

201226008B

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV侵入の動的超分子機構を標的とする  
ケミカルバイオロジー創薬研究

平成22年～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 鳴海 哲夫

平成25年（2013）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

**HIV侵入の動的超分子機構を標的とする  
ケミカルバイオロジー創薬研究**

平成22年～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 鳴海 哲夫

平成25年（2013）年 4月

目 次

I. 総合研究報告

HIV侵入の動的超分子機構を標的とする ケミカルバイオロジー創薬研究 鳴海 哲夫	----- 1
--	---------

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 22
--------------------	----------

III. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	----- 26
-----------------------	----------

## 厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

## 総合研究報告書

## HIV 侵入の動的超分子機構を標的とするケミカルバイオロジー創薬研究

研究者代表者 鳴海 哲夫 東京医科歯科大学生体材料工学研究所 助教

研究要旨 多剤併用療法や AIDS ワクチン研究が抱える課題の解決には、HIV の侵入から出芽に至る生命現象をこれまでとは異なる角度から改めて解析し、既存の情報を再構築する必要がある。本研究課題では、HIV の細胞侵入過程である動的超分子機構を標的として、これまでほとんど行われてこなかった有機合成化学に基づいたケミカルバイオロジー研究を行うことで、HIV の細胞侵入時の HIV 外被タンパク質と宿主側タンパク質との相互作用様式に関して、有機化学的手法による解析を行い、その知見に基づいた新規 HIV 侵入阻害剤の創製研究を実施した。平成 22 年度は、宿主側から HIV 側タンパク質への機能解析として、申請者らが見出した低分子 CD4 ミミックを化学修飾することで高度化した誘導体群を合成し、gp120 に与える構造変化、細胞毒性および抗 HIV 活性を評価することで、リード化合物 (NBD-556) の二つの gem-ジメチル基を二つのシクロヘキシル基に置換することで、NBD-556 と同等の構造変化誘起能を有し、低毒性かつより強力な抗 HIV 活性を有する誘導体 (HAR-171) の創出に成功した。平成 23 年度は、CD4 ミミック誘導体の構造最適化を深化しつつ、コレセプター CCR5/CXCR4 との相互作用に重要な役割を担う V3 loop 領域を模倣した V3 loop ペプチドをリード化合物として、部分ペプチドライブラリーを構築し、コレセプター結合活性および抗 HIV 活性を評価した。その結果、芳香環パラ位の塩素原子に加え、メタ位にフッ素原子を導入することで、HAR-171 の 2 倍程度の抗 HIV 活性および 1.5 倍程度の gp120 構造変化誘起能を有する HAR-431 を見出した。また、X4 指向性ウイルスの V3 loop 領域由来の部分ペプチドおよびそれらを組み合わせたシャッフルペプチド、ヘリックス領域を安定化する非天然アミノ酸を導入したペプチドミメティックを合成し、CXCR4 結合活性および抗 HIV 活性を評価した。その結果、BASE, STEM, TIP の全ての領域を含み、N 末端と C 末端をジスルフィド結合で環化した環状ペプチドにおいてのみ顕著な CXCR4 結合活性および抗 HIV 活性が見られた。平成 24 年度は、標的タンパク質 (gp120) の機能制御を目的として、HAR-431 をリード化合物として高活性化、低毒性化を目指し、CD4 ミミック誘導体のさらなる構造活性相関研究を行い、新規 HIV 侵入阻害剤の創製研究を実施した。その結果、クロロアニリン骨格の代わりに一炭素で酸素間を架橋したカテコール骨格を有する誘導体が顕著な抗 HIV 活性を示し、さらに大幅に細胞毒性が改善されることを見出した。これらの成果は、今後の HIV 侵入過程を標的とした創薬研究の進展に資するものである。なお、見出した研究成果を基に更なる構造活性相関研究が進行中である。

## A. 研究目的

HIV 感染症の化学療法では多剤併用療法が有効な治療法として確立されているが、長期投与による毒性の軽減や耐性ウイルス抑制の観点から、新規治療薬の開発が求められてい

る。また、感染予防や根本的治療を目指したエイズワクチンの開発は今もなお難しい状況になる。これら問題の解決には HIV の侵入から出芽に至る生命現象をこれまでとは異なる角度から改めて解析し、既存の情報を再構築

### 別添 3

する必要がある。一方、工学分野では化学を出発点に生命現象を解析するケミカルバイオロジー研究が盛んに行われ、様々なタンパク質において新たな情報が見出されている。このような背景のもと、HIV 関連タンパク質に対してケミカルバイオロジー研究を行い、HIV の関わる生命現象を有機化学的に解析し、原子・分子レベルの相互作用として理解することは極めて重要と考えられる。そこで本研究課題では、HIV 側および宿主側タンパク質の機能を模倣した有機分子を創製し、それらを用いて HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式を両方向から解析し、その知見に基づいた合理的分子設計により新規 HIV 侵入阻害剤の創製を目指す。

具体的には、有機合成化学の特長を活かして様々な新規機能性分子を合成・修飾し、それらを用いてウイルス側タンパク質(gp120)および宿主側タンパク質(CCR5/CXCR4)への機能解析を両方向から行う。これにより、HIV の細胞侵入時の HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式に関して従来法では達成困難な分子レベルでの知見が得られると考えられる。さらに、これらの知見をリガンド設計にフィードバックすることで、これらタンパク質の機能を制御可能な新規リガンドの創製が期待できる。また、コレセプターと相互作用する gp120 の V3 loop ミミックは、CCR5/CXCR4 の新規拮抗剤としての応用も期待できる。また、本研究課題で得られる HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式に関する詳細な情報は、現在 HIV ワクチン研究が直面している「有効なエピトープの枯渇」という問題に対して、重要なヒントを与えるものと考えられる。また、見出した新規リガンドに対し、有機化学的手法によって医薬品プロファイルを向上させることで、新規 HIV 侵入阻害剤の開発が期待できる。このように本

研究課題で得られる研究成果は、新規治療薬の開発から HIV 感染予防や治療へ向けた創薬研究への展開が十分に期待され、多剤併用療法が抱える課題（薬剤耐性ウイルスの出現や長期投与による副作用、高額な医療費）の克服が期待できる。

### B. 研究方法

平成 22 年度は HIV の細胞侵入の第一段階である gp120 と CD4 の相互作用様式の解析を目的として、gp120 の構造変化を誘起する CD4 ミミック誘導体の設計・合成を行った。申請者らが独自に見出した低分子 CD4 ミミックを三つのフラグメント（芳香環部位、オキサミド部位、ピペリジン部位）に分割し、それぞれ化学修飾した CD4 ミミック誘導体を合成し、それら化合物の生物活性（gp120 に与える構造変化、細胞毒性および抗 HIV 活性）を評価した。

### B. 研究方法

平成 22 年度は HIV の細胞侵入の第一段階である gp120 と CD4 の相互作用様式の解析を目的として、gp120 の構造変化を誘起する CD4 ミミック誘導体の設計・合成を行った。申請者らが独自に見出した低分子 CD4 ミミックを三つのフラグメント（芳香環部位、オキサミド部位、ピペリジン部位）に分割し、それぞれ化学修飾した CD4 ミミック誘導体を合成し、それら化合物の生物活性（gp120 に与える構造変化、細胞毒性および抗 HIV 活性）を評価した。

平成 23 年度は平成 22 年度に引き続き CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究を進めた。これまでの結果から、芳香環部位のクロロアニリン、ピペリジン環部位の嵩高い置換基が生物活性発現に重要であることが明らかにしている。そこで、平

### 別添 3

成 22 度の研究によって見出した HAR-171 をリード化合物として、高活性化および低毒性化など医薬品プロフィールを目指し、新規 CD4 ミミック誘導体を化学合成し、それら化合物の生物活性（抗 HIV 活性、細胞毒性、gp120 の構造変化誘起能）を評価した。また、HIV 側タンパク質から宿主側への機能解析として、コレセプターとの相互作用に重要な役割を担う V3 loop 領域を模倣した V3 loop ペプチドをリード化合物として、部分ペプチドライブラリーを構築し、ウイルス視点でのコレセプターの機能解析を行い、CXCR4 結合活性を評価した。

平成 24 年度は、過去二年間の研究で得られた HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式に関する知見を基に、HIV 外被タンパク質 gp120 の機能を制御する CD4 ミミックの構造活性相関研究を進めた。これまでの構造活性相関研究において見出した HAR-431 をリード化合物として、高活性化および低毒性化など医薬品プロフィールの向上を目指し構造活性相関研究を行った。具体的には、HAR-431 を三つのフラグメント（芳香環部位、オキサミド部位、ペリジジン部位）に分割し、それぞれ化学修飾した CD4 ミミック誘導体を合成し、それら化合物の生物活性（抗 HIV 活性、細胞毒性および gp120 の構造変化誘起能）を評価した。

#### CD4 ミミック誘導体の生理活性試験

細胞毒性および抗 HIV 活性については WST-8 細胞増殖測定法による評価を行った。96 well round-bottom micro culture plate にて、各 CD4 ミミック誘導体存在下または非存在下で、細胞毒性試験では無感染の PM1/CCR5 細胞  $3 \times 10^3$  cells を、抗 HIV-1 活性試験では HIV-1 (サブタイプ B-R5 臨床分離株 YTA48P) 感染させた PM1/CCR5 細胞を 37 °C 下で 5 日間培養した。それぞれの well から 100 mL の培養液を取り除き、WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitro-phenyl)-5-

(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt) 溶液 10 mL を加え、37 °C で 3 時間インキュベートした。マイクロプレートリーダーにて吸光度 (450 nm) を測定して、細胞の生存率を算出した。ウイルスによる細胞死を 50% 阻害する濃度を IC<sub>50</sub> およびウイルス非存在下での各誘導体による 50% の細胞が傷害される濃度を CC<sub>50</sub> とした [研究協力者: 吉村和久第一室室長、原田 恵嘉博士 (国立感染症研究所エイズ研究センター)]。

#### gp120 構造変化誘起能の評価

gp120 の構造変化誘起能は可溶性 CD4 存在下で gp120 に対する結合が増強される CD4i 抗体 (4C11) を用いて、HIV-1 JR-FL 株慢性感染細胞 (PM1/JR-FL) の細胞表面に対する CD4i 抗体の結合活性をフローサイトメーターにて評価した [吉村、原田]。具体的には、HIV-1 に継続感染させた PM1 細胞  $1 \times 10^5$  cells を、FACS buffer (PBS; 2% BSA, 0.2% azide, pH 7.2) 中において CD4 ミミック誘導体 100 μM 存在下または rsCD4 0.5 μg/mL 存在下で、4 °C 下、15 分間攪拌したのち、CD4i 抗体 4C11 (終濃度 3.4 - 6.7 μg/mL) を加えて 4 °C 下で 30 分間攪拌した。遠心後 (4 °C, 1200 rpm, 3 分間)、上清を除去し、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。そこに fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合させたヤギ由来抗ヒト IgG 抗体を加え、4 °C 下で 30 分間染色し、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。また、固定化溶液を加え、4 °C 下で 30 分間固定化したのち、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。その後、フローサイトメーターにて測定を 2 回以上行った。

#### CD4 ミミック誘導体の耐性誘導実験

顕著な生物活性を示した誘導体については HIV-1 YTA48P 株を PM1 細胞に感染させ、誘導体の濃度を徐々に上げながら継代培養 (in vitro 耐性誘導) を行い、耐性機序および結合部位の検討を行った [吉村、原田]。

### 別添 3

#### [<sup>125</sup>I]-SDF-1 $\alpha$ による CXCR4 競合阻害実験

ヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞を遠心沈降 (1000 rpm, 5 min.) した後、上澄みを除去した。沈殿した細胞に結合実験用 buffer (RPMI; 20 % HEPES, 0.5% BSA) を  $5 \times 10^5$  cell/120  $\mu$ L になるように加え、シリコナイズドチューブに 120  $\mu$ L ずつ分注した。調整した各サンプルに化合物溶液 (終濃度 10  $\mu$ M) 15  $\mu$ L、SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 (終濃度 1  $\mu$ M) buffer 15  $\mu$ L、10% DMSO を含む結合実験用 buffer 15  $\mu$ L をそれぞれ加え、全てのサンプルに放射性同位体標識された CXCR4 の天然リガンドである [<sup>125</sup>I]-SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 (終濃度 0.5 nM) 15  $\mu$ L を添加し、氷上で 1 h インキュベートした。インキュベート終了後、oil cushion 用 oil (olive oil:dibutyl phthalate = 1:4, v/v) 500  $\mu$ L を加え、遠心沈降 (4 °C, 14000 rpm, 2 min) した。水層および油層を除去した後、ペレットのついているチューブの先を切り落とし、RIA tube に入れて gamma-counter で測定することで、各化合物の結合活性を評価した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は HIV 感染症例の血液サンプルを解析する必要があるため、熊本大学大学院生命科学研究部等臨床研究・医療技術倫理委員会により、臨床研究・医療技術承認を受けている。また、個人情報情報の紛失、漏洩を防ぐため、個人名は全て暗号化し、臨床データ、臨床サンプルを管理保管する。

### C. 研究結果

#### 【芳香環部位の構造活性相関研究】

これまでの構造活性相関研究において、芳香環パラ位に塩素原子または臭素原子を有する誘導体において顕著な抗体 HIV 活性を示すことが明らかになっている。これに対し、報告者らはメチル基置換体においても強力な抗体 HIV 活性を示すことを見出した。そこで、

更なる活性の向上には芳香環の環拡大または他のヘテロ環に置換することで抗 HIV 活性や gp120 の構造変化誘起能などの生物活性の向上が期待できると考えた。具体的には、アザインドールやアミノインドール、キノリンなど様々な抗 HIV 活性を有する低分子化合物に含まれる多環性複素環を CD4 ミミックに導入したハイブリッド分子を合成し、生物活性評価したが、ほとんどの誘導体において顕著な生物活性 [IC<sub>50</sub> >70  $\mu$ M; cf. IC<sub>50</sub> of NBD-556 0.65  $\mu$ M] を示さなかった (平成 22 年度)。

これらの結果を受けて、理論計算によるドッキングシミュレーションから、芳香環部位は Val255 や Ser375 との疎水性相互作用や水素結合による相互作用を強くする必要があると考え、芳香環パラ位の置換基に加え、芳香環メタ位にヘテロ原子を導入した化合物群も併せて合成し、生物活性評価を行った。さらにこれら化合物にシクロヘキシル基を導入した化合物群も併せて合成した。生物活性評価の結果、芳香環パラ位の塩素原子に加え、メタ位にフッ素原子を導入することで、HAR-171 (IC<sub>50</sub> = 0.43  $\mu$ M) の 2 倍程度の抗 HIV 活性および 1.5 倍程度の gp120 構造変化誘起能を有する HAR-431 を見出した (IC<sub>50</sub> = 0.23  $\mu$ M)。また、芳香環パラ位の塩素原子をメチル基に置換し、メタ位にフッ素原子を導入した誘導体 HAR-427 も同様に顕著な抗 HIV 活性を示し (IC<sub>50</sub> = 0.54  $\mu$ M)、gp120 構造変化誘起能を維持していた。さらに、分子モデリングによる解析も行い、CD4 ミミックは gp120 の Phe43 cavity 近傍の 6 個のアミノ酸 (Val255、Asp368、Ser375、Met426、Trp427、Val430) との相互作用が重要であることを明らかにした (平成 23 年度)。

次に、医薬品プロファイルの向上を目指し、さらなる誘導体化について検討した。芳香環部

### 別添3

位にクロロアニリン骨格を持つ誘導体は共通して細胞毒性が高く、また溶解性も問題であった。そこで、塩素原子やフッ素原子の生物学的等価体である酸素原子や窒素原子に置換した誘導体群を合成した。また、クロロアニリン骨格以外の新規骨格の探索も平行して行った。分子モデリングの解析した結果、CD4 ミミックの芳香環部位とオキサミド部位の一部が高い平面性を保ちgp120と相互作用していることが示唆された。そこで、芳香環部位とオキサミド部位に平面構造を付与しつつ構造固定化によるエントロピーの減少を図るためにインドール骨格を有する誘導体を設計し、それら化合物群を合成した。合成した化合物群の生物活性について評価したところ、クロロアニリン骨格の代わりに一炭素で酸素間を架橋したカテコール骨格を有する誘導体が顕著な抗 HIV 活性を示し、さらに大幅に細胞毒性が改善されることが明らかになった ( $IC_{50} = 4.1 \mu M$ ,  $CC_{50} = >300 \mu M$ )。

#### 【ピペリジン環部位の構造活性相関研究】

HIV 外被タンパク質 gp120 にある Phe43 cavity は宿主細胞表面タンパク質 CD4 の 43 番目のフェニルアラニン側鎖との相互作用部位であり、HIV の細胞侵入においてかかせない cavity である。これまでの研究から、本研究におけるリード化合物 CD4 ミミックは HIV この Phe43 cavity にふたをするように相互作用することが示唆されている。そこで、詳細な構造活性相関研究を行うために、可溶性 CD4 と gp120 の X 線結晶構造 (1RZJ) を基に CD4 ミミックと gp120 の分子モデリング (Sybil 7.1) を行った。

その結果、ピペリジン環は、Phe43 cavity の入り口付近の複数のアミノ酸と相互作用していることが示唆された。まず、ピペリジン環上の窒素官能基は 368 番目のアスパラギン

酸 (Asp368) と静電的相互作用していることが示唆された。可溶性 CD4 と gp120 の X 線結晶構造においても、可溶性 CD4 の 59 番目のアルギニン (Arg59) がこの Asp368 と静電的相互作用していることから、ピペリジン環上の窒素官能基は Arg59 の側鎖と対応しており、この相互作用は生物活性に大きく寄与していることが示唆された。また、ピペリジン環上の gem-ジメチル基は 430 番目のバリン (Val430) と疎水性相互作用していることが示唆され、オキサミド結合のアミドプロトン (N-H) は 426 番目のメチオニン (Met426) のカルボニル酸素原子と水素結合していることが新たに見えてきた。

そこでこれらの分子モデリングの結果を基にピペリジン環にそれぞれの相互作用を増強する官能基を導入する誘導体を新たに設計した。まず、Asp368 との静電的相互作用の増強を期待して、ピペリジン環上の窒素官能基にグアニド基や、その類縁体であるウレア基やチオウレア基を導入した誘導体を設計した。また、Val430 との疎水性相互作用の増強を期待して、二つのシクロヘキシル基を導入した誘導体を設計した。また、ピペリジン環の生物活性に与える影響を精査するために、ピペリジン環の代わりにパラ位にフッ素原子や塩素原子、臭素原子など種々のハロゲン原子で置換した芳香環を有する誘導体も合成した。加えて、オキサミド結合から二つのメチレン基を導入したピリジン誘導体についても併せて合成した。この他に多数の誘導体を設計し、構造活性相関研究を行った。

抗 HIV 活性評価の結果、リード化合物の一つである NBD-556 は顕著な抗 HIV 活性を示したのに対し [ $IC_{50} = 0.61 \mu M$ ]、芳香環パラ位の置換基をメチル基に置換した YYA-021 では大幅な抗 HIV 活性の低下が認められた [ $IC_{50} = 8.4 \mu M$ ]。また、ピペリジン環上にテト



### 別添 3

ラメチル基を持たない誘導体 HAR-241 では YYA-021 と同程度の抗 HIV 活性を示し [IC<sub>50</sub> = 7.4 μM]、グアニド基を導入したグアニド誘導体 HAR-205 においては YYA-021 に比べわずかながら活性が向上した [IC<sub>50</sub> = 6.1 μM]。グアニド類縁体であるチオウレア誘導体 HAR-245 においてはさらに活性が向上したのに対し [IC<sub>50</sub> = 5.5 μM]、ウレア誘導体 HAR-244 では YYA-021 と同程度の抗 HIV 活性しか示さなかった [IC<sub>50</sub> = 8.3 μM]。さらにウレア窒素原子上にフェニル基を導入した N-フェニルウレア誘導体 HAR-234 では活性の低下が見られ [IC<sub>50</sub> = 11 μM]、ピペリジン環上の窒素原子にベンゾイル基を導入したベンゾイル誘導体 HAR-214 では強力な抗 HIV 活性を示した [IC<sub>50</sub> = 5.1 μM]。またこれら化合物の細胞毒性については、NBD-556 の CC<sub>50</sub> 値が 35 μM なのに対し、N-フェニルウレア誘導体 HAR-234 を除く全ての誘導体において細胞毒性の改善が見られた。また、これら誘導体の中でピペリジン環の窒素原子周辺に酸性度の高いプロトンをもつチオウレア誘導体 HAR-245 や N-フェニルウレア誘導体 HAR-234 では比較的強い細胞毒性を有していることが明らかになった。

次に、gp120 の 430 番目のバリンの疎水性相互作用の増強を指向した CD4 ミミック誘導体の抗 HIV 活性および細胞毒性について評価したところ、ピペリジン環にテトラメチル基を有する NBD-556 はと同様顕著な抗 HIV 活性を示し [IC<sub>50</sub> = 0.61 μM]、細胞毒性も同程度であった [CC<sub>50</sub> = 35 μM]。それに対し、テトラメチル基をさらに嵩高くしたジシクロヘキシル基を二つ導入したジシクロヘキシル誘導体 HAR-171 においては、NBD-556 と同程度の顕著な抗 HIV 活性を示し [IC<sub>50</sub> = 0.68 μM]、さらに 4 倍程度低い細胞毒性であることが明らかになった [CC<sub>50</sub> = 120 μM]。一方で、

ピペリジン環の代わりにパラ位にフッ素原子や塩素原子、臭素原子など種々のハロゲン原子で置換した芳香環では、予想外にもフッ素原子置換体 HAR-114 が強力な抗 HIV 活性を示し [IC<sub>50</sub> = 3.1 μM]、ほとんど細胞毒性を持たないことが明らかとなった [CC<sub>50</sub> = >500 μM]。一方で、塩素原子置換体 HAR-101 や臭素原子置換体 HAR-105 においては抗 HIV 活性および細胞毒性をほとんど示さなかった。さらに、オキサミド結合から二つのメチレン基を導入したピリジン誘導体 HAR-160 においては、低毒性で [CC<sub>50</sub> = 480 μM]、弱いながらも抗 HIV 活性を示した [IC<sub>50</sub> = 19.8 μM]。

また、顕著な抗 HIV 活性を示したシクロヘキシル基を二つ導入したジシクロヘキシル誘導体 HAR-171 について、PM1/CCR5 細胞による multi-round assay にて評価した。リード化合物である NBD-556 は single-round assay では IC<sub>50</sub> = 0.61 μM と非常に強力な抗 HIV 活性を示したのに対し、multi-round assay では IC<sub>50</sub> = 0.90 μM とわずかに低下することが明らかとなった。一方で、ジシクロヘキシル誘導体 HAR-171 においては single-round assay では IC<sub>50</sub> = 0.68 μM と顕著な抗 HIV 活性を示したのに対し、multi-round assay では IC<sub>50</sub> = 0.56 μM とわずかながら活性が向上することが明らかとなった。

次に、抗 HIV 活性を示した CD4 ミミック誘導体について、gp120 の構造変化誘起能について検討した。gp120 の構造変化により露出される CD4i site を認識する CD4i 抗体 4C11 を用いて、CD4 ミミック誘導体処理をした PM1/JR-FL 細胞表面における gp120 の構造変化の程度を評価した。4C11 の結合量については、fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合させたヤギ由来抗ヒト IgG 抗体にて 4C11 を蛍光標識し、FACS にてその蛍光強度を測定した。

報告者らのこれまでの研究から NBD-556

### 別添 3

は可溶性 CD4 と同様に構造変化を誘起することを明らかにしている。本系における平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity: MFI) は 23.13 であった。また、テトラメチル基を除去したピペリジン誘導体 HAR-241、グアニド基を導入したグアニド誘導体 HAR-205、チオウレア基を導入したチオウレア誘導体 HAR-245 は NBD556 とほぼ同程度の MFI であった [MFI (HAR-241) = 20.54, MFI (HAR-205) = 20.85, MFI (HAR-245) = 20.24]。一方で、ウレア誘導体 HAR-244 やベンゾイル誘導体 HAR-214 ではほとんど変化がなかった。また、顕著な抗 HIV 活性を示し、NBD-556 より低毒性なシクロヘキシル基を二つ導入したジシクロヘキシル誘導体 HAR-171 においては、NBD-556 とほぼ同程度の MFI であったことから [MFI (HAR-171) = 22.17]、HAR-171 は gp120 の構造変化誘起能を維持していることが明らかになった。また、強力な抗 HIV 活性は示すが、細胞毒性がほとんどないフッ素原子置換体 HAR-114 と弱いながらも抗 HIV 活性を示したピリジン誘導体 HAR-160 においては、どちらもほとんど変化がなかった。

#### 【V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックの創製】

V3 loop は 1) ジスルフィド結合を含む逆平行β鎖の base 領域、2) 構造的に自由度が高い stem 領域、3) 高度に保存された tip 領域の 3 つのフラグメントに別けられ、base 領域はコレセプターの N 末端と相互作用し、tip および stem 領域はコレセプターの body と相互作用することが示唆されている。そこで、X4 指向性ウイルスの V3 loop 領域由来の部分ペプチドおよびそれらを組み合わせたシャッフルペプチド、ヘリックス領域を安定化する非天然アミノ酸を導入したペプチドミメティックを合成した。

CXCR4 の天然リガンドである SDF-1α との競

合阻害実験によって CXCR4 結合活性を評価したところ、部分ペプチドやシャッフルペプチドはほとんど活性を示さなかったのに対し、base, stem, tip の全ての領域を含み、N 末端と C 末端をジスルフィド結合で環化した環状ペプチド TOZP-022 において顕著な CXCR4 結合活性が見られた。さらに、V3 loop の C 末端のヘリックス構造をより高度に再現するために 33 残基目のアラニン非天然アミノ酸であるα-アミノイソブタン酸 (Aib) に置換したペプチド TOZP-029 では CXCR4 結合活性が向上することを明らかにした。

#### 【CD4 ミミック誘導体の耐性変異】

CD4 ミミックの結合に関与する gp120 アミノ酸残基の同定を目指し、R5 臨床分離株を用いて、各 CD4 ミミック誘導体に対する *in vitro* 耐性誘導を行った。親化合物である NBD-556 やその誘導体 JRC-II-191、申請者らが見出したこれら化合物より強力な抗 HIV 活性を示した HAR-431 について耐性誘導実験を行った結果、gp120 の複数のアミノ酸 (V255M、T375I など) において共通した変異が見られ、これらの結果は理論計算による分子モデリングの結果とよく一致していた。また、高い抗 HIV 活性を示した化合物群では三つの耐性経路のうち V255M の変異を伴う耐性経路を中心とすることが明らかになった。

#### D. 考察

平成 22 年度から平成 24 年度まで、宿主側タンパク質 CD4 の機能を模倣した有機分子を用いて、細胞表面タンパク質 gp120 を標的としたケミカルバイオロジー創薬研究を進め、有機合成化学の特長を活かして、多様な低分子 CD4 ミミック誘導体を合成した。これら化合物の gp120 に与える構造変化、細胞毒性および抗 HIV 活性など生物活性評価も行った。

芳香環部位の構造活性相関により、多環性複素環を導入した誘導体においては、生物活性が消失または減弱することが明らかとなった。さらにメタ位へのフッ素原子の導入が種々の生物活性向上に寄与することが明らかになった。また分子モデリングより CD4 ミミックの芳香環部位は、相互作用部位である gp120 の Phe 43 cavity 領域の底部の疎水性相互作用していることが示唆された。また、インドールも含め多環性複素環などを導入した誘導体では活性が大幅に減弱または消失したことから、これら部位との相互作用には構造を一様に固定するアプローチではなく、可撓性を付加するアプローチが有効と考えられる。

ピペリジン部位の構造活性相関により、大きな疎水性官能基であるシクロヘキシル基を有する誘導体においてリード化合物を大幅に上回る顕著な抗 HIV 活性が見られた。一方で、静電的相互作用の増強を狙った誘導体群は生物活性の減弱が見られたものの、一様に顕著な抗 HIV 活性は示したことから、これら二つの相互作用が可能な誘導体はさらなる活性の向上が期待できる。

gp120 の V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックの創製研究では、V3 loop の base, stem, tip などの部分ペプチドやそれらを組み合わせたシャッフルペプチドでは、CXCR4 結合活性および抗 HIV 活性を示さなかったのに対し、全ての領域を含む環状ペプチドでは CXCR4 結合活性が見られたことから、V3 loop 領域とコレセプターの相互作用はペプチドの配列だけでなく構造的な要因が大きいことが示唆された。さらに、C 末端のヘリックス構造を誘起するために Aib を導入したペプチドにおいて、CXCR4 結合活性が向上したことから V3 loop の構造が重要であることを示唆している。また、V3 loop の保存領域である GPGR 配列を

含む部分ペプチドは CXCR4 結合活性を維持していなかったことや先に述べたペプチド構造の重要性から、GPGR 配列は V3 loop 領域の環構造の保持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

CD4 ミミック誘導体の耐性誘導実験の結果は CD4 ミミックの分子モデリングとよい一致を示したことから、これまで想定していた Phe43 cavity 領域にて相互作用していることが明らかになり、本研究において得られた CD4 ミミックの構造活性相関の結果は、今後の CD4 ミミックの分子設計において有益な情報を得たといえる。

## E. 結論

本研究課題では、有機合成化学に基づいたケミカルバイオロジー研究により、HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式を原子レベルで解析し、細胞侵入段階を標的とした HIV 侵入阻害剤の創製研究を実施した。本研究において、顕著な抗 HIV 活性や gp120 構造変化誘起能を示す誘導体を種々見出し、理論計算や耐性誘導実験によりそれら分子の構造活性相関を明らかにした。これらの結果は今後の HIV 侵入阻害剤の創製研究の進展に資するものである。今後はこれまでの構造活性相関研究に加え、種々の中和抗体との併用も含め様々な応用研究へと展開し、本化合物を基盤としたより効果的な治療法の開発に貢献したい。これらの結果は今後の HIV 侵入阻害剤の開発研究において、重要な基礎的知見を与えるものと思われる。

## F. 謝辞

抗ウイルス活性の測定実験および gp120 構造変化誘起能の評価に関して、熊本大学エイズ学研究センター、吉村和久准教授（現国立感染症研究所 エイズ研究センター第一室・室長）、原田

### 別添 3

恵嘉博士に、お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

- 1) Nomura W, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Ikura T, Ito N, Tamamura H. Fluorescence-Quenching Screening of Protein Kinase C Ligands with an Environmentally Sensitive Fluorophore. *Bioconjugate Chem* 22: 923–930, 2011.
- 2) Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists. *ChemMedChem* 6 : 834-839, 2011.
- 3) Nomura W, Narumi T, Ohashi N, Serizawa Y, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H. Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C. *ChemBioChem* 12:535–539, 2011.
- 4) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C $\delta$  as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding. *Bioconjugate Chem.*, 22: 82-87, 2011.
- 5) Yamada Y, Ochiai C, Yoshimura K, Tanaka T, Ohashi N, Narumi T, Nomura W, Harada S, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV. *Bioorg Med Chem Lett* 20:354-358, 2010.
- 6) Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Ohya A, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Remodeling of dynamic structures of HIV-1 envelope proteins leads to synthetic antigen molecules inducing neutralizing antibodies. *Bioconjugate Chem* 21(4): 709-714, 2010.
- 7) Suzuki S, Maddali K, Hashimoto C, Urano E, Ohashi N, Tanaka T, Ozaki T, Arai H, Tsutsumi H, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Tamamura H. Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: Structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem* 18: 6771-6775, 2010.
- 8) Narumi T, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Tanaka T, Nomura W, Arai H, Ozaki T, Ohashi N, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 5853–5858, 2010.
- 9) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Masuda A, Tamamura H. Bivalent ligands of CXCR4 with rigid linkers for elucidation of dimerization state in cells. *J Am Chem Soc* 132 (45): 15899-15901, 2010.
- 10) Nomura W, Mino T, Narumi T, Ohashi N, Masuda A, Hashimoto C, Tsutsumi H, Tamamura H. Development of Crosslink-Type Tag-Probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins. *Biopolymers: Peptide Science*, 94: 843-852, 2010.
- 11) Narumi T, Hayashi R, Tomita K, Kobayashi K, Tanahara N, Ohno H, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Oishi S, Fujii N. Synthesis of Biological Evaluation of Selective CXCR4 Antagonists Containing Alkene Dipeptide Isosteres. *Org Biomol Chem* 8: 616-621, 2010.
- 12) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S,

- Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg Med Chem* 19 : 6735-6742, 2011.
- 13) Narumi T, Bode JW,  $\alpha,\alpha$ -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of  $\alpha$ -Peptide  $\alpha$ -Ketoacids. *Heterocycles*, 82: 1515-1525, 2011
- 14) Nomura W, Narumi T, Ohashi N, Serizawa Y, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H. Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C. *ChemBioChem* 12: 535-539, 2011.
- 15) Ohashi N, Wataru Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C $\delta$  as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding. *Bioconjugate Chem* 22: 82-87, 2011.
- 16) Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists. *ChemMedChem* 6: 834-839, 2011.
- 17) Nomura W, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Ikura T, Ito N, Tamamura H. Fluorescence-Quenching Screening of Protein Kinase C Ligands with an Environmentally Sensitive Fluorophore. *Bioconjugate Chem* 22: 923-930, 2011.
- 18) Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem*, 7: 205-208, 2012.
- 19) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Tanaka T, Chiba J, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins. *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 1468-1474, 2012.
- 20) Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyauchi K, Narumi T, Aikawa H, Komano AJ, Yamamoto N, Tamamura H. Evaluation of a synthetic C34 trimer of HIV-1 gp41 as AIDS vaccines. *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 3287-3291, 2012.
- 21) Hashimoto C, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Tamamura H. The Success and Failures of HIV Drug Discovery. *Expert Opin Drug Discovery* 6: 1067-1090, 2011.
- 22) Narumi T, Kobayakawa T, Aikawa H, Seike S, Tamamura H. Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Adjacent to a Tertiary Carbon Stereogenic Center by Organocuprate-Mediated Reduction/Alkylation. *Org. Lett.*, 14, 4490-4493, 2012.
- 23) Narumi T, Tanaka T, Hashimoto C, Nomura W, Aikawa H, Sohma A, Itotani K, Kawamata M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Pharmacophore-Based Small Molecule CXCR4 Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 4169-4172, 2012.
- 24) Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyauchi K, Narumi T, Aikawa H, Komano JA, Yamamoto N, Tamamura H. Evaluation of a Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 as AIDS Vaccines. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 3287-3291, 2012.

- 25) Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano JA, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem*, 7, 205-208, 2012.
- 26) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Tanaka T, Chiba J, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 1468-1474, 2012.
- 27) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents. *Bioorg. Med. Chem.*, 21(9), 2518-2526, 2013.
- 28) Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers. *ChemMedChem*, 8(1), 118-124, 2013.
- Osaka, 105-106, 2010.
- 3) Ohya A, Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of Artificial Antigen Peptide Based on the Trimeric Form of HIV Fusion Protein. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 29-32, 2010.
- 4) Nomura W, Serizawa Y, Ohashi N, Okubo Y, Narumi T, Yoshida K, Furuta T, Tamamura H. Caged DAG-Lactones for Study of Cellular Signaling in a Spatial-and Temporal Specific Manner. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 347-348, 2010.
- 5) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Okubo Y, Ikura T, Ito N, Yoshida K, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-Based Orthogonal Sensing Methods for Double Evaluation in PKC Ligands Screening. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 353-354, 2010.
- 6) Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura T. Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins. *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium*, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 132-133, 2011.
- 7) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells. *Proceedings of the Twenty-Second American*

#### 著書

- 1) 鳴海哲夫, 玉村啓和. ペプチドミメティックによる創薬研究, 生化学 特集号「ペプチド科学と生化学の接点」(日本生化学会 東京), 82(6): 515-523, 2010.
- 2) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Yoshimura K, Matsushita S, Murakami T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. From Reverse to Forward Chemical Genomics: Development of Anti-HIV Agent. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society,

- Peptide Symposium, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 134-135, 2011.
- 8) Nomura W, Ohashi N, Mori A, Narumi T, Tanaka T, Masuda A, Tsutsumi H, Tamamura H. Novel Tag-probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins in Living Cells. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 40, 2011.
- 9) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of a Bivalent Ligand for a Chemokine Receptor CXCR4 by Utilizing Polyproline Helix as a Linker. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 220, 2011.
- 10) Narumi T, Bode JW.  $\alpha,\alpha$ -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of  $\alpha$ -Peptide  $\alpha$ -Ketoacids. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 178, 2011.
- 11) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of CXCR4-derived Peptides Targeting the Development of AIDS Vaccines. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 103, 2011.
- 12) Nomura W, Tanaka T, Aoki T, Soma A, Aikawa H, Narumi T, and Tamamura H. Development of Designed Bivalent Ligands for CXCR4 and their Function on Receptor Binding. Peptide Science 2011, Sakaguchi, K., (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 79, 2012.
- 13) Nomura W, Tsutsumi H, Abe S, Mori A, Narumi T, Aikawa H, Tamamura H. Intense Blue Fluorescence of Tag-probe Systems Based on a Leucine Zipper Assembly. Peptide Science 2011, Sakaguchi, K. (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 317, 2012.
- 14) 鳴海哲夫, Jeffrey W. Bode. 「 $\alpha$ -ケト酸とヒドロキシアミンの化学選択的な縮合反応によるペプチド合成」, 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用 (株式会社 メディカルドゥ), 68-75, 2012.
2. 学会発表
- 1) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Elucidation of a Dimerization State of a Chemokine Receptor CXCR4 via Chemical Biology Approach Utilizing Novel Bivalent Ligands with Rigid Polyproline Linkers. The 13th Akabori Conference Leipzig 2010: Japanese-German Symposium on Peptide Science. Leipzig, Germany, Sep11-15, 2010.
- 2) Hashimoto C, Maddali K, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Tamamura H. Peptidic HIV Integrase Inhibitors Derived from HIV Gene Products. 11th KUMAMOTO AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
- 3) Ozaki T, Tanaka T, Narumi T, Arai H, Ohashi

- N, Hashimoto C, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Structure-Activity Relationships of CXCR4 Antagonists Having the Dipicolylamine/Azamacro- Cyclic-Metal Complex Structures. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
- 4) Arai H, Narumi T, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Tanaka T, Nomura W, Ozaki T, Ohashi N, Matsushita S, Tamamura H. Development of Small CD4 Mimic Molecules that Induce Conformational Changes in gp120. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
- 5) Nomura W, Ohashi N, Mori A, Narumi T, Tanaka T, Masuda A, Tsutsumi H, Tamamura H. Novel Tag-probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins in Living Cells. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
- 6) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of a Bivalent Ligand for a Chemokine Receptor CXCR4 by Utilizing Polyproline Helix as a Linker. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
- 7) Narumi T, Bode JW.  $\alpha,\alpha$ -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of  $\alpha$ -Peptide  $\alpha$ -Ketoacids. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
- 8) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of CXCR4-derived Peptides Targeting the Development of AIDS Vaccines. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
- 9) 野村 渉, 中原 徹, 大矢亜紀, 大庭賢二, 田中智博, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. 合成抗原ペプチドによる HIV-1 gp41 の三量体構造を認識する抗体の誘導. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.
- 10) 鳴海哲夫, 落合千裕, 山田裕子, 吉村和久, 原田恵嘉, 大橋南美, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. 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. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.
- 11) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 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. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.
- 12) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, NE. Lewin, PM. Blumberg, 玉村啓和. 蛍光を用いた PKC リガンド結合評価法の開発. 日本薬学会第 130 年会.岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.
- 13) 田中智博, 野村 渉, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 二価型 CXCR4 リガンドの創製と二量体構造解析への応用. 日本薬学会第 130 年会.岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.
- 14) 橋本知恵, 野村 渉, 田中智博, 中原 徹, 鳴海哲夫, 大庭賢二, 村上 努, 山本 直樹, 玉村啓和. 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. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.
- 15) 野村 渉, 大橋南美, 蓑 友明, 森 あつみ, 鳴海哲夫, 増田朱美, 堤 浩, 玉村啓和. 新規蛍光イメージングツールの創出:クロスリンク型 ZIP タグ-プローブペアの開発. 日本ケ



### 別添 3

- ミカルバイオロジー学会 第 5 回年会. 横浜, 2010 年 5 月 18-19 日.
- 16) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新規アミド結合等価体の創製研究. クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会. 横浜, 2010 年 5 月 18-19 日.
- 17) 田中智博, 橋本知恵, 小森谷真央, 野村 渉, 鳴海哲夫, 吉村和久, 松下修三, 村上 努, 駒野 淳, 大庭賢二, 山本直樹, 玉村啓和. リバースからフォワードへケミカルゲノミクスを活用した抗 HIV 剤の創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会. 横浜, 2010 年 5 月 18-19 日.
- 18) 田中智博, 野村 渉, 鳴海哲夫, 増田朱美, 玉村啓和. 堅固なリンカーを有する二価結合型 CXCR4 リガンドの開発と応用. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会. 横浜, 2010 年 5 月 18-19 日.
- 19) 橋本知恵, 野村 渉, 中原 徹, 田中智博, 堤 浩, 長谷山正樹, 大庭賢二, 鳴海哲夫, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を基にしたエイズワクチン開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会. 横浜, 2010 年 5 月 18-19 日.
- 20) 小森谷真央, 村上 努, 鈴木慎太郎, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会. 横浜, 2010 年 5 月 18-19 日.
- 21) 野村 渉, 田中智博, 増田朱美, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 2 価結合型リガンドの新規デザインによる CXCR4 の細胞表面における機能解析. 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム. 大阪, 2010 年 9 月 24-26 日.
- 22) 野村 渉, 相馬 晃, 中原 徹, 大庭賢二, 田中智博, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 山本直樹, 玉村啓和. 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. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 23) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 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. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 24) 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 尾崎太郎, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 25) 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 侵入機構を基にした宿主細胞タンパク質由来抗原分子の創製. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 26) 小森谷真央, 村上 努, 田中智博, 鈴木慎太郎, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 27) 尾崎太郎, 田中智博, 鳴海哲夫, 新井啓之, 大橋南美, 橋本知恵, 野村 渉, 村上 努, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 28) 森 あつみ, 野村 渉, , 大橋南美, 玉村啓和. 細胞内タンパク質の鳴海哲夫挙動解明を志向したタグ・プローブシステムの開発. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 29) 野村 渉, 中原 徹, 橋本知恵, 大庭賢二, 相馬 晃, 田中智博, 鳴海哲夫, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を模倣した立体構造特異的人工抗原分子の創

### 別添 3

- 製. 第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム, 愛知, 2010 年 11 月 1-2 日.
- 30) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 尾崎太郎, 新井啓之, 野村 渉, 玉村啓和. 有機銅試薬によるクロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム. 愛知, 2010 年 11 月 1-2 日.
- 31) 小森谷真央, 村上 努, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチド. 第 29 回メディスナルケミストリーシンポジウム. 京都, 2010 年 11 月 17-19 日.
- 32) 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. 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. 第 29 回メディスナルケミストリーシンポジウム. 京都, 2010 年 11 月 17-19 日.
- 33) 村上 努, 小森谷真央, 鈴木慎太郎, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. 細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーを用いた新規抗 HIV-1 ペプチドの探索と創出. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 徳島, 2010 年 11 月 7-9 日.
- 34) 橋本知恵, 田中智博, 浦野恵美子, 尾崎太郎, 新井啓之, 鳴海哲夫, 野村 渉, Maddali K, Pommier Y, 山本直樹, 駒野 淳, 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- 35) 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 尾崎太郎, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村 啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- 36) 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 中原 徹, 田中智博, 大庭賢二, 相馬 晃, 長谷山正樹, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 侵入過程の動的超分子機構を基にした新規エイズワクチンの創製. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- 37) 小森谷真央, 村上 努, 鈴木慎太郎, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- 38) 尾崎太郎, 田中智博, 宮内浩典, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 駒野 淳, 玉村啓和. gp120 の CD4 結合サイトを模倣した新規抗原分子の創製. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- 39) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. 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 ミミックの創製研究. 日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
- 40) 鳴海哲夫, 玉村啓和. イミダゾリウム塩の構造最適化を指向した構造活性相関研究. 日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
- 41) Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura T. Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25-30, 2011.
- 42) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25-30, 2011.

- 43) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Yamamoto N, Chiba J, Tanaka T, Murakami T, Tamamura H. Identification of Anti-HIV Peptides Derived from Matrix Proteins. ACS Meeting Fall201, Denver, Colorado, USA, Aug 28 -Sep 1, 2011.
- 44) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. HIV-1 Co-Receptor CXCR4-Derived Peptides Targeting AIDS Vaccines. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
- 45) Nomura W, Ohashi N, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. Synthesis of C1b Domains of Protein Kinase C Having Solvatochromism and their Application to Bio-sensing. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
- 46) Narumi T, Arai H, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. SAR Study of Small Molecular CD4 Mimics Targeting the Dynamic Supramolecular Mechanism of HIV Entry and Their Hybrid Molecules with a CXCR4 Antagonist. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
- 47) Arai H, Narumi T, Yoshimura K, Harada S, Aikawa H, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Design, Synthesis and Biological Evaluation of CD4 Mimics Targeting the Interaction with Asp368 and Val430 in Gp120. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
- 48) Narumi T, Seike S, Tamamura H. Synthetic Studies on (*Z*) and (*E*)-Chloroalkene Skeletons As Amide Bond Equivalents. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 49) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. SAR Studies of Small Molecular CD4 Mimics Targeting the HIV Entry Mechanism. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 50) Narumi T, Shishido M, Tamamura H. *N*-(Benzoyloxy)sulfonamides-Mediated Aziridination of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Unsaturated Enones. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 51) Nomura W, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic Antigens for Induction of Structure-Specific Antibodies against Trimer-Form of gp41. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 52) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. CXCR4-Derived Peptides Targeting AIDS Vaccines. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 53) Narumi T, Nomura W, Tamamura H. Several HIV Inhibitors Targeting Entry, Fusion, Integrase and Matrix. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 54) Narumi T, Kambe C, Nomura W, Tamamura H. Development of Photochemically Removable Protecting Groups in Hydrophilic Environments: Synthesis and Photochemical Property of 8-Azacoumarins. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 55) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. 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 ミミックの創製研究. 日

### 別添 3

- 本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
- 56) 鳴海哲夫, 玉村啓和. イミダゾリウム塩の構造最適化を指向した構造活性相関研究. 日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
- 57) 森 あつみ, 野村 渉, 鳴海哲夫, 大橋南 美, 増田朱美, 玉村啓和. 新規タグ・プローブシステムの細胞内タンパク質イメージングへの応用. 日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
- 58) 野村 渉, ト部亜里沙, 近藤麻美, 増田朱美, 鳴海哲夫, 梁 明秀, 玉村啓和. ジンクフィンガーヌクレアーゼによる EB ウイルス複製阻害効果の検討. 日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
- 59) 鳴海哲夫, 落合千裕, 吉村和久, 原田恵嘉, 田中智博, 野村 渉, 新井啓之, 尾崎太郎, 大橋南 美, 松下修三, 玉村啓和. 新規 HIV 侵入阻害剤の創製研究: 低分子型 CD4 ミミック-CXCR4 アンタゴニストのハイブリッド分子の設計と合成. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
- 60) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化を誘起する低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
- 61) 橋本知恵, 野村 渉, 大矢亜紀, 宮内浩典, 鳴海哲夫, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp41-C34 3 量体の合成とその抗 HIV 作用. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
- 62) 鳴海哲夫, 神戸千秋, 野村 渉, 玉村啓和. 水性環境下で効率的に反応する光分解性保護基の開発研究: 8-アザクマリン化合物の合成と光化学的特性. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
- 63) 増田朱美, 野村 渉, ト部亜里沙, 玉村啓和. 高い反応効率をもつ亜鉛フィンガー融合型 DNA 組換え酵素の構築. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23 - 25 日.
- 64) 森 あつみ, 野村 渉, 大橋南 美, 鳴海哲夫, 堤 浩, 玉村啓和. 細胞内タンパク質可視化を目的としたタグ・プローブシステムの創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
- 65) 大橋南 美, 野村 渉, 鳴海哲夫, Nancy E. Lewin, 糸谷恭子, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 環境応答性蛍光基を導入した protein kinase C $\delta$  C1b ドメインによるリガンド結合活性評価. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
- 66) 尾崎太郎, 田中智博, 鳴海哲夫, 相馬 晃, 橋本知恵, 野村 渉, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
- 67) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 玉村啓和. シスアミド等価体としての E 型クロロアルケン骨格の合成研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
- 68) 鳴海哲夫, 宍戸美華, 玉村啓和. N-(ベンゾイルオキシ)スルホンアミドを用いる  $\alpha,\beta$ -不飽和エノンのアジリジン化反応. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
- 69) 野村 渉, 田中智博, 相馬 晃, 鳴海哲夫, 増田朱美, 玉村啓和. 細胞表面における CXCR4 二量体構造解析のための堅固なリン