

（論文内容の要旨）

インフルエンザウイルスはエンベロープ上にヘマグルチニン（HA）というタンパク質を持っており、宿主の細胞膜上に存在する糖鎖の Neu5Ac $\alpha$ 2-3(6)Gal $\beta$ 1-3(4)GlcNAc $\beta$ 1-（Neu5Ac: N-アセチルノイラミン酸, Gal: ガラクトース, GlcNAc: N-アセチルグルコサミン）構造を認識して細胞に結合し、感染の契機となる。本研究はインフルエンザウイルスの HA がシアロ糖鎖に結合する事実を利用して、ポリマー基材にシアロ糖鎖を複数付加したインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤を合成するとともに、本阻害剤の糖クラスター効果に基づく特性を検討したものである。

鶏卵卵黄由来のシアロ糖ペプチドSGP（Sialylglycopeptide）のシアロ糖鎖を糸状菌 *Mucor hiemalis* の糖加水分解酵素 Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase の糖転移活性を利用して *p*-formylphenyl-GlcNAc に転移付加し、得られたシアロ糖化合物SGTG（Sialylglyco-transglycosylation product）をキトサンのアミノ基に還元アミノ化反応によって導入し、シアロ糖鎖が複数付加したインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤 CDO（Complex disialo oligosaccharide）キトサンを合成した。本阻害剤について、インフルエンザウイルス A/New Caledonia (H1N1)、A/Panama (H3N2)、B/Shanghai 株に対する MDCK 細胞への感染阻害能を調べたところ、いずれの株に対しても高い感染阻害能を示し、 $\alpha$ 2,6 シアリルラクトサミンモノマー（Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc）に対する IC<sub>50</sub> 値は 10～100 分の 1 であった。

本 CDO キトサンの阻害特性はバックボーン基材であるキトサン鎖長 (DP) およびシアロ糖鎖付加率 (DS) の二つの因子に依存しており、両因子は増加するほど阻害活性も増加した。しかし、その阻害活性は DP に対して対数的に増加するため、キトサンが長くなるほどクラスター効果の上昇率は徐々に鈍化した。また、キトサンは鎖長が長いほど溶解性が低下するために DS も減少することから、溶解性が高くかつ阻害活性も十分維持される DP 500 程度のキトサンが本阻害剤のポリマー基材として最適であると結論付けた。さらに阻害活性は DS 値 15% で飽和に達し、それ以上キトサンにシアロ糖鎖を付加しても阻害活性の増加は見られなかった。

次に HA と CDO キトサンの構造的相関性を調べるため、DP 10、DS 15% の CDO キトサンの分子構造を分子動力学法によって決定した。得られた CDO キトサンの構造と HA 分子の構造を合わせたところ、CDO キトサン上のシアロ糖鎖の隣り合う二つのシアル酸がちょうど HA 三量体の二つのシアル酸結合部位に一致することが明らかになった。すなわち、CDO キトサンの阻害活性が DS 15% で飽和することは HA の構造から推察すると非常に合理的な結果であった。また DP 116 のキトサン（鎖長約 70 nm）を用いた阻害剤は 1 mg/mL の濃度で A/Panama 株を 50% 程度しか感染阻害しなかったのに対し DP 401 のキトサン（鎖長約 240 nm）を用いたものは全ての株を 80% 以上感染阻害した結果から、CDO キトサンの長さはウイルスの直径約 100 nm よりも十分に長い必要があることが示唆された。

以上の結果とキトサンの剛直性を考えると、CDO キトサンの直鎖上の一部が球状のウイルス表面に接着し、その両端にウイルス直径より長い CDO キトサンの「尻尾」が伸びることにより、ウイルスの細胞表面への接着を妨げて、ウイルス感染を阻害すると考えられる。

## （論文審査の結果の要旨）

インフルエンザウイルスは新型ウイルスの大流行が懸念されるなど、今でも最も重要なヒト感染症の一つである。現在、リレンザやタミフルなどがその感染を防ぐ効果の高い薬剤として用いられているが、これらの薬剤はウイルスの感染そのものを防ぎうるものではない。本研究で提案されているインフルエンザウイルスの捕捉型感染阻害剤は感染そのものを防ぐという新しい観点に基づいた抗インフルエンザ剤であり、予防医学と言う点からも高く評価できるものである。さらに、天然物由来の物質を材料とし、ヒトに対して使用することを考慮して安全性にも配慮した感染阻害剤であり、実用化の観点からも評価できるものである。また、阻害剤の合成についてはタンパク質に付加したシアロ糖鎖を遊離する加水分解酵素の特異な糖転移活性を活用して、合成化合物に効率的にシアロ糖鎖を付加した後、その化合物を化学的にポリマーに繋ぐと言うケモエンザイムの典型的な方法を用いて合成している。本方法は収率良く目的の阻害剤を得ることができる点で評価できる。

本論文の著者は本阻害剤の阻害挙動の解析において、ウイルスタンパク質に認識されるシアロ糖鎖を付加するバックボーンの長さ（DP）とシアロ糖鎖の付加率（DS）を変えることにより、糖鎖に特有のクラスター効果が生じる機構を明らかとした。すなわち、その阻害の効率は DP と DS の二つの因子に依存しており、両因子はいずれも増加するほど阻害活性も増加した。しかし、その阻害活性は DP に対して対数的に増加するため、キトサンが長くなるほどクラスター効果の伸び率は鈍化する。著者は最適な合成条件を見出し、得られた阻害剤について、コンピューター・シミュレーションを用いた理論的考察を加えて実験結果の妥当性を裏付けた。実験と計算の融合は重要な課題であるが、このように双方がうまくかみ合って得られた研究成果はまだ少ない。本研究は、実際に阻害能を持った物質を合成しその機能を理論的に裏付けることに成功した数少ない例である。

実際にこの阻害剤はマスクやスプレーといった人体に接触しうる状況で使用することを視野に入れて、著者は安全かつ簡便な合成方法の確立を目指した応用研究を展開している。本研究は、今後、トリインフルエンザウイルスの感染阻害を目指した展開が可能であり、将来性も十分に期待できる優れた研究である。

よって本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認められた。なお、平成20年9月30日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認められた。