

ヒト細胞内グリコシダーゼの蛍光基質と阻害剤の開発

小胞体グルコシダーゼ阻害剤の抗ウイルス薬への応用を中心として

誌名	応用糖質科学 : 日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	袴田,航 平野,貴子 西尾,俊幸
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	11巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 72-78
発行年月	2021年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat





Development of Fluorogenic Substrates and Inhibitors of Human Intracellular Glycosidases: Focusing on the Application of Endoplasmic Reticulum Glucosidase Inhibitors to Antiviral Agents*

ヒト細胞内グリコシダーゼの蛍光基質と阻害剤の開発：小胞体グルコシダーゼ阻害剤の抗ウイルス薬への応用を中心として*

袴田 航^{1,**}, 平野貴子¹, 西尾俊幸¹

(はかまた わたる, ひらの たかこ, にしお としゆき)

Wataru Hakamata,^{1,**} Takako Hirano,¹ and Toshiyuki Nishio¹

¹ 日本大学生物資源科学部生命化学科
252-0880 神奈川県藤沢市亀井野 1866

¹ Department of Chemistry and Life Science, College of Bioresource Sciences, Nihon University
1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-0880, Japan

要旨：糖鎖は細胞内で糖タンパク質・糖脂質などとして存在し、重要かつ多様な生命機能を提供している。それら糖鎖の構築には、多種類の糖加水分解酵素・糖転移酵素が関わっている。ヒト細胞内の主要なオルガネラには複数の *exo*-型糖加水分解酵素が存在し、その阻害剤は細胞内で糖鎖構造を変化させることにより、免疫機能調節・がん転移制御・抗がん作用・バクテリアおよびウイルス感染抑制と予防効果等を示すため、有望な創薬ターゲットとなっている。これら酵素の阻害剤を開発するためには、ヒト細胞を用いた標的酵素阻害評価系の構築が必要となる。本研究では、ヒト培養細胞を酵素源とし生細胞中の微弱な標的酵素活性を効率的に検出可能な蛍光基質を開発し標的酵素阻害評価系の構築することによって、目的阻害剤の探索を可能とした。本稿では特に小胞体グルコシダーゼ阻害剤がエンベロープウイルスに対して抗ウイルス活性を示すこと中心に述べる。小胞体グルコシダーゼ阻害剤は、薬剤耐性ウイルスの出現回避・ウイルス感染予防薬となりうる宿主標的型抗ウイルス剤に大別される。しかしながら、糖構造を基盤とする既知小胞体グルコシダーゼ阻害剤は、抗ウイルス活性を示すが高い親水性に基づく低い膜透過性の問題があり、問題解決を目指したそれらの誘導体も抗ウイルス薬として上市には至っていない。そのため、既知阻害剤の構造展開といったアプローチではなく、標的酵素の蛍光基質開発、それを用いたヒト培養細胞における阻害剤探索系を構築し、化合物ライブラリより阻害剤探索する方法を採用した。その結果、目的の性質を有するヒット化合物が得られ、その合成法を確立、さらに構造展開を行うことによって、既知阻害剤よりも高い抗ウイルス活性を有する誘導体を得ることができた。

キーワード：小胞体グルコシダーゼ、抗ウイルス剤、直接作用型抗ウイルス剤、宿主標的型抗ウイルス剤*

1. はじめに

2019 年末、中国の武漢で発生した感染性呼吸器疾患、いわゆる新型コロナウイルス感染症が世界的大流行（パンデミック）を引き起こした。本感染症は原稿執筆時点である 2021 年 1 月においても終息の兆しを見せていない。日本では 2020 年 12 月末に 2 度目の緊急事態宣言が発令さ

れ、社会が緊張感に満ちている。2020 年 2 月 11 日には、世界保健機関（WHO）が新型コロナウイルス感染症の正式名称を「COVID-19」とし、国際ウイルス分類委員会は本疾患の原因ウイルス名を「SARS-CoV-2」と命名した。SARS-CoV-2 を含むコロナウイルスはプラス鎖 RNA ウィルスであり、多くのエンベロープウイルス同様にウイルス表面は非常に多くの糖鎖に覆われている¹。ウイルスはこ

* 本原稿は、日本応用糖質科学会 2020 年度大会応用糖質科学シンポジウムで一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 0466-84-3960, Fax. 0466-84-3960, E-mail: hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp)

*** Key words: endoplasmic reticulum glucosidase, antiviral agents, direct-acting antivirals, host-targeting antivirals

略記：ERGI, endoplasmic reticulum α -glucosidase I; ERGII, endoplasmic reticulum α -glucosidase II; QMC, quinone methide cleavage; SARS, severe acute respiratory syndrome; MERS, middle east respiratory syndrome, DNJ, 1-deoxynojirimycin; CST, castanospermine; HIV, human immunodeficiency virus.

これらの糖鎖を利用し、感染時における宿主の免疫応答を阻止している。このように広範囲かつ高度にグリコシル化された SARS-CoV-2 スパイクタンパク質はワクチンや抗体開発の重要な標的となっている¹²⁾。さらに、これら糖鎖は宿主細胞へのウイルスの感染・増殖・出芽においても重要な役割があり、それらを構築する宿主の糖加水分解酵素・糖転移酵素は抗ウイルス薬開発の標的酵素となる³⁾。

これら酵素のなかでヒト細胞内の *exo*-型糖加水分解酵素に着目すると、主要なオルガネラには、グルコシダーゼ・マンノシダーゼ・ガラクトシダーゼ・フコシダーゼ・ヘキサミニダーゼ・ノイラミニダーゼ・イズロニダーゼ等のいずれかまたは複数の酵素活性が認められる⁹⁾。また、これら酵素の阻害剤は細胞内で糖鎖構造を変化させることにより、抗ウイルス活性のみにとどまらず、免疫機能調節・がん転移制御・抗がん作用・バクテリア感染抑制と予防効果等を示し³⁾、さらには酵素補充療法に用いるケミカルシャペロンとして機能することが知られており⁹⁾、創薬の有望な標的酵素となっている。本稿では、これら標的酵素の蛍光基質開発を基盤として、ヒト細胞を用いた標的酵素阻害評価系の構築および阻害剤の探索・ヒットした阻害剤の合成法の確立・構造展開・生物活性の評価について、抗ウイルス薬の標的酵素である小胞体グルコシダーゼを中心に紹介する。

2. ヒト細胞を用いた小胞体グルコシダーゼ阻害剤探索系の構築

2.1 ヒト細胞内 *exo*-型糖加水分解酵素⁹⁾

細胞内の生体分子、特に脂質とタンパク質はグリコシル化されている例が非常に多い。これら糖脂質・糖タンパク質の種類や生理機能は多岐にわたるが、ここでは糖タンパク質の糖鎖について述べる。糖タンパク質糖鎖は、*N*-結合型糖鎖・*O*-結合型糖鎖・*C*-結合型糖鎖に分類され、それぞれ特徴的な構造と役割があり、それらを構築する酵素を大別すると *exo*-型糖加水分解酵素・*endo*-型糖加水分解酵素・糖転移酵素となる。そのなかの一つである *exo*-型糖加水分解酵素の細胞内分布をまとめると、核には α -マンノシダーゼ IIC1、小胞体には α -マンノシダーゼ・ α -グルコシダーゼ I・ α -グルコシダーゼ II、ゴルジ体には α -マンノシダーゼ IA・ α -マンノシダーゼ IB・ α -マンノシダーゼ IC・ α -マンノシダーゼ IIA-1・ α -マンノシダーゼ IIA-2、リソソームには β -ガラクトシダーゼ・ β -グルコシダーゼ・ α -マンノシダーゼ・ α -L-フコシダーゼ・ α -L-イズロニダーゼ・ β -*N*-アセチルヘキサミニダーゼ・ノイラミニダーゼの報告がある。このようにヒト細胞内の *exo*-型糖加水分解酵素には多様性が認められる。

2.2 細胞内 *exo*-型加水分解酵素の特徴

糖タンパク質糖鎖の一つである *N*-結合型糖鎖の修飾は、新生タンパク質のアスパラギン残基の側鎖に 14 糖から成

る糖鎖中間体がオリゴ糖転移酵素複合体の作用により転移するグリコシル化から開始される。グリコシル化されたタンパク質は、小胞体内で前述の *exo*-型糖加水分解酵素である小胞体 α -グルコシダーゼ I (ERGI) および小胞体 α -グルコシダーゼ II (ERGII) が関与する品質管理を受けた後、正しくフォールディングしたタンパク質のみゴルジ体へと輸送される。ゴルジ体での糖鎖修飾は種ごとに特徴的であり、種固有の糖転移酵素と *exo*-型糖加水分解酵素の作用により、種に特徴的な糖鎖構造となる。ヒトにおいて *N*-結合型糖鎖は、高マンノース型・ハイブリッド型・複合型に分類される。このように複数の糖転移酵素と糖加水分解酵素により生合成される *N*-結合型糖鎖は、合成初期からその完成に至るまで多種多様な構造で細胞内に存在することになる。それらはオルガネラにという区切られた空間に区別されて存在してはいるが、そのオルガネラ内にも複数の *exo*-型糖加水分解酵素が存在する。そのため細胞内 *exo*-型糖加水分解酵素は、厳密に基質となる *N*-結合型糖鎖の非還元末端側の構造を区別する必要がある。それを達成する一つの方策として、これら酵素は基質である *N*-結合型糖鎖の非還元末端側からの 2 糖を酵素活性部位の subsite -1 および subsite +1 で認識し、その 2 糖間のグリコシド結合を加水分解することによって基質選択性を高めている。これら酵素の基質特異性は十分に解明されていないが、酵素の立体構造を解析することにより二つの subsite の存在を確認することができる⁷⁾。

2.3 細胞内 *exo*-型加水分解酵素阻害剤探索系の構築

ヒト細胞内 *exo*-型糖加水分解酵素の阻害剤は創薬シードまたはリード化合物となりえる。代表的な例として、小胞体グルコシダーゼ阻害剤の抗ウイルス活性⁹⁾・ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の抗がん活性⁹⁾・リソソームの内 *exo*-型糖加水分解酵素阻害剤のライソゾーム病へのケミカルシャペロンとして利用⁹⁾があり、これら阻害剤の拡充は対象疾患の治療に貢献できる。一般的に阻害剤探索は標的酵素の阻害剤探索系を確立した後に多数の化合物を収載した化合物ライブラリに対して実施する。よって、阻害剤探索系には簡便さ・低コスト・高感度が求められる。したがって、前述のヒト細胞内 *exo*-型糖加水分解酵素阻害剤の効率的な探索においても、それらの条件を満たした適切な阻害剤探索系が必要となる。まず探索系に必要な標的酵素について検討した。標的となる細胞内 *exo*-型加水分解酵素は細胞内の存在量が微量であり、その存在形態も膜結合型酵素である場合やヘテロダイマー構造を形成する等の複雑な構造をもつ場合が多い。そのような理由から、阻害剤探索に必要な酵素量を安定的に細胞や組織から単離精製して供給することは困難である。そのため、安定的に培養可能なヒト生細胞を酵素源として、標的とする酵素活性を細胞レベルで評価することとした。酵素源であるヒト培養細胞にて、目的酵素活性を検出するためには蛍光基質が必要となる。目的とする蛍光基質には、細胞内の目的酵素の

基質を蛍光化することが基質特異性の観点から適切であるが、糖鎖構造が複雑であることから阻害剤探索に必要な基質を調整することは困難である。

そこで本研究では、合成容易な蛍光基質を阻害剤探索に用いることとした。蛍光基質の設計は、これら酵素が非還元側からの2糖を酵素活性部位の subsite -1 および subsite +1 で認識することを利用した。一般的な *exo*-型グリコシダーゼの基質は非還元末端側の糖残基の1位と蛍光団をグリコシド結合で結合した構造をもつ。このような基質は、糖残基よりもサイズが大きい蛍光団をもち、酵素の subsite +1 に蛍光団を受け入れることが難しく、基質として認識されない。そこで、糖残基と蛍光団を糖残基と同等サイズのベンジルリンカーで結合し、酵素によるグリコシド結合の切断をトリガーとし、キノンメチド開裂 (QMC, quinone methide cleavage) 反応を介して蛍光団を遊離する基質を開発することにより問題の解決を目指した (図1)。はじめに培養細胞内の小胞体カルボキシエステラーゼをモデル酵素として、蛍光基質の設計と合成・酵素局在オルガネラの特異・酵素反応と QMC 反応が疑一次反応であることの確認を行い、蛍光基質のコンセプトを立証した¹⁰⁾(図2)。本コ

ンセプトに基づき、ERGII¹¹⁾、 α -L-フコシダーゼ¹²⁾・ β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ¹³⁾について報告を行った。さらに、未報告の新規なゴルジ体 β -アロシダーゼ¹⁴⁾・ β -ガラクトシダーゼ¹⁵⁾の報告も行っている。

2.4 細胞内 *exo*-型加水分解酵素の阻害剤探索系の確立

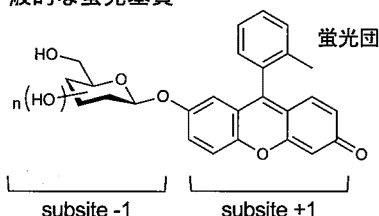
目的とする *exo*-型糖加水分解酵素活性を高感度に検出可能な蛍光基質が得られたため、次にそれを用いてヒト培養細胞を用いた阻害剤探索系を開発した。阻害剤探索系は、96穴プレートにヒト細胞を培養し蛍光基質と阻害剤候補化合物を加え、インキュベート後に各穴の蛍光強度をプレートリーダーで測定する簡便な系とした。種々の最適化を行うことにより、培養細胞を用いた阻害剤探索系の評価基準¹⁶⁾(変動係数10%以下、シグナル/バックグラウンド比3以上、Z'ファクター0.5以上)を満たす阻害剤探索系の構築に成功した^{12,17)}。本系を各種化合物ライブラリへ適用することにより、目的とする阻害剤が得られるものと期待できる。

3. 小胞体グルコシダーゼ阻害剤の抗ウイルス剤への応用

3.1 新興ウイルス感染症とその対策

新興ウイルス感染症は1970年以降に新しく認識されたウイルス感染症であり、現在においては広く認知されているロタウイルス感染症・ノロウイルス感染症・後天性免疫不全症候群(エイズ)なども含まれる。2000年以降では、2002年のSARS (Severe Acute Respiratory Syndrome, 重症急性呼吸器症候群)、2009年の新型インフルエンザ、2012年と2015年のMERS (Middle East Respiratory Syndrome, 中東呼吸器症候群)、2014年と2018年のエボラ出血熱、2016年のジカ熱、2019年のCOVID-19と出現・拡大地域は世界的に広がっているが、幸いにして日本へ侵入したのは新型インフルエンザとCOVID-19の二つである。そのため、毎年のように新興ウイルス感染症が発生しているにも関わらず、その対策の重要性は深まらなかったと思われる。COVID-19のパンデミック前の日本において、ウイル

一般的な蛍光基質



QMC反応を利用した蛍光基質

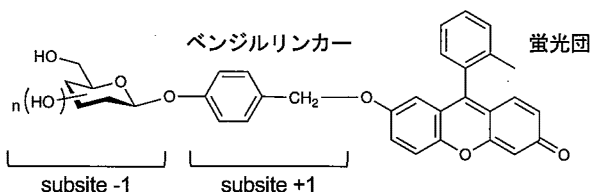


図1. *Exo* 型グリコシダーゼの一般的な蛍光基質の構造式と QMC 反応を利用した蛍光基質の構造式

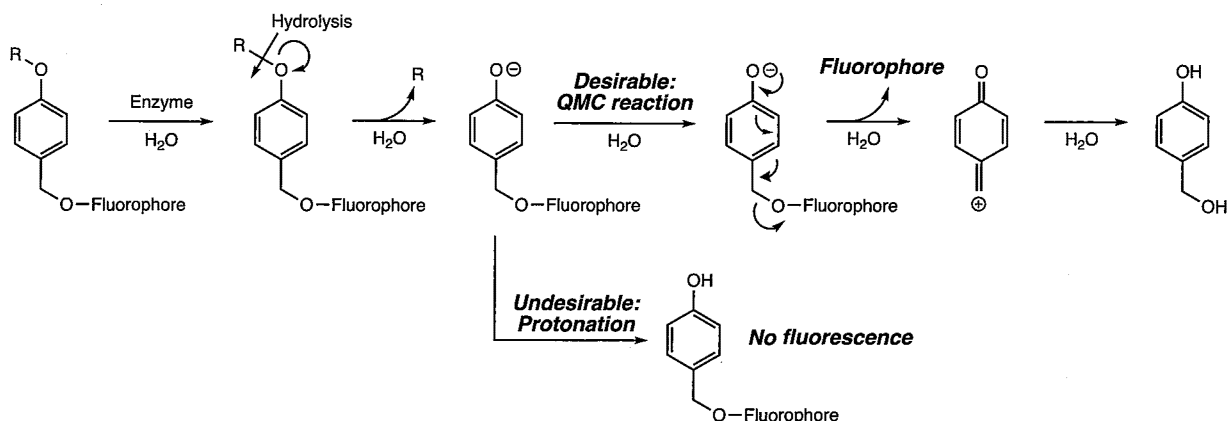


図2. QMC 反応を介した水中での蛍光団の遊離反応

ス感染症に対する対策は縁遠いものと考えられ、一般には充分周知される状況ではなかったが、現時点、パンデミック後の日本では、各種報道や政府および自治体の積極的な周知活動により、多くの方がその詳細を理解し実践している。

ウイルス感染症に対する対策は大きく分けて三つある。一つは物理的隔離である。感染者と非感染者を物理的に遮断しウイルスの拡散を防ぐものであり、感染者の状況に応じて様々な方法がある。パンデミック後の世界では、マスクの着用が必須と考えられ、人と人を物理的に離すソーシャル・ディスタンスの実践が浸透している。多くの方がこれらを着実に実施することにより爆発的な感染拡大が抑えられている。二つ目はワクチン療法である。新興ウイルス感染症に対するワクチンは、基本的にウイルス感染症が拡大した後に開発されるものでありパンデミック前に準備できるものではない。COVID-19に対するワクチンは驚異的なスピードで開発され一部の国では接種が始まっている。執筆時点の日本では、2回接種型のワクチンを全国民に負担なく(全額公費)接種することを厚生労働省が詳細に説明を行っている。三つ目は抗ウイルス薬である。新興ウイルス感染症に対する抗ウイルス薬も、基本的にウイルス感染症が拡大した後に開発されるものでありパンデミック前に準備できるものではない。さらに、抗ウイルス薬は低分子医薬品であり開発には10年以上の期間が必要となる。COVID-19に対する抗ウイルス薬は執筆時点で存在しない。特例措置として承認期間が短くなったとしても、およそ10年後の上市に向けてCOVID-19に対する抗ウイルス薬を開発する製薬会社が存在するかは不明である。これにはウイルスライフサイクルの多様性が深く関与している。ライフサイクルがウイルスごとに大きく異なるために抗ヘルペスウイルス薬・抗HIV(Human Immunodeficiency Virus)薬・抗インフルエンザウイルス薬等を抗COVID-19薬に転用(ドラッグリポジショニング)することは非常に難しい。富士フイルム富山化学株式会社が開発した抗インフルエンザウイルス薬であるアビガン(ファビピラビル)を抗COVID-19薬に転用することが期待されたが、執筆時点では承認されていない。従って、幸いにも抗COVID-19薬が開発できたとしても他のウイルス感染症または将来的に現れる未知の新興ウイルス感染症の治療薬となる可能性は低い。基本的にウイルスと抗ウイルス薬は1対1の関係である。対照的に病原微生物に対する代表的な医薬品である抗生物質は、グラム陰性菌用・グラム陽性菌用と大別できるように一つの抗生物質による抗菌スペクトルは広い。

3.2 抗ウイルス薬の分類

抗ウイルス薬は薬剤の作用標的に基づいて直接作用型抗ウイルス剤(HTAs, Host-targeting antivirals)と宿主標的型抗ウイルス剤(DAAs, Direct-acting antivirals)に大別することができる。DAAsはウイルス固有の生体分子に作用し抗ウイルス活性を示す抗ウイルス薬であり、核酸合成阻害

剤(DNA・RNA・逆転写)・プロテアーゼ阻害剤・非構造タンパク質阻害剤等がある。現在上市されている抗ウイルス薬の殆どはDAAsである。DAAsはウイルス因子を標的とするために、ヒトとウイルスの選択毒性を確立しやすいメリットがある。しかしながら、薬剤耐性ウイルスの高頻度かつ早期の出現を避けることができない。これはウイルスゲノムの早い変異速度による。SARS-CoV-2と同じプラス鎖RNAウイルスであるHIV-1の遺伝子は真核細胞生物やDNAウイルス遺伝子の100万倍以上の速さで変異する¹⁹⁾。最近の例として、塩野義製薬株式会社が開発した抗インフルエンザウイルス薬であるゾフルーザ(パロキサビルマルボキシル)は既存の抗インフルエンザウイルス薬とは異なる作用標的(インフルエンザウイルスのキャップ依存性エンドヌクレアーゼ)をもつ医薬品として、2018年3月に販売が開始された。しかし、2019年には耐性ウイルス検出の報道がなされ、耐性ウイルス出現の速さに動揺が広がった。これは抗ウイルス薬の商品寿命の短さを示すものであり、抗COVID-19薬が開発できたとしても開発費用回収の前に薬剤耐性ウイルスが主流となり販売停止となることも考えられる。このような経済的理由も抗ウイルス薬開発を阻んでいる。執筆時点で、感染力と死亡率が高いとされるSARS-CoV-2英国変異株の国内感染が報告されており、ウイルスの変異速度の速さを思い知らされる。

このような薬剤耐性ウイルスの出現を回避するため、ウイルス因子ではなく宿主であるヒトの因子を標的とするHTAsが注目されている。ウイルスはヒト細胞の生体分子を巧みに利用し感染・増殖・出芽を行う。このヒト細胞でのウイルスライフサイクル特異的プロセスを標的としたのがHTAsである。ウイルスとヒトとの選択毒性の観点から、ヒト因子を標的とすることに懸念はあるが宿主遺伝子の突然変異率は非常に低いため、ウイルスに薬物耐性を獲得させない遺伝的障壁を抗ウイルス薬へ賦与することが可能となる。現在、研究・開発が進められているHTAsには、ウイルス結合阻害剤・ウイルス侵入阻害剤・ウイルス複製阻害剤・ウイルス再構成出芽阻害剤などがある。

3.3 HTAsとしての小胞体グルコシダーゼ阻害剤とその課題

真核生物におけるタンパク質翻訳後修飾であるN-結合型糖鎖修飾はHTAsの重要な作用標的となっている。それはウイルス感染時の宿主細胞レセプターへの結合、宿主細胞免疫などの生体防御機構からの回避など様々な機能を持つウイルスエンベロープが、高度にN-結合型糖鎖に修飾された糖タンパク質を持つからである。これらN-結合型糖鎖は、Sugar coat, Sugar shield, Glycan coat, Glycan shieldなどといわれるが、一般的な日本語訳はないように思われる。よって、N-結合型糖鎖修飾に関与する糖加水分解酵素と糖転移酵素の阻害は、ヒト細胞内でのウイルスの再構成と出芽の阻害し、ウイルスの感染・増殖阻害を引き起こし、抗ウイルス活性を示す²⁰⁾。本作用機序の対象となるウ

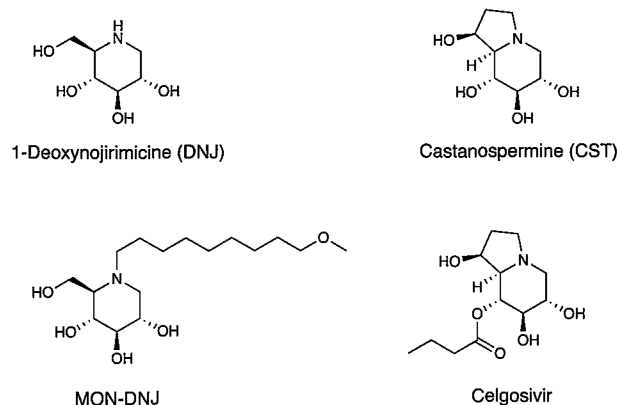


図3. 抗ウイルス活性を示す小胞体グルコシダーゼ阻害剤の構造式

ウイルスはエンベロープウイルスに限られるが、動物から分離されるウイルスの約70%がエンベロープウイルスであり²⁰ SARS-CoV-2もエンベロープウイルスであるため、作用標的の適用性は十分であると考えられる。

このようなN-結合型糖鎖修飾阻害による抗ウイルス活性の報告は、1-Deoxynojirimycin (DNJ) および Castanospermine (CST) の抗HIV活性が最初である^{21,22}。DNJおよびCSTはN-結合型糖鎖合成の初期段階に参与するERGIおよびERGIIの阻害剤である。1990年前後から、いくつかのERGIおよびERGII阻害剤の抗ウイルス薬としての臨床試験が開始された。一例として、DNJの誘導体であるMON-DNJおよびCSTの誘導体であるCelgosivirのフェーズII臨床試験が実施され、2010年にCelgosivirの臨床試験は中止された²³。これら阻害剤の構造式を図3にまとめた。この例に示されるように、天然物由来のDNJおよびCSTを抗ウイルス薬とするためには、化合物に疎水性を付与する構造修飾が必要となる。糖誘導体であるDNJおよびCSTは親水性が高く細胞膜透過性が低く薬剤有効濃度が高くなる傾向がある。MON-DNJおよびCelgosivirに限らず、同様の目的で数多くの構造展開と評価が行われているがERGIおよびERGII阻害剤が抗ウイルス薬として上市されるには至っていない。本研究では、糖誘導体である既知阻害剤の構造展開により抗ウイルス薬を目指すのではなく、ドラッグアブルな化合物ライブラリから目的阻害剤を探索することで問題解決を試みた。

本研究のように標的酵素が決定している場合には、*in silico*での仮想リガンド探索も有効な方法となる。筆者らは、仮想化合物ライブラリー(約600万化合物)から仮想リガンド探索を行い、比較的強力なグルコシダーゼ阻害剤($IC_{50} = 2.47 \mu M$)を得たが²⁴、抗ウイルス活性は示さなかった。研究当時、ERGIおよびERGIIの立体構造は未報告であったが、現在マウス由来ERGIIの立体構造が報告されているため、本酵素をテンプレートとした仮想リガンド探索の実施により抗ウイルス活性を有する阻害剤が得られると期待される。

新しい化合物母核をもった阻害剤を得る方法として、実在する化合物ライブラリからの阻害剤探索はより一般的で

ある。しかしながら、ライブラリーからの阻害剤探索を可能とする酵素の調整や基質の報告はなされていなかった。筆者らにはリコンビナントERGIIを安定的に調整し阻害剤探索を実施することは困難であった。そこで前述の阻害剤探索系構築のコンセプトに従うこととし、はじめにERGIIとその類似酵素であるERGIの基質認識の差異について明らかにした²⁵。次に両酵素の分子認識の違いに基づき、前述のQMC反応を利用した蛍光基質を設計・合成した。更に、本基質が培養細胞中でERGII活性を検出可能であり、培養細胞を用いた阻害剤探索系の評価基準を満たしていたことから、化合物ライブラリからERGII阻害剤の探索を実施し、ヒット化合物としてカルボリン誘導体を得ることができた。化合物ライブラリーから提供される化合物量は僅かなため、ヒット化合物を合成し生物活性を精査するとともに、構造活性相関の解明を目指し30種類程度の誘導体を合成した。それらのなかで既知阻害剤よりも大幅に高い抗ウイルス活性を有するAR407を見出し、AR407で処理したヒト細胞の糖鎖の網羅的解析の結果、GIIの阻害が認められた。

4. おわりに

本研究を開始した頃の研究の背景では、ウイルス感染症のパンデミックがいかに深刻な事態を社会にもたらすか、であった。研究を続け抗ウイルス化合物を得るには至ったが、現実には遥かに先にすすみCOVID-19のパンデミックは現在進行系で社会に甚大な被害を与え続けている。この現実直面し、抗ウイルス薬開発の重要性は再認識され、ウイルス感染予防薬開発の社会的要請も強くなっている。本稿で述べた糖鎖を標的としたHTAsは、その抗ウイルス活性発現機序に基づいて薬剤耐性ウイルスの出現回避だけでなくウイルス感染予防薬としても機能することが可能であり、抗ウイルス薬として開発できれば、その社会的貢献度は非常に大きなものとなる。将来、新たなパンデミックが起こることは確実であり、その未知なるウイルスに対して事前に準備可能な抗ウイルス薬およびウイルス感染予防薬は、宿主であるヒトを標的としたHTAsが最も有望であると考えている。

筆者らは今後も「糖」の多様な生理機能の一端であるウイルス感染に着目し、糖鎖のウイルスライフサイクルにおける役割の解明、それに基づく抗ウイルス薬の開発を目指し研究を継続する。

謝辞

本研究を行うにあたり、抗ウイルス活性の測定をご指導いただきました日本大学生物資源科学部獣医学科 遠矢幸伸先生、日本獣医生命科学大学 獣医学科 氏家 誠先生、N-結合型糖鎖解析を行っていただきました理化学研究所 伊藤細胞制御化学研究室 石渡明弘先生、分子シミュレーションをご指導いただきました厚生労働省 国立

医薬品食品衛生研究所有機化学部 栗原正明部長に深謝申し上げます。ともに研究を行った日本大学生物資源科学部 生命化学科生物有機化学研究室・生物分子機能化学研究室・生物化学研究室内の学生の皆さんに感謝申し上げます。

なお、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究C) 17K08375 および 16K08032, 2019年度度杉山産業化学研究所研究助成, 令和2年度日本大学生物資源科学部学術助成研究費の助成を受けて実施致しました。

文献

- O.C. Grant, D. Montgomery, K. Ito, and R.J. Woods: Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition. *Scientific Reports*, **10**, 1–11 (2020).
- Y. Watanabe, J.D. Allen, D. Wrapp, J.S. McLellan, and M. Crispin: Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, **369**, 330–333 (2020).
- M.P. Christy, Y. Uekusa, L. Gerwick, and W.H. Gerwick: Natural products with potential to treat RNA virus pathogens including SARS-CoV-2. *Journal of Natural Products*, **84**, 161–182 (2020).
- The National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- S. Defaus, P. Gupta, D. Andreu, and R. Gutierrez-Gallego: Mammalian protein glycosylation-structure versus function. *Analyst*, **139**, 2944–2967 (2014).
- A.F. Leal, A.J. Espejo-Mojica, O.F. Sánchez, C.M. Ramírez, L. H. Reyes, J.C. Cruz, and C.J. Alméciga-Díaz: Lysosomal storage diseases: Current therapies and future alternatives. *Journal of Molecular Medicine*, **98**, 931–946 (2020).
- K. Miura and W. Hakamata: Development of fluorescent substrate for glycan processing glycosidase, and screening of the novel glycosidase inhibitor. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **32**, E 201–E 204 (2020).
- S.J. Williams and E.D. Goddard-Borger: α -Glucosidase inhibitors as host-directed antiviral agents with potential for the treatment of COVID-19. *Biochemical Society Transactions*, **48**, 1287–1295 (2020).
- R. Koyama, Y. Kano, K. Kikushima, A. Mizutani, Y. Soeda, K. Miura, T. Hirano, T. Nishio, and W. Hakamata: A novel Golgi mannosidase inhibitor: Molecular design, synthesis, enzyme inhibition, and inhibition of spheroid formation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **28**, 115492 (2020).
- W. Hakamata, S. Tamura, T. Hirano, and T. Nishio: Multicolor imaging of endoplasmic reticulum-located esterase as a prodrug activation enzyme. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **5**, 321–325 (2014).
- 恩田桃子, 石渡明弘, 袴田航, 平野貴子, 伊藤幸成, 遠矢幸伸, 西尾俊幸: カルボリン誘導体の小胞体グルコシダーゼ II 阻害による抗ウイルス活性, 日本農芸化学会関東支部 2018 年度支部大会講演要旨集, pp. 7(2018).
- K. Miura, T. Tsukagoshi, T. Hirano, T. Nishio, and W. Hakamata: Development of fluorogenic substrates of α -L-fucosidase useful for inhibitor screening and gene-expression profiling. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **10**, 1309–1313 (2019).
- K. Miura, Y. Aoyama, Y. Natsu, R. Koyama, T. Hirano, T. Nishio, and W. Hakamata: Development of specific fluorogenic substrates for human β -N-acetyl-D-hexosaminidase A for cell-based assays. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **68**, 526–533 (2020).
- W. Hakamata, K. Miura, T. Hirano, and T. Nishio: 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **23**, 73–79 (2015).
- K. Miura, W. Hakamata, A. Tanaka, T. Hirano, and T. Nishio: Discovery of human Golgi β -galactosidase with no identified glycosidase using a QMC substrate design platform for *exo*-glycosidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **24**, 1369–

1375 (2016).

- J.H. Zhang, T.D. Chung, and K.R. Oldenburg: A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening*, **4**, 67–73 (1999).
- K. Miura, C. Onodera, M. Takagi, R. Koyama, T. Hirano, T. Nishio, and W. Hakamata: Screening, synthesis, and evaluation of novel isoflavone derivatives as inhibitors of human Golgi β -galactosidase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **68**, 753–761 (2020).
- B. Korber, M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, R. Lapedes, B.H. Hahn, S. Wolinsky, and T. Bhattacharya: Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*, **288**, 1789–1796 (2000).
- M. Onda and W. Hakamata: Antiviral activity and mechanism of action of endoplasmic reticulum glucosidase inhibitors: a mini review. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **30**, E 139–E 145 (2018).
- M.B. Zeisel, E. Crouchet, T.F. Baumert, and C. Schuster: Host-targeting agents to prevent and cure hepatitis C virus infection. *Viruses*, **7**, 5659–5685 (2015).
- B.D. Walker, M. Kowalski, W.C. Goh, K. Kozarsky, M. Krieger, C. Rosen, L. Rohrschneider, W.A. Haseltine, and J. Sodroski: Inhibition of human immunodeficiency virus syncytium formation and virus replication by castanospermine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**, 8120–8124 (1987).
- R.A. Gruters, J.J. Neeffjes, M. Tersmette, R.E. de Goede, A. Tulp, H.G. Huisman, F. Miedema and H.L. Ploegh: Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase. *Nature*, **330**, 74–77 (1987).
- E.C. Clarke, R.A. Nofchissey, C. Ye, and S.B. Bradfute: The iminosugars celgosivir, castanospermine and UV-4 inhibit SARS-CoV-2 replication. *Glycobiology*, cwa091 (2020).
- W. Hakamata, R. Ishikawa, Y. Ushijima, T. Tsukagoshi, S. Tamura, T. Hirano, and T. Nishio: Virtual ligand screening of α -glucosidase: Identification of a novel potent noncarbohydrate mimetic inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**, 62–64 (2012).
- W. Hakamata, M. Muroi, T. Nishio, T. Oku, and A. Takatsuki: Recognition properties of processing α -glucosidase I and α -glucosidase II. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **23**, 27–39 (2004).

質疑応答

[質問]

東京大学大学院 伏信進矢

このストラテジーで特に作りにくい糖はあるのでしょうか？ 物性改善の余地があるということですが、どこをどう改善したらよい、というお考えはありますでしょうか？

[回答]

ストラテジーにという観点では糖による違いはないと考えています。ただし、官能基の種類が多いシアル酸では合成の難易度は高く、フラノースでコンセプトが機能するかは不明です。見出した阻害剤は結晶性が高く溶解性が低い特徴をもっています。望む物性ではないので、阻害剤の平面性の崩壊および極性表面積の増大を目指した構造展開が必要であると考えています。

[質問]

静岡大学農学部 中村彰彦

開発された蛍光基質は糖鎖切断後にチロシン化してしまうと蛍光が出ないとのことでしたが、酸性条件では蛍光が出にくいのでしょうか。また宿主をターゲットとする抗ウ

ウイルス剤は副作用が強いのではないかと考えられますが、いかがでしょうか？

[回答]

酸性条件で蛍光が出にくいかな否かは用いる蛍光団に依存します。酸性条件で蛍光が減弱しにくい蛍光団を選択することが可能です。本研究では、酸性条件でも蛍光の減弱が小さい蛍光団を用いています。

ご指摘のとおり、宿主をターゲットとする抗ウイルス剤 HTAs は副作用が強い可能性はありますが、薬剤耐性ウイルスの出現回避やウイルス感染予防薬としてのメリットも大きいと考えています。最近では、ウイルス感染時に起こる特異的な宿主の反応をターゲットとする研究も行われています。

[質問]

農研機構食品研究部門 徳安 健

1) アグリコン構造を大胆に変えて複数種類について試すことで、天然酵素の反応特性を複数のアグリコンに対するレスポンスとしてパターン化して機能予測に繋げるなどの、新たなアプローチが期待される。既に具体的に取り組まれているか。

2) 非還元末端の構造を側鎖を含めて多様に変えて反応測定基質とすることで、有機合成の利点を活かし、天然界の非還元末端の多様な役割に迫れるものと期待される。既に具体的に取り組まれているか。

[回答]

両質問は今後の研究に大きな示唆を与える貴重なご提案と感じております。提案については全く手つかずですので、今後検討させていただきたいと思います。