

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01806

研究課題名(和文) 難合成糖鎖受容体を分子模倣した修飾ペプチドの活性機構解明

研究課題名(英文) Inhibition mechanism of modified peptide ligands that mimic complicated sugar receptors

研究代表者

松原 輝彦 (Matsubara, Teruhiko)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・講師

研究者番号：10325251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：天然リガンドの代わりに認識される分子を合理設計するため、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)を標的としたペプチドの相互作用解析を行った。糖鎖受容体の代わりに認識されて感染阻害を行う糖修飾ペプチドのHAおよび感染細胞との相互作用解析を行った。糖修飾ペプチドは設計通りHAの糖鎖結合受容体に結合することがわかったが、ペプチド共存下で細胞のエンドサイトーシスを抑制させても感染が抑制されず、HAとの相互作用が感染阻害活性に直接関わっていないことが示唆された。これらの結果は、糖修飾ペプチドが細胞内での膜融合を阻害している可能性を示し、新規な阻害機構を有するペプチドリガンドとして期待出来る。

研究成果の概要(英文)：Toward design of artificial peptide ligands by de novo, the interaction between hemagglutinin (HA) and peptides that bind to HA of influenza virus were investigated. Sugar-modified peptide showed the binding to the sugar receptor-binding site, but the peptide could not inhibit endocytosis induced by viral infection. This result suggests that the peptide is not directly inhibited the initial attachment of virus to sugar receptor on cell surface. Several analyses indicate that the sugar-modified peptide has a potential to inhibit membrane fusion after endocytosis. This kind of peptide with inhibition of membrane fusion is a unique activity, suggesting that it is useful for designing of peptide ligands with novel mechanism of inhibition for viral infection.

研究分野：生体分子科学

キーワード：ペプチド インフルエンザ ウイルス感染 感染阻害機構 相互作用解析 糖鎖認識 計算機シミュレーション ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

医薬品はできるだけ多くの患者に有効で副作用が少なく、また大量生産できる収益性が高いものが開発される。しかし難治性疾患など限定された患者数しかない薬剤は、ニーズが一定数存在するものの、営利企業では対応できているわけではなく、厚生労働省による難治性疾患克服研究事業などの支援が行われている。さらに今後は次世代のオーダーメイド医療が予想され、個々の患者に適した薬剤開発のニーズがますます高まることが予想される。

申請者は、限定された人数に適した薬剤分子設計、つまり少量多品種を行う小規模な医薬品製造を目指した開発手法を研究する。例えば各医療機関において「医薬品を設計および生産まで一括して行う」ことが可能となれば、難治性疾患やオーダーメイド医療の実現が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、限定された人数に適した薬剤分子設計、つまり少量多品種を行う小規模な医薬品開発を指向した手法を開発する。しかしながら設計された薬剤が容易に合成できなければ実現しないことから、官能基の組み合わせが容易に準備でき、膨大な候補物質が準備できるペプチドが構成単位として有用ではないかと考えた。つまりペプチドは、(1) 活性のある候補分子を膨大な分子ライブラリーを準備でき、(2) 少量多品種の生産が容易で有機合成を使わない複数の選択肢(微生物・動物による生産、遺伝子治療で体内生産)がある、などの点で本課題の目的に適している。そもそもペプチドはインスリンやエンケファリン(モルヒネと同じ作用を持つペプチド)など内在性分子であり、また医薬品としても利用実績がある。

現在最も期待できる設計手法は、計算機を用いた分子設計である。そこで申請者は、特定のタンパク質に結合する代替ペプチドリガンドを *in silico* 内で得るための手法を開発することを研究目的とした。近年では高性能のワークステーションや個人用電子計算機が普及し、さらに高性能な画像処理ユニット(GPU)が搭載されたゲーム機が家庭内で

すでに使われている。これらの計算リソースを利用することで、薬剤設計が可能になると考えられる。実際、Zanamivir(商品名:リレンザ)として上市されている抗インフルエンザ薬は、1989年に当時のスパコンで設計されたノイラミニダーゼ阻害剤であるが、現在のワークステーションでは数分で同様の相互作用計算が可能である。

3. 研究の方法

計算精度を高めるためには、現在では実験による解析データを集める必要があることから、複数の実験手法によるペプチドとタンパク質の相互作用解析を行った。具体的には、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)とその糖鎖受容体に糖鎖の代わりとなって結合するペプチドの相互作用解析を以下の手法で解析した。

(a) 組換え HA タンパク質発現およびペプチドの化学合成

HA とペプチド間の相互作用の精度の高い熱力学パラメータを得るため、HA を大腸菌で発現させ、高純度な組換えタンパク質を得た。今回発現させた HA は全長 566 残基であるが、リフォールディング作業等を考慮して糖鎖受容体部位を含む 330 残基程度の HA1 ドメインのみとした。

リガンドであるペプチドは、以前に報告した 5 残基から 15 残基の配列、およびこれらの配列にビオチン化リジンを連結したペプチド(ビオチン化ペプチド)を Fmoc 化学によって有機合成した。すべてのペプチドは、実験に必要な数 mg 程度の量を 95%以上の純度で得ることができ、また質量分析によって目的物であることを同定した。

(b) アビジン-ビオチン複合体(ABC)法による K_d 値の算出

HA を 96 穴に固定化し、ビオチン化ペプチドを濃度依存的に相互作用させた。ペプチドの HA への結合は酵素標識したアビジンで検出し、逆数プロットなどから解離定数 K_d を算出した。

(c) 等温滴定型熱量測定(ITC)による熱力

学パラメータ算出

HA とペプチド間の相互作用の熱力学パラメータを測定するため、ITC 測定を行った。まずはすでにパラメータが報告されているレクチンと糖鎖の相互作用を測定した。期待通り、文献値とほぼ一致する結果が得られることを確認した。高純度な HA の組換えタンパク質に対してペプチド溶液を加え、滴定で得られるチャートから、G や H、S および K_d 値を得た。

(d) プラークアッセイ

MDCK 細胞を 6 穴シャーレに単層培養し、インフルエンザウイルスを感染させてプラーク形成数を常法に従ってカウントした。またウイルスとペプチド阻害剤の共存下で同様の実験を行い、 IC_{50} 値を算出して感染阻害活性を評価した。

4. 研究成果

(a) はじめに

天然リガンドの代わりとしてタンパク質に認識されるペプチドリガンドを設計する手法を確立することを目指し、インフルエンザウイルスの HA を標的としたペプチドを設計した。糖鎖受容体の代わりに認識されて感染阻害を行う活性の機構解析を行うため、これまでに最も高い感染阻害活性を示した糖修飾ペプチドの HA および感染細胞との相互作用解析を中心に行った。

(b) 相互作用解析

糖修飾ペプチドと HA と相互作用を ABC 法で測定したところ、HA に結合するとともに糖修飾ペプチドはシアリルラクトサミン共存下で阻害され、設計通り HA の糖鎖結合受容体に結合することがわかった。しかしながら糖を修飾しないペプチドとその解離定数が変化せず、これまで想定していた糖鎖と HA の結合阻害ではない可能性が示唆された。

(c) 感染阻害機構解析

そこで次に、糖修飾ペプチド共存下でエンドサイトーシスを抑制させ、その後プラーク

アッセイを行ったところ、感染が抑制されなかった。やはり糖修飾ペプチドはウイルスの吸着を阻害するわけではないことがわかった。一方、糖修飾ペプチド共存下で感染後 4 時間の細胞内ウイルスゲノム量を PCR で測定したところ、感染は阻害されていた。赤血球を用いた溶血試験を行ったところ、糖修飾ペプチド濃度依存的に溶血が阻害された。これらの結果は、糖修飾ペプチドによる感染阻害は、ウイルス感染過程の最初の吸着過程ではなく、次段階である膜融合に関わることが初めて示唆された。

これらの結果は、糖修飾ペプチドが HA を介した細胞内での膜融合を阻害している可能性を示した。糖修飾ペプチドが HA に結合することで HA の安定性が向上し、膜融合の誘発に必須である HA の構造変化が起きにくくなった可能性がある。HA の受容体結合部位に相互作用する化合物が膜融合阻害活性を示す例はこれまでに報告がなく、新規な阻害機構を有するペプチドリガンドとして期待出来る。

(d) まとめと展望

糖修飾しないペプチドは感染阻害活性が低く、糖修飾によって感染阻害活性が向上するが、この向上の理由は、糖修飾によって結合親和性が向上したと予想していた。しかしこの仮説が否定され、複数の相互作用データの積み重ねの結果、糖修飾ペプチドの阻害機構がウイルス吸着ではなく、膜融合であるとの新しい知見が得られた。いままで不明であった機構解明に新規な視点が加わり、解明研究を展開できる状況となった。

想定外に興味深い阻害機構解明が明らかになったため、計画の計算機シミュレーションでの値を比較検討までは十分ではなかったが、阻害剤設計に新しい概念を提唱することが可能な機構を明らかにすることができた。これらの示唆をより確実なものにするため、続く感染細胞の解析とともに、X 線結晶構造解析も必要になってくると考え、結晶化のためのタンパク質発現および精製などの解析準備を進めた。

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5件)

(1)松原輝彦・佐藤智典, インフルエンザ発症初期におけるウイルスのダイヤモンド電極による検出, *NEW DIAMOND*, 34(2), 30-33 (2018), 査読無.

(2)Masanori Nagao, Yurina Fujiwara, Teruhiko Matsubara, Yu Hoshino, Toshinori Sato, Yoshiko Miura, Design of glycopolymers carrying sialyl oligosaccharides for controlling the interaction with the influenza virus, *Biomacromolecules*, 18(12), 4385-4392 (2017), 査読有, DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01426

(3) Teruhiko Matsubara, Michiko Ujie, Takashi Yamamoto, Miku Akahori, Yasuaki Einaga, Toshinori Sato, Highly sensitive detection of influenza virus by boron-doped diamond electrode terminated with sialic acid-mimic peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113(32), 8981-8984 (2016), 査読有, doi: 10.1073/pnas.1603609113.

(4)Teruhiko Matsubara, Ai Onishi, Tomomi Saito, Daisuke Yamaguchi, and Toshinori Sato, Multivalent effect in influenza hemagglutinin-binding activity of sugar-mimic peptide, *Kobunshi Ronbunshu*, 73(1), 62-68 (2016), 査読有.

(5)Teruhiko Matsubara, Ai Onishi, Daisuke Yamaguchi, Toshinori Sato, Heptapeptide ligands against receptor-binding sites of influenza hemagglutinin toward anti-influenza therapy, *Bioorg. Med. Chem.*, 24(5), 1106-1114 (2016), 査読有, doi: 10.1016/j.bmc.2016.01.039.

[学会発表](計10件)

(1)藤原由梨奈・松原輝彦・佐藤智典, インフルエンザウイルス感染を阻害する糖ペプチドの作用メカニズム, 日本化学会第98春季年会(2017), 2018年3月

(2)Yurina Fujiwara, Shunsuke Arami, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato, The mechanism of Inhibition of Influenza Virus Infection by sugar-modified peptide, 第

64回日本ウイルス学会学術集会, 2017年10月

(3)Teruhiko Matsubara, Peptide-based biosensors: design and modification of receptor-mimic peptides for electrochemical detection of the influenza virus by a boron-doped diamond electrode, E-MRS 2017 Fall Meeting, 2017年9月

(4)松原輝彦, シアル酸模倣ペプチドによるインフルエンザウイルス検出, 6th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2017年1月

(5)Yurina Fujiwara, Shunsuke Arami, Shoko Chiba, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato, Inhibition of Influenza Virus Infection by sugar-modified peptide, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016年10月

(6)松原輝彦・大西愛・山口大介・佐藤智典, ヘマグルチニンの受容体結合部位に挿入されるペプチドの計算機支援による設計, 第26回バイオ・高分子シンポジウム, 2016年7月

(7)藤原由梨奈・荒見俊介・千葉頌子・松原輝彦・佐藤智典, インフルエンザウイルス感染を阻害する糖ペプチドの開発, 日本化学会第96春季年会(2016), 2016年3月

(8)松原輝彦, インフルエンザウイルスの感染を阻害する糖鎖模倣ペプチドの設計, 5th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2016年1月

(9)Teruhiko Matsubara, Ai Onishi, Daisuke Yamaguchi, Toshinori Sato, Affinity selection of hemagglutinin-binding heptapeptide and in silico docking simulation, THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015 (Pacifichem 2015), 2015年12月

(10)吉川 栞・栗山 龍之介・郡 遥香・松原輝彦・佐藤 智典, 糖鎖ミミックペプチドとヘマグルチニンとの相互作用の熱力学的考察, 第64回高分子年次大会, 2015年5月

[図書](計1件)

(1)松原輝彦・佐藤智典, 糖鎖模倣ペプチドによる抗インフルエンザ薬の研究(6章1節), ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術, p221-228, 技術情報協会, 2017年12月

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<https://www.bionano-molec.org/>

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

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

藤原由梨奈 (FUJIWARA, Yurina)