

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07834

研究課題名(和文) ウイルスを自己崩壊に導く新規抗RSウイルス薬の開発

研究課題名(英文) A novel antiviral strategy against respiratory syncytial virus disrupting protein-protein interactions

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質-タンパク質間の相互作用はウイルス増殖のあらゆるステップに必須であり、重要な抗ウイルス薬の標的になりうる。本研究では新規抗RSウイルス薬の開発を目指し、ウイルスタンパク質間の相互作用に関わる領域を模倣した各種ペプチドを作製した。その結果、Pタンパク質由来の「P Fr」がPタンパク質に強く結合することでRNAポリメラーゼ活性を抑制し、ウイルスの増殖を阻害することが分かった。Pタンパク質はRSウイルスと同じグループのパラミクソウイルス全てがもつことから、「P Fr」は広くパラミクソウイルスに効く可能性が出てきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスタンパク質どうしの相互作用部位または機能部位に基づき抗ウイルス薬を理論的に設計するという本研究の新しい手法は、従来のランダムスクリーニング法に加え新たな創薬法として提唱できる。アミノ酸配列を基につくるペプチド阻害薬であるため、スクリーニングにかかる時間が大幅に短縮でき、かつ耐性ウイルスに対しても迅速に対応できる利点がある。またRNAポリメラーゼの補因子であるPタンパク質が標的になりうることは、本手法がRSウイルスだけでなくPタンパク質をもつ全てのモノネガウイルスに適用できる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Since most viral replication processes depend on the protein-protein interactions, the disruption of such interactions between viral proteins is a promising strategy for drug discovery. Based on a mimicking approach that targets the face of interaction, we designed various peptide-based inhibitors against respiratory syncytial virus (RSV). We found that the peptide P Fr derived from viral phosphoprotein P strongly binds to P and suppresses the RNA polymerase activity, and consequently inhibits viral replication. These results highlight P as an important target for the development of antiviral compounds against RSV and other paramyxoviruses.

研究分野：ウイルス学

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

1. 研究開始当初の背景

RSウイルスは乳幼児期にほとんどが感染するウイルスで、通常は軽い風邪症状を起こす程度である。ところが、6ヶ月未満の場合や慢性的に肺や心臓に疾患を持つような乳幼児では重症化しやすく、実に乳幼児の細気管支炎の50~90%、肺炎の約50%はRSウイルスが原因といわれている。他のウイルスと違い、RSウイルス感染では母親からの移行抗体が感染防御にうまく働かない。そのため移行抗体により病原体から守られているはずの6ヶ月未満の乳幼児ではRSウイルス感染を許してしまい、重症化に至りやすくなる。メディアは毎年インフルエンザを大きく取り上げるが、実は呼吸器疾患が重症化した乳幼児から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と治療薬が既に存在する。ところが、RSウイルスに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。以前ワクチンが開発されたが、ワクチンはかえって重症化を招いたため中止になりワクチン開発は頓挫した。また米国では抗体薬「パリビズマブ」が開発されたがコストが高すぎるため一般には普及していない。一方、迅速診断キットは市販され広く普及している。しかし、抗ウイルス薬がないため迅速診断キットによる結果が早期治療に活かせていない。RSウイルスの対策は、診断と治療の狭間で停滞しているのが現状である。この状況を打開するためにも、新しい抗ウイルス薬を開発しRSウイルス感染症の治療法を確立する必要がある。

2. 研究の目的

新規抗RSウイルス薬を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

RSウイルスのPタンパク質は本来ウイルス複製に必須のタンパク質で、ウイルスのRNAポリメラーゼ(Lタンパク質)を転写・複製の場へ誘導する。これまでの研究でRSウイルスのPタンパク質をもとに作製したペプチド「P Fr」がウイルスのRNAポリメラーゼ活性を著しく阻害することが分かった。そこで本研究では「P Fr」を基にした新規抗RSウイルス薬の開発を試みた。

まず実験材料となる「P Fr」の大量精製法の確立を行った。「P Fr」は82アミノ酸と長い人工合成では高コストとなる。そこで組換えバキュロウイルスを作製し、SF21昆虫細胞にて大量発現させた。精製を容易にするため「P Fr」に各種タグ(Hisタグ、TAPタグ、SUMOタグ)を付加して発現させ、この中から発現量と精製度が最良のタグを選抜した。

次に大量精製した「P Fr」を用い、実際にRSウイルスの増殖を阻害するか培養細胞レベルで検討した。細胞にはHEp2細胞(ヒト咽頭癌由来)を用いた。ウイルスはRSV A2(ATCC, VR-1540)を用いた。ウイルスを細胞に感染させ24時間後に「P Fr」を添加し、さらに24時間培養した。その後、培養上清液および感染細胞を全て回収しウイルスの定量をプラークアッセイで行った。

4. 研究成果

まず実験材料となる「P Fr」の大量精製法を確立した。「P Fr」のC末端側にTAPタグを付加することで、発現量および精製度について最良の結果が得られた。発現させた「P Fr」はIgGセファロースへ吸着させ、TEVプロテアーゼでタグを切断し「P Fr」を遊離させた。遊離させた「P Fr」をニックルアガロースと混合し、サンプル中に含まれるTEVプロテアーゼ(Hisタグ付)を除去し高純度(95%以上)の精製品を得ることができた。収量は細胞培養1Lあたり約1mgの「mgオーダー」に達した。

次に精製した「P Fr」を使って実際にRSウイルス感染を抑えることができるか培養細胞レベルで検討した。抗ウイルス薬の実際の臨床での使用場面を想定し、ウイルス感染後のウイルスの増殖期(感染24時間後)に「P Fr」を投与した。「P Fr」を感染細胞へ直接添加した場合、ウイルス増殖に対する阻害効果はみられなかった。ところが、ペプチド導入試薬(Xfect protein transfection reagent, Clontech)を用いた場合、「P Fr」0.23 μ Mではウイルス産生量が約20%まで、0.47 μ Mでは約2%程度まで抑制された(図1)。「P Fr」は単独では細胞内に取り込まれにくいいため、ペプチド導入試薬のようなデリバリー剤を使用すれば阻害効果を発揮することが分かった。

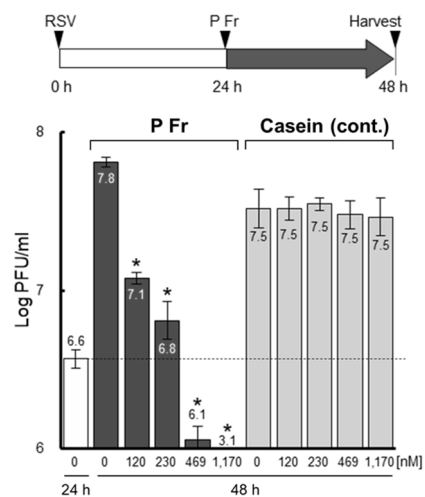


図1. P Frの抗RSウイルス活性. RSVを培養細胞HEp-2へ感染させ、24時間後に精製したP Frを添加し、さらに24時間培養して増殖したウイルス量を定量した。

「P Fr」はウイルスのPタンパク質およびLタンパク質に結合することが分かり、特にPタンパク質に強く結合することが明らかとなった。Pタンパク質は本来4量体構造をとって安定型となりRNAポリメラーゼLへ結合しRNAポリメラーゼを活性化する。「P Fr」の作用機序としては、Pタンパク質に直接結合してPタンパク質の4量体化を阻止するものと考えている(図2)。4量体をとれなくなったPタンパク質はLと結合できないため、RNAポリメラーゼが活性化されずウイルスの増殖が阻害されると予測している。「P Fr」の標的となるPはRSウイルスの属するパラミクソウイルス科の全てのウイルスがもっており、かつPの4量体化はRNAポリメラーゼ活性に必須であることから、「P Fr」は広くパラミクソウイルスに効くかもしれない。今後も研究を継続し、他のパラミクソウイルスに対する抗ウイルス作用を調べていく予定である。

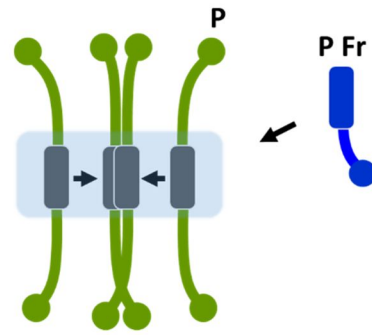


図2. P Frの作用機序のモデル。P FrはPへ結合してPの4量体化を阻害する。4量体化を阻止されたPはRNAポリメラーゼLに結合できなくなるため、ポリメラーゼ活性が抑えられウイルス複製が阻害される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hara K, Yaita K, Khamrin P, Kumthip K, Kashiwagi T, Eleouet JF, Rameix-Welti MA, Watanabe H.	4. 巻 101
2. 論文標題 A small fragmented P protein of respiratory syncytial virus inhibits virus infection by targeting P protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gen Virol	6. 最初と最後の頁 21-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koyu Hara
2. 発表標題 A new approach for inhibiting respiratory syncytial virus infection.
3. 学会等名 U.S. Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 22nd Acute Respiratory Infections (ARI) Panel Meeting; Viral Diseases. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 好勇、柏木孝仁、渡邊 浩
2. 発表標題 ウイルスRNAポリメラーゼ複合体由来のP断片は抗RSウイルス活性を示す
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 好勇
2. 発表標題 インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼPB2サブユニットのN末領域は転写および複製に関与している
3. 学会等名 第89回日本感染症学会西日本地方会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 好勇、柏木孝仁、渡邊 浩
2. 発表標題 精製したRSウイルスのP断片はRSウイルスの増殖を抑制する
3. 学会等名 第 93回日本感染症学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koyu Hara, Kenichiro Yaita, Takahito Kashiwagi and Hiroshi Watanabe
2. 発表標題 The C-terminal fragment of the respiratory syncytial virus phosphoprotein inhibits the viral polymerase activity.
3. 学会等名 Negative Strand Virus meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八板謙一郎、原 好勇、柏木孝仁、渡邊 浩
2. 発表標題 RSウイルスの増殖を抑制する欠損型Pの作用機序について
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>久留米大学医学部感染制御学講座 http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/virol/jp/index.html</p>

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
研究分担者	柏木 孝仁 (Kashiwagi Takahito) (70320158)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	
研究分担者	渡邊 浩 (Watanabe Hiroshi) (90295080)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	

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