

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460157

研究課題名(和文)糖鎖合成阻害を機序とする薬剤耐性回避型抗ウイルス剤の探索

研究課題名(英文)Antivirus drug development based on inhibition of N-glycan processing process

研究代表者

袴田 航 (HAKAMATA, Wataru)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10333337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのウイルス感染症に対する医薬品は非常に限られている。そこで、多くのウイルスの感染・増殖に必須な宿主機構である N-結合型糖鎖合成に着目した。本プロセスに關与する酵素は原理的に薬剤耐性回避型抗ウイルス薬の標的酵素になるとし、本研究オリジナルな蛍光基質を用いて、化合物ライブラリよりヒト細胞内で機能する阻害剤を探索し、得られた化合物を評価した。その結果、前述した社会的要請に応えることが期待される、幅広いウイルスに効果を発揮する抗ウイルス薬開発へむけての着実な一歩になる結果(化合物)が得られた。

研究成果の概要(英文)：An endoplasmic reticulum glucosidase II in host cells is a key target for the development of anti-virus agents aimed at the measure of virus outbreak. A disturbance of maturation of N-linked glycosylation of virus envelope proteins inhibited of the β -glucosidases have an influence on particle assembly and infectivity of the virus. Here we report on the identification of novel inhibitors of glucosidase II through a discovery of inhibitor screening from compound library and its biological evaluations, and anti-virus activity.

研究分野：医薬品化学

キーワード：抗ウイルス 糖鎖 グルコシダーゼ 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

ヒトの感染症は微生物・原虫・ウイルスによって主として引き起こされる。微生物・原虫による感染症に対する医薬品(抗生物質・抗菌剤等)は数多く上市されているが、ウイルス感染症に対する医薬品は非常に限られている。インフルエンザに対する治療薬としてタミフルやリレンザ等は一般的によく知られているが(新型インフルエンザに対しては効果が薄いこともまた同様に知られている)、MARS・SARS・エボラ出血熱・デング熱・ジカ熱といった新興・再興ウイルス感染症に対しては、基本的に治療薬が存在しない。またこのようなウイルス感染症が続々と出現し、安心・安全を基調とする社会に深刻な脅威を与えている。

一方、家畜に対するウイルス感染症(鳥インフルエンザ・豚流行性下痢・口蹄疫など)も同様に治療薬・治療法がなく、感染症がみられた場合には近隣の家畜を含め全頭が殺処分され、甚大な経済的損失を引き起こしている。

このような社会的背景から、幅広いウイルスに効果を発揮する抗ウイルス剤開発への要請が非常に高くなっている。

2. 研究の目的

このようにヒト・家畜に対して、毎年のように新しいウイルス感染症が報告されているが、抗ウイルス薬は非常に限られている。さらに、細菌感染症に対する抗生物質に比べ、抗ウイルス薬の開発は大きく遅れており、新規な抗ウイルス薬の開発が喫緊の課題となっている。

現状、抗ウイルス薬の開発が大きく遅れている原因として、ウイルスの非常に早い遺伝子変異があげられる。このような遺伝子変異の早さによって、歴史的にはスペイン風邪・香港風邪のようなパンデミックを引き起こしてきた。さらに、現状の抗ウイルス薬の1つである抗インフルエンザ薬のタミフルおよび抗 HIV 薬の逆転写酵素阻害剤・プロテアーゼ阻害剤は、ウイルス遺伝子にコードされているタンパク質・酵素を標的としているため、ウイルスゲノムの変異によって、薬剤耐性ウイルスの高頻度な出現が原理的に避けられない。

本研究では、原理的に薬剤耐性が生じにくい有望な抗ウイルス薬の標的として、多くのウイルスの感染・増殖に必須な宿主機構である *N*-結合型糖鎖合成に着目した。*N*-結合型糖鎖合成酵素が阻害されるとウイルス糖鎖の成熟が阻害され、宿主であるヒト細胞の受容体との親和性が低下し、ウイルスの感染・増殖活性が大幅に低下する。故に、*N*-結合型糖鎖合成酵素は、原理的に薬剤耐性回避型抗ウイルス薬の標的酵素になる

本研究では、薬剤耐性ウイルスの出現回避を目指しウイルス宿主の酵素を標的酵素とした抗ウイルス薬開発を行う。そこで、ウイ

ルスコートタンパク質の糖鎖合成阻害がウイルスの感染性を大幅に低下させる事に着目し、これら糖鎖合成を司る酵素の阻害剤は薬剤耐性回避型抗ウイルス薬となると考えた。

本研究では、培養細胞内で機能する糖鎖合成酵素特異的蛍光基質を合成し、化合物ライブラリから阻害剤スクリーニングを行い、抗ウイルス薬のリード化合物を得る事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたり、研究の効率化を図るため先行の研究の調査を行なった。標的とした *N*-結合型糖鎖合成酵素阻害剤は、ウイルスの宿主受容体への結合能を低下させるだけでなく、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、様々なウイルス(インフルエンザ、B型・C型肝炎ウイルス、HIV、SARS等)に抗ウイルス活性を示す事が数多く報告されている(Dwek, R. A., et al, Nature Reviews Drug Discovery, 1, 65, 2002)。しかし、標的とする *N*-結合型糖鎖合成酵素は、ウイルスの宿主であるヒトの酵素であり、抗ウイルス薬の標的酵素として適切ではないとの懸念が多く示されていた。

そのような状況にも関わらず、米国 NIH のエイズ治療薬データベースに、標的酵素阻害剤が治療候補薬として1つ登録され、また標的酵素阻害活性を有するミグルスタットが日本を含め 43 カ国でゴーシェ病・ニーマンピック病の治療薬として上市されるに至っていた。このような背景から、本宿主酵素を阻害する懸念の多くは取り除かれたと考えられている(Chang J., et al, Antiviral Research, 99, 251, 2013)。よって、これら標的酵素は Druggable Target として非常に有力であるが、抗ウイルス剤となる適切なリード化合物(阻害剤)が得られていない状況であると分析した。

このような研究の動向をふまえ、申請者はこれまでの *N*-糖鎖合成酵素阻害剤を抗ウイルス薬へ応用するならば、阻害剤の構造展開・膜透過性等の制御・代謝変換の制御等を行うために、既知の基質ミミックな阻害剤だけではなく、ドラックライクな構造を有する阻害剤を化合物ライブラリより探索することが効率的であることにたどり着いた。

そこで、*N*-結合型糖鎖合成の初期段階に關与し抗ウイルス薬の標的として報告例が最も多い、小胞体グルコシダーゼを標的酵素とし、ヒト培養細胞において小胞体グルコシダーゼの活性測定を可能とすれば、化合物ライブラリからの阻害剤スクリーニングを効率的に行うことができると考え、細胞内小胞体グルコシダーゼ活性を細胞レベルで可視化する蛍光基質の開発を目指し、細胞内でオルガネラ特異的に蛍光を発する蛍光基質の分子設計コンセプトの実証および阻害剤スクリーニングに適した長波長励起蛍光団を有

するマルチカラー化蛍光基質の開発を行い、これら分子設計コンセプトに基づき、培養細胞で小胞体グルコシダーゼ活性のみを特異的に検出可能な3色(赤・青・緑)の蛍光基質を用いた。

本研究では、上記蛍光基質と培養細胞を用いて阻害剤スクリーニング系の構築を行い、構築した阻害剤スクリーニング系を用いて、化合物ライブラリから小胞体グルコシダーゼ阻害剤のスクリーニングを行なった。

本方法は、これまでの細胞レベルアッセイと比較して非常に効率的よく細胞内で阻害活性を示す小胞体グルコシダーゼ阻害剤を見いだすことができる。本研究より得られた阻害剤は、薬剤耐性ウイルスを生じさせにくい抗ウイルス薬のリード化合物となり、将来的にはコートタンパク質を有する広範なウイルスに作用し、薬剤耐性ウイルスを生じにくい薬剤耐性回避型抗ウイルス薬になると期待できる。

4. 研究成果

培養細胞で作用する小胞体グルコシダーゼ阻害剤を得ることを目的とし、蛍光基質を合成し阻害剤スクリーニング系を構築することによって、化合物ライブラリから阻害剤探索を行い、抗ウイルス薬への展開を行なった。具体的な研究成果は下記の通りである。

(1) 小胞体グルコシダーゼ阻害剤の 96 穴フォーマットによるスクリーニング系を構築

上記蛍光基質およびヒト培養細胞を用いて、96 穴フォーマットによる標的酵素の活性測定系の確立を第一に行なった。その結果、本系において標的酵素の活性を測定する系を確立した。

次に確立した本系と既知阻害剤を用いて、96 穴フォーマットによる標的酵素の阻害活性測定系の確立を行なった。その結果、本系において標的酵素の阻害活性を測定する系を確立した。

最後に確立した本系とランダムに選択した化合物と既知阻害剤を用いて、96 穴フォーマットによる標的酵素の阻害スクリーニング系の確立を行なった。その結果、本系において標的酵素の阻害スクリーニングが可能であることを確認した。

(2) 化合物ライブラリを用いた阻害剤スクリーニング

上記にて確立した本系と化合物ライブラリと既知阻害剤を用いて、96 穴フォーマットによる標的酵素の阻害スクリーニングを行なった。その結果、いくつかのヒット化合物が得られた。

(3) ヒット化合物の濃度依存性・細胞毒性等を評価による最終ヒット化合物を選抜

上記により得られたいくつかのヒット化合物の濃度依存性を求め、濃度依存的阻害活

性が見られた化合物を選抜した。

次にそれら化合物の細胞毒性を測定した。抗ウイルス薬とするためには低い細胞毒性が必要となる。この選抜プロセスにおいて、いくつかの化合物がドロップアウトすることとなった。

最後に選抜された化合物の来歴等調査し、今後の構造展開性を考慮した結果、抗ウイルス薬として将来性を見込めるヒット化合物を得た。

(4) 最終選抜化合物の抗ウイルス活性評価

上記により得られた最終選抜化合物の抗ウイルス活性を国立感染症研究所・日本獣医生命科学大学に依頼した。

その結果、得られた最終選抜化合物のなかに抗ウイルス活性を示すものが存在した。

以上、前述した社会的要請に応えることが期待される、幅広いウイルスに効果を発揮する抗ウイルス薬開発へむけての着実な一歩になる結果(化合物)が得られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Hakamata Wataru, Miura Kazuki, Hirano Takako, Nishio Toshiyuki., Identification of a novel glycan processing enzyme with exo-acting β -allosidase activity in the Golgi apparatus using a new platform for the synthesis of fluorescent substrates, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (1), 2015, 73-79. 査読有
DOI: 10.1016/j.bmc.2014.11.023

[学会発表](計10件)

上間 駿、朝日 孝幸、氏家 誠、田代 充、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸、*N*-結合型糖鎖修飾に関する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の合成と生物活性評価：抗ウイルス剤への応用を目指して、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017.03.17-20、京都女子大学、(京都府、京都市)

恩田 桃子、氏家 誠、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸、天然化合物由来の小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の構造展開とその誘導体の抗ウイルス活性、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017.03.17-20、京都女子大学(京都府、京都市)
上間駿、荒井詩織、小山亮祐、朝日孝幸、袴田航、平野貴子、西尾俊幸、小

胞体グルコシダーゼ II 阻害剤としてのインドールスルホンアミド誘導体の構造展開と生物活性評価：抗ウイルス剤への応用を目指して、日本応用糖質科学会平成 28 年度大会、2016.09.13-16、福山大学（広島県、福山市）
荒井 詩織、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸、小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の開発：活性部位とは異なる部位を標的とした阻害剤、日本応用糖質科学会平成 27 年度大会、2015.09.16、奈良春日国際フォーラム（奈良県、奈良市）
荒井 詩織、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸、異なる作用部位をもつヒト小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の探索、2015 年度日本ケミカルバイオロジー学会、2015.06.09、東北大学（宮城県、仙台市）
荒井 詩織、唐津 悠、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸、抗ウイルス活性を示すインドール誘導体の細胞内における作用標的の解析、日本農芸化学会平成 26 年度大会、2015.03.26-28、岡山大学（岡山県、岡山市）
Wataru Hakamata, Kazuki Miura, Shiori Arai, Saori Tamura, Atsuko Suzuki, Takako Hirano, Toshiyuki Nishio, Multicolor Imaging of *N*-glycan Processing Enzymes in Cultured Cells, International Chemical Biology Society 3rd Annual Conference, 2014.11.16-18, San Francisco, CA, USA.
荒井 詩織、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸、仮想スクリーニングによって得られた α -グルコシダーゼ阻害剤の阻害機構解析、日本応用糖質科学会平成 26 年度大会、2014.09.23-25、朱鷺メッセ（新潟県、新潟市）
上間 駿、荒井 詩織、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸、糖鎖認識部位へ結合する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の開発、2016 年度日本ケミカルバイオロジー

学会、2014.06.15-17、京都テルサ（京都府、京都市）
荒井 詩織、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸、仮想スクリーニングによって得られた小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤：in vitro および培養細胞における阻害活性の評価、2014 年度日本ケミカルバイオロジー学会、2014.06.09-11、大阪大学（大阪府、大阪市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

袴田 航（HAKAMARA, Wataru）
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：10333337

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

荒井 詩織（ARAI, Shiori）
上間 駿（UEMA, Shun）
恩田 桃子（ONDA, Momoko）