

学 位 論 文 題 名

Rational design, synthesis and characterization of influenza hemagglutinin blocker based on cyclic glycopeptides

(インフルエンザウイルスヘマグルチニン結合性環状糖ペプチドの分子設計)

学位論文内容の要旨

インフルエンザは毎年、世界中で大流行し多くの死者を出す恐ろしい病気である。しかし頻繁に起こる抗原性変異が有効なワクチンや薬の開発を困難にしている。従って早急な抗インフルエンザ薬の開発や治療法が望まれている。インフルエンザの感染はウイルスのエンベロープ表面に存在する糖タンパク質のマグルチニンが宿主細胞に存在するシアル酸を有する糖鎖を認識することにより始まる。その後、同じく糖タンパク質であるノイラミニダーゼと共同しエンドサイトーシスにより宿主細胞に取り込まれ増殖を開始する。インフルエンザの一連の感染経路で重要な役割を担っている機構は糖鎖-タンパク質間の特異的相互作用であり、ウイルス感染以外にも受精、発生、分化、成長、老化、がん化、などの様々な機能をその構造の違いにより制御する大変興味深い生命現象である。近年になって、この相互作用に着目した新しい糖鎖医薬の開発研究が盛んに行われるようになった。その基礎となる概念は、糖鎖-タンパク質間の特異的相互作用を人工的に合成した糖鎖誘導体（ブロッカー）を用いて阻害し、ウイルスや毒素の宿主細胞への結合をブロックしようというものである。糖鎖ブロッカーはターゲットタンパク質の糖鎖結合部位は突然変異を起こしにくい、安全性が高く分解されにくい、効果が高い等の有益な利点を多く持つため、近年このようなアプローチによる糖鎖リガンドの設計が積極的に行われ、ノイラミニダーゼ阻害剤、ペロ毒素リガンド（スターフィッシュ）等の有用性の高い化合物が設計、合成された。特に現在使用されているノイラミニダーゼ阻害剤（ザナミビルとその誘導体）は新しい糖鎖医薬として非常に大きな成果を挙げた。このような糖鎖-タンパク質間の特異的相互作用を利用したブロッカーの設計にはいかに結合力の強い化合物を設計するかが鍵であるが、糖鎖ブロッカーの効力は直接結合に関与する糖鎖の構造の他に、糖鎖部位周辺的环境（側鎖やスパーサーの構造、電荷、多価性、配向等）が複雑に絡み合って発揮するため、あらかじめ予測することは困難である。しかしこれまでの研究成果、知見を考慮しさらにコンピュータケミストリーの力を借りることによりこれまでにない、より理に適った高い効果が期待される糖鎖リガンドの設計が可能となった。

現在、実用化されている抗インフルエンザ薬はM2 タンパクの阻害剤である塩酸アマンタジンとノイラミニダーゼブロッカーのザナミビルの二種類あるが、塩酸アマンタジンは効果がA 型インフルエンザにのみであり副作用が大きい点から実際の使用から遠ざかっている。一方、ノイラミニダーゼ阻害剤はごく最近実用化されたため、まだ耐性ウイルスの出現は見られていないが、長期間に亘る使用に対して耐性ウイルスや副作用が現れる可能性がある。したがって既存の薬とは異なる作用機構による抗インフルエンザ薬の開発が必要である。

インフルエンザノイラミニダーゼと同じく膜糖タンパクであるヘマグルチニンに対するブロッカーはまだ実用化されていない。ヘマグルチニンブロッカーは初期感染に重要な役割を

担うヘマグルチニンに着目したブロッカーであるためノイラミニダーゼ阻害剤と組み合わせた治療による効果上昇、また耐性ウイルス出現の際での代替薬としてその開発は有用である。

本研究では一貫して糖鎖医薬を指向した新しいヘマグルチニンブロッカーに着目して研究を行った。コンピュータモデリングによる分子設計、効率のよい合成方法、糖鎖の配置およびその周りの構造が活性に与える影響について検討した。第一章では序論として生体内での糖鎖タンパク質相互作用に置ける糖鎖の役割及びそれを利用した糖鎖医薬について過去の様々な研究成果を基に説明した。

第二章ではコンピュータケミストリーを利用した新規インフルエンザヘマグルチニンブロッカーの設計について述べた。これまでの知見で効果的なブロッカーは様々なポリマー上に多数のシアル酸を結合させた化合物であり、シアル酸の数（密度）を増加させることにより劇的に効果を上昇させることができる（クラスター効果）。しかし合成ポリマーの安全性はまだ十分に調査されていないため、実用化は難しい。そこで私は生体内での使用に汎用性の高い環状ペプチドに注目した。新規ブロッカーは、環状ペプチドの土台にスパーサーを介してGM3 型糖鎖を結合させた環状糖ペプチドでありマグルチニンの構造特性を考慮して設計したため高い効果が期待できる化合物である。

第三章では設計した環状糖ペプチドの化学法と酵素法を組み合わせた合成について述べた。設計した環状糖ペプチドは糖鎖とペプチドの化学的性質の大きな違いから化学的手法のみで合成することは非常に困難である。そこで化学合成法と酵素合成法を併用することにより、効率よく目的物質を合成することに成功した。近年、主流になりつつある固相法による環状ペプチドの簡便かつ効率的な合成法についても述べた。

第四章では合成した環状糖ペプチドの実際のヘマグルチニンの阻害活性について述べた。活性は二種類の測定法により行った。まず、はじめにヘマグルチニンの赤血球凝集阻害活性につて鳥赤血球を用いて行った。活性は糖鎖の本数に従って高い効果が得られた。しかし土台となる環状ペプチドの配列により活性が異なる事が見出された。次に表面共鳴プラズモン（SPR）法によって合成した化合物の結合を解析した。この実験結果からも糖鎖の本数以外に環状ペプチドの配列が活性に影響を与える事が示唆された。

第五章では第四章で得られ活性について環状糖ペプチドの構造に関する視点から考察を行った。環状糖ペプチドの活性がその土台となる環状ペプチドの配列に依存することが見出されたが、環状糖ペプチドのコンフォメーションが活性に強く影響を与えていると仮定し NMR による構造解析から安定構造を算出し活性との相関について述べた。強い活性を持つ環状糖ペプチドは糖鎖が同じ向きに配向しヘマグルチニンの効率することが示唆された。

第六章は第一章から第五章までの総括として結果と考察について手短に述べた後、本研究から導き出された結論を述べている。本研究ではコンピュータモデリングを駆使し設計したインフルエンザヘマグルチニンブロッカーとしての環状糖ペプチドは、その簡便な合成法と活性結果から有用性が高い物質であることを示した。またヘマグルチニン阻害活性は土台の環状ペプチドの配列に強く依存する事を、様々な誘導体のヘマグルチネーション阻害活性および表面共鳴プラズモン分析から明らかにした。さらに環状ペプチドの配列が糖鎖の立体構造に影響を与えるが故に活性に差が生じることを NMR 構造解析から示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 教 授 田 中 勲

副 査 助教授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

Rational design, synthesis and characterization of influenza hemagglutinin blocker based on cyclic gltcopeptides

(インフルエンザウイルスヘマグルチニン結合性環状糖ペプチドの分子設計)

インフルエンザは抗原性が年々変わるうえに、新型ウイルスが出現するため効果的な予防、治療法が確立されていない厄介な伝染病である。インフルエンザの感染はウイルスのエンベロープ表面に存在する糖タンパク質のマグルチニンが宿主細胞に存在するシアル酸を有する糖鎖を認識することにより始まる。その後、同じく糖タンパク質であるノイラミニダーゼと共同しエンドサイトーシスにより宿主細胞に取り込まれ増殖を開始する。インフルエンザの一連の感染経路で重要な役割を担っている機構は糖鎖—タンパク質間の特異的相互作用であり、ウイルス感染以外にも受精、発生、分化、成長、老化、がん化、などの様々な機能をその構造の違いにより制御する大変興味深い生命現象である。近年になって、この相互作用に着目した新しい糖鎖医薬の開発研究が盛んに行われるようになった。その基礎となる概念は、糖鎖—タンパク質間の特異的相互作用を人工的に合成した糖鎖誘導体（ブロッカー）を用いて阻害し、ウイルスや毒素の宿主細胞への結合をブロックしようというものである。糖鎖ブロッカーはターゲットタンパク質の糖鎖結合部位は突然変異を起こしにくい、安全性、効果が高い等の有益な利点を多く持つため、近年このようなアプローチによる糖鎖リガンドの設計が積極的に行われてきた。特に現在使用されているノイラミニダーゼ阻害剤（ザナミビルとその誘導体）は新しい糖鎖医薬として非常に大きな成果を挙げた。このような糖鎖—タンパク質間の特異的相互作用を利用したブロッカーの設計にはいかに結合力の強い化合物を設計するかが鍵であるが、糖鎖ブロッカーの効力は直接結合に関与する糖鎖の構造の他に、糖鎖部位周辺的环境（側鎖やスパーサーの構造、電荷、多価性、配向等）が複雑に絡み合って発揮するため、あらかじめ予測することは困難である。しかしこれまでの研究成果、知見を考慮しさらにコンピュータケミストリーの力を借りることによりこれまでにない、より理に適った高い効果が期待される糖鎖リガンドの設計が可能となった。

現在、実用化されている抗インフルエンザ薬は M2 タンパクの阻害剤である塩酸アマンタジンとノイラミニダーゼブロッカーの二種類あるが、塩酸アマンタジンは効果が A 型インフルエンザにのみであり副作用が大きいという欠点がある。一方、ノイラミニダーゼ阻害剤はごく最近実用化されたため、まだ耐性ウイルスの出現は見られていないが、長期間に亘る使用に対して耐性ウイルスや副作用が現れる可能性がある。したがって既存の薬とは異なる作用機構による抗インフルエンザ薬の開発が必要である。

インフルエンザノイラミニダーゼと同じく膜糖タンパクであるヘマグルチニンに対するブロッカーはまだ実用化されていない。ヘマグルチニンブロッカーは初期感染に重要な役割を担うヘマグルチニ

ンに着目したブロッカーであるためノイラミニダーゼ阻害剤と組み合わせた治療による効果上昇、また耐性ウイルス出現の際での代替薬としてその開発は有用である。

そこで本研究では一貫して糖鎖医薬を指向した新しいヘマグルチニンブロッカーに着目して研究を行った。コンピュータモデリングによる分子設計、効率のよい合成方法、糖鎖の配置およびその周りの構造が活性に与える影響について検討した。

ヘマグルチニンは三量体糖タンパクであり、単量体のそれぞれに一边が約40 Åの三角形上にシアル酸結合部位が存在する。本研究ではこれらの特徴を踏まえ新しいヘマグルチニンブロッカーとして環状糖ペプチドを設計した。設計した環状糖ペプチドはコンピュータシミュレーションの結果、ヘマグルチニンブロッカーとして合理的な構造を持つことを示した。設計した環状糖ペプチドは、化学法と酵素法を併用して効率的に合成した。糖鎖とペプチドの性質の違いから化学法のみだと合成が極めて困難である糖ペプチドを、一級アミンとグルタミンの側鎖を架橋させる酵素のトランスグルタミナーゼを用いて簡便に合成することに成功した。この際、環状ペプチドを合成する必要があるが、液相法では大変手間と時間が掛かる合成を、環化反応を含めた固相法により効率的に達成した。

合成した環状糖ペプチドの阻害活性を赤血球凝集活性及び表面共鳴プラズモン法により評価した。活性は糖鎖の本数に従って高い効果が得られた。しかし土台となる環状ペプチドの配列により活性が異なる事が見出された。この実験結果から糖鎖の本数以外に環状ペプチドの配列が活性に影響を与える事が示唆された。

二種類の活性実験から、活性は環状糖ペプチドの土台となる環状ペプチドの配列に依存することが示唆された。そこで環状糖ペプチドのコンフォメーションが活性に強く影響を与えていると仮定しNMRによる構造解析から安定構造を算出し活性との相関について調べた。その結果、強い活性を持つ環状糖ペプチドは糖鎖が同じ向きに環の外側に配向し、活性を持たない環状糖ペプチドにはそのような効果がないことを示した。すなわち活性を持つ環状糖ペプチドは効率よくヘマグルチニンに結合することが示唆された。この結果から活性の違いは糖鎖の向きが重要であり、それを司る要因に環状ペプチドの配列が重要な因子であることを明らかにした。

これを要するに、著者は、インフルエンザヘマグルチニンブロッカーについて設計、合成、活性相関の新知見を得たものであり、様々な疾患に対しての新しい糖鎖医薬開発に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。