興味深いことに T-20 耐性臨床分離株ではほとんどみられない N43K では D36G による効果はほとんど見られなかった。

D. 考察

我々は現在米国、ヨーロッパで使用されている T-20 を上回る薬剤の同定を目指しており、昨年度まで SC34 および SC34EK などのペプチドを見出してきた。特に SC34EK は T-20 と比べ抑制効果が 50 倍以上優れていた。本年度はこの SC34EK の小分子化を図り、またその抗 HIV 活性を検討した。SC34EK は 29 アミノ酸まで小分子化してもその抗 HIV 活性は変化しなかった。さらに耐性 HIV に対する活性も維持されていた。SC29EK は SC34EK に含まれる 2 つの EE-KK pairing が保存されており、E-K pairing が 2 つ欠失しているが、活性に及ぼす影響はなかったことから、SC34EK における 2 つの EE-KK pairing が活性の維持に重要な働きをしていることがわかった。

本年度は SC34EK で有効であった EK 置換を T-20 にも応用した T-20EK を作製し、T-20 耐性株に対する効果を判定した。こちらも SC34EK 同様に効果が増強しただけでなく、耐性 HIV の複製を抑制することが可能であった。

一方、耐性ウイルスの解析では N36 耐性機序を解明した。この耐性に関与する変異は N126K と E138Q であったが、N126K は C34 耐性 HIV でも見出された変異であり、gp41 内における HR-1 と HR-2 の結合性を上昇させることがわかっている。現在解析中であるが、E138Q もおそらくは結合性を上昇させ、外部からの阻害剤としての N36 よりも gp41 内でおこる結合競合性を増加させていると考えられる。つまり、外部から加えられた N36 は培養液中で生理学的な HR-1 と違う形態で存在すると考えられる。今後、これらを検証し、この研究から得られた結果を新しい N36 誘導体の作製に応用したい。

最後に D36G 変異は C34 耐性ウイルスでも報告され、さらに今回の N36 耐性ウイルスでも誘導されてきた。また、薬剤非存在下であっても誘導されることから、融合阻害剤と関連性はないと考えられたが、この D36G が導入されるためには何らかの HIV にとってメリットがなければならない。今回我々はその HIV におけるメリットが複製速度であることを示した。事実、臨床分離株ではほとんどが D36G 変異を有している。またこの変異を有しているウイルスは複製上 N43D 変異を誘導しやすいことを見出した。このことは何故、T-20 耐性ウイルスにおいて N43D が多く分離される 1 つの要因となると考えられた。

E. 結論

EK 置換を導入したペプチドの耐性 HIV に対する効果の判定を行い、SC29EK が SC34EK で見られた野性株と耐性株に対する効果を維持することを見出した。N36 に対する耐性変異が N126K と E137Q であることを同定し、T-20 耐性で N43D が多く見

られることには D36G 変異による複製能の改善が関与することを示した。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kajiwara K, Kodama E, Matsuoka M. A novel colorimetric assay for CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency viruses. *Antivir Chem Chemother* 17: 215-223, 2006.

Saita Y, Kodama E, Orita M, Kondo M, Miyazaki T, Sudo K, Kajiwara K, Matsuoka M, Shimizu Y. Structural Basis for the Interaction of CCR5 with a Small Molecule, Functionally Selective CCR5 Agonist. *J Immunol*, 177: 3116-3122, 2006.

Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, Ito Y, Kawakami H, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Ikeda S, Kodama E, Matsuoka M, Shinkai H. Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. *J Med Chem* 49:1506-1508, 2006.

Ohru H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, Mitsuya H. 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma. *Nucleic Acids Symp Series* 50:1-2, 2006.

2. 学会発表

Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M. In Vitro Antiviral Activity and Resistance Profile of a Novel HIV Integrase Inhibitor JTK-303/GS-9137. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, Sep 27-30, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願：2006-204827 N36 結合ペプチドの製造方法

特願：2006-290241 抗 HIV 剤

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HIV 融合過程を標的とする耐性克服型新規治療薬の開発に関する研究

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
分担研究者：京都大学大学院薬学研究科 藤井 信孝
分担研究者：京都大学大学院薬学研究科 大石 真也

研究要旨 T-20 耐性株にも強力な活性を示す新規膜融合阻害剤 T-20EK を創出した。さらに、耐性株の gp41 CHR のアミノ酸配列をもとに合理的にデザインした誘導体が、当該耐性株に対する高い活性を示すことを明らかにした。また、膜融合阻害剤の非ペプチド化を目的としたフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成法を確立するとともに、インドール骨格を有する低分子膜融合阻害剤の構造最適化研究を効率的に実施するための新規インドール骨格構築法を確立した。

分担研究項目 1：融合過程を標的とする新規治療薬の創製

A. 研究目的

HIV-1 は標的細胞への膜融合を介して細胞内へ侵入し感染を成立させる。この膜融合過程において、エンベロープタンパク質 gp41 の 2 つの α ヘリックス構造である N-および C-領域（それぞれ NHR, CHR）が逆並行型に相互作用し、6-helical bundle 構造を形成後、ウイルス膜と標的細胞膜が近づき感染が成立すると推定されている。CHR 由来ペプチドの一つである C34 は、gp41 の NHR と安定な 6-helical bundle を形成することで HIV 感染を阻害すると考えられている。一方、enfuvirtide (T-20, Fuzeon) は、C34 と同様のメカニズムによってこの過程を阻害すると考えられている CHR の部分ペプチドであり、現在臨床応用されている唯一の膜融合阻害剤であるものの、詳細な感染阻害メカニズムについては明確な知見が得られていない。研究グループでは、T-20 の α ヘリックス性の向上による抗 HIV 活性の向上と溶媒接触面のアミノ酸置換による活性発現に重要なアミノ酸残基の同定を目的とし、新規 T-20 誘導体 T-20EK をデザインした。さらに、T-20 耐性 HIV 臨床分離株の変異アミノ酸部位に基づく新規膜融合阻害剤の開発を行うこととした。

B. 研究方法

研究グループでは、CHR 由来ペプチドの一つである C34 をリード化合物とした抗 HIV ペプチドの創製研究を展開し、これまでに極めて強力な抗 HIV 活性を示す SC35EK を見

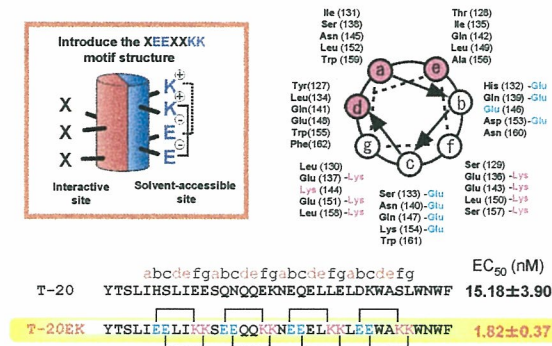


図 1: T-20EK のデザインと抗 HIV 活性

出している。これは、C34 に Glu と Lys 残基間の塩橋による α ヘリックス性の向上を指向した X-EE-XX-KK ユニット (X = C34 のアミノ酸残基; E = Glu; K = Lys) を導入することで、相互作用面と溶媒接触面とに区別化され、gp41 NHR との 6-helical bundle 構造が安定化し、抗 HIV 活性の向上につながるという戦略である。研究グループでは、C34 と同じ CHR の部分ペプチドである T-20 も同様に、 α ヘリックス性の向上により抗 HIV 活性の向上が可能であると考えた。そこで、T-20 に X-EE-XX-KK ユニット (X = T-20 のアミノ酸残基; E = Glu; K = Lys) を適用し、新規誘導体 T-20EK をデザインした。図 1 に示したように、結晶構造から推定される gp41 NHR との相互作用に重要な残基 (a, d, e) はウイルス由来の配列を保存し、溶媒接触面に位置する残基 (b, c, f, g) を Glu もしくは Lys に置換した。これにより、ヘリックスの内側と外側の機能を分割して予測することが可能となり、T-20 の活性発現メカニズムの解明に寄与することが期待された。

一方、T-20 耐性 HIV 臨床分離株の gp41

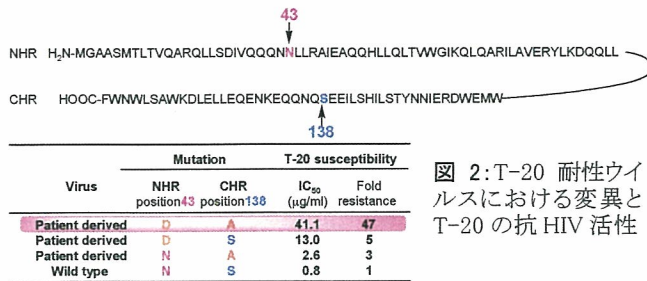


図 2: T-20 耐性ウイルスにおける変異と T-20 の抗 HIV 活性

において、NHR の Asn43 と CHR の Ser138 の変異が確認され、このうち特に Asn43 が Asp、Ser138 が Ala にそれぞれ変異することで、T-20 に対する耐性が 47 倍上昇することが報告されている(図 2)。また、Kim らによる gp41 の X 線結晶構造解析から、この NHR の 43 位と CHR の 138 位は空間的に近い位置にあると考えられている。以上のことから、研究グループでは、CHR の 138 位が NHR と CHR の相互作用だけでなく、T-20 の抗 HIV 活性にも重要な役割を果たしているのではないかと考え、この部位の構造活性相関について精査した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

全てのペプチドは、Fmoc 固相合成法により調製し、MAGI assay により抗 HIV 活性を評価した。活性評価の結果、T-20EK は T-20 に比べ約 8 倍強力な抗 HIV 活性を示した(図 1)。また、CD スペクトル測定の結果、T-20EK において α-ヘリックス性の指標として用いられる 222 nm 付近で負の極大を示すスペクトルが観察され、T-20EK の α-ヘリックス性が T-20 に比べ期待通り上昇していることを確認した(図 3)。

6-helical bundle 構造のさらなる安定化と物性の向上を期待して、T-20EK の N および C 末端領域に Glu もしくは Lys の置換を拡張した T-20EK2-5 をそれぞれ合成し、抗 HIV 活性を評価したところ、T-20EK に比べ、T-20EK2 は 1/5、T-20EK3 は 1/4、T-20EK4,5 は 1/80 程度の活性を示した(表 1)。特に Trp161 を Glu に置換した T-20EK4 および T-20EK5 は著しい活性の低下を示したため、Trp161 が抗 HIV 活性の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

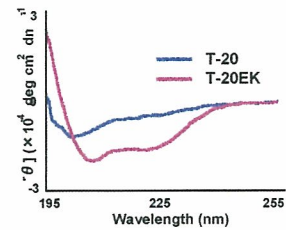


図 3: T-20 および T-20EK の CD スペクトル

次に、T-20EK の C 末端領域について精査した。T-20 の C 末端疎水性アミノ酸残基は活性発現に必須であることが報告されている。T-20EK には、T-20 の溶媒接触面に Glu-Lys の組み合わせが 8 組導入されているが、C 末端疎水性アミノ酸領域は保存されており、特に Trp の配置は種々の HIV 株においても高度に保存されている。そこで、T-20EK においても C 末端疎水性アミノ酸残基が活性発現に重要であるかを調べるため、それぞれアラニンに置換した誘導体の抗 HIV 活性を評価したところ、T-20EK/W159A, W161A, F162A において 15 倍以上活性の低下が認められた(表 1)。一方、T-20EK/W155A では、1/4 程度の活性の低下にとどまり、155 位の Trp は 6-helical bundle 構造内に位置している可能性が示唆された。これらの結果から、T-20EK の C 末端(159 位、161 位、162 位)の疎水性でかつ立体的にかさ高いアミノ酸残基は T-20 と同様活性発現に必須であり、この領域が 6-helical bundle 構造の形成とは異なる様式で

表 1: T-20 誘導体の抗 HIV 活性

Peptides	Sequences	EC ₅₀ (nM)
T-20EK	YTS L IE L IKK S EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W N W F	1.50±0.19
T-20EK2	Y T S R IE L IKK S EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W N W F	7.52±1.40
T-20EK3	Y T SK I EB L IKK S EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W N W F	5.99±3.15
T-20EK4	Y T SK I EB L IKK S EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W E E F	125.37±26.82
T-20EK5	Y T SK I EB L IKK S EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W E E F	121.10±64.83
T-20EK32	I E EL I KK S EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W N W F	16.84±3.58
T-20EK25	S E EQ Q KK N EE L KK L EE W AK K W N W F	>1000
T-20EK18	N E EE L KK L EE W AK K W N W F	>1000
T-20EK11	L E EW A KK W N W F	>1000
T-20EK/F162A	Y T SL I EB L IKK S EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W N W A	26.84±6.82
T-20EK/W161A	Y T SL I EB L IKK S EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W N W A F	23.74±8.63
T-20EK/W159A	Y T SL I EB L IKK S EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W N W F	48.97±8.63
T-20EK/W155A	Y T SL I EB L IKK S EE Q KK N EE L KK L EE A KK W N W F	5.82±1.02

表 2: T-20/S138X および T-20EK/S138X の抗 HIV 活性

T-20/S138X		Y T SL I HS L IE E X Q N Q Q E KN E Q E LL E LD K W A SL W N W F		T-20EK/S138X		Y T SL I EB L IKK X EE Q KK N EE L KK L EE W AK K W N W F	
EC ₅₀ (nM)		EC ₅₀ (nM)		EC ₅₀ (nM)		EC ₅₀ (nM)	
X	T-20/S138X	T-20EK/S138X	X	T-20/S138X	T-20EK/S138X	X	T-20/S138X
S	14.21±2.59	1.82±0.37	D	>1000	>1000	D	>1000
A	1.51±0.33	0.29±0.04	E	>1000	>1000	E	>1000
I	2.05±0.76	0.53±0.06	K	>1000	>1000	K	>1000
L	2.62±0.41	1.84±0.38	H	>1000	>1000	H	>1000
M	1.65±0.57	0.69±0.58	R	>1000	>1000	R	>1000
V	3.57±0.82	2.25±0.46	F	69.97±34.31	58.18±9.46	F	69.97±34.31
G	17.35±6.53	3.08±0.66	P	>1000	>1000	P	>1000
T	13.32±3.84	3.89±0.58	Y	268.70±35.86	189.25±46.68	Y	268.70±35.86
N	293.03±83.20	179.19±70.65	W	533.97±146.93	>1000	W	533.97±146.93
Q	377.10±244.48	225.19±92.51					

表 3 : T-20/S138A および T-20EK/S138A の T-20 耐性株 に対する抗 HIV 活性

Peptides	EC ₅₀ (nM)	
	DG*	DG/N43D**
T-20	2.25±0.52	43.73±10.71
T20/S138A	0.51±0.07	3.49±0.85
T-20EK	1.03	1.48
T-20EK/S138A	0.28	0.28

DG* : D36G variant of NL4-3 strain (control)
 DG/N43D** : D36G/N43G variant of NL4-3 strain (T-20 resistant)
 N36 (NL4-3) : **S**IVQQQNLLRAEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
 N36 (DG) : **S**IVQQQNLLRAEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
 N36 (DG/N43D) : **S**IVQQQNLLRAEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL

表 4 : T-20/S138A および C34/S138A の抗 HIV 活性

X	EC ₅₀ (nM)	
	T-20/S138X	C34/S138X
S	14.21±2.59	2.70±0.38
A	1.51±0.33	0.30±0.09
L	2.62±0.41	0.35±0.07
P	>1000	157.75±20.61
T	13.32±3.84	1.66±0.72
W	533.97±146.93	>1000

C34/S138X
 WMEWDREINNYTSLIHSLEIEKQNGQEKNEQELL
 CHR
 Ser(138) tgc→gcg (Ala)
 others: acg (Thr), ccg (Pro)
 ttg (Leu), tgg (Trp)

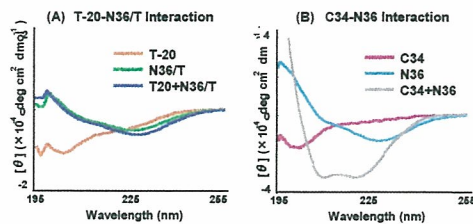


図 4: T-20-N36/T 複合体(A)と C34-N36 複合体(B)の CD スペクトル

活性発現に寄与している可能性が示唆された。

つづいて、T-20 および T-20EK の 138 位をシステインを除く天然アミノ酸で置換した T-20/S138X および T-20EK/S138X を合成し、抗 HIV 活性を評価した。その結果、いずれの誘導体間においても酸性アミノ酸 (Asp, Glu) や塩基性アミノ酸 (Lys, His, Arg) 置換体において大幅な活性の低下が認められたが、Ala や Ile といった電荷を持たない側鎖の比較的小さいアミノ酸で置換した場合において高い抗 HIV 活性を示した (表 2)。中でも、Ala 置換体がどちらのペプチドにおいても最も高い活性を示し、T-20EK/S138A はリード化合物である T-20 に比べ 50 倍以上強力な抗 HIV 活性を示した。さらに、T-20 耐性株 (DG/N43D) に対する抗 HIV 活性を評価したところ、T-20/S138A および T-20EK/S138A は耐性株に対しても強力な抗 HIV 活性を示した (表 3)。

さらに 138 位のアミノ酸置換を C34 に応用した。C34/S138X を合成し、抗 HIV 活性を評価した結果、置換部位において T-20 と同じ傾

向の構造活性相関を示した (表 4)。このため、T-20 耐性獲得のメカニズムに基づく膜融合阻害剤の開発を視野に入れ、これらの 138 位置換体についてさらに詳しく精査した。

抗 HIV 活性と 6-helical bundle 形成能との関係を明らかにするため、複合体の CD スペクトルを測定した。T-20 とそれに相当する NHR である N36/T を用いた場合、αヘリクス性の上昇は見られず、6-helical bundle 形成を確認することはできなかった (図 4A)。そこで、6-helical bundle 形成を確認することが可能な C34 誘導体とそれに相当する NHR である N36 を用い、138 位のアミノ酸置換による複合体形成における物理化学的性質の違いについて精査した (図 4B)。

まず、C34/S138X についてそれぞれ単独の CD スペクトルを測定した。その結果、全て類似のランダム構造を取っていることが確認され、138 位のアミノ酸置換は C34 単独の二次

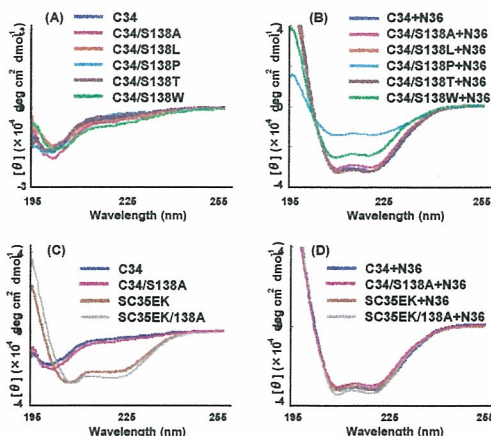


図 5: C34/S138X(A)、C34/S138A-N36 複合体(B)、C34 誘導体(C)、C34 誘導体-N36 複合体(D)の CD スペクトル

表 5: C34/S138X および SC35EK/S138X ペプチドの抗 HIV 活性と物理化学的性質

Peptides	X	EC ₅₀ (nM)	Tm (°C)
C34	S	2.70±0.38	53.7
C34/S138A	A	0.30±0.09	59.6
C34/S138L	L	0.35±0.07	57.8
C34/S138P	P	157.75±20.61	47.8
C34/S138T	T	1.66±0.72	49.6
C34/S138W	W	>1000	48.6
SC35EK	S	0.74±0.21	70.0
SC35EK/S138A	A	0.39±0.08	76.0

C34/S138X WMEWDREINNYTSLIHSLEIEKQNGQEKNEQELL
 SC35EK/S138X WEEWDKIKIEEYTKKIEELIKKIEEQQKRNNEELKK

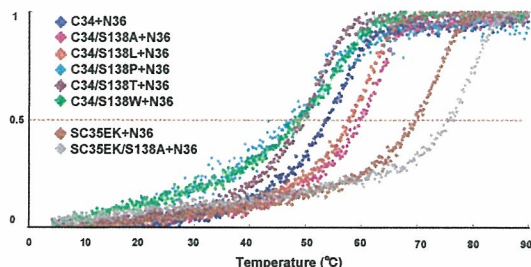


図 6: C34/S138X-N36 複合体および SC35EK/S138X-N36 複合体の CD スペクトルにおける 222nm のシグナルの温度依存性

構造に影響しないことが示唆された(図 5A)。次に、C34/S138X-N36 複合体の CD スペクトルを測定したところ、C34 と同等、もしくはそれ以上の活性を示す Ala, Leu, Thr 置換体からなる複合体はほぼ 100% α ヘリックス性を示したのに対し、活性の低い Pro, Trp 置換体からなる複合体では C34 に比べ α ヘリックス性の減弱が認められた(図 5B、表 5)。

続いて、C34/S138X-N36 複合体の安定性を調べるために、4℃ から 90℃ における $[\theta_{222}]$ を測定した。4℃ における 6-helical bundle 構造を 100% folding、90℃ において 100% unfolding とみなし、50% unfolding にあたる温度を α ヘリックスの相転移温度 (T_m) と定義した。測定の結果、抗 HIV 活性と T_m 値は高い相関性を示した(図 6、表 5)。なかでも特に C34/S138A-N36 複合体の T_m 値は C34-N36 複合体より約 6℃ 高く、Ser から Ala への変換がより安定な 6-helical bundle 構造の形成に寄与していることが示唆された(表 5)。

同様の傾向は、前述にある SC35EK 誘導体の構造活性相関でも見られ、SC35EK に比べ高い抗 HIV 活性を示した SC35EK/S138A は単独の CD スペクトルにおいて、SC35EK とほぼ同じ α ヘリックス性を示した(図 5C、5D)。一方で、SC35EK/S138A-N36 複合体の T_m 値は SC35EK-N36 複合体に比べ約 6℃ 高く、Ser から Ala への変換がより安定な 6-helical bundle 構造の形成に寄与していることが示唆された(図 6、表 5)。

D. 考察

結晶構造から推定される T-20 の溶媒接触面に位置する残基(b,c,f,g)を Glu もしくは Lys に置換した T-20EK では、抗 HIV 活性が上昇したことから、この位置する残基は T-20 の膜融合阻害に直接関与していないことが示唆された。このことは T-20 が C34 と同様に gp41 NHR と安定な 6-helical bundle 構造を形成することで、HIV 感染を阻害している可能性を示唆しており、未だ完全に解明されていない T-20 の阻害メカニズムに対して有益な知見であると考えられる。

また、T-20 耐性 HIV 株に対し、ウイルスの変異に合わせた合成ペプチド T-20/S138A は、再び抗ウイルス活性を示した。このことは、NL4-3 株 NHR の N43D 変異により親和性が低くなった gp41 の NHR と CHR の相互作用を補うために、Ser138 のコドンの一塩基変異に

よって起こりうるアミノ酸変異 (Ala, Leu, Pro, Thr, Trp) のうち T-20 耐性 HIV で S138A 変異が選択された可能性を示唆している。加えて、138 位の Ala 置換は CHR 由来ペプチドの種類によらず 6-helical bundle 構造の安定化に寄与することで、活性発現に重要な役割を果たしており、このような T-20 耐性 HIV 臨床分離株で確認された変異アミノ酸部位は膜融合阻害剤を開発する上で重要な構造最適化の標的部位になりうるものと示唆された。

E. 結論

研究グループでは、T-20 に α ヘリックス性の向上を指向した X-EE-XX-KK ユニットを導入することで、強力な抗 HIV 活性を示す T-20EK を見出した。さらに、T-20 耐性 HIV 臨床分離株で確認された gp41 の変異アミノ酸部位に着目し、T-20 および T-20EK の 138 位について構造活性相関研究を行ったところ、それぞれ Ala 置換体が最も高い活性を示し、リード化合物である T-20 に比べ 50 倍以上強力な抗 HIV 活性を示す誘導体 T-20EK/S138A を見出した。また、C34/S138 誘導体と N36 を用いた物理化学的性質の評価により、138 位の構造活性相関の結果は、複合体の 6-helical bundle 構造の安定性と相関していることが示唆された。

分担研究項目 2 : 融合阻害剤の設計・合成

A. 研究目的

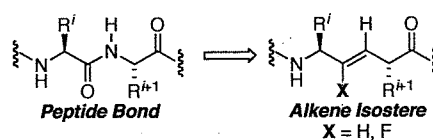


図 1: アルケン型ジペプチドイソスターの化学構造

高活性 HIV-1 膜融合阻害剤として見いだされた SC35EK 誘導体および T-20EK 誘導体について、昨年度に引き続き非ペプチド誘導体への構造変換を目的として、アルケン型ジペプチドイソスターの導入について検討を行った。昨年度の研究では、(E)-CH=CH 型アルケンイソスターに代わる (Z)-CF=CH 型アルケン(フルオロアルケン)イソスターの立体選択的合成法を確立した(図 1)。フルオロアルケン型ジペプチドイソスターは水素結合を形成するペプチド結合のカルボニル酸素に相当するフッ素原子を有しているため、活性発現に必

要な α ヘリックス構造の形成に有利であることが期待される。研究グループでは SC35EK および T-20EK に共通して存在する X-EE-XX-KK モチーフの Lys-Lys に相当するフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成に取り組んだ。

加えて、最近、respiratory syncytial virus (RSV)の膜融合阻害剤がインドールもしくはベンズイミダゾール骨格を有する低分子化合物であることに着目し、松岡・児玉グループとの共同研究によりこれらの骨格を有する化合物 118 種類についてスクリーニングを実施した。その結果、 $EC_{50} = 40\mu\text{M}$ と $70\mu\text{M}$ [MAGI assay(IIIB)]の抗 HIV 活性を示した化合物の共通骨格がインドールであったことから、これらの関連誘導体への合成展開に向けて、効率的なインドール誘導体合成法の確立に取り組んだ。

B. 研究方法

これまでに研究グループでは、キラル補助基を分子内に有する鍵中間体への一電子還元/不斉アルキル化の One-Pot 反応において、銅エノラートから反応性の高いスズエノラートへのトランスメタル化を行うことで、2 つの不斉点に挟まれたフルオロアルケン骨格を高立体選択的に合成する方法を確立している。本研究では、この合成法を応用し Fmoc 固相合成法でペプチドに導入可能な Lys-Lys フルオロアルケン型ジペプチドイソスターの合成について検討を行った。

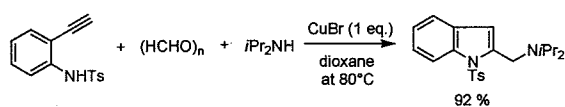


図 2: 2-(アミノメチル)インドール誘導体の合成

一方、研究グループではアレン化合物の合成に関する研究の過程において、エチニルアニリン誘導体、パラホルムアルデヒド、ジイソプロピルアミンを臭化銅(I)存在下で反応させると、2-(アミノメチル)インドール誘導体が高収率で得られることを見出した (図 2)。これをもとにして銅触媒を用いた三成分カップリング環化ドミノ反応による原子効率の高い新規 2-(アミノメチル)インドール骨格構築法への展開を検討した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

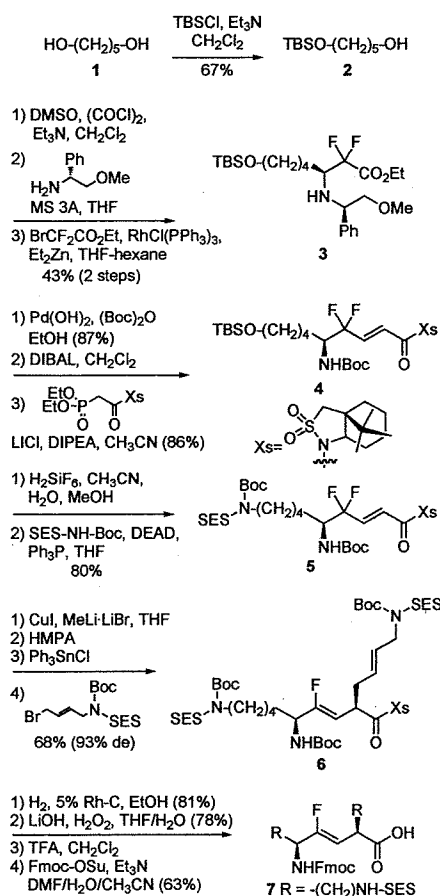


図 3: イソスターを含む Fmoc アミノ酸の合成

C. 研究結果

1,5-pentanediol **1** からキラル補助基を分子内に有する鍵中間体 **5** を合成した (図 3)。Lys-Lys ジペプチドイソスターをペプチドに導入するには、2 つの Lys 側鎖のアミノ基が適切な保護基によって保護されていなければならない。そこで、このような保護基として、Fmoc 固相合成法でジペプチドイソスターをペプチドに導入後に脱保護可能な SES 基を用いることにした。**4** の TBS 基を脱保護後、保護されたアミノ基を光延反応で導入し、1 つめの Lys 側鎖を構築した。ここで、昨年度確立した一電子還元-不斉アルキル化による One-Pot 反応を応用し、立体選択的にもう 1 つの Lys 側鎖を導入するとともに、フルオロアルケン骨格を構築した。続いて、得られた **6** のフルオロアルケン部位を残したまま、Lys 側鎖に相当する部位の二重結合を Rh-C 存在下で選択的に接触還元した後、キラル補助基を切断し、N 末端側アミノ基を Fmoc 基で保護することで、ペプチド合成に応用可能な **7** を満足のいく収率で得ることができた。

インドール骨格合成法の確立では、まず反応条件について精査した (表 1)。二級アミン成

表 1: 反応条件の最適化

Entry	CuBr (mol%)	(HCHO) _n (eq.)	Et ₃ N (eq.)	Time	Yield (%)
1	100	2	2	15 min	71
2	10	2	2	15 min	84
3	1	2	2	15 min	92
4	1	2	-	15 min	87
5	1	1.5	-	1 h	75
6	1	1.1	-	12 h	70

表 2: さまざまな二級アミンからのインドール合成

Entry	R	Time (min)	Product (%)
1	<i>i</i> -Pr (10a)	15	11a (81)
2	(CH ₂) ₅ (10b)	15	11b (87)
3	(CH ₂) ₄ (10c)	15	11c (89)
4	Et (10d)	30	11d (37) + 12 (53)
5 ^b	Et (10d)	15	11d (89)
6	Bzl (10e)	120	11e (78)
7	Allyl (10f)	30	11f (78)

^aUnless otherwise stated, reactions were carried out with **8** (0.18 mmol), **9** (2.0 eq.), amine **10** (1.1 eq.) and CuBr (1 mol%) in 1,4-dioxane at 80 °C.
^b2 equivalents of amine **3d** was used.

表 3: 多様な置換基を有するインドールの合成

Entry	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Conditions	Products (%)
1	Me	H	Bzl	Bzl	80 °C, 3 h then reflux, 1 h	11g (78)
2	H	CO ₂ Me	Bzl	Bzl	80 °C, 5 h	11h (79)
3	H	CF ₃	Bzl	Bzl	80 °C, 3 h	11i (61)
4	H	H		<i>n</i> -Bu	80 °C, 3 h then reflux, 1 h	11j (80)
5	H	CO ₂ Me		<i>n</i> -Bu	80 °C, 3 h then reflux, 10 h	11k (79)

分を低減させるために、トリエチルアミンの存在下で反応を行ったところ、71%の収率で目的のインドールを得た (entry 1)。次に臭化銅(I)の量について検討を行ったところ、10 または 1 mol%まで減らしても反応は速やかに進行し、反応にトリエチルアミンは必要ないことも明らかとなった (entries 2-4)。しかしながら、パラホルムアルデヒドの量を低減させたところ反応収率はやや低下した (entries 5, 6)。

次に様々な二級アミン成分を用いて反応を行った (表 2)。触媒量の臭化銅(I)存在下エチニルアニリン、ジイソプロピルアミン **10a**、パラホルムアルデヒドをジオキサン中で反応させたところ、収率 81%で目的のインドール誘導体 **11a** を得た (entry 1)。同様にピペリジン、ピロリジンにおいても反応は効率よく進行した (entries 2, 3)。ジエチルアミンの場合は揮発性が高いため収率が顕著に低下したが (entry 4)、2 当量のジエチルアミンを用いることで目的のインドールが高収率で得られた (entry 5)。

また二級アミン成分として、除去可能なアルキル基を含むジベンジルアミン、ジアリルアミンを用いた場合においても反応は効率よく進行し、それぞれ目的のインドール化合物 **11e**、**11f** を与えた (entries 6, 7)。

続いて芳香環に置換基の存在するエチニルアニリン誘導体や非対称の二級アミンを基質として反応を行った (表 3)。比較的反応性の低い基質を用いた際には高温や長時間を必要としたが、いずれも良好な収率で目的の反応が進行した。一連の反応を高温で行うと副反応が生じやすい基質においては、カップリングを 80 °Cで行った後に昇温することで目的のドミノ反応が収率よく進行した (entries 1, 4 and 5)。

D. 考察

フルオロアルケン型イソスターを含む Fmoc アミノ酸 **7** は、一般的なペプチドの固相合成法に応用可能なユニットである。今後 HIV 膜融合阻害剤 SC35EK をはじめとする X-EE-XX-KK モチーフをもつ種々のペプチドに導入することで、 α ヘリックス構造に与える影響を精査するとともに、SC35EK および T-20EK の非ペプチド化への展開が可能である。

他方で、この新規インドール骨格合成法は、R¹-R⁴ の置換基を自由に選択することが可能であることから、多様な化合物のライブラリーが構築可能である。今後、本法を用いたリード化合物の最適化研究を効率的に実施することが可能となった。

E. 結論

研究グループでは、ペプチド性膜融合阻害剤の候補化合物 SC35EK 誘導体および T-20EK 誘導体の非ペプチド化を目的として、 α ヘリックス構造に不可欠な水素結合形成が期待できるフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法を確立した。

また、低分子膜融合阻害剤の構造活性相関研究を展開するための基盤技術として、ホルムアルデヒド、二級アミン、エチニルアニリンの銅触媒による三成分カップリング、連続する環化反応により様々な官能基を有する新規 2-(アミノメチル)インドール化合物の効率的合成法を確立した。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. Tamamura, H.; Tsutsumi, H.; Masuno H.; Fujii N. Development of low molecular weight CXCR4 antagonists by exploratory structural tuning of cyclic tetra- and pentapeptide- scaffolds towards the treatment of HIV infection, Cancer Metastasis and Rheumatoid arthritis. *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14(1), 93-102.
2. Sasaki, Y.; Shigenaga, A.; Fujii, N.; Otaka, A. Synthesis of (Z)-alkene-containing cis-proline dipeptide mimetics using samarium(II) diiodide (SmI₂)-mediated reductive alkylation reaction. *Tetrahedron*, **2007**, 63(9), 2000-8.
3. Ueda, S.; Oishi, S.; Wang, Z.; Araki, T.; Tamamura, H.; Cluzeau, J.; Ohno, H.; Kusano, S.; Nakashima, H.; Trent, J. O.; Peiper, S. C.; Fujii, N. Structure-activity relationships of cyclic Peptide-based chemokine receptor CXCR4 antagonists: disclosing the importance of side-chain and backbone functionalities. *J. Med. Chem.* **2007**, 50(2), 192-8.
4. Kato-Takagaki, K.; Suzuki, N.; Yokoyama, F.; Takaki, S.; Umezawa, K.; Higo, J.; Mochizuki, M.; Kikkawa, Y.; Oishi, S.; Utani, A.; Nomizu, M. Cyclic peptide analysis of the biologically active loop region in the laminin α 3 Chain LG4 module demonstrates the importance of peptide conformation on biological activity. *Biochemistry*, **2007**, 46(7), 1952-1960.
5. Narumi, T.; Niida, A.; Tomita, K.; Oishi, S.; Otaka, A.; Ohno, H.; Fujii, N. A novel one-pot reaction involving organocopper-mediated reduction/transmetalation/asymmetric alkylation, leading to the diastereoselective synthesis of functionalized (Z)-fluoroalkene dipeptide isosteres. *Chem. Commun.* **2006**, (45), 4720-2.
6. Baba, M.; Hong, S.-B.; Sharma, N.; Warren, M. B.; Nickerson, M. L.; Iwamatsu, A.; Esposito, D.; Gillette, W. K.; Hopkins, R. F., III; Hartley, J. L.; Furihata, M.; Oishi, S.; Zhen, W.; Burke, T. R., Jr.; Linehan, W. M.; Schmidt, L. S.; Zbar, B. Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103(42), 15552-7.
7. Otaka, A.; Fujii, N. Development of anti-viral fusion inhibiting peptides. *Kagaku Kogyo* **2006**, 57(10), 797-801.
8. Tomita, K.; Niida, A.; Oishi, S.; Ohno, H.; Cluzeau, J.; Navenot, J.-M.; Wang, Z.; Peiper, S. C.; Fujii, N. Structure-activity relationship study on small peptidic GPR54 agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14(22), 7595-7603.
9. Tamamura, H.; Tsutsumi, H.; Fujii, N. The chemokine receptor CXCR4 as a therapeutic target for several diseases. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, 6(9), 989-995.
10. Tsuda, M.; Terada, T.; Irie, M.; Katsura, T.; Niida, A.; Tomita, K.; Fujii, N.; Inui, K. Transport characteristics of a novel peptide transporter 1 substrate, antihypertensive drug midodrine, and its amino acid derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 318(1), 455-60.
11. Menu, E.; Asosingh, K.; Indraccolo, S.; De Raeve, H.; Riet, V. I.; Valckenborgh, V. E.; Vande B., V. I.; Fujii, N.; Tamamura, H.; Camp, V. B.; Vanderkerken, K. The involvement of stromal derived factor 1 α in homing and progression of multiple myeloma in the 5TMM model. *Haematologica*, **2006**, 91(5), 605-612.
12. Kasyanov, A.; Tamamura, H.; Fujii, N.; Xiong H. HIV-1 gp120 enhances giant depolarizing potentials via chemokine receptor CXCR4 in neonatal rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, **2006**, 23(5), 1120-8.
13. Tamamura, H.; Tsutsumi, H.; Masuno, H.; Mizokami, S.; Hiramatsu, K.; Wang, Z.; Trent, J. O.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Peiper, S. C.; Fujii, N. Development of linear type of low molecular weight CXCR4 antagonists based on T140 analogs. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4(12), 2354-7.
14. Hanaoka, H.; Mukai, T.; Tamamura, H.; Mori, T.; Ishino, S.; Ogawa, K.; Iida, Y.; Doi, R.; Fujii, N.; Saji, H. Development of a ¹¹¹In-labeled peptide derivative targeting a chemokine receptor, CXCR4, for imaging tumors. *Nucl. Med. Biol.* **2006**, 33(4),

- 489-494.
- Sasaki, Y.; Niida, A.; Tsuji, T.; Shigenaga, Ak.; Fujii, N.; Otaka, A. Stereoselective synthesis of (*Z*)-alkene-containing proline dipeptide mimetics. *J. Org. Chem.* **2006**, 71(13), 4969-4979.
 - Tamamura, H.; Ojida, A.; Ogawa, T.; Tsutsumi, H.; Masuno, H.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Hamachi, I.; Fujii, N. Identification of a new class of low molecular weight Antagonists against the chemokine receptor CXCR4 having the dipicolylamine-zinc(II) complex structure. *J. Med. Chem.* **2006**, 49(11), 3412-5.
 - Niida, A.; Mizumoto, M.; Narumi, T.; Inokuchi, E.; Oishi, S.; Ohno, H.; Otaka, A.; Kitaura, K.; Fujii, N. Synthesis of (*Z*)-alkene and (*E*)-fluoroalkene-containing diketopiperazine mimetics utilizing Organocopper-mediated reduction-alkylation and diastereoselectivity examination using DFT calculations. *J. Org. Chem.* **2006**, 71(11), 4118-4129.
 - Niida, A.; Tanigaki, H.; Inokuchi, E.; Sasaki, Y.; Oishi, S.; Ohno, H.; Tamamura, H.; Wang, Z.; Peiper, S. C.; Kitaura, K.; Otaka, A.; Fujii, N. Stereoselective synthesis of 3,6-disubstituted-3,6-dihydropyridin-2-ones as potential diketopiperazine mimetics using organo-copper-mediated anti-SN^{2'} reactions and Their use in the preparation of low-molecule CXCR4 antagonists. *J. Org. Chem.* **2006**, 71(10), 3942-3951.
 - Avniel, S.; Arik, Z.; Maly, A.; Sagie, Assa; Basst, H. B.; Yahana, M. D.; Weiss, I. D.; Pal, B.; Wald, O.; Ad-El, D.; Fujii, N.; Arenzana-Seisdedos, F.; Jung, S.; Galun, E.; Gur, E.; Peled, A. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, 126(2), 468-476.
 - Ohno, H.; Kadoh, Y.; Fujii, N.; Tanaka, T. Potassium carbonate-promoted stereospecific 5-endo-trig cyclization of unactivated allenes in the absence of any transition metals. *Org. Lett.* **2006**, 8(5), 947-950.
 - Niida, A.; Tomita, K.; Mizumoto, M.; Tanigaki, H.; Terada, T.; Oishi, S.; Otaka, A.; Inui, K.; Fujii, N. Unequivocal synthesis of (*Z*)-alkene and (*E*)-fluoroalkene dipeptide isosteres to probe structural requirements of the peptide transporter PEPT1. *Org. Lett.* **2006**, 8(4), 613-616.
 - Oishi, S.; Miyamoto, K.; Niida, A.; Yamamoto, M.; Ajito, K.; Tamamura, H.; Otaka, Akira; Kuroda, Y.; Asai, A.; Fujii, N. Application of tri- and tetrasubstituted alkene dipeptide mimetics to conformational studies of cyclic RGD peptides. *Tetrahedron*, **2006**, 62(7), 1416-1424.
 - Dewan, M. Z.; Uchihara, J.; Terashima, K.; Honda, M.; Sata, T.; Ito, M.; Fujii, N.; Uozumi, K.; Tsukasaki, K.; Tomonaga, M.; Kubuki, Y.; Okayama, A.; Toi, M.; Mori, N.; Yamamoto, N. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood*, **2006**, 107(2), 716-724.
 - Ohta, Y.; Itoh, S.; Shigenaga, A.; Shintaku, S.; Fujii, N.; Otaka, A. Cysteine-derived S-protected oxazolidinones: Potential chemical devices for the preparation of peptide thioesters. *Org. Lett.* **2006**, 8(3), 467-470.
 - Niida, A.; Wang, Z.; Tomita, K.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Navenot, J.-M.; Broach, J. R.; Peiper, S. C.; Fujii, Nobutaka. Design and synthesis of down-sized metastin (45-54) analogs with maintenance of high GPR54 agonistic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16(1), 134-137.

2. 学会発表

- Yoshikazu Sasaki, Ayumu Niida, Takashi Tsuji, Akira Shigenaga, Nobutaka Fujii and Akira Otaka. Synthesis of (*Z*)-alkene-containing Pro dipeptide isosteres corresponding to *cis*-prolyl peptides. The 11th Korea-Japan Joint Symposium on Drug Design and Development (2006.5, Jeju Island, Korea)
- Nobutaka Fujii. From genome to lead: medicinal chemistry beyond XXX-omics researches. The 11th Korea-Japan Joint Symposium on Drug Design and Development (2006.5, Jeju Island, Korea)
- Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Zi-xuan Wang, Takanobu Araki, Hirokazu Tamamura,

- Hiroaki Ohno, Hideki Nakashima, Stephen C. Peiper and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship studies on cyclic peptide-based CXCR4 antagonists. ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (2006.7, Kyoto, Japan)
4. Kenji Tomita, Ayumu Niida, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Miki Akamatsu and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship study on GPR54 agonists. ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (2006. 7, Kyoto, Japan)
 5. Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Ayumu Niida, Yasuyo Koderu, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno and Nobutaka Fujii. Development of synthetic methodology toward (*Z*)-fluoroalkene dipeptide isosteres based on the concept of organometallic-mediated C-F bond cleavage. ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (2006.7, Kyoto, Japan)
 6. S. Ueda, S. Oishi, Z-X. Wang, H. Ohno, S. C. Peiper, N. Fujii. Structure-activity relationship studies on cyclic peptide-based CXCR4 antagonists: Side-chain and backbone modifications. 232nd American Chemical Society National Meeting & Exposition (2006.9.10 San Francisco, U.S.A.)
 7. Yoshikazu Sasaki, Takashi Tsuji, Ayumu Niida, Akira Shigenaga, Nobutaka Fujii and Akira Otaka. Regio- and stereoselective synthesis of (*Z*)-alkene *cis*-Xaa-Pro dipeptide mimetics with organocopper-mediated *anti*-S_N2' reactions. 29th European Peptide Symposium (2006. 9. Gdansk, Poland)
 8. Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Ayumu Niida, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii. Diastereoselective synthesis of (*Z*)-fluoroalkene dipeptide isosteres based on organocopper-mediated reduction/direct alkylation via transmetalation. 29th European Peptide Symposium (2006.9, Gdansk, Poland)
 9. Shinya Oishi, Kenji Tomita, Ayumu Niida, Miki Akamatsu, Toshihiko Masui, Ryuichiro Doi, Jean-Marc Navenot, Zixang Wang, Stephen C. Peiper, Nobutaka Fujii. Discovery of novel low-molecular-weight GPR54 agonists. 29th European Peptide Symposium (2006.9, Gdansk, Poland)
 10. Hiroaki Ohno, Tetsuaki Tanaka, Nobutaka Fujii, From amino acids to peptide isosteres and heterocycles: implications to vinylaziridines and amino allene chemistry. 11th Akabori conference (2006.9, Regensburg, Germany)
 11. Kenji Tomita, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Miki Akamatsu and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship studies on GPR54 agonists. The International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium and 4th Peptide Engineering Meeting (2006. 11, Yokohama, Japan)
 12. Michinori Tanaka, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno and Nobutaka Fujii. A novel oxazolidine linker for the synthesis of peptide aldehydes. The International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium and 4th Peptide Engineering Meeting (2006. 11, Yokohama, Japan)
 13. Toshiaki Watanabe, Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii and Hiroaki Ohno. Tandem *N*-arylation and C-H activation. The 10th International KYOTO Conference on New Aspects of Organic Chemistry (2006. 11, Kyoto, Japan)
 14. Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Eriko Inokuchi, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno and Nobutaka Fujii. Allylic hydrodefluorination under palladium catalysis for the synthesis of fluoroalkene dipeptide isosteres The 10th International KYOTO Conference on New Aspects of Organic Chemistry. (2006. 11, Kyoto, Japan)
 15. Nobutaka Fujii. From amino acids to peptide isosteres: Implication to genome-lead drug discovery. 2nd International Symposium on Biomolecules and Related Compounds. (2006.11, Kyoto, Japan)
 16. Kenji Tomita, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Miki Akamatsu and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship studies on

- N-terminal acyl groups of pentapeptidic GPR54 agonists. The 3rd Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists (2006. 11, Seoul, Korea)
17. Hiroki Nishikawa, Eiichi Kodama, Saori Itho, Keiko Kajiwara, Kazuki Izumi, Shinya Oishi, Masao Matsuoka and Nobutaka Fujii. New Peptide Design for HIV-1 Fusion Inhibitors against T-20-Resistant HIV-1 Variants. The 3rd Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists (2006. 11, Seoul, Korea)
18. Nobutaka Fujii, Hiroaki Ohno, Shinya Oishi. From knowledge to controlling: implications of peptide-lead drug templates for genome-lead discovery. RIKEN International Symposium on Chemical Biology (2007.1, Hakone, Japan)
19. Kenji Tomita. Structure-activity relationship Study on GPR54 agonists. 2006-07 21st COE program-Knowledge Information Infra-structure for Genome Science (2007. 1, Kyoto, Japan)
20. Tetsuo Narumi. Unprecedented, ECO-benign, Palladium-catalyzed fluoroalkene synthesis: relevance to fluoroalkene peptidomimetics. 2006-07 21st COE program-Knowledge Information Infrastructure for Genome Science (2007. 1, Kyoto, Japan)
21. Kenji Tomita, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Miki Akamatsu and Nobutaka Fujii. Structure-activity relationship study on GPR54 agonist as novel anti-metastatic agent. First JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics (2007. 3, Nagoya, Japan)
22. Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Zi-xuan Wang, Hiroaki Ohno, Stephen C. Peiper and Nobutaka Fujii. Development of cyclic pentapeptide-based CXCR4 antagonists for the treatment of CXCR4-mediated diseases. First JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics (2007. 3, Nagoya, Japan)
23. Nobutaka Fujii, Shinya Oishi, Satoshi Ueda. CXCR4 antagonists: Relevance to small cell lung cancer chemotherapy. First JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics (2007. 3, Nagoya, Japan)
24. Tetsuo Narumi, Eriko Inokuchi, Kenji Tomita, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno and Nobutaka Fujii. Unprecedented palladium-mediated carbon-fluorine bond cleavage: relevance to the synthesis of fluoroalkene dipeptidomimetics. American Chemical Society 233rd National Meeting & Exposition (2007, 3. Chicago, IL USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. GPR54アゴニスト活性を有する化合物: 出願番号: 特願2006-122305; 発明者: 藤井信孝、大石真也、富田健嗣、新居田歩; 出願人: 京都大学; 出願日: 2006年4月26日
2. N36結合ペプチドの製造方法; 出願番号: 特願2006-204827; 発明者: 堤、石田、久田、水本、秦、藤井、松岡、児玉、大石; 出願人: 月桂冠株式会社; 出願日: 2006年7月27日
3. 抗FIV剤; 出願番号: 特願2006-242428; 発明者: 辻本元、藤井信孝; 出願人: 国立大学法人京都大学, 国立大学法人東京大学; 出願日: 2006年9月7日
4. 抗HIV剤; 出願番号: 特願2006-290241; 発明者: 藤井信孝; 大石真也; 松岡雅雄; 児玉栄一; 出願人: 国立大学法人京都大学; 出願日: 2006年10月25日

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄
 分担研究者：京都大学ウイルス研究所 児玉 栄一

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kajiwara K, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> .	A novel colorimetric assay for CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency viruses.	Antivir Chem Chemother	17	215-223	2006
Saita Y, <u>Kodama E</u> , Orita M, Kondo M, Miyazaki T, Sudo K, Kajiwara K, <u>Matsuoka M</u> , <u>Shimizu Y</u> .	Structural Basis for the Interaction of CCR5 with a Small Molecule, Functionally Selective CCR5 Agonist.	J Immunol	177	3116-3122	2006
Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, Ito Y, Kawakami H, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Ikeda S, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Shinkai H.	Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics.	J Med Chem	49	1506-1508	2006
Ohroi H, Kohgo S, Hayakawa H, <u>Kodama E</u> , <u>Matsuoka M</u> , Nakata T, Mitsuya H.	2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma.	Nucleic Acids Symp Series	50	1-2	2006