

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658035

研究課題名（和文） 新しい発想を基盤としたインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤の合成とその応用

研究課題名（英文） Synthesis and Application of Binding-typed Inhibitor for Infection of Influenza Virus on a Base of New Conception

研究代表者

山本 憲二 (YAMAMOTO KENJI)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：70109049

研究成果の概要（和文）：

ニワトリ卵黄より抽出した糖ペプチドまたは糖ペプチドに糸状菌エンドグリコシダーゼ（エンド-M）を作用して遊離した糖鎖を縮合反応または還元アミノ化反応によりアルギン酸やキトサンに多価に重合した糖鎖結合ポリマーを合成し、糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸残基にインフルエンザウイルスを結合させて捕捉する新しい概念の感染阻害剤として応用した。阻害剤について動物細胞を用いたインフルエンザウイルス感染阻害能を調べた結果、高い感染阻害活性を示すことを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We have succeeded in simple syntheses of efficient binding-inhibitors for influenza virus, which are composed of sialyl saccharides of glycopeptides extracted from hen egg yolk. We modified alginate and chitosan with multiple sialyl saccharides using condensation reaction and reductive amination reaction, respectively. These binding-inhibitors utilize the carbohydrate recognition of influenza virus for sialic acid, thus they can prevent the virus from infection. The resulting inhibitors showed sufficient inhibitory activity against influenza virus infection in MDCK cells. Unlike the other binding-inhibitors of influenza virus, these virus inhibitors require simple step in their syntheses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：応用微生物学、糖鎖工学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：インフルエンザウイルス、感染阻害剤、シアロ糖鎖、アルギン酸、キトサン

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルスは人間の免疫機構にとって最大の脅威であり、インフルエンザウイルスはその代表的なウイルスの一つである。昨今の新型インフルエンザウイルスによる世界的な流行は地球規模のウイルスの脅威を感じさ

せるものである。ウイルスは宿主細胞内に侵入して、その代謝経路を利用して自らを複製するため、特異的な薬剤を作成することが難しく、しかもそのサイズが非常に小さいために膜ろ過による除去も困難である。特にインフルエンザウイルスは変異が激しいために

有効なワクチンを迅速に充分量用意することが難しい。このような背景から、インフルエンザウイルスの感染を予防する実効的な方法の考案は急務である。

インフルエンザウイルスの感染増殖機構を利用した実効性のある感染阻害剤としてはウイルスが感染細胞から出芽する際に働くノイラミニダーゼの阻害剤である **zanamivir** や **oseltamivir** が広く使われている。これらの阻害剤は現在、最も有効で、かつ唯一のインフルエンザ治療薬として使われているが、その効果は限定的であって、宿主細胞にウイルスが感染した後の増殖段階に限られる。そのために感染そのものを避けることはできず、しかも感染後、細胞からウイルスが出芽するまでの48時間以内の投与が必要である。これらの薬剤はウイルスの拡散を防ぐ効果はあっても既に増殖したウイルスを失活させる効果はない。また、最近では薬剤耐性を獲得したウイルス株の出現が報告されている。

## 2. 研究の目的

インフルエンザウイルスは菌体を包むエンベロープ上にヘマグルチニンとノイラミニダーゼと言う二つの糖タンパク質を発現している。ヘマグルチニンは宿主細胞膜上の酸性糖であるシアル酸を末端に持つ糖鎖（シアロ糖鎖）を認識して細胞に接着し、続いて起こるウイルスの細胞内への膜融合を伴った侵入に本質的な役割を果たす。一方、ノイラミニダーゼはシアル酸を認識して分解する糖分解酵素（シアリダーゼ）であり、宿主細胞内で複製されたウイルスが細胞膜周辺で再構成されて細胞外に出る際にヘマグルチニンと結合した細胞膜上のシアル酸を切断除去することによってウイルスが凝集するのを防ぐ。このような感染増殖機構を利用して、これまでに多くの抗インフルエンザ薬剤が開発されている。現在、世界中に広がるインフルエンザウイルスによる感染症は **zanamivir**（商品名リレンザ）や **oseltamivir**（商品名タミフル）などの抗インフルエンザ薬剤が有効で広汎に用いられている。これらの薬剤はインフルエンザウイルスが有するノイラミニダーゼの反応中間体を模倣した構造を持つもので、宿主のシアリダーゼには作用しないために抗インフルエンザウイルス薬剤として高い効果を持つ。しかし、これらの薬剤はノイラミニダーゼの阻害剤であるために、その効果はウイルスが宿主細胞に感染した後の増殖段階に限られる。従って、感染そのものを避けることはできず、発症直後の高熱などの危険な症状を回避することはできない。そこで、発想の転換が要求される。すなわち、予防医学の発想を求めなければならない。インフルエンザウイルスに対す

るワクチンの作成、接種は予防法の一つであるが、ワクチンを広く行きわたらせるためにはその製造にかかる多大な時間と量と費用が必要である。予防医学の発想として他の方法はないかと考えれば、それは物理的方法である。これはプリミティブな方法ではあるが、非常に確実な方法でもある。すなわち、ウイルスを捕捉し除去してしまおうという発想である。これは斬新な発想であり、これまでの抗インフルエンザウイルス薬剤による感染阻害とは根本的に異なるコンセプトを持ったものである（図1参照）。

本研究ではウイルスの感染を予防するという観点から、インフルエンザウイルスがシアル酸に結合することに注目して、シアロ糖鎖を有したウイルス捕捉型感染阻害剤の作成を試みた。すなわち、ニワトリ卵黄から多量に得られるシアロ糖ペプチドのシアロ糖鎖をアルギン酸やキトサンなどのポリマーに多価重合して、ウイルスに接着し絡め取るような捕捉型の感染阻害剤を作成する。これらの原料は天然物由来でヒトに対して無害な物質であり、本研究ではこのような阻害剤の感染阻害効果を解析するとともにその応用を検討することを目的とした。

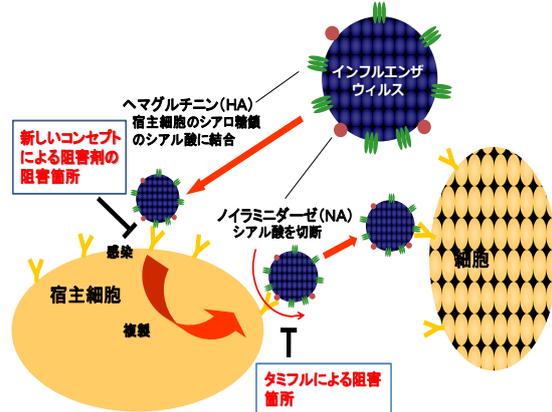


図1. 新しい発想に基づいたインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤の概念

## 3. 研究の方法

新しい発想に基づいて創製しようとするインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤は鶏卵の卵黄より抽出単離したシアロ糖ペプチドとアルギン酸、あるいはエンドグリコシダーゼでシアロ糖ペプチドから遊離させたシアロ糖鎖とキトサンから合成されるもので、シアロ糖鎖をこれらのポリマーに多価重合し、糖クラスター効果を活用した感染阻害剤を作成した。得られたシアロ糖鎖ポリマーについて、さまざまなタイプのインフルエンザウイルスに対する感染阻害を MDCK 細胞を用いて調べた。

### (1) シアロ糖ペプチドの調製

ニワトリの卵より卵黄を採出し、フェノー

ル抽出によって糖ペプチド画分を得た後、プロナーゼ処理して、アスパラギン残基にシアロ二本鎖複合型糖鎖を結合する6残基のアミノ酸からなる糖ペプチドをゲル濾過によって分離調製した。

(2) シアロ糖ペプチドのアルギン酸への付加

シアロ二本鎖複合型糖鎖を有する糖ペプチドをアルギン酸と DMT-MM

(4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-Methylmorpholinium chloride n-Hydrate) の存在下で反応し、糖ペプチドの N-末端アミノ酸残基であるリジンのアミノ基とアルギン酸の構成単位であるウロン酸のカルボキシル基を縮合させて、シアロ糖鎖を有するアルギン酸を合成した。反応液を限外濾過膜によって濾過濃縮し、アルギン酸にシアロ糖鎖が多価結合したポリマーを得た。

(3) シアロ糖鎖の調製

上記のようにして卵黄から得たシアロ糖ペプチドに、土壌より単離同定した糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来のエンドグリコシダーゼ (Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, Endo-M) の遺伝子組換え酵素を pH6.0 にて作用させ、還元末端側に N-アセチルグルコサミン残基を一分子のみ有した形のシアロ二本鎖複合型糖鎖を調製した。

(4) シアロ糖鎖のキトサンへの付加

上記により調製したシアロ糖鎖を NaBH<sub>3</sub>CN の存在下でキトサンと反応し、還元アミノ化反応によってキトサンにシアロ糖鎖が多価結合したポリマーを得た。また、3糖のシアリルラクトースを同様に NaBH<sub>3</sub>CN の存在下でキトサンと還元アミノ化反応を行い、シアリルラクトースを多価結合したポリマーを得た。

(5) ウイルス感染阻害試験

96穴プレートのウェルにて MDCK 細胞 (Madin-Darby canine kidney cell、イヌ腎臓細胞) を一晚培養し、細胞を単層に固定化する。次いで倍々希釈した阻害剤とインフルエンザウイルスを混合して 25℃ で一時間反応した各反応液を各ウェルに添加して、CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベートした。パラホルムアルデヒドで固定した後、ウイルスのモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光抗体法によりウイルス感染細胞を蛍光にてラベルし、蛍光顕微鏡によって陽性細胞数をカウントして阻害剤のウイルス感染阻害能を調べた。供試ウイルスには A 型 (A/New Caredonia/20/99(H1N1)、A/Panama/2007/99(H3N2)) および B 型 (B/Shanghai/361/2002) のヒトインフルエンザウイルスを用いた。

#### 4. 研究成果

(1) シアロ糖鎖をアルギン酸に多価結合したポリマーのウイルス感染阻害効果

アルギン酸にシアロ糖ペプチドを縮合反応により多価に結合したシアロ糖鎖ポリマーは A 型および B 型のいずれのヒトインフルエンザウイルスについても高い感染阻害活性を示した。しかし、ウイルスのノイラミニダーゼによってシアロ糖鎖末端のシアル酸が切断されるためにその拮抗的な阻害効果が著しく低下することが示された。そこで、ノイラミニダーゼの阻害剤であるタミフルを共存して作用したところ、相乗効果によるインフルエンザウイルスの感染阻害が見られ、以前に我々が合成した CDO-キトサン (Complex-type di-sialooligosaccharide-binding chitosan、キトサンにスパーサーを介してシアロ糖鎖を多価に結合させたポリマー) と同等の感染阻害を示した (図 2)。アルギン酸のシアロ糖鎖ポリマーは CDO-キトサンに比して合成が容易という利点がある。

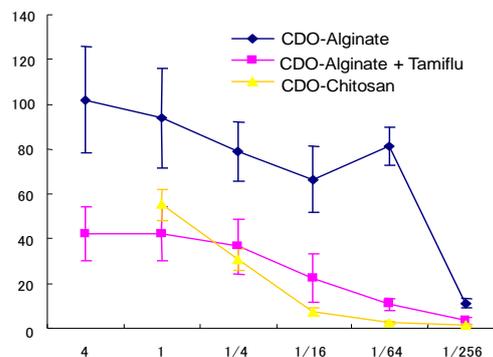


図 2. シアロ糖鎖ポリマーによるインフルエンザウイルス (A/New Caredonia/20/99(H1N1)) の感染阻害

横軸：阻害剤の希釈度、縦軸：残存感染能

1) Umemura, M., Itoh, M., Makimura, Y., Yamazaki, K., Umekawa, M., Masui, A., Matahira, Y., Shibata, M., Ashida H., Yamamoto, K. (2008). Design of a sialylglycopolymers with a chitosan backbone having efficient inhibitory activity against influenza virus infection. *Journal of Medicinal Chemistry*, **51**, 4496-4503.

(2) シアロ糖鎖およびシアリルラクトースをキトサンに多価結合したポリマーのウイルス感染阻害効果

一段階の簡易な反応によって感染阻害剤を作成する目的で、シアロ糖ペプチドを Endo-M 処理して得られるシアロ糖鎖の還元末端の糖残基 (一残基の N-アセチルグルコサミン) を還元アミノ化反応によってキトサンのアミノ基と結合し、ペンダント状にシアロ糖鎖をキトサンに結合させた阻害剤、および 3糖のシアリルラクトースを還元アミノ化反応によってキトサンに多価重合した阻害剤を調製して、その感染阻害効果を検討した。

その結果、シアリルラクトースのみによる感染阻害活性は低い、シアリルラクトースをキトサンに多価に付加した阻害剤は約 50 倍高い感染阻害能を示した。また、シアロ糖鎖をキトサンに多価に結合した阻害剤の感染阻害能は約 10 倍高く、さらに遊離のシアロ糖鎖のみによる阻害能に比べて有為に高かった。シアリルラクトースのキトサンへの付加率は阻害能に影響することも確認された。

#### 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 1 件)

Umemura, M., Makimura, Y., Itoh, M., Yamamoto, T., Mine, T., Mitani, S., Shimizu, I., Ashida, H., and Yamamoto, K.: One-step synthesis of efficient binding-inhibitor for influenza virus through multiple addition of sialyloligosaccharides on chitosan, *Carbohydrate Polymers*, **81**, 330-334 (2010) 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

山本憲二、Endo-M 酵素を用いた糖鎖の付加技術、研究産業・産業技術振興協会、平成 24 年 1 月 16 日、東京

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 憲二 (YAMAMOTO KENJI)  
石川県立大学・生物資源環境学部・教授  
研究者番号：70109049

##### (2) 研究分担者

芦田 久 (ASHIDA HISASHI)  
京都大学大学院・生命科学研究科・准教授  
研究者番号：40379087