

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06450

研究課題名(和文)牛白血病ウイルス感染阻害作用をもつ化合物を利用した新規ウイルス複製機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a novel virus replication mechanism using compounds that inhibit bovine leukemia virus infection

研究代表者

佐藤 洋隆 (SATO, Hirotaka)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00708539

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)：これまでの研究によって得られた、牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)に対して阻害作用を示す5種の化合物について、それぞれ類縁構造をもつ化合物(計275化合物)のスクリーニングを行い、最終的にBLV複製阻害活性をもつ3種類の化合物構造を決定した。また、それぞれの構造をもつ、高活性かつ細胞に低毒性なリード化合物(化合物A、B、C)を得ることに成功した。このうち化合物Cは、ウイルス遺伝子の逆転写よりも後で、mRNAの転写よりも前のステップに作用していることが示唆された。さらに、化合物Bについては、ウイルス外膜が細胞の膜に融合する細胞融合のステップを阻害していることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)の感染を抑制する作用を持つ薬剤について、より活性が高く、毒性の低い薬剤候補を見いだすことができた。これにより作用機序および作用標的の解析が可能になった。また、1化合物についてはその作用機序が細胞膜融合の阻害によるものである事までを明らかにする事ができた。このことは抗BLV薬剤候補として開発していくために重要な発見であった。この薬剤の標的分子を明らかにすることでBLVやその他ウイルスの感染における膜融合機構について新たな知見が得られるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：From previous research, five candidate compounds were found to have inhibitory effects against bovine leukemia virus infection. For each of these, screening was conducted on related compounds (a total of 275 compounds), and finally three compound structures with viral replication inhibitory activity were found. Additionally, lead compounds with higher activity and lower cytotoxicity (compounds A, B, and C) representing each of these structures were successfully obtained. Among these, compound C was suggested to act at a step after reverse transcription of the viral genome but before transcription of mRNA. Furthermore, it was revealed that compound B inhibits the cell fusion process in which the viral envelope and cell membrane fuse.

研究分野：ウイルス学

キーワード：BLV 感染症 抗ウイルス薬 阻害剤 作用機序解析 膜融合阻害 低分子化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 29 年度科研費若手 B 研究課題として採択された「新規牛白血病ウイルス感染性蛍光定量法を応用した感染阻害剤スクリーニング法の研究」において、牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV、旧称：牛白血病ウイルス) に対して感染阻害作用を示す、五つの構造の異なるシード化合物が得られた。これらの候補化合物は既存の抗ウイルス薬とも構造が異なっていることから、未知の作用機序を有することが示唆され、これらの候補化合物が標的とする分子を特定することで、BLV 感染における新規機序を明らかにすることができると考えた。シード化合物では標的分子との結合が弱く、標的分子の同定が困難であることから、類縁体スクリーニングおよび構造関連相関による化合物の最適化が必要であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、独自に同定した BLV 複製阻害剤の作用点およびその作用機序を明らかにすること。さらに、その標的となる BLV 感染に寄与する因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、まずシード化合物の類縁体スクリーニングによる BLV 複製阻害活性の増強を行った。研究代表者がこれまでに得ているシード化合物は、理研化合物バンク (NPdepo) 25,000 化合物を構造的に 400 のグループに分類し、それぞれの代表的構造をもつ化合物 400 個を収載したパイロットライブラリーからスクリーニングされた化合物であり、標的分子を特定するためには結合の強い化合物に最適化を行う必要があった。シード化合物スクリーニングにも用いた、新規 BLV 感染性蛍光定量法 (LuSIA) を用い、NPdepo から提供を受ける類縁体についてスクリーニングを行い、構造関連相関により標的分子に強く結合して作用するリード化合物の創生を行った。

次に得られたリード化合物を用いて time of addition assay による作用点の特定を行った。Time of addition assay ではウイルスの細胞表面吸着から複製、ウイルス成熟までのウイルスの生活環のどのステップに薬剤が作用するかを、感染開始からの薬剤添加開始時間を変えることで特定した。最後に化合物ビーズを用いた標的タンパク質の同定のため、化合物と結合する標的分子 pull-down 法の構築を行った。

4. 研究成果

まず 5 種類の候補化合物について NPdepo のデータベースから構造的類似性の高い化合物について、提供を受けた。合計で 275 類縁化合物について提供を受け、牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) 感染に対する感染抑制効果および細胞毒性について検討を行った。BLV の感染抑制については蛍光シンシチウム誘導アッセイ (LuSIA) を用い、感染に伴うウイルス転写因子 tax 発現による緑色蛍光タンパク質の誘導および細胞変性効果によるシンシチウム形成への化合物の影響を測定した。また、細胞毒性の高い化合物を除外するため、溶媒を処理した細胞と比較して化合物処理後の細胞生存率が 90% 以上の化合物について阻害活性を評価した。その結果、3 種類の化合物構造が低毒性で BLV 感染を強く阻害する作用を持つことが示された。

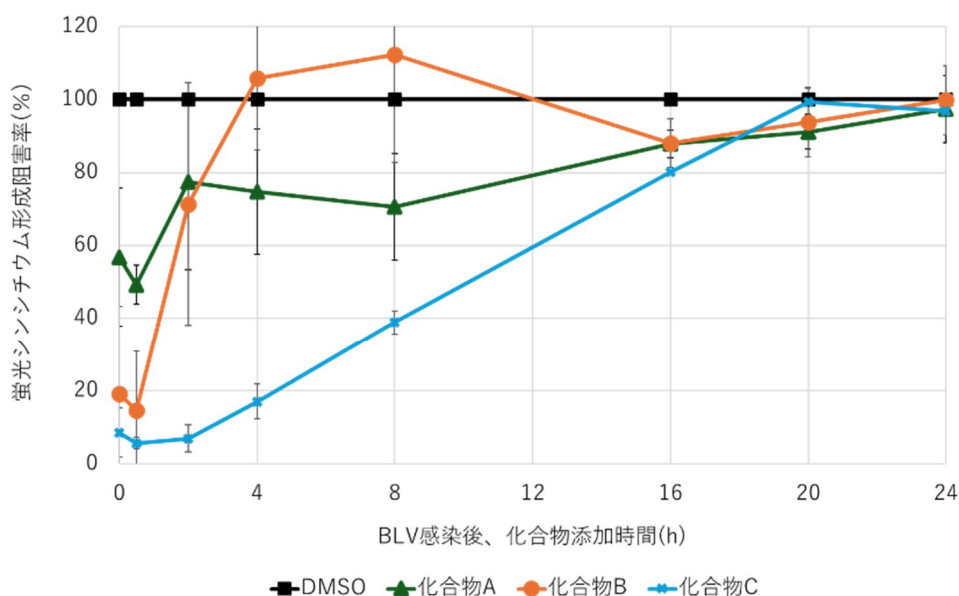


図1. time of addition assayによる蛍光シンシチウム形成阻害時間

さらに、これらの構造を持つ化合物で市販されており、入手可能なものを探索した結果、高い活性を持ち、細胞に低毒性のリード化合物が得られた(化合物A,B,C)。

次にこれら3つのリード化合物を用いて、BLV感染のどのステップで作用しているのかを検討した。細胞にBLVを感染後、time of addition assayとして数時間ずつ間隔を空けてそれぞれ化合物を添加したとき、どの時間まで感染阻害作用を示すか検討した(図1)。その結果、化合物Cは感染後16時間してから添加しても一定の阻害作用を示したのに対して、化合物Bでは感染後4時間以降に添加した場合、感染阻害作用を示さないことが明らかとなった。化合物Aについては感染から2時間後以降で阻害活性が低下し、その後も20時間後まで阻害活性が残存していたことから2つの阻害機序をもつことが考えられた。

次に、感染の具体的なステップとして、細胞表面での吸着への化合物の影響について検討を行った。細胞にBLVウイルス粒子を添加し、4で2時間静置した後、BLVエンベロープタンパク質に対する抗体を用いたフローサイトメトリーによって細胞表面に吸着したウイルス粒子量の測定を行ったが、いずれの化合物も細胞表面での吸着を阻害しないことが明らかとなった。

次にウイルス感染後、逆転写により生成されるウイルスDNA量をreal-time PCRによって測定した。その結果、化合物B処理によってウイルスDNA量が有意に低下することが明らかとなった(図2)。同様に、ウイルス由来転写因子taxによるレポーター遺伝子mRNA発現への影響を

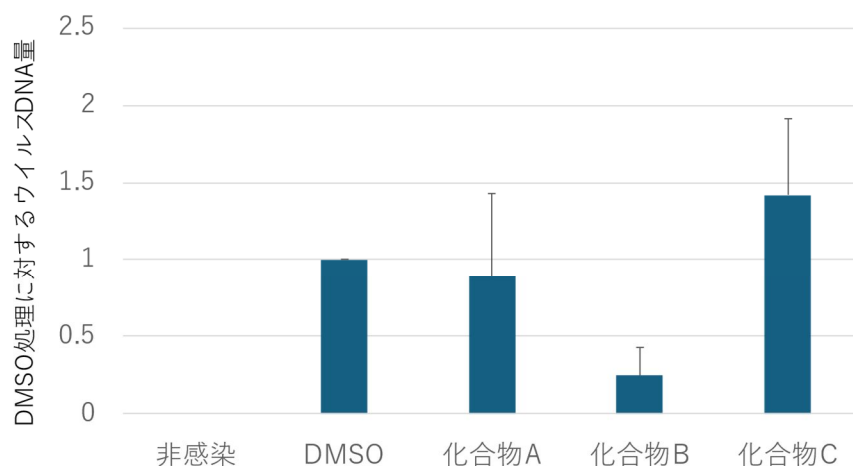


図2. 逆転写ウイルス遺伝子量

real-time PCRにより確認したところ、化合物Bに加え、化合物Cの処理で発現が低下するのに対し、化合物Aでは発現が低下しないことが明らかとなった。これにより化合物Aについては、ウイルス複製の後半に作用していることが考えられた。化合物Cについてはウイルス遺伝子の逆転写よりも後で、mRNA転写よりも前の段階に作用していると考えられたが、戦争の影響により化合物の輸入が困難となり、合成も難しいことから、これ以上の解析を断念することとした。

化合物Bは吸着より後でウイルス遺伝子の逆転写よりも前の段階で作用していると考えられたことから、次にウイルス粒子の膜融合に対する化合物B添加の影響を検討した。分割ルシフェラーゼをそれぞれ遺伝子導入した細胞同士を混ぜ、高濃度ウイルス粒子を添加し、6時間後の細胞内復帰ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、化合物Bは膜融合による、細胞内でのルシフェラーゼ活性の増加を有意に抑制することが示された(図3)。このことから化合物Bはウイルスの細胞膜融合の段階に作用して、BLV感染を阻害することが明らかとなった。

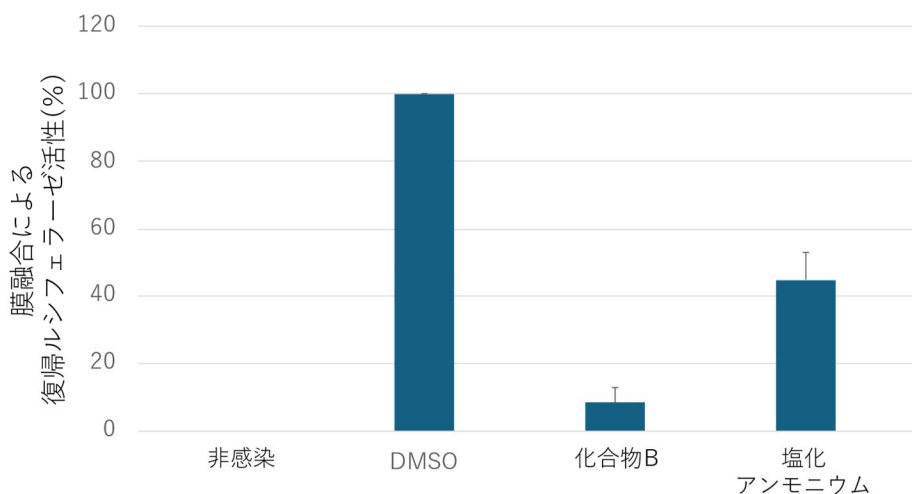


図3. ウイルス粒子による膜融合への化合物の影響

この化合物 B の標的となる分子が何であることを明らかにするため、医科歯科大の細谷教授に協力を頂き、化合物 B およびその類縁体に標的タンパク質と結合、標識できる化学修飾を行った。これらの修飾化合物について、標的への結合を確認するため、BLV 感染阻害試験を行ったところ、化合物 B の化学修飾を行った化合物は BLV 感染を阻害する活性が示され、標的因子への結合が示唆された。しかしながら、類縁体に化学修飾を行った構造については高い細胞毒性があることから結合が確認できなかった。現在はこの化学修飾化合物を用いて、標的因子の同定を行っている。

本研究により、BLV の細胞膜融合を介して、ウイルス複製を阻害する化合物 B を同定することができた。化合物 B の標的分子の同定までには至っていないものの、化合物の修飾が行われ、同定に向けた準備が整ったところである。これまで BLV 感染における細胞膜融合の機序についてはほとんど明らかになっておらず、化合物 B が作用する標的を明らかにすることにより BLV の膜融合についての新たな知見得られ、抗ウイルス薬新規標的としての評価が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Hirotaka, Fukui Jun-na, Hirano Hiroyuki, Osada Hiroyuki, Arimura Yutaka, Masuda Michiaki, Aida Yoko	4. 巻 15
2. 論文標題 Application of the Luminescence Syncytium Induction Assay to Identify Chemical Compounds That Inhibit Bovine Leukemia Virus Replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 4~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v15010004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hirotaka, Bai Lanlan, Borjigin Liushiqi, Aida Yoko	4. 巻 17
2. 論文標題 Overexpression of bovine leukemia virus receptor SLC7A1/CAT1 enhances cellular susceptibility to BLV infection on luminescence syncytium induction assay (LuSIA)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12985-020-01324-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanuki Sonoko, Takeshima Shin-nosuke, Borjigin Liushiqi, Sato Hirotaka, Bai Lanlan, Murakami Hironobu, Sato Reiichiro, Ishizaki Hiroshi, Matsumoto Yasunobu, Aida Yoko	4. 巻 50
2. 論文標題 Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13567-019-0724-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤洋隆 増田道明
2. 発表標題 化合物BSI-679が膜融合阻害作用を介して抗ウイルス活性を示す可能性
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 2. 佐藤 洋隆、福井 淳那、平野 弘之、有村 裕、長田 裕之、増田 道明、間 陽子
2. 発表標題 牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)感染を阻害する新規機序抗レトロウイルス薬の探索と機序解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤洋隆、福井淳那、平野弘之、有村裕、長田裕之、間陽子
2. 発表標題 牛白血病ウイルス(BLV)感染性測定法 (Luminescence syncytium induction assay; LuSIA) を用いたBLV複製阻害剤の探索
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------