

201029004B

平成 20-22 年度 厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策事業

課題番号：H20-エイズ-一般-004

**Vif/APOBEC3Gの相互作用を標的とした
新規抗HIV-1薬の開発**

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

平成 20-22 年度 総合研究報告書

平成 23 年 5 月

研究代表者 高折 晃史

(京都大学・医学研究科 教授)

目次

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

I. 総括研究報告書	-----	1
研究代表者：高折 晃史（京都大学医学研究科）		
II. 分担研究報告書		
1. 研究分担者：高折 晃史（京都大学医学研究科）	-----	3
2. 研究分担者：梁 明秀（横浜市大）	-----	5
3. 研究分担者：木曾 良明（京都薬科大学）	-----	9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11

平成 20~22 年度 総合研究報告書

I. 総合研究報告書	-----	13
研究代表者：高折 晃史（京都大学医学研究科）		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21

総括研究報告書

Vif/APOBEC3Gの相互作用を標的とした新規抗HIV-1薬の開発

課題番号：H20-エイズ-一般-004

研究代表者：高折晃史（京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学 教授）

研究分担者 錦織桃子（京都大学医学研究科 助教）、梁 明秀（横浜市立大学 教授）、
木曾 良明（京都薬科大学 教授）、小林 正行（京都大学医学研究科 助教）

研究要旨

Vif/APOBEC3Gの相互作用を標的とした新規抗HIV-1薬の開発へ向け、複数の低分子化合物ハイスループットスクリーニング系を確立し、一次、二次スクリーニングを行い、候補化合物を同定した。さらに、それら候補化合物より、抗HIV-1活性を持つ化合物を6つまで絞り込んだ。

A. 研究目的

HIV-1感染は、HAARTの出現によりウイルス複製をある程度制御可能になったとはいえ、一方でその長期服用による副作用、また薬剤耐性の出現が大きな問題となっており、これらの克服に向け、新規作用機序の抗HIV-1薬の早期開発が待たれている。HIV-1 Vifは、ウイルス複製およびAIDS発症に必須の蛋白であるが、その機能の本態は、本来HIV-1の標的細胞が有する抗HIV-1宿主因子APOBEC3Gを中和することであることが近年明らかにされた。Vifがウイルス複製にとって必須の蛋白であること、およびVif/APOBEC3Gの相互作用の分子機構が詳細に明らかにされたことにより、これらの分子およびその相互作用は、新規の抗HIV-1薬の絶好の標的と考えられる。そこで、本研究では、Vif/APOBEC3G両分子およびその相互作用を標的とした新規抗HIV-1薬の開発を目指した研究を行った。

B. 研究方法

昨年度の研究結果として、前述の三つの柱のうち特に「①VifによるAPOBEC3Gのユビキチン依存性分解を阻害する化合物」に関して、約2万の低分子化合物ライブラリーを用いた一次スクリーニング、さらにウエスタン法を用いた二次スクリーニングにより24の候補化合物を同定した。これら候補化合物について、本年度はウイルス感染実験によりin vitroにおける抗HIV-1活性の確認、候補化合物の作用機序の同定およびリード化合物の選択とその機能解析を目的として研究を行った。

分担研究者の梁は、無細胞合成系を用いたスクリーニング系により平成21年度までに同定された253個の候補化合物について、本年度はイムプロット法を用いた2次スクリーニングおよび候補化合物の作用機序の同定を目的とした研究を行った。

分担研究者の木曾は、スクリーニングの際のポジティブコントロールとして、すでに報告されているIMB-26の合成を行った。また

さらに、上記の候補化合物の骨格構造に関して、コンピューターシミュレーションを用いて、共通の化合物構造等を解析した。

(倫理面への配慮)
特に存在しない。

C. 研究結果

VifによるAPOBEC3Gのユビキチン依存性分解を阻害する化合物に関しては、ウイルス感染実験において2つの化合物がVif依存性の抗HIV-1活性を示すことを確認し、作用機序についてもVifによるAPOBEC3Gのユビキチン化より下流、プロテオソームより上流であることが判明した。さらに分担研究者の木曾により9つの類似化合物が抽出され、そのうち2つがAPOBEC3GのVifによる分解を阻害すること、さらにそのうちの1つがウイルス感染実験により抗HIV-1活性を示すことが判明した。

また、無細胞合成系スクリーニングで得られた253の候補化合物のうち3つの候補化合物の抗HIV-1活性を確認した。

D. 考察

Vif/APOBEC3Gの相互作用は、新規の抗HIV-1薬の絶好の標的と考え、本研究を提案した。実際、すでに我々が計画したと同様の方法を用いて複数のグループにより候補物質が同定され報告された。本年度は、2つの異なる一次スクリーニング系を用いて同定された候補化合物から、さらなる絞り込みを行い、実際抗HIV-1活性を有する化合物を得ることができた。これは、本アプローチの方向性の妥当性を示しているといえる。引き続き、薬理的解析等を通じて、適切なリード化合物の選択が期待できると考える。

E. 結論

Vif/APOBEC3Gの相互作用を標的とした新規抗HIV-1薬の開発に関する研究が順調に進んだ。本年度の研究により、新規の抗HIV-1薬の候補となる低分子化合物を合計6つ同定することができたが、これらの実用化に向けてさらに研究が必要である。

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

分担研究報告書

研究分担者 高折晃史 京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発へ向け、細胞を用いた低分子化合物ハイスループットスクリーニング系を確立し、一次、二次スクリーニングを行い、候補化合物を同定した。さらに、それら候補化合物より、抗 HIV-1 活性を持つ化合物を3つまで絞り込んだ。

A. 研究目的

本研究では、Vif/APOBEC3G 両分子およびその相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発を目指し、低分子化合物のスクリーニングを行い、その結果同定された候補化合物のさらなる絞り込みを行った。

B. 研究方法

- ①Vif による APOBEC3G のユビキチン依存性分解を阻害する化合物
- ②APOBEC3G の発現および活性を調節する化合物
- ③Vif のユビキチン依存性分解を促進する化合物に関する複数のスクリーニングのうち、①に関して、GFP-APOBEC3G と Vif の共発現により、Vif による APOBEC3G の分解を定量化できる系を樹立して、本系を用いて低分子化合物スクリーニング、さらに二次スクリーニングを行い 24 の候補化合物を同定した。これら化合物について、感染実験による抗 HIV-1 活性の確認、候補化合物の作用機序の同定およびリード化合物の選択とその機能解析を目的として研究を行った。

(倫理面への配慮)

特に存在しない。

C. 研究結果

Vif による APOBEC3G のユビキチン依存性分解を阻害する化合物に関しては、ウイルス感染実験において2つの化合物がVif依存性の抗 HIV-1 活性を示すことを確認し、作用機序についても Vif による APOBEC3G のユビキチン化より下流、プロテオソームより上流であることが判明した。さらに分担研究者の木曾により9つの類似化合物が抽出され、そのうち2つが APOBEC3G の Vif による分解を阻害すること、さらにそのうちの1つがウイルス感染実験により抗 HIV-1 活性を示すことが判明した。

D. 考察

本年度は、一次スクリーニング系を用いて同定された候補化合物から、さらなる絞り込みを行い、実際抗 HIV-1 活性を有する化合物を得ることができた。これは、本アプローチの方向性の妥当性を示しているといえる。引き続き、薬理的解析等を通じて、適切なりード化合物の選択が期待できると考える。

E. 結論

Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした

新規抗 HIV-1 薬の開発に関する研究が順調に進んだ。本年度の研究により、新規の抗 HIV-1 薬の候補となる低分子化合物を合計 3 つ同定することができたが、これらの実用化に向けてさらに研究が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujita H, Nishikori M, Takaori-Kondo A, Yoshinaga N, Ohara Y, Ishikawa T, Haga H, and Uchiyama T: A case of HIV-associated lymphoproliferative disease that was successfully treated with highly active antiretroviral therapy. *International Journal of Hematology* 91(4):692-8, 2010.

2) Kei Sato, Taisuke Izumi, Naoko Misawa, Tomoko Kobayashi, Yoshiki Yamashita, Masahide Ohmichi, Mamoru Ito, Akifumi Takaori-Kondo, and Yoshio Koyanagi: Remarkable Lethal G-to-A Mutations in *vif*-Proficient HIV-1 Provirus by Individual APOBEC3 Proteins in Humanized Mice. *Journal of Virology* 84(18):9546-56, 2010.

3) Makiko Hirai, Norimitsu Kadowaki, Toshio Kitawaki, Haruyuki Fujita, Akifumi Takaori-Kondo, Ryutaro Fukui, Kensuke Miyake, Takahiro Maeda, Shimeru Kamihira, Yoshiki Miyachi, Takashi Uchiyama: A proteasome inhibitor bortezomib suppresses immunostimulatory activity of human plasmacytoid dendritic cells by targeting

intracellular trafficking of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis. *Blood in press*.

4) Taisuke Izumi, Katsuhiko Io, Masashi Matsui, Kotaro Shirakawa, Masanobu Shinohara, Yuya Nagai, Masahiro Kawahara, Masayuki Kobayashi, Hiroshi Kondoh, Naoko Misawa, Yoshio Koyanagi, Takashi Uchiyama, and Akifumi Takaori-Kondo*: HIV-1 Vif interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(48):20798-803, 2010.

2. 学会発表

1) 高折 晃史：Vif の新規機能とその分子メカニズム。第 12 回白馬シンポジウム in 徳島、徳島、平成 22 年 5 月 14-5 日(invitation)

2) 高折 晃史：シンポジウム 9 ウイルストロピズムのダイナミクス「APOBEC3G とレトロウイルスの種特異性」第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、平成 22 年 11 月 7~9 日(Invitation)

3) 高折 晃史：シンポジウム 4 Restriction Factor 「APOBEC3G」第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、平成 22 年 11 月 24~26 日(Invitation)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

分担研究報告書

研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学 教授

研究要旨 HIV-1 感染症の成立には宿主タンパク質と HIV-1 タンパク質間の相互作用が必須である。特に宿主因子による HIV-1 タンパク質の翻訳後修飾はウイルスの増殖やその病原性発現に重要な役割を示す。本研究課題では Vif/APOBEC3G を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発を目指し、小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を用いて新規スクリーニングを構築した。本スクリーニング法を活用して、約 1 万種類の化合物をスクリーニングした結果、阻害効果の高い化合物 10 種類がスクリーニング産物として得られた。さらに、これらの化合物および類縁化合物は抗 HIV-1 活性を有することが確認された。

A. 研究目的

HIV-1 タンパク質翻訳後修飾は HIV-1 の複製の各ステップにおいて時間的、空間的な宿主-ウイルス相互作用を形成し、ウイルス複製や病原性発現にきわめて重要な役割を果たすことが知られている。本研究課題では、Vif/APOBEC3G 両分子およびその相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発を目指し、我々が開発した小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を用いて新規スクリーニングを構築する。また、約 1 万種類の低分子化合物ライブラリーを用いて、実施に Vif-APOBEC3G 間の相互作用や APOBEC3G のユビキチン化を阻害する薬剤を見出し、それらの抗 HIV-1 活性を考察する。

B. 研究方法

HIV-1 感染症の成立には宿主タンパク質と HIV-1 質間の相互作用が必須である。HIV-1 タンパク質の翻訳後修飾を基盤とした感染分子制御機構を明らかにし、宿主因子を標的とした新しい抗エイズ薬の開発を目指している。しかしながら従来の細胞を用いた薬剤スクリーニングは、①細胞そのものに薬剤を投与する為、阻害効果が確認出来ても予想する相互作用を阻害しているか判断しにくい②スループット性が著しく低く、試験出来る化合物数が限られる、などの問題がある。標的となるタンパク質を個別に調製し薬剤スクリーニングを行うにしても、調製タンパク質の可溶化、および活性保持に難を持つこと

が多い。我々はこれまでに小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を用いて活性を保持した宿主タンパク質と HIV タンパク質を調製し相互作用解析を行ってきた。この技術を用いれば、①相互作用を行うタンパク質のみでスクリーニング系を構築できるため、結果の解釈が明快、②タンパク質調製が全自動化されており、また高感度なタンパク質間相互作用検出システムと組み合わせることでハイスループットスクリーニング系を構築できる、③真核型タンパク質合成システムであるため、調製タンパク質の品質が高い、などの利点を持つ。HIV-1 Vifによる APOBEC3G 分解には、Vif と APOBEC3G との相互作用および、Vif と Cullin 5-elongin B-elongin C-Rbx1 との複合体 (Vif-E3 リガーゼ複合体) 形成が重要である。無細胞タンパク質合成技術を用いて調製

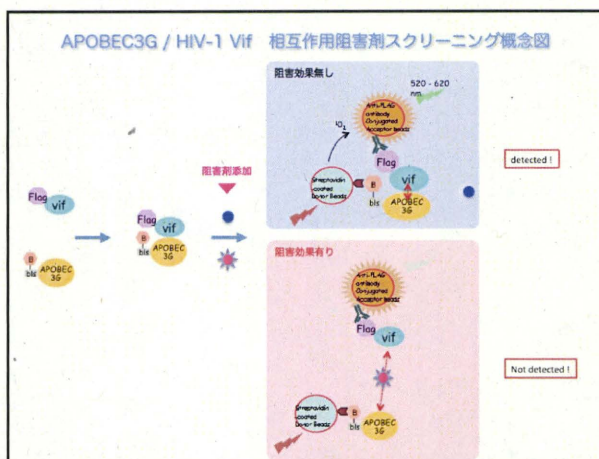


図1 Vif-APOBEC3G 相互作用検出概念図

したタンパク質は Vif-E3 リガーゼ複合体を形成できることが確認され、また Vif-E3 リガーゼ複合体による APOBEC3G のユビキチン化活性、および APOBEC3G のシチジンデアミネーション活性の保持が確認された。これら活性を保持したタンパク質と相互作用を高感度・ハイスループットに検出出来るアルファスクリーンシステムを用いて、Vif-APOBEC3G 相互作用阻害剤スクリーニングを構築した (図 1)。

次に約 1 万種類の低分子化合物ライブラリーを用いた無細胞基盤のスクリーニングにより、Vif-A3G 間相互作用や Vif 依存性 A3G ユビキチン化を阻害する低分子化合物を複数同定した。また、これらの化合物の Vif-A3G 経路依存的な抗 HIV 活性阻害を検出する細胞実験系を構築し、複数の 3 種類の化合物の抗 HIV 作用を確認した (図 2)。また、コムギ無細胞系を用いて Vif-A3G 複合体を精製し、NMR 解析を実施中である。

(倫理面への配慮)
特に存在しない。

C. 研究結果

1 万種類の化合物をスクリーニングした結果、阻害効果の高い化合物 10 種を含む 253 種が 1 次スクリーニング産物として得られた (図 2)。約 2 万の低分子化合物ライブラリーを用いた細胞基盤のスクリーニングにより、Vif 依存性 A3G 分解を阻害する低分子化合物を 10 種類同定した。また、細胞株を用いた HIV 感染実験により、これらの化合物が A3G 依存性かつ非依存性に抗 HIV 活性を示すことを確認した。また、同じライブラリーを用いた無細胞タンパク質合成系のスクリーニングにより、Vif/A3G タンパクの結合を阻害するもの、A3G のユビキチン化を阻害するもの、A3G の重合を促進し、粒子内への取り込みを促進するものの 3 種類に分類した。また、候補化合物の類縁化合物を購入し、これらの抗 HIV-1 活性も確認している。また、バクテリア発現系においては全く不溶な Vif/A3G タンパク質複合体を無細胞タンパク

質合成系にて合成かつ精製し、NMR 解析を施行中である

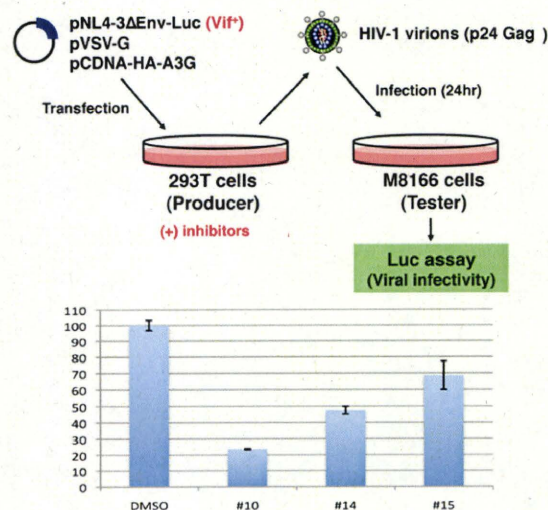


図 2. A3G 特異的抗 HIV 活性法 (上) とその実施例 (下)

D. 考察

タンパク質—タンパク質間結合、ユビキチン化、タンパク質重合という高次のタンパク質機能を基盤とした新規のスクリーニング系を構築した。また、本スクリーニングにより実際に抗 HIV-1 活性を有する候補化合物を同定できた。

E. 結論

Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発に関する研究が順調に進んだ。今後は得られた候補化合物および類縁化合物の最適化を推進することで、宿主—s ウイルス間相互作用を標的とした新たな抗ウイルス薬の開発に結びつける。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*, 2011 Feb 4. [Epub ahead of print]
2. Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits

- HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J Biol Chem*, 2011 Jan 12. [Epub ahead of print]
3. Yoshizaki S, Nishi M, Kondo A, Kojima Y, Ryo A. Vaccination with human induced pluripotent stem cells creates an antigen-specific immune response against HIV-1 gp160. *Frontiers in Microbiology*, in press.
 4. Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of saffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis*. In press.
 5. Kojima Y, Ryo A. Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction. *Frontiers in Microbiology*, Published on 09 Sep 2010
 6. Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology*, 7:90, 2010.
 7. Matsuura I, Chiang KN, Lai CY, He D, Wang G, Ramkumar R, Uchida T, Ryo A, Lu K, Liu F. Pin1 promotes transforming growth factor-beta-induced migration and invasion. *J Biol Chem*. 285(3):1754-1764, 2010.
 8. Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamaguchi K, Kojima Y, Suzuki K, Koumitsu N, Nagashima Y, Nagahama K, Ehara M, Hirayasu Y, Ryo A, Aoki I, Yamanaka S. Thymic Alterations in GM2 Gangliosidosis Model Mice. *PLoS ONE*, 10;5(8). pii: e12105, 2010.
 9. Kobiyama K, Jounai N, Ishii KJ, Horii T, Suzuki K, Ryo A, Takeshita F. Modulation of intracellular signaling using protein-transduction technology. *Crit Rev Immunol*. 30(5):395-421, 2010
 10. Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Jpn. *J Infect Dis*. 63(5):378-80, 2010.
 11. Shimada M, Yoshizaki S, Jounai N, Kondo A, Ichino M, Ryo A, Okuda K. DNA vaccine expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin fusion protein enhances cellular immunity. *Vaccine*, 12;28(31):4920-7, 2010.
 12. Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M, Pasalic Z, Bohlander SK, Ryo A, Tenen DG, Behre G. Elevated PIN1 expression by C/EBPalpha-p30 blocks C/EBPalpha-induced granulocytic differentiation through c-Jun in AML. *Leukemia*, 24(5):914-23, 2010.
 13. Yashima S, Yoshizaki S, Shinoda K, Yoshida A, Kondo A, Mizuguchi H, Ryo A, Okuda K, Shimada M. Co-administration of viral vector-based vaccines suppresses antigen-specific effector CD8 T cells. *Vaccine*, 28(18):3257-64, 2010.
2. 学会発表
1. K Miyakawa, T Sawasaki, S Matsunaga, N Yamamoto, A Ryo, Identification of a Host Factor Antagonizing Vpu-Mediated Tetherin Down-Regulation. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, Dec. 2010.
 2. M Nishi, K Miyakawa, N Yamamoto, A Ryo, The Tumor Suppressor Apc Regulates HIV-1 Assembly and Release. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, Dec. 2010.
 3. S Matsunaga, Y Kojima, R Morishita, T Sawasaki, A Ryo, An In Vitro Cleavage Assay System for XmrV Protease by Wheat-Germ Cell Free Protein Production. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, Dec. 2010.
 4. M Nishi, K Miyakawa, N Yamamoto, A Ryo, The Tumor Suppressor APC Regulates HIV-1 Assembly and Release. The 10th Awaji International

- Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Sep. 2010.
5. A Ryo, Identification of host proteins Required for HIV-1 infection. 5th German-Japanese HIV Symposium, Keio University, Tokyo, May. 2010.
 6. K Miyakawa, A Ryo, A New Host Restriction Factor Promoting HIV-1 Particle Destruction. 5th German-Japanese HIV Symposium, Keio University, Tokyo, May. 2010.
 7. 梁 明秀 革新的技術を応用した次世代エイズ研究の展望, 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京・グランドプリンスホテル高輪, 2010 年 11 月.
 8. 正岡崇志, 杉浦 亙, 澤崎達也, 松永智子, 遠藤弥重太, 巽 正志, Shafer Robert, 山本直樹, 梁 明秀 コムギ無細胞合成 HIV プロテアーゼを用いた薬剤耐性高速検査法の開発, 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京・グランドプリンスホテル高輪, 2010 年 11 月.
 9. 宮川 敬, 澤崎達也, 松永智子, 山下暁朗, 山本直樹, 梁 明秀 包括的キノーム解析による HIV-1 Vpu のリン酸化調節機構の解明, 第 58 回ウイルス学会学術集会, 徳島・あわぎんホール, 2010 年 11 月.
 10. 稲垣奈都子, 武内寛明, 横山 勝, 佐藤裕徳, 梁 明秀, 俣野哲朗 SIV CA の N ドメインと C ドメインの機能的相互作用に関わるアミノ酸残基の同定, 第 58 回ウイルス学会学術集会, 徳島・あわぎんホール, 2010 年 11 月.
 11. 正岡崇志, 杉浦 亙, 澤崎達也, 松永智子, 遠藤弥重太, 巽 正志, Shafer Robert, 山本直樹, 梁 明秀 酵素活性を指標とした HIV プロテアーゼ薬剤耐性新規検査法の開発, 第 58 回ウイルス学会学術集会, 徳島・あわぎんホール, 2010 年 11 月.
 12. 島田 勝, 吉崎慎二, 奥田研爾, 梁 明秀 DNA Vaccine Expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin Fusion Protein Enhances Cellular Immunity. 第 58 回ウイルス学会学術集会, 徳島・あわぎんホール, 2010 年 11 月.
 13. 近藤麻美, 野村 渉, 玉村哲和, 鈴木陽一, 梁 明秀 亜鉛フィンガー-LEDGF 融合タンパクを用いた LV ベクターの配列特異的挿入法の開発の試み, 第 58 回ウイルス学会学術集会, 徳島・あわぎんホール, 2010 年 11 月.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
- なし。

分担研究報告書

研究分担者 木曾 良明 京都薬科大学 教授

研究要旨

Vif/APOBEC3G を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発を目指し、IMB-26 の合成、および、2nd スクリーニングヒット化合物の共通構造の抽出および誘導体の検討を行い、薬理的側面から本研究の推進ができた。

A. 研究目的

本研究では、Vif/APOBEC3G 両分子およびその相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発を目指し、薬理的側面から研究を展開する。

B. 研究方法

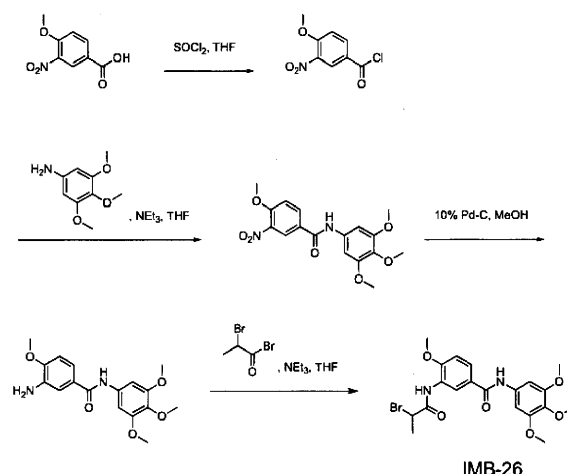
a) IMB-26 の合成

Scheme 1 に示す様に、4-メトキシ-3-ニトロ安息香酸を出発物質とし、テトラヒドロフラン溶液中、塩化チオニルを加えて還流し、酸塩化物へと変換した。これをテトラヒドロフラン溶液中、トリエチルアミンの塩基存在下、3,4,5-トリメトキシアニンと反応させアミド結合を形成し、中間体の4-メトキシ-3-ニトロ-N-(3,4,5-トリメトキフェニル)ベンズアミドへと変換した。得られた中間体のニトロ基を Pd-C 触媒による接触還元により、アミノ基へ変換させた。続いて、テトラヒドロフラン溶液中、トリエチルアミンの塩基存在下、2-ブロモプロピオニルブロミドを用いてアシル化を行い、粗生成物を得た。C₁₈ カラムを用いた逆相分取 HPLC により精製し、凍結乾燥後、IMB-26 を得た。MALDI-TOF MS 分析により分子量を同定し、HPLC 分析により純度を確認した。また、¹H-NMR 解析により化学構造を同定した。

b) 2nd スクリーニングヒット化合物の共通化学構造の抽出および誘導体の検討

2nd スクリーニングにより阻害活性が高かった 2 種の化合物は、共通する複素環構造をも

つことに着目した。ナミキ商事の ChemCupid® を用いて市販の類似化合物を複数回検索した。



Scheme 1. Synthetic route of IMB-26.

(倫理面への配慮)
特に存在しない。

C. 研究結果

比較対照の IMB-26 を得るために、既知の合成経路と同様の合成経路により合成し、収率良く（総収率 79%）、高純度（98.2%）の IMB-26 が得られた。

2nd スクリーニングにて阻害活性の高い 2 種の化合物について共通する特徴的な複素環構造を幾つか抽出し、その構造を骨格に持つ市販の誘導体を検索したところ、合計約 100 種が Hit した。その中から、共通する環

状構造を固定し、置換基構造の異なる化合物が9種あることを確認した。

D. 考察

報告された候補化合物の合成、本研究により同定された候補化合物の化学構造解析により、本研究を薬理的側面から十分な支援を行えたと考える。

E. 結論

Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発に関する研究が順調に進んだ。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Noriko Shimizu, Shigeru Sugiyama, Mihoko Maruyama, Yoshinori Takahashi, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Koushi Hidaka, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Ryota Kuroki, Yusuke Mori and Hiroyoshi Matsumura: Crystal growth procedure of HIV-1 protease-inhibitor KNI-272 complex for neutron structural analysis at 1.9 Å resolution. *Crystal Growth & Design*, **10** (7), 2990–2994 (2010).

2) Jeffrey-Tri Nguyen, Keiko Kato, Henri-Obadja Kumada, Koushi Hidaka, Tooru Kimura and Yoshiaki Kiso: Maintaining potent HTLV-I protease inhibition without the P3-cap

moiety in small tetrapeptidic inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**(6), 1832–1837 (2011)

2. 学会発表

1) Y. Kiso: Peptidomimetic chemistry: design of protease inhibitors, prodrug forms and click peptides. 12th Naples Workshop on Bioactive Peptides / 2nd Italy-Korea Symposium on Antimicrobial Peptides, ナポリ (イタリア)、平成 22 年 6 月 4–7 日

3) 日高興士, 安達基泰, 黒木良太, 濱田貴司, Rajesh Sankaranarayanan, 木村徹, 木曾良明: ロピナビル耐性を獲得した変異 HIV プロテアーゼに対するアロフェニルノルスタチン阻害剤の活性評価. 第 24 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、平成 22 年 6 月 12 日

4) 日高興士, 安達基泰, 黒木良太, 濱田貴司, Rajesh Sankaranarayanan, 木村徹, 木曾良明: ロピナビル耐性株由来の変異を導入した HIV プロテアーゼ誘導体の解析. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、平成 22 年 11 月 24–26 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし。

平成 22 年度 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
特になし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujita H, Nishikori M, Takaori-Kondo A, Yoshinaga N, Ohara Y, Ishikawa T, Haga H, and Uchiyama T	A case of HIV-associated lymphoproliferative disease that was successfully treated with highly active antiretroviral therapy	<i>Int J Hematol</i>	91(4)	692-8	2010
K Sato, T Izumi, N Misawa, T Kobayashi, Y Yamashita, M Ohmichi, M Ito, A Takaori-Kondo, and Y Koyanagi	Remarkable Lethal G-to-A Mutations in <i>vif</i> -Proficient HIV-1 Provirus by Individual APOBEC3 Proteins in Humanized Mice	<i>J Virol</i>	84(18)	9546-56	2010
T Izumi, K Io, M Matsui, K Shirakawa, M Shinohara, Y Nagai, M Kawahara, M Kobayashi, H Kondoh, N Misawa, Y Koyanagi, T Uchiyama, and A Takaori-Kondo	HIV-1 Vif interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication	<i>Proc Natl acad Sci USA</i>	107(48)	20798-803	2010
Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H	Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G	<i>J Biol Chem</i>	In press		2011
Yoshizaki S, Nishi M, Kondo A, Kojima Y, Ryo A	Vaccination with human induced pluripotent stem cells creates an antigen-specific immune response against HIV-1 gp160	<i>Frontiers in Microbiol</i>	In press		2011
Kojima Y, Ryo A	Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction	<i>Frontiers in Microbiol</i>	In press		2011
Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, Matano T	A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in	<i>Retrovirol</i>	7	90	2010

	simian immunodeficiency virus capsid proteins				
Shimada M, Yoshizaki S, Jounai N, Kondo A, Ichino M, <u>Ryo A</u> , Okuda K	DNA vaccine expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin fusion protein enhances cellular immunity	<i>Vaccine</i>	28(31)	4920-7	2010
N Shimizu, S Sugiyama, M Maruyama, Y Takahashi, M Adachi, T Tamada, K Hidaka, Y Hayashi, T Kimura, <u>Y Kiso</u> , H Adachi, K Takano, S Murakami, T Inoue, R Kuroki, Y Mori and H Matsumura	Crystal growth procedure of HIV-1 protease-inhibitor KNI-272 complex for neutron structural analysis at 1.9 Å resolution	<i>Crystal Growth & Design</i>	10 (7)	2990-4	2010
J Nguyen, K Kato, H Kumada, K Hidaka, T Kimura and <u>Y Kiso</u>	Maintaining potent HTLV-I protease inhibition without the P3-cap moiety in small tetrapeptidic inhibitors	<i>Bioorg Med Chem Lett</i>	21(6)	1832-7	2010

