

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
2012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		山 藤 歩 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	ウイルス感染症の新規治療薬の合理的設計・開発				
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		山 藤 歩		
研究期間	2012年度				
研究経費	500 千円（実績額又は執行額）337,310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。）

現在地球上には数多くの“病原性”ウイルスが存在し、我々人類は今なお、その恐怖に脅かされています。ひとたび猛威を振るえば世界規模の被害を引き起こすウイルス感染による疾病に対しては、社会的規模で対策を講じる必要があります。その一方で、近年の地球温暖化などの影響により、従来までは熱帯地域にみられたウイルス感染症が、感染範囲や感染者数を急激に増大しており、臨床応用されているワクチンや治療薬がないため、現在では、より多くの人々がウイルス感染のリスクにさらされています。そこで、環境に負担が少ないコンピュータの仮想実験空間を利用し、ウイルスに対する薬剤の結合による阻害発現メカニズムの解明し、新規薬剤の開発を目指す。

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。）

[ウイルス感染症] [理論創薬] [分子設計]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)**(1) ドッキングシミュレーションを活用した結合サイトの特定**

ウイルスに対して薬剤が効果を発現するためには、薬剤分子とウイルスのタンパク質とが結合することが必要です。そのため、新規に設計した薬剤が“どこに”“どのように”“どのくらいの強さで”ウイルスタンパク質に結合するのかを正確に予測することが必要不可欠です。そこで、まず、“どこに”薬物が結合するか、その結合ポイント进行特定するために、ドッキングシミュレーションを用いた理論的解析を行った。

デングウイルス表面タンパク質に対する解析

ウイルス表面に存在する表面タンパク質(E-protein)は二量体として安定化している。そこで、E-protein の二量体構造に対して結合サイトの探索を行った。タンパク質の立体構造は X 線結晶構造を基に水素を補完して構築し、阻害剤は HF/6-31G*レベルでの構造最適化計算を行った上で、MMFF94x の力場において水分子と共に MD シミュレーションを実行し、水中での安定構造を複数構築した。そこで、得られた結合サイトそれぞれに対して阻害剤候補化合物のドッキングシミュレーションを実行することにより、タンパク質と化合物の結合率を算出し、阻害剤の結合サイトを特定した。

阻害剤候補化合物が結合し得るサイトの数…66 個
イオン性クラスター部分にある結合サイトの数…7 個

結合率は以下の式を用いて算出した。

$$\text{結合率}^* = e^{-kT(E_i - E_4)}$$

* 結合サイト 4 を基準にした阻害剤が結合する割合
 T: 温度 (K) , E: エネルギー (kcal/mol) , k: 定数

イオン性クラスター周辺の結合サイトに対する阻害剤候補化合物の結合率

結合サイト:	1	2	3	4	5	6	7
結合率	: 0.30	0.11	0.09	1.00	0.06	0.01	0.62

なお、以上の成果については、Glyco T 2012 および、第 31 回日本糖質学会年会で発表した。

インフルエンザ表面タンパク質(ヘマグルチニン)に対する解析

ヘマグルチニン(Hemagglutinin: HA)はインフルエンザウイルスが宿主細胞へ吸着するときに機能するタンパク質である。また、近年では、宿主細胞内で複製された核タンパク質(NP)が細胞表面へ移動する際のシグナルの発生に HA と硫化糖脂質(スルファチド: Sulfatide)が大きく関与する可能性が示唆されているが、それらの結合ポイントおよび、作用機構は未解明であるため、理論的な解析を行った。

Sulfatide が結合し得るサイトの数…128 個

ここで、HA と Sulfatide は同じラフト内で相互作用する場合(cys-interaction)とラフト間で相互作用をする場合(trans-interaction)が考えられる。それを踏まえて結合サイトを解析し、cys-interaction に関与する結合サイトおよび、trans-interaction に関与する結合サイトをそれぞれ特定した。

Cys-interaction を形成する結合サイト…15 個
Trans-interaction を形成する結合サイト…12 個

なお、以上の成果については第 56 回日本薬学会関東支部大会で発表した。

研究成果の概要 つづき

(2) FMO 法を用いたタンパク質-薬剤相互作用解析

化合物がタンパク質に結合するとき、どのアミノ酸と“どのくらいの強さで”有効な結合をしているかを解析することで、類似の結合パターンを予測し、新規化合物を設計することが可能である。その時、指標の一つとなるのが、タンパク質と化合物の結合能 (Binding Affinity [kcal/mol]) である。そこで、今回は DENV E-protein と阻害剤候補化合物の複合体に対して FMO 法を用いて、RI-MP2/cc-pVDZ レベルでの相互作用エネルギー (InterFragment Interaction Energy: IFIE) 解析を行うことにより、結合サイト毎の Binding Affinity [kcal/mol] を算出し、それに寄与するアミノ酸の特定を行った。ここで用いた RI-MP2 は従来の MP2 法と同じ精度で高速に計算できるように改良したものである。

$$\text{結合能 (Binding Affinity)} = \Sigma (E_{i,j} - E_i - E_j) \text{ [kcal/mol]}$$

E: エネルギー[kcal/mol]

イオン性クラスター周辺の結合サイトに対する阻害剤候補化合物の結合能

結合サイト:	1	2	3	4	5	6	7	
結合能	-176.34	-151.59	-185.16	-264.94	-248.80	-254.52	-212.73	[kcal/mol]
(Binding Affinity)								

また、それぞれのアミノ酸と阻害剤との相互作用エネルギー (IFIE) を解析した結果、阻害剤は結合サイト周辺の塩基性アミノ酸、特に、Lys310 および Arg323 と強い静電的相互作用を、His149 と水素結合を形成していることが明らかとなった。これらの結果は、阻害活性発現のメカニズムの解明に寄与するだけでなく、新規薬剤の開発のための設計指針とすることができる。

なお、以上の成果については 26th International Carbohydrate Symposium(ICS)および、第 31 回日本糖質学会年会において発表した。

(3) 新規薬剤分子の設計

(1) (2) で得られた結果を設計指針として新規化合物 **1,3-*syn*-sulfoxy carboxylic acid**、**1,3-*anti*-sulfoxy carboxylic acid** など 4 種類の新規薬剤の候補となる分子を設計した。設計に際しては、まず、分子内のカルボン酸と硫酸基との位置関係(距離)が重要であること、さらに、結合サイト周辺のアミノ酸残基との立体的な反発を軽減することが重要であることを考慮した。そこで、タンパク質への結合において重要な官能基である硫酸基とカルボキシル基のみを残し、できるだけシンプルな化合物を設計した。また、もともとの阻害剤が糖骨格を有しているのに対し、新規化合物では炭化水素骨格を採用し、官能基の修飾をより容易にすることで、更なる高活性を示す薬としての分子の最適化がしやすくなり、阻害活性発現のメカニズム解明および、新規薬剤の創出を促進すると考えられる。

なお、以上の成果については、論文への投稿準備中である。

(4) 設計した新規化合物の合成

(3) で設計した化合物の有機合成を行った。現在までに設計した 4 種類の化合物の内、1 種類の合成を完了している。まず、3-cyclohexenecarboxylic acid を出発原料とし、ヨードラクトン化により立体を制御した。その後、加水分解を経て、アルコールに硫酸基を導入し、イオン交換により目的化合物のナトリウム塩として合成を完了した。反応の完了は薄層クロマトグラフィー (TLC) で確認し、化合物の同定には核磁気共鳴装置 ($^1\text{H-NMR}$) を用いた。また、加水分解を行った化合物を共通中間体として他の化合物の合成も可能であると考えている。他の 3 種類の化合物の合成が完了した後、新規化合物の特許申請、およびこれまでの研究成果を論文にまとめ、在学中に投稿するための準備をしている。

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)

①②③は該当なし

④学会発表

- ✓ “Novel in silico investigation between sulfated monosaccharide inhibitors and envelope glycoproteins” “How do furan derivatives from Japanese apricot fruit-juice concentrate inhibit functions of glycoproteins?” , **Glyco T 2012**, Hnnover (Germany), 5-9, June
- ✓ “HEORETICAL MOLECULAR DESIGN OF NOVEL INHIBITOR FOR DENGUE VIRUS INFECTION” , **International Carbohydrate Symposium(ICS)**, Madrid(Spain), 22-27, July
- ✓ “ Deng ウイルス 感染 阻害 剤 の 結合 サイト 解析 ” , **第 31 回 日本糖質学会年会**, 鹿児島, 17-20, Sep.
- ✓ “スルファチドによるインフルエンザ HA 阻害活性機構に関する理論的解析” , **第 56 回日本薬学会関東支部大会**, 東京, 13, Oct.