

## キナーゼの細胞内局在機構解明のためのツールとしてのケージド化合物

(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研、<sup>2</sup>東京医歯大・院医歯学総合、<sup>3</sup>Laboratory of Cancer Biology and Genetics, NCI, NIH、  
<sup>4</sup>東京医歯大・院生命情報、<sup>5</sup>東京医歯大・難治研、<sup>6</sup>東邦大・理)

○野村 渉<sup>1</sup>・芹澤 雄樹<sup>1,2</sup>・大橋 南美<sup>1,2</sup>・Nancy E. Lewin<sup>3</sup>・奥田 善章<sup>1,4</sup>・鳴海 哲夫<sup>1</sup>・吉田 清嗣<sup>5</sup>・Peter  
 M. Blumberg<sup>3</sup>・古田 寿昭<sup>1,6</sup>・玉村 啓和<sup>1,2</sup>

Caged molecules as tools for translocation analysis of protein kinases in cell (*Inst. Biomater. Bioeng., Tokyo Med. Dent. Univ.*<sup>1</sup>, *Grad. School of Med. and Dent. Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.*<sup>2</sup>, *Lab. Cancer Biol. Genetics, NCI, NIH*<sup>3</sup>, *School of Biomed. Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.*<sup>4</sup>, *Med. Res. Inst., Tokyo Med. Dent. Univ.*<sup>5</sup>, *Dept. Biomol. Sci., Toho Univ.*<sup>6</sup>)  
 NOMURA, Wataru<sup>1</sup>; SERIZAWA, Yuki<sup>1,2</sup>; OHASHI, Nami<sup>1,2</sup>; Nancy E. LEWIN<sup>3</sup>; OKUDA, Yoshiaki<sup>1,4</sup>; NARUMI, Tetsuo<sup>1</sup>; YOSHIDA, Kiyotsugu<sup>5</sup>; Peter M. BLUMBERG<sup>3</sup>; FURUTA, Toshiaki<sup>1,5</sup>; TAMAMURA, Hirokazu<sup>1,2</sup>

プロテインキナーゼ C (PKC) はジアシルグリセロール (DAG) をセカンドメッセンジャーとするセリン・スレオニン特異的リン酸化酵素であり、がんやアルツハイマー病の治療薬創製の標的酵素として注目されている。演者らはケージド基で保護した PKC 特異的リガンドを創製し、紫外光照射による PKC 活性化の時間・空間的な制御を試みた。DAG を環化することによって結合活性を上昇させた DAG-ラクトンの重要なファーマコフォアである水酸基を光分解性保護基である 6-Bromo-7-methoxycoumarin (Bmc) または 6-Bromo-7-hydroxycoumarin (Bhc) により保護したケージド DAG-ラクトン誘導体を合成した。ケージド DAG-ラクトンを緩衝液中で紫外光照射し、Bmc 基の脱保護及び DAG-ラクトンの出現を HPLC 分析により確認した。また、その結果から分解反応 (Figure 1A) の量子収率等を算出した。ケージド DAG-ラクトンの PKC $\delta$  活性化能について、試験管内での <sup>3</sup>H[PDBu] (ホルボールエステル) との競合阻害活性、リン酸化アッセイ、および CHO-K1 細胞内における GFP 融合 PKC $\delta$  の細胞内局在変化 (Figure 1B) によって検討した。その結果、ケージド DAG ラクトンはいずれの場合も PKC $\delta$  に対する結合活性および活性化能を持たず、紫外光照射によってケージド基を脱保護した場合においてのみ PKC $\delta$  に対する結合活性を出現させ、活性化も行うことが確認された。以上のことから、ケージド DAG-ラクトンへの紫外光照射による脱保護、それに伴う結合活性の回復を用いて PKC $\delta$  の活性化を時間・空間的に制御できる可能性が示された。

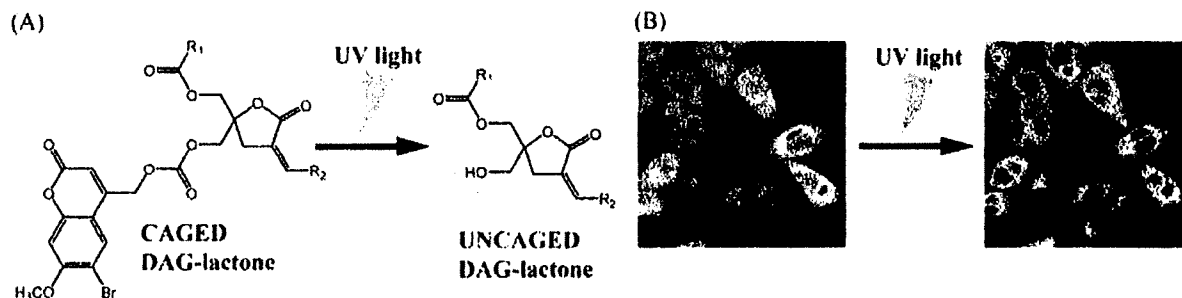


Figure 1. Uncaging of DAG-lactones (A) and activation of translocation (B) by UV irradiation.

## SYNTHESIS OF AN ANTIGEN PEPTIDE INDUCING NEUTRALIZING ANTIBODIES SPECIFIC TO THE GP41 TRIMERIC FORM

Aki Ohya<sup>1</sup>, Toru Nakahara<sup>1</sup>, Wataru Nomura<sup>1</sup>, Kenji Ohba<sup>2</sup>, Tomohiro Tanaka<sup>1</sup>, Chie Hashimoto<sup>1</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Tsutomu Murakami<sup>2</sup>, Naoki Yamamoto<sup>2</sup>, and Hirokazu Tamamura<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, <sup>2</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, <sup>3</sup>School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

The antibody therapy of AIDS is a promising treatment. As a new approach for this therapy, artificial antigen molecules were synthesized based on the dynamic structures of envelope proteins during HIV-1 entry. HIV-1 gp41 plays a pivotal role in membrane fusion process of HIV-1 initial infection, and is divided by the N-terminal helix region (N36) and the C-terminal helix region (C34). In membrane fusion process, a six-helical bundle that consists of a trimeric coiled-coil of N36 surrounded by C34 in an antiparallel fashion is formed. Thus, the antibody which recognizes N36 trimer in a structure-specific manner could block HIV-1-entry. To construct a peptidomimetic of N36 trimer, the N36 peptides, which were synthesized by solid-phase peptide synthesis, were assembled on a three-blanch template. The template is C3-symmetric form with three equivalent linkers. The equivalency of linker length is important for the formation of triplet helix which is truly corresponding to a gp41 pre-fusion form. This synthetic approach uses thiazolidine ligation for chemoselective coupling of Cys-containing unprotected N36RE (N36REGC) with aldehyde scaffold-containing three arms, which produces triN36e. The antiserum produced by immunization of an N36 trimeric form antigen showed structural preference in binding to N36

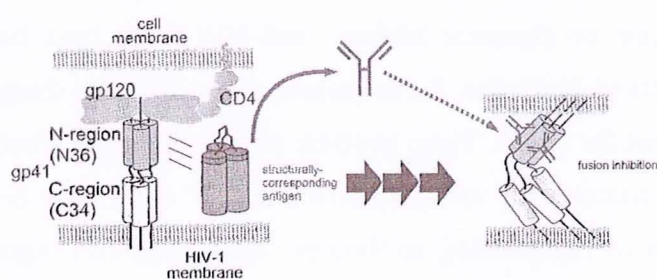


Figure. Development of a structurally corresponding antigen of an HIV-1 protein gp41 and fusion inhibition by induced antibodies specific to gp41 trimer

trimer. Moreover, it was revealed that the antiserum has more potent inhibitory activity against HIV-1 infection than that of N36 monomer. Our results imply an effective strategy of HIV vaccine design based on the correspondence to the native structure of proteins correlated to HIV fusion mechanisms.

## O-14 FROM REVERSE TO FORWARD CHEMICAL GENOMICS: DEVELOPMENT OF ANTI-HIV AGENTS

Tomohiro Tanaka<sup>1</sup>, Wataru Nomura<sup>1</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Kazuhisa Yoshimura<sup>2</sup>,  
Shuzo Matsushita<sup>2</sup>, Tsutomu Murakami<sup>3</sup>, Jun Komano<sup>3</sup>, Naoki Yamamoto<sup>3</sup>,  
and Hirokazu Tamamura<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, <sup>2</sup>Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan, <sup>3</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, <sup>4</sup>School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

Recently, highly active anti-retroviral therapy (HAART), which involves a combinational use of reverse transcriptase inhibitors and HIV protease inhibitors, has brought us a great success in the clinical treatment of AIDS patients. However, HAART has serious clinical problems including the emergence of multi-drug resistant HIV-1 strains. These drawbacks encouraged us to find novel drugs and increase repertoires of anti-HIV agents with various action mechanisms. The recent disclosing of the dynamic supramolecular mechanism in HIV-entry has provided potentials to find a new type of drugs. To date, we have synthesized HIV-entry inhibitors, especially coreceptor CXCR4 antagonists. In addition, protease inhibitors based on a combinatorial design, and CD4 mimics in consideration of synergic effects with other entry inhibitors or neutralizing antibodies have been developed. The development of the above anti-HIV agents is based on the concept of reverse chemical genomics, in which target molecules are fixed. On the other hand, based on the concept of forward chemical genomics, in which active compounds are searched according to the screening of random libraries, effective peptide leads such as integrase inhibitors have been discovered. As such, from a point of view on chemical biology, anti-HIV leads have been found utilizing reverse and forward chemical genomics. Furthermore, antibody-based therapy is still thought to be a promising treatment for AIDS. Thus, peptidic antigen molecules based on artificial remodeling of the dynamic structures of surface proteins in HIV-entry have been synthesized and evaluated for induction of neutralizing antibodies. These anti-HIV agents might be important and useful compounds in consideration of cocktail therapy of AIDS. In addition, the present concept of chemical biology for the development of anti-HIV agents would be essential for drug discovery in medicinal chemistry.

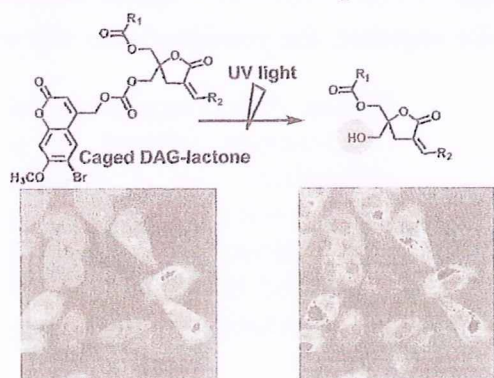
P-087 CAGED DAG-LACTONES FOR STUDY OF CELLULAR SIGNALING IN A SPATIAL- AND TEMPORAL-SPECIFIC MANNER

Wataru Nomura<sup>1</sup>, Yuki Serizawa<sup>1,2</sup>, Nami Ohashi<sup>1,2</sup>, Yoshiaki Okuda<sup>1,3</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Kiyotsugu Yoshida<sup>4</sup>, Toshiaki Furuta<sup>1,5</sup>, and Hirokazu Tamamura<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, <sup>2</sup>Graduate School of Medical and Dental Sciences, <sup>3</sup>School of Biomedical Science, <sup>4</sup>Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, <sup>5</sup>Faculty of Science, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

Photo-activatable protecting groups have been demonstrated their compatibility in a cell biology field as tools for discovery of physiological functions such as cell signaling. Protein kinase C (PKC) has 11 family members. Our research is focused on PKC $\delta$ , which is correlated to diverse diseases such as tumor progression and neurological disorders. This kinase is located on upstream of signaling for cell proliferation or transcription, thus it is difficult to detect the effects of ligand binding in time-resolved ways. It is known that the response to ligand binding could be detected by observing translocation in cytosol. Isozyme-specific ligands must be synthesized in a systematic manner. This structure-activity relationship approach is very powerful strategy for the discovery of optimized ligands, however, the mechanisms of cellular signaling occurred by ligand binding is still unclear. To tackle these problems, photo-activatable groups (6-bromo-7-methoxycoumarin (Bmc) and 6-bromo-7-hydroxycoumarin (Bhc)) were attached to the ligands giving "caged compounds". The synthetic caged molecules showed a 100- to 400-fold decrease in binding affinity for PKC, compared to the corresponding parent compounds. The effects on PKC translocation by the binding of compounds were assessed by confocal laser scanning microscopy. The results indicated that caged compounds have no effects on translocation of PKC and that the translocation occurs after photo-irradiation by specific wave lengths (365 nm for Bmc and 405 nm for Bhc).

This method could be applied to detect the signaling which is caused by ligand binding in a spatial- and temporal-controlled manner. The present data could reveal details of cellular signaling correlated to PKC activation.

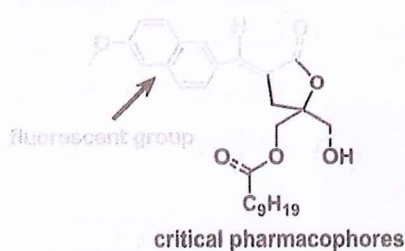


**Figure.** Schematic representation of photo-triggered uncaging reaction of caged DAG-lactones and translocation of PKC $\delta$  upon uncaging.

Nami Ohashi<sup>1</sup>, Wataru Nomura<sup>1</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Yoshiaki Okuda<sup>1,2</sup>, Teikichi Ikura<sup>2</sup>, Nobutoshi Ito<sup>2</sup>, Kiyotsugu Yoshida<sup>3</sup>, Nancy E. Lewin<sup>4</sup>, Peter M. Blumberg<sup>4</sup>, and Hirokazu Tamamura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, <sup>2</sup>School of Biomedical Science, <sup>3</sup>Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan, <sup>4</sup>Laboratory of Cancer Biology and Genetics, Center for Cancer Research, NCI, NIH, Bethesda, MD 20892, USA.

Protein kinase C (PKC), which is a serine/threonine protein kinase and has 11 isozymes, mediates signal transduction correlated to cell growth, differentiation, apoptosis, etc. Regarding its central roles in cellular signaling, PKC is a promising target for drug discovery. Currently, several PKC-directed drugs are progressed in clinical trials. The PKC activation is triggered by binding of ligands such as diacylglycerol (DAG)/phorbol esters (tumor promoters) to C1 domains. Thus, ligands with high binding affinity could be lead compounds for the drug development. To evaluate ligand binding or to search a new lead compound, two different approaches utilizing fluorescent sensing were developed instead of conventional methods using radioisotops. The first method utilizes the synthetic  $\delta$ C1b domain derivatives bearing an environmentally responsive fluorescent group (Dansyl). The results indicated that this method could detect ligand binding affinity by change of fluorescent intensity and wavelength shift. The second method involves competitive ligand replacement by a fluorophore-labeled DAG-lactone. The fluorophore is a coumarin derivative, which is also environmentally sensitive. More than 10 compounds were tested to evaluate the compatibility of the above method. The obtained data showed that this detection is correlated to that of radioisotope methods. To evaluate the advantage of fluorescent-utilized methods, multi-well plate assays were performed. The results suggested the fluorescent ligand method could be utilized for screening of new compounds. Take together, the combinational use of these fluorescent-labeling methods would lead to detailed and reliable evaluation of lead compounds for PKC ligands.



**Figure.** A fluorescent-labeled DAG-lactone utilized in a competitive ligand replacement method. A green part indicates a fluorescent group and blue circles show the pharmacophore of DAG-lactones.

ペプチドライブラリーを基にした HIV-1 インテグラーゼに対する阻害剤の創製

(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研、<sup>2</sup>東京医歯大・疾患生命研、<sup>3</sup>国立感染症研・エイズ研セ)

○中西 勇太<sup>1,2</sup>、中原 徹<sup>1,2</sup>、鈴木 慎太郎<sup>1</sup>、田中 智博<sup>1</sup>、大橋 南美<sup>1</sup>、堤 浩<sup>1</sup>、  
鳴海 哲夫<sup>1</sup>、野村 渉<sup>1</sup>、駒野 淳<sup>3</sup>、山本 直樹<sup>3</sup>、玉村 啓和<sup>1,2</sup>

【背景】

今日、HIV-1 感染者に対する治療薬として、プロテアーゼ阻害剤、逆転写酵素阻害剤、膜融合阻害剤を組み合わせた多剤併用療法 Highly active anti-retroviral therapy (HAART)が成果を上げている。しかしながら、薬剤耐性ウイルスの出現や副作用などの問題が残されており、新規の作用機序を持つ治療薬の開発が求められている。

【方法】

新たな標的候補として HIV-1 のライフサイクル中で宿主ゲノム遺伝子に HIV-1 プロウイルス遺伝子を挿入する作用を持つ酵素であるインテグラーゼ (IN) に注目した。HIV-1 の *gag, pol, env, vpu, vpr, rev, tat* 遺伝子産物のアミノ酸配列を基にして合成されたペプチドライブラリーを用いて、IN 阻害活性のあるペプチドのスクリーニングを行った。その結果、Vpr 配列中から IN 阻害ペプチドモチーフを同定し、**octa-arginine motif** を配列に付与することによって培養細胞レベルで HIV-1 複製が抑制されることを実証した。今回はこの配列を基に、更に高い活性を有するペプチドを探索するためにアミノ酸置換による構造活性相関を行った。具体的なアプローチとして (1) LQQLLF モチーフペプチド (野生型 (WT) 配列: Ac-EAIIIRILQQLLFIFHRIG-RRRRRRRR-NH<sub>2</sub>) 配列中の様々な位置にグルタミン酸 (E)、リジン (K) の組み合わせ (EXXXK 配列) を導入し、2 アミノ酸側鎖間の静電的相互作用によって  $\alpha$ ヘリックス性の変化による IN 阻害活性への影響についての検討、(2) アラニンスキャンによる IN との相互作用における重要なアミノ酸残基の検討を行った。(1) では固相合成法によって得られた 7 種類のペプチドについて CD スペクトル測定を行い、アミノ酸配列が  $\alpha$ ヘリックス性に与える影響について検討した。また、(2) では LQQLLFIFHRIG 配列のアミノ酸それぞれをアラニンに置換したペプチドを合成し、IN 阻害活性への影響について検討した。また、これらの

実験で得られた結果を基に IN とモチーフペプチドの結合様式について検討を行った

【結果・考察】

EK モチーフ導入ペプチドの CD スペクトル測定結果より、EK モチーフの導入によって  $\alpha$ ヘリックス性に変化が起こることが明らかになった。この結果を基に阻害活性への影響について検討を行ったが、具体的な相関関係は明かではなかった。しかし、いずれのペプチド配列においても WT 同様の  $\alpha$ ヘリックス性が確認され、IN 阻害活性において  $\alpha$ ヘリックスモチーフが IN との相互作用に重要であるこ

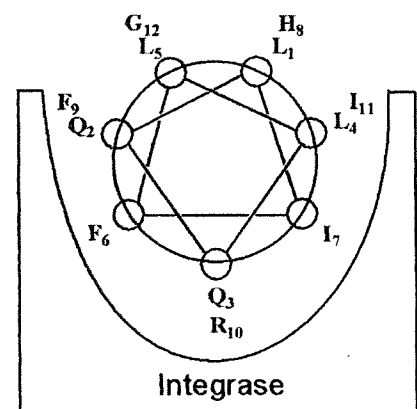


Figure 1. 予測された LQQLLF モチーフペプチドの結合モデル

とが示唆された。次に、INとの相互作用に重要であるアミノ酸残基を決定するためにアラニンスキャニングの手法を用いて LQQLLFIHFRIG 配列について 1 アミノ酸ずつ置換を行った。その結果、F<sup>6</sup>、I<sup>7</sup>、F<sup>9</sup>、I<sup>11</sup> が IN 阻害活性に重要であることが明らかになった。これらの結果を基に Figure 1 で示すようなコンフォメーションで IN と結合している可能性が示唆された。今回同定されたペプチド配列は新たな抗 HIV 治療薬開発のリード化合物として今後構造の固定化や結合部位の同定、非ペプチド化および小分子化による高機能化が期待される。

## Development of inhibitors against HIV-1 integrase based on peptide libraries

Yuta Nakanishi<sup>1,2\*</sup>, Toru Nakahara<sup>1,2</sup>, Shintaro Suzuki<sup>1</sup>, Tomohiro Tanaka<sup>1</sup>, Nami Ohashi<sup>1</sup>, Hiroshi Tsutsumi<sup>1</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Wataru Nomura<sup>1</sup>, Jun Komano<sup>3</sup>, Naoki Yamamoto<sup>3</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, <sup>3</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

Highly active anti-retroviral therapy (HAART) is frequently adopted as clinical treatment for AIDS or HIV-1-infected patients. HAART has brought us a great success in the chemotherapy of patients by a combination of two or three different agents among reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. However, there still remain several serious problems such as the emergence of the viral strains with multi-drug resistance (MDR), considerable adverse effects and high costs. Thus, development of novel drugs possessing action mechanisms different from the above inhibitors would be currently desirable. As such, we focus on HIV-1 integrase and explore finding of effective compounds with inhibitory activity against integrase.

Previously, we have successfully found inhibitory peptides against HIV-1 integrase, which are identified from the Vpr-derived peptide library by an *in vitro* screening experiment. Then, an octa-arginine sequence was added to Vpr-derived peptides with integrase inhibitory activity to introduce these peptidic inhibitors into cells. These cell-membrane permeable inhibitors exhibited significant inhibitory activity of HIV replication *in vivo*. In this study, we have developed higher potent peptidic inhibitors against the integrase through experiments involving the systematic replacement of amino acids for structure-activity relationship studies, suggesting that these peptides are novel lead compounds of anti-HIV agents.

## 合成二価型リガンドを用いた CXCR4 二量体構造の解析研究

(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研、<sup>2</sup>東京医歯大・疾患生命研) ○田中 智博<sup>1</sup>、野村 渉<sup>1</sup>、鳴海 哲夫<sup>1</sup>、  
玉村 啓和<sup>1,2</sup>

## 【背景】

CXCR4はG蛋白質共役型受容体(GPCR)ファミリーに属するケモカイン受容体である。CXCR4はエイズやがん転移、関節リウマチなど多くの難治性疾患に関わっていることが知られており、魅力的な創薬標的の一つである。近年、多くの研究からCXCR4の多様な生理活性はホモ-及びヘテロ-二量体化により制御されていることが示唆されている。しかしながら、生細胞中における天然のCXCR4二量体の構造や生理学的意義に関しては未だに解明されていない部分が多い。そこで、本研究ではCXCR4二量体を標的とした新規二価型リガンドを合成し、CXCR4二量体の構造の解析研究を行った。

## 【方法】

以前、我々は強力なCXCR4アンタゴニストFC131を開発している。そこで、このFC131を種々の長さのリンカーで架橋した二価型FC131誘導体を合成・設計した。リンカーには一定の長さを有する安定なロッド構造を有するポリプロリン(PP)リンカーを選択し、また、PEG修飾型ポリプロリン(PEG-PP)リンカーも併せて合成することで、リンカー構造の柔軟性がCXCR4との結合に与える影響も同時に検討した(Figure 1)。合成した種々の鎖長を有する二価型FC131誘導体の結合活性をCXCR4の内因性リガンドである[<sup>125</sup>I]-SDF-1 $\alpha$ との競合阻害実験により評価した。

## 【結果・考察】

これらの合成した15種の二価型FC131誘導体はリンカーの性質に関わらず、リンカー長がある範囲の時に高いCXCR4結合活性を示した。これらの結果はCXCR4二量体におけるFC131結合サイトの距離を示していると考えられ(Figure 2)、今後のCXCR4二量体構造解明や二価型リガンドの創製に有用な知見を与えるものである。

## 【参考文献】

1. Babcock, G. J.; Farzan, M and Sodroski, J. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 3378–3385.
2. Handl, H. L.; Sankaranarayanan, R.; Josan, J. S.; Vagner, J.; Mash, E.; Gillies, R. J and Hruby, V. J. *Bioconjugate Chem.* 2007, 18, 1101-1109.
3. Daniels, D. J.; Lenard, N. R.; Etienne, C. L.; Law, P.; Roerig, S. C. and Portoghese, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 19208–19213.

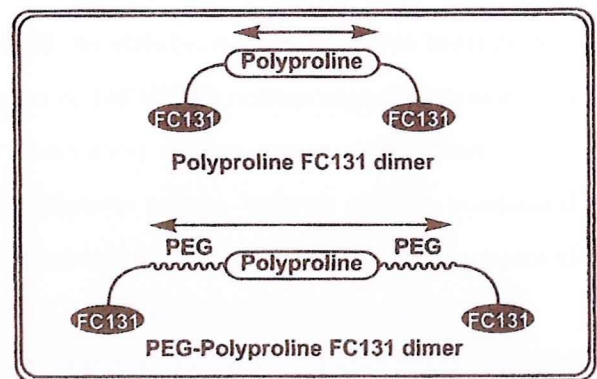


Figure 1. ポリプロリン及びPEG修飾型ポリプロリンFC131二量体の構造

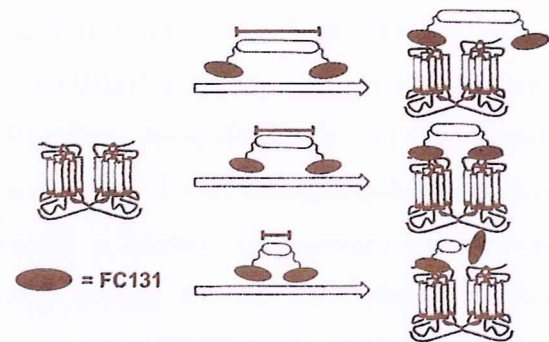


Figure 2. CXCR4二量体と二価型リガンドとの結合の模式図

## Chemical biology approach utilizing novel bivalent ligands for GPCR CXCR4 leads to the elucidation of a dimeric structure

Tomohiro Tanaka<sup>1\*</sup>, Wataru Nomura<sup>1</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

The chemokine receptor CXCR4 is a membrane protein, which belongs to the G-protein coupled receptor (GPCR) family. Interaction of CXCR4 with its endogenous ligand, stromal-cell derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12, induces various physiological functions: chemotaxis, angiogenesis, neurogenesis, *etc.* in an embryonic stage. On the other hand, CXCR4 is relevant to multiple diseases: AIDS, cancer metastasis, progression of leukemia, rheumatoid arthritis, *etc.* in adulthood. Recent studies have indicated a pivotal role of homo- and hetero-oligomerization of CXCR4 in cancer metastasis.

These studies were mostly performed with BRET analysis. The results indicated the limitation of this method in the elucidation of the native state of receptors in living cells because of the conformational or functional changes due to the mutations.

Estimation of the precise distance between receptors in a dimer form will bring us the efficient development of bivalent ligands of GPCRs, which have advantages in binding affinity and specificity. However, challenges in design of bivalent ligands have showed its difficulty because of the unclearness in dimeric forms of GPCRs. Therefore, there is an increasing demand for a novel strategy for this analysis.

In this study, we designed and synthesized novel CXCR4 bivalent ligands with two FC131 analogues [*cyclo*(D-Tyr-Arg-Arg-Nal-D-Cys-)] (Nal = L-3-(2-naphthyl)alanine) connected by a polyproline or a PEGylated polyproline linker. A cyclic pentapeptide FC131 [*cyclo*(D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-)] was previously found as a potent CXCR4 antagonist. The linkers were expected to sustain a certain constant distance between the ligands. Our bivalent ligands with various linkers were applied to measure the distance between two binding sites of ligands in CXCR4 dimers.

Here, we present experimental results concerning the native state of CXCR4 dimer utilizing our bivalent ligands, leading to a clear comprehension of the precise structure. This approach could be utilized to other GPCRs as a molecular measure in design of bivalent ligands. Furthermore, an application of fluorescent-labeled bivalent ligands to cancer diagnosis will be discussed.

## HIV-1 第二受容体 CXCR4 を基にした合成抗原分子の開発

(1 東京医歯大・生材研、2 東京医歯大・疾患生命研、3 国立感染研・エイズ研セ)

○橋本 知恵<sup>1,2</sup>、野村 渉<sup>1</sup>、田中 智博<sup>1</sup>、鳴海 哲夫<sup>1</sup>、大庭 賢二<sup>3</sup>、山本 直樹<sup>3</sup>、  
玉村 啓和<sup>1,2</sup>

## 【背景】

HIV が AIDS の原因ウイルスとして特定されてから 25 年以上が経過し、様々な抗 HIV 薬が開発されてきた。現在、HIV 感染者および AIDS 患者の治療において抗 HIV 薬（プロテアーゼ阻害剤や逆転写酵素阻害剤）を複数組み合わせる多剤併用療法（highly active anti-retroviral therapy: HAART）が大きな効果を上げているが、根治は難しく、薬剤耐性ウイルスの出現や高額な治療費などの二次的問題も生じている。そのため、予防、治療効果が高いと考えられる AIDS ワクチンの開発が行われてきたが成功には至っていない。本研究では、従来行われてきた HIV 側を標的とする方法ではなく、宿主細胞側第二受容体 CXCR4 の細胞外 N 末端領域を標的とする新規なワクチンによって HIV の侵入を阻害する方法の開発に取り組んだ。

## 【方法】

CXCR4 の細胞外領域となる N 末端領域と 3 個の細胞外ループのうち、HIV-1 と宿主細胞との結合に重要である N 末端領域を標的とする抗体誘導のために、オーバーラップする 3 配列に断片化した N 末端領域（細胞膜に遠い方から Nt-1, 2, 3 とする）を Fmoc 固相合成法により作製した。また、効率良く抗体誘導を行うために、合成したペプチドを多価抗原ペプチド（multi-antigen peptide: MAP）テンプレート上に導入した。合成した抗原分子をマウスに免疫し、抗体誘導実験を行った。免疫後、定期的に血清を採取し、ELISA 法によって抗体価を評価した。さらに、CXCR4 を高発現する細胞を用いてリガンド競合阻害実験を行い、誘導された抗体の CXCR4 に対する結合活性も評価した。

## 【結果・考察】

Nt-2, 3 を用いた免疫で抗体誘導が確認され、より細胞膜に近い Nt-3 を基にした抗原分子が Nt-2 よりも高い抗体誘導能を示すことが明らかになった。また、リガンド競合阻害実験によって、Nt-3 で誘導された抗体が CXCR4 結合活性を有することが確認された。今後、誘導された抗体を含む血清を用いて中和活性を評価することで、宿主側因子を標的とするワクチンデザインが有効な方法であることを示すことができると考えられる。

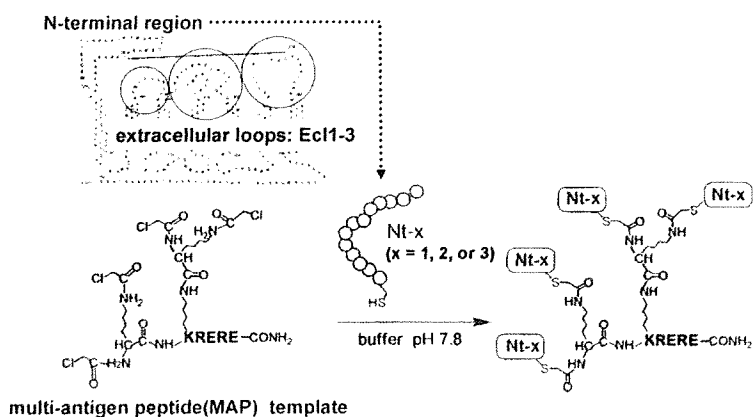


Figure 1. CXCR4 の N 末端領域断片ペプチドの MAP コンジュゲート体の作製

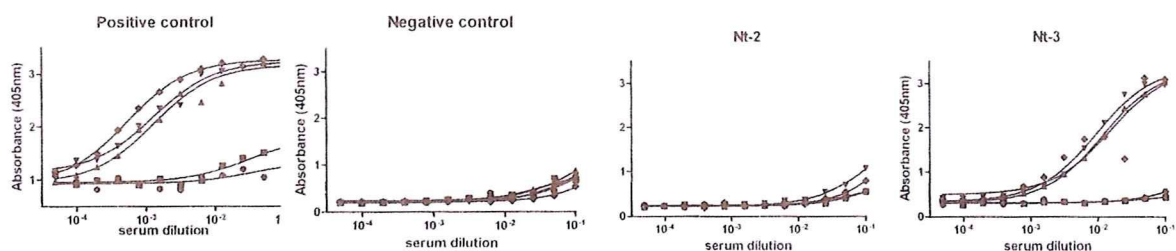


図 2. ELISA 法による抗体価の評価 左から positive control, negative control, Nt-2, Nt-3 を抗原とした免疫 1 週間前(●), 免疫 1 週(■), 3 週(▲), 5 週(▼), 7 週(◆)における抗体価

## Development of synthetic antigen molecules based on HIV-1 co-receptor CXCR4

Chie Hashimoto<sup>1,2\*</sup>, Wataru Nomura<sup>1</sup>, Tomohiro Tanaka<sup>1</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Kenji Ohba<sup>3</sup>,  
Naoki Yamamoto<sup>3</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, <sup>3</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

To treat AIDS or HIV-infected patients, a therapy designated as highly active anti-retroviral therapy (HAART) has achieved a remarkable clinical success to date. In the therapy, reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors are used in combinations. However, these antiretroviral agents cannot remove virus completely from infected individuals and escape mutations of virus strains occurred during the treatment. Thus, demands for different strategies of AIDS chemotherapy are increasing.

HIV-1 vaccine is a promising alternative treatment of AIDS. Despite enormous efforts in basic and clinical researches, the development of HIV-1 vaccine targeting viral proteins is greatly hampered by viral mutation. Therefore, the second receptor CXCR4 on host cells was selected as a new target. CXCR4 is composed of an extracellular N-terminal region and three extracellular loops (Ecl 1, 2, and 3). The N-terminal region contains by 39 amino acid residues, and was segmented into three parts (Nt-1, 2, and 3) as antigen molecules. The peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS). For an efficient induction of antibodies, these peptides were conjugated to a multi-antigen peptide (MAP) template. The antigen molecules, Nt-2 and 3 were inoculated into mice and sera were collected at regular intervals. The induction of antibodies in the sera was monitored by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results indicated antibodies were induced strongly by Nt-3. Additionally, a competitive binding assay suggested that the induced antibodies significantly bind to CXCR4. The synthetic antigens based on cellular proteins of host cells would lead to development of efficacious vaccine of AIDS.

## PKC リガンドの蛍光を用いた洗浄不要型アッセイ法の開発

(1 東京医歯大・生材研、2 東京医歯大・疾患生命研)

○奥田 善章<sup>1,2</sup>、野村 渉<sup>1</sup>、鳴海 哲夫<sup>1</sup>、大橋 南美<sup>1</sup>、玉村 啓和<sup>1,2</sup>

## 【背景】

Protein kinase C (PKC)は11種類のアイズォイムからなるセリン・スレオニン特異的リン酸化酵素であり、生理的条件下では diacylglycerol (DAG)をセカンドメッセンジャーとして細胞増殖や分化、アポトーシスにおいて重要な作用を示す。代表的な腫瘍プロモーターである phorbol dibutyrate (PDBu)も PKC をターゲットとして作用することが知られており、PKC はがん治療薬の標的分子として注目されている。

当研究室では、天然のリガンドである DAG の誘導体を環化することにより、PKC との結合に必要な官能基 (ファーマコフォア) を空間的に固定化し、結合活性を上昇させるという Marquez らの戦略に基づき、PDBu に匹敵する結合活性を持った DAG-lactone 誘導体を合成している (Figure 1)。これらの PKC への結合活性は、放射性同位体(RI)でラベル化された [20-<sup>3</sup>H]PDBu をプローブとした競合阻害アッセイを用いて評価している。しかし、RI を使用したアッセイには専用の設備などを必要とし、被爆の危険性もあるため、より簡便で安全なアッセイ系が必要とされている。そこで本研究では、DAG-lactone 誘導体の R<sub>2</sub> に環境応答性蛍光基を導入した蛍光性 DAG-lactone 誘導体を合成し、[20-<sup>3</sup>H]PDBu に代わる競合プローブとしての利用が可能か検討を行った。

## 【方法】

環境応答性蛍光基で修飾した DAG-lactone 誘導体が PKC との結合に伴って蛍光変化を起こす場合、リガンド候補化合物の競合的結合を蛍光変化として検出することが可能である。従って、RI アッセイで必要な洗浄操作が不要となるため、非常に簡便で [20-<sup>3</sup>H]PDBu に代わる有用なプローブになると期待できる。また簡便な検出方法であるため、大量の候補化合物を用いるスクリーニングのためのプローブとしても応用が可能である。合成した蛍光性 DAG-lactone 誘導体が PKC のリガンド結合部位である C1b ドメインに対して、十分な結合活性を保持していることを [20-<sup>3</sup>H]PDBu との競合阻害実験により確認した。次に蛍光滴定実験を行い、蛍光性 DAG-lactone 誘導体の C1b ドメインとの結合に伴う蛍光波長の変化を追跡した。構築した系が競合阻害活性を検出するために利用可能であることを検討するために PKC C1b ドメインへの結合活性が既知である数種類の化合物について蛍光性プローブを用いたアッセイを行った。さらに化合物スクリーニングへの応用のためにマルチウェルプレート上における結合活性評価について検討を行った。

【結果・考察】

合成した蛍光性リガンドが C1b ドメインと結合することで蛍光波長が短波長側にシフトし、かつ蛍光強度が顕著に増大することが明らかとなった (Figure 2a)。さらに PDBu との競合阻害実験を行ったところ、PDBu の濃度依存的に蛍光強度の減少と長波長シフトが見られた (Figure 2b)。このことから、リガンド候補化合物の競合的結合を蛍光の変化として検出するための蛍光性プローブとして用いることが可能であると示された。C1b ドメインへの結合が既知の化合物を用いた競合阻害アッセイでは RI を用いたアッセイ法による結果と高い相関性を示す結果が得られた。また、このことはマルチウェルプレートを用いた系でも同様に示された。

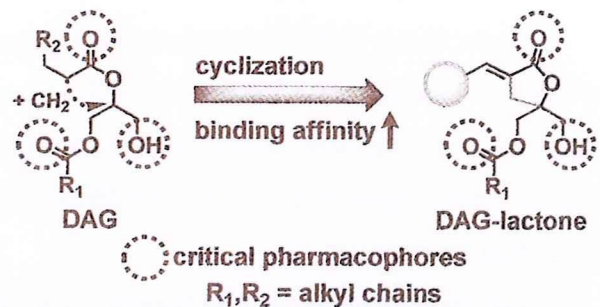


Figure 1. DAG-lactone の創出と R<sub>2</sub> への環境応答性蛍光基の導入

このように環境応答性蛍光基を有するプローブとして DAG-lactone 誘導体が機能し、非常に簡便な操作によって化合物の結合活性を評価できることが示唆された。

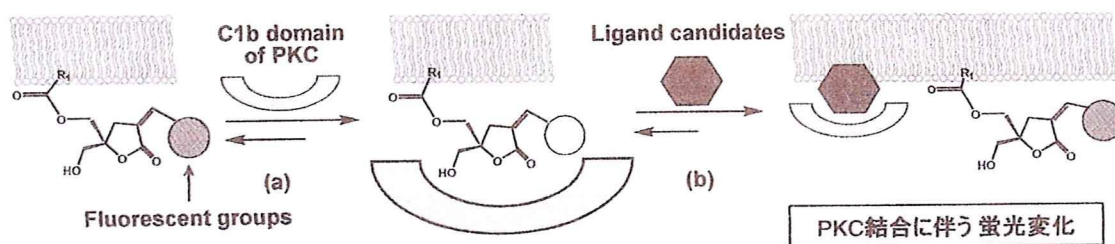


Figure 2. C1b ドメインへの蛍光性 DAG-lactone の結合(a)とリガンド候補化合物との拮抗による蛍光変化(b)

### Development of fluorescent-based wash-free assay methods for PKC ligands

Yoshiaki Okuda<sup>1,2\*</sup>, Wataru Nomura<sup>1</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Nami Ohashi<sup>1</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

Protein kinase C (PKC) is serine/threonine-specific kinase. Under physiological condition, PKC is activated by binding of diacylglycerol (DAG) as a second messenger and the activation is correlated to important cellular signaling such as cell growth, differentiation, and apoptosis. PKC is also known as the target of tumor promoters such as phorbol dibutylate (PDBu). Thus, PKC is one of the attractive targets in cancer drug development.

DAG-lactone derivatives have been developed based the strategy that the pharmacophores of DAG is steadied by cyclization. The resulting DAG-lactones show increased binding affinity for PKC as phorbol esters such as PDBu. The binding affinity of PKC ligands have been evaluated by competitive assay against radio isotope (RI) labeled ligand, [<sup>3</sup>H]PDBu. For high-throughput screening of PKC ligands, simple assay is required as an alternative method to RI assay. In this study, fluorescent DAG-lactones were designed and synthesized by substitution of environment-sensitive fluorescent group for R<sub>1</sub> or R<sub>2</sub> group. The fluorescent DAG-lactone showed spectrum changes by binding to PKC and addition of competitive ligand, PDBu. The results indicated the synthetic DAG-lactone could be utilized as a fluorescent probe for binding to PKC C1b domain. Evaluation of binding affinity of known PKC ligands by fluorescent titration showed a reasonable correlation to RI assays. Furthermore, it was proved that the competitive assay could be applied to the assay on multi-well plates. The present results suggest that the environment-sensitive fluorescent probe would be utilized for high-throughput screenings of drug leads targeting PKC.

## HIV-gp41 の三量体構造に特異的な中和抗体を誘導する人工抗原ペプチド

(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研、<sup>2</sup>東京医歯大・疾患生命研、<sup>3</sup>国立感染研・エイズ研セ) ○大矢 亜紀<sup>1</sup>、  
 中原 徹<sup>1,2</sup>、野村 渉<sup>1</sup>、大庭 賢二<sup>3</sup>、田中 智博<sup>1</sup>、橋本 知恵<sup>1,2</sup>、鳴海 哲夫<sup>1</sup>、  
 村上 努<sup>3</sup>、山本 直樹<sup>3</sup>、玉村 啓和<sup>1,2</sup>

## 【背景】

現在、エイズの治療として数種の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤を組み合わせる多剤併用療法 (HAART) が効果的であるが、耐性ウイルスの出現や高額な治療費等の問題がある。新しい治療薬として HIV ワクチンの開発が期待されているが、今なお困難を極めている。我々は新しい作用点である感染の初期過程の膜融合に注目し、HIV ワクチンを開発することを目指した。

## 【方法】

HIV-gp41 の helix 領域にある N36 3 量体構造は感染初期過程の膜融合で重要な働きをする。そこで、その構造を特異的に認識する抗体を誘導するための抗原分子を合成し、誘導された抗体により膜融合及び感染を阻害することができると考えた (Figure 1)。まず、3 量体構造を保持させるために等価なリンカーを持つ C<sub>3</sub> 対称性の新規低分子テンプレートを合成した。テンプレート上に N36 ペプチドを thiazolidine ligation によって導入することで N36 3 量体構造を模倣した抗原分子を創製した。マウスを用いた抗体誘導実験によって抗体誘導能、および産生される抗体の選択性を確認した。

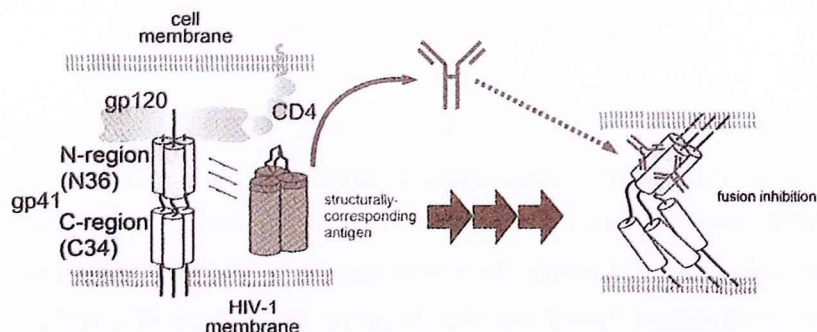


Figure 1. Development of an antigen peptide inducing neutralizing antibodies specific to the HIV-gp41 trimer

## 【結果・考察】

合成した人工抗原分子の CD スペクトル測定を行った。その結果、三量体では単量体よりも $\alpha$ -ヘリックス性が増加することが明らかになり、新規低分子テンプレート上での N36 3 量体構造の形成が示唆された。また、C34 と混合させると $\alpha$ -ヘリックス性が増加した。C34 3 量体は膜融合過程において N36 3 量体と相互作用し 6 量体を形成することが知られており、合成した抗原分子は天然の構造を反映していることが示された。マウスを用いた免疫実験では抗体誘導が確認された。3 量体型抗原から得られた血清では N36 単量体よりも N36 3 量体に対する抗体価が高いことから、3 量体構造を特異的に認識する抗体が誘導されていることが示された。また、この血清は N36 単

量体免疫から得られた血清よりも高い中和活性を示した。最近になって HIV-1 感染者のメモリー B 細胞から得られた抗体が抗原構造認識能を有し、強い中和活性を有することが Burton らによって報告された[1]ことから立体構造特異的抗体を誘導する抗原分子デザインは HIV ワクチンとして有効であると考えられる。

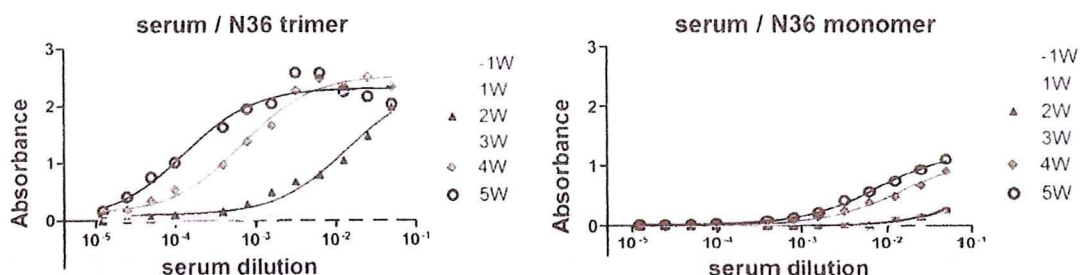


Figure 2. Results of Serum titer ELISA of antibodies induced by N36 trimeric antigen

### Development of an antigen peptide inducing neutralizing antibodies specific to the HIV-gp41 trimer

Aki Ohya<sup>1\*</sup>, Toru Nakahara<sup>1,2</sup>, Wataru Nomura<sup>1</sup>, Kenji Ohba<sup>3</sup>, Tomohiro Tanaka<sup>1</sup>, Chie Hashimoto<sup>1,2</sup>, Tetsuo Narumi<sup>1</sup>, Tsutomu Murakami<sup>3</sup>, Naoki Yamamoto<sup>3</sup>, Hirokazu Tamamura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, <sup>3</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

Highly active anti-retroviral therapy (HAART), which utilizes a combination of HIV protease inhibitors and reverse transcriptase inhibitors, is an effective therapy of AIDS. However, HAART involves serious problems such as the emergence of multi-drug resistant strains and the high cost of therapy. As a new approach for AIDS therapy, artificial antigen molecules were synthesized based on the dynamic structures of envelope proteins during HIV-1 entry. HIV-1 gp41 plays a pivotal role in membrane fusion process of HIV-1 initial infection, and contains the N-terminal helix region (N36). Thus, the antibody which recognizes N36 trimer in a structure-specific manner could block HIV-1-entry. To construct a mimetic of N36 trimer, the synthesized N36 peptides were assembled on a C3-symmetric template. The antiserum produced by immunization of an N36 trimeric form antigen showed higher affinity for N36 trimer than for N36 monomer. Moreover, it was revealed that the antiserum has more potent inhibitory activity against HIV-1 infection than that of N36 monomer. Our results indicate the effectiveness of antigen design for to HIV vaccine.

[1] L. M. Walker, et. al., *Science*, 3 September 2009 (10.1126/science.1178746).

8TG-am05

エイズワクチンを指向した宿主受容体 CXCR4 由来抗原分子の創製

橋本 知恵<sup>1,2</sup>, 野村 渉<sup>1</sup>, 田中 智博<sup>1</sup>, 中原 徹<sup>1,2</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 大庭 賢二<sup>3</sup>, 上 努<sup>3</sup>, 山本 直樹<sup>3</sup>, 玉村 啓和<sup>1,2</sup> (1東京医歯大・生材研, 2東京医歯大院・疾患生命科学教育部, 3感染研・エイズ研セ)

【目的】これまで HIV-1 を標的としたエイズワクチン開発研究が展開されてきたが、HIV-1 の易変異性から成功には至っていない。また、現在行われている複数の抗 HIV 薬を投与する多剤併用療法は、治療費が高価であり、長期間の投与により副作用も生じてしまう。そのため、投与回数が少なく経済的に負担の軽いワクチンの開発が望まれている。本研究では変異しやすい HIV-1 ではなく、宿主細胞への侵入時に HIV-1 が利用する受容体の 1 つである CXCR4 を取り上げた。

【方法】CXCR4 の細胞外領域は N 末端領域と 3 つの細胞外ループからなる。このうち、HIV-1 との結合に重要とされている 39 アミノ酸残基からなる N 末端領域を基に抗原分子の創製を行った。N 末端領域をオーバーラップする 3 種類のペプチド Nt-1m-3m (m: monomer) に分けて合成することとした (図)。また、ペプチドの抗体誘導能向上のため、テンプルト上に Nt-1m-3m を集積させた 4 価抗原分子 Nt-1q-3q (q: quadrivalent) を設計した。これらをマウスに免疫し、ELISA 法により抗体誘導能を評価した。

【結果および考察】ELISA 法の結果、Nt-1 の配列は顕著な抗体誘導能を示し、それに次いで Nt-3 の配列も抗体誘導能を示した。しかし、Nt-2 の配列は顕著な抗体誘導能を示さなかつた。また、誘導された抗体を用いて、CXCR4 結合試験および HIV 侵入阻害試験を行い、宿主由来タンパク質を標的としたワクチンデザインの有効性を検討した。

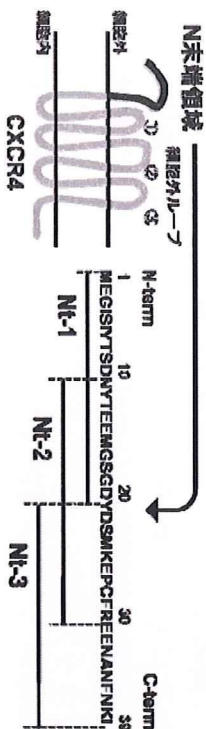


図. 3 種類の CXCR4 N 末端領域断片ペプチド

口頭発表 28TG-am05

28 日 9:48~10:00

T-G 会場 津島会場 1F B12

化学系薬学 医薬品設計1

浦野 泰照 (東大院薬)

エイズワクチンを指向した宿主受容体 CXCR4 由来抗原分子の創製

Synthesis of Host Receptor CXCR4-based Antigen Molecules for AIDS

Vaccine

○橋本 知恵<sup>1,2</sup>, 野村 渉<sup>1</sup>, 田中 智博<sup>1</sup>, 中原 徹<sup>1,2</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 大庭 賢二<sup>3</sup>, 村上 努<sup>3</sup>, 山本 直樹<sup>3</sup>, 玉村 啓和<sup>1,2</sup>

(1 東京医歯大・生材研, 2 東京医歯大院・疾患生命科学教育部, 3 感染研・エイズ研セ)



8TG-am08

光を用いた PKC リガンド結合評価法の開発

大橋 南美<sup>1</sup>, 野村 渉<sup>1</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 奥田 善章<sup>1,2</sup>, 伊倉 貞吉<sup>2</sup>, 伊藤 暢聡<sup>2</sup>, 田 清嗣<sup>2</sup>, E Nancy LEWIN<sup>4</sup>, M Peter BLUMBERG<sup>4</sup>, 玉村 啓和<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東京医歯大・材研, <sup>2</sup>東京医歯大院・生命疾患研, <sup>3</sup>東京医歯大・難治研, <sup>4</sup>Laboratory of Cancer Biology and Genetics, Center for Cancer Research, NCI, NIH)

口頭発表

28TG-am08

28 日 10:24~10:36

T-G 会場 津島会場 1F B12

化学系薬学 医薬品設計2

棚谷 綾 (お茶の水大)

蛍光を用いたPKCリガンド結合評価法の開発

Development of PKC ligands evaluation methods based on fluorescence

【目的】蛋白質を標的としたリガンド結合評価法において検出に蛍光を用いることにより、ハイスループットスクリーニングへの応用が期待できる。演者らは、がんやアルツハイマー型痴呆症に関与することから有望な創薬標的の1つであるプロテインキナーゼC(PKC)を取り上げ、蛍光標識したリガンド結合ドメイン(8C1b ドメイン)もしくは標準リガンド(DAG-lactone 誘導体)を用いる2種類のリガンド結合評価法の開発を行った。

【方法】蛋白質側からのアプローチでは、PKCδアミノザイムの8C1b ドメインに環境応答性蛍光団を導入した蛍光性8C1b を作製した。Fmoc 固相合成法および Native Chemical Ligation 法を用いて蛍光性8C1b を合成し、リガンドであるホルボールエステール(PDBu)の結合活性を評価した。その後、リガンド滴定実験で蛍光スペクトル変化の測定を行った。リガンド標識法からのアプローチでは、合成PKCリガンドの1つである DAG-lactone の蛍光誘導体を合成した。合成した蛍光性 DAG-lactone の PKC に対する PDBu 結合阻害活性、蛍光特性、更にリガンド競合阻害実験を行った。

【結果および考察】蛍光性8C1b は野生型と同等のホルボールエステル結合を示した。リガンド滴定実験において蛍光スペクトル変化と極大波長のシフトが確認され、作製した蛍光性8C1b がリガンド結合評価に利用できた。環境応答性蛍光団を持つ DAG-lactone はホルボールエステルとの競合阻害が蛍光変化によって検出できた。また、リガンドの結合阻害実験で RI 実験との相関性が示された。これら2種類のオルソゴナルな蛍光を用いた評価系を利用することでより精度の高いリガンド評価系の構築が期待できる。



図. 蛍光標識された8C1b と DAG-lactone

○大橋 南美<sup>1</sup>, 野村 渉<sup>1</sup>, 鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 奥田 善章<sup>1,2</sup>, 伊倉 貞吉<sup>2</sup>, 伊藤 暢聡<sup>2</sup>, 吉田 清嗣<sup>2</sup>, LEWIN E Nancy<sup>4</sup>, BLUMBERG M Peter<sup>4</sup>, 玉村 啓和<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研, <sup>2</sup>東京医歯大院・生命疾患研, <sup>3</sup>東京医歯大・難治研, <sup>4</sup>Laboratory of Cancer Biology and Genetics, Center for Cancer Research, NCI, NIH)

新規アミド結合等価体クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究  
 海 哲夫<sup>1</sup>, ○清家 俊輔<sup>1,2</sup>, 野村 涉<sup>1</sup>, 玉村 啓和<sup>1,3</sup> (1東京医歯大・生材研, 2東京大理, 3東京医歯大・疾患生命教育学部)

口頭発表

29TF-am03

29 日 9:24~9:36

T-F 会場 津島会場 1F E11

化学系薬学 アミノ酸・ペプチド6

山内 貴靖 (星薬大医薬研)

新規アミド結合等価体クロロアルケン型ジペプチドイソスターの  
 合成研究

Endeavors for the synthesis of chloroalkene dipeptide isosteres

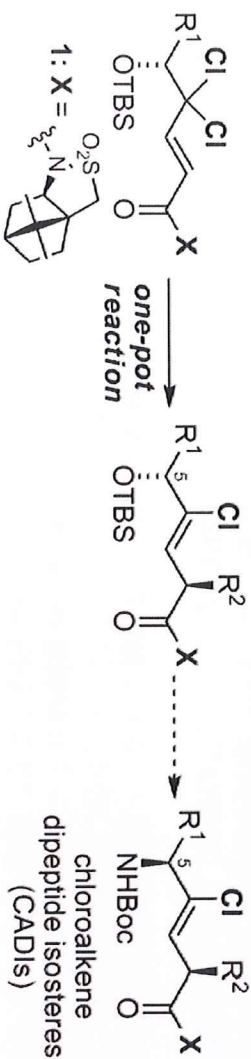
鳴海 哲夫<sup>1</sup>, ○清家 俊輔<sup>1,2</sup>, 野村 涉<sup>1</sup>, 玉村 啓和<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>東京医歯大・生材研, <sup>2</sup>東京理大理, <sup>3</sup>東京医歯大・疾患生命教育学部)

【目的】 ペプチド結合をオレフィン類で置換したアルケン型ジペプチドイソスターは、ペプチドリード創薬において重要なアミド結合等価体である。今回我々は新規アミド結合等価体として、ペプチド結合をクロロオレフィンで置換したクロロアルケン型ジペプチドイソスターを設計し、本化合物の効率的合成法の開発を目指し、側鎖官能基の位置及び立体選択的導入法について検討した。

【方法】 Benzaldehyde から誘導した分子内にキラル補助基を有する鍵中間体 **1** に対して、Gilman 型有機銅試薬を用いた一電子還元反応による Z 型クロロアルケン骨格の構築、続く不斉アルキル化反応による側鎖官能基の立体選択的導入を one-pot 反応で行った。

【結果・考察】 one-pot 反応を精査した結果、Z 型クロロアルケン骨格の構築および高立体選択的な側鎖官能基の導入に成功した。さらに、5 位への窒素官能基導入法についても検討したので併せて報告する。



9TG-am05

V-1外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの  
造活性相関研究

鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 落合 千裕<sup>1</sup>, 山田 裕子<sup>1</sup>, 吉村 和久<sup>2</sup>, 原田 恵嘉<sup>2</sup>, 大橋 南美<sup>1</sup>,  
村 涉<sup>1</sup>, 松下 修三<sup>2</sup>, 玉村 啓和<sup>1</sup>(<sup>1</sup>東京医歯大・生体材料工学研,<sup>2</sup>熊本大エイ  
学センター, <sup>3</sup>東京医歯大・疾患生命科学研究所)

口頭発表 29TG-am05

29 日 9:48~10:00

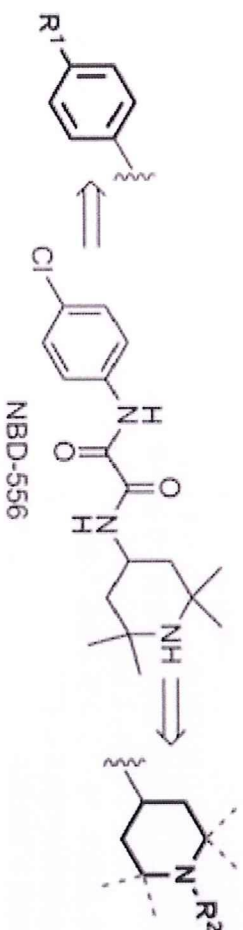
T-G 会場 津島会場 1F B12

化学系薬学 天然物・生体由来医薬品

青山 洋史 (東大分生研)

CD4 ミミックは CD4-gp120 結合阻害スクリーニングにより gp120 の CD4 結合部  
位に結合する化合物として同定された HIV 侵入阻害剤である。また、本化合物は  
gp120 結合時に可溶性 CD4 結合時と類似した構造変化を誘起することから、低分子  
CD4 ミミックとしても注目されている。これまで我々は、CD4 ミミックと CD4i  
抗体とを併用することで、CD4i 抗体の中和活性を増強することを明らかにしてお  
り、CD4 ミミックは保存領域に対する抗体の中和活性を増強する併用剤としても期待さ  
れている。しかしながら、CD4 ミミック誘導体は細胞毒性が高く、gp120 との結合  
活性が低いいため、そのままでの臨床応用は困難であると思われる。

今回我々は gp120 との相互作用に重要と示唆されている NBD-556 の芳香環パラ位  
を様々な置換基に置き換えた種々の芳香環を持つ化合物群を合成した。さらに、こ  
れまでに構造活性相関が明らかにされていないピペラジン環についても種々の誘導  
体を合成した。これら化合物に対し、gp120 構造変化誘起能、細胞毒性および抗 HIV  
活性について評価した。これら化合物の構造活性相関研究について報告する。



HIV-1外被タンパク質gp120の構造変化誘起を指向した低分子

CD4ミミックの構造活性相関研究

SAR study of CD4 mimics inducing conformational changes in an HIV-1  
envelope protein gp120

○鳴海 哲夫<sup>1</sup>, 落合 千裕<sup>1</sup>, 山田 裕子<sup>1</sup>, 吉村 和久<sup>2</sup>, 原田 恵嘉<sup>2</sup>,

大橋 南美<sup>1</sup>, 野村 涉<sup>1</sup>, 松下 修三<sup>2</sup>, 玉村 啓和<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京医歯大・生体材料工学研,<sup>2</sup>熊本大エイズ学センター,<sup>3</sup>東京医歯大・疾  
患生命科学研究所)