

平成 年 月 日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2006-2009
 課題番号： 18390044
 研究課題名（和文） クラスタ効果を利用した抗インフルエンザ薬の開発
 研究課題名（英文） Development of a novel therapeutic agent against Influenza virus infections using multivalent peptide library techniques
 研究代表者 西川 喜代孝 (Nishikawa Kiyotaka)
 同志社大学・生命医科学部・教授
 研究者番号：40218128

研究成果の概要：

A型インフルエンザウイルスの表面タンパク質であるHAは3量体を形成することで非常に強く標的細胞に結合する（クラスタ効果）。本研究では、このクラスタ効果に基づく高親和性結合を阻害する阻害剤を開発するための新しい方法、多価型ペプチドライブラリー法を用いて、HA 3量体に特異的かつ高親和性に結合するペプチドモチーフを同定した。本モチーフを有する化合物は、ウイルス粒子の標的細胞への侵入を強力に阻害するペプチド性阻害剤として期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：薬学、感染症、糖鎖、衛生、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

A型インフルエンザウイルスの表面タンパク質であるHAは、標的細胞上に存在するシアル酸を受容体として認識、結合し、エンドソームを介したウイルスの細胞内への侵入に中心的な役割を果たしている。また、HA 1分子ではシアル酸に対する結合親和性は非常に低いが、3量体を形成することで一度に3分子のシアル酸を認識することが可能とな

り結合親和性は著しく亢進する（糖鎖クラスタ効果）。しかしながら、天然物、あるいはケミカルライブラリーからスクリーニングする方法、ファージディスプレイ法などの既存の方法では、原理的にクラスタ効果に立脚したスクリーニングになっていないために、優れたHA阻害物質を得ることは極めて困難であった。

我々はこれまでに、protein kinase の触媒

部位などの機能ドメインに対して直接基質モチーフあるいは結合モチーフを決定する方法、ペプチドライブラリー法を開発してきた (U.S. Patent Publication No. US-2003-0148377-A1). しかしながら、各種レクチンに代表される糖鎖認識分子はその糖鎖リガンドと多価型の結合をおこなうことによって結合親和性を高めているため、糖鎖認識分子に対してはペプチドライブラリー法は応用することができなかつた。

最近我々は、腸管出血性大腸菌 0157:H7 が産生するペロ毒素 (Shiga toxin, Stx) に注目し、ペプチドライブラリー自体を多価にするという全く新たな概念に基づいた多価型ペプチドライブラリー法を開発し、Stx とその糖鎖受容体との多価型高親和性結合を阻害するペプチド性化合物を同定することができた (特願 2004-295405, 国際出願 PCT/JP2005/012286 ; 特願 2004-189801). 本化合物は 0157:H7 感染実験において顕著な治療効果を示すことから、現在最も臨床応用に近い化合物として期待されている。

本研究では、この多価型ペプチドライブラリー法を用いて、HA 3 量体に特異的かつ高親和性に結合し、ウイルス粒子の標的細胞への侵入を強力に阻害するペプチド性阻害剤を開発することを目的とする。

2. 研究の目的

多価型ペプチドライブラリー法はそれ自体がクラスター効果を発揮するために、標的分子単体に存在している微弱な構造の変化や相異を極めて鋭敏に、かつ高親和性で認識するペプチドモチーフを同定することが可能であるという優れた特徴を有する。HA は免疫系からのがれるために、比較的保存されたシアル酸結合部位の外辺部に存在する領域に、3.5 アミノ酸置換/年の割合で変異を導入するが、本法はこの激しい変異により次々に作り出されるそれぞれの HA に対し、柔軟かつ容易に対応することができる。本研究では、この多価型ペプチドライブラリー法の特徴を生かし、従来の抗インフルエンザ薬の宿命であった耐性の問題を克服する、新たな抗インフルエンザ薬を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

多価型ペプチドライブラリーは図 1 に示す構造をしている。構造中 X (degenerate position) は Cys を除く 19 種のアミノ酸のミックスチャーであり、X を 4 個有する一つの分岐ライブラリーは、理論上 19 の 4 乗種類のペプチドのミックスチャーから構成されていることになる。本ペプチドライブラリー

を標的タンパクが固定化されたカラムにかけ、洗浄後、カラムに強く結合したペプチドを回収しアミノ酸シーケンスを行う。その結果、各 degenerate position について、どのアミノ酸がどの程度選択されたかのランキングがつくことになる。すべての degenerate position について最も強く選択されたアミノ酸を順番に並べれば、その配列は標的タンパクに対する最適の結合モチーフとなっているはずである。以上がペプチドライブラリー法の原理である。なお、アミノ末端の Met-Ala, ならびにカルボキシル側の Ala は、回収したペプチドのアミノ酸シーケンスがサイクルごとに確実に行われたかを確認するために導入してある。

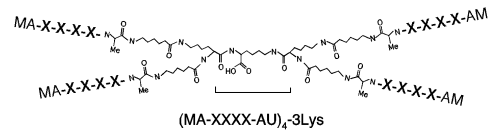


図 1 多価型ペプチドライブラリーの構造

4. 研究成果

1) 野生型 HA ならびにシアル酸結合部位に変異を有する HA の大量調製

ヒトインフルエンザウイルス H1N1 由来 HA のシアル酸結合サイトに特異的に結合するペプチドモチーフを決定するために、ライブラリーのスクリーニングは、野生型 HA カラムならびにシアル酸結合部位に変異を有する HA(L194A) カラムの 2 種を用いて行う。バキュロウイルス発現系を用いて、C 末端に His-tag を有する野生型 HA ならびに L194A を発現している Sf21 細胞を調製し、L194A では赤血球凝集活性が完全に消失していることを確認した (図 2-1)。これら Sf21 細胞から大量の HA を調製し、本来膜タンパク質である HA を活性を保持したままの状態でビーズ上に固定したアフィニティーカラムを作成することができた (図 2-2)。

QuickTmpey C2
 4L1E2EVEE0E4E4
 C19C4CAE5ENE EEC24AEQEC2C2C2C2...C0IK6VÇ-QIAB

図 2-1

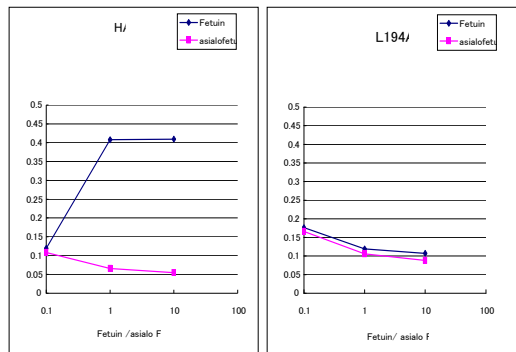


図 2-2 ELISA を用いたアフィニティ精製後の HA とシアル酸との特異的結合. 野生型 HA はシアル酸を有するフェツインに特異的に結合し, シアル酸を除去したフェツイン (アシアロフェツイン) には全く結合しないことが示された. 一方, L194A はいずれに対しても結合活性を示さない.

2) HA に対して最適化した多価型ペプチドライブラリーの作成

多価型ペプチドライブラリー法では標的とするタンパク質に合わせて, その核構造を最適化することが必要であり, この操作によってライブラリー自体の親和性を大きく向上させることができる. 本研究では, HA 3 量体の結晶構造に基づいて, 末端のライブラリー部と核構造を結ぶスペーサー長が異なる一連のマルチバレントペプチドライブラリーを作成し, 野生型 HA に対する結合活性を比較し, 最終的に HA に対して最適化したマルチバレントペプチドライブラリーの構造を決定した.

HA に最適化したマルチバレントペプチドライブラリー (1 次ライブラリー) を用い, 野生型 HA カラムならびにシアル酸結合サイトに変異を有する HA (L194A) カラムの 2 種を用いてスクリーニングを行った. 本検討により結合に中心的な役割を果たすと考えられるアミノ酸として, Arg, Lys, Val を同定することができた. これらのアミノ酸を locking position として導入した 2 次ライブラリー, すなわち XXX-Arg-XXX, XXX-Lys-XXX, XXX-Val-XXX を 4 個持ち, HA に対してより結合親和性に優れた 2 次ライブラリーを合成した.

3) HA シアル酸結合部位特異的結合モチーフの同定

本 2 次ライブラリーのスクリーニングは, 同様に野生型 HA カラムならびに HA (L194A) カラムの 2 種を用いて行った. 野生型 HA カラ

ムを用いて得られた結合モチーフから, ミュータント HA カラムを用いて得られた結合モチーフを差し引くことにより, HA のシアル酸結合サイトに特異的に結合する候補ペプチドモチーフを数種決定することができた.

今後は, これまでに決定した HA1 結合モチーフについて, すでに決定した HA1 に最適化した核構造に組み込み, 4 価のペプチド性 HA 阻害剤を化学合成する. 本阻害剤の HA 活性阻害能, 結合様式に関する構造化学的検討, さらに実際の HA1 を持つインフルエンザウイルスを用いた, ウイルス増殖抑制活性, 感染実験における感染阻止効果を検討してゆく. 最終的に臨床応用に耐えうる新たなインフルエンザ治療薬の開発を目指す.

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 13 件)

- 1) Kano F., Yamauchi S., Yoshida Y., Watanabe-Takahashi M., Nishikawa K., Nakamura N., and Murata M., Yip1A regulates the COPI-independent retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum, *J. Cell Sci.*, 2009, in press. 査読有り。
- 2) 西川喜代孝, 腸管出血性大腸菌(EHEC) による感染への新たな対策の研究, 化学療法の領域 (医薬ジャーナル社), 2008, 24(5), 93-101. 査読なし
- 3) 西川喜代孝, 志賀毒素の細胞内輸送異常を誘導するペプチド, 蛋白質核酸酵素 (共立出版), 2008, 53(1), 44-51. 査読なし
- 4) Yamaguchi N., Koizumi H., Aoki J., Natori Y., Nishikawa K., Natori Y., Takanezawa Y., and Arai H., Type I platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits over-expression induces pleiomorphic nuclei and centrosome amplification, *Genes Cells*, 2007, 12 1153-1161. 査読有り。
- 5) 西川喜代孝, O157 感染症に対する次世代治療薬の開発, 小児感染免疫 (日本小児感染症学会), 2007, 19(1), 75-83. 査読なし
- 6) Nishikawa K.*, Watanabe M., Kita E., Igai K., Omata K., Yaffe M. B., and Natori Y., A multivalent peptide-library approach identifies a novel Shiga toxin-inhibitor that induces aberrant cellular transport of

- the toxin, **FASEB J.**, 2006, 20, 2597-2599. 査読有り。
- 7) Shibata N., Jishage K., Arita M., Watanabe M., Kawase Y., Nishikawa K., Natori Y., Inoue H., Shimano H., Yamada N., Tsujimoto M., and Arai H., Regulation of hepatic cholesterol synthesis by a novel protein (SPF) that accelerates cholesterol biosynthesis, **FASEB J.**, 2006, 20, 2642-2644. 査読有り。
 - 8) Shin I., Nishikawa K., Maruya H., and Ishii S., Histidine-tagged Shiga toxin B subunit binding assay: Simple and specific determination of Gb3 content in mammalian cells, **Chem. Pharm. Bull.**, 2006, 54, 522-527. 査読有り。
 - 9) Yamada A., Hatano K., Matsuoka K., Koyama T., Esumi Y., Koshino H., Hino K., Nishikawa K., Natori Y., and Terunuma D., Syntheses and Vero toxin-binding activities of carbosilane dendrimers periphery-functionalized with galabiose, **Tetrahedron**, 2006, 62, 5074-5083. 査読有り。
 - 10) Miyagawa A., Watanabe M., Igai K., Kasuya M. C. Z., Natori Y., Nishikawa K., and Hatanaka K., Development of dialyzer with immobilized glycoconjugate polymers for removal of Shiga-toxin, **Biomaterials**, 2006, 27, 3304-3311. 査読有り。
 - 11) Watanabe M., Igai K., Matsuoka K., Miyagawa A., Watanabe T., Yanoshita R., Samejima Y., Terunuma D., Natori Y., and Nishikawa K.*, Structural analysis of the interaction between Shiga toxin B-subunits and linear polymers bearing clustered globotriose residues, **Infect. Immun.**, 2006, 74, 1984-1988. 査読有り
 - 12) 西川喜代孝, 腸管出血性大腸菌感染症、Pharma Medica (メディカルレビュー社)、2006, 24(8), 33-37. 査読なし
 - 13) 西川喜代孝, ペロ毒素を標的とした O157 感染症治療薬、ファルマシア (日本薬学会)、2006, 42(4)、319-323. 査読なし

[学会発表] (計 10 件)

Invited

- 1) Neutralizing Shiga toxin., Nishikawa, K. 6th International Symposium on “Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections”, 2006, Melbourne, Australia.
- 2) A novel Shiga toxin neutralizer for treatment

of STEC infections., Nishikawa, K. International Symposium on Cholera and Other Diarrhoeal Diseases, 2006, Kolkata, India.

Oral/Poster presentation

- 1) Structural analysis of the interaction between Shiga toxin B-subunits and linear polymers bearing clustered globotriose residues.,_ Watanabe M., Igai K., Matsuoka K., Miyagawa A., Watanabe T., Yanoshita R., Samejima Y., Terunuma D., Natori Y., and Nishikawa K. 6th International Symposium on “Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* Infections”, 2006, Melbourne, Australia, Poster presentation.
- 2) A multivalent peptide-library approach identifies an inhibitor for a sugar-recognizing molecule, Shiga toxin. Nishikawa K., Kita E., Omata K., Igai K., Watanabe M., Yaffe M. B., Natori Y. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, Kyoto, Japan, Poster presentation.

国内学会招待講演・シンポジウム等

- 1) テーマ「革新的な抗体・核酸・ペプチド医薬への展望」演題名—クラスター効果に基づく強い相互作用を阻害する技術—多価型ペプチドライブラリー法、高橋美帆、西川喜代孝、第 8 2 回日本細菌学会総会、名古屋国際会議場、2009/3/13
- 2) 特別講演「O157 感染症の新規治療薬の創製」西川喜代孝、第 82 回日本感染症学会総会、島根県民会館、2008/4/17
- 3) ランチョンセミナー「細菌毒素に結合する中和ペプチドのデザインとその効果」西川喜代孝、第 81 回日本細菌学会総会、国立京都国際会館、2008/3/25
- 4) テーマ「安全で健康な生活を目指して—食の安全・機能性と創薬研究における産学連携・関西からの発信」演題名「腸管出血性大腸菌感染症に対する次世代治療薬の開発」西川喜代孝、大阪府立大学産学官連携機構生物資源開発センターセミナー、大阪府立大学、2007/10/12
- 5) 出展タイトル—腸管出血性大腸菌感染症に対する次世代治療薬を開発する。西川喜代孝、さきがけライブ 2006、(独) 科学技術振興機構主催、東京国際フォーラム、2006/12/15-16
- 6) テーマ「腸管出血性大腸菌感染症の治療」演題名—「重症合併症予防の最先端—新

しい志賀毒素阻害薬を中心に」西川喜
代孝、第10回腸管出血性大腸菌感染症
シンポジウム、東京慈恵医科大、2006/9/1

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

Australian Patent No.2005257527

Publication Date: 29 Jan. 2009

Name of Patent: Japan Science and
Technology Agency

Name of Actual Inventor(s):
Nishikawa, Kiyotaka.

Title of Invention: Method of screening
toxin-neutralizing peptide, STX2
inhibitory peptide and vero
toxin-neutralizing agent

Term of Letters Patent: Twenty years
from 28 June 2005

〔その他〕

JST、研究成果展開総合データベースJ-

STORE(<http://jstore.jst.go.jp/>) 掲載分特許

出願番号2006-528873、毒素中和性ペプチ
ドのスクリーニング方法とSTX2阻害性
ペプチド並びにベロ毒素中和剤

[http://jstore.jst.go.jp/cgi-bin/patent/advance
d/detail.cgi?pat_id=19242](http://jstore.jst.go.jp/cgi-bin/patent/advance
d/detail.cgi?pat_id=19242)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 喜代孝 (Nishikawa Kiyotaka)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：40218128