

様式（共同研究用）

3 大学連携研究支援費に係る研究成果（ホームページ用）

	（所 属）	（職 名）	（氏 名）
共同研究 代表者	京都府立医科大学・ 医学研究科	教授	赤路 健一
研究組織 の体制	京都府立大学	教授	椿 一典
	京都工芸繊維大学	教授	黒田 裕久
研究の 名称	多機能プローブを用いる抗エイズ薬作用機序の解明		
研究のキ ーワード	ケモカインレセプター、CCR5、TAK779、Maraviroc 安定同位体ラベル		
研究の 概要	<p><math>\beta</math>ケモカインレセプターCCR5はG蛋白共役型7回膜貫通受容体で、HIVウイルスの細胞侵入のコレセプターとして働く。HIVウイルスの細胞侵入にとってこのケモカインレセプターとの相互作用は必須であり、ケモカインレセプターと結合できるTAK779などの低分子化合物はきわめて有望な新規抗エイズ薬候補である。しかし、ケモカインレセプターが膜貫通蛋白であるためその相互作用様式の解析はほとんど進展しておらず、現状では論理的ドラッグデザインはまったく不可能である。</p> <p>本研究では有機的な3大学連携により、申請者が最近合成に成功した安定同位体<math>^{13}\text{C}</math>ラベル化合成法のTAK779およびMaravirocラベル体への応用を検討した。ついで、合成プローブを用い、通常の方法論では解析困難な膜蛋白質との相互作用解析を主に固体NMRの手法で試みた。固体NMRによる解析は、府立医大の赤路が大阪大学蛋白質研究所と連携しつつ遂行した。</p>		

<p>研究の背景</p>	<p>従来の研究では、主にケモカインレセプターの特異アミノ酸を変異させて得られる変異型レセプターの機能解析から間接的に相互作用部位を推定してきた。</p> <p>本研究では、このような間接的手法ではなく固体NMRを用いる直接解析により相互作用様式を解析することを最終目的とし、この解析に不可欠なプローブ調製を行った。ついで、プローブとしての多機能化を図るため、異なる2種類の安定同位体元素の同時導入と光応答性官能基の導入への展開を図った。</p>
<p>研究手法</p>	<p>1. 安定同位体ラベル化TAK779の合成</p> <p>TAK779は、ケモカインレセプターとの結合によるHIVウイルス感染阻害が認められた最初の化合物で、この分野の研究のスタンダード化合物である。合成法も報告されているが、安定同位体ラベル化に利用できる経路はまったく知られていなかった。本研究によりケモカインレセプターとの相互作用様式の直接解析に必須となる<sup>13</sup>Cラベル化TAK779の合成法を確立するとともに、ダブルラベル化体合成への展開を図る。</p> <p>2. 安定同位体ラベル化Maravirocの合成</p> <p>Maravirocはケモカインレセプターとの結合が認められた第2世代化合物であるが、その相互作用様式はまったく未知である。TAK779で蓄積した安定同位体特有の反応性を参考にしつつ、本化合物のラベル化を行う。特に本合成では、芳香環のすべての炭素に安定同位体ラベルを導入することにより、固体NMRによる解析によってこれまで裏付けの無かったπ-πスタッキングについての解析が可能になると期待される。</p>
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>1. 安定同位体ラベル化TAK779の合成 (府立医大・赤路 担当)</p> <p>比較的容易に入手できる安定同位体化合物<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>Iを利用してフラグメントを合成し、これらを順次縮合することによって分子の両端にラベルを導入したラベル化TAK779を得た。</p> <p>予備的な固体NMR測定により、末端のN(<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>)のケミカルシフトが溶液中とは異なり大きくシフトしていることが分かった。これらの結果は、TAK779のジメチル体側末端の+チャージが、ケモカインレセプターCCR5の183位Gluの近傍に位置することを強く示唆するものである。</p> <p>現在、モノラベル体合成ルートをもとに、あらたに<sup>15</sup>Nと<sup>13</sup>Cの2種類の安定同位体でラベルしたダブルラベル体の合成を目的とし、新規合成ルートを構築しつつある。</p>

	<p>2. 安定同位体ラベル化Maravirocの合成  (府立大・椿、工芸繊維大学・黒田 担当)</p> <p>現在、非ラベル化部分の合成にめどをつけ、効率的ラベル化方法についての検討を進めている。非ラベル化部分の合成と平行して、工芸繊維大学・黒田がこれまで研究を進めてきた光合成モデルを参考に、電子移動に伴うエネルギー検出が可能なプローブに関する基礎的研究とプローブ導入位置と合成法についての検討を進めている。</p>
<p>地域への研究成果の還元状況</p>	<p>これまで府立医大・赤路が進めてきた京都地域の関連研究企業(けいはんな・プロテインウェブ株式会社)との共同研究を通じ、地域還元を図っている。</p>
<p>研究成果が3大学連携にもたらす意義</p>	<p>本研究では、安定同位体ラベル化リガンド調製にはじめて成功した府立医大・赤路が精密解析を目指したラベル化手法の確立と研究全体のコーディネート、府立大学の椿グループが新たなリガンドへのラベル化法の適用を、工芸繊維大学の黒田グループが新たなプローブ機能の検討を担当する。新たな方法論の開拓を分野横断的に進めるためには、このような性格の異なる3大学の研究グループの有機的連携がきわめて有効である。</p> <p>固体NMRは不溶性膜蛋白質の解析に最も適した解析方法であるとされているが、解析に必要なラベル化低分子リガンドの調製が困難であったため研究がほとんど進展していない。膜蛋白質の結晶化が極めて困難な現状では、ラベル化低分子リガンドを利用した膜蛋白質機能解析法の開拓をそれぞれの特色を生かした3大学連携によってすすめる意義は高いと考える。</p>
<p>研究発表</p>	<p>本連携研究の成果を元に、以下の発表を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Konno, K.; Takebayashi, Y.; Nosaka, K.; Akaji, K. Synthetic studies on callipeltins: Stereoselective syntheses of (3S,4R)-3,4-Dimethyl-L-pyroglutamic acid and Fmoc-D-allothreonine from serine derivatives, <i>Heterocycles</i> 81, 79-89, <b>2010</b>.  (ラベル体合成の基盤となる合成手法の報告)</li> <li>2. T. Yamamoto; K. Sasaki; Y. Kuroda. Charge separation in self-assembling porphyrin heptamer mimicking light-harvesting antenna system. 環太平洋国際化学会議 <i>Pacificchem 2010</i>, No.904, ホノルル 2010年12月18日  (電子移動プローブに関する機能解析研究の報告)</li> </ol>