

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05985

研究課題名（和文）エボラウイルスの選択的複製阻害剤を用いた複製機構の解明と創薬基盤の構築

研究課題名（英文）Elucidation of Replication Mechanisms and Development of Drug Discovery Platforms Using Ebola Virus Replication Inhibitors

研究代表者

小川 健司（OGAWA, Kenji）

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50251418

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、VP35多量体形成評価系をハイスループットフォーマットに応用展開し、東京大学創薬機構化合物ライブラリー（約210,000化合物）の大規模スクリーニングを実施した。EBOVミニゲノムアッセイを用いた高次スクリーニングにおいて、EBOVの複製を濃度依存的に阻害する13化合物が得られた。更に、EBOVミニゲノムアッセイ系を応用し、EBOV複製を効率的に阻害する変異型EBOV組換えタンパク質の開発に成功した。本研究によりVP35の創薬標的としての可能性が明らかとなった。この成果は「フィロウイルス科ウイルス複製阻害剤」として特許を出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBOVは、その驚異的な感染性と致死率からWHOの「リスクグループ4」に指定され、ウイルスの取り扱いには最高度安全実験施設（BLS4）が必要である。本研究では、感染性を有するウイルスを使用せず、ウイルスタンパク質を細胞に発現させることにより、複製その過程を数値化するアッセイ系を構築した。VP35を標的とした化合物の大規模探索では、EBOV複製を濃度依存的に阻害する13化合物が得られた。またEBOV複製を効率的に阻害する組換えタンパク質の作製に成功し、VP35の創薬標的としての可能性を明らかにした。本研究で開発した技術は、病原性の高いウイルスや未知のウイルスに即時対応可能な創薬基盤となり得る。

研究成果の概要（英文）：We have applied an assay for measuring EBOV VP35 multimer formation into a high-throughput format and conducted a High-throughput screening the chemical compound library (approximately 210,000 compounds) from the Drug Discovery Initiative (DDI), University of Tokyo, and obtained 13 compounds dose-dependently inhibit EBOV replication. Furthermore, by applying the EBOV mini-genome assay, we have succeeded in developing a mutant EBOV recombinant protein that efficiently inhibits EBOV replication. The results revealed the potential of VP35 as a drug target. We have applied for a patent for this achievement as "Filoviridae virus replication inhibitor"

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：感染症 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルス病（エボラ出血熱）は、エボラウイルス（Ebolavirus: EBOV）の感染による致死率の極めて高い急性熱性感染症である。1976年にスーダンにおいて最初の感染例（感染者数 284、死亡者数 151、致死率 51%）が報告されて以来、主に中央アフリカを中心として、20回以上におよぶアウトブレイクを繰り返している。特に、過去最悪の感染事例となった2014年の西アフリカにおけるアウトブレイクでは、感染者数 27,550 人、死亡者数 11,235 人（致死率 41%）に達しただけでなく、アメリカ、スペイン、イギリス、イタリアなどの欧米諸国にも感染が飛び火し、その猛威を目の当たりにしたことは記憶に新しい。近年、アウトブレイクの頻度が高くなる傾向が見られることから、世界規模での流行が危惧されている。また、その著しく高い致死率から、これがバイオテロなどに悪用される可能性を懸念する声も聞かれる。各方面での努力にもかかわらず、エボラウイルス病の決定的な予防および治療法は、現段階では確立されておらず、対症療法に頼らざるを得ないのが現状である。

表 1. 研究計画タイムテーブル

	平成28年度	平成29年度	平成30年度
基礎段階 評価系の構築	1. 生細胞高速評価系の構築		
	2. 複製評価系の構築		
応用段階 スクリーニング	3. 高速評価系による大規模スクリーニング		
	4. 複製評価系による詳細な評価		
展開段階 化合物最適化	5. 有効性、安全性評価		
	6. 化合物の最適化		

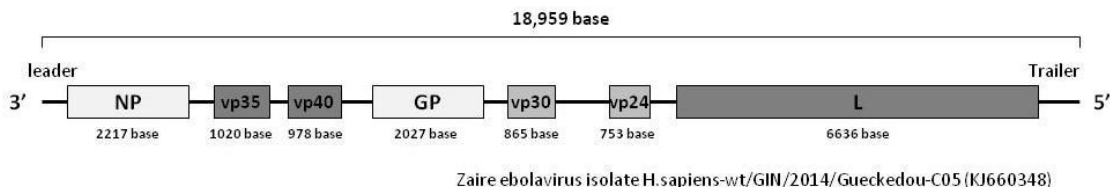
2. 研究の目的

我々はこれまでに、ウイルス由来のタンパク質を標的とした高速アッセイ系を構築し、これを用いた大規模スクリーニングによる化合物の探索を行って来た。本研究計画では、ザイールエボラウイルス（Zaire ebolavirus）を中心としたエボラウイルス属に着目し、その複製を選択的に阻害する化合物の大規模スクリーニングを実施し、EBOV を含むモノネガウイルス目の複製機構の解明や新規創薬標的の同定を目指すと共に、創薬基盤の構築を目指す。そのために、研究期間を3年間とし、「表 1. 研究計画タイムテーブル」に示すスケジュールで、「基盤研究」として(1)生細胞を用いたアッセイ系の構築、(2)高速アッセイ系による化合物ライブラリーの大規模スクリーニング、(3)複製アッセイ系によるヒット化合物の詳細な評価と選抜、「応用研究」として(4)バイオプローブ応用：EBOV の感染・複製機構の解明と新規宿主およびウイルス由来創薬標的因子の同定、(5)創薬シード応用：ヒット化合物とその類縁化合物を用いた構造活性相関解析と有効性、安全性および作用選択性における最適化、を実施する。

3. 研究の方法

[RNP 構成タンパク質の複合体形成および相互作用を数値化する高速アッセイ系の構築]

図 1 ザイールエボラウイルスのゲノムの構造

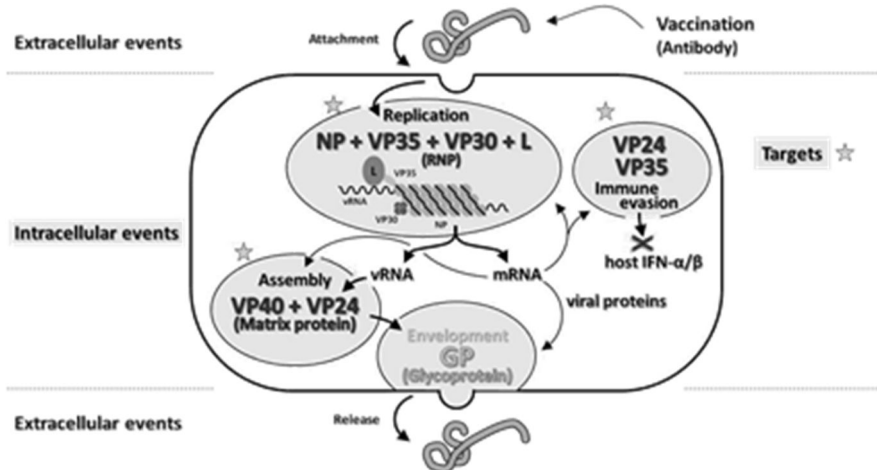


EBOV は、全長約 18-19kb のマイナス鎖 RNA をゲノムとするウイルスであり、ゲノム上には、NP (Nucleoprotein)、VP35 (Viral protein 35)、VP40 (Viral protein 40)、GP (Glycoprotein)、VP30 (Viral protein 30)、VP24 (Viral protein 24) および L (Large protein = RNA Polymerase) の 7 種類の ORF が存在する (図 1)。ウイルス粒子内のゲノム RNA は NP、VP35、VP30 および L と結合してリボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体として存在する。NP は多量体、VP35 は三量体、VP30 は二量体をそれぞれ形成し、これらを単位としてそれぞれがゲノム RNA や L と相互作用することにより RNP が作られる。RNP は、ウイルスタンパク質の発現とゲノムの複製の双方に重要であり、したがって NP、VP35 および VP30 の多量体形成および相互作用は、ウイルス複製の重要な初期のステップと換言しうる。また、VP35 は、L タンパク質 (RNA polymerase) の co-factor

としてウイルスの複製に重要な役割を果たす一方、宿主の因子であるダイニン軽鎖 LC8 と結合することが知られている。この VP35 と LC8 との結合は、EBOV の複製に重要であることが報告されており、抗 EBOV 創薬の標的となる可能性が高い。本研究では、二分子化学発光相補反応 (Bimolecular Luminescence complementation, BiLC) を利用して、RNP 構成タンパク質のホモ多量体形成およびそれぞれのタンパク質の相互作用を数値化する高速アッセイ系を構築する (図 2)。

[VP35 および VP24 の免疫抑制作用を数値化する高速アッセイ系の構築]

図 2. 抗エボラウイルス化合物探索の標的



EBOV 由来のタンパク質のうち、VP35 (polymerase co-factor) と VP24 (minor matrix protein) は、EBOV の免疫回避に関わるタンパク質と想定されている。EBOV 感染者は、抗体が産生されると急速に快方に向かうと報告されており、EBOV 由来タンパク質による免疫回避機構は、創薬標的となり得る。本研究計画では、VP35 および VP24 を HeLa 細胞に強制発現させ、IFN- γ レポーターを用いて NF- κ B および IRF-3、IRF-7 によって誘導される IFN- γ シグナルの阻害活性を評価するシステムを構築する。

[EBOV 複製アッセイ系の構築] 一次ヒット化合物の効果を詳細に評価する目的で、感染性のあるウイルスを用いず、EBOV の複製を安全かつ短時間で数値化するシステムを構築する。EBOV のコードする RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (L タンパク質) は、ゲノム RNA の 3' 末端に位置するリーダー配列に結合し、ゲノムの複製および mRNA の転写を開始する。本研究では、EBOV ゲノムの非翻訳領域を両端に持つレポーター遺伝子を RNA ポリメラーゼ I (RNA Pol I) プロモーターとターミネーターの間に挿入したレポーター遺伝子を作製する。このレポーターは、内因性の RNA Pol I により転写され、ゲノム RNA (vRNA) を模したレポーター-vRNA となり、NP、VP35、VP30 および L の存在下で cRNA および mRNA に転写される。このレポーターと EBOV タンパク質発現ベクターを細胞に共導入し、RNA の転写をレポーター遺伝子 (GFP、ルシフェラーゼなど) または RT-PCR によって定量する方法を開発する。

[化合物の大規模スクリーニング] 構築したアッセイ系を高速アッセイ (High Throughput Screening, HTS) に展開し、理化学研究所天然化合物ライブラリー (NPDepo: 約 20,000 化合物)、東京大学創薬機構化合物ライブラリー (約 210,000 化合物) の大規模スクリーニングを実施する。一次スクリーニングでは、化合物 (5 μ M) の存在下で、ウイルスタンパク質の多量体形成、複合体形成による Gluc の再構成および細胞傷害活性を解析し、Gluc 阻害率が平均値より SD の 3 倍以上高く、かつ細胞傷害活性を示さない化合物を選抜する。さらに、選抜された化合物のうち、濃度依存的に Gluc の再構成を阻害し、全長 Gluc の活性を阻害せず、かつ細胞傷害活性を示さない化合物を一次ヒット化合物とする。二次スクリーニングでは、複製アッセイ系を用いて EBOV 由来 RNA ポリメラーゼによるレポーター遺伝子の転写を濃度依存的に阻害し、CMV プロモーター制御下の mRNA 転写を阻害しない化合物を選抜する。

4. 研究成果

本研究では、二分子化学発光相補反応を利用して、RNP 構成タンパク質のホモ多量体形成やタンパク質間相互作用を数値化する評価系を構築した。まず、海洋性カイアシ (Gaussia princeps) 由来の分泌型ルシフェラーゼ (Gluc) の N 末端または C 末端の分割断片 (Spli-Gluc) と、RNP 構成タンパク質との融合タンパク質発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドを組み合わせ、HeLa 細胞に導入し、24 時間培養後に上清中のルシフェラーゼ活性を測定することにより、タンパク質間相互作用や多量体形成の数値化の可否を検討した。VP35 および VP30 の Spli-Gluc 融合タンパク質を用いた実験では、培養上清中に高いレベルのルシフェラーゼ活性が認められ、VP35 および VP30 のホモ多量体形成が数値化し得ることが示された。同様の実験により、VP35 と

ダイニン軽鎖 LC8 との相互作用も確認された。NP の各構造領域と Spli-Gluc 融合タンパク質を用いた実験により、Core domain の N-lobe 領域同士に強い相互作用が認められ、この領域が NP の多量体形成に重要である可能性が示唆された。また、N-lobe 領域と VP35 の相互作用も認められた。

次に、VP35 評価系を 384-well plate に対応した高速評価系に展開し、東京大学創薬機構の約 21 万化合物の大規模スクリーニングを実施した。VP35 同士の相互作用によるルシフェラーゼの再構成を濃度依存的に阻害し、全長 Gluc の活性は阻害せず、かつ細胞傷害活性を示さない 2,373 化合物を一次ヒット化合物として選抜した。二次スクリーニングでは、EBOV のミニゲノムを用いた化合物の評価を実施し、EBOV の複製を濃度依存的に阻害する 13 化合物を選抜した。これらのヒット化合物は、新規抗エボラウイルス病薬として応用される事が期待される。

また我々は、EBOV タンパク質の創薬標的としての可能性に着目し、EBOV の複製を阻害する変異型 EBOV タンパク質の作製を試みた。我々が開発した EBOV ミニゲノムアッセイを用いて、変異型 EBOV タンパク質の発現が、EBOV 複製に及ぼす効果を検討した結果、ある特定の変異型 EBOV タンパク質を発現させると、EBOV の複製が阻害されることを見出した。この成果は「フィロウイルス科ウイルス複製阻害剤」として特許を出願した。抗 EBOV 新規創薬への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川健司、市川保恵、吉田 稔
2. 発表標題 ザイールエボラウイルスRNP構成タンパク質のタンパク質間相互作用を数値化する評価系の構築
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川健司、市川保恵、吉田 稔
2. 発表標題 ザイールエボラウイルスRNP構成タンパク質のタンパク質間相互作用を創薬標的とした評価系の構築
3. 学会等名 第 161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 フィロウイルス科ウイルス複製阻害剤	発明者 小川健司	権利者 国立研究開発法人理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-010636	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------