

## 生薬由来化合物をライブラリとした抗ウイルス剤の探索

申請代表者	袴田 航	日本大学 生物資源科学部 生命化学科	准教授
所外共同研究者	三浦 一輝	日本大学大学院 生物資源科学研究科	大学院生
所外共同研究者	小山 亮祐	日本大学大学院 生物資源科学研究科	大学院生

### ■背景・目的

現在、新型インフルエンザやトリインフルエンザのヒトへの感染など続々と出現する新興・再興ウイルス感染症は人類の脅威となっている。しかし、抗ウイルス薬は抗生物質に比べ、十分な作用機序・薬剤多様性を持つには至っていない。そのため、ウイルス感染機序に基づく分子標的が明確な抗ウイルス薬の探索・開発が急務となっている。そこで本研究では、ウイルスが細胞内で自己増殖する際に宿主機構を巧みに利用している事に着目し、多くのウイルスの感染・増殖に必須な宿主機構である、*N*結合型糖鎖プロセシング酵素を分子標的とした。これらの酵素は、ウイルスコートタンパク質に糖鎖修飾を行う酵素であり、これらの阻害はウイルス粒子の成熟を阻害し、抗ウイルス活性を示す。これら糖鎖の合成を司る糖鎖プロセシング酵素の阻害剤を生薬由来化合物よりスクリーニングし、抗ウイルス薬のリード化合物を得る事を目的とする。

### ■結果・考察

ヒト培養細胞において、糖鎖修飾に関与する小胞体グルコシダーゼおよび関与されると推定されるグリコシダーゼ（ガラクトシダーゼおよびアロシダーゼ）の活性を検出可能な蛍光基質の開発に成功し、培養細胞レベルで標的酵素の酵素活性が評価可能となった。そこで、これらの基質を96穴プレートに培養した HeLa 細胞に添加し標的とした酵素阻害剤のハイスループットアッセイ系を開発するため、以下の点について検討を行った。

最適基質の決定：ハイスループットアッセイを効率的に行うため、励起波長および蛍光波長が異なる3色の蛍光団（赤・青・緑）を有する蛍光基質を96穴プレートに培養した培養細胞に加えて、それぞれの蛍光強度を蛍光プレートリーダーにより測定した。検出感度の検討を行い最適な基質を検討した結果、緑色蛍光基質が最適基質であると判断した。

既知阻害剤を用いたアッセイ系の評価：蛍光基質を96穴プレートに培養した培養細胞に緑色蛍光基質を投与し蛍光プレートリーダーを用いて蛍光を測定する系を確立した。その際は細胞レベルアッセイに必要な精度が維持されていることを確認した。

以上の結果より、細胞培養と蛍光測定が可能な96ウェルプレートに培養した HeLa 細胞に緑色蛍光基質と阻害剤を投与し、生じた蛍光を蛍光プレートリーダーにより測定する事により、化合物の阻害活性を測定可能な培養細胞を用いたハイスループット阻害剤スクリーニング系を確立した。

### ■結論

以上、本ハイスループットスクリーニング系を用いて、貴学の化合物ライブラリから阻害剤スクリーニングが可能となった。そこで生薬由来化合物については阻害剤スクリーニングを行い、小胞体グルコシダーゼを強く阻害する化合物が9種、ガラクトシダーゼを強く阻害する化合物が3種、アロシダーゼを強く阻害する化合物が5種得られた。しかしながら、生薬エキスおよび漢方剤エキスセットについては試料の自家蛍光が強く阻害剤探索は成功しなかった。