

2008300/9B

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策総合研究事業

抗エイズ薬を目指したウイルス糖鎖構造制御による  
宿主免疫の賦活化・機能化分子の開発

平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

主任研究者 袴田 航

平成21(2009)年4月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策総合研究事業

抗エイズ薬を目指したウイルス糖鎖構造制御による  
宿主免疫の賦活化・機能化分子の開発

平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

主任研究者 袴田 航

平成21（2009）年4月

# 目 次

## I. 総合研究報告

- 抗エイズ薬を目指したウイルス糖鎖構造制御による宿主免疫の  
賦活化・機能化分子の開発（総括）…………… 8  
袴田 航（日本大学 生物資源科学部 講師）

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 9

## III. 研究成果の刊行物・別刷…………… 22

1. Wataru Hakamata, Ikuo Nakanishi, Yu Masuda, Takehiko Shimizu, Hajime Higuchi, Yuriko Nakamura, Tadatake Oku, Shinichiro Saito, Shiro Urano, Toshihiko Ozawa, Nobuo Ikota, Naoki Miyata, Haruhiro Okuda, Kiyoshi Fukuhara. Planar catechin analogues with alkyl side chain, a potent antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Journal of American Chemical Society*, 128, 6524-6525 (2006).
2. Wataru Hakamata, Makoto Muroi, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, Akira Takatsuki, Hiroyuki Osada, Kiyoshi Fukuhara, Haruhiro Okuda, Masaaki Kurihara, N-Linked oligosaccharide processing enzymes as molecular targets for drug discovery. *Journal of Applied Glycoscience*, 53 149-154, (2006).
3. Wataru Hakamata, Emiko Yamamoto, Makoto Muroi, Masataka Mochizuki, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Kiyoshi Fukuhara. Design and synthesis of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor having DNA cleaving activity. *Journal of Applied Glycoscience* 53 (4), 255-260 (2006).
4. Masaaki Kurihara, Yukiko Sato, Wataru Hakamata, Haruhiro Okuda, Yosuke Demizu, Masanobu Nagano, Naomi Kawabe, Mitsunobu Doi, Masakazu Tanaka, Hiroshi Suemune. Computational study on conformation of oligopeptides containing chiral cyclic  $\alpha$ ,  $\alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids. *Peptide Science*, 42, 371-372 (2006).
5. Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Atsushi

- Kittaka. Sequence-specific recognition of double-stranded DNA by cooperatives strand invasion. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50,157-158 (2006).
6. Y. Suhara, M. Kurihara, A. Kittaka, M. Ichikawa, Y. Ichikawa. Efficient Synthesis of Carbopeptoid Oligomers and their Conformational Studies. *Tetrahedron*, 62, 8207-8217 (2006).
  7. T. Fujishima, R. Tsutsumi, Y. Negishi, S. Fujii, H. Takayama, A. Kittaka, M. Kurihara, Methyl-introduced A-ring Analogues of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Synthesis and Biological Evaluation *Anticancer Res.*, 26, 2633-2636 (2006).
  8. N. Kawabe, Y. Demizu, M. Tanaka, M. Kurihara, and H. Suemune, Synthesis of Various Chiral Cyclic  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Disubstituted Amino Acids and Conformational analysis of their Peptides, *Peptide Science* 2005, 347-348 (2006).
  9. M. Nagano, Y Demizu, M. Tanaka, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune Chiral Cyclic  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acids Bearing Two Chiral Centers and Conformation of Their Peptides. *Peptide Science* 2005, 345-346 (2006).
  10. Masaaki Kurihara, Wataru Hakamata, Yukiko Sato, Haruhiro Okuda, Yousuke Demizu, Kosuke Anan, Mitsunobu Doi, Masataka Tanaka, Hhiroshi Suemune. Computational study on helical structures of oligopeptides containing chiral cyclic  $\alpha$ -amino acids. *Peptides* 2006, 546-547 (2007).
  11. Kadokura, K.; Rokutani, A.; Yamamoto, M.; Ikegami, T.; Sugita, H.; Itoi, S.; Hakamata, W.; Oku, T.; Nishio, T. Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2), 357-365 (2007).
  12. Kadokura, Kazunari; Sakamoto, Yusuke; Saito, Kaori; Ikegami, Takanori; Hirano, Takako; Hakamata, Wataru; Oku, Tadake; Nishio, Toshiyuki. Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Letters*, 29(8), 1209-1215, (2007).



13. Kadokura, Kazunari; Sakamoto, Yusuke; Saito, Kaori; Ikegami, Takanori; Hirano, Takako; Hakamata, Wataru; Oku, Tadatake; Nishio, Toshiyuki. Production and secretion of a recombinant *Vibrio parahaemolyticus* chitinase by *Escherichia coli* and its purification from the culture medium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(11), 2848-2851 (2007).
14. Satoh, Tadashi; Cowieson, Nathan P.; Hakamata, Wataru; Ideo, Hiroko; Fukushima, Keiko; Kurihara, Masaaki; Kato, Ryuichi; Yamashita, Katsuko; Wakatsuki, Soichi. Structural Basis for Recognition of High Mannose Type Glycoproteins by Mammalian Transport Lectin VIP36. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (38), 28246-28255 (2007).
15. Chida, Hiroataka; Nakazawa, Aiko; Akazaki, Hideharu; Hirano, Takako; Suruga, Kohei; Ogawa, Masahiro; Satoh, Tadashi; Kadokura, Kazunari; Yamada, Seiji; Hakamata, Wataru; Isobe, Katsunori; Ito, Tei-ichiro; Ishii, Ryuichi; Nishio, Toshiyuki; Sonoike, Kintake; Oku, Tadatake. Expression of the algal cytochrome *c6* gene in *Arabidopsis* enhances photosynthesis and growth. *Plant and Cell Physiology*, 48 (7), 948-957 (2007).
16. Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka, A.; Recognition of Longer Duplex DNA by Cooperative Strand Invasion, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 51, 269-270 (2007).
17. Masakazu Tanaka, Yosuke Demizu, Masanobu Nagano, Mariko Hama, Yukio Yoshida, Masaaki Kurihara, and Hiroshi Suemune, Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Cyclic trans-1,2-Diols Bearing a Diester Moiety: Synthetic Application to Chiral Seven-Membered-Ring  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acid, *J. Org. Chem.*, 72, 7750-7756 (2007).
18. Y. Demizu, M. Tanaka, M. Nagano, M. Kurihara, M. Doi, T. Maruyama, H. Suemune, Controlling  $3^{10}$ -Helix and  $\alpha$ -Helix of Short Peptides in the Solid State, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 840-842 (2007).
19. M. Tanaka, M. Nagano, Y. Demizu, K. Anan, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune; Side-chain chiral centers of amino acids and helical-screw handedness of their peptides; *Peptides 2006*, 268-269(2007).

20. Nagano, M., Tanaka, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Doi, M., Suemune, H, Secondary Structure of Heteropeptides Using Chiral Cyclic  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amino Acids; Controlling the Helical; *Peptides 2006*, 476-477(2007).
21. Design and Screening Strategies for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information. Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9 (1), 3-12 (2009).
22. Crystallization and structural analysis of cytochrome *c6* from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at 1.5 Å resolution. Hideharu Akazaki, Fumihiro Kawai, Masahiro Hosokawa, Toshiyuki Hama, Hirotaka Chida, Takako Hirano, B. K. Lim, N Sakurai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatake Oku, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 189-191 (2009).
23. (2S, 2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer. Wataru Hakamata, Yukiko Sato, Haruhiro Okuda, Shinobu Honzawa, Nozomi Saito, Seishi Kishimoto, Atsushi Yamashita, Takayuki Sugiura, Atsushi Kittaka, Masaaki Kurihara, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 120-123, (2008).
24. Purification, characterization, and cloning of *Vibrio parahaemolyticus* chitinolytic enzymes and application to oligosaccharide production. Kazunari Kadokura, Yusuke Sakamoto, Akiko Rokutani, Takanori Ikegami, Takako Hirano, Mahiro Yamamoto, Kaori Saito, Wataru Hakamata, Shiro Itoi, Haruo Sugita, Tadatake Oku, Toshiyuki Nishio, *Journal of Applied Glycoscience*, 55, 157-164, (2008).
25. Cloning, expression and purification of cytochrome *c6* from the brown alga *Hizikia fusiformis* and complete X-ray diffraction analysis of the structure. Hideharu Akazaki, Fumihiro Kawai, Hirotaka Chida, Yuichirou Matsumoto, Mao Hirayama, Ken Hoshikawa, Satoru Unzai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatake Oku, *Acta Crystallographica F.*, 64, 674-680, (2008).
26. Physicochemical properties of diheme cytochrome *c4* of unknown function from *Vibrio parahaemolyticus* strain RIMD2210633. Hideharu Akazaki, Yoshio Futami, Naoya Shibayama, Ikuko Shirasaki, Harumi Nakade, Hirotaka Chida, Wataru Hakamata, sam-Yong Park, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, *Bioscience Biotechnology and*

*Biochemistry*, 72, 2791-2794 (2008).

27. Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with the nonsecosteroidal vitamin D<sub>3</sub> analogue YR301. Shinji Kakuda, Kazuhisa Okada, Hiroshi Eguchi, Kazuya Takenouchi, Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Midori Takimoto-Kamimura, *Acta Crystallographica F.*, 64, 970-973, (2008).
28. Structure Basis for Recognition of High Mannose Type Glycan Transport Lectin VIP36., T. Satoh, N. P. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, K. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki., *PF NEWS*, 25, 17-22, (2008).
29. 奥 忠武, 千田浩隆, 中沢愛子, 赤崎秀治, 西尾俊幸, 袴田 航、藻類のタンパク質遺伝子導入による陸上植物の光合成増感、46 (3), 156-158, (2008).
30. The 2 $\alpha$ -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D<sub>3</sub> analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu) ; S. Honzawa, Y. Yamamoto, A. Yamashita, T. Sugiura, M. Kurihara, M. A. Arai, S. Kato, A. Kittaka; *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 3002-3024 (2008)
31. Computational Study on Secondary Structure of Oligopeptides Containing  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acids; M. Kurihara, Y. Sato, F. Kaneko, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune; *Peptide Science 2007*, 137-138, (2008).
32. Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement., T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara., *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 185-189 (2009).
33. Helical-Screw Directions of Diastereoisomeric Cyclic  $\alpha$ -Amino Acid Oligomers., Nagano, M., Tanaka, M., Doi, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Suemune, H., *Org. Lett.*, 11, 1135-1137 (2009).
34. Computational Study on Helical Structure of  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Oligopeptides Containing Chiral  $\alpha$ -Amino Acids., M. Kurihara, Y. Sato, N. Yamagata, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune., *Peptide Science 2008*, 149-150 (2009).



35. Design and synthesis of chiral cyclic  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acid having azido functions and its oligopeptides., H. Takazaki, M. Tanaka, N. Kawabe, M. Nagano, M. Doi, M. Kurihara, H. Suemune., *Peptide Science 2008*, 159-160 (2009).
36. Cooperative Strand Invasion by Peptide Nucleic Acid., Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka, A., *Peptide Science 2008*, 481-482 (2009).



抗エイズ薬を目指したウイルス糖鎖構造制御による  
宿主免疫の賦活化・機能化分子の開発

主任研究者 袴田航 日本大学・生物資源科学部・講師

研究要旨

エイズは「多剤併用療法」の進歩により、死亡率が著しく減少したことから、不治の病からコントロール可能な病へ、特別な病から、誰もが感染のリスクを有しうる一般的な病へと変化しつつある。このようなエイズの慢性感染症化は、「多剤併用療法」の広がりを意味し、それら薬剤に対する耐性株の出現速度を増大させる。また、多剤併用療法によって HIV の増殖を抑制すると、HIV 特異的免疫反応が低下することが知られている。そこで、これまでの「多剤併用療法」の治療標的だけでなく、異なる標的を有する薬剤および宿主免疫を維持する薬剤の登場が強く望まれている。本研究は、ウイルス糖鎖構造制御による宿主免疫の賦活化・機能化作用増大による抗エイズ薬を目指しており、「多剤併用療法」の維持・発展させることを目的とする。

本研究の主な研究成果は、以下の①~⑤の通りである。

- ① 医薬品や医薬品候補化合物のデータベースを用いた Drug-Like / Drugness / Drugability の解析と経験則のルール化を重要視したライブラリーを用い、エイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物の *in silico* 論理的・網羅的探索を行った。
- ② 約 100 万化合物の配座解析情報に基づいて、糖鎖構築酵素の活性部位をファーマコフォアとしてファーマコフォア検索を行った。ヒット化合物ライブラリーを基にドッキングスタディーによるパーチャルスクリーニングにより、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリーを得た。これらの構造はこれまでに報告されている阻害剤とは異なる、非常にユニークな骨格を有していた。
- ③ 得られた上記ライブラリーに対して、酵素阻害活性を行った結果、非常に強力な阻害活性（micro M オーダー）を示す化合物を 2 種類見だし、細胞レベルでの抗ウイルス活性を測定した。
- ④ 新規な糖鎖構築酵素阻害活性測定系の構築を試み、有力な基質候補化合物を見いだした。
- ⑤ 特異な培養条件で培養した放線菌ライブラリーを対象とし、HTS を用いた阻害剤の網羅的探索を行った結果、強力な阻害活性を有する代謝物と特定の特異な培養条件においてのみ阻害剤を生産する放線菌を見いだした。

分担研究者

栗原 正明  
国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学部  
室長

西尾 俊幸  
日本大学  
生物資源科学部  
准教授

## A. 研究目的

HIV-1 感染症に対する抗ウイルス薬剤の開発と治療法は急速に進歩し、ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤 (NRTI) 6 種類、非ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) 3 種類、プロテアーゼ阻害剤 (PI) 5 剤の合計 14 種類の薬剤が開発、実用化された。また、NRTI 2 剤と PI 1 剤あるいは NRTI 2 剤と NNRTI 1 剤を組み合わせた多剤併用療法の開発により、感染者体内における HIV-1 の増殖をほぼ完全に抑え込むことに成功し、病気の進行を抑制することが可能となり、エイズは慢性感染症の性格を帯びてきている。しかし、抗 HIV 薬の長期投与に伴う副作用や薬剤耐性ウイルスの出現や多剤併用療法によって HIV 特異的免疫反応が低下することが問題となっている。更に、HIV 感染者・エイズ患者報告数の増加が続いていることから、抗ウイルス薬剤研究の推進が必要である。

以上の事から、抗 HIV 薬の長期投与に伴う薬剤耐性ウイルスおよび HIV 特異的免疫反応が低下への対策として、ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤以外の抗ウイルス薬剤の開発が強く望まれている。本研究は、宿主ヒト細胞のエイズ中和抗体が、ウイルス表面の多数の糖鎖により機能しない事に着目し、糖鎖構造制御物質を新たに開発する事により、エイズ中和抗体を機能させるこれまでの抗 HIV 薬とは異なる治療標的を有する「宿主免疫の賦活化・機能化を目指す創薬研究」であり、急速に拡大している薬剤耐性エイズウイルスの効果的な対策であり、行政施策の推進に大きく貢献でき、国民の健康の安心・安全の実現のための重要な研究でありと考えられる。

## B. 研究方法

HIV エンベロープ糖タンパク質 gp120 の N-結合型糖鎖の構築は、小胞体で開始される。gp120 の N-結合型糖鎖は、始めに小胞体 N-結合型糖鎖プロセッシング酵素により糖鎖のプロセッシングが行われ、正常な糖タンパク質はゴルジ体に輸送される。よって、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素阻害またはウイルス糖タンパク質のオルガネラ間の輸送を阻害する事が出来れば、未成熟な糖鎖構造を有する gp120 が構築でき、HIV に目的とする糖鎖を提示させる事が可能となると考えた。更に、ホスト細胞のタンパク質の品質管理機構によって、未成熟糖鎖を有するウイルス粒子が感染を持たぬまま、細胞外へ排除される事も期待できる。その結果、制御された糖鎖を有する gp120 に中和抗体が結合し、抗 HIV 活性を発現する事が期待され、更に感染性の失われたウイルスが生産される可能性も併せて期待できる。

そこで、N-結合型糖鎖の構造を制御する化合物、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素阻害剤を得るために「*in silico*による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」および「微生物ライブラリーからの阻害剤のハイスクリーン・ブットスクリーニング (HTS)」の2つの異なる戦略を立案した。

「*in silico*による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」は、近年続々と明らかにされ始めている酵素の立体構造に基づき *in silico* で論理的かつ高効率に阻害剤分子の探索および設計を行う。「微生物ライブラリーからの阻害剤の HTS」は現在その活性測定系が十分ではない。N-結合型糖鎖プロセッシング酵素の活性測定には、基質調製にウイルス培養、活性検出に放射性同位体が汎用され HTS には不向きである。そこで、新たな HTS 法の開発を行う。HTS を用いた阻害剤の網羅的探索は、特異な培養条件で培養した放線菌ライブラリーからのスク



リーニングを行った。

このように、*in silico* 技術および HTS 法を両輪とし、バーチャルライブラリーおよび微生物ライブラリーから阻害剤の探索・分子設計・阻害剤分子の合成・阻害活性の評価を有機的に連携して研究を実施することにより、高活性化合物を迅速かつ効率的に得る事ができると考え、研究を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、エイズウイルスの宿主ヒト細胞の糖鎖構築酵素の構造および分子認識情報を基に阻害剤を設計・合成および探索を行う研究であり、標的酵素の構造情報・分子認識情報をのみ用いる為、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解、実験動物に対する動物愛護上の配慮等を必要とする研究を含まない。

### C. 研究結果

「*in silico*による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」：市販化合物ライブラリーを用いたバーチャルスクリーニングにより、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリーを得、ヒット化合物ライブラリーの多変量解析に基づく定量的構造活性相関を行う事により、化合物ライブラリーの品質・多様性について検討を行った。更に、Fragment-based drug 設計によりライブラリーの拡充を行い、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリーを得た。これらの構造はこれまでに報告されている阻害剤とは異なる、非常にユニークな骨格を有していた。まず、得られたヒット化合物群の *in vitro* での阻害活性を測定した。その結果、インドールを母核とする化合物群が高い阻害活性 ( $IC_{50}$  0.5  $\mu$ M ~ 数十  $\mu$ M) を示す事、2-アミノチアゾロン母核とする化合物群が高い阻害活性 ( $IC_{50}$  0.5  $\mu$ M ~ 数  $\mu$ M) を示す事を明らかとした。そこで、Dixon plot 法を用いて化合物の酵素への

結合位置を確認した結果、インドールを母核とする化合物群は、酵素活性部位に結合する競合阻害型の化合物、活性部位近傍に結合する不競争型および混合型の化合物である事が分かった。2-アミノチアゾロン母核とする化合物では、Dixon plot 法を用いて酵素との結合様式を特定する事ができなかった。しかしながら、反応時間と共に酵素活性が低下する事、透析により酵素活性が復帰しない事から、1,4-マイケル付加反応による共有結合形成型の新規阻害剤である事が明らかになった。上記、2母核の内インドールを母核とする化合物に、細胞レベルで抗 HIV 活性を見いだした(本活性測定については、国立感染症研究所 エイズ研究センター 武部 豊 博士のご支援をいただいた)。

「微生物ライブラリーからの阻害剤の HTS」：HTS を用いた阻害剤の網羅的探索のために、新たな HTS 法の開発を行い、特異な培養条件で培養した放線菌ライブラリーを対象として、HTS を用いた阻害剤の網羅的探索を行い、特異な培養条件においてのみ阻害剤を生産する放線菌を見いだした。得られた阻害剤生産菌は、16s rDNA の配列より *Streptomyces* 属である事を明らかとした。これら放線菌の培養液から阻害剤の単離を試みた。活性画分内において、最も存在量が多かった化合物 A を単離し、構造決定を試みた。FAB MS を用いたイオン化シフト法により分子量 390 であると推定し、UPLC MS/MS (ESI) によりフラグメント情報を得た。NMR (1D Exp:  $^1$ H,  $^{13}$ C, 2D-Exp: H-H COSY, HMQC, HMBC) により化合物 A の構造を推定した。そこで、単離した化合物 A のグルコシダーゼ阻害剤を測定した結果、 $IC_{50}$  3.3 mM と活性が非常に低かったため、化合物 A が活性本体でないことと決定した。次に単離したニンヒドリン反応陰性の化合物 B の構造解析を試みた。UPLC MS/MS (ESI) 分析を行った結果、分子量

494 であると推定した。

#### D. 考察

これまでの研究の結果、市販化合物をライブラリとした *in silico* 阻害剤スクリーニングによって非常に高効率に阻害剤が得られる事を実証した。

得られた阻害剤は、酵素速度論的な解析の結果、シミュレーションとおり酵素の活性部位に結合する事が分かり、ドッキングシミュレーションの有用性の高さを実証する事ができた。

阻害剤スクリーニングに適した新規活性測定系の開発、特異な培養系を用いた放線菌ライブラリからの阻害剤スクリーニングによって、活性画分を得ることができたが、現在のところ真の阻害剤に構造を明らかにするにはいたっていない。

このような事からも、*in silico* 阻害剤スクリーニングの有用性は非常に高いと感じられた。更に、IT 技術の進歩を抗 HIV 薬開発に活用する事ができる、非常に優れた有意義な方法論を確立したと考えられる。

このように、*in silico* 技術を用いる事により、IT 技術の進歩を抗エイズ薬開発に活用する事ができる、非常に優れた有意義な方法論を確立したと考えられる。

医薬品・医薬品候補化合物であり、かつ市販されている化合物のライブラリーのすべてをスクリーニングした訳ではなく、まだ阻害剤の原石が眠っている可能性が十分ある。更に、時間の経過とともに新しい医薬品・医薬品候補化合物は次々と発売されている。この様な現状から、IT 技術の進歩を取り入れ、スクリーニング速度の向上を達成していきたい。

また、現在の標準的な HIV 感染症治療法は、抗 HIV 薬を 3～4 剤使用する多剤併用療法であり、HIV 感染者の生命予後を著しく改善した。HIV 感染症治療法について解決すべき問題；多剤併用療法の長期化お

よび HIV 感染者の増加により、これら薬剤に対する耐性株の出現速度が速まる。よって、これまでの薬剤とは異なる治療標的を有する薬剤開発が急務となっている。

このようにエイズウイルスの薬剤耐性獲得のスピードは非常に速い。よって、新規な作用機序に基づく新規な抗エイズ薬の開発もスピードが求められている。エイズウイルスの変異速度に対抗するにはコンピュータの情報処理能力を積極的に活用する事が重要である。本研究の研究成果は、IT 技術の進歩を生化学的研究に取り入れるインターフェイスとして先駆的であり学術的意義は高いと考えられる。また、その結果得られる抗エイズ薬は、国際的・社会的必要性が非常に高い。

今後は、糖鎖構築酵素の活性部位をファーマコフォアとしてファーマコフォア検索、ドッキングスタディーによるバーチャルスクリーニングにより、濃縮されたエイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物の化合物ライブラリーを得ることができた。そこで、得られた糖鎖構造制御候補化合物ライブラリーの多変量解析に基づく定量的構造相関を検討する事により、得られた化合物ライブラリーの品質・多様性についてより精緻な検討を行う。将来的には、近年注目を集めている **Fragment-based drug** 設計によりライブラリーの拡充を図る事が出来ると考えている。本法を用いる事により、ライブラリーの欠損や多様性等を補うことができ、より論理的・網羅的にスクリーニングを行う事が可能となるであろう。

#### E. 結論

本研究は、IT 技術を積極的に取り入れる事および特異な微生物培養系を用いる事によって、*in silico* または天然のライブラリから HIV 糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物を効率的に得る目的をほぼ終了した。得られた化合物の一部は、酵素阻害活性の報告の無



い新規母核を有する阻害剤であった。また、活性部以内の水素結合・疎水結合等の重要な相互作用をふんだんに利用した興味深い構造であり、活性部位に競争的に結合する事を実験的にも確認する事ができた。このように、本方法論が非常に強力な阻害剤のスクリーニング手法である事を明らかにした。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 業績

### 1. 論文発表

- 1) Wataru Hakamata, Ikuo Nakanishi, Yu Masuda, Takehiko Shimizu, Hajime Higuchi, Yuriko Nakamura, Tadatake Oku, Shinichiro Saito, Shiro Urano, Toshihiko Ozawa, Nobuo Ikota, Naoki Miyata, Haruhiro Okuda, Kiyoshi Fukuhara. Planar catechin analogues with alkyl side chain, a potent antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Journal of American Chemical Society*, 128, 6524-6525 (2006).
- 2) Wataru Hakamata, Makoto Muroi, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, Akira Takatsuki, Hiroyuki Osada, Kiyoshi Fukuhara, Haruhiro Okuda, Masaaki Kurihara, N-Linked oligosaccharide processing enzymes as molecular targets for drug discovery. *Journal of Applied Glycoscience*, 53 149-154, (2006).
- 3) Wataru Hakamata, Emiko Yamamoto, Makoto Muroi, Masataka Mochizuki, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Kiyoshi Fukuhara. Design and synthesis of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor having DNA cleaving activity. *Journal of Applied Glycoscience* 53 (4), 255-260 (2006).
- 4) Masaaki Kurihara, Yukiko Sato, Wataru Hakamata, Haruhiro Okuda, Yosuke Demizu, Masanobu Nagano, Naomi Kawabe, Mitsunobu Doi, Masakazu Tanaka, Hiroshi Suemune. Computational study on conformation of oligopeptides containing chiral cyclic  $\alpha$ ,  $\alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids. *Peptide Science*, 42, 371-372 (2006).
- 5) Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka. Sequence-specific recognition of double-stranded DNA by cooperatives strand invasion. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50,157-158 (2006).
- 6) Y. Suhara, M. Kurihara, A. Kittaka, M. Ichikawa, Y. Ichikawa. Efficient Synthesis of Carbopeptoid Oligomers and their Conformational Studies. *Tetrahedron*, 62, 8207-8217 (2006).
- 7) T. Fujishima, R. Tsutsumi, Y. Negishi, S. Fujii, H. Takayama, A. Kittaka, M. Kurihara, Methyl-introduced A-ring Analogues of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Synthesis and Biological Evaluation *Anticancer Res.*, 26, 2633-2636 (2006).
- 8) N. Kawabe, Y. Demizu, M. Tanaka, M. Kurihara, and H. Suemune, Synthesis of Various Chiral Cyclic  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Disubstituted Amino Acids and Conformational analysis of their Peptides, *Peptide Science* 2005, 347-348 (2006).
- 9) M. Nagano, Y. Demizu, M. Tanaka, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune Chiral Cyclic  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acids Bearing Two Chiral Centers and

- Conformation of Their Peptides. *Peptide Science* 2005, 345-346 (2006).
- 10) Masaaki Kurihara, Wataru Hakamata, Yukiko Sato, Haruhiro Okuda, Yousuke Demizu, Kosuke Anan, Mitsunobu Doi, Masataka Tanaka, Hiroshi Suemune. Computational study on helical structures of oligopeptides containing chiral cyclic  $\alpha$ -amino acids. *Peptides* 2006, 546-547 (2007).
  - 11) Kadokura, K.; Rokutani, A.; Yamamoto, M.; Ikegami, T.; Sugita, H.; Itoi, S.; Hakamata, W.; Oku, T.; Nishio, T. Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2), 357-365 (2007).
  - 12) Kadokura, Kazunari; Sakamoto, Yusuke; Saito, Kaori; Ikegami, Takanori; Hirano, Takako; Hakamata, Wataru; Oku, Tadake; Nishio, Toshiyuki. Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Letters*, 29(8), 1209-1215, (2007).
  - 13) Kadokura, Kazunari; Sakamoto, Yusuke; Saito, Kaori; Ikegami, Takanori; Hirano, Takako; Hakamata, Wataru; Oku, Tadake; Nishio, Toshiyuki. Production and secretion of a recombinant *Vibrio parahaemolyticus* chitinase by *Escherichia coli* and its purification from the culture medium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(11), 2848-2851 (2007).
  - 14) Satoh, Tadashi; Cowieson, Nathan P.; Hakamata, Wataru; Ideo, Hiroko; Fukushima, Keiko; Kurihara, Masaaki; Kato, Ryuichi; Yamashita, Katsuko; Wakatsuki, Soichi. Structural Basis for Recognition of High Mannose Type Glycoproteins by Mammalian Transport Lectin VIP36. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (38), 28246-28255 (2007).
  - 15) Chida, Hirota; Nakazawa, Aiko; Akazaki, Hideharu; Hirano, Takako; Suruga, Kohei; Ogawa, Masahiro; Satoh, Tadashi; Kadokura, Kazunari; Yamada, Seiji; Hakamata, Wataru; Isobe, Katsunori; Ito, Tei-ichiro; Ishii, Ryuichi; Nishio, Toshiyuki; Sonoike, Kintake; Oku, Tadake. Expression of the algal cytochrome *c6* gene in *Arabidopsis* enhances photosynthesis and growth. *Plant and Cell Physiology*, 48 (7), 948-957 (2007).
  - 16) Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka, A., Recognition of Longer Duplex DNA by Cooperative Strand Invasion, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 51, 269-270 (2007).
  - 17) Masakazu Tanaka, Yosuke Demizu, Masanobu Nagano, Mariko Hama, Yukio Yoshida, Masaaki Kurihara, and Hiroshi Suemune, Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Cyclic trans-1,2-Diols Bearing a Diester Moiety: Synthetic Application to Chiral Seven-Membered-Ring  $\alpha, \alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acid, *J. Org. Chem.*, 72, 7750 -7756 (2007).
  - 18) Y. Demizu, M. Tanaka, M. Nagano, M. Kurihara, M. Doi, T. Maruyama, H. Suemune, Controlling  $3^{10}$ -Helix and  $\alpha$ -Helix of Short Peptides in the Solid State, *Chem.*



- Pharm. Bull.*, 55, 840-842 (2007).
- 19) M. Tanaka, M. Nagano, Y. Demizu, K. Anan, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune; Side-chain chiral centers of amino acids and helical-screw handedness of their peptides; *Peptides 2006*, 268-269(2007).
  - 20) Nagano, M., Tanaka, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Doi, M., Suemune, H, Secondary Structure of Heteropeptides Using Chiral Cyclic  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amino Acids; Controlling the Helical; *Peptides 2006*, 476-477(2007).
  - 21) Design and Screening Strategies for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information. Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9 (1), 3-12 (2009).
  - 22) Crystallization and structural analysis of cytochrome *c6* from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at 1.5 Å resolution. Hideharu Akazaki, Fumihiro Kawai, Masahiro Hosokawa, Toshiyuki Hama, Hirotaka Chida, Takako Hirano, B. K. Lim, N Sakurai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatake Oku, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 189-191 (2009).
  - 23) (2S, 2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer. Wataru Hakamata, Yukiko Sato, Haruhiro Okuda, Shinobu Honzawa, Nozomi Saito, Seishi Kishimoto, Atsushi Yamashita, Takayuki Sugiura, Atsushi Kittaka, Masaaki Kurihara, *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 120-123, (2008).
  - 24) Purification, characterization, and cloning of *Vibrio parahaemolyticus* chitinolytic enzymes and application to oligosaccharide production. Kazunari Kadokura, Yusuke Sakamoto, Akiko Rokutani, Takanori Ikegami, Takako Hirano, Mahiro Yamamoto, Kaori Saito, Wataru Hakamata, Shiro Itoi, Haruo Sugita, Tadatake Oku, Toshiyuki Nishio, *Journal of Applied Glycoscience*, 55, 157-164, (2008).
  - 25) Cloning, expression and purification of cytochrome *c6* from the brown alga *Hizikia fusiformis* and complete X-ray diffraction analysis of the structure. Hideharu Akazaki, Fumihiro Kawai, Hirotaka Chida, Yuichirou Matsumoto, Mao Hirayama, Ken Hoshikawa, Satoru Unzai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatake Oku, *Acta Crystallographica F.*, 64, 674-680, (2008).
  - 26) Physicochemical properties of diheme cytochrome *c4* of unknown function from *Vibrio parahaemolyticus* strain RIMD2210633. Hideharu Akazaki, Yoshio Futami, Naoya Shibayama, Ikuko Shirasaki, Harumi Nakade, Hirotaka Chida, Wataru Hakamata, sam-Yong Park, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72, 2791-2794 (2008).
  - 27) Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with the nonsecosteroidal vitamin D<sub>3</sub> analogue YR301. Shinji Kakuda, Kazuhisa Okada, Hiroshi Eguchi, Kazuya Takenouchi, Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Midori Takimoto-Kamimura, *Acta Crystallographica F.*, 64, 970-973, (2008).

- 28) Structure Basis for Recognition of High Mannose Type Glycan Transport Lectin VIP36., T. Satoh, N. P. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, K. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki., *PF NEWS*, 25, 17-22, (2008).
- 29) 奥 忠武, 千田浩隆, 中沢愛子, 赤崎秀治, 西尾俊幸, 袴田 航, 藻類のタンパク質遺伝子導入による陸上植物の光合成増感, 46 (3), 156-158, (2008).
- 30) The 2 $\alpha$ -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D3 analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu); S. Honzawa, Y. Yamamoto, A. Yamashita, T. Sugiura, M. Kurihara, M. A. Arai, S. Kato, A. Kittaka; *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 3002-3024 (2008)
- 31) Computational Study on Secondary Structure of Oligopeptides Containing  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acids; M. Kurihara, Y. Sato, F. Kaneko, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune; *Peptide Science* 2007, 137-138, (2008).
- 32) Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement., T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara., *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 185-189 (2009).
- 33) Helical-Screw Directions of Diastereoisomeric Cyclic  $\alpha$ -Amino Acid Oligomers., Nagano, M., Tanaka, M., Doi, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Suemune, H., *Org. Lett.*, 11, 1135-1137 (2009).
- 34) Computational Study on Helical Structure of  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Oligopeptides Containing Chiral  $\alpha$ -Amino Acids., M. Kurihara, Y. Sato, N. Yamagata, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune., *Peptide Science* 2008, 149-150 (2009).
- 35) Design and synthesis of chiral cyclic  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acid having azido functions and its oligopeptides., H. Takazaki, M. Tanaka, N. Kawabe, M. Nagano, M. Doi, M. Kurihara, H. Suemune., *Peptide Science* 2008, 159-160 (2009).
- 36) Cooperative Strand Invasion by Peptide Nucleic Acid., Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka, A., *Peptide Science* 2008, 481-482 (2009).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現在、本研究で得られた細胞レベルで抗 HIV 活性が認められた化合物について、日本大学・国立医薬品食品衛生研究所・国立感染症研究所の知財部および職務発明委員会を通して、特許の出願手続きを行っている。



## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 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
該当なし							

## 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
Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka.	Sequence-specific recognition of double-stranded DNA by cooperatives strand invasion.	<i>Nucleic Acids Symp. Ser.</i>	50	157-158	2006
Masaaki Kurihara, Yukiko Sato, Wataru Hakamata, Haruhiro Okuda, Yosuke Demizu, Masanobu Nagano, Naomi Kawabe, Mitsunobu Doi, Masakazu Tanaka, Hiroshi Suemune.	Computational study on conformation of oligopeptides containing chiral cyclic a, a-disubstituted a -amino acids.	<i>Peptide Science</i>	42	371-372	2006
Wataru Hakamata, Emiko Yamamoto, Makoto Muroi, Masataka Mochizuki, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Kiyoshi Fukuhara.	Design and synthesis of a -glucosidase inhibitor having DNA cleaving activity.	<i>Journal of Applied Glycoscience</i>	53	255-260	2006
Wataru Hakamata, Makoto Muroi, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, Akira Takatsuki, Hiroyuki Osada, Kiyoshi Fukuhara, Haruhiro Okuda, Masaaki Kurihara	N-Linked oligosaccharide processing enzymes as molecular targets for drug discovery.	<i>Journal of Applied Glycoscience</i>	53	149-154	2006
Wataru Hakamata, Ikuo Nakanishi, Yu Masuda, Takehiko Shimizu, Hajime	Planar catechin analogues with alkyl side chain, a potent	<i>Journal of American Chemical Society</i>	128	6524-6525	2006

Higuchi, Yuriko Nakamura, Tadatake Oku, Shinichiro Saito, Shiro Urano, Toshihiko Ozawa, Nobuo Ikota, Naoki Miyata, Haruhiro Okuda, Kiyoshi Fukuhara.	antioxidant and $\alpha$ -glucosidase.				
Y. Suhara, M. Kurihara, A. Kittaka, M. Ichikawa, Y. Ichikawa	Efficient Synthesis of Carbopeptoid Oligomers and their Conformational Studies.	Tetrahedron	62	8207-8217	2006
T. Fujishima, R. Tsutsumi, Y. Negishi, S. Fujii, H. Takayama, A. Kittaka, M. Kurihara	Methyl-introduced A-ring Analogues of $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> : Synthesis and Biological Evaluation	Anticancer Res.,	26	2633-2636	2006
N. Kawabe, Y. Demizu, M. Tanaka, M. Kurihara, and H. Suemune	Synthesis of Various Chiral Cyclic $\alpha$ , $\alpha$ -Disubstituted Amino Acids and Conformational analysis of their Peptides	Peptide Science 2005		346-347	2006
M. Nagano, Y Demizu, M. Tanaka, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune	Chiral Cyclic $\alpha, \alpha$ -Disubstituted $\alpha$ -Amino Acids Bearing Two Chiral Centers and Conformation of Their Peptides	Peptide Science 2005		345-346	2006
Masaaki Kurihara, Wataru Hakamata, Yukiko Sato, Haruhiro Okuda, Yousuke Demizu, Kosuke Anan, Mitsunobu Doi, Masataka Tanaka, Hiroshi Suemune.	Computational study on helical structures of oligopeptides containing chiral cyclic $\alpha$ -amino acids.	<i>Peptides 2006</i>		546-547	2007

<p>Kadokura, K.; Rokutani, A.; Yamamoto, M.; Ikegami, T.; Sugita, H.; Itoi, S.; Hakamata, W.; Oku, T.; Nishio, T.</p>	<p>Purification and characterization of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin.</p>	<p><i>Applied Microbiology and Biotechnology.</i></p>	<p>75 (2)</p>	<p>357-365</p>	<p>2007</p>
<p>Kazunari Kadokura, Yusuke Sakamoto, Kaori Saito, Takanori Ikegami, Takako Hirano, Wataru Hakamata, Tadatake Oku, Toshiyuki Nishio</p>	<p>Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in the culture medium of <i>Escherichia coli</i> cells.</p>	<p><i>Biotechnology Letters</i></p>	<p>29 (8)</p>	<p>1209-1215</p>	<p>2007</p>
<p>Kadokura, Kazunari; Sakamoto, Yusuke; Saito, Kaori; Ikegami, Takanori; Hirano, Takako; Hakamata, Wataru; Oku, Tadatake; Nishio, Toshiyuki</p>	<p>Production and secretion of a recombinant <i>Vibrio parahaemolyticus</i> chitinase by <i>Escherichia coli</i> and its purification from the culture medium.</p>	<p><i>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry</i></p>	<p>71 (11)</p>	<p>2848-2851</p>	<p>2007</p>
<p>Satoh, Tadashi; Cowieson, Nathan P.; Hakamata, Wataru; Ideo, Hiroko; Fukushima, Keiko; Kurihara, Masaaki; Kato, Ryuichi; Yamashita, Katsuko; Wakatsuki, Soichi.</p>	<p>Structural Basis for Recognition of High Mannose Type Glycoproteins by Mammalian Transport Lectin VIP36.</p>	<p><i>Journal of Biological Chemistry</i></p>	<p>282 (38)</p>	<p>28246-28255</p>	<p>2007</p>

Chida, Hirotaka; Nakazawa, Aiko; Akazaki, Hideharu; Hirano, Takako; Suruga, Kohei; Ogawa, Masahiro; Satoh, Tadashi; Kadokura, Kazunari; Yamada, Seiji; Hakamata, Wataru; Isobe, Katsunori; Ito, Tei-ichiro; Ishii, Ryuichi; Nishio, Toshiyuki; Sonoike, Kintake; Oku, Tadatake.	Expression of the algal cytochrome c6 gene in Arabidopsis enhances photosynthesis and growth.	<i>Plant and Cell Physiology,</i>	48 (7)	948-957	2007
Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka. A	Recognition of Longer Duplex DNA by Cooperative Strand Invasion,	<i>Nucleic Acids Symp. Ser.</i>	51	269-270	2007
Masakazu Tanaka, Yosuke Demizu, Masanobu Nagano, Mariko Hama, Yukio Yoshida, Masaaki Kurihara, and Hiroshi Suemune	Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Cyclic trans-1,2-Diols Bearing a Diester Moiety: Synthetic Application to Chiral Seven-Membered-Rin g $\alpha,\alpha$ -Disubstituted $\alpha$ -Amino Acid	<i>J. Org. Chem.</i>	72	7750 -7756	2007
Y. Demizu, M. Tanaka, M. Nagano, M. Kurihara, M. Doi, T. Maruyama, H. Suemune	Controlling $3^{10}$ -Helix and $\alpha$ -Helix of Short Peptides in the Solid State,	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	55	840-842	2007
M. Tanaka, M. Nagano, Y. Demizu, K. Anan, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune	Side-chain chiral centers of amino acids and helical-screw handedness of their peptides	<i>Peptides 2006</i>	128	268-269	2007
Nagano, M., Tanaka, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Doi, M., Suemune, H,	Secondary Structure of Heteropeptides Using Chiral Cyclic $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amino Acids	<i>Peptides 2006</i>	128	476-477	2007