

研究題目：小胞体グルコシダーゼ阻害によるウイルス再構成制御に基づく抗ウイルス薬の開発

日本大学 生物資源科学部  
生命化学科 袴田 航

抗ウイルス薬開発を目的とした本研究助成を申請させていただいた 2018 年末、新型コロナウイルス感染症のパンデミックは当然予想されていなかった。2019 年末に武漢を発生源とした新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が全世界で猛威を奮い、現在でも深刻な公衆衛生上の問題となっている。しかし、COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 に使用可能な抗ウイルス薬は限られている。日本では重篤な症状に対してエボラ出血熱およびマールブルグウイルス感染症薬であるレムデシビル (商品名：ベクルリー) を、比較的な軽症な場合は抗インフルエンザ薬であるファビピラビル (商品名：アビガン) を転用し投与している。新型コロナウイルス感染症以前でも、MARS・SARS・エボラ出血熱・デング熱・新型インフルエンザといった新興・再興ウイルス感染症が続々と出現し人類に深刻な脅威を与え続けていた。このようにこれらのウイルス感染症および将来的に発生が予想される未知のウイルス感染症への対応は、人類の克服すべき課題の 1 つとなっている。

我々は本パンデミック以前から、新興・再興ウイルス感染症のパンデミックへの寄与を目指し抗ウイルス薬の開発研究を行っている。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 (Direct-acting antivirals, DAAs) と宿主標的型抗ウイルス剤 (Host-targeting antivirals, HTAs) に大別できる。DAAs はウイルス固有の生体分子やプロセス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。一方、HTAs はウイルスの宿主内における特異的なプロセスやそれらに関連する生体分子を標的とする。HTAs は DAAs と比べ薬剤耐性ウイルスの出現頻度を大幅に低下させること、かつ未知のウイルス感染症への対応が原理的に可能である利点がある。本研究では、HTAs の標的酵素として、多くのウイルスの感染・増殖に必須な N-結合型糖鎖合成に関与する小胞体グルコシダーゼ II (ERGII) を選択した。本酵素の阻害はウイルス糖鎖の成熟を阻害し、ウイルスの宿主細胞内での再構成および出芽ウイルスの感染力を大幅に低下させる。本研究では、強力な ERGII 阻害剤を見出し、その阻害剤と基盤とした新規 HTAs の開発を目指している。

これまでに我々は、目的とする抗ウイルス薬のシード化合物とするため ERGII 阻害剤のバーチャルスクリーニングおよび化合物ライブラリーからのスクリーニングを行い、いくつかの阻害剤を見出した。これら得られた阻害剤のなかから、カルボリンを母核とする阻害剤に焦点をあて、有機合成手法を用いた構造展開を行い、さらなる酵素阻害活性の向上を目指すこととした。本研究においては、右図に示したカルボリンを母核とする阻害剤 AR407 (図 1) を対象化合物とした。将来的に AR407 を抗ウイルス薬とするためには、より高い ERGII 阻害活性

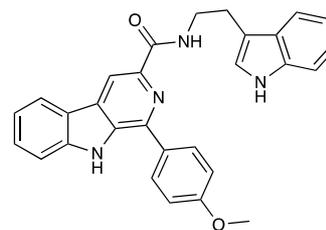


図 1 AR407 の構造

と抗ウイルス活性が求められる。そのためには、ERGII とのドッキングシミュレーションに基づく AR407 の論理的構造展開が最も効率的であると考えた。ドッキングシミュレーションを実施するためには、AR407 がヘテロダイマー構造を持つ GII のどちらのサブユニットに結合するか明らかにする必要がある。しかしながら、シミュレーションに必要なヒト由来 ERGII の結晶構造が報告されていなかった。そこで、立体構造の報告があったマウス由来 ERGII が代用可能であるか評価した。その結果、マウス由来 ERGII とヒト ERGII の全体配列一致度は 92 % と非常に高く、活性部位を構成するアミノ酸残基は完全に保存されていた (図 2) ため、マウス由来 ERGII 代替構造として適切であると判断した。

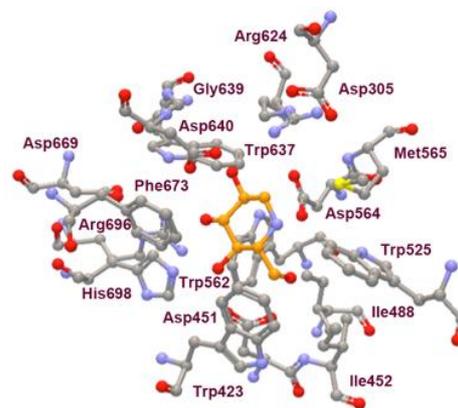


図 2 マウス由来 ERGII の活性部位

次に AR407 がヘテロダイマー構造を持つ GII のどちらのサブユニットに結合するか光親和性標識法を用いて明らかにすることとした。そこで AR407 を基にした光親和性プローブを設計するために、AR407 とマウス由来 ERGII 活性部位とのドッキングシミュレーションを行い、リガンドの結合様式を確認した。その結果、AR407 のインドール部分が ERGII の活性部位の奥深くに入り込み、メトキシ基は活性部位の外側に位置していることを確認した。本結果に基づき、活性部位に結合しないメトキシ基部位からリンカーを伸長し、光反応性基を導入することとした。光反応性基には、酵素との反応効率や酵素への反応特異性が高いとされるベンゾフェノン用い、その末端に三重結合を導入した光親和性プローブを設計した (図 3)。生体内に三重結合を持つ化合物は存在しないことから、三重結合を有するタンパク質は本プローブが結合したタンパク質であると決定できる。

光親和性プローブの合成は、AR407 が天然物であることに着想を得て、L-トリプトファンメチルエステル塩酸塩を合成出発原料とした。はじめに、トリプトファンと 4-ニトロベンズアルデヒドをピクテ・スベングラール反応により結合し飽和カルボリン誘導体を得た。新規に構築された窒素原子を含む六員環を過マンガン酸カリウムで酸化し、カルボリン骨格を持つ化合物を得た。次に、化合物のメチルエステルを塩基で加水分解しカルボキシ基に変換した。得られたカルボキシ基に対して、DMT-MM を縮合剤としてトリプタミンをアミド結合で導入した。これら一連の反応により AR407 部分の合成に成功したため、光親和性標的に必要となる光反応性基は得られた化合物のニトロ基をアミノ基に還元し導入することとした。ニトロ基は水素雰囲気下で水酸化パラジウム-活性炭にて還元しアミノ基とした。得られたアミノ基に無水コハク酸を反応させアミド結合を形成するとともに 4 原子のリンカーを導入した。しかしながら、標的酵素の分子サイズは大きいと予測されたため、リンカーを延長することとした。そこで、初期リンカー導入化合物の末端カルボキシ基に 10 原子長のポリエステルグリ

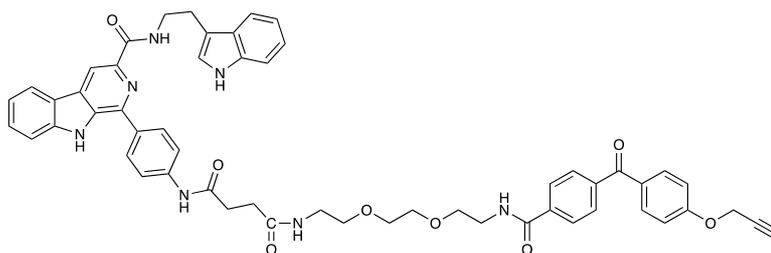


図 3 AR407 を基にした光親和性プローブの構造

コールリンカーをアミド結合で導入し、計 14 原子リンカーとした。次にリンカー末端のアジド基を水素雰囲気下パラジウム-フィブロインでアミノ基に還元した。最後に、得られたアミノ基に別途合成を行った光反応性基を導入した。光反応性基導入の効率が悪く、かつ得られた最終化合物の単離生成は困難を極めたため、以降の実験は若干の不純物を含んだものを試料として実施した。

合成したプローブによる光親和性標識は、ヒト培養細胞 (HeLa) を用いて行った。培養にプローブを投与、6 時間培養後に 365 nm の紫外線照射しプローブ内の光反応性基を励起しプローブ結合タンパク質を光標識化した。光照射細胞のライセートを作成し、光ラベル化タンパク質中に含まれる三重結合に対してアジド化ビオチンをクリック反応により結合した。その後、タンパク質の酸沈殿により全タンパク質を回収した。回収タンパク質からビオチン化タンパク質のみをアビジン結合樹脂によるアフィニティー精製により回収した。精製されたタンパク質はビオチン化されており、言い換えると合成プローブと結合していたタンパク質といえる。次に精製タンパク質の SDS-PAGE 電気泳動を行い、銀染色法によりプルダウンタンパク質を解析した (図 4)。銀染色では、ERGII  $\alpha$  サブユニット (100 kDa) とと思われるバンドが確認できたが、ERGII  $\beta$  サブユニット (80 kDa) 付近のバンドは確認できなかった。今後ウエスタンブロット法にてプルダウンした

タンパク質を確認するために本系で機能する抗  $\alpha$  and  $\beta$  抗体を見出すことができた (図 4)。以上の結果から、AR407 の結合部位は  $\alpha$  サブユニットであることが示唆されたため、今後はウエスタンブロット法での標的ユニットの同定が必要であると考えられる。化合物の標的サブユニットが同定された際には、AR407 の論理的構造展開が可能となり阻害剤開発に大きな進展が期待できる。

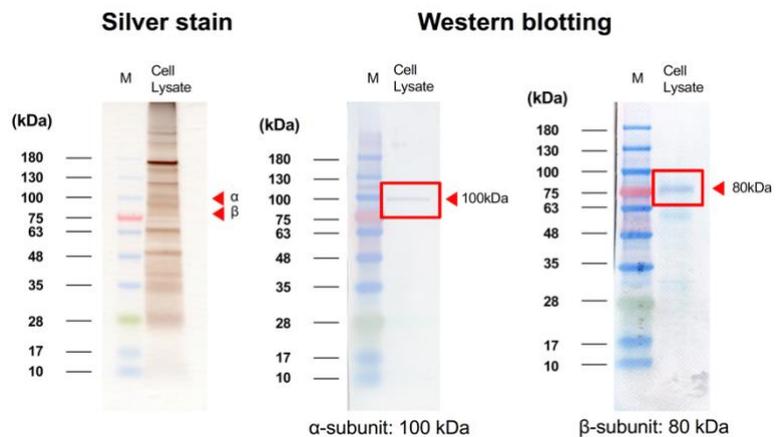


図 4 標識タンパク質の銀染色とウエスタンブロットティング

本研究は将来的に発生が予想されていた新規なウイルス感染症のパンデミックに備える研究として開始された。その矢先に COVID-19 のパンデミックが発生した。抗ウイルス薬をはじめ、医薬品の開発には多くの時間を要する。本研究は COVID-19 のパンデミックに直接役立つことはできなかったが、今後起こりうるウイルスパンデミックに対して有効な手段となる抗ウイルス薬開発の一助になるよう本研究を推進する。

## 謝辞

助成いただいた研究期間中に COVID-19 のパンデミックが発生し研究現場は混乱状態に陥り、予定通りに研究を実施することができませんでした。その様な事態に際しても、研究期間の延長等の様々なご配慮をいただきましたこと心より感謝申し上げます。多大なるご支援を頂いた杉山産業化学研究所様に厚く御礼申し上げます。