

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
大学院生研究
2013年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院	理学研究科	化学専攻
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年	氏名	
	理学研究科・化学専攻・1年	石坪 江梨花 印	
指導教員	所属・職名	氏名	
	理学部化学科・教授	常盤 広明 印	
自然・人文・社会の別	○自然・人文・社会	個人・共同の別	○個人・共同名
研究課題名	食品起源による新規抗ウイルス感染症治療薬の合理的設計開発に関する理化学的研究		
研究組織	在籍研究科・専攻・学年	氏名	
	理学研究科・化学専攻・1年	石坪 江梨花	
研究期間	2013 年度		
研究経費	(支出金額) 499 千円	／ (採択金額)	500 千円

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

インフルエンザウイルスは多様な変異を起こしやすく、既存の抗インフルエンザ薬に対する耐性を持つ株種が次々と報告され、今なお新薬の開発が急務となっている。現在、上市している抗インフルエンザ薬ほとんどは、糖構造を基本骨格とするが、それに対して、最近、食品由来のフラン誘導体がインフルエンザウイルスに対して、特徴的な阻害活性を持つことを明らかにされた。しかし、その作用機序や作用点については不明のままであった。そこで本研究では、危険なウイルス実験などを一切せずに、コンピュータによる仮想実験（理論計算）を行い、食品由来の新規薬物候補化合物の作用機構を解明し、新薬開発の基盤形成を目指した。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[インフルエンザウイルス] [理論創薬] [高精度理論計算]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)**【背景】**

我々はこれまでに、生梅には含まれず日本古来の製法で精製された「梅エキス」に含まれる食品由来の化合物が、インフルエンザウイルスの増殖をコントロールしているタンパク質(Neuraminidase: NA)に対して阻害作用を発現する機構を明らかにしてきた。しかし、この梅エキス抽出物の「立体化学」は未決定であった。そこで本研究では、まず梅エキス抽出物の立体化学を、フラグメント分子軌道(FMO)法を用いた高精度理論計算により明らかにし、薬物候補化合物のそれぞれの光学異性体が、どのようにインフルエンザウイルス表面タンパク質の作用を阻害するのかを理論的に特定した。一方、標的タンパク質 NA の酵素活性部位の構造を柔軟に変化させることが示唆されている。そこで本研究では、分子動力学 (MD) シミュレーションを用い、標的タンパク質の動的な構造変化を取り入れた薬物相互作用解析を実行した。現在、市販されている抗インフルエンザ薬の作用機序は、ウイルスの「増殖」を阻害するものである。しかし、梅エキス抽出物は、ウイルスの増殖阻害だけではなく、ウイルスの「感染」を支配しているタンパク質(Hemagglutinin: HA)に対しても阻害作用を持つ。このHAはインフルエンザウイルス最大の脅威である「高毒性」発現にも密接に関わっているため、本研究では、ウイルスの感染タンパク質 HA の阻害作用機構の特定も行った。

【研究成果】**1. 食品中の有効成分の立体化学の特定および光学異性体間の阻害活性の違いの解明**

本研究の対象である薬物候補化合物は、元来、生梅には含まれず日本古来の製法で精製された「梅エキス」に含まれる化学成分である。しかしながら、その立体化学は不明であった。そこで、梅エキス抽出物の2つの光学異性体(R体とS体)をそれぞれ、コンピュータ上で作成し、インフルエンザウイルスの増殖をコントロールするタンパク質NAへの結合姿勢の特定を行い、複合体構造を理論的に作成した。この複合体構造に対して、FMO法を用いた高精度理論計算による相互作用エネルギー解析を行ったところ、梅エキス抽出物のうち、S体のほうがR体よりも高活性であることが分かった。そこで、理論的構造に基づく相互作用を詳細に解析したところ、実験的にNAのパンデミック化に重要だと考えられている150-loop部分を形成するアミノ酸残基とS体だけが安定な水素結合を形成できることが示唆された。さらに、MD Simulationを用いて、結合部位を含む複合体の動的構造変化を考慮した相互作用解析も行った結果、S体が結合したNA複合体は150-loop部の構造変化を抑えられ安定に存在するのに対して、R体とNAとの複合体では、構造変化が大きいことが分かった。これらの成果については、6月にポストンで開催された国際会議 Discovery & Therapy World Congress 2013(国際学会1-1)ならびに8月の糖質学会(国内学会2-1,2)で発表した。

研究成果の概要 つづき

さらに、MD Simulation によって得られた動的構造変化の結果についてタンパク質を構成する各アミノ酸残基の平均化構造からの変動を表す値である根平均二乗ゆらぎ(RMSF 値)を用いて解析を行った。その結果からも、S 体のほうが R 体よりも NA に対して有効に作用することが示唆された。これらの結果については、9 月に兵庫で開催された国際会議 The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity(国際学会 1-2)で発表した。さらに同様な高精度計算手法に基づく相互作用解析を、糖鎖構造の相違によるサルモネラ菌への阻害発現の違いの原因解明、および黄色ブドウ球菌に対する阻害活性を持つ苔由来の新規化合物の解析に応用し、それらの結果を、*FEBS Open Bio* および *Bio. Med. Chem* に専門論文(1,2)として発表した。

2. 食品中の有効成分のインフルエンザウイルスに対するマルチターゲットリードとしての有効性の解明

梅エキス抽出物は、インフルエンザウイルスの感染をコントロールするタンパク質である HA に対しても有効であると報告されている。NA では疎水ポケットに対する相互作用解析を行ったが、HA ではタンパク質表面の糖鎖認識部位に対する相互作用解析となるため、その柔軟な分子認識機構を適切に評価することは困難であり、これまでに臨床応用に至った薬剤は存在しない。そこで、本研究では、HA とシアル酸との相互作用の一つに着目し、梅エキス抽出物と HA との複合体構造を構築した。この構造に対し、FMO 法を用いて相互作用エネルギー解析を行った。その結果、HA においても S 体の方が R 体よりも有効に作用することが判明した。ここまでの成果については、10 月にタイで開催された 5th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology:5th ACGG(国際学会 1-3) および薬学会関東支部大会(国内学会 2-3,4,5,6,7)にて発表した。特に 5thACGG では、参加各国 2,3 名のみの Yong Scientist Awardee を受賞し、講演(国際学会 1-4)することができた。さらに、梅エキス抽出物が異なる複数の部位すなわちマルチターゲットに作用する新規リードとしての有効性について解析を行うため、NA の変異体に対する相互作用エネルギー解析を行い、変異導入によって相互作用様式に相違があることを見出した。この成果については査読審査を通過し 11 月のウイルス学会(国内学会 2-8)、および 1 月の 3rd Negative Strand Virus-Japan(国内学会 2-9,10)にて発表した。以上のような理論的構造に基づく相互作用解析結果を、実験的に立証するため、梅エキス抽出物の化学合成を行い、光学分割を試みた。これらの結果については 11 月のメディシナルケミストリーシンポジウム(国内学会 2-11,12)および 2014 年 3 月の薬学会年会(国内学会 2-13,14,15)にて発表を行った。さらに、中国との国際共同研究により、ラセミ混合物の Soaking により HA および NA との複合体構造の X 線共結晶構造解析を試みていただいたが、良好な共結晶は得られず実験的構造解析には至っていない。現在、食品抽出のラセミ混合物からの光学分割を試みており、実験的な構造決定ができ次第、IF の高い Top ジャーナルに投稿し(1-3,4)、最終的には理論先行型の創薬を推し進めて、実際のアカデミア創薬を目指したい。

※この(様式 2)に記入の成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調書(A 4 縦型横書き 1 枚・自由様式)を添付すること。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ① 雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ② 図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③ シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④ その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① 専門論文

1. A. Minami, S. Ishibashi, K. Ikeda, **E. Ishitsubo**, T. Hori, H. Tokiwa, R. Taguchi, D. Ieno, T. Otsubo, Yukino Matsuda, Saki Sai, Mari Inada, Takashi Suzuki, "Catalytic preference of Salmonella typhimurium LT2 sialidase for N-acetylneuraminic acid residue over N-glycolylneuraminic acid residue", *FEBS Open Bio* **3**: 231-236 (2013).
2. K. Onoda, H. Sawada, D. Morita, **E. Ishitsubo**, T. Kuroda, K. Matsuno, H. Tokiwa, H. Miyachi, "Further Structure-Anti-MRSA Activity Relationship of a series of Bis(bibenzyl) derivatives", *Bio. Med. Chem.*, **23**:6563-6568 (2013).
3. **E. Ishitsubo**, K. N. Kirschner, N. Sriwilaijaroen, Y. Suzuki, H. Tokiwa, "Rational drug design and development of novel inhibitors for multitarget points of influenza virus based on the first-principles calculations and molecular dynamics simulations", to be submitted to *PLoS Pathogen* (2014).
4. N. Sriwilaijaroen, S. Magesh, **E. Ishitsubo**, M. Sakai, T. Hori, M. Ando, S. Ishida, M. Kiso, H. Tokiwa, and Y. Suzuki, "Novel potent and specific influenza viral neuraminidase inhibitors: synthesis, structural analysis and biological evaluation", *Nature Chemical Biology*, to be submitted, (2014).

④ 学会発表

1. 国際学会

- 1-1. "Theoretical interaction analysis between Mumefural and influenza virus NA by first principle calculations and MD Simulation.", Drug Discovery & Therapy World Congress (Boston, USA), June, 2013.
- 1-2. "Novel *in silico* analysis based on the first-principle calculations and molecular dynamics simulations of molecular mechanism of influenza virus pathogenesis.", The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity (Hyogo, Japan), September, 2013.
- 1-3. "Rational design and development of a novel potent and highly specific inhibitor against influenza viral and human neuraminidases", 5th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (Khon Kaen, Thailand), October, 2013.
- 1-4. "Theoretical study of novel multitarget inhibitor for influenza virus by the first-principles calculation and MD Simulation", 5th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (Khon Kaen, Thailand), October, 2013. (Young Scientist Program Award 受賞)

2. 国内学会

- 2-1. "FMO および MD 計算によるムメフラールの NA に対する理論的相互作用解析", 第 32 回日本糖質学会年会 大阪 2013 年 8 月
- 2-2. "特異的シアリダーゼ阻害活性を持つ新規化合物と viNA/huNeu との相互作用解析", 第 32 回日本糖質学会年会 大阪 2013 年 8 月
- 2-3. "第一原理計算および MD Simulation を用いたインフルエンザウイルス HA および NA をマルチターゲットとする新規阻害剤に関する理論的研究", 第 56 回薬学会関東支部大会 東京 2013 年 10 月
- 2-4. "特異的シアリダーゼ阻害活性を持つ新規抗インフルエンザ薬の合理的設計・開発", 第 56 回薬学会関東支部大会 東京 2013 年 10 月
- 2-5. "高精度第一原理計算を用いた DPP-4 阻害薬に関する理論的研究", 第 56 回薬学会関東支部大会 東京 2013 年 10 月
- 2-6. "非エステル型脂肪酸と核内受容体 PPAR α/γ との理論的相互作用解析", 第 56 回薬学会関東支部大会 東京 2013 年 10 月
- 2-7. "遊離脂肪酸と GPR40 および GPR120 との理論的相互作用解析", 第 56 回薬学会関東支部大会 東京 2013 年 10 月
- 2-8. "第一原理計算を用いたインフルエンザウイルス表面糖タンパク質とマルチターゲット医薬リード天然物との高精度相互作用解析", 第 61 回ウイルス学会学術集会 兵庫 2013 年 11 月
- 2-9. "高精度第一原理計算を用いた DPP-4 阻害薬に関する理論的研究 2", 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム 広島 2013 年 11 月
- 2-10. "梅エキス抽出物フラン誘導体を先導化合物とした新規抗インフルエンザ薬の合理的設計開発", 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム 広島 2013 年 11 月
- 2-11. "インフルエンザ NA および HA と梅エキス抽出物 Mumefural との理論的相互作用解析", 3rd Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄 2014 年 1 月
- 2-12. "第一原理計算を用いたマルチターゲット抗インフルエンザウイルス薬の合理的設計開発", 3rd Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄 2014 年 1 月
- 2-13. "梅エキス抽出物をリードとしたマルチターゲット新規抗インフルエンザ薬の合理的設計・開発", 日本薬学会第 133 年会 熊本 2014 年 3 月
- 2-14. "高精度第一原理計算を用いた DPP-4 阻害薬に関する理論的研究 3", 日本薬学会第 133 年会 熊本 2014 年 3 月
- 2-15. "高精度第一原理計算および MD シミュレーションを用いた核内受容体 AF2 インターフェースの動的構造解析", 日本薬学会第 133 年会 熊本 2014 年 3 月

他 4 件 合計 19 件