

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

目 次

課題番号

20030895A KH21009	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
896A KH21010	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
897A KH21011	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
898A KH21012	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
899A KH21013	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
900A KH21014	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
901A KH21015	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
902A KH21016	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
903A KH21017	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
904A KH21018	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
905A KH21019	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
906A KH21020	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
907A KH21021	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
908A KH21022	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
909A KH21024	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
910A KH21025	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
911A KH21026	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
912A KH21027	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
913A KH22071	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
914A KH22072	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
915A KH22073	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
916A KH22082	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発

所属 静岡県立大学 薬学部 生化学教室
研究者 鈴木 康夫

研究要旨 1)インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着および宿主細胞からの出芽の両方をブロックする新規分子(シアリルホスファチジルエタノールアミン)の動物実験評価を開始した。2)新規インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ機能阻害物質としてグルコサミン-6-硫酸を創製し、天然からスルファチドを発見した。3)インフルエンザウイルスに結合すると蛍光が減少する糖鎖分子センサーを創製した。4)インフルエンザウイルスのヘマグルチニン3量体の受容体結合ポケットへ入り込み、ウイルス活性を阻害する画期的糖鎖化合物の創製に成功した。

分担研究者

- (1)三菱生命科学研究所 蟹江 治
(2)名古屋大学大学院工学研究科 小林一清

A. 研究目的

インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着・侵入に関わるヘマグルチニンおよび宿主からの発芽・遊離に関わるノイラミニダーゼ(シアリダーゼ)の両者をブロックし、しかも、ウイルスの変異を克服した画期的な新規・次世代抗インフルエンザ薬開発の基盤を創ることである。

B. 研究方法

インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着および宿主細胞からの出芽の両方をブロックする新規分子インフルエンザウイルス:シアリダーゼに対して加水分解されず、あるいは酵素阻害剤となり、かつ、ヘマグルチニンに結合する化合物をデザインすれば、両ウイルス膜糖タンパクの機能を阻害することでウイルス感染を阻害する全く新しい抗インフルエンザ薬とすることができる可能性がある。具体的には、先行試験の結果に基づきシアリ酸3位のアキシシャル位に電子吸引性置換基としてフッ素原子とアジド基を導入した化合物を合成することとした。また、アグリコンとしては、分子としては低分子でありながら凝集により効果を発揮できるよう、グリセロ脂質としてジステアロイルポスファチジルエタノールアミンを選択した。

インフルエンザウイルス:MDCK細胞または発育鶏卵で培養し精製した。インフルエンザウイルスの感染阻害:阻害物質存在下、MDCK細胞にウイルスを感染させ、遊離したウイルスをブランク・アッセイ法により測定した。インフルエンザウイルスシアリダーゼ活性:シアリラクトースを基質にして遊離したシアリ酸を測定した。ウイルスヘマグルチニン活性:モルモット赤血球の凝集を指標に測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト介入試験、ヒト組織などを使用する実験は行わなかった。動物の使用においても倫理面への配慮を充分行った。

C. 研究結果

1) インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着および宿主細胞からの出芽の両方をブロックする新規分子(シアリルホスファチジルエタノールアミン)の動物実験評価への移行:蟹江治分担研究者と協力して、動物実験を可能とする大量合成を試みた。

現在、最終産物の前段階まで到達した。また、本物質のマウスの経鼻投与による感染阻害実験を開始した。試料をレシチン・コレステロールとともにリポソームとしている。

2) 新規インフルエンザウイルスノイラミニダーゼスパイク機能阻害物質、グルコサミン硫酸の創製:今年度、全く新しい抗ノイラミニダーゼ剤として、硫酸化グルコサミンの創製に成功した。本物質は、N-アセチルグルコサミンの6位に硫酸基を導入したものである。これは、シアリ酸と立体化学的に類似の構造であり、シアリ酸の類似物質として酵素を阻害していると考えられる。本物質は、比較的安価(天然では、カニの甲羅に含まれるキチンから生産可能)に得られるグルコサミンを原料としているため今後、新しい抗インフルエンザ薬として開発できる高い有利性をもつ。

3) インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ機能を阻害する天然の硫酸化糖脂質(スルファチド)の発見:哺乳動物の脳や腎臓に多く含まれ、比較的分子量であるスルファチドがインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ機能(シアリダーゼ活性)を強力に阻害することを見出した。これは、化学合成も可能であり、新規抗インフルエンザ薬としての応用が期待できる。スルファチドは酸性においてのみインフルエンザウイルスのシアリダーゼ活性を阻害することを見出した。

4) インフルエンザウイルスに結合すると蛍光が減少する糖鎖分子の創製:鶏卵黄に見出したインフルエンザウイルス結合性シアリ酸含有複合型糖鎖ペプチドの糖鎖部分を EndoM エンドグリコシダーゼにより、グルコース含有ルテニウム錯体へ結合させることに成功した。この物質は、シアリ酸含有糖鎖を介してインフルエンザウイルスのヘマグルチニンへ結合し、ウイルス感染を阻害すること、ウイルスに結合するとコンフォメーションが劇的に

変わり、蛍光が減少することを見出した。これは、インフルエンザウイルスセンサーとして開発が可能であると期待される。

5) インフルエンザウイルスのヘマグルチニン3量体の受容体結合ポケットへ入り込み、ウイルス活性を阻害する画期的糖鎖化合物の創製:インフルエンザウイルスヘマグルチニン3量体の3つのポケットへはまり込む新しいシアロ糖鎖含有環状ペプチドの創製に成功した。これは、7つのアミノ酸を1グループとして3グループを環状に合成し、この上に3つのシアリルラクトースをヘマグルチニンの3次構造を基に配したもので、インフルエンザウイルスヘマグルチニン3量体の3つのポケットに結合することが出来る。本物質はインフルエンザウイルスの赤血球凝集反応を効果的に阻害し、新しい、Tailored influenza virus hemagglutinin inhibitorとして開発が期待できるものである。

D. 考察

上記シアリルホスファチジルエタノールアミンの合成は、今年度、これまで問題であった低収率の反応行程を別ルートを開拓することにより克服することが出来た。そして、合成した化合物を用いモデル動物による実験を開始することが出来た。今後、さらに詳細な動物実験、また、毒性試験などを行うためには更なる物質の供給が必要である。また、今回、糖鎖モジュール化法から誘導された情報をもとに、6-sulfo-GlcNAc分子とシアリ酸の構造類似性を実証した。さらにその分子骨格はインフルエンザシアリダーゼに高い阻害活性を示し、医薬品のリード化合物となることを見出すことが出来たことは大きな成果となった。

E. 結論

1) インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着および宿主細胞からの出芽の両方をブロックする新規分子(シアリルホスファチジルエタノールアミン)の動物実験評価を開始した。2) 新規インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ機能阻害物質としてグルコサミン-6-硫酸を創製し、天然からスルファチドを発見した。3) インフルエンザウイルスに結合すると蛍光が減少する糖鎖分子センサーを創製した。4) インフルエンザウイルスのヘマグルチニン3量体の受容体結合ポケットへ入り込み、ウイルス活性を阻害する画期的糖鎖化合物の創製に成功した。

以上、いくつかの新しい抗インフルエンザ剤を発見し、阻害機構も明らかに出来た。これまで問題であった低収率の反応行程を別ルートを開拓することにより克服し、本年度合成した化合物を用いモデル動物による実験を開始するに至った。N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)はエビやカニの甲羅の構成要素であるキチン質に多く含まれるバイオマスである。硫酸化GlcNAcがインフルエンザシアリダーゼ阻害活性を示した結果は、工業的にも極めて重要な発見であり、薬剤開発における新たなリード化合物として期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kenji Sasaki, Yoshihiro Nishida, Mikie Kambara, Hirota Uzawa, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kazukiyo Kobayashi: Design of N-acetyl-6-sulfo- β -D-glucosaminide-based inhibitors of influenza virus sialidase. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1367-1375 (2004).
2. Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Takehiko Saito, Chao-Tan Guo, Kazuya I.-P. Jwa, Hidari, Daisei Miyamoto, Yasuo Suzuki: Evolutional analysis of influenza A virus N2 neuraminidase genes based on the transition of the low-pH stability of sialidase activity. *FEBS LETT.* 557, 228-232 (2004)
3. Ogawa, D., Shikata, K., Honke, K., Sato, S., Matsuda, M., Nagase, R., Tone, A., Okada, S., Usui, H., Wada, J., Miyasaka, M., Kawashima, H., Suzuki, Y., Suzuki, T., Tanuguchi, N., Hiraharam Y., Tadano-Aritomi K., Ishizuka, I., Tedder, TF, Makino H. Cerebroside sulfotransferase deficiency ameliorates L-selectin-dependent monocyte infiltration in the kidney after ureteral obstruction. *J. Biol. Chem.*, 279, 2085-2090 (2003).
4. Ohta, T., Miura, N., Fujitani, N., Nakajima, F., Niikura, K., Chao-Tan Guo, Suzuki, T., Suzuki, Y., Monde, K., Nishimura, S.-I. Glycotentacles: Synthesis of cyclic glycopeptides toward a tailored blocker of influenza virus hemagglutinin. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42 (42) 586-5189 (2003).
5. Suzuki, T., Takahashi, T., Nishinaka, D., Murakami, M., Fujii, S., Hidari, I.-P.-Jwa K., Miyamoto, D., Li, Y.-T., Suzuki, Y., Inhibition of influenza A virus sialidase activity by sulfatide. *FEBS LETT.* 553, 355-359 (2003)
6. Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Kazuya I.-P. Jwa, Hidari, Daisei Miyamoto, Yasuo Suzuki, A molecular mechanism for the low-pH atability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidase. *FEBS LETT.*, 543, 71-75 (2003)
7. Shinji Kojima, Teruaki Hasegawa, Takahiro Yonemura, Ken Sasaki, Kenji Yamamoto, Yutaka Makimura, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kazukiyo Kobayashi, Ruthenium complexes carrying a disialo complex-type oligosaccharide: enzymatic synthesis and its application to a luminescent probe to defect influenza viruses. *Chem. Comm.* 11, 1250-1251 (2003) (The Royal Society of Chemistry, Advance Article).
8. Yuko Matsushima-Hibiya, Masahiko Watanabe, Kazuya Hidari, Daisei Miyamoto, Yasuo Suzuki, Takeshi Kasama, Takashi Kanazawa, Kotaro Koyama, Takashi Sugimura, Keiji Wakabayashi, Identification of glycosphingolipid receptors for pierisin-1, a guanine-specific ADP-ribosylating toxin from the cabbage butterfly. *J. Biol. Chem.* 278, 9972-9978 (2003)

9. Kazuhide Totani, Takeshi Kubota, Takao Huroda, Takeomi Murata, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kazukiyo Kobayashi, Hisashi Ashida, Kenji Yamamoto, and Taichi Usui: Chemoenzymatic synthesis and application of glycopolymers containing multivalent sialyloligosaccharides with a poly(L-glutamic acid) backbone for inhibition of infection by influenza viruses. *Glycobiology*. 13, 315-326 (2003)

川輝明, 米村享宏, 鈴木隆
出願人 科学技術振興事業団

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

2. 学会発表

1. Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki, Daisei Miyamoto, Kazuya I.-P.J. Hidari, Tadanobu Takahashi, Toshihiro Ito, Kennedy F Shortridge, Hiroshi Kida, Yoshihiro Kawaoka: Sialyl linkage and molecular species of sialic acid as the determinant of host range of influenza virus. *Glyco XVII, XVII International Symposium on Glycoconjugates* (Bangalore, India) Abstract Book, pp.98, Jan. 12-16 (Jan. 14), 2003.
2. 鈴木康夫: ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用 第1回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム(東京) 要旨集 pp. 27、2003年11月4日
3. Yasuo Suzuki: The role of antivirals in the prevention and control of epidemic and pandemic influenza. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, pre-congress symposia, Souvenir Program, pp.12, 2003.
4. Yasuo Suzuki, I.-P.J. Hidari, D. Miyamoto, T. Suzuki, C.-T. Guo, T. Ito, H. Kida, Y. Kawaoka: Host range of influenza viruses and the development of new anti influenza agents. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, pre-congress symposia J. Clinical Virology (Abstract Book 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, pp7-10 December 2003, Kuala Lumpur, Malaysia) 28, Suppl.1, pp.s104-s105, 2003
5. 佐々木健二、神原実季恵、西田芳弘、鵜沢浩隆、高橋忠伸、鈴木隆、鈴木康夫、小林一清
位置選択的硫酸化糖の合成とシアリダーゼ阻害活性の評価, 第24回日本糖質学会年会要旨集 p. 109(2003). 他 多数

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 硫酸化グルコサミンをリード化合物とする抗インフルエンザ薬
出願番号 2003-186514
出願日 平成15年6月30日
発明者 小林一清、鈴木康夫、佐々木健二、西田芳弘、鈴木隆、鵜沢浩隆
出願人 科学技術振興事業団
2. ウイルス捕捉材およびウイルスセンサー
出願番号 2003-62077
出願日 平成15年3月7日
発明者 小林一清、鈴木康夫、小島慎司、長谷

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社