

200710019A

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 H19-政策創薬-一般-007

HIV吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型HIV化学療法剤の開発

平成19年度 総括研究報告書

平成20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吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV化学療法剤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） 分担研究者・児玉栄一（京都大学ウイルス研究所・助教） | ----- | 4 |
| 2. 分担研究者・藤井信孝（京都大学大学院薬学研究科・教授） 分担研究者・大石真也（京都大学大学院薬学研究科・助教） | ----- | 12 |
| 3. 分担研究者・村上努（国立感染症研究所・エイズ研究センター室長） | ----- | 20 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 24 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 30 |

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合 研究事業）
総括研究報告書

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤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

耐性 HIV の出現は治療上大きな脅威であり、その克服には新たな標的に対する抗 HIV 剤の開発が必要である。本研究では、これまでに同定した侵入阻害活性を有する多数の小分子リード化合物、及び T-20 より強力に耐性ウイルスにも有効なペプチド製剤を基に、HIV 吸着・膜融合過程を標的とした強力かつ安全な新規抗 HIV 剤を開発し、多数の HIV 感染者が利用可能な多剤耐性克服型化学療法を確立する。

分担研究者氏名・所属機関名及び

所属分野における職名：

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・助教)

児玉栄一(京都大学ウイルス研究所・助教)

村上努(国立感染症研究所・エイズ研究センター第三室長)

西垣純爾(富士フィルム株式会社 R&D 統括本部有機合成化学研究所・主任研究員)

せ、現在、米国等で使用され、耐性 HIV も検出されるようになった T-20 に代わるペプチド製剤と小分子化合物の2つの薬剤開発を行う。これらの開発によって長期にわたり HIV 複製を抑制しうる多剤併用療法の確立を目指す。さらに本申請では融合の前段階であるコレセプターとの結合阻害剤の開発もあわせて行い、ウイルスの細胞への侵入全体を多段階で阻害する有効で副作用の少ない併用療法の確立も目指す。

A. 研究目的

多剤併用療法 (HAART) は HIV 感染症をコントロール可能としたが、依然 HIV の駆逐は不可能であり、耐性ウイルスの出現は治療上大きな脅威となっている。HIV 外皮(Env)蛋白質 gp41 に由来するペプチド製剤 T-20 (Fuzeon; Trimeris/Roche 社) は HIV の融合を阻害し、臨床応用され大きな効果を上げている。しかし、T-20 はペプチド製剤であり経皮投与に限られるという欠点を有しており、また治療費の高騰という問題がある。このため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り、同時に安価で強い活性を持つペプチドの開発が必要である。

本研究の目的は、宿主細胞への HIV 感染における初期段階である細胞侵入を阻害する薬剤の開発である。侵入にはレセプターへの吸着、その後 gp120 が解離することによって gp41 が活性化される膜融合の過程がある。申請者は、平成 18 年度までの本事業において後者の膜融合阻害剤の開発を行ってきており、有効なペプチド薬の開発で特許申請を行っている。また小分子化合物でもリードとなりうる化学構造を有する化合物の同定を行ってきた。これらの研究成果をさらに発展さ

B. 研究方法

細胞、ウイルス

HeLa-CD4/CCR5LTR-β-galactosidase (MAGI) およびヒト glioma 由来 NP-2 細胞に HIV レセプターである CD4/CXCR4/CCR5 を導入した NCK45 細胞を使用した。T-20 耐性 HIV-1 クローンは site-directed mutagenesis 法を用いて作製した。

抗ウイルス剤

gp41 由来のペプチドである N36、T-20、C22、C29 と C34 および SC22EK、SC29EK、SC34EK、SC35EK、DS5000、AZT および ddC を使用した。CXCR4、CCR5 アンタゴニストである T-140 と TAK-779 はそれぞれ京都大学薬学部、米国 NIH より分与を受けた。

Circular dichroism スペクトルの測定

SC29EK と N-HR 由来のペプチド N36 との結合親和性は circular dichroism (CD) により解析した。

構造解析

gp41 における N-領域の Asn43 が Asp にアミノ酸変異すると、T-20 耐性を獲得することが報告されている。これらのアミノ酸変異を導入した 6-helical bundle 構造の N-領域/C-領域相互作用様式を、X 線構造で解析した。

低分子膜融合阻害剤の開発研究

低分子膜融合阻害剤の基本骨格合成は、市販の化学試薬を利用して、有機合成化学における常法により行った。シリカゲルクロマトグラフィーによる精製後、¹H-NMR および質量分析によって、目的とする化合物の同定を行った。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

C. 研究結果

抗 HIV-1 活性測定法の開発

NCK-45 細胞にレポーター遺伝子を導入した NCK-β-Gal/SEAP 細胞を使った抗 HIV-1 活性測定を検討し MAGI 細胞と同等の特異性・感度を有することを明らかにした。

融合阻害ペプチドの抗 HIV-1 活性

C34 から 5 アミノ酸を少なくした C29 は抗 HIV-1 活性を示さなかったが、SC34EK から 5 アミノ酸を削減した SC29EK は HIV-1_{WT} や T-20 耐性 HIV-1 に対して SC34EK と同等の抗 HIV-1 活性を示した。

SC29EK の抗 HIV-1 活性メカニズムの解析

SC29EK が強い抗 HIV-1 活性を示すメカニズムを明らかにするため N36/SC29EK 複合体の CD 解析を行い SC29EK は N36 と安定な結合性を示したことから α-ヘリックス性の増強が抗 HIV-1 活性に関与すると考えられた。

構造解析

HIV-1 野生株および T-20 耐性株における gp41 の N-領域部分ペプチド (N36/N43D) と C-領域部分ペプチド (C34) を調製し、N36/N43D と C34 との複合体の結晶を得た。X 線構造解析を行ったところ、N36/N43D と C34 が 3:3 の比で結晶構造を構成しており、互いのペプチドが逆平行型に相互作用していた。T-20 耐性変異部位に着目すると、Asp43 は、Arg46 と塩橋を形成し、Glu137 とは水分子を介した水素結合により連結していた。

低分子膜融合阻害剤の開発研究

N-アリアル化と C-H 活性化をパラジウム触媒を用いて連続的に行うことによるカルバゾール骨格構築法の検討を行った。触媒量・酸化剤・溶媒を精査し、ジフェニルアミンの反応における各種条件から高収率でカルバゾールを得る条件を確立した。

また、前年度までの研究により確立した 2-(アミノメチル)インドール誘導体の合成法をイソキノリン骨格合成へと展開し、ヨウ化銅触

媒存在下、2-エチニルベンズアルデヒド、パラホルムアルデヒド、及び二級アミンの三成分反応終了後に *t*-BuNH₂ を加えて加熱する四成分反応連結反応によりイソキノリン誘導体を合成する条件を確立した。

CXCR4 阻害剤

(株)クレハが開発した KRH-1636 の誘導体で、経口吸収性を示す CXCR4 阻害剤 KRH-3955 に関して解析を行った。X4, R5X4 HIV-1 の活性化 PBMC における複製を EC₅₀: 1-4 nM というごく低濃度で抑制した。また hu-PBL-SCID mice を用いた HIV-1 感染モデルにおいても NL4-3 の複製を、ほぼ完全に抑制した。KRH-3955 の SDF-1α 結合阻害活性を測定し、IC₅₀ = 0.8nM と強力に結合を阻害することを明らかにした。CXCR4 変異体を使い、KRH-3955 との結合責任アミノ酸を解析し、Asp²⁶²、His²⁸¹ と相互作用することが示された。

融合阻害小分子化合物の探索

融合阻害活性を有する小分子化合物を同定していたが、更に活性が強い化合物を探索した。3000 種類以上の化合物を検討し、EC₅₀ が 100nM 前後の強い抗 HIV 活性を有する化合物を複数見出している。

D. 考察

今年度の研究により X-Gal による染色だけでなく、SEAP 活性、MTT 色素法によっても抗 HIV 活性を検討できる新たなアッセイ系を確立した。このアッセイ系によって効率的なスクリーニングが可能になるものと期待される。

Fuseon (T-20) は実際に臨床で使用され大きな効果を上げているが、耐性ウイルスの出現が大きな問題となっている。我々は C34 をアミノ酸置換することによって高親水性で高活性の誘導体を作製することに成功している。これらの誘導体は N-HR との相互作用にとって必要ではない溶媒接触面のアミノ酸残基をグルタミン酸 (E) とリジン (K) に置換させている。C34 において XEEXXKK (X は置換されていないアミノ酸) モチーフの繰り返しが存在する。SC34EK は 2 個の完全な XEEXXKK モチーフと 3 個の不完全な XEEXXKK モチーフを持ち、元の配列である C34 と比べて抗 HIV-1 活性が増強されていた。4 個のモチーフを持つ SC29EK は活性を示したが、3 個になるとその活性は急激に低下した。SC29EK が SC34EK と同様に T-20 耐性 HIV-1 の融合を阻害することから、少なくとも

も4個のXEEXKKモチーフがT-20耐性ウイルスの融合を阻害するために必要であることが明らかとなった。この機序としてEKによる静電的な相互作用が α -ヘリックス性を強めていることが明らかとなった。ペプチド製剤は、その製造に高いコストがかかり低分子化が必要であるが、本研究で用いたEK置換は α -ヘリックス性を増強させることにより抗ウイルス効果を増強させる事が可能であり、低分子化を可能とした。

X線結晶構造解析によりN領域にあるAsn43のAspへの変異は、T-20とN領域との複合体(6-helical bundle構造)形成を阻害し、T-20耐性を獲得することが示唆された。また、C領域部分ペプチドの138位の構造最適化により、T-20耐性株に対する阻害活性を回復する新規膜融合阻害剤創製の可能性が示された。

融合阻害活性を有する小分子化合物の開発に向けて効率的な合成法の開発を継続しており、進展がみられた。また強い融合阻害活性を示す化合物の同定に新たに成功しており、今後、その作用機序の解析を経て合成展開を目指す。

E. 結論

今年度の研究から融合阻害ペプチド製剤の低分子化に成功すると共にCXCR4阻害剤の開発に向けた研究が進んでいる。また新たな融合阻害活性を有する小分子化合物の同定、合成法の開発にも成功しており今後、研究を推進して行く。

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

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤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

多剤耐性 HIV 感染症を克服するために HIV の細胞侵入過程を標的とした薬剤の開発を行った。ウイルス侵入過程を詳細に調べるために、レセプターごとにそのアンタゴニズムを測定しうるアッセイ系を確立し、有望な融合阻害剤 SC34EK を小分子化した SC29EK の抗 HIV 活性を明らかとした。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のエンベロープタンパクである gp120 と gp41 はウイルスの宿主細胞への侵入において重要な役割を果たしている。gp120 は細胞表面上の CD4、続いて CXCR4 や CCR5 等のコレセプターと結合することにより構造変化を起こし、それによって gp41 が活性化され N 末端の疎水性アミノ酸部位が細胞膜に貫通する。融合の過程で、gp41 の N 末端側ヘリックス(N-HR)と C 末端側ヘリックス(C-HR)が相互作用し六量体を形成することでウイルスと細胞膜を接近させ、膜融合を起こすと考えられている。

本研究ではこの HIV の細胞内侵入を阻害する薬剤を網羅的に探索・開発し、現在臨床で問題となっている逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤耐性 HIV を効率よく抑制することを目的としている。そのため初年度である今年度はスクリーニング効率の向上と作用機序の解明のために新たなスクリーニング系を確立した。この方法によって CCR5 を利用して感染する実験室株や臨床分離株などを効率よく簡便にスクリーニングできることを示した。また一方で、我々がこれまでに開発してきた有望な融合阻害剤 SC34EK を小分子化した。またこれらのペプチドを現在臨床で問題となりつつある T-20 耐性ウイルスに対して検討し、さらに血中での安定性を *in vitro* で検討した。

B. 研究方法

細胞とウイルス

HeLa-CD4/CCR5LTR- β -galactosidase (MAGI) およびヒト glioma 由来 NP-2 細胞に HIV レセプターである CD4/CXCR4/CCR5 を導入した NCK45 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清 (FCS)、0.2 mg/ml G418、0.1 mg/ml ハイグロマ

インシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium 中で培養した。NCK45 細胞に Figure 1 に示したようなレポーター遺伝子を含むプラスミドを遺伝子導入し、ピューロマイシンで導入細胞を選択した (NCK- β -Gal/SEAP)。HIV-1_{MB} と HIV-1_{BAL} は NCK45 細胞を用いて培養、回収した。臨床分離株は国立国際医療センター岡慎一博士より供与を受けた。T-20 耐性 HIV-1 クローンは site-directed mutagenesis 法を用いて pNL4-3 に変異を導入し作製した。これらクローンを 293T 細胞に遺伝子導入し、48 時間後にウイルスを回収した。

抗ウイルス剤

gp41 由来のペプチドである N36、T-20、C22、C29 と C34 および SC22EK、SC29EK、SC34EK、SC35EK は化学合成により作製した。DS5000、AZT および ddC は Sigma-Aldrich 社より購入した。CXCR4、CCR5 アンタゴニストである T-140 と TAK-779 はそれぞれ京都大学薬学部、米国 NIH より分与を受けた。

抗 HIV-1 活性の評価

抗 HIV-1 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator assay を用いた。10⁴ cells/well の HeLa-CD4/CCR5LTR- β -galactosidase (MAGI) 細胞を 96 well flat microtiter culture plate で培養し、翌日に HIV-1 クローンと抗ウイルス剤を加える。ウイルスを加えてから 48 時間培養後 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) によって感染細胞を染色した。呈色した細胞数を数えコントロールとの比較によってその濃度における HIV-1 の細胞への感染阻害率を求めた。抗 HIV-1 活性は HIV-1 の複製を 50%阻害する濃度 (EC₅₀)を算出し評価した。

同アッセイを用いて SC29EK の血中タンパク

に対する結合性を培養液中の FCS 濃度を変化させ検討した。また新鮮ヒト血清存在下 SC29EK を 37°C で二時間インキュベーションした後、MAGI 法を行った。

NCK-β-Gal/SEAP 細胞を用いた抗 HIV 効果の測定は上記の HeLa-CD4/CCR5/LTR-β-galactosidase 細胞で用いた X-Gal を用いて測定した。また上清中に放出される分泌型アルカリホスファターゼ活性は培養上清を 56°C で 1 時間処理した後、SEAP 測定キットを用いて行った。

Circular Dichroism スペクトルの測定

SC29EK と N-HR 由来のペプチド N36 との結合親和性は circular dichroism (CD) により検討した。CD スペクトルはペプチド(等モルの C 末端側ヘリックスと N 末端側ヘリックス)を PBS に溶かし、分光計で測定した。PBS のみのモル楕円率の波長[θ]を基準として、各複合体の[θ]は 25°C において測定した。結合したペプチドの熱安定性は 222 nm における CD スペクトルの変化を見ることで評価した。0.5°C 刻みに測定し、熱変性過程の中間を融解温度 T_m として求めた。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

C. 研究結果

NCK-β-Gal/SEAP 細胞におけるβ-Gal 活性と SEAP 活性の比較

まず NCK-β-Gal/SEAP 細胞においてβ-Gal 活性と SEAP 活性が相関するかを検討した。Figure 1 に示したように両活性値はともに感染価とよく相関していた(相関係数 0.928)

さらに吸着阻害剤である DS5000、T-140、TAK-779、逆転写酵素阻害剤である AZT、ddC の抗 HIV 活性を HeLa-CD4/CCR5/LTR-β-galactosidase 細胞を用いた MAGI 法と比較した。ウイルスには CXCR4 をコレセプターとする HIV-1_{IIIb} と CCR5 をコレセプターとする HIV-1_{BaL} を用いた。CXCR4 アンタゴニストである T-140 は HIV-1_{BaL} に、CCR5 アンタゴニストである Tak-779 は HIV-1_{BaL} に効果を示さないが、その傾向も MAGI 法と NCK-β-Gal/SEAP 細胞では同等であった。しかし、NCK-β-Gal/SEAP 細胞では AZT の活性値の絶対値は約 10 倍感度が高く、逆に TAK-779 の感受性は約 10 倍低かった。この理由として AZT に関しては細胞内リン酸化酵素活性の違いや細胞膜の透過性の違いが考えられ、また TAK-779 では細胞表面上の CCR5 の発現量が高いことが考えられる。しかし、その程

度は 10 倍以下であった。また、β-galactosidase と SEAP 活性は抗 HIV 活性測定時によく相関していた (Table 1)。

臨床検体の複製

この細胞が臨床分離株の複製を支持するかどうかを検討した。5つの dual tropic および 1 つの CCR5 tropic HIV-1 を NCK-β-Gal/SEAP 細胞に感染させたところすべてのウイルスが NCK-β-Gal/SEAP 細胞に感染し、抗ウイルス活性を測定することが可能であった。臨床分離株においてもβ-galactosidase と SEAP 活性はよく相関していた (Table 2)。

融合阻害ペプチドの抗 HIV-1 活性

NL4-3 株では gp41 の 36 番目のアミノ酸はアスパラギン酸(D)だが、ほとんどの HIV-1 株ではこのアミノ酸がグリシン(G)である。D を有するウイルスは複製能が低下することが報告されていることから site-directed mutagenesis 法を用いて pNL4-3 の 36 番目のアミノ酸を G へ戻し、これに種々の耐性変異を導入したものを抗 HIV-1 活性の評価に用いた。このウイルスを用いることにより、これまで十分なウイルス力価が得られなかったウイルスにおいても比較的安定に十分な力価を得ることが可能となった。この NL4-3-D36G を HIV-1_{WT} として T-20 耐性株に対しての SC29EK の活性を調べた。臨床で T-20 耐性変異として報告されている変異 V38A、N43D、N43D/S138A を HIV-1_{WT} に導入した。

C34 から 5 アミノ酸小分子化した C29 の抗 HIV-1 活性は C34 と比較して減弱しており、T-20 耐性 HIV-1 に対しても効果を示さなかった (Table 3)。一方 SC29EK は HIV-1_{WT} や T-20 耐性 HIV-1 に対して SC34EK と同等の抗 HIV-1 活性を示した。さらに 7 残基小分子化した SC22EK の活性は HIV-1_{WT} に対して T-20 より弱く、さらに T-20 耐性 HIV-1 に対して活性を示さなかった。EK 置換を行っていない C22 は HIV-1_{WT} に対しても活性がなかった。

N36 との結合親和性

SC29EK が強い抗 HIV-1 活性を示すメカニズムを明らかにするため、我々は N36/SC29EK 複合体の CD 解析を行った。N36/SC29EK の CD スペクトルは N36/C34 や N36/SC35EK と同様に [θ]₂₂₂ 付近において極小値をとるα-ヘリックス構造に特徴的なスペクトルを示していた (Figure 3)。また N36/C22 複合体ではほとんどα-ヘリックス構造をとっていないと考えられた。T-20 耐性変異の入った N36 と SC29EK との複合体 (N36_{V38A}/SC29EK、N36_{N43D}/SC29EK) の CD スペクトルは、N36/SC29EK のスペクトルと同じで

あることから SC29EK は変異の入った N36 に対しても結合力を維持していると考えられた。一方、C29 では V38A 変異に対して α -ヘリックス性の減弱が見られ、N43D 変異に対しては α -ヘリックス構造をとっていないことから、変異により結合力が低下していると考えられた。

[θ]₂₂₂ の変化を利用し、N36/SC29EK の結合力を熱安定性によって評価した。N36/SC29EK の融解温度 T_m は N36/C29 の T_m より高く、 α -ヘリックス性を向上させることにより六量体の熱安定性が増強したと考えられた。ウイルス感染において生理的温度である 37°C において SC29EK は N36 と安定な結合性を示した。これらの結果から α -ヘリックス性の増強が抗 HIV-1 活性に関与すると考えられた。

血清タンパクの影響

SC29EK が高濃度の FCS 存在下やヒト血清存在下でその抗 HIV 活性を維持できるかを検討した。培養液中の FCS の濃度を 5、10、20、50% に調整して HIV-1_{WT} に対する EC₅₀ を MAGI 法により決定した。コントロールとして用いた逆転写酵素阻害剤 ddC の抗 HIV-1 活性は FCS 濃度依存的に減少した (Figure 4A)。同様に、T-20 においても弱い FCS 濃度依存的な活性の減少傾向が認められた。SC29EK、SC34EK は FCS の濃度に関わらず高い活性を維持していた。

次に二人の HIV 抗体陰性の健常者から血清を採取しヒト血清の影響を検討した。その結果、T-20 と SC29EK は PBS、FCS、ヒト血清処理を行っても活性に変化は見られなかった (Figure 4B)。これらのことから SC29EK は T-20 と同様に *in vivo* で強い抗 HIV-1 活性を安定的に発揮すると考えられた。

D. 考察

本年度確立したスクリーニングに用いた NP2 細胞は HIV 感染に必要とされる 7 回膜貫通型のレセプターを発現していないとされるため、目的とするレセプターの cDNA を遺伝子導入することでそのレセプターに対するアンタゴニズムを正確に検討できるというメリットをもつ。本年度は HIV 感染に中心的な役割を果たす CXCR4 と CCR5 を導入し、システムを確立させた。今後必要に応じて CCR3 等を導入した細胞の確立も行っていきたいと考えている。検出方法もこれまでの MAGI 法は X-Gal による染色・計測しかなかったが、今年度作製した NCK- β -Gal/SEAP 細胞では、MAGI 法と同様に X-Gal による染色だけでなく、SEAP 活性によってもその効果を検討可能である。また時間がかかるものの MTT 色素

法によるオートメーション化も可能であることがわかっている。来年度以降この有用な方法を本研究で見出した薬剤の測定や作用機序の解明に利用する予定である。

Enfuvirtide (T-20) は gp41 の六量体の形成を阻害することで膜融合を抑制すると考えられており、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に耐性を持つ HIV-1 の複製も強く抑制する。しかしながら、gp41 の 38 番目のアミノ酸がバリンからアラニンに変異した V38A 変異や 43 番目のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に変異した N43D 変異が導入された T-20 耐性ウイルスが出現しており、T-20 の効果を減弱させている (Table 3)。したがって T-20 耐性ウイルスの複製を抑制できる新規の融合阻害剤が望まれている。一方で C-HR 由来のペプチドの一つである C34 は *in vitro* において T-20 より効果的にウイルスの融合を阻害することが知られており、我々は C34 をアミノ酸置換することによって高親水性で高活性の誘導体を作製することに成功している。これらの誘導体は N-HR との相互作用にとって必要ではない溶媒接触面のアミノ酸残基をグルタミン酸 (E) とリジン (K) に置換させている。これらの置換は C34 のアミノ酸配列の i と $i+4$ の位置にあり (Figure 2)、それにより XEEXXKK (X は置換されていないアミノ酸) モチーフの繰返しとなっている。SC34EK は 2 個の完全な XEEXXKK モチーフと 3 個の不完全な XEEXXKK モチーフを持ち、元の配列である C34 と比べて抗 HIV-1 活性が増強されていた。興味深いことに、5 個の完全な XEEXXKK モチーフを持つ SC35EK の抗 HIV-1 活性は SC34EK のそれと同等であることから、我々は 5 個以下の XEEXXKK モチーフでも十分な抗 HIV-1 活性を期待できると想定した。実際、4 個のモチーフを持つ SC29EK は活性を示したが、3 個になるとその活性は急激に低下した。

SC29EK が SC34EK と同様に T-20 耐性 HIV-1 の融合を阻害することから、少なくとも 4 個の XEEXXKK モチーフが T-20 耐性ウイルスの融合を阻害するために必要であることが明らかとなった。六量体の構造解析によると、T-20 耐性変異が導入される部位は SC29EK が N-HR と結合する部位には含まれておらず、そのため SC29EK は T-20 耐性 HIV-1 の N-HR と効率よく結合でき、抗ウイルス効果を発揮するものと考えられた。

N36/SC29EK 複合体の T_m 値は N36/C29 複合体のそれより高い値を示したことから、EK 置換は α -ヘリックス性を増強させることにより六量

体の安定性を高めたと考えられた。EK の導入による安定した α -ヘリックス構造はペプチド内での塩橋形成によるものだと考えられていたが、近年EKによる静電的な相互作用が α -ヘリックス性を強めていることがわかり、このことからSC29EKの安定した α -ヘリックス構造もSC34EKと同様の仕組みによるものであると考えられた。従って、 α -ヘリックス性の増強はペプチドの低分子量化にも役立つことが考えられる。ペプチド製剤は、その製造に高いコストがかかり低分子化が必要であるが、単純にT-20を短くしただけでは抗ウイルス活性が失われてしなう。本研究で用いたEK置換は α -ヘリックス性を増強させることにより抗ウイルス効果を増強させる事が可能であり、低分子化を可能とした。

E. 結論

本年度、HIVの細胞侵入を詳細に調べることができるアッセイ系を確立した。また、29アミノ酸からなるSC29EKがT-20耐性HIV-1の複製を抑制することを明らかにした。SC29EKは高い血清濃度においてもその高い抗HIV-1活性を維持していたことから、第二世代のペプチド誘導阻害剤の候補として期待される。

F. 健康危険情報

基礎的研究であり該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, Matsuoka M, Anderson KS, Cheng YC, Mitsuya H. Antiviral Activity against HIV-1, Intracellular Metabolism, and Effects on Human DNA Polymerases of 4'-Ethylnyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 2701-2708, 2007

Ohruji H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, Mitsuya H. 2'-Deoxy-4'-C-Ethylnyl-2-Fluoroadenosine: A Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor with Highly Potent Activity Against Wide Spectrum of HIV-1 Strains, Favorable Toxic Profiles, and Stability in Plasma. *Nucleosides*

Nucleotides and Nucleic Acids 26:1543-6, 2007

Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N and Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. *Journal of Virology* 82: 588-592, 2008

Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Watanabe Y, Ohata Y, Doi S, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M. Broad Anti-Retroviral activity and Resistance Profile of a Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor, Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *Journal of Virology* 82: 764-774, 2008

Kajiwarra K, Kodama E, Sakagami Y, Naito T, Matsuoka M. A Dual-Reporter Phenotypic Assay for Human Immunodeficiency Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 792-795, 2008

Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Watanabe K, Tanaka M, Ohno H, Izumi K, Sakagami Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Design of a Novel HIV-1 Fusion Inhibitor That Displays a Minimal Interface for Binding Affinity. *Journal of Medicinal Chemistry* 51: 388-391, 2008

Atsuko Hachiya, Eiichi Kodama, Stefan G. Sarafianos, Matthew M. Schuckmann, Yasuko Sakagami, Masao Matsuoka, Masafumi Takiguchi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka. Amino acid mutation, N348I, in the connection subdomain of HIV-1 Reverse Transcriptase Confers Multi-class Resistance to Nucleoside and Non-nucleoside Reverse

Transcriptase Inhibitors. *Journal of Virology*
(in press)

11月28-30日

2. 学会発表

Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann M, Matsuoka M, Takiguchi, Gatanaga H, and Oka S. A Novel Mutation, N348I in HIV-1 Reverse Transcriptase Induced by NRTI Treatment, Confers Nevirapine Resistance. 14th conference on retroviruses and opportunistic infections. Los Angeles, CA, Feb 25-28, 2007.

内藤武志、泉和樹、西川裕輝、児玉栄一、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：C29 水溶性誘導体 SC29EK の抗 HIV 効果：第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007 年 11 月 28-30 日

Kodama E. Retroviral integrase inhibitor, elvitegravir (JTK-303/GS9137): Mechanism of action and resistance. The Korea-Japan Basic Scientific Cooperation Program. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy. Jeju, Korea Dec. 5-7, 2007

嶋根和毅、泉和樹、児玉栄一、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 誘導体の抗 HIV 効果：第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007 年 11 月 28-30 日

志村和也、児玉栄一、阪上泰子、松崎裕児、渡辺渡、山高一修、佐藤元秀、加納光記、池田了、松岡雅雄：HIV インテグラーゼ阻害剤 Elvitegravir (JTK-303/GS-9137) の抗ウイルス活性および耐性機序の解析：第 17 回抗ウイルス療法研究会、高松、2007 年 5 月 25 日-26 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

志村和也、児玉栄一、池田了、松岡雅雄：インテグラーゼ阻害剤に対する耐性 HIV の誘導とその複製能の比較：第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007 年 11 月 28 日-30 日

泉和樹、西川裕輝、伊藤紗織、児玉栄一、志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 耐性 HIV-1 に対して有効な融合阻害薬の開発：第 17 回抗ウイルス療法研究会、香川、2007 年 5 月 25-26 日

泉和樹、児玉栄一、志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 耐性変異を利用した融合阻害薬の開発：第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007 年

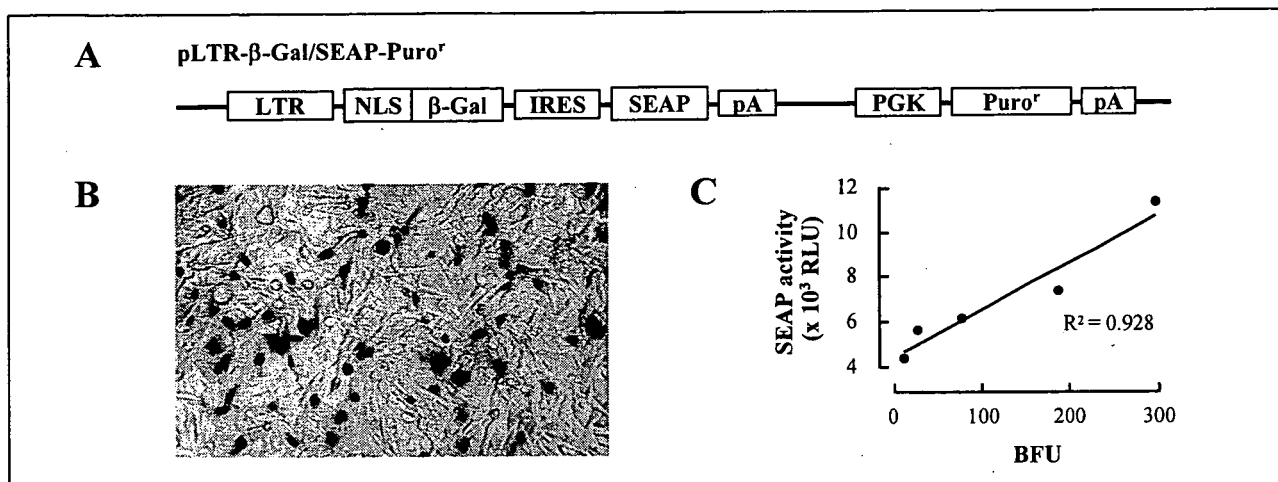


Fig. 1 Establishment of a cell line with β -galactosidase (β -Gal) and secretory alkaline phosphatase (SEAP) genes driven by a long terminal repeat (LTR). (A) Schematic diagram of the vector used in the present study, which simultaneously expresses genes for β -Gal and SEAP under the control of the HIV-1 LTR promoter (pLTR- β -Gal/SEAP-Puro⁺). The enhancer region (positions -138 to +89) of the LTR, nuclear localization signal (NLS) derived from the T-antigen of SV40, internal ribosome entry site (IRES), phosphoglycerate kinase promoter (PGK) and polyadenylation signal (pA) are also shown. (B) Microscopic image of X-gal-stained NCK45- β -Gal/SEAP cells at 48 h after virus inoculation. (C) Correlation between β -Gal and SEAP activities in culture supernatants. NCK45- β -Gal/SEAP cells were infected with HIV at various infectious doses and incubated for 48 h. Culture supernatants were examined for their SEAP activities and expressed as relative right units (RLU). BFU: blue-cell-forming units.

TABLE 1. 抗HIV 活性の比較

| Target | | EC ₅₀ (μ M) ^a | | | | | | CC ₅₀ (μ M) ^c |
|---------|-------|--|---|--------|------------------------------------|---|--------|--|
| | | HIV-1 _{IIIb} ^b | | | HIV-1 _{Ba-L} ^b | | | |
| | | MAGI | NCK45- β -Gal/SEAP β -Gal SEAP | | MAGI | NCK45- β -Gal/SEAP β -Gal SEAP | | |
| DS5000 | gp120 | 0.14 | 0.076 | 0.07 | 0.36 | 0.49 | 0.42 | >100 |
| AZT | RT | 0.031 | 0.0043 | 0.0035 | 0.05 | 0.0035 | 0.0094 | >100 |
| ddC | RT | 0.4 | 0.53 | 0.42 | 0.48 | 0.72 | 0.67 | >100 |
| T-140 | CXCR4 | 0.006 | 0.006 | 0.0025 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| TAK-779 | CCR5 | >100 | >100 | >100 | 0.003 | 0.035 | 0.027 | >100 |

^aEC₅₀: 50% effective concentration.

Data represent mean values of at least three independent experiments (mean value \pm standard deviation).

^bHIV-1_{IIIb} and HIV-1_{Ba-L} utilize CXCR4 (X4) and CCR5 (R5) as a co-receptor, respectively.

^cCC₅₀: 50% cytotoxic concentration. CC₅₀ was determined by MTT method.

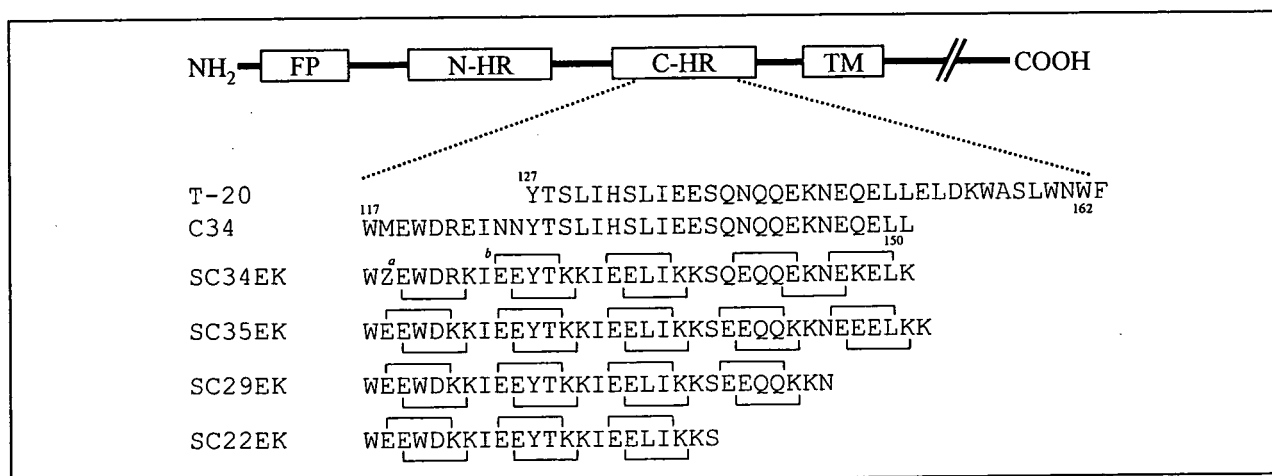


FIG. 2. Schematic diagram of HIV-1 gp41 and sequences of C-HR derived peptides. FP: fusion peptide; N-HR: N-terminal heptad repeat; C-HR: C-terminal heptad repeat; TM: transmembrane domain. ^aThe Z indicates an artificial amino acid, norleucine, instead of methionine, to avoid oxidation of the side chain of methionine. ^bPossible electrostatic interactions are indicated.

| Substitution | EC ₅₀ ^a (nM) | | | | | |
|---|--|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | T-20 | SC22EK | C29 | SC29EK | C34 | SC34EK |
| HIV-1 _{WT} ^b | 15 ± 1.3 ^c (6.3) ^d | 77 ± 14 | 245 ± 42 (4.7) | 24 ± 0.1 (1.3) | 7.3 ± 0.7 (1.1) | 3.0 ± 0.3 (1.1) |
| HIV-1 _{DB6G} | 2.4 ± 0.6 | ND ^e | 52 ± 18 | 1.9 ± 0.0 | 6.5 ± 1.8 | 2.7 ± 0.7 |
| HIV-1 _{DB6GV38A} | 23 ± 8.2 (9.6) | >1000 | 504 ± 193 (9.7) | 3.4 ± 0.9 (1.8) | 9.2 ± 2.0 (1.4) | 1.5 ± 0.3 (0.6) |
| HIV-1 _{DB6GN43D} | 49 ± 10 (20) | >1000 | >1000 (>19) | 3.0 ± 0.6 (1.6) | 9.3 ± 3.5 (1.4) | 2.2 ± 0.4 (0.8) |
| HIV-1 _{DB6GN43DSI38A} | 84 ± 16 (35) | ND | >1000 (>19) | 4.1 ± 0.6 (2.2) | 15.7 ± 5.5 (2.4) | 1.6 ± 0.4 (0.6) |
| HIV-1 _{ΔV4/DB6G137K/N126K/L204} ^f | 390 ± 155 (163) | 252 ± 71 | >1000 (>19) | 50 ± 11 (26) | 171 ± 15 (26) | 3.0 ± 0.2 (1.1) |

^a EC₅₀: 50% Effective Concentration

^b Wild type (WT) indicates HIV-1_{NL4-3}

^c Antiviral activity was determined by the MAGI assay.

^d Parenthesis indicates fold of decreased EC₅₀ value compared to EC₅₀ value in D36G.

^e Not Determined

^f ΔV4 indicates five amino acids deletion in V4 region of gp120

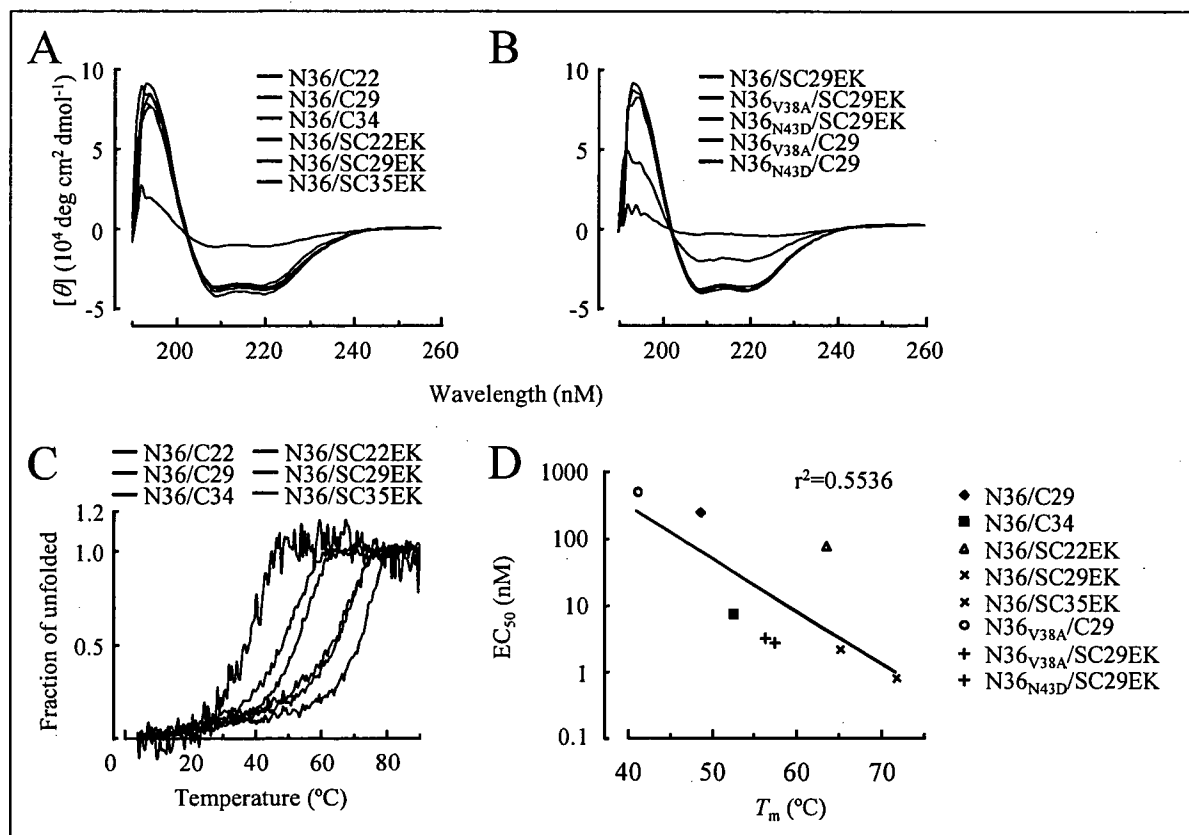


FIG. 3. Circular dichroism (CD) spectra of various N-HR derived peptides and C-HR derived peptides complexes.

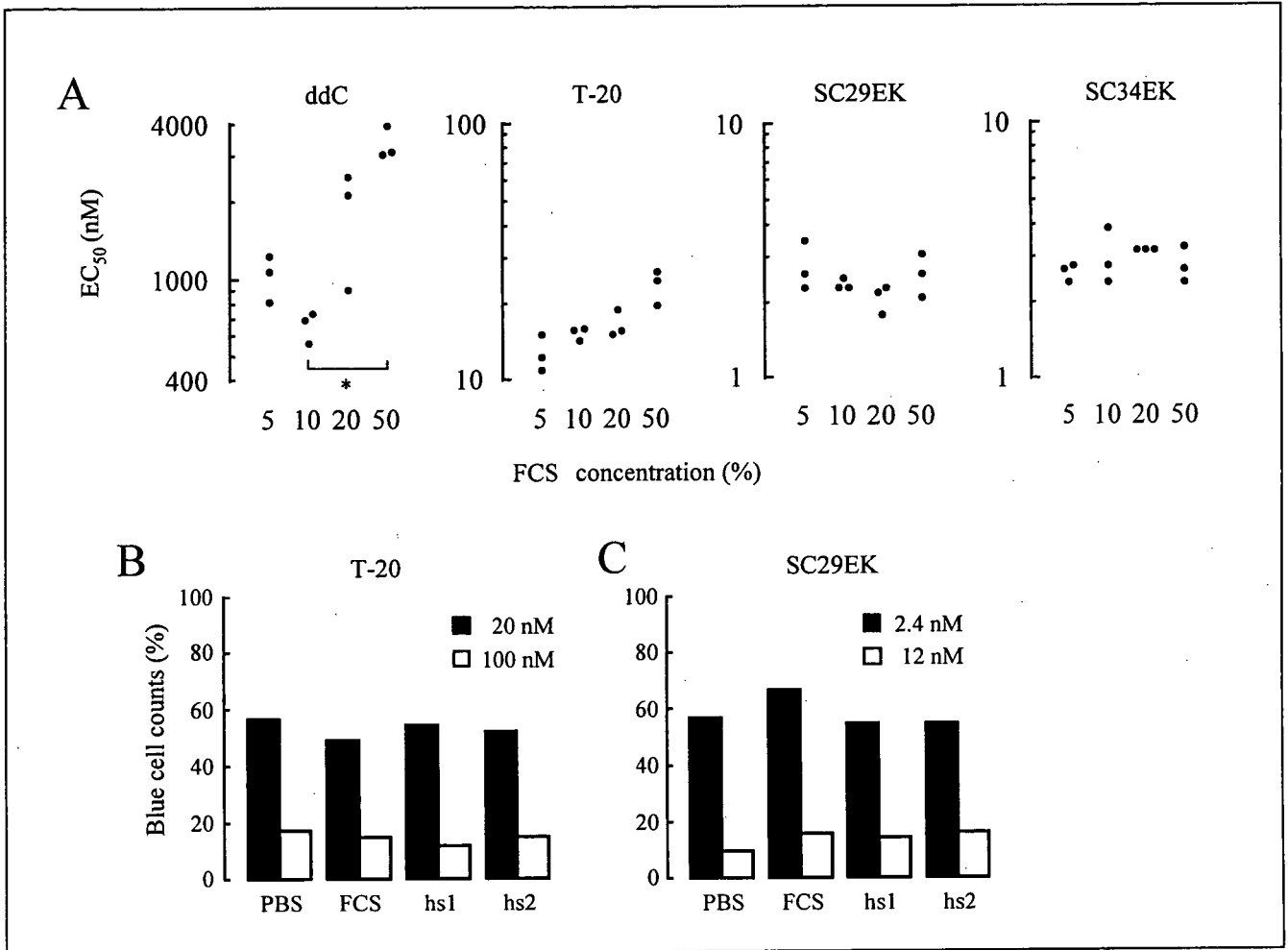


FIG. 4. Effect of serum components on antiviral activity. Antiviral activities in various serum concentrations, 5, 10, 20 and 50%, were determined by the MAGI assay. (A) Black dots indicate EC₅₀ (nM) values of each determinations that were carried out three times independently (*p=0.01 by student's *t* test). Antiviral activities of T-20 (B) and SC29EK (C) in human HIV-seronegative sera were assessed by counting the number of blue cells of HeLa-CD4/CCR5/LTR- β -galactosidase. Bars indicate percentage of the number of blue cells in PBS, FCS and human sera against that of control which added only virus not antiviral agents to cells.

HIV 吸着・膜融合過程を標的とする多剤耐性克服型 HIV 化学療法剤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
大石 真也

研究要旨 T-20 耐性株由来 gp41 N36/N43D-C34 複合体の X 線結晶構造解析を行い、耐性獲得のメカニズムと強力な活性を示す新規膜融合阻害剤のデザインへの指針を与える 6-helical bundle の相互作用様式を解明した。また、非ペプチド性膜融合阻害剤の創製を目指した構造最適化研究のための、カルバゾール骨格およびイソキノリン骨格の新規効率的な多品目合成法を確立した。

分担研究項目 1：ペプチド性膜融合阻害剤の開発のための構造最適化研究

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 α -helix 構造をとる N-および C-領域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。C-領域部分ペプチドである C34 は、gp41 の N-領域と安定な 6-helical bundle 構造を形成することで HIV 感染を阻害すると考えられている。一方、Fuzeon (T-20) は、C34 と同様のメカニズムによって膜融合過程を阻害すると考えられている C-領域部分ペプチドであり、臨床応用されている唯一の膜融合阻害剤であるものの、詳細な作用機序については明確な知見が得られていない。近年、T-20 耐性ウイルスが出現し、薬剤耐性株に効果を示す新規阻害剤が求められていることから、本研究では、T-20 耐性獲得のメカニズムを X 線構造解析により解明し、構造最適化の指針を得ることを目指した。

B. 研究方法

gp41 における N-領域の Asn43 が Asp にアミノ酸変異すると、T-20 耐性を獲得することが報告されている。そこで、これらのアミノ酸変異を導入した 6-helical bundle 構造の N-領域/C-領域相互作用様式を、X 線構造解析により明らかにし、T-20 耐性獲得のメカニズムを調査した。

現在、T-20 は臨床応用されているにも関わらず、N-領域部分ペプチドとの複合体（6-helical bundle 構造）の結晶構造を決定した報告例はなく、この複合体の結晶化は非常に困難であると推察される。これまでに N-領域部分ペプチドの N36 と C-領域部分ペプチドの C34 との 6-helical bundle 構造が X 線構造解析されており、Fig. 1 に示すように、これらのペプチドは T-20 耐性獲得に関与するアミノ酸変異部位を有している。そこで、研究グループでは N36/N43D および C34 の複合体（6-helical bundle 構造）の X 線構造解析を行った。

（倫理面への配慮）

該当事項なし

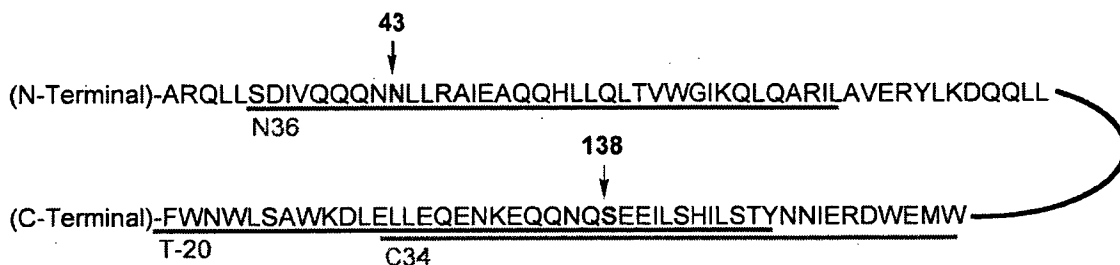


Fig. 1 Amino-acid sequence of gp41

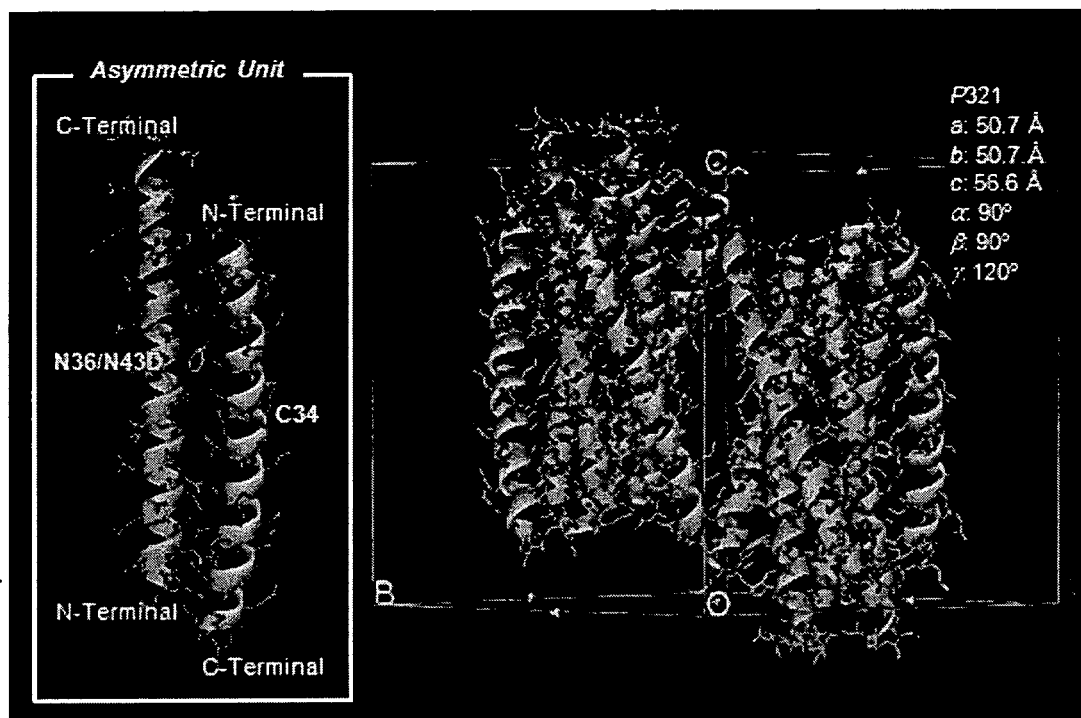


Fig. 2 Crystal structure of N36/N43D-C34 complex

C. 研究結果

HIV-1 野生株および T-20 耐性株における gp41 の N-領域部分ペプチド (N36/N43D) と C-領域部分ペプチド (C34) を Fmoc 固相合成法により調製し、等量の各ペプチド混合条件下、共結晶化実験を行った。その結果、N36/N43D と C34 との複合体の結晶を得ることに成功した。得られた結晶について X 線構造解析を行ったところ、Fig. 2 に示すように N36/N43D と C34 が 3:3 の比で結晶構造を構成しており、互いのペプチドが逆平行型に相互作用していた。そして、空間群 *P321* の対称性により、結晶格子内に 6-helical bundle 構造が二組存在していた。T-20 耐性変異部位に着目すると、Asp43 は、Arg46 と塩橋を形成し、Glu137 とは水分子を介した水素結合により連結していた (Fig. 3)。

D. 考察

これまでに構造解析された HIV-1 野生株における 6-helical bundle 構造 (N36-C34) 中では、N-領域にある Arg46 と C-領域にある Glu137 が塩橋を形成しており、さらに N-領域にある Asn43 が Arg46 と水素結合している (Fig. 4)。Asn43 は Glu137 と近接しているため、Asn43 の Asp への変異は N-領域と C-領域との間に静電反発を生じさ

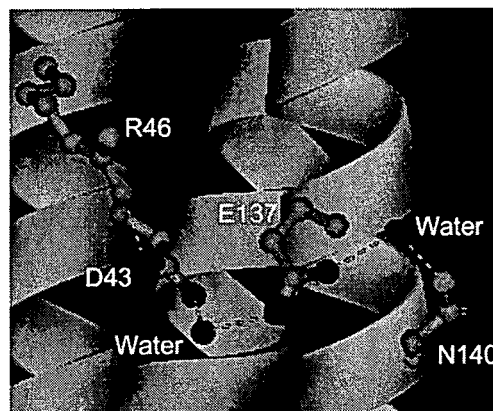


Fig. 3 Highlight view around Asp43 in the crystal structure of N36/N43D-C34

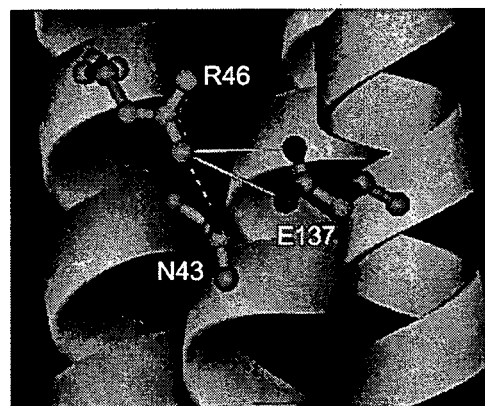


Fig. 4 Highlight view around Asn43 in the crystal structure of N36-C34

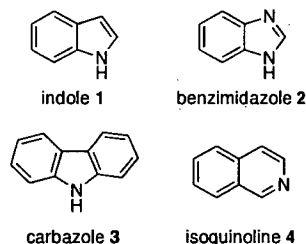
せ、6-helical bundle 構造形成を阻害すると推察される。構造解析の結果、Fig. 3 が示すように、Glu137 の側鎖が構造変化を起こし、水分子を介した水素結合により Asp43 と結合していたが、静電反発は遠距離まで働く相互作用であることから、N-領域と C-領域との親和性は弱まっていることが示唆された。すなわち、N-領域にある Asn43 の Asp への変異は、T-20 と N-領域との複合体 (6-helical bundle 構造) 形成を阻害し、T-20 耐性を獲得すると考えられる。また、C-領域部分ペプチドの 137 位の構造最適化により、T-20 耐性株に対する阻害活性を回復する新規膜融合阻害剤創製の可能性が示唆された。

E. 結論

T-20 耐性変異を有する N-領域部分ペプチドである N36/N43D と C-領域部分ペプチドである C34 との共結晶を作成し、X 線構造解析により構造決定した。この構造情報から、Asn43 が Asp にアミノ酸変異した際の T-20 耐性獲得メカニズムが原子レベルで明らかになった。

分担研究項目 2 : 低分子膜融合阻害剤の開発研究

A. 研究目的



研究グループでは、昨年度の研究において松岡・児玉グループとの共同研究により、インドール 1 もしくはベンズイミダゾール 2 骨格を有する化合物のスクリーニングを実施し、中程度の抗 HIV 活性を示すインドール誘導体を見出した。これらの関連誘導体の合成展開に向けて、インドール 1 と類似の分子骨格を有する複素環であるカルバゾール 3 およびイソキノリン誘導体 4 の効率的な多品目合成法の確立を行った。

B. 研究方法

パラジウム触媒を用いた C-H 活性化は、通常不活性な C-H 結合を直接活性化するこ

とができるため、原子効率の高い有効な手段として近年盛んに研究が行われている。また、2 価パラジウムによる酸化的ビアリールカップリングは二つの C-H 結合を活性化し、新たに C-C 結合を形成することができる極めて優れた反応である。そこで、パラジウム触媒による N-アリール化と C-H 活性化を連続的に行うことにより、カルバゾール骨格を効率よく構築できるものと考え、本研究に着手した。

一方、研究グループでは、前年度の研究により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触媒量の CuBr 存在下で反応させると、2-(アミノメチル)インドール誘導体を得られることを明らかにした。本法をイソキノリン骨格合成へと展開し、2-エチニルベンズアルデヒドからイミン誘導体を経てイソキノリン骨格を合成する条件について、詳細に検討を行った。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

酸化的ビアリールカップリングでは、化学量論量のパラジウムが必要になるが、適当な酸化剤を加えることにより触媒回転が可能になることが知られている。まず、酸化的ビアリールカップリングを触媒的に行うために触媒量、酸化剤、溶媒の検討を行った。ジフェニルアミンの反応における各種条件を検討したところ、酢酸中、酸化剤として酸素、触媒量 10 mol% 用いた場合に最も高い収率でカルバゾールが得られた。

つづいて、アニリンとフェニルトリフラートをを用いたカルバゾールの一挙合成を検討した (Table 1)。Buchwald-Hartwig クロスカップリング条件下、N-アリール化を行った後に、酢酸を加え酸素雰囲気下において C-H 活性化を行ったところ、目的のカルバゾールが 69% の収率で得られた (entry 1)。

3 位に電子供与性基としてメチル基を有するトリフラートは 4 位のものより高い収率を与えた (entries 3, 4)。また、3 位にメチル基を有するトリフラートをを用いた場合、立体障害を避けるように環化が進行した 2-メチルカルバゾールのみを選択的に与えた (entry 4)。4 位に電子吸引性基としてエステル基やトリフルオロメチル基を有するトリフラートやアニリンでは共に中程度の収

Table 1. Reactions of aryl triflates with substituted anilines.^a

| Entry | Triflate (R) | Aniline (R') | Temp. (°C) | t (h) | Yield 7 (%) ^b |
|-------|----------------------|----------------------|------------|-------|--------------------------|
| 1 | H | H | 100 | 10 | 69 |
| 2 | H | H | 100 | 18 | 67 ^c |
| 3 | 4-Me | H | 100 | 8 | 46 |
| 4 | 3-Me | H | 100 | 7.5 | 62 |
| 5 | 4-CO ₂ Me | H | 120 | 30 | 64 ^d |
| 6 | H | 4-CF ₃ | 100 | 6 | 72 ^e |
| 7 | 2-Me | 4-CO ₂ Me | 120 | 24 | 56 |
| 8 | 3-Me | 4-CO ₂ Me | 100 | 11 | >99 |
| 9 | 4-Me | 4-CO ₂ Me | 80 | 24 | 78 |

^a Reaction conditions: aryl triflate **5** (1.0 equiv), aniline **6** (1.1 equiv), Pd(OAc)₂ (10 mol%), ligand (15 mol%), Cs₂CO₃ (1.2 equiv), toluene, 100 °C, then O₂ (1 atm), AcOH. ^b Yields of isolated products. ^c Air was used in place of O₂. ^d Diphenyl amine was obtained in 28% yield. ^e Diphenyl amine was obtained in 23% yield.

率で目的物を与えた (entries 5, 6)。2、3 または 4 位にメチル基を有するトリフラートと 4 位にエステル基を有するアニリンとの反応では (entries 7–9)、3 位にメチル基を有するトリフラートが最も高い収率を与えた (entry 8)。一方で、2 位にメチル基を導入すると反応部位が一箇所限定されるため、反応性が著しく低下した (entry 7)。いずれの場合においても *N*-アリアル化の過程はほぼ定量的に進行し、C-H 活性化の過程における置換基効果が収率に大きな影響を与えることが明らかとなった。

イソキノリン骨格の合成では、ヨウ化銅触媒存在下、2-エチルベンズアルデヒド **8**、パラホルムアルデヒド **9**、及び二級アミン **10** の三成分反応終了後に *t*-BuNH₂ を加えて加熱することで、四成分反応連結反応により目的のイソキノリン誘導体 **11** が効率よく得られた (Table 2)。二級アミン **10** として、ジイソプロピルアミン **10a**、ジアリルアミン **10b** のような鎖状二級アミンの他、ピペリジン **10b** のような環状アミンも本反応に適用可能であり、また、ベンズアルデヒド上の置換基として、フッ素、メトキシ基等が選択可能である。

D. 考察

カルバゾール骨格は縮環型のインドール誘導体として、イソキノリン骨格はインドール類縁体として、それぞれ低分子膜融合阻害剤への応用が期待される含窒素複素環である。今回研究グループが開発したカルバゾール骨格構築法では、2つの安価なコンポーネントをもとに多様なカルバゾール

Table 2. Synthesis of isoquinolines.

| Entry | Substrate | R ¹ | R ² | R ₂ NH (10) | Product (yield) |
|-------|-----------|----------------|----------------|--|-----------------|
| 1 | 8a | H | H | (<i>i</i> -Pr) ₂ NH (10a) | 11a (83) |
| 2 | 8a | H | H | piperidine (10b) | 11b (88) |
| 3 | 8a | H | H | (allyl) ₂ NH (10c) | 11c (60) |
| 4 | 8b | F | H | (<i>i</i> -Pr) ₂ NH (10a) | 11d (83) |
| 5 | 8c | H | OMe | (<i>i</i> -Pr) ₂ NH (10a) | 11e (84) |

ル誘導体を 1 反応で化学合成可能であることから、迅速な構造活性相関研究への対応が可能である。一方、4 成分をもとにイソキノリン環を一挙に構築する方法では、R¹, R², R 部位を自由に選択可能であり、多様な化合物のライブラリーが構築可能である。これらにより、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、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、*N*-アリアル化-C-H 活性化からなるワンポット反応を行うことにより、様々な置換基を有するカルバゾール誘導体の効率的合成法の開発に成功した。また、2-エチルベンズアルデヒド、ホルムアルデヒド、二級アミン、*t*-BuNH₂ の銅触媒による四成分環化反応により様々な官能基を有する新規イソキノリン骨格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. 論文発表

1. Sasaki Y., Fujii N., Otaka A. Development of copper-mediated allylation of γ -activated- α,β -unsaturated lactam toward peptide mimetic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48(18), 3221-3224.
2. Watanabe T., Ueda S., Inuki S., Oishi S., Fujii N., Ohno H. One-pot synthesis of carbazoles by palladium-catalyzed N-arylation and oxidative coupling. *Chem. Commun.* **2007**, 43, 4516-4518.
3. Watanabe T., Oishi S., Fujii N., Ohno H. Gold-catalyzed hydroarylation of allenes: a highly regioselective carbon-carbon bond formation producing six-membered rings. *Org. Lett.* **2007**, 9(23), 4821-4824.
4. Ohno H., Iuchi M., Fujii N., Tanaka T. Zipper-mode double C-H activation: palladium-catalyzed direct construction of highly-fused heterocyclic systems. *Org. Lett.* **2007**, 9(23), 4813-4815.
5. Tamamura H., Tanaka T., Tsutsumi H., Nemoto K., Mizokami S., Ohashi N., Oishi S., Fujii N. Versatile use of acid-catalyzed ring-opening of β -aziridinyl- α,β enoates to stereoselective synthesis of peptidomimetics. *Tetrahedron*, **2007**, 63(37), 9243-9254.
6. Narumi T., Tomita K., Inokuchi E., Kobayashi K., Oishi S., Ohno H., Fujii N. Facile synthesis of fluoroalkenes by palladium-catalyzed reductive defluorination of allylic gem-difluorides. *Org. Lett.* **2007**, 9(17), 3465-3468.
7. Ohno H., Aso A., Kadoh Y., Fujii N., Tanaka T. Heck-type cyclization of oxime ethers: stereoselective carbon-carbon bond formation with aryl halides to produce heterocyclic oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46(33), 6325-6328.
8. Kubonishi S., Kikuchi T., Yamaguchi S., Tamamura H., Fujii N., Watanabe T., Arenzana-Seisdedos F., Ikeda K., Matsui T., Tanimoto M., Katayama Y. Rapid hematopoietic progenitor mobilization by sulfated colominic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 355(4), 970-975.
9. Cluzeau J., Oishi S., Ohno H., Wang Z., Evans B., Peiper S.C., Fujii N. Design and synthesis of all diastereomers of cyclic pseudo-dipeptides as mimics of cyclic CXCR4 pentapeptide antagonists. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5(12), 1915-1923.
10. Ohno H., Mizutani T., Kadoh Y., Aso A., Miyamura K., Fujii N., Tanaka T. A highly regio- and stereoselective formation of bicyclo[4.2.0]oct-5-ene derivatives through thermal intramolecular [2 + 2] cycloaddition of allenes. *J. Org. Chem.* **2007**, 72(12), 4378-4389.
11. Ohno H., Ohta Y., Oishi S., Fujii N. Direct synthesis of 2-(aminomethyl) indoles through copper(I)-catalyzed domino three-component coupling and cyclization reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46(13), 2295-2298.
12. Hamaguchi H., Kosaka S., Ohno H., Fujii N., Tanaka T. Bromoallenes as allyl dication equivalents in the presence or absence of palladium(0): direct construction of bicyclic sulfamides containing five- to eight-membered rings by tandem cyclization of bromoallenes. *Chem-Eur. J.* **2007**, 13(6), 1692-1708.
13. Tsutsumi H., Tamamura H., Fujii N. Inhibitors of the chemokine receptor CXCR4: chemotherapy of AIDS, metastatic cancer, leukemia and rheumatoid arthritis. *Lett. Drug Design Discov.* **2007**, 4(1), 20-26.
14. 大石真也、藤井信孝 ペプチドをリードとした創薬。蛋白質 核酸 酵素 増刊ケミカルバイオロジー、長野哲雄・長田裕之・菊地和也・上杉志成編集, **2007**, 52, 1696-1701.
15. 大石真也、藤井信孝 ケミカルバイオロジーを基盤とするペプチド創薬。遺伝子医学 MOOK8 ペプチドと創薬, 寒川賢治・南野直人編集, **2007**, 87-91.
16. Ujike M., Nishikawa H., Otaka A., Yamamoto N., Yamamoto N., Matsuoka M., Kodama E., Fujii N., Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block protease-mediated direct entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus but not entry via the endosomal pathway pathway. *J. Virol.* **2008**, 82(1), 588-592.
17. Oishi S., Ito S., Nishikawa H., Watanabe K., Tanaka M., Ohno H., Izumi K., Sakagami Y., Kodama E., Matsuoka M., Fujii N., Design of a novel HIV-1 fusion inhibitor that displays a minimal interface for binding affinity. *J. Med. Chem.* **2008**, 51(3), 388-391.
18. Oishi S., Masuda R., Evans B., Ueda S., Goto Y., Ohno H., Hirasawa A., Tsujimoto G., Wang Z., Peiper S.C., Naito

- T., Kodama E., Matsuoka M., Fujii N. Synthesis and application of fluorescein- and botin-labeled molecular probes for chemokine receptor CXCR4. *ChemBioChem*. 2008, in press.
19. Ohta Y., Oishi S., Fujii N., Ohno H. Facile synthesis of 3-(aminomethyl) isoquinolines by copper-catalysed domino four-component coupling and cyclisation. *Chem. Commun.* 2008, 7, 835-837.
 20. Ohno H., Okano A., Kosaka S., Tsukamoto K., Ohata M., Ishihara K., Maeda H., Tanaka T., Fujii N. Direct construction of bicyclic heterocycles by palladium-catalyzed domino cyclization of propargyl bromides. *Org. Lett.* in press.
- ## 2. 学会発表
1. ○富田健嗣、鳴海哲夫、新居田歩、大石真也、大野浩章、藤井信孝 シスアミド等価体としての(Z)-アルケンおよび(E)-フルオロアルケンジペプチドイソスターの合成とその応用 日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会(京都) H19年5月9日
 2. ○田中理紀、伊藤紗織、大石真也、西川裕樹、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、大野浩章、藤井信孝 EK-コンセプトを利用した高活性HIV膜融合阻害剤の創製研究 日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会(京都) H19年5月9日
 3. ○西川裕樹、小寺泰代、田中理紀、水越文徳、辻本元、児玉栄一、松岡雅雄、大石真也、大野浩章、藤井信孝 ネコ免疫不全ウイルス(FIV)膜融合阻害剤の創製研究 日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会(京都) H19年5月10日
 4. ○渡部敏明、上田 聡、大石真也、藤井信孝、大野浩章 Pd 触媒を用いたタンデム型 N-アリール化-C-H 活性化によるカルバゾールの合成と反応機構の考察 第5回次世代を担う有機化学シンポジウム(東京) H19年5月26日
 5. ○Toshiaki Watanabe, Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Hiroaki Ohno, Synthesis and application of carbazoles by palladium-catalyzed tandem N-arylation and oxidative C-H activation Eighth Tetrahedron Symposium (Berlin) H19年6月28日
 6. ○Tomita K., Narumi T., Niida A., Oishi S., Ohno H., Fujii N. Synthesis and Application of (Z)-Alkene- and (E)-Fluoroalkene-Dipeptide Isosteres as cis-Amide Equivalents. 20th American Peptide Symposium (Montreal) H19年6月29日
 7. ○Oishi S., Ito S., Nishikawa H., Tanaka M., Ohno H., Otaka A., Izumi K., Kodama E., Matsuoka M., Fujii N. Development of a novel fusion inhibitor against T-20-resistant HIV-1. 20th American Peptide Symposium (Montreal) H19年6月29日
 8. Toshiaki Watanabe, ○Shinsuke Inuki, Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii, One-pot Synthesis of carbazoles by palladium-catalyzed N-arylation and oxidative coupling. 6th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (Istanbul) H19年7月11日
 9. ○Yusuke Ohta, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, and Hiroaki Ohno, Construction of 2-(Aminomethyl)indole Motif by Cu-catalyzed Multi-component Reaction. 14th IUPAC Symposium on Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis (Nara) H19年8月3日
 10. ○Toshiaki Watanabe, Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Hiroaki Ohno, Synthesis and application of carbazoles by palladium-catalyzed tandem N-arylation and oxidative C-H activation. 14th IUPAC Symposium on Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis (Nara) H19年8月3日
 11. ○Eriko Inokuchi, Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Ayumu Niida, Kazuya Kobayashi, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii, Pd-Catalyzed Carbonylation of CF₃-containing Allylic Carbonate: Application to the Synthesis of (Z)-Trifluoromethylalkene Dipeptide Isosteres. 14th IUPAC Symposium on Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis (Nara) H19年8月3日

12. ○Tetsuo Narumi, Yasuyo Kodera, Kenji Tomita, Eriko Inokuchi, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii, Diastereoselective Synthesis of Functionalized (Z)-Fluoroalkene Dipeptide Isosteres: Lys-Lys and Glu-Glu type FADIs. 234th ACS meeting & exposition (Boston) H19年8月20日
13. ○Y. Ohta, S. Oishi, N. Fujii, H. Ohno, Construction of 2-(Aminomethyl)indole Motif by Cu-catalyzed Multi-component Reaction. 234th ACS meeting & exposition (Boston) H19年8月22日
14. ○Nobutaka Fujii, Shinya Oishi, Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Hiroaki Ohno Nobutaka Fujii From Amino Acids to Peptide Isosteres: Implication to genome-lead drug discovery using peptide-lead drug templates World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (Beijing) H19年9月6日
15. ○Nobutaka Fujii. CXCR4-chemokine receptor: implication to problematic multifactorial diseases. ELKIN LECTURE SERIES at Emory University (Atlanta) H19年9月14日
16. ○Hiroki Nishikawa, Yasuyo Kodera, Shinya Oishi, Michinori Tanaka, Tadafumi Tochikura, Kazumi Kajiwara, Hiroaki Ohno, Fuminori Mizukoshi, Hajime Tsujimoto, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Nobutaka Fujii, Development of novel FIV membrane fusion inhibitors. Virus Molecular Interactions: Therapeutic Targets (Oxford) H19年9月17日
17. ○Shinya Oishi, Saori Ito, Hiroki Nishikawa, Michinori Tanaka, Hiroaki Ohno, Akira Otaka, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, and Nobutaka Fujii, Design and synthesis of novel HIV fusion inhibitors. Virus Molecular Interactions: Therapeutic Targets (Oxford) H19年9月17日
18. ○藤井信孝 情報から制御へ:ゲノム情報収斂型創薬科学 21COE 公開シンポジウム (京都) H19年9月20日
19. ○鳴海哲夫、富田健嗣、井ノ口恵利子、小林和也、大石真也、大野浩章、藤井信孝 有機金属による炭素-フッ素結合切断を伴うフルオロアルケン骨格の合成:多価官能基を有するフルオロアルケン型ジペプチドイソスターの高立体選択的合成への展開 第57回日本薬学会近畿支部大会 (大阪) H19年10月27日
20. ○井ノ口恵利子、鳴海哲夫、新居田歩、大石真也、大野浩章、藤井信孝 パラジウム触媒によるカルボニル化反応を用いたトリフルオロメチルアルケン型ジペプチドイソスター及び類縁体の新規合成法の開発 第57回日本薬学会近畿支部大会 (大阪) H19年10月27日
21. ○加藤学、上田聡、井貫晋輔、大石真也、大野浩章、藤井信孝 インドールを母核とした新規ケモカインレセプター CXCR4 アンタゴニストの創製研究 第57回日本薬学会近畿支部大会 (大阪) H19年10月27日
22. ○井ノ口恵利子、鳴海哲夫、新居田歩、大石真也、大野浩章、藤井信孝 パラジウム触媒カルボニル化反応を用いたトリフルオロメチルアルケンジペプチドイソスター及び類縁体の新規合成法の開発 第33回反応と合成の進歩シンポジウム (長崎) H19年11月5日
23. ○大野浩章、太田悠介、大石真也、藤井信孝、井内睦美、田中徹明 連続結合形成反応による縮環型芳香族化合物の一挙合成法の開発 第33回反応と合成の進歩シンポジウム (長崎) H19年11月6日
24. ○岡野晃典、大野浩章、藤井信孝、小坂昇平、大畑実代、石原小太郎、田中徹明、塚本効司 パラジウム触媒を用いたプロパルギルブロミドの連続的閉環反応による二環性複素環の一挙構築 第33回反応と合成の進歩シンポジウム (長崎) H19年11月7日
25. ○鳴海哲夫、富田健嗣、井ノ口恵利子、小林和也、大石真也、大野浩章、藤井信孝 ペプチド結合ミメティックスとしてのフルオロアルケン骨格の展望 第44回ペプチド討論会 (富山) H19年11月7日
26. ○渡辺健太郎、伊藤紗織、西川裕樹、田中理紀、大石真也、大野浩章、泉和樹、児玉栄一、松岡雅雄、藤井信孝 ヘリックス誘起モチーフを導入した抗