

令和元年6月7日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08032

研究課題名(和文)新規 グリコシダーゼ阻害剤を用いた特異的抗コロナウイルス薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel alpha-glucosidase inhibitors suppressing coronavirus replication.

研究代表者

氏家 誠 (Ujike, Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50415478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体 グルコシダーゼ阻害薬(AGI)は、宿主細胞の グルコシダーゼの働きを抑制する事で糖蛋白質の合成を阻害する。このため、AGIは、コロナウイルス(CoV)を初めとするエンベロープウイルスに対して抗ウイルス活性を示す。我々は、これまでに、動物およびヒトCoVに対して強力な抗ウイルス活性を示す新規AGIを6種類同定した。AGIが示した抗CoV活性は、当初、構造蛋白質であるS糖蛋白質の合成阻害に起因すると考えられていたが、S糖蛋白質だけではなく非糖蛋白質及びその転写活性をも選択的に阻害する事が分かった。これらの事から、AGIによる抗CoV機構は従来とは異なる機構で働く事が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CoV科は、監視伝染病である豚伝染性胃腸炎及び伝染性気管支炎ウイルスや、近年国内で大流行した豚流行性下痢ウイルス、実験動物取扱時に問題となるマウス肝炎ウイルス、ペットの猫や野生ネコ属に致死的な病態を引き起こす猫伝染性腹膜炎ウイルスを含む。また、ヒトにおいては高い致死率をもつ重症呼吸器症候群や中東呼吸器症候群CoVを含み医学・獣医学領域で重要なウイルスである。しかしながら、現在でも効果的な抗CoV薬は存在しない。本研究により見出された、幅広いCoVに効果をもつAGIsが臨床応用されれば動物の衛生及びヒトの公衆衛生に大きな影響を与えられられる。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) alpha-glucosidase inhibitors (AGI) inhibit host ER alpha-glucosidases, resulting in the suppression of host glycoprotein synthesis. Because most enveloped viruses including coronavirus (CoV) contain glycoproteins, AGI would efficiently disrupt the morphogenesis of a broad spectrum of enveloped viruses in infected cells. In this study, we identified six novel AGIs which have a novel framework by screening from the compound library and found that these AGIs showed strong antiviral activity against animal or human CoVs. It was first thought that the anti-CoV activity by novel AGIs was due to the inhibition of the structural protein, viral spike glycoproteins. However, we found that novel AGIs specifically inhibited not only spike glycoprotein but viral non-glycoproteins and even viral transcription activity. These data suggested that novel AGIs showed anti-CoV activity by a distinct mechanism from conventional one.

研究分野：ウイルス学

キーワード：コロナウイルス 抗ウイルス薬 小胞体 グルコシダーゼ阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コロナウイルス(CoV)科は、エンベロープ膜をもつ一本鎖(+)鎖 RNA ウイルスである。本科ウイルスは、監視伝染病である豚伝染性胃腸炎(TGEV)及び伝染性気管支炎ウイルス(IBV)や、2014年に国内で大流行した豚流行性下痢ウイルス(PEDV)、実験動物取扱時に問題となるマウス肝炎ウイルス(MHV)、ペットの猫や野生ネコ属に致死的な病態を引き起こす猫伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)を含む。また、ヒトにおいては高い致死率をもつ重症呼吸器症候群(SARS)や中東呼吸器症候群(MERS)-CoV を含み医学・獣医学領域で重要なウイルスである。しかしながら、効果的な抗 CoV 薬は存在せず、幅広い CoV に効果のある抗ウイルス薬の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

小胞体 グルコシダーゼ阻害薬(AGI)は、宿主細胞の グルコシダーゼの働きを抑制する事で糖蛋白質の合成を阻害する。このため、AGI は、コロナウイルス (CoV) を初めとする幅広いエンベロープウイルスに対して抗ウイルス活性を示す。しかしながら、その抗ウイルス活性は比較的穏やかである。本研究では、(1)化合物ライブラリーから新規 AGI のスクリーニングを行い、(2) それら新規 AGI の動物及びヒト CoVs (MHV、PEDV、MARS-CoV) に対する抗ウイルス活性の評価を行う。さらに(3)新規 AGI による抗 CoV 機構の解明を行うことで、幅広い CoV に効果のある抗 CoV 薬の開発を行う。

3. 研究の方法

- (1) AGI 活性を持つ新規化合物の検索：パーチャルスクリーニング及び天然化合物ライブラリーからのスクリーニングにより AGI 活性を持つ新規化合物の検索を行った。また、各種細胞を用いた毒性試験を行った。
- (2) 新規 AGI の抗 CoV 評価：毒性の低かった新規 AGI を用いて、3 種の CoVs (MHV、PEDV、MARS-CoV) に対する抗 CoV 活性の評価を行った。
- (3) 新規 AGI による抗 CoV メカニズムの解明
CoV 及び宿主細胞の転写活性・各種蛋白質合成能の測定:AGI が従来のメカニズム、すなわち CoV の構造蛋白質のうちスパイク糖蛋白質を阻害して抗 CoV 活性を示すのか、その評価を行った。
DMVs 形成能の観察：感染初期に形成される CoV 専用工場である DMVs の形成能を特異抗体を用いて蛍光顕微鏡下観察した。
NSP4 蛋白質の合成量の測定:DMVs 形成に必須である、非構造蛋白質であり糖蛋白質の NSP4 の、AGI 存在下における合成能を測定した。

4. 研究成果

- (1) AGI 活性を持つ新規化合物の検索：パーチャルスクリーニング及び天然化合物からのスクリーニングにより AGI 活性を持つと考えられる約 60 の新規候補化合物を見出した。
- (2) これらの新規 AGI の毒性試験及び 3 種 CoVs(MHV、PEDV、MERS-CoV) に対する抗 CoV 活性を評価した所、既知 AGI と比べて強力な抗 CoV 活性を持ち、かつ安全性の高い 6 つの新規 AGI を同定した。
- (3) 新規 AGI による抗 CoV メカニズムの解明
新規 AGI 及び既知 AGI 存在下、MHV 及び宿主細胞の転写活性・各種蛋白質合成量を測定したところ、宿主由来遺伝子の転写量及び蛋白質量に大きな影響は見られなかった。一方、MHV 由来蛋白質においては、スパイク糖蛋白質だけでなく非糖蛋白質の合成も阻害されており、一部新規 AGI では MHV の転写活性も抑制された。これまで AGI の抗 CoV 活性は、構造蛋白質のスパイク糖蛋白質の合成阻害に起因すると考えられていた。ところが、AGI は MHV のスパイク糖蛋白質だけではなく非糖蛋白質及びその転写活性をも選択的に阻害する事が示唆され、これは全く予期せぬ結果であった。そこで下記の仮定の元、さらなる解析を行った。
CoV は感染すると宿主細胞由来の脂質 2 重膜を変化させて DMVs と呼ばれる「CoV 専用の複製工場」を形成する。この DMVs 形成には、非構造蛋白質の NSP3、4 及び 6 が関与する。

NSP4 及び NSP6 は糖蛋白質であることから、AGI はこれら糖蛋白質に作用して DMVs 形成を抑制すると仮定した。そこで、AGI 存在及び非存在下、感染細胞の DMVs 形成を観察したところ、AGI 存在下では DMVs 形成が著しく抑制される事が分かった (図 1A)

次に AGI 存在及び非存在下、NSP4 糖蛋白質の合成量を比較したところ、AGI 存在下では NSP4 合成が強く阻害される事が分かった (図 1B)

これらの結果から、AGI は非構造蛋白質の NSP4 糖蛋白質の合成を阻害することで CoV 専用の複製工場 DMVs 形成そのものの合成を抑制し、その結果として、CoV の転写活性・翻訳活性を強力に阻害して強い抗 CoV 活性を示すことが示唆された。

国内外におけるインパクト：
CoV は DMVs 内でウイルスゲノムを複製、または転写・翻訳する事でウイルス構成成分を濃縮しウイルス粒子形成を容易にする。このため、DMVs は CoV の増殖に必須であり、DMVs 形成を阻害する抗ウイルス薬は、幅広い CoV に強力な効果が期待できる。現在、このような作用機序を持つ化合物は K22 などのわずかな化合物だけである。しかしながら K22 は幅広い CoV に効果を示すものの、容易に耐性株が出現する事が報告されている。一方、AGI は宿主

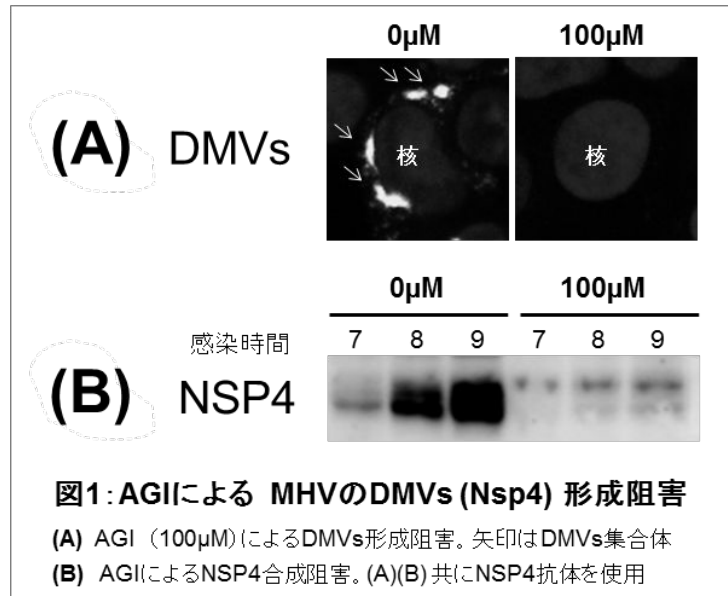
の代謝機能に作用して DMVs 形成を阻害すると考えられるため、K22 と異なり、耐性株が極めて出現しにくいと考えられる。また、高い安全性を持つ事から、CoV 治療薬として優れた特性を持つ。

今後の展望：今後は、AGI の抗 CoV 機構に関するさらに詳細な解析を行うと共に、マウスモデルを使用した動物実験などを行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Antiviral Activity and Mechanism of Action of Endoplasmic Reticulum Glucosidase Inhibitors: A Mini Review. (2018) M. Onda and W. Hakamata, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 30(176), E139-E145, <https://doi.org/10.4052/tigg.1753.1J>. 査読：有
2. Design and synthesis of cell-permeable fluorescent nitrilotriacetic acid derivatives. (2018) Tsuji G, Hattori T, Kato M, Hakamata W, Inoue H, Naito M, Kurihara M, Demizu Y, Shoda T. *Bioorg. Med. Chem.*, 26 (20), 5494-5498, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.09.028>. 査読：有
3. Synthesis of Chitin Oligosaccharides Using Dried *Stenotrophomonas maltophilia* Cells Containing a Transglycosylation Reaction-Catalyzing β -N-Acetylhexosaminidase as a Whole-Cell Catalyst. (2018) Uehara A, Takahashi N, Moriyama M, Hirano T, Hakamata W, Nishio T. *Appl Biochem Biotechnol.*, 184(2), 673-684, <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2585-2>.
4. Chemoenzymatic synthesis of sucronic acid using d-glucurono-6,3-lactone and sucrose as raw materials, and properties of the product. (2018). Hosaka H, Mizoguchi S, Tashiro M, Fujimoto T, Hirano T, Hakamata W, Nishio T. *Enzyme Microb Technol.*, 110, 53-60,



<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.12.006>.

5. Identification of Small-Molecule Inhibitors of Human Golgi Mannosidase *via* a Drug Repositioning Screen. (2018) Koyama R, **Hakamata W**, Hirano T, Nishio T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*: **66** (6), 678-681, <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-01009>. 査読：有
6. Identification of tumor-initiating cells derived from two canine rhabdomyosarcoma cell lines. (2017) Kishimoto TE, Yashima S, Nakahira R, Onozawa E, Azakami D, **Ujike M**, Ochiai K, Ishiwata T, Takahashi K, Michishita M. *Journal of Veterinary Medical Science* 79: 1155-1162, <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0412>. 査読：有
7. *In vivo* programming of endogenous antibodies via oral administration of adaptor ligands. (2017) Nagano M., Carrillo ., Otsubo N., **Hakamata W.**, Ban H., Fuller R.P., Bashiruddin N.K., Barbas CF 3rd *Bioorg. Med. Chem.* **25** (21), 5952-5961, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.010>. 査読：有
8. The contribution of the cytoplasmic retrieval signal of severe acute respiratory syndrome coronavirus to intracellular accumulation of S proteins and incorporation of S protein into virus-like particles (2016) **Ujike M**, Huang C, Shirato K, Makino S, Taguchi F. *Journal of General Virology* 97: 1853-1864, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000494>. 査読：有
9. Phylogenetic and antigenic characterization of newly isolated porcine epidemic diarrhea viruses in Japan. (2016) Islam MT, Kubota T, **Ujike M**, Yahara Y, Taguchi F. *Virus Research* 222: 113-119, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.06.006>. 査読：有
10. Discovery of human Golgi β -galactosidase with no identified glycosidase using a QMC substrate design platform for *exo*-glycosidase (2016). Miura K, **Hakamata W**, Tanaka A, Hirano T, Nishio T, *Bioorg. Med. Chem.*, **24** (6), 1369-1375, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.010>. 査読：有

〔学会発表〕(計 9件)

1. 牛トロウイルスの血球凝集素 エステラーゼ (HE) 遺伝子の安定性に関する研究 (2018) **氏家誠**、江藤由佳、木暮菜希、イスラム・タイムール、田口文広 第 66 回日本ウイルス学会学会学術集会
2. 牛トロウイルスヌクレオカプシド蛋白質の CRM1 非依存的核外移行シグナルに関する研究 (2018) 木田萌子、木村留華、岩田修二、松永惟、田口文広、**氏家誠** 第 66 回日本ウイルス学会学術集会
3. 牛トロウイルスの Membrane(M)蛋白質の細胞内局在に関する研究 (2018) 鈴木友美、田口文広、**氏家誠** 第 66 回日本ウイルス学会学術集会
4. 新規小胞体 -グルコシダーゼ阻害薬による抗コロナウイルス機構に関する研究(2017) 小酒さおり、坪内千春、上間駿、恩田桃子、松山州徳、**袴田航**、**氏家誠** 第 65 回日本ウイルス学会学術集会
5. 牛トロウイルスヌクレオカプシド蛋白質の核輸送機構に関する研究(2017) 岩田修二、松永惟、河内悠華子、田口文広、**氏家誠** 第 65 回日本ウイルス学会学術集会
6. Inverse correlation between innate immune responses and pathogenicity of influenza H7N9 virus that is adapted to mice. (2017) Teruki Miyazaki, Kimimasa Takahashi, **Makoto Ujike**, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Noriyo Nagata, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Hideki Asanuma. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology.
7. 小胞体 -グルコシダーゼ阻害薬による抗コロナウイルス機構に関する研究 (2016) **氏家誠**、松永唯、荒井 詩織、松山州徳、**袴田航** 第 159 回日本獣医学会学術集会
8. 牛トロウイルス N 蛋白質の核輸送機構に関する研究 (2016) 伊藤咲、松永惟、河内悠華子、

9. Phylogenetic and antigenic characterization of newly isolated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Japan (2016) Islam MT, Kubota T, Ujike M, Yahara Y, Taguchi F. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：袴田 航

ローマ字氏名：Hakamata Wataru

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10333337

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松山 州徳

ローマ字氏名：Matsuyama Shutoku

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。