様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ５ 月 ２４ 日現在

機関番号： ３２６１２
研究種目： 挑戦的萌芽研究
研究期間： 2014～2015
課題番号： ２６５６０２４５

研究課題名（和文） インフルエンザウイルス結合性ペプチドの熱力学的因子を考慮した分子進化と機能評価

研究課題名（英文） Molecular evolution and functional analysis of influenza virus-binding peptides

研究代表者
佐藤　智典（Sato, Toshinori）

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：００１６２４５４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：新型インフルエンザウイルス(IFV)の出現によるパンデミックの対策のために、ウイルスの検出手法の開発と感染阻害剤の開発について検討した。ファージディスプレイ法で得られたIFVのヘマグルチニン（HA）結合性ペプチドとHAとの相互作用の熱力学的パラメーターを等温滴定カロリメーターにより評価した。HAの糖鎖認識ポケットのサイズに適した５残基のペプチドは１５残基のペプチドと同程度の水素結合で相互作用していることが示された。得られた５残基のペプチド配列ARLPRは、多様な亜型に対して高い感染阻害活性を示した。さらに、ダイヤモンド電極表面に固定化することで、高感度にIFVを検出することにも成功した。

研究成果の概要（英文）：For taking measures against pandemic by emerging of new strains of influenza virus (IFV), we carried out the development of virus detection method and infection inhibitor using IFV-binding peptides. IFV hemagglutinin (HA)-binding peptides were selected from a phage-displayed peptide library. Thermodynamic parameters for the interaction between peptides and HA were determined by isothermal titration calorimetry, and it was indicated that pentapeptides suitable for the size of the receptor-binding pocket in HA showed the similar enthalpy change with pentadecapeptides. The pentapeptide ARLPR showed high infection inhibition activity against major IFV subtypes. Furthermore, by the immobilization of the HA-binding peptides on diamond electrode, we could achieve highly sensitive detection of IFV.

研究分野：生命科学

キーワード：ペプチド　インフルエンザウイルス　ヘマグルチニン　ファージディスプレイ法　等温滴定型カロリメーター　感染阻害剤　ダイヤモンド電極　ウイルスセンシング

１．研究開始当初の背景

近年、新型インフルエンザウイルス(IFV)の出現によりパンデミックの危険性が高まってきている。本格的なパンデミックが起きる前に我々が行っておくべき対策は、サーベイランスとしてのウイルスの検出法と感染阻害剤の開発である。ウイルスの検出や感染阻害においては、抗体や糖鎖を用いた研究・開発が行なわれているが、本研究では、糖鎖認識を模倣するペプチドを用いた。IFV に結合するペプチドは、ファージ提示ペプチドライブラリーを用いて探索が行える。IFV に親和性を有するペプチドを開発することで、感染阻害剤や検出用のプローブとしての利用が可能となってくる。

２．研究の目的

H5 型などの新型 IFV のヘマグルチニン(HA、赤血球凝集素)の糖鎖認識部位に結合性を有したペプチド配列を、ファージライブラリー法を用いて探索する。次に、HA に対する親和性を動力学的解析、熱力学的な解析、配列のクラスタリング解析およびドッキングシミュレーションを用いて解析する。親和性解析を基にして、分子進化工学の手法を用いたペプチド配列の最適化と短小化を行う。得られたペプチド配列を固体基板表面などに提示させることで、IFV の検出および感染阻害活性を評価する。

３．研究の方法

ペプチドの探索はファージディスプレイ法により行った。ランダムな 15 アミノ酸残基のペプチドライブラリーを提示した M13 ファージを作製した。HA 固定化基板とファージライブラリーを相互作用させて、シアリルラクトサミンなどで溶出することで糖鎖認識部位に結合したファージを回収した。得られたファージを大腸菌で増幅した後に、再度、固定化した HA に対してファージを相互作用させた。この操作を繰り返した後に、ファージのクローニングを行ない、遺伝子解析からペプチド配列を決定した。また、H5 型（A/Vietnum/1203/　2004 株）の HA に親和性のあるペプチドを探索するために HA を遺伝子組換えにより大腸菌で作製した。ファージクローンと HA との親和性は ELISA 法により評価した。親和性が確認されたファージクローンに提示されたペプチド配列を解析し、ClustalW などのソフトを用いてクラスタリング解析を行なった。ファージディスプレイ法により得られたペプチド配列を固相合成して、HA との相互作用を検討した。測定は次の方法で行った。１）ビオチン化ペプチドとアビジンとの複合体を作製し、基板に固定化した HA との相互作用を定量した。２）ペプチド修飾リン脂質を合成して基板上に累積し、HA や IFV との結合を原子間力顕微鏡や PCR 法等により評価した。３）HA 結合性ペプチドをホウ素ドープダイヤモンド（BDD）電極表面に固定化し、IFV の結合を電気化学的に定量した。電極表面への固定化はアジド化ペプチドを用いてクリック反応により行った。４）等温滴定型カロリメーター（ITC）を用いて HA とペプチドとの相互作用の熱力学的解析を行った。さらに、５）IFV の MDCK 細胞(イヌ腎由来細胞)への感染阻害実験をプラークアッセイ法により行った。そのためにステアリル化ペプチドを合成して自己集合体を形成させた。もしくは HA 結合性ペプチドを修飾したカルボシランデンドリマーを用いた。

４．研究成果

(1) Ｈ５亜型 HA1 の作製とペプチドとの親和性の確認

A/Vietnam/1203/2004（H5N1）の IFV 株の HA の糖鎖結合部位である HA1 の特定部分（17D から 336S までの 320 残基）の末端に 6×His タグを付加した配列を pET-15b ベクターに組み込んだ。この発現ベクターを大腸菌と培養して、HA1 の組換えタンパク質を作製した。SDS-PAGE およびウエスタンブロティングにより HA1 が作製されていることを確認した。HA1 を ELISA プレート基板に吸着させて、フェツインとの結合性を確認した。さらに、HA 結合性ペプチドとの親和性を有していることも確認できた。

(2) 等温滴定カロリーメーター（ITC）を用いた HA1-ペプチド間相互作用の解析

H5 亜型 HA1 とペプチドとの相互作用における熱力学的パラメーターは、ITC を用いて評価した。その結果、HA 結合性ペプチドは、α2-6 シアリルラクトサミン（6'-SLN）よりも低い解離定数を示した（表１）。また、H5 亜型 HA1 とエンタルピー支配で結合していることが示された（図１）。しかしながら、配列の相同性の高い H5-17-bK と D1-bK での熱力学的パラメーターではエンタルピーの値などでの類似性は見られなかった。一方、

H5-18-bK、D1-bK と 6'-SLN については類似した熱力学的パラメーターが得られた。特に、H5-17-bK では、多くの極性のアミノ酸が相互作用に関与することでエンタルピー支配の程度が高まったと考えられるまた、ドッキングシミュレーションでは、疎水性のアミノ酸が相互作用に関与していることが示唆され、極性のアミノ酸と共同して親和性を高めていると推察された。

また、短い５残基の s2(1-5)ARLPR 配列では ΔH = -89.1 kJ/mol, ΔS= -231 J/molK で K_d = 23 μM であった。１５残基に比べて高いエンタルピー変化が得られており、HA の糖鎖認識ポケットに入って水素結合に寄与している部分は５残基程度で十分であることが明らかとなった。

表１　ペプチドとＨ５亜型 HA1 との ITC で求めた解離定数

ペプチド	K_d (μM)
H5-17-bK VGHSISPEATSRQAL-bK	30.1
H5-18-bK TPGHTIGDPNWKYPM-bK	35.6
D1-bK GLAMAPSVGHVRQHG-bK	10.7
6'-SLN NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAc	58.0

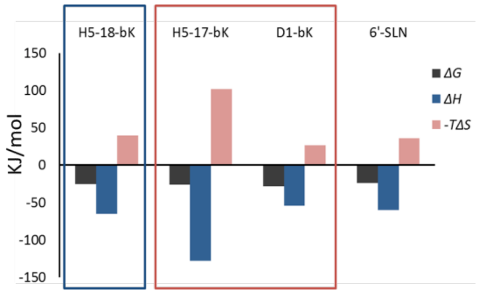

図１　HA1-ペプチド間相互作用における熱力学的パラメーター

(3) H5 亜型に結合するペプチドの探索

D1 ペプチドを提示したファージクローンは H5 亜型 HA(A/Vietnum/1203/2004)に結合できた。そこで、このペプチド配列に変異を導入した D1 サブライブラリーを作製して、H5 亜型 HA1 に対してセレクションを行った。溶出物質は、シアル酸を含む糖鎖である GM3 あるいは sLe^x を用いた。12 通りの条件でセレクションを行った結果、D1 と同定度の結合活性を持つファージクローンが７種類得られた。これらのファージクローンでは、D1 配列中の(xxAMAPxxxHxxxxx)が保存されていた。これらのアミノ酸は、D1 配列において、H1 および H3 亜型 HA の結合に重要であると同定されているアミノ酸と一致していた。これにより N 末端側の７残基程度がヘマグルチニンの糖鎖認識ポケットに挿入されて相互作用していることが推察された。この結果はドッキングシミュレーションにより支持された。

(4) H1,H3, H5, H7, H9 亜型 IFV に対する感染阻害活性

C18-D1 および C18-s2(1-5) ARLPR ペプチドを用いた感染阻害活性の結果、C18-s2(1-5) ペプチドは H1 や H3 亜型と同様に H5, H7 および H9 亜型に対して感染阻害活性を示した（表２）。これに対して C18-D1 ペプチドは H5, H7 および H9 亜型に対しては阻害活性を示さなかった。また realtime RT-PCR では、感染を阻害したペプチドは、ペプチド濃度依存的に細胞内ウイルス量を減少させた。これにより細胞内への IFV の取り込み量の低下が感染阻害活性をもたらしたものと考えられる。一方、ITC で求められた H5 亜型 HA1 の結合活性は D1 が 10.7 μM で s2(1-5)が 2.3 μM であり、共に高い結合活性を示した。よって、ペプチドは HA と親和性を示しても、必ずしもウイルス感染を阻害する訳ではないことが示された。

表２ プラークアッセイにより求めたペプチドの感染阻害活性（IC_{50}, μM）

ペプチド	H1	H3	H5	H7	H9
C18-D1	11	7.5	>100	>100	>100
C18-s2(1-5)	1.9	1.6	0.98	0.19	1.83

(5) ラフト様の構造を有するペプチド脂質膜と IFV および HA との相互作用

HA 結合性ペプチド ARLPR を有したペプチド脂質 pep-DPPE および DOPC(ジオレオイルホスファチジルコリン)の混合脂質単分子膜を作製し、POPC 固定化マイカ基板上に累積した。ELISA 法により親和性を定量化したところ、H1 亜型 HA は 10 nM の Kd 値を示し、H1 亜型 IFV は 1600 pfu で有意な親和性が見られた。また、このときペプチド固定化膜に結合しているウイルス量を PCR により定量評価したところ、400 pfu/cm^2 の IFV が結合していた。この結果は、IFV の結合量が十分ではないのに加えて、抗体や PCR での検出限界が影響していることも懸念され

た。そこで、次に高感度に IFV を検出する手法の開発を行った。

(6) HA 結合性ペプチド修飾 BDD 電極による IFV および HA の検出

IFV 認識分子として HA 結合性 s2(1-5)のアジド基導入ペプチドデンドリマーを固相法により合成した。さらに検出デバイスの基板として、BDD 電極を作製した。BDD 電極の表面を、① 電界グラフトによるリンカー分子の固定化とアルキニル基の提示、② クリック反応によるペプチドの固定化、という順序で修飾し、ペプチド修飾電極を作製した(図２)。作製したペプチド修飾 BDD 電極に HA および IFV を相互作用させ、電気化学インピーダンス（EIS）測定を用いて検出を行った。

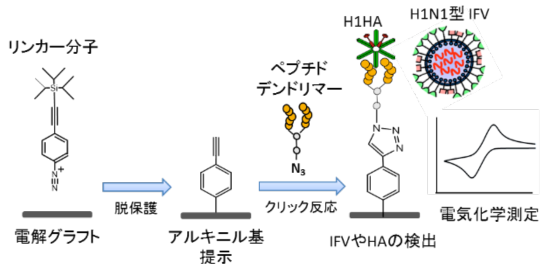

図２　ダイヤモンド電極の修飾と HA および IFV の検出

このペプチド修飾電極を用いて EIS 測定を行うと、HA および IFV の濃度に依存したインピーダンスの増加がみられた。非特異タンパク質である BSA での検出結果と比較すると、HA は濃度依存的なインピーダンスの増加を示していることが確認できた。また、H1 亜型の IFV を 20 pfu という高感度で検出することに成功した。

(7) 総括

ITC により、HA 結合性ペプチドと HA との相互作用における熱力学的パラメーターを算出することで、N 末端の 5 -7 残基程度が HA の糖鎖認識ポケットに入ることで親和性が達成されていることが示された。D1 配列を元にした分子進化工学的な手法を元にしたバイオパニングを行うことで、N 末端側が保存された配列が得られてきた。これによりバイオパニングで得られた１５残基のペプチド中の N 末端側の配列である ARLPR 配列を用いて感染阻害活性と IFV の検出について検討した。その結果、ARLPR 配列では、H1, H3, H5, H7 および H9 亜型で高い感染阻害活性が得られた。さらに、BDD 電極表面に固定化することで、高感度に IFV を検出することに成功した。

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 3 件）

① T. Matsubara, R. Shibata, <u>T. Sato</u>, Binding of Hemagglutinin and Influenza Virus to a Peptide-Conjugated Lipid Membrane, Front. Microbiol., **7**, 468 (2016) doi: 10.3389/fmicb.2016.00468 査読有

② T. Matsubara, A. Onishi, D.Yamaguchi, <u>T. Sato</u>, Heptapeptide Ligands against Receptor-Binding Sites of Influenza Hemagglutinin toward Anti-Influenza Therapy, Bioorg. Med. Chem., **24**, 1106-14 (2016) doi: 10.1016/j.bmc. 2016.01.039 査読有

③ 松原輝彦、大西愛、齋藤智美、山口大介、<u>佐藤智典</u>、糖鎖模倣ペプチドのインフルエンザヘマグルチニンに対する結合活性の多価効果、高分子論文集、**73**, 62-68 (2016) 査読有

〔学会発表〕（計 16 件）

① S. Yoshikawa, R. Kuriyama, H. Kori, T. Matsubara, <u>T. Sato</u>, Thermodynamic analysis for the interaction between sugar-mimic peptide and hemagglutinin, Pacifichem 2015, 2015.12.14-20「Honolulu (USA)」

② M. Ujie, M. Akahori, T. Matsubara, T. Yamamoto, Y. Einaga, <u>T. Sato</u>, Electrochemical detection of influenza virus using hemagglutinin-binding peptide-modified diamond electrode, Pacifichem 2015, 2015.12.14-20「Honolulu (USA)」

③ 吉川栞、栗山龍之介、郡遥香、松原輝彦、<u>佐藤智典</u>、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解析、第 25 回バイオ・高分子シンポジウム、2015 年 7 月 23 日～24 日、東京工業大学（東京都・目黒区）

④ 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 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 25-27 日(発表 26 日)、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

⑤ R. Shibata, T. Matsubara, T. Sato, Analysis of the interaction between peptide aptamers and hemagglutinin, SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting, 2014. Nov. 16-19「Honolulu (USA)」

〔産業財産権〕
○出願状況（計２件）

名称：インフルエンザウイルス感染阻害剤、リポソーム、インフルエンザ予防・治療剤
発明者：佐藤　智典・中屋 隆明
権利者：学校法人　慶應義塾・京都府公立学校法人　京都府立医科大学
種類：特許
番号：特願 2016−010162
出願年月日：2016 年 1 月 12 日
国内外の別：国内

名称：タンパク質又は病原体の新規検出方法
発明者：佐藤智典・松原輝彦・栄長泰明・山本　崇史
権利者：学校法人慶應義塾
種類：特許
番号：特願 2015-093132
出願年月日：2015 年 4 月 30 日
国内外の別：PCT 出願

６．研究組織

(1)研究代表者
佐藤　智典　（SATO, Toshinori）
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：00162454