

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17300159
 研究課題名（和文） 分子進化ファージライブラリー法を用いた感染阻害剤の開発
 研究課題名（英文） Development of infection inhibitors using molecular evolutionary phage library method
 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

研究成果の概要：

本研究ではペプチドを用いた新しい作用機序の抗ウイルス薬の開発を目指して、ヘマグルチニン（HA）と細胞表面の糖鎖の間の相互作用を阻害するペプチド配列の分子進化を行った。種々の配列を有するペプチドを化学合成し、H1N1 型と H3N2 型のインフルエンザウイルスの MDCK 細胞への感染をプラークアッセイ法で評価した。リポペプチドとして自己集合体を形成することで、5 残基から 15 残基のペプチドにおいて感染阻害活性の向上を達成した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	3,800,000	0	3,800,000
2006 年度	3,200,000	0	3,200,000
2007 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	13,400,000	1,920,000	15,320,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：インフルエンザウイルス、ヘマグルチニン、糖脂質、ファージライブラリー、ペプチド、感染阻害、バイオパニング、分子進化学

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは世界的に毎年流行している感染症の 1 つであり、インフルエンザウイルスを病原として引き起こされる感染症である。インフルエンザはウイルスの感染性と症状の重篤性から、普通感冒とは異なる予防と治療の 2 つの対応が必要である。基本的な予防はワクチン接種であるが、ワクチン接

種できないアレルギー患者や緊急対応時、さらに治療を目的とした抗ウイルス薬が望まれている。現在、ノイラミニダーゼ阻害剤として作用する抗ウイルス薬が認可されているが、耐性株の出現の可能性がある、ウイルスを細胞に侵入させないような作用機序による新しい抗ウイルス薬の開発が望まれている。

2. 研究の目的

スフィンゴ糖脂質は生体内で毒素やウイルスの受容体になっていることが知られている。例えば、インフルエンザウイルスの受容体である GM3、ペロ毒素の受容体である Gb3Cer、アルツハイマーの原因として考えられている β -アミロイドあるいはコレラ毒素に結合する GM1 等が知られている。これらの毒素やウイルスの感染阻害剤としてはオリゴ糖鎖やその誘導体が用いられている。しかし、我々が手に入れることのできるオリゴ糖鎖は限られており感染阻害剤の探索や開発には限界がある。これに対してペプチドでは、ファージ表面に提示されたペプチドライブラリーを用いることができるため、新規な阻害剤の開発には好都合である。本研究では、感染に参与しているオリゴ糖鎖に結合するペプチドあるいは糖鎖を鋳型とした糖鎖レプリカペプチドを、ファージライブラリー法を用いて探索する。特に、ペプチド配列の最適化を分子進化工学的手法を用いて行う。得られたペプチド配列をリポソームや高分子に組み込んでナノ粒子を作製し、分子レベルや細胞レベルでの活性を検討する。最終的に動物実験による評価を行うことで、インフルエンザウイルス等の感染に対するペプチド阻害剤を開発することを目指している。

3. 研究の方法

(1) ペプチド配列の同定

感染阻害は HA と細胞表面糖鎖との相互作用を阻害させることで実現するが、戦略としては (a) 細胞表面糖鎖にペプチドを結合させる、もしくは (b) HA の糖鎖結合部位にペプチドを結合させる、の 2 通りの方法がある。そこで糖鎖に結合するペプチド、および HA に結合するペプチドを設計する。設計する手法は、ファージ提示法によるランダムペプチドライブラリーからのアフィニティセクション (バイオパニング) で行なった。ペプチドの長さは 15 アミノ酸残基を標準として用いて、可能である場合により短小化することで必要最小限な配列を同定した。得られたペプチドの糖鎖 (糖脂質) もしくは HA への結合活性を確認した。

(2) 感染阻害活性の評価

同定されたペプチドを化学合成し、感染阻害活性を評価した。ペプチドの活性を向上させるためにペプチドの長さの検討も行なった。感染阻害活性評価は、H1N1 型と H3N2 型のウイルス、およびイヌ腎臓由来の Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いてプラークアッセイ法で行なった。

4. 研究成果

(1) 糖脂質結合性ペプチド

概略 スフィンゴ糖脂質は疎水性セラミ

ド脂質部分に糖鎖が結合した構造である。インフルエンザ HA はシアリルガラクトース (Neu5Ac-Gal) 構造を認識するが、いくつかの糖脂質はこの構造を持っている。Neu5Ac-Gal に結合するペプチドは感染阻害活性を有している可能性がある。

以前にファージライブラリーを用いてシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシド GM1 (Gal 1-3GalNAc 1-4(Neu5Ac 2-3)Gal 1-4Glc 1-1'Cer) および GM3 (Neu5Ac 2-3Gal 1-4Glc 1-1'Cer) に結合する 15 残基のペプチドを探索してきた。本研究では、これまでに得られたペプチド配列の糖脂質への結合性の検討と結合活性の向上を行った。

結合活性

まず GM1 を組み込んだ脂質単分子膜に対して GM1 結合性ペプチドの結合性について検討した。GM1/GlcCer の混合比率を変えた単分子膜を準備し、ペプチドの結合活性を評価したところ、糖脂質のクラスターに特異的に結合していることを見出した。またガングリオシド GM3 に結合するペプチド配列は、動物細胞に配列特異的に結合することを見出した。

分子進化サブライブラリーの作製

糖脂質結合配列の最適化を行うために、ランダムな変異を組み込んだ 2 種類の新しい分子進化サブライブラリーの構築を行った。ペプチドは GM3 に結合する c01 配列を用いて、ファージ提示法で行なった。

1 つ目のサブライブラリーは c01 配列をコードするコドンに混合塩基にすることでランダム変異を導入した。その結果、15 残基のうち平均 4.8 アミノ酸が置換された「ランダム変異ライブラリー」を作製した。

2 つ目のサブライブラリーは、結合モチーフを固定し、それ以外のアミノ酸をランダムに変異させた。c01 ペプチドを用いてアラニンスキャンニングを行い、糖鎖の認識に必要なモチーフ部分を決定した。モチーフ部分とそれ以外の部分に勾配をつけた変異を導入して「モチーフ固定ライブラリー」を作製した。

またガングリオシド GM1 は アミロイドの凝集および沈着が関わっている。GM3 結合性ペプチドと同様に、GM1 への結合性を有するペプチドの分子進化を目指し、サブライブラリーの作製を行った。

ファージベクターの改良

これまでにいくつかのファージライブラリーの作製を行なって来たが、高い多様性のあるライブラリーを作製することが難しかった。この問題を改善するためにファージベクターの制限酵素切断部位の検討を行った。その結果、これまで用いて来た切断部位を

BamHI に変換することにより、これまでのベクターよりも効率よく形質転換できるベクターを作製できた。

糖脂質結合性ペプチドの分子進化

GM3 結合性ペプチドの変異ライブラリーを用いて、GM3 単分子膜に対するアフィニティセクションを行った。得られたファージクローンの GM3 結合活性を酵素免疫測定法 (ELISA) により評価した。これらの新規アミノ酸配列の中で $\alpha 01$ と同等もしくはそれ以上の結合活性を有している配列が得られた。これらのペプチドは GM3 に対して結合活性を有していた。

(2) HA 結合性ペプチド

概略 以前にファージライブラリーを用いてインフルエンザ HA に結合する 7 残基および 15 残基のペプチドを同定した。本課題では、糖脂質結合性ペプチドと同様に、これまでに得られたペプチド配列よりも活性が高い配列を探索するためにペプチド分子進化を行なった。点変異導入による HA への結合性およびインフルエンザウイルス感染阻害活性の検討を行った。

7 残基の *in silico* 分子進化

7 残基のペプチド配列の HA に対する結合性を計算機シミュレーションにより観察した。化学合成したペプチドの結合性実験およびシミュレーションにより、相互作用に必須のアミノ酸の特定を行った。また *in silico* スクリーニングにより、ペプチドと HA の相互作用のシミュレーションが可能であることを示した。

分子進化サブライブラリーの作製

まず HA に結合する 15 アミノ酸残基の配列の HA 認識に重要なアミノ酸 (HA 結合モチーフ) をアラニンスキャニングにより同定した。この結果を元に 2 種類の異なった手法によりランダム変異を導入した分子進化サブライブラリーを作製した。上述の新しいファージベクターを用いてランダムに変異させたライブラリー (15 アミノ酸配列のうち平均 3.3 残基に変異) および結合に關与するモチーフ残基 (4 残基) を固定したライブラリーを作製した。

HA 結合性ペプチドの分子進化

サブライブラリーを用いて H1 型と H3 型の HA に対して交互にバイオパニング操作を行った。セクションにより得られた配列の結合活性を ELISA により HA との結合活性の評価を行った。

その結果、これまでの配列と同程度の結合活性を有するペプチドを数種類同定するこ

とに成功した。

(3) 動物細胞に対するウイルス感染阻害

概略 HA 結合性ペプチドおよび GM3 結合性ペプチドを化学合成し、感染阻害活性を評価した。H1N1 型と H3N2 型のウイルス、および MDCK 細胞を用いてブランクアッセイ法で行なった。15 残基の分子進化ペプチドおよび短小化フラグメントペプチドの評価を行った。

15 残基のペプチド

セクションにより得られた分子進化ペプチド配列にアルキル鎖を結合させたペプチドを化学合成した。MDCK 細胞に対する感染阻害活性を評価したところ、進化前の配列と同じ程度の阻害活性を有していることがわかった。

ペプチドはしばしば合成が困難であったり、溶解性が低いことがあり、高い活性を有する類似した配列が必要となる。今回得られた配列は新たな阻害剤候補として期待できる。

ペプチドの短小化

上述のペプチドは 15 残基であるが、薬劑として用いるにはより短い配列のほうが合成が容易である。15 残基のペプチドをフラグメント化し、種々の長さおよび位置のペプチドを合成して阻害活性を評価した。

その結果、8 残基および 5 残基と短くしていくに従って感染阻害活性が向上することがわかった。最終的に最も高い感染阻害活性を有する 5 残基の最小配列を同定することができた。この配列は元の 15 残基よりも 10 倍高い活性を有していた。

(4) 糖脂質結合性ペプチドの機能解析

GM3 結合性ペプチド

GM3 結合性の 15 残基のペプチド-アビジン複合体は B16 メラノーマ細胞に効率よく取り込まれることが示され、その取り込み機構を解析した。TAT に比較して効率の良く取り込まれていることが示された。さらに、緑色蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質を遺伝子組み換えにより作製し、細胞に取り込まれることを示した。これにより、タンパク質等のドラッグデリバリーにも利用可能であることが示された。

GM1 結合性ペプチド

GM1 結合性ペプチドは老齡マウスシナプトソーム膜およびラフト画分からなる再構成膜に特異的に結合することを見いだした。 β -アミロイドが形成されるシナプトソームを特異的に標識するには、従来用いられてきたコレラ毒素ではなく、GM1 結合性ペプチド

が有用であることが示された。

(5) 総括

本研究では、ファージライブラリー法により糖脂質結合性ペプチドおよびインフルエンザウイルスのヘマグルチニンに結合するペプチドの機能解析および、分子進化ファージライブラリー法によるその機能向上を行った。

ヘマグルチニン結合性ペプチドでは、インフルエンザの感染を阻害することを *in vitro* で確認した。分子進化ファージライブラリー法により得られたペプチドでは感染阻害活性を飛躍的に向上させることができた。さらに、得られた配列における結合モチーフを決定し、阻害活性に必要な最小4残基の配列を決定できた。これらのペプチドは *in vivo* でも感染阻害活性を有することが確認されたことから、抗インフルエンザ薬としての応用研究に展開している。

糖脂質に結合するペプチドとして、ガングリオシド GM3 および GM1 結合性ペプチドを中心に検討を行った。分子進化ファージライブラリー法を用いて、糖脂質への結合を向上した配列を得ることができた。GM3 結合性ペプチドでは、インフルエンザの感染阻害活性を有していることが見いだされた。さらには、シアリルガラクトース残基に結合することで、細胞内への輸送ペプチドとしての機能を有することも見いだされた。GM1 結合性ペプチドでは、GM1 の密度依存的な結合能を有していることが見いだされた。アルツハイマーの原因として考えられるβ-アミロイドの集合体が形成されるシナプトゾームを選択的に標識できることから分子プローブとして使用できることが示された。

以上、インフルエンザ結合性ペプチドおよび糖脂質結合性ペプチドを用いた感染阻害剤の開発を行うことに成功した。糖脂質結合性ペプチドでは、細胞に結合する能力を利用して、分子プローブや細胞標的デバイスとして活用できることも示された。これらの成果を利用して、学術的あるいは実用化のための研究開発を展開中である。

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4件)

1. T. Matsubara, M. Iida, T. Tsumuraya, I. Fujii, and T. Sato, Selection of carbohydrate-binding domain with a helix-loop-helix structure, *Biochemistry*, **47**, 6745-6751 (2008), 査読有

2. T. Matsubara, K. Iijima, M. Nakamura, T. Taki, Y. Okahata, and T. Sato, Specific binding of GM1-binding peptides to high-density GM1 in lipid membranes, *Langmuir*, **23**, 708-714 (2007), 査読有
3. N. Fujitani, H. Shimizu, T. Matsubara, T. Ohta, Y. Komata, N. Muira, T. Sato, and S.-I. Nishimura, Structural transition study of a fifteen amino acid residue peptide induced by GM1, *Carbohydr. Res.*, **342**, 1895-1903 (2007), 査読有
4. T. Matsubara, and T. Sato, Identification of oligosaccharide-recognition molecules by phage-display technology, *Trends Glycosci. Glycotech.*, **19**, 133-145 (2007), 査読有

[学会発表](計19件)

1. 松原輝彦・山下美季・野殿英恵・佐藤智典, 細胞表面のシアル酸含有糖鎖を標的とするペプチドの設計および機能解析, 第57回高分子討論会, 2008年9月24日, 大阪市立大学
2. 佐藤智典, インフルエンザの感染を阻害する糖鎖ミミックペプチドの開発, イノベーションジャパン2007, 2007年9月13日, 東京国際フォーラム
3. 松原輝彦, 飯島一智, 角真智子, 佐藤智典, ライブラリー選択で得られたオリゴ糖鎖認識ペプチドの構造と機能, 第55回高分子討論会, 2006年9月20日, 富山大学
4. Identification of peptides that inhibit influenza virus infection, T. Matsubara, T. Sato, ISBC2006, 2006年8月8日, Kobe
5. T. Matsubara, M. Sumi, T. Taki, and T. Sato, Inhibition of Influenza Virus Infection by Sialylgalactose binding Peptides Selected from a Phage displayed Random Library, The Pacificchem 2005 Congress, Dec. 19, 2005, Honolulu
6. T. Sato, Inhibition of the influenza virus infection by glycomimetic peptides selected from a phage library, *GlycoXVIII*, Sep 6, 2005, Italy (招待講演)

[図書](計2件)

1. 松原輝彦・佐藤智典, 糖鎖認識ペプチドの開発と応用(第4章 バイオ超分子, 第4節 糖鎖の超分子化学), 「超分子サイエンス&テクノロジー」, 国武 豊喜 監修, NTS (2009), pp. 1036-1042.

2. 松原輝彦・佐藤智典, フェージディスプレイ法, 「分子間相互作用解析ハンドブック」, 磯辺 俊明・中山 敬一・伊藤 隆司 監修, 羊土社 (2007), pp. 16-22.

〔産業財産権〕

出願状況 (計2件)

1. 名称: インフルエンザ感染阻害ペプチド、インフルエンザウイルス感染阻害剤、リボソーム、インフルエンザ予防・治療剤

発明者: 佐藤智典、松原輝彦

権利者: 慶應義塾大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2007/54452

出願年月日: 2007年3月7日

国内外の別: 国外

2. 名称: インフルエンザウイルス感染阻害方法

発明者: 佐藤智典、松原輝彦

権利者: 株式会社グライコメディクス (慶應義塾大学より譲渡)

種類: 特許

番号: 特願 2005-344531

出願年月日: 2005年11月29日

国内外の別: 国内

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

(2) 研究分担者

松原 輝彦 (MATSUBARA TERUHIKO)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号: 10325251

(3) 連携研究者

該当なし