

2008J0019A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 袴田 航

平成21(2009)年4月

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 袴田 航

平成21（2009）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) 7
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 8
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 12
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 18

IV. 研究成果の刊行物・別刷 23

1. Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information. Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9 (1), 3-12 (2009).
2. Crystallization and structural analysis of cytochrome *c6* from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at 1.5 Å resolution. Hideharu Akazaki, Fumihito Kawai, Masahiro Hosokawa, Toshiyuki Hama, Hiroataka Chida, Takako Hirano, B. K. Lim, N Sakurai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatake Oku, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 189-191 (2009).
3. (2S, 2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer. Wataru Hakamata,

- Yukiko Sato, Haruhiro Okuda, Shinobu Honzawa, Nozomi Saito, Seishi Kishimoto, Atsushi Yamashita, Takayuki Sugiura, Atsushi Kittaka, Masaaki Kurihara, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 120-123, (2008).
4. Purification, characterization, and cloning of *Vibrio parahaemolyticus* chitinolytic enzymes and application to oligosaccharide production. Kazunari Kadokura, Yusuke Sakamoto, Akiko Rokutani, Takanori Ikegami, Takako Hirano, Mahiro Yamamoto, Kaori Saito, Wataru Hakamata, Shiro Itoi, Haruo Sugita, Tadatake Oku, Toshiyuki Nishio, *Journal of Applied Glycoscience*, 55, 157-164, (2008).
 5. Cloning, expression and purification of cytochrome *c6* from the brown alga *Hizikia fusiformis* and complete X-ray diffraction analysis of the structure. Hideharu Akazaki, Fumihiko Kawai, Hirotsuka Chida, Yuichiro Matsumoto, Mao Hirayama, Ken Hoshikawa, Satoru Unzai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatake Oku, *Acta Crystallographica F.*, 64, 674-680, (2008).
 6. Physicochemical properties of diheme cytochrome *c4* of unknown function from *Vibrio parahaemolyticus* strain RIMD2210633. Hideharu Akazaki, Yoshio Futami, Naoya Shibayama, Ikuko Shirasaki, Harumi Nakade, Hirotsuka Chida, Wataru Hakamata, sam-Yong Park, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72, 2791-2794 (2008).
 7. Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with the nonsecosteroidal vitamin D₃ analogue YR301. Shinji Kakuda, Kazuhisa Okada, Hiroshi Eguchi, Kazuya Takenouchi, Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Midori Takimoto-Kamimura, *Acta Crystallographica F.*, 64, 970-973, (2008).
 8. Structure Basis for Recognition of High Mannose Type Glycan Transport Lectin VIP36., T. Satoh, N. P. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, K. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki., *PF NEWS*, 25, 17-22, (2008).
 9. 奥 忠武, 千田浩隆, 中沢愛子, 赤崎秀治, 西尾俊幸, 袴田 航, 藻類のタンパク質遺伝子導入による陸上植物の光合成増感、46 (3), 156-158, (2008).
 10. The 2 α -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D₃ analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu) ; S. Honzawa, Y. Yamamoto, A. Yamashita, T. Sugiura, M. Kurihara, M. A. Arai, S. Kato, A. Kittaka; *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 3002-3024 (2008)

11. Computational Study on Secondary Structure of Oligopeptides Containing α,α -Disubstituted α -Amino Acids; M. Kurihara, Y. Sato, F. Kaneko, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune; *Peptide Science 2007*, 137-138, (2008).
12. Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement., T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara., *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 185-189 (2009).
13. Helical-Screw Directions of Diastereoisomeric Cyclic α -Amino Acid Oligomers., Nagano, M., Tanaka, M., Doi, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Suemune, H., *Org. Lett.*, 11, 1135-1137 (2009).
14. Computational Study on Helical Structure of α,α -Disubstituted Oligopeptides Containing Chiral α -Amino Acids., M. Kurihara, Y. Sato, N. Yamagata, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune., *Peptide Science 2008*, 149-150 (2009).
15. Design and synthesis of chiral cyclic α,α -disubstituted amino acid having azido functions and its oligopeptides., H. Takazaki, M. Tanaka, N. Kawabe, M. Nagano, M. Doi, M. Kurihara, H. Suemune., *Peptide Science 2008*, 159-160 (2009).
16. Cooperative Strand Invasion by Peptide Nucleic Acid., Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka, A., *Peptide Science 2008*, 481-482 (2009).

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」の広がりを含め、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は、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パ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種類見だし、細胞レベルでの抗ウイルス活性を測定した。
- 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、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 エンベロープ糖タンパク質 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、宿主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-結合型糖鎖プロセッ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的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-結合型糖鎖プロセッ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、パ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パ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。まず、得られたヒット化合物群の *in vitro* での阻害活性を測定した。その結果、インドールを母核とする化合物群が高い阻害活性 (IC_{50} 0.5 μ M ~ 数十 μ M) を示す事、2-アミノチアゾロン母核とする化合物群が高い阻害活性 (IC_{50} 0.5 μ M ~ 数 μ M) を示す事を明らかとした。そこで、Dixon plot 法を用いて化合物の酵素への

結合位置を確認した結果、インドールを母核とする化合物群は、酵素活性部位に結合する競合阻害型の化合物、活性部位近傍に結合する不競争型および混合型の化合物である事が分かった。2-アミノチアゾロン母核とする化合物では、Dixon plot 法を用いて酵素との結合様式を特定する事ができなかった。しかしながら、反応時間と共に酵素活性が低下する事、透析により酵素活性が復帰しない事から、1,4-マイケル付加反応による共有結合形成型の新規阻害剤である事が明らかになった。上記、2母核の内インドールを母核とする化合物に、細胞レベルで抗 HIV 活性を見いだした(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 博士のご支援をいただいた)。

「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、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い、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。得られた阻害剤生産菌は、16s rDNA の配列より *Streptomyces* 属である事を明らかとした。これら放線菌の培養液から阻害剤の単離を試みた。活性画分内において、最も存在量が多かった化合物 A を単離し、構造決定を試みた。FAB MS を用いたイオン化シフト法により分子量 390 であると推定し、UPLC MS/MS (ESI) によりフラグメント情報を得た。NMR (1D Exp: 1 H, 13 C, 2D-Exp: H-H COSY, HMQC, HMBC) により化合物 A の構造を推定した。そこで、単離した化合物 A のグルコシダーゼ阻害剤を測定した結果、 IC_{50} 3.3 mM と活性が非常に低かったため、化合物 A が活性本体でないことと決定した。次に単離したニンヒドリン反応陰性の化合物 B の構造解析を試みた。UPLC MS/MS (ESI) 分析を行った結果、分子量

494 であると推定し、現在引き続き構造解析を行っている。

D. 考察

これまでの研究の結果、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によって非常に高効率に阻害剤が得られる事を実証した。

得られた阻害剤は、酵素速度論的な解析の結果、シミュレーションとおり酵素の活性部位に結合する事が分かり、ドッキングシミュレーションの有用性の高さを実証する事ができた。

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からの阻害剤スクリーニングによって、活性画分を得ることができたが、現在のところ真の阻害剤に構造を明らかにするにはいたっていない。

このような事からも、*in silico* 阻害剤スクリーニングの有用性は非常に高いと感じられた。更に、IT 技術の進歩を抗 HIV 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。

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* または天然のライブラリから HIV 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、酵素阻害活性の報告の無い新規母核を有する阻害剤であった。また、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り、活性部位に競争的に結合する事を実験的にも確認する事ができた。このように、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) Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information. Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Toshiyuki Nishio, Tadatabe Oku, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9 (1), 3-12 (2009).
- 2) Crystallization and structural analysis of cytochrome *c6* from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at 1.5 Å resolution. Hideharu Akazaki, Fumihiko Kawai, Masahiro Hosokawa, Toshiyuki Hama, Hiroataka Chida, Takako Hirano, B. K. Lim, N Sakurai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatabe Oku, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 189-191 (2009).
- 3) (2S, 2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer. Wataru Hakamata, Yukiko Sato, Haruhiro Okuda, Shinobu Honzawa, Nozomi Saito, Seishi Kishimoto, Atsushi

Yamashita, Takayuki Sugiura, Atsushi Kittaka, Masaaki Kurihara, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 120-123, (2008).

- 4) Purification, characterization, and cloning of *Vibrio parahaemolyticus* chitinolytic enzymes and application to oligosaccharide production. Kazunari Kadokura, Yusuke Sakamoto, Akiko Rokutani, Takanori Ikegami, Takako Hirano, Mahiro Yamamoto, Kaori Saito, Wataru Hakamata, Shiro Itoi, Haruo Sugita, Tadatabe Oku, Toshiyuki Nishio, *Journal of Applied Glycoscience*, 55, 157-164, (2008).
- 5) Cloning, expression and purification of cytochrome *c6* from the brown alga *Hizikia fusiformis* and complete X-ray diffraction analysis of the structure. Hideharu Akazaki, Fumihiko Kawai, Hiroataka Chida, Yuichirou Matsumoto, Mao Hirayama, Ken Hoshikawa, Satoru Unzai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatabe Oku, *Acta Crystallographica F.*, 64, 674-680, (2008).
- 6) Physicochemical properties of diheme cytochrome *c4* of unknown function from *Vibrio parahaemolyticus* strain RIMD2210633. Hideharu Akazaki, Yoshio Futami, Naoya Shibayama, Ikuko Shirasaki, Harumi Nakade, Hiroataka Chida, Wataru Hakamata, sam-Yong Park, Toshiyuki Nishio, Tadatabe Oku, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72, 2791-2794 (2008).
- 7) Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with the nonsecosteroidal vitamin D₃ analogue YR301. Shinji Kakuda, Kazuhisa Okada, Hiroshi Eguchi, Kazuya

- Takenouchi, Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Midori Takimoto-Kamimura, *Acta Crystallographica F.*, 64, 970-973, (2008).
- 8) Structure Basis for Recognition of High Mannose Type Glycan Transport Lectin VIP36., T. Satoh, N. P. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, K. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki., *PF NEWS*, 25, 17-22, (2008).
 - 9)
 - 10) 奥 忠武, 千田浩隆, 中沢愛子, 赤崎秀治, 西尾俊幸, 袴田 航, 藻類のタンパク質遺伝子導入による陸上植物の光合成増感、46 (3), 156-158, (2008).
- 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, (2S,2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 120-123 (2008).
 - 2) The 2 α -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D3 analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu); S. Honzawa, Y. Yamamoto, A. Yamashita, T. Sugiura, M. Kurihara, M. A. Arai, S. Kato, A. Kittaka; *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 3002-3024 (2008)
 - 3) Computational Study on Secondary Structure of Oligopeptides Containing α,α -Disubstituted α -Amino Acids; M. Kurihara, Y. Sato, F. Kaneko, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune; *Peptide Science 2007*, 137-138, (2008).
 - 4) Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with a nonsecosteroidal vitamin D3 analogue YR301; S. Kakuda, K. Okada, H. Eguchi, K. Takenouchi, W. Hakamata, M. Kurihara, M. Takimoto-Kamimura, *Acta Crystallogr. F.*, 64, 970-973, (2008).
 - 5) Structure Basis for Recognition of High Mannose Type Glycan Transport Lectin VIP36., T. Satoh, N. P. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, K. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki., *PF NEWS*, 25, 17-22, (2008).
 - 6) Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement., T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara., *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 185-189 (2009).
 - 7) Helical-Screw Directions of Diastereoisomeric Cyclic α -Amino Acid Oligomers., Nagano, M., Tanaka, M., Doi, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Suemune, H., *Org. Lett.*, 11, 1135-1137 (2009).
 - 8) Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitors Based on Enzymological Information., W. Hakamata, M. Kurihara, H. Okuda, T. Nishio, T. Oku., *Curr. Top. Med. Chem.*, 9, 3-12 (2009)
 - 9) Computational Study on Helical Structure of α,α -Disubstituted Oligopeptides Containing Chiral α -Amino Acids., M. Kurihara, Y. Sato, N. Yamagata, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune., *Peptide Science 2008*, 149-150 (2009).
 - 10) Design and synthesis of chiral cyclic

a,a-disubstituted amino acid having azido functions and its oligopeptides., H. Takazaki, M. Tanaka, N. Kawabe, M. Nagano, M. Doi, M. Kurihara, H. Suemune., *Peptide Science* 2008, 159-160 (2009).

- 11) Cooperative Strand Invasion by Peptide Nucleic Acid., Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka, A., *Peptide Science* 2008, 481-282 (2009).

分担研究者：西尾 俊幸

- 1) Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information. Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Toshiyuki Nishio, Tadatabe Oku, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9 (1), 3-12 (2009).
- 2) Crystallization and structural analysis of cytochrome *c6* from the diatom *Phaeodactylum tricorutum* at 1.5 Å resolution. Hideharu Akazaki, Fumihiko Kawai, Masahiro Hosokawa, Toshiyuki Hama, Hirotsuka Chida, Takako Hirano, B. K. Lim, N Sakurai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatabe Oku, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 189-191 (2009).
- 3) Purification, characterization, and cloning of *Vibrio parahaemolyticus* chitinolytic enzymes and application to oligosaccharide production. Kazunari Kadokura, Yusuke Sakamoto, Akiko Rokutani, Takanori Ikegami, Takako Hirano, Mahiro Yamamoto, Kaori Saito, Wataru Hakamata, Shiro Itoi, Haruo Sugita, Tadatabe Oku, Toshiyuki Nishio, *Journal of Applied Glycoscience*, 55,

157-164, (2008).

- 4) Cloning, expression and purification of cytochrome *c6* from the brown alga *Hizikia fusiformis* and complete X-ray diffraction analysis of the structure. Hideharu Akazaki, Fumihiko Kawai, Hirotsuka Chida, Yuichiro Matsumoto, Mao Hirayama, Ken Hoshikawa, Satoru Unzai, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio, sam-Yong Park, Tadatabe Oku, *Acta Crystallographica F.*, 64, 674-680, (2008).
- 5) Physicochemical properties of diheme cytochrome *c4* of unknown function from *Vibrio parahaemolyticus* strain RIMD2210633. Hideharu Akazaki, Yoshio Futami, Naoya Shibayama, Ikuko Shirasaki, Harumi Nakade, Hirotsuka Chida, Wataru Hakamata, sam-Yong Park, Toshiyuki Nishio, Tadatabe Oku, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72, 2791-2794 (2008).
- 6) 奥 忠武, 千田浩隆, 中沢愛子, 赤崎秀治, 西尾俊幸, 袴田 航, 藻類のタンパク質遺伝子導入による陸上植物の光合成増感, 46 (3), 156-158, (2008).

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在、本研究で得られた細胞レベルで抗 HIV 活性が認められた化合物について、日本大学・国立医薬品食品衛生研究所・国立感染症研究所の知財部および職務発明委員会を通して、特許の出願手続きを行っている。

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的设计を行った。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え、更にライブラリーの精密化を行った。

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、ライブラリの精緻化を行うことができた。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) The 2 α -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D3 analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu); S. Honzawa, Y. Yamamoto, A. Yamashita, T. Sugiura, M. Kurihara, M. A. Arai, S. Kato, A. Kittaka; *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 3002-3024

(2008)

- 3) Computational Study on Secondary Structure of Oligopeptides Containing α,α -Disubstituted α -Amino Acids; M. Kurihara, Y. Sato, F. Kaneko, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune; *Peptide Science* 2007, 137-138, (2008).
- 4) Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with a nonsecosteroidal vitamin D3 analogue YR301; S. Kakuda, K. Okada, H. Eguchi, K. Takenouchi, W. Hakamata, M. Kurihara, M. Takimoto-Kamimura, *Acta Crystallogr. F*, 64, 970-973, (2008).
- 5) Structure Basis for Recognition of High Mannose Type Glycan Transport Lectin VIP36., T. Satoh, N. P. Cowieson, W. Hakamata, H. Ideo, K. Fukushima, M. Kurihara, K. Kato, K. Yamashita, S. Wakatsuki., *PF NEWS*, 25, 17-22, (2008).
- 6) Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement., T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara., *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 185-189 (2009).
- 7) Helical-Screw Directions of Diastereoisomeric Cyclic α -Amino Acid Oligomers., Nagano, M., Tanaka, M., Doi, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Suemune, H., *Org. Lett.*, 11, 1135-1137 (2009).
- 8) Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitors Based on Enzymological Information., W. Hakamata, M. Kurihara, H. Okuda, T. Nishio, T. Oku., *Curr. Top. Med. Chem.*, 9, 3-12 (2009)
- 9) Computational Study on Helical Structure of α,α -Disubstituted Oligopeptides Containing Chiral α -Amino Acids., M. Kurihara, Y. Sato, N. Yamagata, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune., *Peptide Science* 2008, 149-150 (2009).
- 10) Design and synthesis of chiral cyclic α,α -disubstituted amino acid having azido functions and its oligopeptides., H. Takazaki, M. Tanaka, N. Kawabe, M. Nagano, M. Doi, M. Kurihara, H. Suemune., *Peptide Science* 2008, 159-160 (2009).
- 11) Cooperative Strand Invasion by Peptide Nucleic Acid., Sugiyama, T., Imamura, Y., Kurihara, M., Kittaka, A., *Peptide Science* 2008, 481-282 (2009).

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 12) 現在、本研究で得られた細胞レベルで抗 HIV 活性が認められた化合物について、日本大学・国立医薬品食品衛生研究所・国立感染症研究所の知財部および職務発明委員会を通して、特許の出願手続きを行っている。

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 5 9 5 サンプル、合計 6 3 0 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プ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、放線菌 35 菌体をそれぞれ完全培地 (Bennett's Glucose 液体培地) で 2 日間前培養した後、35 菌体のうちの 2 菌体の前培養液を最少培地 (Krain-sky's asparagine 液体培地) に植菌し、1 週間共生培養を行った。その後、培養液を遠心分離し、純粋培養上清 35 サンプル、共培養上清 595 サンプル、合計 630 サンプルを調製した。グルコシダーゼ阻害活性は、酵素として yeast 由来グルコシダーゼ及び rice 由来グルコシダーゼ、基質として PNP α -D-glucopyranoside を用いて、得られたサンプルの阻害活性測定を行った。その結果、yeast 由来グルコシダーゼに対して、培養上清を 1/6 希釈したとき 90%以上の阻害活性を示したサンプルを 22 サンプル、1/3 希釈したときに 90%以上の阻害活性を示したサンプルを 41 サンプル見出した。また、すべてのサンプルが rice 由来グルコシダーゼに

対して阻害活性を示さなかった。これらの結果より阻害剤生産菌として 54a、73a、194、361、501、537c (計 6 菌体) を見出した。

・PCR 法による *acbC* 遺伝子の探索

放線菌はグルコシダーゼ阻害剤を生産することが知られており、その多くがアカルボース (図 1.) やバリダマイシンなどの C7N Aminocyclitol Family (C7N A Family) である。そこで放線菌から新規母格を有するグルコシダーゼ阻害剤を得るために、C7N A Family 化合物を生産しない放線菌から阻害剤をスクリーニングすることにした。

代表的な C7NA Family であるアカルボースは、sedo-heptulose-7-phosphate cyclase (AcbC) により sedo-heptulose-7-phosphate が環化され、2-epi-5-epi-valiolone となる反応がキーステップとなり、合成される。(図 2.)

図 2. C7NA Family の生合成キーステップ
これらのことから、放線菌が *AcbC* をコードする *acbC* 遺伝子を有さなければ、C7N A Family を生産しないため、未知の母核を有するグルコシダーゼ阻害剤が得られるのではないかと考えた。そこで PCR 法により *acbC* 遺伝子の探索を行った。アカルボース生産菌である放線菌 *Actinoplanes* sp. SE50/110 を陽性コントロールとして用い、強い阻害活性を示した放線菌 54a、54b、73a、194、234、243a、361、365 に対して、AS-C1 (5' -AGGGAAGCTCATATGAGTGGTGTTCGAG-3') 及び AS-C2 (5' -GGTATCGCGCCAAGAATTCCTGGACTG-3') をプライマーとして用いて (Ref. J. Biol. Chem., 274, 10998-10896, 1999)、PCR を行った。

その結果、*Actinoplanes* sp. SE50/110、54b 及び 73a は *acbC* 遺伝子を有していたが、54a、194、234、243a、361、365 は *acbC*

遺伝子の存在が確認できなかった。

・阻害剤生産菌の同定

阻害剤生産菌である 54b、73a、194、243a を 16S rDNA の配列に基づき、種の決定を試みた。配列決定は 16S rDNA 増幅用 PCR プライマー 27f (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 及び 1492r (5' -GGCTACCTTGTTACGACTT-3') を用いた PCR 法により目的遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物の配列決定し、その配列をもとに BLAST 検索を行ったその結果、放線菌 54b 及び 73a は *Micromonospora* sp.、194 及び 243a は、*Streptomyces* sp. と推定した。

・阻害剤の単離・精製・構造決定

共生培養することによって強いグルコシダーゼ阻害活性を示し、かつ典型的なグルコシダーゼ阻害剤骨格である C7NA Family 化合物生合成遺伝子 *acbC* 遺伝子を有していないと予想される放線菌 194 と 243a (*Streptomyces* sp.) を共生培養し、培養上清から阻害剤の単離を試みた。

194・243a の共培養液を水と有機溶媒 (ジクロロメタン:メタノール=7:3) を用いて分配を行いグルコシダーゼ阻害活性の測定した結果、有機溶媒層が活性画分であった。更に検討した結果、酢酸エチル抽出においても同様の結果が得られた。そこで得られた酢酸エチル抽出物をシリカゲルオープンカラム (ヘキサン:酢酸エチル=10:1) で精製し、最も存在量が多かった化合物 A を単離した。化合物 A はニンヒドリン反応陰性であり、アミンを有さないことが確認されたことから C7NA Family 化合物でないことと示唆された。そこで、化合物 A の構造決定試み、FAB MS を用いたイオン化シフト法により分子量 390 であると推定し、

UPLC MS/MS (ESI) によりフラグメント情報を得た。NMR (1D Exp: 1H, 13C, 2D-Exp: H-H COSY, HMQC, HMBC) により化合物 A の構造を推定した。そこで、単離した化合物 A のグルコシダーゼ阻害剤を測定した結果、IC₅₀ 3.3 mM と活性が非常に低かったため、活性本体でないことと決定した。

次に単離したニンヒドリン反応陰性の化合物 B の構造解析を試みた。UPLC MS/MS (ESI) 分析を行った結果、分子量 494 であると推定し、現在引き続き構造解析を行っている。

(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・分子認識情報のみを用いる為、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、研究に必要な放線菌 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 2 1 サンプル、1/3 希釈時に、3 6 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、GH 31 グルコシダーゼ阻害活性は認められなかった。

このような結果から、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

放線菌共生培養液 595 サンプルの試料を調整し、グルコシダーゼ阻害活性を測定した結果より共生培養を行う事によって、放線菌が生産する化合物が変化することが