

## 学位論文題名

## Study on the novel Neu2 Sialidase inhibitor

(新規Neu2 シアリダーゼ阻害剤に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

シアリダーゼ阻害剤として知られている化合物は N-acetyl-2,3-dehydro-2-deoxy-neuraminic acid (DANA) に代表されるような低分子化合物が主流であり、その作用メカニズムとしては、本来の基質であるシアル酸の構造を模倣することによって酵素の基質結合クレバスを占有し、本来の基質の侵入あるいは、酵素の触媒活性を阻害しているものと考えられている。この時、阻害剤は酵素活性中心として重要であることが知られる、いくつかのアミノ酸と疎水結合や水素結合を形成して基質結合クレバスにより安定に居座ることが、より強い阻害活性を発揮する上で求められる。幅広い生物種において、シアリダーゼは $\beta$ シートで形成された6つのドメインがプロペラ状に集合した特徴的な構造を持つことが X 線解析によって明らかになっている。一方で、酵素の内部に存在する活性中心のアミノ酸はある程度保存されているものの、種によっては特定の阻害剤と相互作用するためのアミノ酸が存在しない場合もあり、基質結合クレバスそのものの構造が異なることによって、幅広い生物種において普遍的に強い阻害活性を発揮できるシアリダーゼ阻害剤の開発は難しいものと考えられる。そのため、構造生物学的な方法により、特定の生物種に特化したシアリダーゼ阻害剤の開発などが、たとえばインフルエンザのノイラミニダーゼ阻害剤などを中心に精力的に行われている。特定の生物に特化した阻害という観点では、一方で、抗体の利用が考えられる。抗体は非常に種選択性が高く、同時に非常に高い親和性で結合ができることが知られている蛋白質である。幅広い生物種のシアリダーゼにおいて、高い阻害活性を引き起こすことのできる標的部位がシアリダーゼ上のどこかに存在すれば今後のシアリダーゼ阻害剤開発において非常に有用な知見となると考えられる。しかしながら、これまでにシアリダーゼを阻害するような抗体が樹立されたことはなく、また効率的に酵素阻害につながるような特定のエピトープの同定も報告されていない。

哺乳動物には Neu1、Neu2、Neu3、Neu4 の4つのシアリダーゼが知られているが、筆者は、このうち、細胞質シアリダーゼとして同定されている Neu2 の組み換えタンパク質をマウスあるいはラットに免疫し、得られたモノクローナル抗体を丹念にスクリーニングすることにより、非常に高いシアリダーゼ阻害活性を有する Neu2 抗体を複数クローン樹立することに成功した。これらは非常に高いアフィニティーで Neu2 に結合し、ほぼ完全にシアリダーゼ活性を阻害する。こういった背景から、抗体のような分子がなぜ、このような高い阻害活性を有するのかに興味をもち、解析を進めた。異なる動物種の Neu2 間でドメインシャufflingを行ない、エピトープ解析を行った結果、これら複数の抗体はいずれも $\alpha 1$ とよばれる、基質侵入側に突き出た $\alpha$ ヘリックスループに結合していることを明らかにした。ま

た $\alpha 1$ を単独で認識している抗体間の比較では、アフィニティーが高いほど、シアリダーゼ阻害活性の高いことも明らかにした。興味深いことに、 $\alpha 1$ の配列を有する直線上のペプチドにはこれら抗体は結合しないこと、 $\alpha 1$ の配列を有する合成ペプチドの免疫も試みたものの、これら被免疫動物からは Neu2 阻害活性のある抗体は得られなかったことから、我々の樹立した抗体は  $\alpha 1$  のなんらかの立体構造を認識していること、また、そのことが酵素阻害には重要であるものと考えられた。また変異体を用いた解析から、少なくとも N 末端側から 42、43、45 番目のアミノ酸がエピトープに含まれていることも明らかにした。既に報告されている X 線構造解析の結果からは  $\alpha 1$  は動くループであることが知られている。興味深いことに、Neu2 の酵素活性中心を構成するアミノ酸はそのほとんどが分子内部に存在するが、シアリダーゼ活性触媒の責任残基とされている Asp46 は唯一この可動ループである  $\alpha 1$  に存在しており、しかもエピトープとなっている 42、43、45 番目のアミノ酸残基に近接していることから、抗体は  $\alpha 1$  ループ、なかでも Asp46 周辺を含むエピトープに結合し、触媒機能になんらかの影響を与えることによりシアリダーゼ活性を阻害しているものと考えられた。

通常、抗体のような嵩高い分子は、低分子阻害剤のように、酵素活性中心内部にまで接触できないものの、酵素活性に重要なアミノ酸を含む  $\alpha 1$  を標的とすることに、触媒機能に影響を与えているというメカニズムが本研究により提唱された。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	有賀	寛芳
副査	教授	木原	章雄
副査	講師	佐々	貴之
副査	講師	米田	宏

学位論文題名

## Study on the novel Neu2 Sialidase inhibitor

(新規Neu2 シアリダーゼ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)

動物細胞によって生産された組み換え糖タンパク質は近年、様々な疾患の治療薬として開発が進められている。CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞は、高いタンパク質生産性や、その扱いやすさゆえ、本目的に世界的に広く用いられている。これまでの研究から CHO 細胞によって生産されたタンパク質に付加している N 結合型糖鎖の構造は、ヒト体内で自然に生産されるタンパク質に見られる糖鎖と共通の構造を多く有していることが知られている。たとえば N 結合複合型糖鎖の非還元末端側は bi, tri あるいは tetra-antennary の分岐構造をとるが、そこには Gal $\beta$  1,4GlcNAc 糖鎖がみられ、さらにその末端に存在するシアル酸によって保護されている。このような糖鎖の生合成過程に何らかの問題が生じると、糖タンパク質医薬品の糖鎖構造が不均一となり、その生物活性に大きな影響を与えることが知られている。特に薬物動態については大きな影響を受けることが知られており、末端のシアル酸あるいはガラクトースが切断された糖タンパク質は、肝臓に存在するアシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) あるいはマンノース/GlcNAc 受容体を介した経路によって血中から積極的に取り除かれてしまう。つまり安定した体内動態を有する

糖タンパク質医薬品を生産するためには、シアル酸付加数を十分かつ均一な状態で保持したままの生産を行う必要がある。実際に CHO 細胞を用いた糖タンパク質医薬品の製造は、発現遺伝子を安定に組み込んだタンパク質発現 CHO 細胞をバイオリアクターで連続的に培養して行われるが、培養期間が長くなるほど高い生産力価が得られる一方で、増加してくる死細胞より漏出した細胞質シアリダーゼ (Neu2 シアリダーゼ) の影響により、N 型糖鎖非還元末端からのシアル酸の切断が起こることが問題となっている。この課題解決のため、培養期間の短縮、培養条件最適化、宿主改良など様々な取り組みが行われてきたが、本質的かつ画期的な解決策は見つかっていない。

著者は、これを解決する方法として、チャイニーズハムスター由来の Neu2 シアリダーゼを阻害する抗体を樹立し、これを培地添加物して用いることにより、糖タンパク質の培養生産において Neu2 シアリダーゼの活性を長期間に渡って阻害し、シアル酸付加数を損なうことなく有用糖タンパク質医薬品を生産する方法を確立した。また樹立抗体の詳細な解析により、Neu2 シアリダーゼの阻害に重要なタンパク質ドメインを同定した。本知見は、本抗体がこれまでに知られるシアリダーゼ阻害剤とは異なる新しい阻害メカニズムを持っていることを示唆しており、幅広い生命現象に関わっているシアリダーゼの特異的阻害剤開発に展開できる新しい知見であると考えている。

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。