

学位論文題名

Study of Mechanism-Based Inhibitor for Neuraminidases

(ノイラミニダーゼの作用機序に基づく特異的阻害剤に関する研究)

学位論文内容の要旨

シアル酸 (*N*-アセチルノイラミン酸) は動物の体内に広く分布しており、細胞表面の糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質において、糖鎖の非還元末端に局在している。シアル酸は炭素原子 9 個からなる酸性糖であり、その親水性や負電荷に帯電している性質から複合糖質の物理化学的性質を変化させ、分子や細胞の認識や隠蔽を行うことで生体現象において重要な役割を担っている。これらのシアル酸の機能はシアル酸加水分解酵素であるノイラミニダーゼ (シアリダーゼ) によって調節されている。ノイラミニダーゼは、ウイルス、細菌から鳥類、哺乳動物にまで広く分布しており、複合糖質の糖鎖末端からシアル酸を除去する。ヒトなど高等動物におけるノイラミニダーゼは、シアル酸の着脱による分子認識・細胞接着・免疫応答などの生体機能を制御している。一方、微生物が持つノイラミニダーゼは、コレラやインフルエンザに代表されるように病原性や宿主細胞への侵入に関与している。このため、ノイラミニダーゼの阻害剤は感染症治療薬の候補としてのみならず、疾病や生体機能研究のツールとしても開発が望まれている。

現在までに実用化されたノイラミニダーゼ阻害剤は、リレンザやタミフルに代表される抗インフルエンザ薬のみである。これらの阻害剤は、全て天然由来の競争阻害剤である DANA とノイラミニダーゼの X 線結晶構造を基に設計されているが、個々のノイラミニダーゼのシアル酸認識部位のアミノ酸の種類、配向は似ており、その他のノイラミニダーゼ阻害剤開発を困難としている。

一方、近年ノイラミニダーゼの不可逆的阻害剤として Mechanism-Based Inhibitor (MBI) が注目されてきている。ノイラミニダーゼ MBI は、ノイラミニダーゼによってシアロシド結合が切断されることにより特異的に活性化され、酵素と共有結合を形成することによって不可逆的に失活させる。最も広く研究されている MBI の 1 つにジフルオロメチルフェニル基をアグリコン部位に有する構造があるが、この場合は、酵素によって切断された後にフルオリドイオンの脱離によって活性化したキノン型構造を生じ、活性中心近傍に存在するアミノ酸残基の側鎖と共有結合を形成することにより酵素を失活させる。しかしながら、ジフルオロメチルフェニル型の MBI は、アグリコン部分に酵素に対するアフィニティがなく、ノイラミニダーゼによって切断された後

に、キノン型構造に活性化する前に酵素の活性中心から脱離してしまうという問題が指摘されている。このことは、活性中心の外でキノン型構造が生じ、周辺の酵素と共有結合又は疎水性相互作用により非特異的に酵素を阻害するという事を示している。

そこで本研究では、これらの問題を解決するために、①酵素のアグリコン部位に個々のノイラミニダーゼに対する親和性を、クリックケミストリーを用いて付与する。また、②環状構造を有するノイラミニダーゼ MBI を合成し、アグリコン部位が切断された後も酵素の内部に滞在させるという2通りのコンセプトに基づき、それぞれ新奇なノイラミニダーゼ MBI の開発を行った。

ノイラミニダーゼのアグリコン部位には、通常シアル酸の還元末端に結合しているラクトースなどを認識する部位が存在している。個々のノイラミニダーゼにおける基質選択性が異なることから、これらのアグリコン部位にアフィニティを持つ MBI を開発することで、酵素によって切断された後のアグリコン部位からの脱離を抑えられると予想した。パラ位にアジド基を有するジフルオロメチルフェニル型のノイラミニダーゼ MBI を合成し、様々な構造を有するアルキンと銅触媒下クリック反応によりライブラリを構築した。その後、2段階のスクリーニングを行った結果、コレラノイラミニダーゼとヒト細胞質ノイラミニダーゼのそれぞれに特異的なノイラミニダーゼ MBI 構造の抽出に成功した。予想通り、これら2種類の MBI は、元のアジド基を有する骨格に比べ結合能の向上を示し、共に100倍以上 K_i 値が減少した。

ノイラミニダーゼには、シアル酸の加水分解の初めの段階としてシアル酸のアノマー位と共有結合するチロシンが保存されていることが知られている。そこで、既存のジフルオロメチルフェニル型のノイラミニダーゼ MBI において、シアル酸とアグリコン部位を環化することにより、シアル酸が加水分解される間、酵素からの脱離を抑制できるのではないかと予想した。コレラノイラミニダーゼと DANA の X 結晶構造を基に、14員環構造を有する環状ノイラミニダーゼ MBI を設計した。鍵となる環化反応は、Grubbs 触媒を用いた閉環メタセシス反応によって構築し、目的化合物を14段階、総収率1.2%で合成した。合成した環状ノイラミニダーゼ MBI を7種類のノイラミニダーゼに対して評価したところ、いずれのノイラミニダーゼに対しても環状ノイラミニダーゼ MBI が基質として切断されること及び、競争阻害剤として機能していることが確認された。また、サルモネラノイラミニダーゼ以外の6種のノイラミニダーゼに対して MBI として機能していることが分かった。サルモネラノイラミニダーゼの酵素特性を調べたところ、代謝回転数 (K_{cat}) が $18,000\text{ s}^{-1}$ と他のノイラミニダーゼの200倍程大きい値を示した。この値は、環状ノイラミニダーゼ MBI が酵素の活性中心に留まる時間の尺度と考えることができ、環状ノイラミニダーゼ MBI は予想通りノイラミニダーゼの活性中心からの脱離が抑制されていることが確認された。

本研究では、アフィニティの付与と環状構造という全く新しい2つのアプローチによってノイラミニダーゼ MBI の開発を行った。今回開発したノイラミニダーゼ MBI より既存の MBI の欠点が改善でき、MBI を用いた更なる応用研究が進展することが期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	西村 紳一郎
副査	教授	門出 健次
副査	助教	比能 洋
副査	教授	坂入 信夫 (環境科学院)

学位論文題名

Study of Mechanism-Based Inhibitor for Neuraminidases

(ノイラミニダーゼの作用機序に基づく特異的阻害剤に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

ノイラミニダーゼ (NA) は、複合糖質末端に存在するシアル酸の加水分解酵素であり、内在性 NA が生体恒常性に深く関与する一方で、インフルエンザなどによる外来 NA はその感染サイクルの維持に重要な役割を果たしている。それ故、NA 阻害剤は NA の機能解明のツールとなるばかりではなく、感染症治療薬としても注目を集めている。しかし、現在までに実用化された NA 阻害剤は、競争阻害剤である 2,3-デヒドロシアル酸を基に設計されたりレンザやタミフルに代表される抗インフルエンザ薬のみである。

そこで近年、NA の不可逆的阻害剤としてジフルオロメチルフェニル型のアグリコンを有する Mechanism-Based Inhibitor (MBI) の研究が着目されている。このノイラミニダーゼ MBI は、NA によるシアロシド結合の切断に伴いアグリコン部位がキノン型構造を生じ、NA 上の求核性官能基と共有結合を形成することによって NA を不可逆的に失活させる。しかし、この MBI のアグリコン部位は、加水分解後、酵素との親和性等の影響によっては共有結合を形成する前に酵素の活性中心より脱離するという問題点が存在した。

本論文では、このノイラミニダーゼ MBI の実用上の問題点となっているアグリコン部位の脱離を抑制し、NA に対する特異性及び MBI 活性を向上させることを目的として研究を行った。

第二章では、アグリコン部位に様々な構造を付加した MBI ライブラリを作成し、2 段階のスクリーニングを経てコレラ NA とヒト細胞質 NA のそれぞれに特異的に作用するノイラミニダーゼ MBI 構造の抽出に成功した。

第三章では、グリコシド結合の加水分解後にアグリコン部位が酵素の活性中心にシアル酸との結合により滞在することを狙い、環状ノイラミニダーゼ MBI の開発を行った。環化反応には Grubbs 触媒を用い、14 段階、総収率 1.2% で環状 MBI を合成した。合成した環状 MBI は、評価した 7 種類全ての NA に対して基質となること、及び、NA の代謝回転数 (k_{cat}) に応じた MBI 機能を有することが確認された。このことから、環状 MBI では予想通りアグリコン部位の活性中心からの脱離が抑制されていることが確認された。

これを要するに、申請者はノイラミニダーゼ MBI 開発における 2 通りの戦略の提供に成功したと言える。この 2 つの戦略はそれぞれ NA による MBI の取り込みと脱離を標的とした互いに相補的な関係にあり、その組み合わせにより新しいノイラミニダーゼ阻害剤の開発に大きく貢献すると考えられる。

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