

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策総合研究事業

抗エイズ薬を目指したウイルス糖鎖構造制御による
宿主免疫の賦活化・機能化分子の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 袴田 航

平成20（2008）年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 抗エイズ薬を目指したウイルス糖鎖構造制御による宿主免疫の
賦活化・機能化分子の開発（総括）…………… 8
袴田 航（日本大学 生物資源科学部 講師）

II. 分担研究報告

- 糖鎖プロセッシング酵素の立体構造を基にした小分子化合物のスク
リーニングおよびドッキングに関する研究…………… 9
栗原 正明（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 室長）

- 放線菌の特異な培養法を用いたケミカルライブラリーの構築と
ウイルス糖鎖構造制御化合物のスクリーニングに関する研究…………… 13
西尾 俊幸（日本大学 生物資源科学部 准教授）

- 資料 1…………… 17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 48

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 51

1. Masaaki Kurihara, Wataru Hakamata, Yukiko Sato, Haruhiro Okuda, Yousuke Demizu, Kosuke Anan, Mitsunobu Doi, Masataka Tanaka, Hhiroshi Suemune. Computational study on helical structures of oligopeptides containing chiral cyclic α -amino acids. *Peptides 2006*, 546-547 (2007).
2. Kadokura, K.; Rokutani, A.; Yamamoto, M.; Ikegami, T.; Sugita, H.; Itoi, S.; Hakamata, W.; Oku, T.; Nishio, T. Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2), 357-365 (2007).

3. Kadokura, Kazunari; Sakamoto, Yusuke; Saito, Kaori; Ikegami, Takanori; Hirano, Takako; Hakamata, Wataru; Oku, Tadatake; Nishio, Toshiyuki. Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Letters*, 29(8), 1209-1215, (2007).
4. Kadokura, Kazunari; Sakamoto, Yusuke; Saito, Kaori; Ikegami, Takanori; Hirano, Takako; Hakamata, Wataru; Oku, Tadatake; Nishio, Toshiyuki. Production and secretion of a recombinant *Vibrio parahaemolyticus* chitinase by *Escherichia coli* and its purification from the culture medium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(11), 2848-2851 (2007).
5. Satoh, Tadashi; Cowieson, Nathan P.; Hakamata, Wataru; Ideo, Hiroko; Fukushima, Keiko; Kurihara, Masaaki; Kato, Ryuichi; Yamashita, Katsuko; Wakatsuki, Soichi. Structural Basis for Recognition of High Mannose Type Glycoproteins by Mammalian Transport Lectin VIP36. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (38), 28246-28255 (2007).
6. Chida, Hirotaka; Nakazawa, Aiko; Akazaki, Hideharu; Hirano, Takako; Suruga, Kohei; Ogawa, Masahiro; Satoh, Tadashi; Kadokura, Kazunari; Yamada, Seiji; Hakamata, Wataru; Isobe, Katsunori; Ito, Tei-ichiro; Ishii, Ryuichi; Nishio, Toshiyuki; Sonoike, Kintake; Oku, Tadatake. Expression of the algal cytochrome c6 gene in *Arabidopsis* enhances photosynthesis and growth. *Plant and Cell Physiology*, 48 (7), 948-957 (2007).
7. Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka, A.; Recognition of Longer Duplex DNA by Cooperative Strand Invasion, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 51, 269-270 (2007).
8. Masakazu Tanaka, Yosuke Demizu, Masanobu Nagano, Mariko Hama, Yukio Yoshida, Masaaki Kurihara, and Hiroshi Suemune, Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Cyclic trans-1,2-Diols Bearing a Diester Moiety: Synthetic Application to Chiral Seven-Membered-Ring α,α -Disubstituted α -Amino Acid, *J. Org. Chem.*, 72, 7750 -7756 (2007).
9. Y. Demizu, M. Tanaka, M. Nagano, M. Kurihara, M. Doi, T. Maruyama, H. Suemune, Controlling 3^{10} -Helix and α -Helix of Short Peptides in the Solid State, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 840-842 (2007).

10. M. Tanaka, M. Nagano, Y. Demizu, K. Anan, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune; Side-chain chiral centers of amino acids and helical-screw handedness of their peptides; *Peptides 2006*, 268-269(2007).
11. Nagano, M., Tanaka, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Doi, M., Suemune, H, Secondary Structure of Heteropeptides Using Chiral Cyclic α,α -Disubstituted Amino Acids; Controlling the Helical; *Peptides 2006*, 476-477(2007).

抗エイズ薬を目指したウイルス糖鎖構造制御による
宿主免疫の賦活化・機能化分子の開発

主任研究者 袴田航 日本大学・生物資源科学部・講師

研究要旨

エイズは「多剤併用療法」の進歩により、死亡率が著しく減少したことから、不治の病からコントロール可能な病へ、特別な病から、誰もが感染のリスクを有する一般的な病へと変化しつつある。このようなエイズの慢性感染症化は、「多剤併用療法」の広がりを含み、それら薬剤に対する耐性株の出現速度を増大させる。また、多剤併用療法によって HIV の増殖を抑制すると、HIV 特異的免疫反応が低下することが知られている。そこで、これまでの「多剤併用療法」の治療標的だけでなく、異なる標的を有する薬剤および宿主免疫を維持する薬剤の登場が強く望まれている。本研究は、ウイルス糖鎖構造制御による宿主免疫の賦活化・機能化作用増大による抗エイズ薬を目指しており、「多剤併用療法」の維持・発展させることを目的とする。

本年度迄に報告する主な研究成果、以下の①~⑤の通りである。

- ① 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ーを用い、エイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物の *in silico* 論理的・網羅的探索を行った。
- ② 約100万化合物の配座解析情報に基づいて、糖鎖構築酵素の活性部位をファーマコフォアとしてファーマコフォア検索を行った。ヒット化合物ライブラリーを基にドッキングスタディーによるバーチャルスクリーニングにより、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリーを得た。これらの構造はこれまでに報告されている阻害剤とは異なる、非常にユニークな骨格を有していた。
- ③ 得られた上記ライブラリーに対して、酵素阻害活性を行った結果、非常に強力な阻害活性（micro M オーダー）を示す化合物を2種類見いだした。
- ④ 新規な糖鎖構築酵素阻害活性測定系の構築を試み、有力な基質候補化合物を見いだした。
- ⑤ 特異な培養条件で培養した放線菌ライブラリーを対象として、HTS を用いた阻害剤の網羅的探索を行った結果、強力な阻害活性を有する代謝物と特定の特異な培養条件においてのみ阻害剤を生産する放線菌を見いだした。

分担研究者

栗原 正明

国立医薬品食品衛生研究所

有機化学部

室長

西尾 俊幸

日本大学

生物資源科学部

准教授

A. 研究目的

HIV-1感染症に対する抗ウイルス薬剤の開発と治療法は急速に進歩し、ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤 (NRTI) 6種類、非ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) 3種類、プロテアーゼ阻害剤 (PI) 5剤の合計 14種類の薬剤が開発、実用化された。また、NRTI 2剤と PI 1剤あるいは NRTI 2剤と NNRTI 1剤を組み合わせた多剤併用療法の開発により、感染者体内における HIV-1 の増殖をほぼ完全に抑え込むことに成功し、病気の進行を抑制することが可能となり、エイズは慢性感染症の性格を帯びてきている。しかし、抗 HIV薬の長期投与に伴う副作用や薬剤耐性ウイルスの出現や多剤併用療法によって HIV 特異的免疫反応が低下することが問題となっている。更に、HIV 感染者・エイズ患者報告数の増加が続いていることから、抗ウイルス薬剤研究の推進が必要である。

以上の事から、抗 HIV 薬の長期投与に伴う薬剤耐性ウイルスおよび HIV 特異的免疫反応が低下への対策として、ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤以外の抗ウイルス薬剤の開発が強く望まれている。本研究は、宿主ヒト細胞のエイズ中和抗体が、ウイルス表面の多数の糖鎖により機能しない事に着目し、糖鎖構造制御物質を新たに開発する事により、エイズ中和抗体を機能させるこれまでの抗 HIV 薬とは異なる治療標的を有する「宿主免疫の賦活化・機能化を目指す創薬研究」であり、急速に拡大している薬剤耐性エイズウイルスの効果的な対策であり、行政施策の推進に大きく貢献でき、国民の健康の安心・安全の実現のための重要な研究でありと考えられる。

B. 研究方法

HIV エンベローブ糖タンパク質 gp120 の N結合型糖鎖の構築は、小胞体で開始される。gp120 の N結合型糖鎖は、始めに小胞体 N結合型糖鎖プロセシング酵素により糖鎖のプロセシングが行われ、正常な糖タンパク質はゴルジ体に輸送される。よって、N結合型糖鎖プロセシング酵素阻害またはウイルス糖タンパク質のオルガネラ間の輸送を阻害する事が出来れば、未成熟な糖鎖構造を有する gp120 が構築でき、HIV に目的とする糖鎖を提示させる事が可能となると考えた。更に、ホスト細胞のタンパク質の品質管理機構によって、未成熟糖鎖を有するウイルス粒子が感染を持たぬまま、細胞外へ排除される事も期待できる。その結果、制御された糖鎖を有する gp120 に中和抗体が結合し、抗 HIV 活性を発現する事が期待され、更に感染性の失われたウイルスが生産される可能性も併せて期待できる。

そこで、N結合型糖鎖の構造を制御する化合物、N結合型糖鎖プロセシング酵素阻害剤を得るために「*in silico*による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」および「微生物ライブラリーからの阻害剤のハイスループットスクリーニング (HTS)」の2つの異なる戦略を立案した。

「*in silico*による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」は、近年続々と明らかにされ始めている酵素の立体構造に基づき *in silico* で論理的かつ高効率に阻害剤分子の探索および設計を行う。「微生物ライブラリーからの阻害剤の HTS」は現在その活性測定系が十分ではない。N結合型糖鎖プロセシング酵素の活性測定には、基質調製にウイルス培養、活性検出に放射性同位体が汎用され HTS には不向きである。そこで、新たな HTS 法の開発を行う。HTS を用いた阻害剤の網羅的探索は、特異な培養条件で培養した放線菌ライブラリーからのスクリーニングを行う。

このように、*in silico* 技術および HTS 法を両輪とし、バーチャルライブラリーおよび微生物ライブラリーから阻害剤の探索・分子設計・阻害剤分子の合成・阻害活性の評価を有機的に連携して研究を実施することにより、高活性化化合物を迅速かつ効率的に得る事ができると考えている。

(倫理面への配慮)

本研究は、エイズウイルスの宿主ヒト細胞の糖鎖構築酵素の構造および分子認識情報を基に阻害剤を設計・合成および探索を行う研究であり、標的酵素の構造情報・分子認識情報をのみ用いる為、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解、実験動物に対する動物愛護上の配慮等を必要とする研究を含まない。

C. 研究結果

「*in silico*による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」：市販化合物ライブラリーを用いたバーチャルスクリーニングにより、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリーを得、ヒット化合物ライブラリーの多変量解析に基づく定量的構造活性相関を行う事により、化合物ライブラリーの品質・多様性について検討を行った。更に、Fragment-based drug 設計によりライブラリーの拡充を行い、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリーを得た。これらの構造はこれまでに報告されている阻害剤とは異なる、非常にユニークな骨格を有していた。

「微生物ライブラリーからの阻害剤の HTS」：HTS を用いた阻害剤の網羅的探索のために、新たな HTS 法の開発を行い、これまでにない基質を用いる事により、より構造情報が得やすい酵素活性測定法を開発した。更に、特異な培養条件で培養した放線菌ライブラリーを対象として、HTS を用いた阻害剤の網羅的探索を行った結果、強力な阻害活

性を有する代謝物と特定の特異な培養条件においてのみ阻害剤を生産する放線菌を見いだした。

D. 考察

これまでの研究の結果、市販化合物をライブラリーとした *in silico* 阻害剤スクリーニング・阻害剤スクリーニングに適した新規活性測定系の開発、特異な培養系を用いた放線菌ライブラリーからの阻害剤スクリーニングによって、抗エイズ薬の候補ライブラリーおよび化合物を得た。今後は、細胞レベルでの抗エイズウイルス活性を測定する事により、細胞レベルで効果を有する化合物を得る様、研究を行う。(本活性測定については、国立感染症研究所 エイズ研究センター 武部 豊 博士のご支援を頂く)

このように、*in silico* 技術を用いる事により、IT 技術の進歩を抗エイズ薬開発に活用する事ができる、非常に優れた有意義な方法論を確立したと考えられる。

医薬品・医薬品候補化合物であり、かつ市販されている化合物のライブラリーのすべてをスクリーニングした訳ではなく、まだ阻害剤の原石が眠っている可能性が十分ある。更に、時間の経過とともに新しい医薬品・医薬品候補化合物は次々と発売されている。この様な現状から、IT 技術の進歩を取り入れ、スクリーニング速度の向上を達成していきたい。

また、現在の標準的な HIV 感染症治療法は、抗 HIV 薬を 3～4 剤使用する多剤併用療法であり、HIV 感染者の生命予後を著しく改善した。HIV 感染症治療法について解決すべき問題：多剤併用療法の長期化および HIV 感染者の増加により、これら薬剤に対する耐性株の出現速度が速まる。よって、これまでの薬剤とは異なる治療標的を有する薬剤開発が急務となっている。

このようにエイズウイルスの薬剤耐性獲得のスピードは非常に速い。よって、新規な

作用機序に基づく新規な抗エイズ薬の開発もスピードが求められている。エイズウイルスの変異速度に対抗するにはコンピュータの情報処理能力を積極的に活用する事が重要である。本研究の研究成果は、IT 技術の進歩を生化学的研究に取り入れるインターフェイスとして先駆的であり学術的意義は高いと考えられる。また、その結果得られる抗エイズ薬は、国際的・社会的必要性が非常に高い。

今後は、糖鎖構築酵素の活性部位をファーマコフォアとしてファーマコフォア検索、ドッキングスタディーによるバーチャルスクリーニングにより、濃縮されたエイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物の化合物ライブラリーを得ることができた。そこで、得られた糖鎖構造制御候補化合物ライブラリーの多変量解析に基づく定量的構造相関を検討する事により、得られた化合物ライブラリーの品質・多様性についてより精緻な検討を行う。更に、近年注目を集めている Fragment-based drug 設計によりライブラリーの拡充を図る事が出来ると考えている。本法を用いる事により、ライブラリーの欠損や多様性等を補うことができ、より論理的・網羅的にスクリーニングを行う事が可能となるであろう。

E. 結論

本研究は、IT 技術を積極的に取り入れる事および特異な微生物培養系を用いる事によって、*in silico* および天然のライブラリーからエイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物を効率的に得る目的をほぼ終了した。得られた化合物の一部は、これまでの阻害剤とは異なる構造を有しており、かつ、活性部以内の水素結合・疎水結合等の重要な相互作用をふんだんに利用した興味深い構造であった。本方法論、が非常に強力な阻害剤のスクリーニング手法である事を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 業績

1. 論文発表

主任研究者：袴田 航

- 1) W. Hakamata, Y. Sato, H. Okuda, S. Honzawa, N. Saito, S. Kishimoto, A. Yamamoto, T. Sugiura, A. Kittaka, M. Kurihara, (2S, 2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 120-123 (2008).
- 2) T. Satoh, N. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, R. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki, Structural basis for recognition of high-mannose type glycoproteins by mammalian transport lectin VIP36., *J. Biol. Chem.*, 282, 28246-28255 (2007).
- 3) H. Chida, A. Nakazawa, H. Akazaki, T. Hirano, K. Suruga, M. Ogawa, T. Satoh, K. Kadokura, S. Yamada, W. Hakamata, K. Isobe, T. Ito, R. Ishii, T. Nishio, K. Kintake, T. Oku, Expression of the algal cytochrome c6 gene in Arabidopsis enhances photosynthesis and growth. *Plant and Cell Physiology*, 48 (7), 948-957 (2007)
- 4) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T. Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of Escherichia coli cells. *Biotechnology Letters*, 29 (8), 1209-1215 (2007).

- 5) K. Kadokura, A. Rokutani, A. Yamamoto, T. Ikegami, T. Sugita, H. Itoi, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75 (2), 357-365 (2007).
- 6) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, M. nagano, M. Hama, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational study on helical structures of oligopeptides containing chiral cyclic α,α -Disubstituted α -amino acids. *Peptide Science 2006*, 43, 88 (2007).
- 7) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, Y. Demizu, M. Nagano, N. Kawabe, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational Study on Conformation of Oligopeptides Containing Chiral Cyclic α,α -Disubstituted α -Amino Acids, *Peptides 2006*, 546-547 (2007).
- 8) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T., Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Production and Secretion of a Recombinant *Vibrio parahaemolyticus* Chitinase by *Escherichia coli*, and Its Purification from the Culture Medium, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2848-2851 (2007).
- (2S,2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 120-123 (2008).
- 2) T. Sugiyama, Y. Imamura, M. Kurihara, and A. Kittaka, Recognition of longer duplex DNA by cooperative strand invasion. *Nucleic Acids Symp Ser*, 51, 269-270 (2007).
- 3) T. Satoh, N. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, R. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki, Structural basis for recognition of high-mannose type glycoproteins by mammalian transport lectin VIP36., *J. Biol. Chem.*, 282, 28246-28255 (2007).
- 4) M. Tanaka, Y. Demizu, M. Nagano, M. Hama, Y. Yoshida, M. Kurihara, H. Suemune, Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Cyclic trans-1,2-Diols Bearing a Diester Moiety: Synthetic Application to Chiral Seven-Membered Ring α,α -Disubstituted α -Amino Acid. *J. Org. Chem.*, 72, 7750 -7756 (2007).
- 5) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, M. nagano, M. Hama, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational study on helical structures of oligopeptides containing chiral cyclic α,α -Disubstituted α -amino acids. *Peptide Science 2006*, 43, 88 (2007).
- 6) Y. Demizu, M. Tanaka, M. Nagano, M. Kurihara, M. Doi, T. Maruyama, H. Suemune, Controlling 310-Helix and α -Helix of Short Peptides in the Solid State, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 840-842 (2007).

分担研究者：栗原 正明

- 1) W. Hakamata, Y. Sato, H. Okuda, S. Honzawa, N. Saito, S. Kishimoto, A. Yamamoto, T. Sugiura, A. Kittaka, M. Kurihara,

- 7) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, Y. Demizu, M. Nagano, N. Kawabe, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational Study on Conformation of Oligopeptides Containing Chiral Cyclic α,α -Disubstituted α -Amino Acids, *Peptides* 2006, 546-547 (2007).
- 8) M. Tanaka, M. Nagano, Y. Demizu, K. Anan, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune, Side-chain chiral centers of amino acids and helical-screw handedness of their peptides, *Peptides* 2006, 268-269 (2007).
- 9) Nagano, M., Tanaka, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Doi, M., Suemune, H., Secondary Structure of Heteropeptides Using Chiral Cyclic α,α -Disubstituted Amino Acids. *Peptides* 2006, 476-477 (2007).
- Ikegami, T. Sugita, H. Itoi, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75 (2), 357-365 (2007).
- 4) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T., Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio Production and Secretion of a Recombinant *Vibrio parahaemolyticus* Chitinase by *Escherichia coli*, and Its Purification from the Culture Medium, , *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2848-2851 (2007).

分担研究者：西尾 俊幸

- 1) H. Chida, A. Nakazawa, H. Akazaki, T. Hirano, K. Suruga, M. Ogawa, T. Satoh, K. Kadokura, S. Yamada, W. Hakamata, K. Isobe, T. Ito, R. Ishii, T. Nishio, K. Kintake, T. Oku, Expression of the algal cytochrome *c6* gene in *Arabidopsis* enhances photosynthesis and growth. *Plant and Cell Physiology*, 48 (7), 948-957 (2007).
- 2) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T. Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Letters*, 29 (8), 1209-1215 (2007).
- 3) K. Kadokura, A. Rokutani, A. Yamamoto, T.
2. 学会発表
- 1) 題名：GH31 α -グルコシダーゼ阻害剤の *in silico* バーチャルスクリーニング、学会名：2007年日本農芸化学会、場所、年月：東京（東農大）、2007年3月25-28日、発表者：袴田 航、奥田 晴宏、栗原 正明（国立医薬品食品衛生研・有機化学）
- 2) 題名：小胞体マンノシダーゼのファーマコフォア作製とそれに基づく阻害剤のバーチャルスクリーニング、学会名：2007年日本薬学会、場所、年月：富山（富山市）、2007年3月28-30日、発表者：袴田 航、奥田 晴宏、栗原 正明（国立衛研）
- 3) 題名：固相合成法による¹⁸Fの導入法の開発、学会名：2007年日本薬学会、場所、年月：富山（富山市）、2007年3月

- 28-30日、発表者：寺山直樹、袴田 航、奥田 晴宏、栗原 正明 (国立衛研、工学院大)
- 4) 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) 題名： 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ーの構築、発表者：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
 - 5) 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) 題名：グリコン特異性の拡張を目指した計算機支援による α -グルコシダーゼの論理的改変発表者：石井麻亜理、田中明奈、袴田 航、西尾俊幸、奥忠武
 - 6) 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) 題名：*Vibrio parahaemolyticus* のキチンオリゴ糖デアセチラーゼの発現・分泌解析発表者：池上孝紀、西尾俊幸、門倉一成、上田賢志、高野英晃、河瀬顕、袴田航、奥忠武
 - 7) 第15回糖質関連酵素化学シンポジウム、2007年8月、日本大学 (神奈川県藤沢市) 題名：キチンから部分アセチル2糖の生産に関わる酵素系の解明とオリゴ糖生産への利用発表者：門倉一成、西尾俊幸、六谷明子、山本真広、坂本裕輔、齋藤香織、池上孝紀、平野貴子、袴田 航、奥 忠武
 - 8) 第26回メディシナルケミストリーシンポジウム、ノンセコ型VDRリガンドの設計と合成、栗原正明、佐藤由紀子、金子文也、袴田 航、本澤 忍、山下純、橘高敦史、加藤茂明、奥田晴宏、
 - 9) 第4回武田科学振興財団薬科学シンポジウム The 4th Takeda Science Foundation Symposium on Pharmaceutical Sciences The heterodisaccharide, 4-G(N-acetyl-p-o-glucosaminyl)-o-glucosamine, is a specific attractant for the chemotaxis of *Vibrio parahaemolyticus* T. Hirano, K. Kadokura, T. Ikegami, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio
 - 10) 平成20年度日本農芸化学会、2008年3月、(名古屋)、題名：放線菌共培養ライブラリーからの α -グルコシダーゼ阻害剤のスクリーニング 発表者：牛島世里子、寺島 彩、袴田 航、西尾 俊幸、奥 忠武
 - 11) 平成20年度日本農芸化学会、2008年3月、(名古屋)、題名：グリコン特異性の多様化を目指した計算機支援による α -グルコシダーゼの論理的改変 石井麻亜理、田中 明奈、袴田 航、西尾 俊幸、奥 忠武
 - 12) 平成20年度日本農芸化学会、2008年3月、(名古屋)、題名：シロイヌナズナ由来シトクロム c_{6A} の酸化還元電位低下の要因 星川 健、中出 晴美、千田浩隆、袴田 航、西尾 俊幸、奥 忠武
 - 13) 平成20年度日本農芸化学会、2008年3月、(名古屋)、題名：低酸化還元電位を有する褐藻 *Hizikia fusiformis* 由来 cytochrome c_6 の結晶構造解析 赤崎秀治、河合 文啓、松本 雄一郎、松岡 耕太、袴田 航、西尾 俊幸、朴 三用、奥忠武

14) 平成20年度日本農芸化学会、2008年3月、(名古屋)、題名：*Vibrio*

*prahaemolyticus*の化学遊走性に関する分子生態学と酵素化学(I) 平野 貴子、西尾 俊幸、門倉 一成、重田 侑子、袴田 航、奥 忠武

15) 平成20年度日本農芸化学会、2008年3月、(名古屋)、題名：新規キチンオリゴ糖デアセチラーゼの探索と大腸菌での発現系の構築 坂本 裕輔、西尾 俊

幸、門倉 一成、久野 恵理子、袴田 航、奥 忠武

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在、日本大学にて申請中

糖鎖プロセッシング酵素の立体構造を基にした小分子化合物の
スクリーニングおよびドッキングに関する研究

分担研究者 栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・室長

研究要旨

現在、エイズが慢性感染症になりつつあるとはいえ、その制圧は緊急かつ重要な問題となっている。薬剤耐性を有するエイズの出現など依然としてエイズは人類の脅威となっている事に変わりはない。しかし、エイズを始めとする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エイズを含む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。

エイズなどのウイルスの感染・増殖に必須である *N*-結合型糖鎖プロセッシング酵素を分子標的とし、糖鎖プロセッシング酵素阻害剤の論理的探索 (*in silico* スクリーニング) およびドッキングモデルの構築を行う事を行い、抗ウイルス薬の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を本研究の目的とする。本年度は、糖鎖プロセッシング酵素の3次元情報を詳細に解析する事により、プロセッシング酵素の活性部位を同定する事ができ、さらにファーマコフォアの設計を行った。それにより、設計したファーマコフォアを基に *in silico* でのバーチャルスクリーニングを行った。

A. 研究目的

HIV-1 感染症に対する抗ウイルス薬剤の開発と治療法は急速に進歩し、ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤 (NRTI) 6 種類、非ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) 3 種類、プロテアーゼ阻害剤 (PI) 5 剤の合計 14 種類の薬剤が開発、実用化された。また、NRTI 2 剤と PI 1 剤あるいは NRTI 2 剤と NNRTI 1 剤を組み合わせた多剤併用療法の開発により、感染者体内における HIV-1 の増殖をほぼ完全に抑え込むことに成功し、

病気の進行を抑制することが可能となり、エイズは慢性感染症の性格を帯びてきている。しかし、抗 HIV 薬の長期投与に伴う副作用や薬剤耐性ウイルスの出現や多剤併用療法によって HIV 特異的免疫反応が低下することが問題となっている。更に、HIV 感染者・エイズ患者報告数の増加が続いていることから、抗ウイルス薬剤研究の推進が必要である。

以上の事から、抗 HIV 薬の長期投与に伴う薬剤耐性ウイルスおよび HIV 特異的免

疫反応が低下への対策として、ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤以外の抗ウイルス薬剤の開発が強く望まれている。本研究は、宿主ヒト細胞のエイズ中和抗体が、ウイルス表面の多数の糖鎖により機能しない事に着目し、糖鎖構造制御物質を新たに開発する事により、エイズ中和抗体を機能させるこれまでの抗 HIV 薬とは異なる治療標的を有する「宿主免疫の賦活化・機能化を目指す創薬研究」であり、急速に拡大している薬剤耐性エイズウイルスの効果的な対策であり、行政施策の推進に大きく貢献でき、国民の健康の安心・安全の実現のための重要な研究でありと考えられる。

B. 研究方法

HIV エンベローブ糖タンパク質 gp120 の N-結合型糖鎖の構築は、小胞体で開始される。gp120 の N-結合型糖鎖は、始めに小胞体 N-結合型糖鎖プロセッシング酵素（グルコシダーゼ I・II およびマンノシダーゼ I・II）により糖鎖のプロセッシングが行われ、正常な糖タンパク質はゴルジ体に輸送される。よって、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素を害する事が出来れば、目的とする糖鎖構造を有する gp120 が構築でき、HIV に目的とする糖鎖を提示させる事が可能となる。その結果、制御された糖鎖を有する gp120 に中和抗体が結合し、抗 HIV 活性を発現する事が期待される。また、N-結合型糖鎖プロセッ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ッシング酵素は「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-結合型糖鎖プロセッシング酵素を分子標的とした薬剤である、プ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ッ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、N-結合型糖鎖の構造を制御する化合物、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素阻害剤、を得るために、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 100 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ための、酵素の解析とデータベースを整備し、バーチャルスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、エイズウイルスの宿主ヒト細胞の糖鎖構築酵素の構造および分子認識情報を基に阻害剤を設計・合成および探索を行う研究であり、標的酵素の構造情報・分子認識情報をのみ用いる為、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解、実験動物に対する動物愛護上の配慮等を必要とする研究を含んでいない。

C. 研究結果

昨年度に引き続き、2005 年に立体構造が解析されたマンノシダーゼ (PDB: 1X9D) の詳細な立体構造解析を行った。本研究における *in silico* 研究分野については、

Chemical Computing Group 社製ソフトウェア MOE (Molecular Operating Environment) を主たる計算化学環境として使用した。

さらに、酵素の立体構造に基づいた *in silico* 高効率的薬剤設計研究を効率的に進める為の方法として、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用した。そのような戦略の基に、エイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物の *in silico* 論理的・網羅的探索を行うために、約 100 万化合物の配座解析情報の準備を行った。糖鎖構築酵素の活性部位をファーマコフォアとしてファーマコフォア検索を行った。ヒット化合物ライブラリを基にドッキングスタディーによるバーチャルスクリーニングにより、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリを得た。

D. 考察

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る事により、研究全体として、効率的なスクリーニングが可能にたつたと考えている。

また、糖鎖構築酵素の活性部位をファーマコフォアとしてファーマコフォア検索を行った。ヒット化合物ライブラリを基にドッキングスタディーによるバーチャルスクリーニングにより、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリが得られた事から、ファーマコフォアの設定に大きな問題がなかった事を示す事ができたと考えている。

このように、*in silico* 技術を用いる事により、以前では考えられなかったスピードでライブラリから候補化合物を濃縮する事が可能となった。今後、コンピュータの情報処理速度

の増大に伴い、更に濃縮速度が増大する。IT 技術の進歩を抗エイズ薬開発に活用する事ができる、非常に優れた有意義な方法論であると考えられる。この様な現状から、IT 技術の進歩を取り入れ、研究の向上を達成していきたい。

E. 結論

本研究は長足の進歩を遂げるコンピュータの CPU パワーから受ける恩恵を、積極的に取り入れる事によって、エイズウイルス糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物を高効率的に得る糖鎖プロセッシング酵素の立体構造の解析とライブラリの構築をほぼ終了した。得られたファーマコフォアとデータベースからの *in silico* スクリーニングにより (総括研究報告を参照)、これまでの阻害剤とは異なる構造を有した阻害剤が得られている事から、本方法が非常に強力な阻害剤のスクリーニング手法である事を明らかにすることができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 業績

- 1) W. Hakamata, Y. Sato, H. Okuda, S. Honzawa, N. Saito, S. Kishimoto, A. Yamamoto, T. Sugiura, A. Kittaka, M. Kurihara, (2S,2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 120-123 (2008).
- 2) T. Sugiyama, Y. Imamura, M. Kurihara, and A. Kittaka, Recognition of longer duplex DNA by cooperative strand invasion. *Nucleic Acids Symp Ser*, 51, 269-270 (2007).
- 3) T. Satoh, N. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, R. Kato, K.

- Yamashita, S. Wakatsuki, Structural basis for recognition of high-mannose type glycoproteins by mammalian transport lectin VIP36., *J. Biol. Chem.*, 282, 28246-28255 (2007).
- 4) M. Tanaka, Y. Demizu, M. Nagano, M. Hama, Y. Yoshida, M. Kurihara, H. Suemune, Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Cyclic trans-1,2-Diols Bearing a Diester Moiety: Synthetic Application to Chiral Seven-Membered Ring α,α -Disubstituted α -Amino Acid. *J. Org. Chem.*, 72, 7750 -7756 (2007).
- 5) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, M. nagano, M. Hama, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational study on helical structures of oligopeptides containing chiral cyclic α,α -Disubstituted α -amino acids. *Peptide Science 2006*, 43, 88 (2007).
- 6) Y. Demizu, M. Tanaka, M. Nagano, M. Kurihara, M. Doi, T. Maruyama, H. Suemune, Controlling 3_{10} -Helix and α -Helix of Short Peptides in the Solid State, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 840-842 (2007).
- 7) M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, Y. Demizu, M. Nagano, N. Kawabe, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, Computational Study on Conformation of Oligopeptides Containing Chiral Cyclic α,α -Disubstituted α -Amino Acids, *Peptides 2006*, 546-547 (2007).
- 8) M. Tanaka, M. Nagano, Y. Demizu, K. Anan, M. Kurihara, M. Doi, H. Suemune, Side-chain chiral centers of amino acids and helical-screw handedness of their peptides, *Peptides 2006*, 268-269 (2007).
- 9) Nagano, M., Tanaka, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Doi, M., Suemune, H., Secondary Structure of Heteropeptides Using Chiral Cyclic α,α -Disubstituted Amino Acids. *Peptides 2006*, 476-477 (2007).

H. 知的財産権の出願・登録状況
現在、日本大学と申請中。

放線菌の特異な培養法を用いたケミカルライブラリーの構築と
ウイルス糖鎖構造制御化合物のスクリーニングに関する研究

分担研究者 西尾 俊幸 日本大学・生物資源科学部・准教授

研究要旨

現在、エイズが慢性感染症になりつつあるとはいえ、その制圧は緊急かつ重要な問題となっている。薬剤耐性を有するエイズの出現など依然としてエイズは人類の脅威となっている事に変わりはない。しかし、エイズを始めとする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エイズを含む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。

エイズなどのウイルスの感染・増殖に必須である N-結合型糖鎖プロセッシング酵素を分子標的とし、糖鎖プロセッシング酵素阻害剤の論理的探索 (*in silico* スクリーニング) およびドッキングモデルの構築を行う事を行い、抗ウイルス薬の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を本研究の目的とする。そこで、現在販売されている天然物由来の医薬品の約 2/3 が放線菌由来である事から、放線菌培養上清からのグルコシダーゼ阻害剤のスクリーニングを行った。また、放線菌は純粋培養だけでなく、2 菌株を共に培養する、共培養法を用いた。微生物は共培養する事により、お互いの放出する化合物が相互作用を及ぼし、生産する化合物が変化する事が知られている。このようにして得られた培養上清の酵素阻害活性（放線菌 35 種類の純粋培養 35 サンプル、共培養 595 サンプル、合計 630 サンプル）の測定を行い阻害剤生産菌を見いだした。

A. 研究目的

HIV-1 感染症に対する抗ウイルス薬剤の開発と治療法は急速に進歩し、ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤 (NRTI) 6 種類、非ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) 3 種類、プロテアーゼ阻害剤 (PI) 5 剤の合計 14 種類の薬剤が開発、実用化された。また、NRTI 2 剤と PI 1 剤あるいは NRTI 2 剤

と NNRTI 1 剤を組み合わせた多剤併用療法の開発により、感染者体内における HIV-1 の増殖をほぼ完全に抑え込むことに成功し、病気の進行を抑制することが可能となり、エイズは慢性感染症の性格を帯びてきている。しかし、抗 HIV 薬の長期投与に伴う副作用や薬剤耐性ウイルスの出現や多剤併用療法によって HIV 特異的免疫反応が低下

することが問題となっている。更に、HIV 感染者・エイズ患者報告数の増加が続いていることから、抗ウイルス薬剤研究の推進が必要である。

以上の事から、抗 HIV 薬の長期投与に伴う薬剤耐性ウイルスおよび HIV 特異的免疫反応が低下への対策として、ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオチド型逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤以外の抗ウイルス薬剤の開発が強く望まれている。本研究は、宿主ヒト細胞のエイズ中和抗体が、ウイルス表面の多数の糖鎖により機能しない事に着目し、糖鎖構造制御物質を新たに開発する事により、エイズ中和抗体を機能させるこれまでの抗 HIV 薬とは異なる治療標的を有する「宿主免疫の賦活化・機能化を目指す創薬研究」であり、急速に拡大している薬剤耐性エイズウイルスの効果的な対策であり、行政施策の推進に大きく貢献でき、国民の健康の安心・安全の実現のための重要な研究でありと考えられる。

B. 研究方法

HIV エンベローブ糖タンパク質 gp120 の N-結合型糖鎖の構築は、小胞体で開始される。gp120 の N-結合型糖鎖は、始めに小胞体 N-結合型糖鎖プロセッシング酵素（グルコシダーゼ I・II およびマンノシダーゼ I・II）により糖鎖のプロセッシングが行われ、正常な糖タンパク質はゴルジ体に輸送される。よって、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素を害する事が出来れば、目的とする糖鎖構造を有する gp120 が構築でき、HIV に目的とする糖鎖を提示させる事が可能となる。その結果、制御された糖鎖を有する gp120 に中和抗体が結合し、抗 HIV 活性を発現する事が期待される。また、N-結合型糖鎖プロセッ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ッシング酵素は「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-結合型糖鎖プロセッシング酵素を分子標的とした薬剤である、プ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ッ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、グルコシダーゼ阻害剤生産培地として、Krainsky's asparagine 液体培地を選択した。その理由は、放線菌の二次代謝産物生産性が栄養豊富な培地で継代することで失われやすい傾向があるためである(バイオサイエンスと放線菌, 出版社: 医学出版センター第 VI 章 放線菌の選択分離法と保存及び培養, ISBN: 4900575143)。よって、最少培地かそれに近い培地での生育がグルコシダーゼ阻害剤の生産に適すると考え、最少培地である Krainsky's asparagine 培地で培養することとした。

下記手順で Krainsky's asparagine 液体培地を作成する理由は、Glucose と L-Asparagine を混合してオートクレーブ処理を行うと培地が褐変するため、L-Asparagine はオートクレーブ後、混合することに酵素阻害活性測定に有利な無色透明な Krainsky's asparagine 培地が得られるためである。

(Krainsky's asparagine 液体培地作成手順)
500 mL 容メジウムビンに Glucose、K₂HPO₄

を量り取り（上記量）500 mLの純水を加え溶解した。また、15 mL容コニカルチューブにL-Asparagineを量り取り、3 mLの純水を加え溶解した。それぞれを121°Cで20分間オートクレーブ後、2つの溶液をクリーンベンチ内で混合することにより作製した。

（倫理面への配慮）

本研究は、エイズウイルスの宿主ヒト細胞の糖鎖構築酵素の構造および分子認識情報を基に阻害剤を設計・合成および探索を行う研究であり、標的酵素の構造情報・分子認識情報をのみ用いる為、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解、実験動物に対する動物愛護上の配慮等を必要とする研究を含んでいない。

C. 研究結果

本年度は、研究初年度であるため、研究に必要となる放線菌400菌をグリセロールストックから立ち上げ、寒天平板へと植菌し菌株を得た（添付資料1を参照）。また、菌体培養上清（化合物ライブラリ）は、以下の方法で得る事ができた。

前培養：クリーンベンチ内で、3 mLのBG液体培地を加えた15 mL容コニカルチューブに菌株の保存用寒天培地から上記の菌を白金耳でかき取り植菌し、2日間振とう培養（高崎科学器械株式会社：K-504, 100 rpm, 30°C）を行った。

本培養：（純粋培養：1菌株のみの培養）クリーンベンチ内で、Krainsky's asparagine 液体培地3 mLを加えた15 mL容コニカルチューブに上記前培養液200 μLを植菌し、2～3日間振とう培養（高崎科学器械株式会社：K-504, 100 rpm, 30°C）を行った。

本培養（共培養：2菌株の混合培養）：クリーンベンチ内で、Krainsky's asparagine 液体

培地3 mLを加えた15 mL容コニカルチューブに上記2種の前培養液をそれぞれ100 μLずつ植菌し、7～10日間振とう培養（高崎科学器械株式会社：K-504, 100 rpm, 30°C）を行った。

上清回収：7～10日間培養した本培養液全量を遠沈管（Hitachi Koki：333959A）に移し、遠心分離（高速冷却遠心機：Himac CR21G, ローター：RPR18-3-576, 10,000 rpm, 5分間）を行った。その後、菌体を吸わないようにパスツールピペットを用いて上清を回収し、グルコシダーゼ阻害活性測定に供し、阻害活性を見いだした。

D. 考察

GH13 グルコシダーゼの阻害剤の探索では、共培養条件595サンプルにおいて、1/6希釈時に21サンプル、1/3希釈時に、36サンプルに阻害活性が見いだされた。

純粋培養条件では、1/6希釈時に1サンプル、1/3希釈時に、5サンプルに阻害活性が見いだされ、グルコシダーゼ阻害剤生産菌は6菌体であった。これに対し、GH31グルコシダーゼ阻害活性は認められなかった。

この様な結果から、GH13グルコシダーゼは、GH31グルコシダーゼと比較して、阻害剤感受性が高い事が認められ、スクリーニングに使用する酵素の起源が重要であり、スクリーニングの結果を左右すると考えられた。

E. 結論

GH13 グルコシダーゼを用いて阻害剤の探索を行った結果、630サンプル中63サンプル10パーセントに阻害活性が認められた。

GH31 グルコシダーゼを用いて阻害剤の探索を行った結果、すべてのサンプルに阻害活性が認められなかった。

GH13とGH31グルコシダーゼでは、放線菌共培養液に対する阻害スペクトルが大きく異なった。

GH 31 グルコシダーゼを用いた阻害剤の探索では、PNP グルコピラノシドに対する比活性が小さいため、使用する酵素量が多くなり、非常なコスト高となった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 業績

- 1) H. Chida, A. Nakazawa, H. Akazaki, T. Hirano, K. Suruga, M. Ogawa, T. Satoh, K. Kadokura, S. Yamada, W. Hakamata, K. Isobe, T. Ito, R. Ishii, T. Nishio, K. Kintake, T. Oku, Expression of the algal cytochrome c6 gene in Arabidopsis enhances photosynthesis and growth. *Plant and Cell Physiology*, 48 (7), 948-957 (2007).
- 2) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T. Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Letters*, 29 (8), 1209-1215 (2007).

- 3) K. Kadokura, A. Rokutani, A. Yamamoto, T. Ikegami, T. Sugita, H. Itoi, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio, Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75 (2), 357-365 (2007).
- 4) K. Kadokura, Y. Sakamoto, K. Saito, T. Ikegami, T., Hirano, W. Hakamata, T. Oku, T. Nishio Production and Secretion of a Recombinant *Vibrio parahaemolyticus* Chitinase by *Escherichia coli*, and Its Purification from the Culture Medium, , *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2848-2851 (2007).

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在、日本大学へ申請中。