

平成22年 5月19日現在

研究種目：若手 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790102
 研究課題名 (和文) 糖鎖プロセッシング酵素を分子標的とした論理的・網羅的創薬探索
 研究課題名 (英文) In silico and HTS screenings of oligosaccharide processing enzyme as drug discovery target
 研究代表者
 袴田 航 (HAKAMATA WATARU)
 日本大学・生物資源科学部・講師
 研究者番号：10333337

研究成果の概要 (和文)：新型インフルエンザをはじめとした新興ウイルス感染症が人類にとって重要な問題となっている。そこで、近年立体構造が解析されたドラッグターゲットとして有望である糖鎖プロセッシング酵素を分子標的として、市販化合物のライブラリ (約 600 万化合物ライブラリを入手済) に対して、*in silico* 高速スクリーニングと微生物代謝産物に対して阻害剤探索を行い、ドラッグリード化合物およびライブラリを得た。

研究成果の概要 (英文)：For the development of a true alpha-inhibitor that acts in cells, *in silico* HTS using the target alpha-glucosidase and computer-aided inhibitors for screening based on enzymological information of alpha-glucosidase are important.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	660,000	3,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：糖鎖、ウイルス、酵素反応

1. 研究開始当初の背景

現在、新興・再興ウイルス感染症の制圧は緊急かつ重要な問題となっている。トリインフルエンザのヒトへの伝播や SARS など続々と出現する難治性新興ウイルス感染症等、新興・再興ウイルス感染症は人

類の脅威となっている。しかし、ウイルス感染症に対する有効な薬剤の開発は、細菌感染症の抗生物質に比べ遅れている。従って、ウイルス感染症に対する根本的な治療薬の開発および新興ウイルス感染症への迅速な対応の為、ウイルス感染機序に基づくスピーディーな抗ウイルス薬の探索・研

究・開発が早急に必要となっている。

2. 研究の目的

新興・再興ウイルス感染症拡大の多くは、ウイルスが生物種を超えて伝播することに起因する事から、個々のウイルス感染症に対する薬剤だけでなく、ウイルス共通の感染機序に基づいた薬剤の開発が重要となる。そこで、殆どのウイルスの感染・増殖に必須である *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素を分子標的とし、糖鎖プロセシング酵素阻害剤の論理的探索 (*in silico* スクリーニング) および化合物網羅的探索 (ハイスループットスクリーニング: HTS) を行い、リード化合物を効率的に探索し、得られたリード化合物の構造最適化を行い、細胞レベルで抗ウイルス活性を有する真のリード化合物を得る事が重要となっている。

3. 研究の方法

N-結合型糖鎖プロセシング酵素阻害剤は、*N*-結合型糖鎖の構築を阻害する事によりタンパク質のフォールディングや細胞内輸送を混乱させ¹⁾、様々なウイルス (インフルエンザ、B 型・C 型肝炎ウイルス、エイズウイルス、SARS ウイルス等) に抗ウイルス活性を示す事が数多く報告されている²⁾。このように糖鎖プロセシング酵素は「薬物の分子標的となりうる “Druggable Target”」として非常に有力である。^{1) *Mutat. Res.*, **569**, 29, 2005, ^{2) *J. Virol.*, **80**, 2326, 2006, *Chem. Biochem.*, **7**, 165, 2006, *Mini. Rev. Med. Chem.*, **2**, 163, 2002.} 具体例として *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素を分子標的とした薬剤である、ブチルデオキシノジリマイシンやブタノイルカスタノスペルミンは HIV や C 型肝炎に有効であり、その開発は Phase II まで進行している。}

このように糖鎖プロセシング酵素を分子標的とした創薬が有効である事は明らかであるが、これら酵素の阻害剤の大部分がアザ糖誘導体であり、創薬展開の為には新規骨格と異なる作用を有する新しい薬剤の探索と開発が必要とされている。

そこで、本研究は最も重要となる糖鎖プロセシング酵素およびその阻害剤の研究において、小胞体 *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素に着目し、その分子認識機構・機能解明・基質特異性に基づいた阻害剤設計と合成・効率的活性測定法の開発・阻害剤の HTS を行う事とした。

(1) 阻害剤の *in silico* スクリーニング

2005 年~2006 年に立体構造が解析されたマンノシダーゼ (PDB: 1X9D) およびグルコシダーゼ (PDB: 2G3M) を分子標的として、市販化合物のライブラリ (約 600 万化合物ライブラリを入手済) に対して、*in silico* スクリーニングを行う。

研究を効率的に進める為、医薬品や医薬品候補化合物のデータベースを用いた Drug-Like / Drugness / Drugability の解析と経験則のルール化を重要視したライブラリを用い、単なる阻害剤ではなくリード化合物として発展性が期待できる阻害剤を獲得する戦略を採る。

その際見いだされた優れた阻害剤候補化合物 (約 30 化合物程度) の酵素阻害活性を測定した。阻害活性測定はこれまでの研究において確立し、報告を行った (*J. Am. Chem. Soc.*, 2006、2005 年度日本薬学会年会) 高感度で簡便な活性測定方法を用いて行う。

本方法での問題は、*in silico* スクリーニングによって得られた化合物に阻害活性が見いだされない事であった。そのような場合には、見いだされる化合物に新規性が

少なくなる可能性があるが、我々が既に報告した (J. Am. Chem. Soc., 2006 and J. Appl. Glycosci., 2006) 糖鎖プロセッシング阻害を作用機序とする抗ウイルス化合物の構造をファーマコフォアとして再スクリーニングを行う事により、阻害剤のヒット率を高めた。

(3) ハイスループットスクリーニング (HTS) による阻害剤探索

自然界の多くの生物は、生物と生物、生物と環境が深く相互に関係し、多様な相互関係を維持しながら共存し複合生物系を形成している。例えば、□単独では増殖不可能で他の生物との複合関係に依存的な場合 (機能も発現できない) □増殖や特定の二次代謝機能に (必須ではないが) 複合関係が有効に機能している場合 □特定の時期にのみ他の生物との複合関係を必要とする場合 (基質依存的分解酵素生産など) □競合的複合関係下で阻害物質や忌避物質を生産する場合、などその多くは単一生物では得られない多様な機能を有しているものと考えられる。パスツール、コッホ以来の単一微生物を対象とした従来のバイオ技術では、取り扱い可能な微生物は 0.1~1%前後と言われている。このため、多くの遺伝子資源・微生物資源が未利用の状態であることを示している。そこで我々は高感度・簡便アッセイ方法にハイスループット化を施し (文科省科研費 H17-H18 若手 (B))、その方法と有効性を 2006 年度日本応用糖質科学会大会にて報告した。本方法を用いて、本天然物の化合物ライブラリに対して化合物網羅的スクリーニングを行った。また、微生物や植物からは毎年 500 から 1,000 個程度の新規生理活性物質の報告があり、これまでの累計では 4~5 万程

度の化合物が報告されている。微生物代謝産物については 2005 年までにおよそ 2 万化合物が報告されているが、生産菌として報告された微生物種の割合は、放線菌 45%、細菌が 17%、カビなどの真菌が 38%程度である。1990 年代後半から真菌由来の報告が年々増加し、最近由来の報告が減少傾向にある。活性としては医薬分野で活発に探索されてきたこともあり、抗細菌、抗真菌、抗腫瘍、抗炎症、免疫調整、コレステロール低下、血糖低下などの作用を有するものが多く、抗生物質を始め抗腫瘍剤、抗脂血症治療剤、血糖低下剤、免疫抑制剤など多様な医薬品が上市されている。その上市確率は報告された生理活性物質の 0.4%程度である。また、2002 年の上市医薬品の全世界での売り上げ上位 200 品目のうち、約 16%が天然物由来 (原体そのものと誘導体または天然物をリードとして合成展開したものを合算) であり、その 80%が放線菌、細菌、真菌類などの微生物由来である。そこでさらに、より新規性があり高活性阻害剤を得る為に、放線菌 2 次代謝物ライブラリの活用を行った。

4. 研究成果

「*in silico* 探索」および「微生物からの探索」阻害剤の論理的・網羅的探索を行った。その結果、市販化合物をライブラリとした *in silico* 阻害剤スクリーニングおよび共生培養系を用いた放線菌ライブラリからの阻害剤スクリーニングによって得られた阻害剤および阻害剤候補化合物ライブラリから、創薬リード化合物を得る事ができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- ①. Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information. Current Topics in Medicinal Chemistry, 9, 3-12, (2009). 査読有

〔学会発表〕(計5件)

- ①. 第56回日本応用糖質科学会、2007年8月、日本大学(神奈川県藤沢市)、 α -グルコシダーゼ阻害剤の *in silico* スクリーニングに用いる合成可能なバーチャル化合物ライブラリの構築、袴田 航、牛島世里子、寺島 彩、栗原正明、奥田晴宏、西尾俊幸、奥 忠武
- ②. 2008年日本農芸化学会、2008年3月(京都)、放線菌共培養ライブラリからの α -グルコシダーゼ阻害剤のスクリーニング、牛島 世里子、寺島 彩、袴田 航、西尾 俊幸、奥 忠武
- ③. XXIV International Carbohydrate Symposium, 7/30/2008, (Oslo, Norway), *In silico* Screening for α -Glucosidase Inhibitors, W. Hakamata, Y. Ushijima, M. Kurihara, H. Okuda, T. Nishio, T. Oku
- ④. 第57回日本応用糖質科学会、2008年8月、琉球大学(沖縄県那覇市)、グルコシダーゼ阻害剤生合成鍵酵素の存在を指標とした放線菌共培養液からの新規骨格を有するグルコシダーゼ阻害剤の探索、牛島 世里子、袴田 航、西尾 俊幸、奥 忠武
- ⑤. 薬理学会第82回日本薬理学会年会、2009年3月18日、シンポジウム招待講演(神奈川県横浜市)、*In silico* Screening of oligosaccharide processing glycosidase inhibitor for HIV drug, Wataru Hakamata, Yutaka Takebe, Yoriko Ushijima, Toshiyui Nishio, Tadatake Oku

6. 研究組織

(1)研究代表者

袴田 航 (HAKAMATA WATARU)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：10333337