

Title	糖鎖の分子置換による新規抗ウイルス薬の設計手法の開発
Sub Title	Development of design of antiviral drug by substitution of carbohydrate ligand for peptide
Author	松原, 輝彦(Matsubara, Teruhiko)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
Abstract	インフルエンザウイルスは感染する初期過程で細胞表面の糖鎖と相互作用する。本課題では糖鎖リガンドをペプチド分子に「置換」し、感染過程を阻害する新しい作用機序を持つインフルエンザの治療薬の分子設計の手法を開発した。糖鎖構造を模倣したペプチド分子は複数の垂型に阻害活性を示した。また化学修飾によって高い阻害活性を示すことが明らかとなった。このように複雑な構造を持つ糖鎖を「置換」する方法論は、迅速な治療薬の開発に貢献できる可能性が示された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2010～2011 課題番号：22790115 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：薬学・創薬化学
Genre	Research Paper
URL	<a href="http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22790115seika">http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22790115seika</a>

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790115

研究課題名（和文） 糖鎖の分子置換による新規抗ウイルス薬の設計手法の開発

研究課題名（英文） Development of design of antiviral drug by substitution of carbohydrate ligand for peptide

## 研究代表者

松原 輝彦（MATSUBARA TERUHIKO）

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：10325251

研究成果の概要（和文）： インフルエンザウイルスは感染する初期過程で細胞表面の糖鎖と相互作用する。本課題では糖鎖リガンドをペプチド分子に「置換」し、感染過程を阻害する新しい作用機序を持つインフルエンザの治療薬の分子設計の手法を開発した。糖鎖構造を模倣したペプチド分子は複数の亜型に阻害活性を示した。また化学修飾によって高い阻害活性を示すことが明らかとなった。このように複雑な構造を持つ糖鎖を「置換」する方法論は、迅速な治療薬の開発に貢献できる可能性が示された。

## 研究成果の概要（英文）：

Influenza virus binds to carbohydrate receptors on the host cell surface at an initial step in the infection process. The method to design of peptide drug was developed based on the concept of substitution of carbohydrate ligand for peptide. The carbohydrate-mimetic peptides showed inhibitory activity for virus infection among multiple types of strain. Furthermore chemical modification of peptide with monosaccharide indicated that the peptides have the highest inhibitory activity. This resulted in the promising methodology for design of novel antiviral drugs.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ペプチドドラッグ、ライブラリー、インフルエンザ、ヘマグルチニン、感染阻害剤、ファージ提示法、親和性選択、感染症

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザはインフルエンザウイルスを病原として引き起こされる感染症であり、A型はパンデミックをしばしば引き起こす。2009年には新型 H1N1 が発生し、高病原性 H5 型の流行も依然として懸念される。発症率の低下および軽症化に最も有効な対策法はワクチンによる予防接種であるが、近年抗インフルエンザ薬としてオセルタミビルが開発された（商品名「タミフル」）。抗ウイルス薬は治療に加えて、ワクチン接種ができない予防段階（ワクチンが準備できない状況、卵アレルギー患者、家禽インフルエンザの処理業者など）での利用も可能である。しかしパンデミックが起きた 2009 年 3 月当時、耐性ウイルスもすでに蔓延していた（旧型の季節性 A/H1N1 ウイルスの 99% はすでにタミフル耐性であった）。新しい抗ウイルス薬の迅速な開発手法が求められており、本研究では阻害剤を開発するための方法論を検討した。

### 2. 研究の目的

オセルタミビルはウイルスが増殖して発芽する際に関わる糖加水分解酵素ノイラミニダーゼ(NA)の機能を阻害する。しかしウイルスが感染した状態で細胞内にとどまることから、遺伝子の変異して耐性株が発生することが懸念される。そこで本研究では、ノイラミニダーゼ阻害剤とは異なるメカニズムとして、感染過程を阻害する分子設計を行なった。ウイルスの感染過程ではヘマグルニチン(HA)がシアル酸含有糖鎖を結合するが、この糖鎖は動物種で変化しない。つまり、受容体糖鎖の構造を模倣した分子は亜型や変異に影響されず活性が維持されることが期待でき、広範囲な亜型に利用可能な感染阻害剤として作用する可能性がある。

本課題では、HA の糖鎖結合部位に挿入されるペプチドを出発分子とし（糖鎖リガンドをペプチドに「置換」したペプチド）、感染阻害剤として利用させるための化学修飾方法および阻害メカニズムを検討した。また単一の亜型だけではなく、複数の型の HA に結合し、広域感染阻害剤として利用できるペプチドを目標とした。

### 3. 研究の方法

これまでにインフルエンザウイルスの H1 型および H3 型の HA に対して、ファージ提示法によるペプチドライブラリーから親和性選択を行ない、両方の HA に結合する 15 残基のペプチドをすでに得ている。このペプ

チドを脂質、ビオチン、糖などの化学修飾を行い、ウイルスの感染阻害効果および阻害メカニズムを検討した。感染阻害は MDCK 細胞を用いたプラークアッセイによって評価した（図 1）。

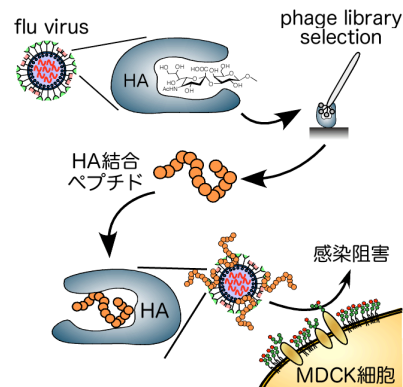


図 1 HA 結合ペプチドによるインフルエンザウイルスの感染阻害の概念図。ファージ提示法によってインフルエンザウイルス (flu virus) の HA に結合するペプチドを同定する。このペプチドは糖鎖の結合部位に挿入されるため、阻害剤としての利用が期待できる。ペプチド（および化学修飾したペプチド）の感染阻害活性は MDCK 細胞を用いて評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 阻害活性を示す HA 結合ペプチド

HA 結合ペプチドは 15 残基を基本の長さとし、A1, s2, D1 などを得ている。この中で s2 配列は短くしても活性を保ち、N 末端の 5 残基で最も高い阻害活性を示し、4 残基以下では亜型の特異性が出てしまうことがわかった。

またペプチド D1 の中央 7 残基目のセリン (Ser) に *N*-アセチルガラクトサミン ( $\alpha$ -GalNAc) を修飾すると、脂質修飾したペプチドと同レベルの高い感染阻害活性を示した。

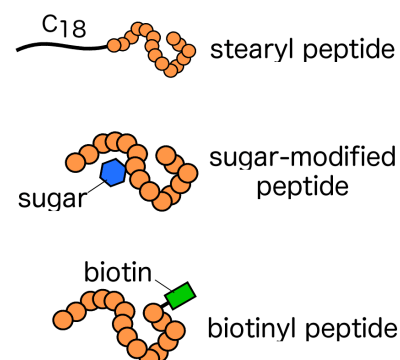


図 2 感染阻害活性および機構解明のための HA 結合ペプチドの化学修飾。ステアリン酸を N 末端に結合したペプチド脂質 (上)、糖をペプチド中央の側鎖に修飾した糖ペプチド (中) およびビオチン修飾したペプチド (下)。

## (2) 阻害メカニズム解析

$\alpha$ -GalNAc 修飾ペプチド D1 の阻害活性に着目し、その阻害機構を解明するため、まず糖の位置および種類を変えた糖ペプチドを化学合成した。GalNAc のかわりにグルコース (Glc) やラクトース (Lac ; Gal-Glc) などの糖を含むペプチドを Fmoc ケミストリーによる固相合成で合成した。糖の修飾は、水酸基がアセチル化された糖アミノ酸を用いた。ペプチド自動合成機で固相樹脂に順次アミノ酸を連結させ、最後にペプチドを樹脂から切断した。糖のアセチル基はナトリウムメトキシドで加水分解を行ない、最後に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製して凍結乾燥後、HPLC および質量分析で純度および目的物の同定を行なった。

合成した糖修飾ペプチドは、GalNAc 以外の糖では感染阻害活性を示さないことがわかった。さらにビオチン化 D1 を用いた阻害実験によって、糖ペプチドの HA との相互作用で評価した。その結果、糖ペプチドの HA との相互作用の強さに比例してウイルスの感染阻害活性が高くなり、HA の親和性と阻害活性が相関していることが明らかとなった。GalNAc が D1 ペプチドと協同して HA に結合し、結果として阻害活性を有することが示唆された。

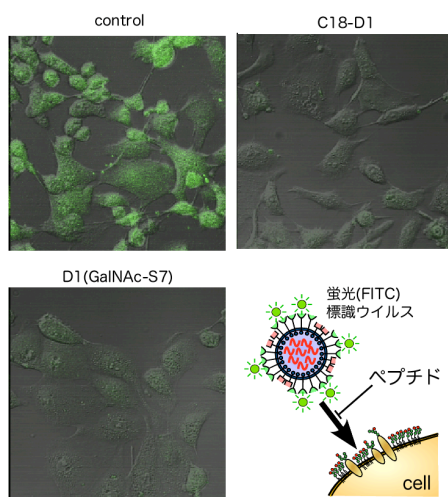


図 3 蛍光標識したウイルスの MDCK 細胞への取り込みの共焦点レーザー顕微鏡観察像。ウイルス感染を示す緑色蛍光は、ペプチド C18-D1 もしくは D1(GalNAc-S7)共存下

で減少し、感染阻害活性を明らかにした。

また蛍光標識したウイルスを MDCK 細胞と相互作用させ、共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて評価したところ、期待通りに蛍光は減少し、ペプチドは感染阻害を行っていることが明らかとなった (図 3)。また、蛍光標識したペプチドを細胞と相互作用させたが、期待通り蛍光が細胞膜に観察されなかった。これはペプチドは直接細胞と相互作用せず、ウイルスとのみ相互作用して阻害活性を示していることがわかった。

## (3) 強毒性 H5 型ウイルスへの適用

これまでインフルエンザウイルスは弱毒性である季節性の H1 型および H3 型ウイルスを用いてきた。しかし近年、高い致死性の強毒性 H5 型ウイルスの流行が危惧されている。そこで H5 型 HA に対するペプチドの結合評価の方法を検討し、既存の HA 結合性ペプチドとの相互作用評価を行った。

H5 型 HA はサンプル入手が困難であるため、少量の HA でも相互作用解析が行える表面プラズモン共鳴法での実験系を構築した。HA 結合性ペプチドは、H1 型および H3 型ウイルスに効果のある 15 残基の D1 配列を化学合成した。D1 ペプチドもしくは H5 型 HA のいずれかを表面プラズモン共鳴装置のセンサーチップに固定化し、もう片方の分子を流路系に流すことで条件検討を行った。その結果、HA をチップに固定化し、ビオチン化ペプチドとアビジンとの複合体を添加する手法が最も確実に相互作用解析を行うことが可能であった (図 4)。

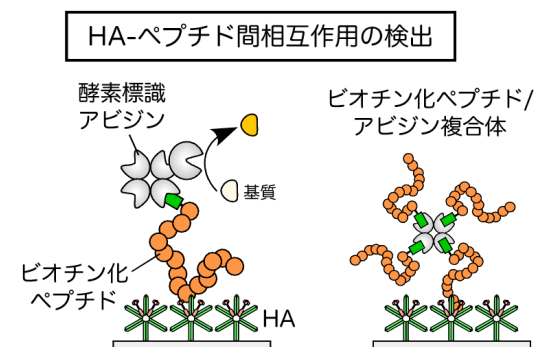


図 4 HA 結合性ペプチドの結合活性を評価する手法。ビオチン化ペプチドをアビジンと複合化することで、感度の高い評価法を確立した。

決定された固定化の条件を用いて、H1, H3 および H5 型 HA をそれぞれ固定化し、D1

および 2 つの D1 変異体のビオチン化ペプチドとの相互作用解析を行った。その結果、D1 配列の HA への結合は濃度依存的に増加し、Langmuir プロット解析で得られた解離定数の値は、どの HA でも数十  $\mu\text{M}$  の値を示した。D1 変異体も解離定数は HA が異なってもほぼ同じ値を示した。これらの結合親和性の順序は、ファージ ELISA での結合活性の順序に対応していた。ファージ上でも合成ペプチドでも D1 配列および変異体は異なる亜型に対して近い結合親和性を持っていたことから、ペプチドは設計通りに糖鎖受容体の構造を模倣していることが示された。

#### (4) まとめ

インフルエンザウイルスの HA の糖鎖に結合するペプチドの感染阻害活性の機能解析を行った。ペプチドを脂質、糖、ビオチン、蛍光性官能基などの化学修飾によって阻害活性の検討を行った。また研究が計画よりも進展し、強毒性 H5 型 HA へ適用することができた。

関連論文は医薬品化学分野で最も権威のある専門誌 *Journal of Medicinal Chemistry* に掲載され、招待講演を 2 件行った。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Teruhiko Matsubara, Ai Onishi, Tomomi Saito, Aki Shimada, Hiroki Inoue, Takao Taki, Kyosuke Nagata, Yoshio Okahata, and Toshinori Sato, Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy, *J. Med. Chem.*, 査読有, 53, 2010, 4441-4449.

[学会発表] (計 8 件)

(1) 松原輝彦、細胞膜界面における糖鎖ナノクラスター構築とペプチドによる糖鎖認識制御、第 6 回理研「バイオものづくり」シンポジウム、2011 年 5 月 10 日、理化学研究所 (和光市)

(2) T. Matsubara; T. Saito; A. Shimada; A. Onishi; T. Sato, Design of sugar-mimicking peptide inhibitors on influenza virus infection, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010 年 12 月 16 日, ハワイコンベンションセンター (ホノルル)

(3) 松原輝彦、ライブラリーを用いた糖鎖-タンパク質相互作用を制御するペプチドの設計, GlycoTOKYO 2010, 2010 年 11 月 27 日, 東京大学 (東京)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松原輝彦 (MATSUBARA TERUHIKO)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号: 10325251

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし