

令和元年6月11日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20955

研究課題名(和文) インフルエンザノイラミニダーゼに応答して脂質膜を溶解する人工ペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of artificial peptide that dissolves lipid membrane in response to influenza neuraminidase

研究代表者

松下 隆彦 (Matsushita, Takahiko)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：10435745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ノイラミニダーゼのはたらきでアミノ基含有化合物を遊離する仕組みを構築し、これを発色基質や脂質溶解性ペプチドに適用したプロドラッグ型基質を合成した。ノイラミニダーゼが本基質のシアル酸残基を切断するとアミノ基含有化合物が遊離されるばかりでなく、その過程で発生する中間体がノイラミニダーゼの活性を低下させるはたらきを持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在主流の抗インフルエンザ薬はノイラミニダーゼ阻害薬であるが、新型インフルエンザウイルスや薬剤耐性株の対策には異なる作用機序をもつ薬剤の開発が重要である。本研究で構築したプロドラッグ型ペプチドは、ノイラミニダーゼ応答的に脂質溶解性ペプチドを遊離してインフルエンザウイルスを溶解するはたらきと、副次的な酵素活性の低減が期待できる。ノイラミニダーゼ応答性は他の化合物にも付与できるため、新たな創薬の展開につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a mechanism to release an amine-containing compound by the action of neuraminidase has been constructed and applied to a chromogenic substrate and a lipid-soluble peptide. In the presence of neuraminidase, the prodrug-type substrates not only release amine-containing compounds but also reduce the activity of neuraminidase by side reaction with the intermediate generated in the process of release.

研究分野：生体機能化学

キーワード：インフルエンザウイルス プロドラッグ ターゲティング

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスはこれまでに幾度も世界的に大流行して多くの感染者や死亡者を出してきた。インフルエンザウイルスの表面にはヘマグルチニンとノイラミニダーゼの二つの糖タンパク質が脂質膜にスパイク状に結合している(図1)。ノイラミニダーゼはシアル酸を加水分解するシアリダーゼ活性を有しており、感染細胞から子孫ウイルス粒子を遊離するはたらきを持っている。現在、オセルタミビルをはじめとしたノイラミニダーゼ阻害剤がインフルエンザの予防や治療に使われている。しかしながら、オセルタミビルに耐性のウイルスは、2007年に北欧に出現してからわずか一年の間に世界的な拡大を遂げており、今後ますます深刻化すると予想される。このような薬剤耐性株や新型インフルエンザウイルスの対策には、従来のノイラミニダーゼ阻害剤に加えて異なる作用機序ではたらく薬剤を開発することが強く望まれる。

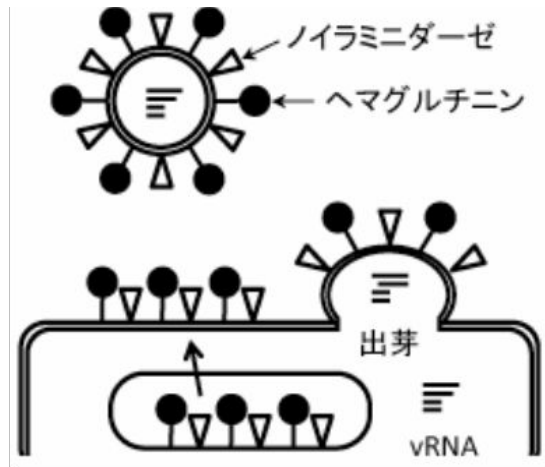


図1 インフルエンザウイルスと感染細胞

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスを特異的に溶解する人工ペプチドを開発する。本研究で着目するペプチドは脂質膜を溶解するはたらきがある。天然に存在する強力な毒素ペプチドのメリチンよりも活性が強く、ウイルスを溶解することもできる。本ペプチドの活性をインフルエンザウイルス特異的に発揮させるには、本ペプチドに選択毒性を付与しなければならない。インフルエンザウイルスの表面にはシアル酸を切断する酵素であるノイラミニダーゼが存在する。従来の抗インフルエンザ薬はこの酵素活性を阻害してきたが、本研究ではこの活性を利用したアプローチを採用する。ノイラミニダーゼの作用によるシアル酸の切断が引き金となって本ペプチドが遊離することで膜溶解活性がオンとなり、反応場の近傍のウイルスを溶解する作用機序を持つ新規物質の創製を目指す(図2)。

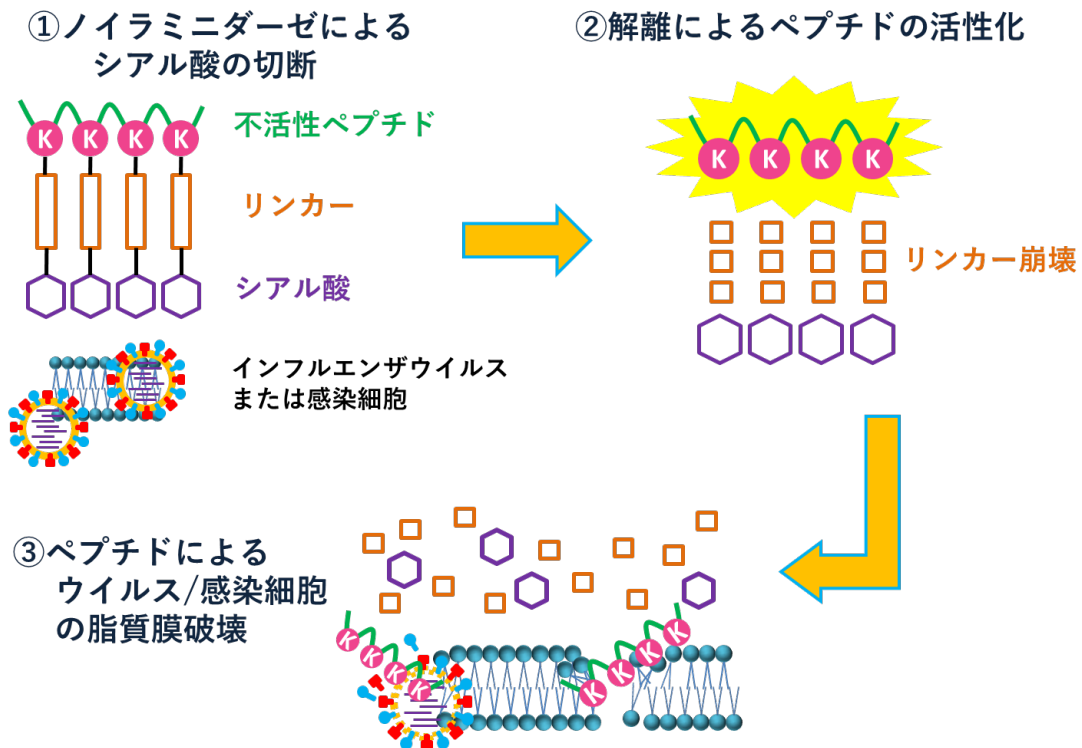


図2 インフルエンザノイラミニダーゼに反応した脂質膜破壊の概略図

3. 研究の方法

(1) ノイラミニダーゼ応答性リンカーの構築

ノイラミニダーゼの作用部位となるシアル酸残基を末端にもつノイラミニダーゼ応答性リンカーをデザインして化学合成する。

(2) ノイラミニダーゼ応答性リンカーの機能検証

ノイラミニダーゼ応答性リンカーを *p*-ニトロアニリンと連結したモデル基質を化学合成し、これにノイラミニダーゼを作用させることで意図した化合物遊離が起こるかどうかを調べる。

(3) ノイラミニダーゼ感受性リンカーをもつプロドラッグ型ペプチドの構築

脂質溶解性ペプチドの側鎖にノイラミニダーゼ応答性リンカーを導入したネオ糖ペプチドを化学合成する。

4. 研究成果

本研究ではノイラミニダーゼの作用でシアル酸が分解されることを引き金に、膜溶解性ペプチドが遊離することで、反応場近傍にあるインフルエンザウイルスを溶解することを意図した人工ペプチドの創製に取り組んだ。

まず、ノイラミニダーゼに反応してアミン含有基質を遊離する仕組みを意図したノイラミニダーゼ応答性リンカーをデザインして化学合成した。ノイラミニダーゼに反応した化合物の遊離が実際に起こるかどうかを確かめるため、次に本リンカーを *p*-ニトロアニリンのアミノ基に結合したモデル基質を合成した。本基質にノイラミニダーゼを加えるとすぐに溶液の色が無色から黄色に変わり、その後は時間の経過とともに発色が強くなった。このことから、ノイラミニダーゼが存在することでモデル基質から *p*-ニトロアニリンが遊離されることが確かめられた(図3)。

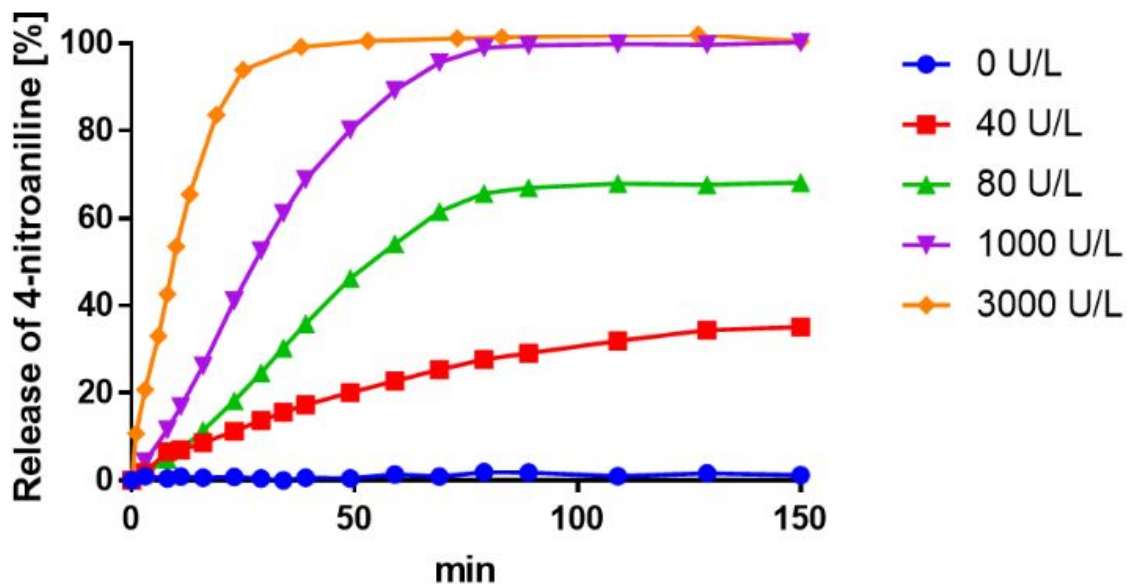


図3 ノイラミニダーゼ活性に依存した *p*-ニトロアニリンの遊離

この反応を NMR 測定により更に詳しく調査した。その結果、ノイラミニダーゼの作用でアミン含有基質が遊離されると並行して、ノイラミニダーゼの活性が低下することを見出した。すなわち、ノイラミニダーゼによって基質のシアル酸部位が切断されると、リンカー部位が自発的に崩壊してアミン含有基質が遊離されるが、その過程で発生する中間体はノイラミニダーゼと副反応して酵素活性を低下させていることが示唆された。

これらの知見をもとに、ノイラミニダーゼ応答性リンカーを脂質溶解性ペプチドのリジン側鎖に結合したネオ糖ペプチドを合成した。あらかじめペプチドを合成したあとにノイラミニダーゼ応答性リンカーを結合させる反応は進行しなかった。原因はペプチドの高さと考え、ペプチドを数アミノ酸残基の短鎖に断片化したものをノイラミニダーゼ応答性リンカーと反応させたところ、今度はスムーズに反応が進行した。得られたオリゴネオ糖ペプチドを逐次的にフラグメント縮合することで長鎖のネオ糖ペプチドを構築することができた。

本研究で構築したプロドラッグ型ペプチドは、ノイラミニダーゼ応答的に脂質溶解性ペプチドを遊離してウイルスを溶解するはたらきと、副次的な酵素活性の低減が期待できる。ノイラミニダーゼ応答性は他の化合物にも付与できるため、新たな創薬の展開につながる事が期待される。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

ダニエルモニック波美、小山哲夫、松下隆彦、幡野健、松岡浩司、NA によるシアル酸の解離機構に関する合成研究() - p - ニトロアニリン誘導体の合成と評価 -、日本化学会第 8 回 CSJ 化学フェスタ 2018 (船堀) 2018 年 10 月.

Monique Daniel, Takahiko Matsushita, Tetsuo Koyama, Ken Hatano, Koji Matsuoka
“Synthetic study on dissociation mechanism of sialic acid by NA(3):Confirmation and evaluation of the dissociation of p-nitroaniline caused by the cleavage of sialic acid”
日本化学会第 98 春季年会 (船堀) 2018 年 3 月.

ダニエルモニック波美、松下隆彦、小山哲夫、幡野健、松岡浩司、NA によるシアル酸の解離機構に関する合成研究(II): リンカーを介したシアル酸とポリペプチドの結合法の開発、高分子学会関東支部第 29 回埼玉地区懇話会 (さいたま) 2018 年 1 月.

ダニエルモニック波美、松下隆彦、小山哲夫、幡野健、松岡浩司、リンカーを介したシアル酸とポリペプチドの結合及び、ノイラミニダーゼによるシアル酸の解離機構に関する合成研究、日本化学会第 7 回 CSJ 化学フェスタ 2017 (船堀) 2017 年 10 月.

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。