

令和元年6月5日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08822

研究課題名(和文)新規エンテロウイルス複製阻害剤の探索および標的宿主因子の同定

研究課題名(英文) Exploration for novel anti-enterovirus compounds and identification of target host factors

研究代表者

有田 峰太郎 (Arita, Minetaro)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：70356244

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)：PI4KB/OSBP阻害剤に部分的な耐性を示すポリオウイルス変異株の解析を行い、その耐性変異がウイルスタンパク質3ABのウイルスプロテアーゼによる切断効率を上昇させることを見出した。作用機序不明の抗エンテロウイルス化合物MDL-860の解析を行い、これまで知られていなかったPI4KBのアロステリック制御機構を発見した。さらに、PI4KB/OSBP阻害剤にほぼ完全な耐性を示すポリオウイルス変異株が試験管内では存在していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PI4KB/OSBP経路は、エンテロウイルスの複製に必要と考えられている宿主の経路であり、かつ低い細胞毒性を示す抗エンテロウイルス化合物の標的でもあるため、ウイルス複製における役割の解明が期待されています。今回の研究の中で、世界で初めてPI4KBのアロステリック制御機構を発見し、またPI4KB/OSBP阻害剤に耐性を示すウイルスの複製機構の一端の解明に成功しました。これらは、ウイルスの複製の本質およびウイルスの進化に関する学術的な重要性を持つ知見であるとともに、将来的には抗ウイルス治療におけるウイルスの耐性動態を制御出来る技術の開発にもつながることも期待されます。

研究成果の概要(英文)：We analyzed poliovirus mutants that showed partial resistance to inhibitors to host PI4KB/OSBP proteins, and found that the resistance mutation in viral 3A protein enhances the cleavage of viral 3AB protein by viral protease. We identified the target of previously uncharacterized anti-enterovirus compound MDL-860 as PI4KB, and discovered allosteric regulation of PI4KB via modification of cysteine residue at amino acid 646 by MDL-860. We isolated a poliovirus mutant that could show substantially complete resistance to PI4KB/OSBP inhibitors in vitro.

研究分野：ウイルス学

キーワード：抗ウイルス薬 ウイルス 複製 宿主因子 PI4KB OSBP エンテロウイルス ポリオウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトエンテロウイルス(HEV)は、ヒトに感染した場合、主に不顕性もしくは軽度の症状を引き起こすのみだが、稀に重度の神経症状を引き起こす。特に神経親和性が高いHEVとして、小児麻痺を引き起こすポリオウイルス(PV)および致死的な肺水腫を引き起こすエンテロウイルス71(EV71)が知られている。これらのウイルスに対するワクチンは開発されているが、不顕性感染者からのウイルスの排出や、ウイルス感染による神経症状の急激な悪化を抑制するための抗ウイルス薬の必要性が認識されている。そこで、抗エンテロウイルス薬の候補化合物としてこれまでに同定したPI4KB/OSBP阻害剤の作用機序の解明および作用機序不明の抗エンテロウイルス化合物の解析を試みた。

2. 研究の目的

抗ウイルス薬の候補化合物としての宿主のPI4KB/OSBP経路の阻害剤の作用機序を明らかにし、抗エンテロウイルス化合物MDL-860の作用機序を解明する。

3. 研究の方法

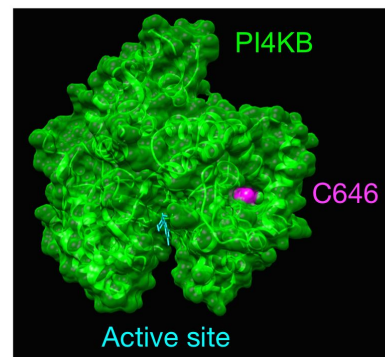
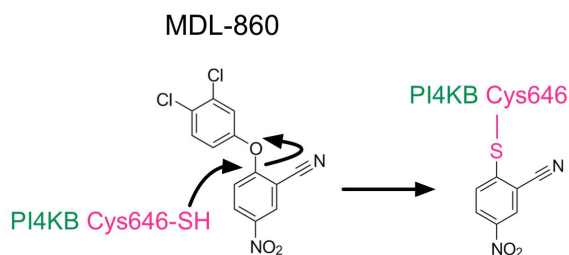
- 1) PI4KB/OSBP阻害剤に部分的に耐性を示すPV変異株と親株のPV感染に関する定量的フェノタイプ解析を行う。1) PI4Pの量の定量、2)ウイルスタンパク質の定量を行う。PI4Pの量は、flow cytometryを用いて行う(Arita, 2014, *Microbiol Immunol*)。ウイルスタンパク質の定量は、抗ウイルスタンパク抗体(2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3Dタンパクに対する抗体)を用いてWestern blotおよびflow cytometryを用いて行う。
- 2) PI4KB耐性を与えるウイルスタンパクの同定を行う。各ウイルスタンパク質を細胞に発現させて、準至適濃度のPI4KB阻害剤存在下でPVを感染させ、PV感染をレスキューできる活性を示すウイルスタンパクを同定する。
- 3) MDL-860に対する耐性ウイルスを同定する。抗エンテロウイルス化合物耐性PVライブラリー(Arita *et al.*, 2013, *J Virol*)を用いた耐性変異の同定を行う。耐性ウイルスのライブラリーから同定されない場合には、ウイルス感染細胞をMDL-860で処理して、耐性ウイルスの回収を行う。
- 4) MDL-860の細胞に与える影響を解析する。MDL-860で処理した細胞の宿主遺伝子の発現変化をマイクロアレイを用いて解析する。コントロールとして、PI4KB阻害剤等の既知の阻害剤で処理した細胞との比較を行、標的と考えられる候補経路を同定する。
- 5) MDL-860の標的を同定する。同定された候補経路の中で働いている遺伝子に対して、TISS法(Target Identification by siRNA sensitization法)を行い、標的遺伝子を同定する。
- 6) 同定されたタンパク質を、siRNAもしくはCRISPR/Cas9を用いて、ノックダウンもしくはノックアウトしてウイルス複製への影響を確認する。
- 7) 植物抽出液ライブラリーを用いて、抗エンテロウイルス活性をしめす非PI4KB/OSP阻害剤のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

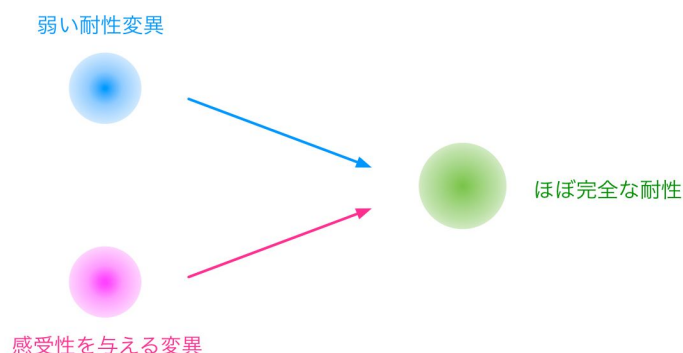
PI4KB阻害剤に部分的な耐性を示すPV変異株の解析を行った。その結果、代表的な耐性変異であるG5318A変異(3A-Ala70Thr変異)は、ウイルスタンパク3ABのウイルズプロテアーゼによる切断効率を上昇させることを見出した。G5318A変異以外の耐性変異についても検討したところ、3ABタンパク質の切断効率とPI4KB阻害剤に対する耐性に正の相関があることが示された。これらの結果から、3Aタンパク内のG5318A変異(3A-Ala70Thr変異)の直接の標的は3ABタンパクであり、その作用機序は3ABの切断効率を上昇させることであることが示唆された。PI4KB阻害剤の存在下でのPV感染細胞中のホスファチジルイノシトール-4-リン酸(PI4P)の量を定量した結果、3Aタンパクの高発現もしくはG5318A変異株の感染細胞でも、ウイルス感染で過剰に産生されるPI4Pの量がPI4KB阻害剤により抑制されていることがわかった(未処理感染細胞の場合の36~52%)。このことから、3Aタンパクは、宿主のPI4KBを超活性化することなしに、ウイルスの複製複合体の場の形成を促進してPI4KB阻害剤に対する部分的な耐性を示すことが示唆された。

MDL-860の抗PV活性を、耐性PV変異株パネルを用いて解析した結果、G5318A変異により耐性が生じることが判明した。そのため、MDL-860のPI4KB活性およびOSBPの細胞内局在への影響を解析したが、興味深いことにMDL-860はin vitroのPI4KB活性を全く阻害

せず、また OSBP の局在変化も誘導しないことが示された。このことから、MDL-860 は、既知の PI4KB 阻害剤もしくは OSBP 阻害剤とは異なる新規の作用機序を示す抗ウイルス化合物であることが示唆された。さらに詳細な解析を進めた結果、MDL-860 処理 PV 感染細胞では、既知の PI4KB 阻害剤と比べて効果が表れる時期が 2~3 時間遅れるものの、PI4P の量が低下し、ウイルス複製複合体から OSBP が解離すること、MDL-860 処理細胞は不可逆的な抗 PV 活性を示すことが判明した。MDL-860 処理細胞のトランスクリプトーム解析の結果、MDL-860 は抗酸化応答経路 NRF2/KEAP1 経路を活性化することが示唆された。これらの結果から、MDL-860 がシステイン残基への共有結合を介して不可逆的に PI4KB の活性を阻害することが予想された。そこで MDL-860 存在下で発現させた PI4KB を精製して in vitro で活性を測定した結果、未処理細胞から精製した PI4KB と比べて 90% 以上も活性を失っていることが判明した。PI4KB の持つ 13 個のシステイン残基をセリンに置換した変異体に対する MDL-860 の影響を調べた結果、646 番目のシステイン残基をセリンに置換した PI4KB 変異体は MDL-860 の阻害を全く受けないこと、マスペクトルの解析から MDL-860 が PI4KB の 646 番目のシステイン残基のみに共有結合していること、この PI4KB 変異体を発現した細胞では MDL-860 の抗 PV 活性が見られないことが示唆された。これらの結果から、MDL-860 は、PI4KB の 646 番目のシステイン残基に直接共有結合することにより、離れた位置にある PI4KB 活性部位に影響する、アロステリック阻害剤であることが示唆された。PI4KB 活性のアロステリック制御機構およびアロステリック阻害剤はこれまでに知られておらず、本研究により初めて明らかにされた。



さらに、PI4KB 阻害剤に対する完全な耐性機構を解明するために、既知の宿主因子である PI4KB を標的として CRISPR/CAS9 でノックアウト細胞を作製した。さらに作製した PI4KB ノックアウト細胞で増殖できるポリオウイルス変異株を分離することに成功した。このウイルス変異株の解析から、1) ウイルス複製の PI4KB/OSBP 経路への依存性は培養細胞では必須ではないこと、2) PI4KB/OSBP 経路からほぼ完全に独立したウイルスの複製は、ウイルス複製器官の発達を促進する変異（弱い耐性変異。3A タンパク内の変異）と PI4KB 経路を活性化しない変異（感受性変異。2B タンパク内の変異）の 2 つに支えられていること（この 2 つの変異は、遺伝学的には recessive epistasis の関係に相当する）、3) PI4KB/OSBP 経路への依存性とインターフェロン応答への拮抗が同じ経路にあることを見出した。これらは、ウイルスの複製の本質およびウイルスの進化に関する学術的な重要性を持つ知見であり、将来的には抗ウイルス治療におけるウイルスの耐性動態を制御出来る技術の開発につながることも期待される。



宿主因子への依存性から脱却するポリオウイルスの進化方法

植物抽出液からのスクリーニング系として、疑似ウイルスを用いた系を検討したが、検討した濃度で毒性が強いものが多く、このスクリーニングでは有効ではなかった。そのため、ウイルスを用いた再度スクリーニングを行い、得られた複数の候補抽出液について現在解析を行っている段階である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Minetaro Arita, and Joëlle Bigay. 2019. Poliovirus evolution toward independence from the phosphatidylinositol-4 kinase III β /oxysterol-binding protein family I pathway. ACS Infectious Diseases, 査読あり、in press, 2019
DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00038

Minetaro Arita, Georgi Dobrikov, Gerhard Pürstinger, Angel Galabov. Allosteric regulation of phosphatidylinositol 4-kinase III beta by an anti-picornavirus compound MDL-860. ACS Infectious Diseases, 査読あり、 3: 585-594, 2017
DOI: 10.1021/acsinfecdis.7b00053

Minetaro Arita. Poliovirus studies in the endgame of the polio eradication program. Japanese Journal of Infectious Diseases, , 査読あり、 70: 1-6, 2017
DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.356

〔学会発表〕(計 3 件)

有田 峰太郎、宿主因子を標的とするポリオウイルス複製阻害剤の探索、第 89 回日本生化学大会、2016

有田 峰太郎、宿主因子を標的とする抗エンテロウイルス化合物の探索およびウイルス複製/宿主細胞への影響の解析、日本薬学会第 137 回年会、2017

有田 峰太郎、ポリオウイルスの複製における脂質輸送機構の解析、第 60 回日本脂質生化学会、2018

〔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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。