

平成30年 6月28日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09672

研究課題名(和文) おとりRNAを利用したパラミクソウイルスの新規治療戦略に関する研究

研究課題名(英文) Establishment of a new therapeutic for the treatment of paramyxoviruses by using a mimic of viral genomic RNA.

研究代表者

原 好勇 (Hara, Koyu)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：40309753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：パラミクソウイルスには共通して遺伝子の両末端に非翻訳領域が存在する。当初、この領域を模倣した「おとりRNA」が抗ウイルス作用を示すかRSVをモデルに検討したが、十分な成果が得られなかった。そこで「おとり」として作用しそうな他のウイルスの構成成分に着目したところ、Pタンパク質の欠損変異型(P断片)に非常に強い抗ウイルス作用があることを見出した。その活性部位はPのC末端側82アミノ酸にあることを特定した。さらにP断片は正常型Pに非常に強く結合しウイルスのポリメラーゼ活性を阻害することを明らかにした。これらの結果からP断片はRSVに対する抗ウイルス薬としての可能性を大きく秘めていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Paramyxoviruses have a non-coding sequence (NCS) at both 5'-end and 3'-end of the genome. We assessed antiviral activities against paramyxoviruses by using interfering RNA that mimicked the NCS. However, its attempts were unsuccessful. Then, we evaluated whether peptides or small proteins derived from the ribonucleoprotein (P, L, N, M2-1) could be used as dominant negative inhibitors to inhibit viral replication. We found that the C-terminal 82 amino acids of P (P Fr) had a substantial anti-viral activity for respiratory syncytial virus (RSV). A pull-down experiment of P Fr showed that P Fr strongly interacts with full-length P and inhibits the viral RNA polymerase activity. Our results indicate that P Fr is a promising candidate for further development of antiviral drug for the treatment of paramyxoviruses, as well as RSV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パラミクソウイルス RSVウイルス 抗ウイルス薬 RNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

呼吸器感染症は小児の疾患の中で非常に頻度が高く、入院患者の約4割を占める。その入院患者のうち3~4割は細菌性、6~8割はウイルス性である。細菌に対しては既に有効な抗菌薬が存在し、治療法が確立されている。しかし、ウイルスに対して有効な治療薬はほとんどなく、その研究開発も大きく立ち後れている。乳幼児では特にRSウイルス(RSV)が最も呼吸器感染症を重症化させやすく、次いでライノウイルス、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)、ヒトボカウイルス、パラインフルエンザウイルス(PIV)、インフルエンザウイルス、アデノウイルスなどがある。メディアは毎年インフルエンザを大きく取り上げるが、実は重症乳幼児でのインフルエンザウイルスの検出頻度は低い。またインフルエンザにはワクチンおよび治療薬が既に存在する。ところが、他の呼吸器ウイルスに対しては未だ治療薬がなく、毎年の流行期には乳幼児に深刻な脅威を与えている。RSVに対しては、以前ワクチンが開発された。しかし、ワクチンはかえってRSV感染を重症化させたため中止になりワクチン開発は頓挫した。また米国でRSVに対する抗体薬パリピズマスが開発・実用化されたが、コストが高すぎるため一般には広く普及していない。乳幼児にとって最も注意すべきRSVでさえ、その対策はほぼ放置状態にあり、治療・予防法は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

パラミクソウイルスは乳幼児の呼吸器感染症を重症化させるリスクが非常に高いウイルスである。しかし、未だに有効な抗ウイルス薬が存在しない。そこで本研究では、抗パラミクソウイルス薬を開発し、パラミクソウイルス感染症の治療法確立につなげ、乳幼児を呼吸器感染症の脅威から守ることを目的とする。

3. 研究の方法

呼吸器ウイルスで検出頻度の高いRSV、HMPVおよびPIVは同じパラミクソウイルス科に属し、同じ遺伝子構造をもつ。ゲノムはマイナス鎖RNAで、ゲノム両末端に非翻訳領域を有する。ゲノムの中でも特に3'末端の非翻訳領域RNAのとる立体構造は、ウイルス自身のRNA複製酵素を強く引き寄せ結合させ、ウイルス自身の遺伝情報を読み取らせるのに欠かせない。3'末端非翻訳領域に結合したRNA複製酵素は遺伝情報を読み取りながら、ウイルス遺伝子を大量に複製し、ウイルス粒子の大量生産を始める。そこで本研究では、3'末端非翻訳領域とRNA複製酵素の強い親和性に着目し、逆にこれを創薬に利用することを考えた。即ち、3'末端非翻訳領域の短いRNAを、いわゆるウイルスへの「おとり(decoy)RNA」として投与すれば、ウイルスRNA複製酵素に選択的に強力に結合し、酵素

活性を喪失させることができる、と考えている。その結果、RNA複製酵素が感染細胞内で枯渇し、ウイルスの増殖を止めることができると予想している。また3'末端非翻訳領域はパラミクソウイルス内で高度に保存性されているため、パラミクソウイルス全般に効果的な抗ウイルス薬になるはずである。

具体的な方法としては、まずパラミクソウイルスのモデル系としてRSVを用い、3'末端非翻訳領域RNAの抗ウイルス効果を評価する実験系を確立する。その後、50~100塩基の3'末端非翻訳領域を10~20塩基程度まで抗ウイルス活性を保持したまま短縮化する。短縮化後、RNAを人工合成し、動物を使って阻害効果の検証を行い、製剤化を目指す。

4. 研究成果

RSウイルスの実験系を構築するために、初年度はまずミニゲノムアッセイ系をEleouet博士(仏)から分与してもらい実験系を整えた。このアッセイ系はRSVの内部遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置き換えたもので、ルシフェラーゼの発光強度を測定することでウイルスの増殖程度を間接的に知ることができる。

2年目はこのアッセイ系を使い、当初の計画通り「おとりRNA」を作用させウイルス増殖が阻害されるか検討した。しかし、予想に反し「おとりRNA」の阻害作用が小さく十分な抗ウイルス作用が得られなかった。そこで当初の計画を変更し、「おとり」として作用しそうな他のウイルスの構成成分4種類(P, N, L, M2-1)に着目した。4種類それぞれについて欠損変異型を作製し、これらを正常型と競合阻害させ、ウイルス増殖を抑えるものがあるかどうか検討した。その結果、Pタンパク質の欠損変異型(以後P断片と略)にウイルス増殖を著しく阻害する効果があることを見出した。一方、実際にP断片を抗ウイルス薬として使用するには、できる限り分子量を小さくし、細胞内に取り込まれやすくする必要がある。そこで、阻害活性に不要な部分を逐次削り込んだ結果、82アミノ酸まで低分子化することに成功した(図1)。

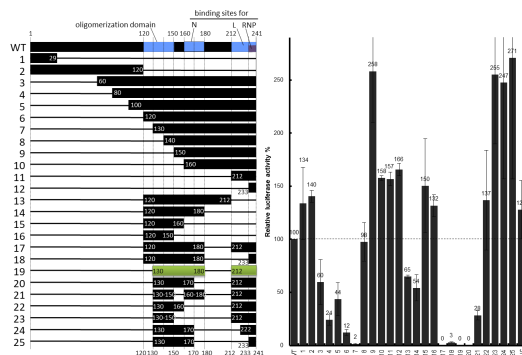


図1. RSウイルスP断片のポリメラーゼ活性阻害効果(#19のP断片が最も強い阻害効果を示した)

そして3年目はP断片の阻害作用の機序を明らかにした。P断片の標的となる分子を探すため、その候補と考えられる4種類のウイルスタンパク質(P、L、N、M2-1)に着目し、それぞれにタンデムアフィニータグ(TAP タグ)を付加した。それぞれの標的候補をP断片と共に培養細胞内で同時発現させTAP 精製法により各標的候補をそれぞれ精製した。その結果、P断片は正常型Pと非常に強く結合することが分かり、P断片の主な標的は正常型Pであることを突きとめた。本来、Pは4量体となりウイルスのRNAポリメラーゼをウイルス遺伝子上の転写・複製が始まる部位へと正確に運搬する働きをする。ここへP断片が加わると、正常型Pの機能が損なわれ、その結果RNAポリメラーゼが正常に運搬されなくなり、ウイルス遺伝子の転写・複製が停止すると推測している(図2)。3年間の研究で見出したP断片は、抗ウイルス薬としての可能性を大きく秘めているため、現在も研究を継続している。

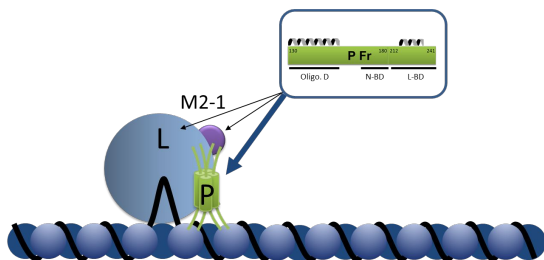


図2. RSウイルスP断片の標的部位(P断片はPの4量体化を阻止することでポリメラーゼ活性を阻害するものと示唆された)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Hara K, Kashiwagi T, Hamada N, and Watanabe H. Basic amino acids in the N-terminal half of the PB2 subunit of influenza virus RNA polymerase are involved in both transcription and replication. J Gen Virol、査読有り、98、2017、900-905.

〔学会発表〕(計3件)

八板謙一郎、原好勇、柏木孝仁、渡邊浩「RSウイルスの欠損型PはRSウイルスのポリメラーゼ活性を阻害する」第87回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同開催、長崎、2017.10.27.

Yaita K, Hara K, Khamrin P, Kashiwagi T, Hamada N, and Watanabe H. The C-terminal region of the respiratory syncytial virus phosphoprotein has an inhibitory effect on the polymerase activity. International Union of

Microbiological Sciences 2017, Sands Expo and Convention Centre, Singapore, 2017.7.17.

八板謙一郎、原好勇、柏木孝仁、濱田信之、渡邊浩「RSウイルスのPタンパク質C末端領域はウイルスRNPの合成を抑制する」第91回日本感染症学会総会・学術講演会、第65回日本化学療法学会学術集会 合同学会、東京、2017.4.6.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/virol/jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原好勇 (HARA, Koyu)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号: 40309753

(2) 研究分担者

柏木孝仁 (KASHIWAGI, Takahito)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号: 70320158

渡邊浩 (WATANABE, Hiroshi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 90295080

- (3)研究分担者：なし
 - (4)連携研究者：なし
 - (5)研究協力者：なし
-