

- aspartic proteases. *Biological Chemistry*, 385 (11), 1035-1039 (2004).
- 9) H. M. Abdel-Rahman, N. A. El-Koussi, G. S. Alkaramany, A. F. Youssef, Y. Kiso: A novel dipeptide-based HIV protease inhibitor containing allophenylnorstatine. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 337 (11), 587-598 (2004).
- 10) T. Kimura, D. Shuto, Y. Hamada, N. Igawa, S. Kasai, P. Liu, K. Hidaka, T. Hamada, Y. Hayashi, Y. Kiso: Design and synthesis of highly active Alzheimer's β -secretase (BACE1) inhibitors, KMI-420 and KMI-429, with enhanced chemical stability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15 (1), 211-215 (2005).

2. 学会発表

- 1) K. Hidaka, T. Kimura, A. Kiso, Y. Tsuchiya, H. Maegawa, K. Nishiyama, Y. Hayashi, A. Nezami, E. Freire, Y. Kiso: Aspartic protease inhibitors containing allophenylnorstatine-dimethylthioprolin scaffold. 8th Chinese International Peptide Symposium (Kunming, China), 2004.7.
- 2) K. Hidaka, T. Kimura, A. Kiso, Y. Tsuchiya, H. Maegawa, K. Nishiyama, Y. Hayashi, A. Nezami, E. Freire, Y. Kiso: Usefulness of allophenylnorstatine-dimethylthioprolin scaffold to aspartic protease inhibitors. 3rd International and 28th European Peptide Symposium: Bridges Between Disciplines (Prague, Czech Republic), 2004.9.
- 3) 木村徹, 前川彦一郎, 西山啓史, 日高興士, 板見綾子, 有井康博, 林良雄, 木曾良明: 基質構造に基づいたHTLV-1プロテアーゼ阻害剤の設計と合成. 難治性疾患の克服をめざした創薬科学研究発表会(京都)2005.2.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

基質遷移状態アナログとしてアロフェニルノルスタチンを含む HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の合成

分担研究者 木曾良明 京都薬科大学教授

研究要旨:我々は HTLV-I の増殖阻害薬を目指して, HTLV-I 固有プロテアーゼの阻害剤創製を試みている. 我々は既に基質構造に基づく論理的な阻害剤デザイン, 合成の結果, 強力な酵素阻害活性を有し低分子のテトラペプチド型阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 を見出ししている. 今回 KNI-10252, KNI-10455 をリードとし P3, P2, P1, P2' の各々の部位で構造活性相関研究を行った結果, KNI-10455 と同等の活性を有し, 生体内安定性が高く細胞透過性を改善できると考えられる化合物を得た.

A. 研究目的

我々は HAM 治療あるいは発症予防を目的とした, HTLV-I の増殖抑制効果を有する化学療法剤の創製を目指す. 化学療法のターゲットとして HTLV-I が自ら産生しその増殖に必須な HTLV-I プロテアーゼに着目し, その阻害剤創製を試みている. 本年度は HTLV-I プロテアーゼの基質のアミノ酸配列に基づいてデザイン・合成した阻害剤をさらに低分子化したテトラペプチド型阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 をリード化合物として, 非ペプチド化, 膜透過性向上を目指した物性の改善について検討を行い, 活性の増強および薬物として適当な物性を有する化合物の創成をめざす.

B. 研究方法

本年度も我々が既に構築した *in vitro* の阻害剤評価系を用いて, 新規にデザイン・合成した阻害剤の活性を測定する.

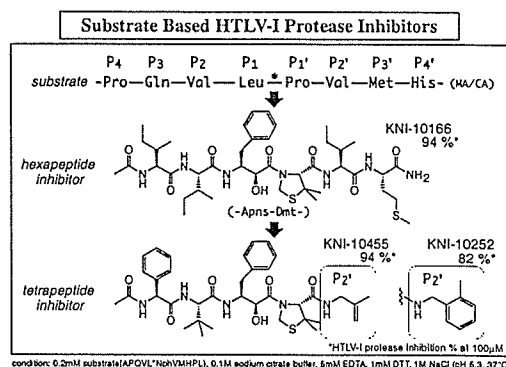
阻害剤評価

酵素として組み替え型 HTLV-I プロテアーゼを, 基質には MA/CA 部位のアミノ酸配列に基づく合成基質 (Ala-Pro-Gln-Val-Leu*Nph-Val-Met-His-Pro-Leu, 0.2 mM) を用い, 1 mM DTT, 1 M NaCl, 5mM EDTA, 0.1 M citrate buffer (pH 5.3) 中で 6h インキュベートし, RP-HPLC にて切断された基質断片の定量を行った. 上記のアッセイ系に 0.1 mM あるいは 0.005 mM の阻害剤を添加し, 基質の切断量の低下を測定し阻害活性を測定した.

阻害剤のデザインと合成

我々は基質遷移状態概念誘導体としてヒドロキシメチルカルボニル(HMC)イソスターを用いたアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤設計およびその合成を行ってきており, HMCイソスターを有する非天然アミノ酸誘導体としてアロフェニルノルスタチン(Apns)を用いた化合物は, 極めて高活性な HIV プロテアーゼ阻害剤や, マラリア原虫プロテアーゼ(プラスメプシン)の阻害剤合成に成功した実績がある.

我々は既に MA/CA 部位のアミノ酸配列 (-Pro-Gln-Val-Leu*Pro-Val-Met-His-) と Apns を組み合わせた阻害剤の設計, 合成を行い, 強い酵素阻害活性を有するヘキサペプチド型阻害剤を見だしている. さらに本化合物を低分子化, 非天然アミノ酸の導入, 非ペプチド化等を行って, テトラペプチド型阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 を見だした. これらはヘキサペプチド型阻害剤と比べても見劣りしない強い酵素阻害活性を有していた.



今回阻害剤の設計に際し、KNI-10455 はペプチド結合の数が少なく、分子量も小さいため、リード化合物として適当であると判断し、各ポジションの構造活性相関研究に利用しようとした。しかし KNI-10455 は合成途中やや不安定であるという性質を有していることが分かったので、合成容易な KNI-10252 を、リード化合物として主に用いた。

各ポジションの構造変換は、酵素との相互作用の質を高めつつ細胞膜透過性向上に寄与できることに重点を置いてデザインすることとした。

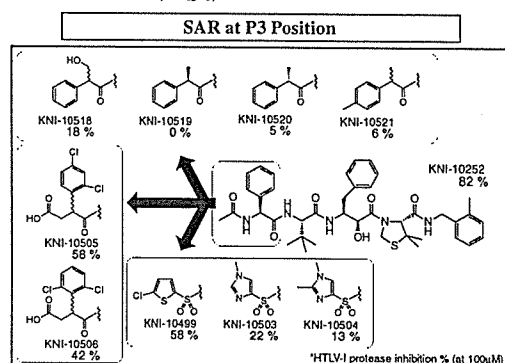
化合物の合成は、Boc 基を一時的アミノ保護基に用いる一般的な液相法にて行い、すべて逆相 HPLC にて精製を行った後、活性の評価に用いた。

(倫理面への配慮)

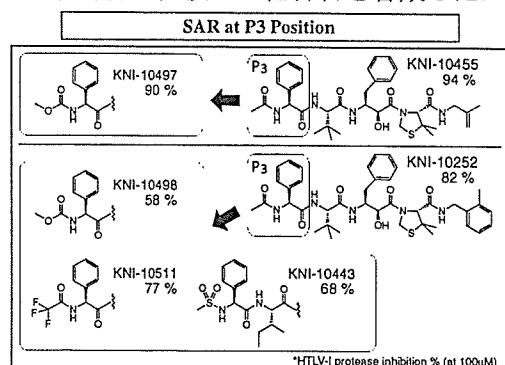
特に必要としない。

C. 研究結果

1) P3 位構造活性相関 (アセチルフェニルグリシンの置換)

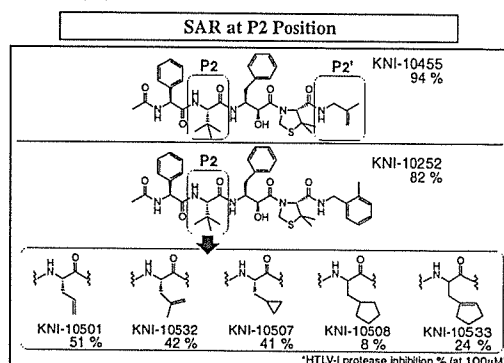


テトラペプチド型阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 の P3 位はいずれもアセチルフェニルグリシンであるが、このアセトアミド部位は薬物として安定性や膜透過の点で不利であると考えられる。そこで P3 位を構造類似性のある、フェニル酢酸誘導体、フェニルコハク酸誘導体およびアリアルスルホンアミド誘導体に置換した化合物を合成した。



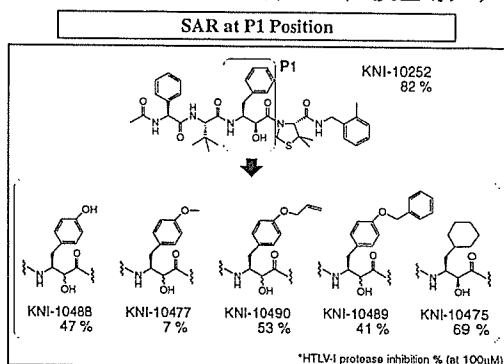
しかし残念ながらこれら化合物は弱い活性しか示さず、アセトアミド部分が酵素と強い相互作用をしていることが示唆された。そこでアセトアミド部位のペプチド結合を残したまま、より望ましい物性を有すると考えられるウレタンやトリフルオロアセトアミドに変換したところ、ほぼ同等の活性を有する化合物 KNI-10497 および KNI-10511 を見いだすことができた。

2) P2 位構造活性相関 (tert-ロイシン側鎖の置換)



KNI-10252 の P2 位 tert-ロイシンを、アリル基類似構造を側鎖に有するアミノ酸に置換した。HTLV-I プロテアーゼは C2 対称性を有しているため、阻害剤の P2 と P2' が配位するポケットは基本的に同一の構造である。そこで P2' 位での構造活性相関研究の結果、良好な活性を有していた β -メタリルアミンに着目し、これら類似の構造を P2 位に導入した阻害剤を設計、合成した。しかし結果として、リード化合物である KNI-10252 より優れた活性を有するものは見いだせなかった。

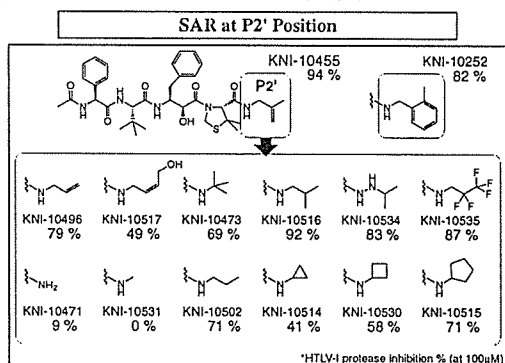
3) P1 位構造活性相関 (アロフェニルノルスタチンのベンゼン環上の置換基導入)



HTLV-I プロテアーゼと HIV プロテアーゼは非常に類似した酵素であるが、HIV プロテアーゼ阻害剤には P1 位を P3 位に近い位置まで延長した化合物 (アタザナビル, インジナビル等) が高い阻害活性を有することが報告

されている。そこで今回、P1 位のアロフェニルノルスタチンのベンゼン環に置換基を導入した阻害剤の合成を行った。ベンゼン環パラ位にアリルオキシまたはベンジルオキシ基を導入した化合物を合成したが、活性は高いものではなかった。しかしこれら化合物は HIV-1 プロテアーゼに対しては非常に強い阻害活性を有していた。

4) P2'位構造活性相関 (ベンジルアミン, β -メタリルアミンからの置換)



KNI-10252, KNI-10455 は P2'位にそれぞれベンジルアミン, β -メタリルアミンを有している。これらを比較的構造類似の低分子有機アミンで置換した化合物の合成を行った。その結果強い阻害活性を有する KNI-10496, KNI-10516 を見いだした。特に KNI-10516 は KNI-10455 に匹敵する阻害活性を有し、合成途中での不安定さを伴わない合成容易な化合物であった。また KNI-10534, KNI-10535 は同等の強い阻害活性を示すだけでなく、分子内に塩基性窒素を有している、あるいは細胞膜と親和性が高く疎水性のフルオロカーボンに有しているといった特徴を持っている。これらは膜透過性の高い薬物としての阻害剤を設計するうえで、極めて有用な知見といえる。

D. 考察

P3 位構造活性相関からアセチルフェニルグリシンのアセトアミド部分が非常に重要な相互作用をもたらしていることが分かった。この部分のカルボニル酸素とアミド水素は両方とも酵素と水素結合を形成するものと考えられる。アセトアミドの様な構造は生体内安定性、膜透過性の点でも望ましいとは言えないので、この様な構造を持たない阻害剤としたいが、単純に除去すると著しく活性が低下した。幸いにもペプチド結合は残存するものの物性の良好と思われるウレタン構造やトリフルオロアセトアミドに置換しても良好な活性を示すことが見いだせた。

P2 と P2'が配位するポケット S2, S2'は基本的に同一の構造であるが、P2'位で良好な結果を示した β -メタリルアミンを P2 位に導入した化合物は優れた活性を示さなかった。これは阻害剤が非対称のため P2 と P2'では同じ官能基を導入しても、位置と方向を完全に同一のものとするのができないためと考えられる。今後は長さの異なる側鎖を持つ誘導体の合成が必要かもしれないが、もし短い側鎖が望ましいのであれば KNI-10455 が有する tert-ブチルが最良である可能性も高い。

P1 位を延長した化合物は HIV プロテアーゼに対しては強い阻害活性を有するが、HTLV-I プロテアーゼには有利に働かないことが分かった。HTLV-I プロテアーゼは HIV プロテアーゼと非常に類似した酵素であるが、一般的な HIV プロテアーゼ阻害剤ではほとんど阻害を受けない。両者の P1 から P3 にかけての構造が大きく異なっている可能性が強く示唆される。

P2'位の構造活性相関から KNI-10455 に匹敵する阻害活性を有し、合成容易な化合物 KNI-10516 を見いだした。これは薬物としてより優れた性質を有しているというだけでなく、今後の構造活性相関研究のリードとしても有用である。

また KNI-10534, KNI-10535 の様に強い酵素阻害活性を有するとともに、塩基性窒素や疎水性フルオロカーボンの様に特徴ある構造を有した阻害剤を見いだすことができた。これらの構造は薬物として有用な阻害剤を設計するうえで、非常に役に立つ部分構造であるといえる。

上記結果を組み合わせることで、生体内安定性、細胞膜透過性に優れた HTLV-I プロテアーゼ阻害剤を創出できるものと期待する。

E. 結論

テトラペプチド型 HTLV-I プロテアーゼ阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 をリード化合物として、生体内安定性、膜透過性向上を目指した阻害剤の設計、合成を試みた。その結果として、P3 部位, P2'部位でリード化合物より安定性や物性の点で進歩した部分構造をもち、同等の酵素阻害活性を有する阻害剤を見いだした。これらは今後薬物としてより有用な阻害剤を設計するうえでの重要な指針となる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomoya Kotake, Yoshio Hayashi, S. Rajesh, Yoshie Mukai, Yuka Takiguchi, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: Design and synthesis of a new polymer-supported Evans-type oxazolidinone: an efficient chiral auxiliary in the solid-phase asymmetric alkylation reactions. *Tetrahedron*, 61 (15) 3819-3833 (2005).
- 2) 林良雄, 木曾良明: α -ヒドロキシ- β -アミノ酸を基盤とした有機化学・創薬化学研究. *有機合成化学協会誌*, 63(6), 640-651 (2005).
- 3) Mariusz Skwarczynski, Youhei Sohma, Mayo Noguchi, Maiko Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshio Hamada, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: No auxiliary, no byproduct strategy for water-soluble prodrugs of taxoids: scope and limitation of O-N intramolecular acyl and acyloxy migration reaction. *J. Med. Chem.* 48 (7), 2655-2666 (2005).
- 4) Akiko Yoshida, Ahmad Piroozmand, Akiko sakurai, Mikako Fujita, Tsuneo Uchiyama, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso, Akio Adachi: Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity. *Microbes and Infection*, 7(5/6), 820-824 (2005).
- 5) Yohei Sohma, Yoshio Hayashi, Maiko Kimura, Yousuke Chiyomori, Atsuhiko Taniguchi, Masato Sasaki, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: The 'O-acyl isopeptide method' for the synthesis of difficult sequence-containing peptides: application to the synthesis of Alzheimer's disease-related amyloid β -peptide (A β) 1-42. *J. Peptide Sci.*, 11(8), 441-451 (2005).
- 6) Youhei Sohma, Yousuke Chiyomori, Maiko Kimura, Fukue Fukao, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura and Yoshiaki Kiso: 'O-Acyl isopeptide method' for the efficient preparation of amyloid β peptide (A β) 1-42 mutants. *Bioorg. Med. Chem.*, 13 (22), 6167-6174 (2005).
- 7) Adam J. Ruben, Yoshiaki Kiso, Ernesto Freire: Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective. *Chem. Biol. Drug. Des.*, 67 (1) 2-4 (2006)
- 8) Ayako Itami, Hikoichiro Maegawa, Keiji Nishiyama, Koushi Hidaka, Yasuhiro Arie, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso Evaluation of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethyl-carbonyl as a transition-state isostere. *Peptide Science 2005, in press* (2006)

2. 学会発表

- 1) 木曾良明: 治療薬としての酵素阻害剤の開

発. 第 79 回日本感染症学会総会(名古屋)、2005.4.

- 2) 板見綾子, 前川彦一郎, 西山啓史, 日高興士, 有井康博, 木村徹, 林良雄, 木曾良明: 基質遷移状態概念に基づいた HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第 10 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会(福岡)2005.8.
- 3) Yoshiaki Kiso: Protease inhibitors and prodrug forms targeting intractable diseases. International Symposium: New Developments in Synthetic Organic Chemistry of Natural Products and Medicines (Kyoto) 2005.9.
- 4) Ayako Itami, Hikoichiro Maegawa, Keiji Nishiyama, Koushi Hidaka, Yasuhiro Arie, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Evaluation of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethyl carbonyl as a transition-state isostere. 42nd Japanese Peptide Symposium (Toyonaka) 2005.10.
- 5) 板見綾子, 前川彦一郎, 西山啓史, 日高興士, 有井康博, 濱田貴司, 木村徹, 木曾良明: Hydroxymethylcarbonyl (HMC) 含有 HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤における構造活性相関研究. 第 24 回メディスナルケミストリーシンポジウム(大阪)2005.11.
- 6) Y. Kiso: Adaptive space search: Design of peptidomimetic inhibitors and prodrugs of aspartic proteases targeting intractable diseases. 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2005) (Honolulu, U.S.A.) 2005.12.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 木曾良明: 水溶性プロドラッグ. 出願番号 2003-273589, 出願日 2003/7/11, 公開番号 2005-29543, 公開日 2005/2/3

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

基質遷移状態アナログとしてアロフェニルノルスタチンを含む HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の合成

分担研究者 木曾良明 京都薬科大学 教授

研究要旨：我々は HTLV-I の増殖阻害薬を目指して、HTLV-I 固有プロテアーゼの阻害剤創製を試みている。我々は基質構造に基づく論理的な阻害剤デザインにより低分子のテトラペプチド型阻害剤を見出している。今回これらをリードとし N 末端、P3, P1, P1', P2' の各々の部位で構造活性相関研究を行い、生体内安定性が高く細胞透過性を改善できる構造を有する阻害剤合成を試みた。その結果、安定性及び物性に置いて優れた誘導体を見出すことが出来た。

A. 研究目的

我々は HAM 治療あるいは発症予防を目的とした、HTLV-I の増殖抑制効果を有する化学療法剤の創製を目指す。化学療法のターゲットとして HTLV-I が自ら産生しその増殖に必須な HTLV-I プロテアーゼに着目し、その阻害剤創製を試みている。本年度も HTLV-I プロテアーゼの基質のアミノ酸配列に基づいてデザイン・合成した阻害剤をさらに低分子化したテトラペプチド型阻害剤をリード化合物として、非ペプチド化、膜透過性向上を目指した物性の改善について検討を行い、活性の増強および薬物として適当な物性を有する化合物の創成をめざす。

B. 研究方法

本年度も我々が既に構築した *in vitro* の阻害剤評価系を用いて、新規にデザイン・合成した阻害剤の活性を測定する。

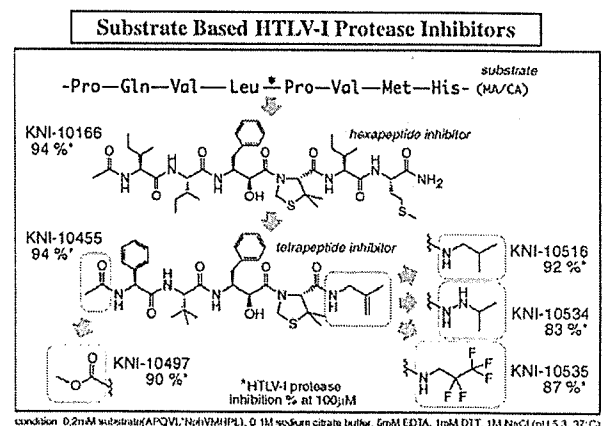
阻害剤評価

酵素として組み替え型 HTLV-I プロテアーゼを、基質には MA/CA 部位のアミノ酸配列に基づく合成基質 (Ala-Pro-Gln-Val-Leu*Nph-Val-Met-His-Pro-Leu, 0.2 mM) を使い、1 mM DTT, 1 M NaCl, 5mM EDTA, 0.1 M citrate buffer (pH 5.3) 中で 6h インキュベートし、RP-HPLC にて切断された基質断片の定量を行った。上記のアッセイ系に 0.1 mM あるいは 0.005 mM の阻害剤を添加し、基質の切断量の低下を測定し阻害活性を測定した。

阻害剤のデザインと合成

我々は基質遷移状態概念誘導体としてヒドロキシメチルカルボニル(HMC)イソスターを用いたアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤設計およびその合成を行ってきており、HIV プロテアーゼや、マラリア原虫プロテアーゼ（プラスメプシン）、 β -セクレターゼに対する選択的で強力な阻害剤合成に成功している。

我々は既に MA/CA 部位のアミノ酸配列 (-Pro-Gln-Val-Leu*Pro-Val-Met-His-) と HMC を有する β -アミノ酸アロフェニルノルスタチン(Apns) を組み合わせた阻害剤が強い酵素阻害活性を有することを見いだしている。さらに本化合物を基に低分子化、非天然アミノ酸の導入、非ペプチド化等を行って、テトラペプチド型阻害剤 KNI-10455, KNI-10497, KNI-10516 等を見いだした。これらはヘキサペプチド型阻害剤と比べても見劣りしない強い酵素阻害活性を有していた。



今回阻害剤の設計に際し、これらをリード化合

物として用い各部位の修飾を行うことにした。また Wlodawer らが世界で初めて成功した HTLV-I プロテアーゼの結晶構造解析 [PNAS, 18332-18337, 102, (2005); pdb: 2B7F] を利用して KNI-10455 とプロテアーゼ複合体の分子モデリングを行い、その結果を設計に利用した。

各ポジションの構造変換は、酵素との相互作用の質を高めつつ生体内安定性と細胞膜透過性向上に寄与できることに重点を置いてデザインすることとした。

化合物の合成は、Boc 基を一時的アミノ保護基に用いる一般的な液相法にて行い、すべて逆相 HPLC にて精製を行った後、活性の評価に用いた。

(倫理面への配慮)

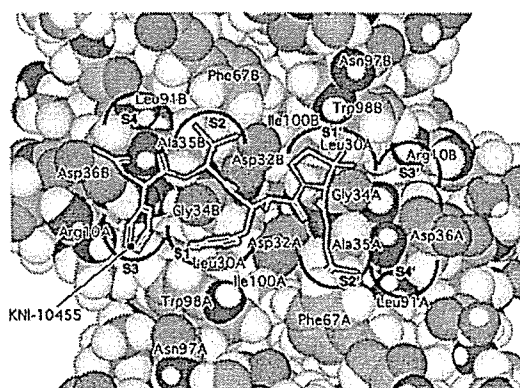
特に必要としない。

C. 研究結果

1) KNI-10455 とプロテアーゼ複合体の分子モデリング

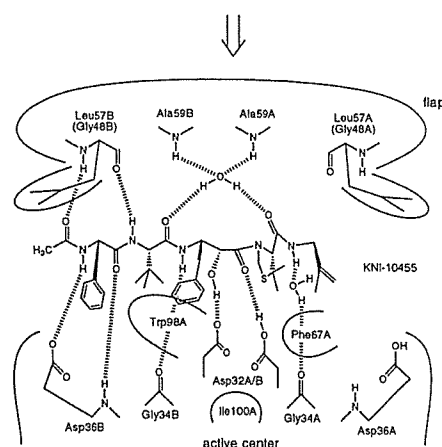
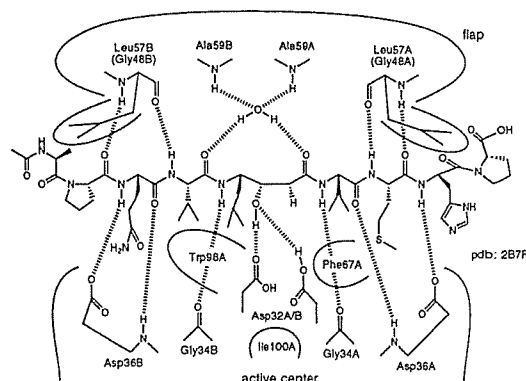
Wlodawer らはフェニルスタチンを有する阻害剤を用いて HTLV-I プロテアーゼ誘導体の結晶化に成功している。その結晶構造は HIV-1 プロテアーゼとおおむね同じと言えるが、細部にはかなりの違いが認められた。特にフラップ部分と S3 部位の構造は HIV のものと大いに異なっていた。このプロテアーゼと我々の設計した阻害剤 KNI-10455 の結合様式を分子モデリングにより解析した。

Modeled Structure of a Complex of HTLV-I Protease with KNI-10455



KNI-10455 の主鎖を構成するペプチド結合は、それぞれ水素結合を形成すると予想され、側鎖官能基は対応するサブサイトに無理なくフィットし、大きなボイドも見られない。これは HIV プロテアーゼとその阻害剤の結合様式と相似であり、KNI-10455 が強い阻害活性を有することと矛盾し

ない。よって KNI-10455 の構造を大きく変えることは大幅な活性低下をもたらすことが予想される。この結果を基に各ポジションの更なる構造変換、最適化を行った。

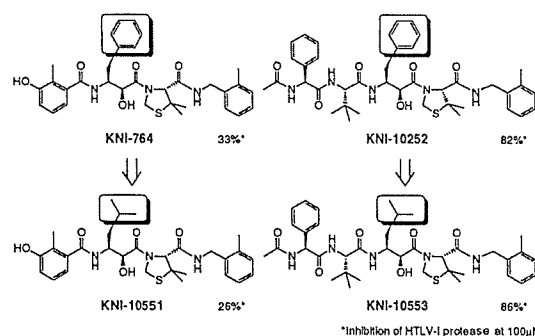


Hydrogen Bonding Pattern between HTLV-I Protease and Inhibitor

2) P1 位構造活性相関

KNI-10455 と HTLV-I プロテアーゼの複合体モデルによると、P1 位のベンゼン環が多少大きすぎる様に見える。そこで P1 位側鎖ベンジル基をイソブチル基 (ロイシントイプ) に変換した化合物 KNI-10551, KNI-10553 を合成した。しかしプロテアーゼ阻害活性はイソブチル基でもベンジル基でも同等の直を示した。

Structure Activity Relationship at P1 Position of HTLV-I Protease Inhibitor

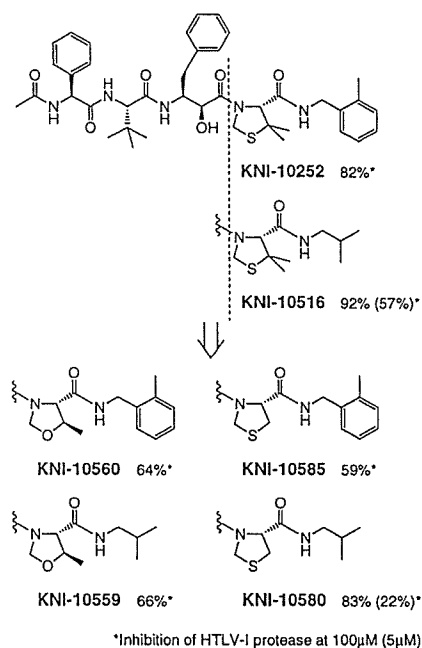


*Inhibition of HTLV-I protease at 100 μ M

3) P1'-P2'位構造活性相関

P2'位が比較的大きい KNI-10252 より、小さめの官能基を持つ KNI-10516 の方が活性が高い。そこで P1'位に比較的小さいユニットを組み合わせることで、より活性が高いものが得られるか試みた。Dmt よりサイズの小さい P1'ユニットと大きめの P2'ユニットを組み合わせさせた阻害剤を合成したが、元の化合物より阻害活性は低下した。

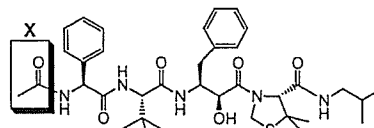
Structure Activity Relationship at P1'-P2' Positions of HTLV-I Protease Inhibitor



4) N 末端部位の構造変換

KNI-10455 の N 末端アセチル基は、膜透過性や生体内安定性の点でも有利とは言えない。そこでこの部位の構造変換を行った。HIV ではこの部分は完全に酵素の外側に位置するのに対し、HTLV-I ではフラップに覆われており相互作用が期待できる。そこで種々脂肪族カルボン酸を導入したところ、いずれも強い阻害活性を示した。とくに KNI-10573, KNI-10574, KNI-10633 等はかなりの活性上昇を示した。またウレタン構造を有する KNI-10584 は物性等の点でも期待できると考えられる。

Structure Activity Relationship at N-terminal of HTLV-I Protease Inhibitor

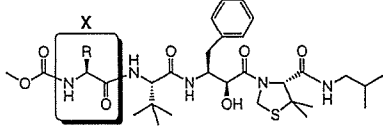






KNI-number	X	Inhibition of HTLV-I protease at 100µM (at 5µM)
KNI-10516		92% (57%)
KNI-10584		92% (67%)
KNI-10570		98% (90%)
KNI-10571		97% (76%)
KNI-10572		93% (84%)
KNI-10573		98% (93%)
KNI-10574		96% (87%)
KNI-10575		93% (81%)
KNI-10614		93% (88%)
KNI-10615		*R and/or S 91% (81%)
KNI-10616		95% (88%)
KNI-10617		95% (87%)
KNI-10618		*R and/or S 95% (86%)
KNI-10633		96%
KNI-10634		89%

5) P3 位構造活性相関

P3 位のフェニルグリシンの側鎖ベンゼン環を低分子化すべく、構造変換を行った。アリルグリシンやシクロペンチルアラニンを導入したが、良好な結果は得られなかった。

Structure Activity Relationship at P3 Position of HTLV-I Protease Inhibitor

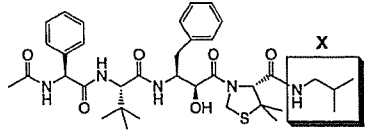










KNI-number	X	Inhibition of HTLV-I protease at 100μM (at 5μM)
KNI-10584		92% (67%)
KNI-10609		74% * R or S
KNI-10584		54%
KNI-10584		65% * R and S

6) P2'位構造活性相関

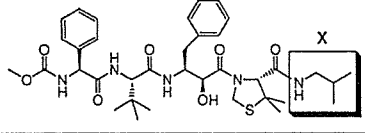
活性上昇とともに物性改善を考慮した P2'位の構造活性相関研究を行った。P2'位のイソブチル基をさらに脂溶性の高いものに変換した KNI-10586, KNI-10600, KNI-10627 等はより強い阻害活性を有していた。一方親水性を増やすため酸素原子を導入したものは活性が低下した。その中で tert-ブチルヒドロジドを有する KNI-10605 は比較的活性が高く、かつ疎水性、親水性共に有するため膜透過に有利ではないかと考えられる。


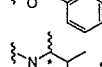









Structure Activity Relationship at P2' Position of HTLV-I Protease Inhibitor (1)



KNI-number	X	Inhibition of HTLV-I protease at 100μM (at 5μM)
KNI-10156		92% (57%)
KNI-10536		48%
KNI-10537		57%
KNI-10542		84% (41%)
KNI-10586		95% (63%)
KNI-10592		84% (26%)
KNI-10600		98% (77%)
KNI-10627		98%

Structure Activity Relationship at P2' Position of HTLV-I Protease Inhibitor (2)



KNI-number	X	Inhibition of HTLV-I protease at 100μM (at 5μM)
KNI-10584		92% (67%)
KNI-10558		12%
KNI-10561		92% (74%) * R or S
KNI-10562		97% (88%)
KNI-10581		79% (44%)
KNI-10583		75% (46%)
KNI-10605		98% (68%)
KNI-10606		21%
KNI-10607		72%
KNI-10608		81% (21%)
KNI-10624		90% * mixture

D. 考察

HTLV-I プロテアーゼと KNI-10455 の分子モデリング解析により、我々の阻害剤はおおむね理想的な結合様式を有していることが予想できた。

P1 位 Aps の側鎖ベンゼン環はモデリングによると少し大きい様に思える。しかしイソブチル基に変換しても活性はほとんど変化しなかった。これらの中間のサイズを持つ側鎖（ネオペンチル等）が導入できると面白いだろう。

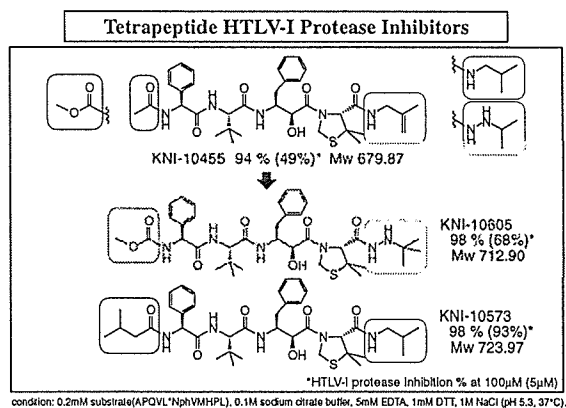
KNI-10455 の N 末端アセチル基は活性に非常に重要な役割を有していた。その理由として HTLV-I プロテアーゼが HIV に比べ大きなフラップを有しているので、HIV では外部に露出するこの部位が相互作用に寄与できるためであることが、HTLV-I プロテアーゼの X 線結晶構造解析により解った。アセトアミドの様な構造は生体内安定性、膜透過性の点でも望ましいとは言えないが、これを安定性の高いと考えられるウレタン構造や、末端分岐脂肪族カルボン酸に変換することが出来た。

P3 位のフェニルグリシンを低分子化しようと試みたが、いずれも活性の低下を伴った。アリルグリシンではなくフェニルグリシンにより近い構造を持つビニルグリシンの誘導体を用いれば良かったかもしれない。

P2'位のイソブチル, β -メタリル, 2-メチルペンジルといった構造を元に構造変換を行った結果, より活性の高い化合物を見いだすことが出来た。しかしこれらはより疎水性が高い官能基を有しており, 薬物として有利かどうか問題がある。S2'位はもともと疎水性のポケットであり, 親水性の官能基が望ましく無いのは当然とも言える。しかし一方で, tert-ブチルヒドラジドの様な疎水性, 親水性共に有する官能基が高い阻害活性をもたらすことも見いだすことが出来た。この知見は薬物としての阻害剤設計に極めて有用であろう。

E. 結論

テトラペプチド型 HTLV-I プロテアーゼ阻害剤 KNI-10455 等をリード化合物として, 生体内安定性, 膜透過性向上を目指した阻害剤の設計, 合成を試みた。その結果としてリード化合物より安定性や物性の点で進歩した部分構造をもち, 同等の酵素阻害活性を有する阻害剤 KNI-10584, KNI-10605 を見いだした。さらに KNI-10562, KNI-10573, KNI-10617 はリード化合物より強い酵素阻害活性を有していた。



F. 研究発表

1. 論文発表

* Youhei Sohma, Atsuhiko Taniguchi, Mariusz Skwarczynski, Taku Yoshiya, Fukue Fukao, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. "O-Acyl isopeptide method" for the efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides: use of "O-acyl isodipeptide unit". *Tetrahedron Letters*, 47 (18), 3013-3017 (2006).

* 日高興士, 木曾良明. 今エイズ薬研究はどうなっているか. *化学*, 61 (5), 25-29, (2006).

* Yoshio Hamada, Naoto Igawa, Hayato Ikari, Zyta Ziora, Abdellah Yamani, Koushi Hidaka,

Tooru Kimura, Kazuki Saito, Yoshio Hayashi, Shoichi Ishiura, Yoshiaki Kiso. β -Secretase inhibitors: Modification at the P4 position and improvement of inhibitory activity in cultured cell. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16 (16), 4354-4359 (2006).

* Mariusz Skwarczynski, Mayo Noguchi, Shun Hirota, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. Development of first photoresponsive prodrug of paclitaxel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16 (17), 4492-4496 (2006).

* Magne O. Sydnnes, Yoshio Hayashi, Vinay K. Sharma, Takashi Hamda, Usman Bacha, Jennifer Barrila, Ernesto Freire, Yoshiaki Kiso. Synthesis of glutamic acid and glutamine peptides possessing a trifluoromethyl ketone group as SARS-CoV 3CL protease inhibitors. *Tetrahedron*, 62 (36), 8601-8609 (2006).

* Taku Yoshiya, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. "O-Acyl isopeptide method": racemization-free segment condensation in solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters*, 47(45), 7905-7909 (2006).

* Youhei Sohma, Yoshiaki Kiso "Click peptide": Chemical biology-oriented synthesis of Alzheimer's disease-related amyloid β peptide (A β) analogues based on the "O-acyl isopeptide method". *ChemBioChem*, 7(10), 1549-1557 (2006).

* Youhei Sohma, Atsuhiko Taniguchi, Taku Yoshiya, Yousuke Chiyomori, Fukue Fukao, Setsuko Nakamura, Mariusz Skwarczynski, Takuma Okada, Keisuke Ikeda, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Shun Hirota, Katsumi Matsuzaki, Yoshiaki Kiso. "Click peptide": a novel "O-acyl isopeptide method" for peptide synthesis and chemical biology-oriented synthesis of amyloid β peptide analogues. *J. Peptide Science*, 12 (12), 823-828 (2006).

2. 学会発表

* 木曾良明: 蛋白質の最適空間の探求: 分子認識を基盤とする阻害剤のデザイン. 第6回日本蛋白質科学会年会ランチョンセミナー(京都), 2006.4.

* Yoshiaki Kiso: Defying difficult diseases: design of protease inhibitors and prodrug forms.

ICOB-5 & ISCNP -25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (Kyoto, Japan) 2006.7.

* Yoshiaki Kiso: Challenging intractable diseases: protease inhibitors and O-N acyl migration-type prodrug forms. 9th Chinese International Peptide Symposium (CPS-9) - New Age of Peptide Biology and Chemistry (Shanghai, China) 2006.7.

* J-T. Nguyen, A. Itami, H. Maegawa, K. Nishiyama, T. Kimura, Y. Kiso. From peptidic substrate to small inhibitor possessing non-natural amino acids: a summary on HTLV-1 protease inhibitor optimization studies. 2nd International Symposium on Biomolecules and Related Compounds (Kyoto, Japan) 2006.11.

* Yoshiaki Kiso. Challenging difficult diseases: peptide mimetic inhibitors and click peptides. 10th Korean Peptide Symposium (Seoul, Korea) 2006.11-12.

G. 知的財産権の出題・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得：該当無し
2. 実用新案登録：該当無し
3. その他：該当無し

HTLV-1 感染価及び HTLV-1 複製阻害剤評価システムの研究

分担研究者 足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学分野)

研究要旨 HTLV-1 に対するインジケーター細胞を得るため、HTLV-1 LTR の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入した pK30 $_{luc}$ をヒトリンパ球株化細胞 H9 に *neo* 遺伝子発現ベクターと共導入し、G418 抵抗性の細胞クローンを選択した。このクローン化細胞(H9/K30 $_{luc}$)は HTLV-1 産生細胞である MT-2 細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生した。HIV-1 に対しても同様のシステムを確立するため、既に保有しているインジケーター細胞(H9/H1 $_{luc}$ 細胞)に加えて、低いレベルで安定にウイルスを産生する持続感染細胞 H9/NL432 を樹立した。これらのシステムは HTLV-1 および HIV-1 に対するウイルス阻害剤の効果を迅速かつ感度良く検出すると予測された。実際、HIV-1 のみに有効であるプロテアーゼ阻害剤サキナビルの評価を行ったところ、HIV-1 に対しては高い阻害効果があり、HTLV-1 に対しては効果がないことが確認された。

A. 研究目的

感染価を迅速に定量するシステムがないため、HTLV-1 のウイルス学的解析は極めて困難であった。本研究では HAM の制御のために、ウイルス複製を指標にした複製阻害剤の開発を目指し、適切な細胞評価系の確立を試みた。

B. 研究方法

- (1) 細胞 細胞株は 293T、H9、H9/H1 $_{luc}$ 、MT-2、MT-4 および M8166 を使用した。
- (2) トランスフェクション 293T 細胞へのトランスフェクションはリン酸カルシウム法で行った。
- (3) ルシフェラーゼおよび逆転写酵素(RT)活性の測定 ルシフェラーゼ活性は Luciferase Assay System (Promega Co., USA) で測定した。RT活性は³²P-dTTPを用い常法により測定した。
- (4) DNA クローン *neo* 遺伝子発現ベクターとして

pRVSVneo を用いた。HTLV-1 完全長クローン pK30 は NIH AIDS Research and Reference Reagent Program(カタログ番号 2817)により入手した。HIV-1 完全長クローンは pNL432 を使用した。ルシフェラーゼレポーターベクター pK30 $_{luc}$ は pK30 の LTR 領域を PCR 法で増幅し、GL3-Basic Vector (Promega Co.) の *Xho* I と *Hind* III 部位に挿入して作製した。

C. 研究結果

- (1) HTLV-1 感染性測定用ルシフェラーゼシステム リンパ球系細胞株 H9 に pK30 $_{luc}$ と pRVSVneo とを 10:1(モル比)の割合で電気穿孔法で共導入し、G418(1mg/ml)存在下で培養した。その結果、安定な細胞株 6 クローンを得た。各細胞株と HTLV-1 産生細胞 MT-2 とを混合培養すると、クローン 1 番は最も高いルシフェラーゼ活性

を示したので、この細胞クローンを H9/K30/luc と名付けその後の実験に使用した。MT-2 との混合培養による H9/K30/luc の活性化が無細胞ウイルスによるものか否か、また、混合培養によって新しく合成された HTLV-1 Tax によるものか否かを検討した。無細胞ウイルスは HTLV-1 陽性 (MT-2), HTLV-1 DNA 陽性 (MT-4 および M8166), あるいは HTLV-1 DNA 陰性 (H9) 細胞の培養上清から調整した。無細胞液を H9/K30/luc に接種し、翌日ルシフェラーゼ産生量を測定した。その結果、観察されていた H9/K30/luc の活性化は無細胞ウイルスの感染によるものではないことが明らかになった。次に、アジドチミジン (AZT) 存在下で H9/K30/luc と MT-2 とを混合培養しルシフェラーゼ産生量を調べた。AZT はルシフェラーゼ産生量にほとんど影響しなかったため、観察されていた活性化に新たに合成された Tax が不要でないことが判明した。

- (2) ルシフェラーゼシステムによる HTLV-1 と HIV-1 に対するサキナビル(SQV)の効果の検討
- (1)の結果から、このシステムでのルシフェラーゼ産生は、ウイルス Env を介した細胞融合により MT-2 から H9/K30/luc へ移行した Tax によるものであると仮定した。プロセッシングされていない Gag と Env-gp41 の C 末端との相互作用が細胞融合を抑制するという HIV-1 に関する報告があることから、プロテアーゼ阻害剤サキナビル (SQV) の効果をこのシステムで検討した。SQV は HIV-1 プロテアーゼを効率的に阻害するが、HTLV-1 Gag のプロセッシングを抑制しないことが報告されている。HIV-1 に関して MT-2 と同様に低レベルのウイルスが産生され続ける持続感染細胞を樹立するため、H9 に pNL432 を電気穿孔法で導入し、数ヶ月培養した。その結果、目的とする HIV-1 持続感染細胞 (H9/NL432) が

樹立できた。この細胞株は低レベルのウイルスを産生していることを RT 活性で確認した。インジケーター細胞 (H9/K30/luc および H9/H1/luc) とウイルス産生細胞 (MT-2 および H9/NL432) とを SQV 存在下で 2 日間混合培養し、細胞中のルシフェラーゼ活性を測定した。HIV-1 システムの場合はルシフェラーゼ産生量が SQV により顕著に抑制されるが、HTLV-1 システムの場合は抑制されないことがわかった。これらの結果は上記の仮説および報告と良く一致した。

D. 考察

本研究で HTLV-1 感染を効率良く検出するインジケーター細胞株 H9/K30/luc を樹立した。H9/K30/luc は無細胞ウイルスに対しては感受性がなく、ウイルス産生細胞 MT-2 との混合培養によって高レベルのルシフェラーゼを産生する。インジケーター細胞のこの活性化は、Env を介した細胞融合によって移行した Tax によって起こると考えられる。本研究では、また、HIV-1 に関しても H9/K30/luc—MT-2 と同様の H9/H1/luc—H9/NL432 システムを構築した。これらのシステムは細胞融合に関わる種々の薬剤や因子の評価に適していると思われる。実際、SQV は HIV-1 に対して抑制効果があることが示された。

E. 結論

HTLV-1 感染価を検出する迅速定量法は未だ報告されていない。また、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤は HTLV-1 プロテアーゼには効果がない。したがって、H9/K30/luc —MT-2 システムによる HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングは極めて重要であると思われる。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan,

- M.A., Shehu-Xhilaga, M., Adachi, A., and Strebel, K. 2004. High level expression of Human Immunodeficiency Virus type-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/NC processing site. *Journal of Biological Chemistry* 279: 12355-12362.
- (2) Sugahara, F., Uchiyama, T., Watanabe, H., Shimazu, Y., Kuwayama, M., Fujii, Y., Kiyotani, K., Adachi, A., Kohno, N., Yoshida, T., and Sakaguchi, T. 2004. Paramyxovirus Sendai virus-like particle formation by expression of multiple viral proteins and acceleration of its release by C protein. *Virology* 325: 1-10.
- (3) Fujita, M., Akari, H., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K., and Adachi, A. 2004. Expression of HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome-degradation. *Microbes and Infection* 6: 791-798.
- (4) Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A., Adachi, A., and Fujita, M. 2004. Functional analysis of HIV-1 *vif* genes derived from Japanese long-term nonprogressors and progressors for AIDS. *Microbes and Infection* 6: 799-805.
- (5) Piroozmand, A., Koyama, A.H., Shimada, Y., Fujita, M., Arakawa, T., and Adachi, A. 2004. Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon. *International Journal of Molecular Medicine* 14: 641-645.
- (6) Nagao, T., Yoshida, A., Sakurai, A., Piroozmand, A., Jere, A., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2004. Determination of HIV-1 infectivity by lymphocytic cell lines with integrated luciferase gene. *International Journal of Molecular Medicine* 14: 1073-1076.
- (7) Jere, A., Piroozmand, A., Tripathy, S., Paranjape, R., Sakurai, A., Fujita, M., and Adachi, A. 2004. Generation and characterization of HIV-1 clones chimeric for subtypes B and C *nef*. *International Journal of Molecular Medicine* 14: 1087-1090.
- (8) Wang, H., Sakurai, A., Khamsri, B., Uchiyama, T., Gu, H., Adachi, A., and Fujita, M. Unique characteristics of HIV-1 Vif expression. *Microbes and Infection*, in press.
- (9) Yoshida, A., Piroozmand, A., Sakurai, A., Fujita, M., Uchiyama, T., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Adachi, A. Establishment of biological assay system for human retroviral protease activity. *Microbes and Infection*, in press.

2. 学会発表

- (1) Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A., Shehu-Xhilaga, M., Lee, Y.-J., Adachi, A., and Strebel, K. (2004) High-level expression of HIV-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the P2/NC processing site. The 2004 Cold Spring Harbor meeting on retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- (2) Fujita, M., Akari, H., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K., and Adachi, A. (2004) Profile of the proteasome-degradation of HIV-1 Vif. The 2004 Cold Spring Harbor meeting on retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- (3) Fujita, M., Khamsri, B., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Akari,

- H., Strebel, K., and Adachi, A. (2004) Proteasome-degradation of HIV-1 Vif and its biological significance. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan.
- (4) Adachi, A. (2004) Functional and structural analysis of HIV accessory proteins which are essential for viral replication and pathogenesis. AIDS Seminar in Kumamoto, Kumamoto, Japan.
- (5) Khamsri, B., Sakurai, A., Jere, A., Uchiyama, T., Adachi, A., and Fujita, M. (2004) Construction and characterization of the arginine mutants of HIV-1 Vif. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜.
- (6) Jere, A., Sakurai, A., Yoshida, A., Fujita, M., and Adachi, A. (2004) Generation and characterization of HIV-1 Nef point mutants. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜.
- (7) 藤田美歌子、カムセー ブンルアン、櫻井明子、アブハイ ジェレ、内山恒夫、足立昭夫 (2004) HIV-2 Vpx および Vpr の発現量の解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜.
- (8) 足立昭夫 (2004) Structural and functional analysis of accessory proteins essential for HIV replication. 第18回日本エイズ学会学術集会シンポジウム、静岡.
- (9) 藤田美歌子、足立昭夫 (2004) HIV-1 Vif: アルギニン変異体の作製およびその性質. 第18回日本エイズ学会学術集会、静岡.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

HTLV-1 感染価及び HTLV-1 複製阻害剤評価システムの研究

分担研究者 足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学分野)

研究要旨 HTLV-1 感染に対するインジケータ細胞として樹立したヒトリンパ球株化細胞 H9/K30*Luc* を用いて、HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを行なった。H9/K30*Luc* 細胞はゲノム内に HTLV-1 LTR の支配下におかれたルシフェラーゼ遺伝子を持ち、MT-2 細胞等の HTLV-1 産生細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生する。候補薬剤存在下で H9/K30*Luc* 細胞と MT-2 細胞とを混合培養し、2 日後に細胞中で産生されるルシフェラーゼ量を測定した。試験管内で抗ヒトレトロウイルスプロテアーゼ阻害能を持つ候補薬剤 (KNI 化合物) は京都薬科大学の木曾良明教授の研究室でデザイン・合成され、当研究室に提供された。調べた全ての KNI 化合物 (KNI-272、-279、-727、-764、-1167、-1276、-1432、-1595b、-10162、-10166、-10220、-10221、-10252、-10270、-10277、-10340、-10375、-10388、-10455b、-10478、-10491、-10496、-10512 および-10516) は細胞毒性の無い薬剤濃度 (5 μ M) で顕著な抗 HTLV-1 活性を示さなかった。なお、上記と同様の HIV-1 評価細胞システムを用いて行なったコントロール実験で、SQV および KNI-764 はこの濃度でほぼ完全に HIV-1 プロテアーゼ活性を阻害した。HTLV-1 プロテアーゼの立体構造に基づいて新しくデザイン・合成された候補薬剤を用いさらにスクリーニングを続ける必要がある。

A. 研究目的

感染価を迅速に定量するシステムがないため、HTLV-1 のウイルス学的解析は極めて困難であった。本研究では、HAM の制御のために、ウイルス複製を指標にした複製阻害剤の開発を目指し、適切な細胞評価系 (H9/K30*Luc*-MT2) を確立した。

B. 研究方法

- (1) 細胞 細胞株は H9/K30*Luc* (HTLV-1 インジケータ細胞)、H9/H1*Luc* (HIV-1 インジケータ細胞)、MT-2 (HTLV-1 産生細胞)、および H9/NL432 (HIV-1 産生細胞) を使用した。
- (2) ルシフェラーゼ活性の測定 ルシフェラーゼ活性は Luciferase Assay System (プロメガ社、USA) で測定した。
- (3) DNA クローン HTLV-1 完全長クローン pK30 は NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (カタログ番号 2817) によ

り入手した。HIV-1 完全長クローンは pNL432 を使用した。ルシフェラーゼクローンは GL3 Basic Vector(プロメガ社)を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトと動物を用いた研究は行っていない。

C. 研究結果

HTLV-1 感染に対するインジケーター細胞として樹立したヒトリンパ球株化細胞 H9/K30 *luc* を用いて、HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを行なった。H9/K30 *luc* 細胞はゲノム内に HTLV-1 LTR の支配下におかれたルシフェラーゼ遺伝子を持ち、MT-2 細胞等の HTLV-1 産生細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生する。候補薬剤存在下で H9/K30 *luc* 細胞と MT-2 細胞とを混合培養し、2 日後に細胞中で産生されるルシフェラーゼ量を測定した。試験管内で抗ヒトレトロウイルスプロテアーゼ阻害能を持つ候補薬剤 (KNI 化合物) は京都薬科大学の木曾良明教授の研究室でデザイン・合成され、当研究室に提供された。調べた全ての KNI 化合物 (KNI-272、-279、-727、-764、-1167、-1276、-1432、-1595b、-10162、-10166、-10220、-10221、-10252、-10270、-10277、-10340、-10375、-10388、-10455b、-10478、-10491、-10496、-10512 および -10516) は細胞毒性の無い薬剤濃度 (5 μ M) で顕著な抗 HTLV-1 活性を示さなかった。なお、上記と同様の HIV-1 評価細胞システムを用いて行なったコントロール実験で、SQV および KNI-764 はこの濃度でほぼ完全に HIV-1 プロテアーゼ活性を阻害した。

D. 考察

本研究で HTLV-1 感染を効率良く検出するインジケーター細胞株 H9/K30 *luc* を樹立した。H9/K30 *luc* は無細胞ウイルスに対しては感受性がなく、ウイルス産生細胞 MT-2 との混合培養によって高レベルのルシフェラーゼを産生する。インジケーター細胞のこの活性化は、開裂型 Gag/Env を介した細胞融合によって移行した Tax によって起こると考えられる。本研究では、また、HIV-1 に関しても H9/K30 *luc*- MT-2 と同様の H9/H1 *luc*- H9/NL432 システムを構築した。これらのシステムは細胞融合に関わる種々の薬剤や因子の評価に適している。しかし、今のところ有効な抗 HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤は見出されていない。昨年、HTLV-1 プロテアーゼの立体構造が決定された。これから得られる情報に基づき、新しく抗 HTLV-1 プロテアーゼ阻害候補薬剤をデザイン・合成し、本研究で確立されたシステムでその有効性を検証する必要がある。

E. 結論

HTLV-1 感染価を検出する迅速定量法は未だ報告されていない。また、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤は HTLV-1 プロテアーゼには効果がない。したがって、H9/K30 *luc* - MT-2 システムによる HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングは極めて重要であると思われる。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang, H., Sakurai, A., Khamsri B., Uchiyama, T., Gu, H., Adachi, A., and Fujita, M. Unique characteristics of HIV-1 Vif expression. *Microbes and Infection* 7: 385-390, 2005.
- 2) Yoshida, A., Piroozmand, A., Sakurai, A., Fujita, M., Uchiyama, T., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Adachi, A. Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity. *Microbes and Infection* 7: 820-824, 2005.
- 3) Khamsri, B., Murao, F., Yoshida, A., Sakurai, A., Uchiyama, T., Shirai, H., Matsuo, Y., Fujita, M., and Adachi, A. Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpx/Vpr proteins. *Microbes and Infection*, in press.
- 4) Kamada, K., Yoshida, A., Khamsri, B., Piroozmand, A., Yamashita, T., Uchiyama, T., Fujita, M., and Adachi, A. Construction of *gag*-chimeric viruses between HIV-1 and SIVmac that are capable of productive multi-cycle infection. *Microbes and Infection*, in press.
- 5) 足立昭夫 HIV 感染症. *日本臨床*, 63 巻増刊号 12, 342-346, 2005.

2. 学会発表

- 1) 鎌田和弥、内山恒夫、山下知輝、Ahmad Piroozmand、Boonruang Khamsri、長尾多美子、藤田美歌子、足立昭夫. サル細胞に感

染する HIV-1 DT の構築. 日本ウイルス学会、2005 年、横浜.

- 2) 藤田美歌子、長尾多美子、足立昭夫. HIV-2 Vpx は細胞増殖抑制効果を示す. 日本エイズ学会、2005 年、熊本.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

HTLV-1 感染価及び HTLV-1 複製阻害剤評価システムの研究

分担研究者 足立昭夫

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学分野 教授

研究要旨 HTLV-1 感染に対するインジケータ細胞として樹立したヒトリンパ球株化細胞 H9/K30*luc* を用いて、HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを行なった。H9/K30*luc* 細胞はゲノム内に HTLV-1 LTR の支配下におかれたルシフェラーゼ遺伝子を持ち、MT-2 細胞等の HTLV-1 産生細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生する。候補薬剤存在下で H9/K30*luc* 細胞と MT-2 細胞とを混合培養し、2 日後に細胞中で産生されるルシフェラーゼ量を測定した。試験管内でヒトレトロウイルスプロテアーゼ阻害能を持つ候補薬剤（KNI 化合物）は京都薬科大学の木曾良明教授の研究室でデザイン・合成され、当研究室に提供された。調べた全ての KNI 化合物（KNI-272、-279、-727、-764、-1167、-1276、-1432、-1595b、-10162、-10166、-10220、-10221、-10252、-10270、-10277、-10340、-10375、-10388、-10455b、-10478、-10491、-10496、-10512 および -10516）は細胞毒性の無い薬剤濃度（5 μ M）で顕著な抗 HTLV-1 活性を示さなかった。さらに、KNI-10535、-10542、-10561a、-10562、-10570、-10571、-10572、-10573、-10574、-10575、-10578、-10581、-10583、-10584、-10586、-10588 および -10590 の抗 HTLV-1 効果について検討中である。

A. 研究目的

感染価を迅速に定量するシステムがないため、HTLV-1 のウイルス学的解析は極めて困難であった。本研究では、HAM の制御のためにウイルス複製を指標にした複製阻害剤の開発を目指し、抗 HTLV-1 プロテアーゼ薬の検索システムとしても利用可能な、二種類の細胞の混合培養による評価系（H9/K30*luc* [インジケータ

細胞] と MT2 [HTLV-1 産生細胞] との混合培養）を確立した（Microbes and Infect. 7:820-824, 2005）。

B. 研究方法

(1) 細胞 細胞株は H9/K30*luc* (HTLV-1 イン

ジケーター細胞)、H9/H1*luc*(HIV-1 インジケーター細胞)、MT-2(HTLV-1 産生細胞)、および H9/NL432(HIV-1 産生細胞)を使用した(Int. J. Mol. Med. 14: 1073-1076, 2004; Microbes Infect. 7: 820-824, 2005)。

(2) ルシフェラーゼ活性の測定 ルシフェラーゼ活性は Luciferase Assay System (プロメガ社、米国) で測定した。

(3) DNA クローン HTLV-1 完全長クローン pK30 は米国 National Institutes of Health の AIDS Research and Reference Reagent Program (カタログ番号 2817) から入手した。HIV-1 完全長クローンは pNL432 (J. Virol. 59: 284-291, 1986) を使用した。ルシフェラーゼクローンは GL3 Basic Vector(プロメガ社)を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトと動物を用いた研究は行っていない。

C. 研究結果

HTLV-1 感染に対するインジケーター細胞として樹立したヒトリンパ球株化細胞 H9/K30*luc* を用いて、HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを行なった。H9/K30*luc* 細胞はゲノム内に HTLV-1 LTR の支配下におかれたルシフェラーゼ遺伝子を持ち、MT-2 細胞等の HTLV-1 産生細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生する。候補薬剤存在下で H9/K30*luc* 細胞と MT-2 細胞とを混合培養し、2 日後に細胞中で産生されるルシフェラーゼ量を測定した。試験管内で抗ヒトレトロウイルスプロテアーゼ阻害能を持つ候補薬剤 (KNI 化合物) は

京都薬科大学の木曾良明教授の研究室でデザイン・合成され、当研究室に提供された。調べた全ての KNI 化合物(KNI-272[C33H41N5O6S2], -279[C34H43N5O6S], -727[C30H41N3O5S], -764[C32H37N3O5S], -1167[C33H33N3O6], -1276[C33H33N3O6], -1432[C34H41N3O5S], -1595b[C38H46N4O6S], -10162[C47H71N11O11S2], -10166[C41H67N7O8S2], -10220[C43H63N7O8S2], -10221[C43H62N8O9S], -10252[C40H51N5O6S], -10270[C41H53N5O6S], -10277[C41H51N5O6S], -10340[C38H53N5O7S], -10375[C37H47N5O8S2], -10388[C38H48N4O5S], -10455b[C36H49N5O6S], -10478[C30H49N5O6], -10491[C49H63N7O7], -10496[C35H47N5O6S], -10512[C53H69N11O13S] および -10516[C36H51N5O6S]) は細胞毒性の無い薬剤濃度 (5 μM) で顕著な抗 HTLV-1 活性を示さなかった。さらに、他の KNI 化合物 (KNI-10535[C35H44F5N5O6S], -10542[C34H44F3N5O6S], -10561a[C37H53N5O7S], -10562[C37H53N5O7S], -10570[C38H55N5O6S], -10571[C37H53N5O6S], -10572[C39H57N5O6S], -10573[C39H57N5O6S], -10574[C38H55N5O6S], -10575[C38H53N5O6S], -10578[C39H57N5O6S], -10581[C34H44F3N5O7S], -10583[C35H44F5N5O7S], -10584[C36H51N5O7S], -10586[C37H53N5O6S], -10588[C40H59N5O6S] および -10590[C40H59N5O6S]) についてその抗 HTLV-1 効果について検討中である。なお、上記と同様の HIV-1 複製評価細胞システム(Int. J. Mol. Med. 14: 1073-1076, 2004; Microbes Infect. 7: 820-824, 2005) を用いて行なったコントロール実験で、SQV および KNI-764 はこの濃度でほぼ完全に HIV-1 プロテアーゼ活性を阻害した。