

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659209

研究課題名(和文) 高病原性ウイルスに対する抗ウイルス活性物質探索のための新規戦略

研究課題名(英文) Novel strategies to identify the antiviral compounds against highly pathogenic viruses

研究代表者

安田 二郎 (Yasuda, Jiro)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：10282518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：エボラウイルスの粒子形成を阻害する化合物を探索する為にウイルスマトリクスタンパク質 VP40の多量体化ドメインとドッキングスコアの高い374の化合物をin silicoスクリーニングにより選抜した。VP40とNanoLucの融合タンパク質を発現する細胞系を樹立して、融合タンパク質で形成されるウイルス様粒子の産生を指標に候補化合物の抗ウイルス効果をスクリーニングできる系を開発した。また、ラッサウイルスの粒子形成を阻害する化合物についても、マトリクスタンパク質であるZとNanoLucの融合タンパク質をテトラサイクリン誘導性に発現する細胞システムを化合物スクリーニング系として開発した。

研究成果の概要(英文)：By in silico screening using super computer DEGIMA system, we selected 374 chemical compounds as antiviral candidates which inhibit ebolavirus assembly. Antiviral activities of these compounds are currently under investigation. We also established the high-through put screening system to identify the chemical compounds which inhibit Lassa virus assembly.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：診断・治療 創薬

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症の制圧には抗ウイルス剤の開発が必須であることは言うまでもないが、これまでに臨床レベルで効果を上げている抗ウイルス剤は数少ない。とりわけ、出血熱ウイルスに代表される高病原性ウイルスに対する抗ウイルス剤はラッサウイルスに対するリバビリンしかなく、しかも、副作用や耐性ウイルス出現などの問題がある為その効果は限定的である。

化合物ライブラリー等を用いたハイスループット・スクリーニングは、新規抗ウイルス剤の探索に最も有効な方策の一つと考えられるが、高病原性ウイルスの取り扱いには P3 あるいは P4 の実験室を使用しなければならず、ウイルス感染系を用いたハイスループット・スクリーニングは困難な状況である。したがって、P2 レベルでアッセイできる新規ハイスループット・スクリーニングシステムの開発がこの分野のブレイクスルーとなると考える。

ラッサウイルスは現在、西アフリカで風土病化しており、感染者が爆発的に増えている。そのため、先進国への輸入感染症例も増加していることから最も早急な対応が迫られているウイルス感染症の一つである。最近になって、ラッサウイルスの宿主細胞への侵入を阻害する低分子化合物 ST-193 が米国の研究グループから報告されているが (Larson et al., 2008, Lee et al., 2008) その分子標的はウイルス表面糖タンパク質 GP2 である。ラッサウイルスは RNA ウイルスであり変異頻度が高く、また一般的に表面糖タンパク質は宿主の選択圧力を受けやすく抗原変異が起こりやすい為、耐性変異ウイルスが出現しやすく、抗ウイルスの標的として必ずしも適していない。

また、エボラウイルスはアフリカで度々アウトブレイクを繰り返しており、その致死率の高さ故に人類の大きな脅威となっている。しかしながら、現時点で有効なワクチンや抗ウイルス剤は開発されていない。

申請者はこれまでにウイルスの粒子形成・出芽機構の分子生物学的解析を行ってきた (Yasuda & Hunter, J. Virol., 1998, Virology 2000, Yasuda et al., EMBO Rep., 2002, J. Virol., 2003, Sakurai et al., Microb. Infect., 2004, Urata et al., J. Virol., 2006, 2007, 2009, Virol. J., 2007, J. Gen. Virol., 2010, Nagashima et al., J. Gen. Virol., 2011 他)。また最近、インターフェロン誘導性細胞因子 Tetherin がラッサウイルスを含む幅広いウイルス種に対して抗ウイルス活性をもつことを明らかにしている (Sakuma et al., J. Virol., 2009, PLoS One, 2009, Fukuma et al., PLoS One, 2011)。

2. 研究の目的

本研究では、未だに有効な治療法が確立さ

れていないラッサ熱、エボラ出血熱に対して有効な治療法を開発する為に抗ウイルス剤候補となる物質を化合物ライブラリーから探索する。

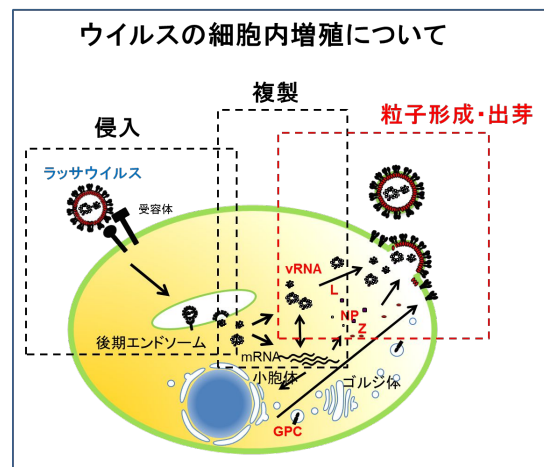
これまでの研究成果を基に、ラッサウイルス、エボラウイルスのアッセムブリーを阻害する化合物の探索が可能な P2 レベルの新規ハイスループットスクリーニング系を開発し、化合物ライブラリーから抗ウイルス剤候補物質を同定する。続いて、有効濃度、細胞毒性等についても検証し、抗ウイルス剤としての有用性を検討する。

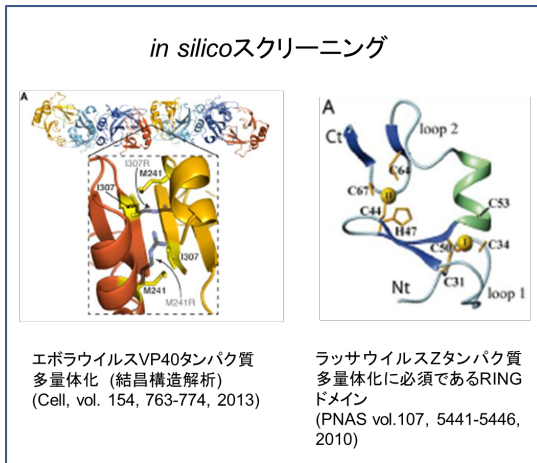
3. 研究の方法

エボラウイルスの VP40 タンパク質はウイルスマトリクスタンパク質であり、VP40 の多量体化はウイルス粒子形成に必須である。VP40 の X 線結晶構造解析は既に Bornholdt らにより報告されており (Cell, 2013)、VP40 の多量体化には C 末ドメインが重要であることが示されている。そこで、スーパーコンピュータシステム DEGIMA を使い、C 末ドメインを介した多量体化を阻害する化合物の *in silico* スクリーニングを行った。

エボラウイルス VP40 の N 末に低分子量の高感度発光酵素 NanoLuc を付加した融合タンパク質 (VP40NLuc) の発現プラスミドを作製し、細胞に導入した。導入細胞では VP40NLuc の自己集合によりウイルス様粒子 (VLP) が形成され、細胞外へ放出されるため、上清中のルシフェラーゼ活性を測定することにより VLP 産生をスクリーニングできる。そこで、本システムを用いて *in silico* スクリーニングで選抜された候補化合物の 1 次スクリーニングを行った。

上記の VP40NLuc-VLP システムと同様にラッサウイルスのマトリクスタンパク質である Z タンパク質の C 末に NanoLuc を付加した融合タンパク質 (ZNLuc) の発現プラスミドを作製し、細胞に導入することにより化合物スクリーニング系の構築を試みた。

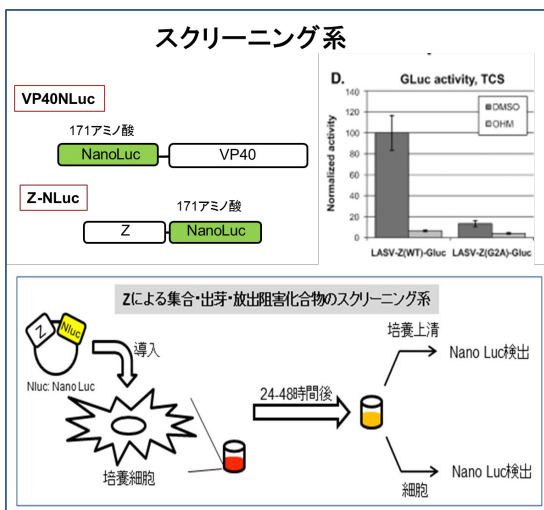




4. 研究成果

in silico スクリーニングの結果、エボラウイルス VP40 の C 末に存在する多量体化に重要と考えられるドメインとのドッキングスコアの高い374の化合物を東京大学創薬オープンイノベーションセンターの化合物ライブラリーより選抜した。これらの化合物を同センターより入手し、上述の今回新たに開発した VP40NLuc-VLP 産生スクリーニング系で VLP 産生を抑制する化合物のスクリーニングを現在進めている。

ラッサウイルスに関しては ZNLuc の恒常的な過剰発現が細胞毒性をもつことが示唆されたので、Tet-On システムを用いてテトラサイクリン誘導性に ZNLuc の発現を制御する系を開発した。このシステムを用いて、現在、ZNLuc-VLP 産生を抑制する化合物のスクリーニングを行っている。



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 2件)

Urata, S., and Yasuda, J.: Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. *Viruses*, **4**(10), 2049-2079, 2012.

DOI:10.3390/v4102049. 査読有

Yasuda, J.: Ebolavirus replication and tetherin/BST-2. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 111 (1-5), 2012. DOI:10.3389/fmicb.2012.00111. 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

浦田秀造、黒崎陽平、安田二郎：高病原性出血熱ウイルスに対する抗ウイルス療法確立の試み、日本薬学会第34年会、熊本、2014年3月27-30日

黒崎陽平、浦田秀造、安田二郎：抗エボラウイルス剤の開発に向けたシュドタイプウイルスによる感染性アッセイ系の確立、第54回日本熱帯医学会大会、長崎、2013年10月3-5日。

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/emerging/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 二郎 (YASUDA, Jiro)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：10282518

(2) 連携研究者

黒崎 陽平 (KUROSAKI, Yohei)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号： 4 0 4 1 5 4 4 3

浦田 秀造 (URATA, Shuzo)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号： 2 0 6 1 4 4 4 9