

平成30年6月19日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19140

研究課題名(和文) アクセサリータンパク質を標的としたパラミクソウイルス感染症の新規治療戦略

研究課題名(英文) Development of an anti-paramyxovirus drug targeting accessory C protein

研究代表者

小田 康祐(Oda, Kosuke)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・助教

研究者番号：60571255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：センドダイウイルス(SeV) Cタンパク質と宿主因子STAT1もしくはAlixとの間の結合を阻害する化合物は、SeVや類縁のヒトパラインフルエンザウイルスの阻害剤になりえる。本研究では、Cタンパク質とこれら標的因子(STAT1およびAlix)の結合阻害剤を安価で極めて高精度にスクリーニングするアッセイ系を構築することができた。また約20万種の低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、Cタンパク質とAlixとの間の結合を特異的に阻害するアクリドン構造を有するいくつかの化合物を取得することができた。

研究成果の概要(英文)：Sendai virus (SeV) causes respiratory tract infection in mice and used as a prototype of viruses belonging to the family paramyxoviridae. In SeV lacking the C protein, the viral pathogenicity was significantly decreased. C protein associates with STAT1 to escape from the host innate system, and it associates with Alix for efficient viral budding from host cells. It is possible that a compound that inhibits the interaction between C protein and STAT1/Alix will become an antiviral drug against SeV or SeV-related viruses. In this study, we carried out a high-throughput screening assay to find a candidate agent targeting C protein. As the result, some acridone derivatives were found to inhibit the association of C protein with Alix.

研究分野：構造生物学

キーワード：ハイスループットスクリーニング FRET 抗ウイルス薬 センドダイウイルス Cタンパク質 PPI阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型 (hPIV1) は、パラミクソウイルス科に分類されるエンベロープウイルスであり、一本鎖 (-) 鎖 RNA をゲノムにもつ。hPIV1 に感染すると、正常な成人では、無症状か軽度の風邪様症状が現れるが、老人や免疫不全患者では、肺炎や気管支炎を含む重度の下気道炎を引き起こす。現在、hPIV1 感染症の治療は対症療法に限られており、感染を予防するワクチンは存在しない。このため、hPIV1 の増殖を抑える治療薬の開発が望まれる。

セндаイウイルス (SeV) は、hPIV1 の一部と交差抗原性を示すほど近縁であり、hPIV1 のモデルとして利用される。SeV では、C タンパク質がウイルス生活環の複数のステップに関与し、ウイルス病原性の発現に重要な役割をもつ。具体的に述べると、C タンパク質は宿主転写因子 STAT1 と結合し、IFN- $\alpha$  /  $\beta$  および IFN- $\gamma$  のシグナル伝達を阻害することで自然免疫の回避に関与する (Kato et al., *J. Virol.*, 2004)。IFN- $\gamma$  のシグナル伝達阻害機構に関しては、その分子基盤の詳細を明らかにしている (Oda et al., *J. Virol.*, 2015)。他方、C タンパク質は、ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) 関連因子である Alix と結合し、これを原形質膜にリクルートすることで、感染性ウイルス粒子の出芽に ESCRT 経路を利用できるようにすると推定される (Sakaguchi et al., 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016)。C タンパク質の C 末 (Y3 と命名) は、STAT1 の N 末ドメイン (STAT1ND) および Alix の Bro1 ドメインとそれぞれ結合する。当研究室ではこれまでに、Y3:STAT1ND 複合体および Y3:Bro1 ドメイン複合体の立体構造を、X 線結晶構造解析により明らかにした。その成果として、STAT1 結合型と Alix 結合型では、Y3 の構造に大きな違いはないことが判明した。また、Y3 は、分子

表面上の異なる領域を用いて STAT1 および Alix と結合していた。

## 2. 研究の目的

SeV および hPIV1 では、C タンパク質を欠失させると、病原性が著しく減弱する (Gotoh et al., *FEBS Lett.* 459: 205-10, 1999; Bartlett et al., *Vaccine* 24: 2674-84, 2006)。また、C タンパク質は、開始コドンの位置が異なる C', C, Y1 および Y2 の 4 種類のタンパク質の総称であり、P mRNA と V mRNA を用いて P とは異なるフレームから合成される (図 1)。このため、C タンパク質のみに導入できる変異は限定されることから、C タンパク質を標的とした薬剤は、感染症に著効を示すとともに、耐性化ウイルスの出現を回避すると期待される。さらに C タンパク質などのアクセサリタンパク質の機能を特異的に阻害する化合物は、これまで知られていない。アクセサリタンパク質を標的とした阻害剤を開発することができれば、抗ウイルス剤としてよく用いられるプロテアーゼ阻害剤や転写酵素阻害剤と組み合わせることで、耐性化ウイルスが生じにくい新規多剤併用療法を開発することができる。

C タンパク質は標的因子と結合することで機能を発揮する。このため、C タンパク質と標的因子間の相互作用を妨害する化合物は、抗 SeV 剤や抗 hPIV1 剤になりえると考えられる。本研究では、SeV C タンパク質を用いて、標的因子 (STAT1 および Alix) との結合を阻害する化合物の開発を目的とした。

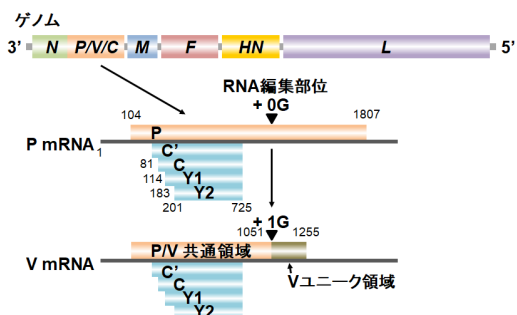


図 1. SeV のゲノム構造と C タンパク質

### 3. 研究の方法

#### (1) 一次スクリーニング方法の開発

Cタンパク質と標的因子との結合を阻害する化合物のスクリーニングでは、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) を利用した (図2)。この手法では、Y3 および STAT1ND/Bro1 ドメインのペプチド末端に、黄色蛍光タンパク質 (Enhanced Yellow Fluorescent Protein, EYFP) および青色蛍光タンパク質 (Enhanced Cyan Fluorescent Protein, ECFP) をそれぞれ付加させた。Y3 が STAT1ND/Bro1 ドメインに結合すると、それぞれの蛍光タンパク質が接近する。このとき、ECFP の励起極大波長である 435 nm の光を入射すると、蛍光タンパク質間で FRET が発生し、EYFP より発せられる 527 nm の蛍光が増大する。Y3 と STAT1ND/Bro1 ドメイン間の相互作用を妨害する化合物存在下では、FRET は発生しない。阻害活性の指標として、480nm の蛍光強度を 530nm の蛍光強度で割った値を用いた。

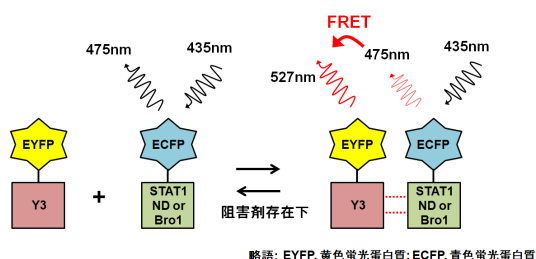


図2. 一次スクリーニングの測定原理

#### (2) X線結晶構造解析

スクリーニングより見出したCタンパク質と Alix 間の結合を阻害する化合物は、Y3:STAT1ND 複合体を用いて、ソーキングが共結晶化により Y3 との複合体構造の解明を試みた。X線回折実験は大型放射光施設 Spring8 のビームラインを利用して、実施した。

### 4. 研究成果

Cタンパク質と STAT1ND との間の結合を

阻害する化合物を探索するために、蛍光共鳴エネルギー移動を利用し、極めて高い精度をもつアッセイ系を構築した (S/B 比  $2.08 \pm 0.01$ ,  $CV_{100\%} 0.19 \pm 0.13$ ,  $CV_{0\%} 0.49 \pm 0.31$ ,  $Z'$  因子  $0.97 \pm 0.02$ )【1】。本アッセイより、東京大学創薬機構より提供される約 20 万種の低分子化合物を用いて、Y3 と STAT1ND 間の結合を阻害するいくつかのフラレン誘導体を見出した。これらフラレン誘導体は、細胞の成長阻害が観測され、薬剤になりにくいと考えられた。他方、Cタンパク質と Bro1 ドメインとの間の結合を阻害する化合物に関しては、数 100 種の化合物を見出した (S/B 比  $1.96 \pm 0.03$ ,  $CV_{100\%} 1.91 \pm 0.34$ ,  $CV_{0\%} 3.35 \pm 1.04$ ,  $Z'$  因子  $0.78 \pm 0.04$ )。このうち、STAT1ND との結合は阻害せず、Bro1 ドメインとの結合を比較的高い活性で特異的に阻害する約 32 種の化合物を用いて、X線結晶構造解析を実施した。その結果、Y3:STAT1ND 複合体結晶を用いてアクリドン構造をもつ化合物をソーキングしX線回折実験を試みたときに、空間群は  $P6_322$  のまま、格子定数が  $a=b=72.43 \text{ \AA}$ ,  $c=198.56 \text{ \AA}$  から  $a=b=68.36 \text{ \AA}$ ,  $c=201.37 \text{ \AA}$  に変化した。またクリсталパッキングに参与する Ca イオンの電子密度が消失し、Y3:STAT1ND ヘテロ二量体間の相対的位置が大きくずれていた。しかしながら阻害剤に由来する電子密度は観察されなかった。本実験で取得した回折データのほとんどの最高分解能は  $2.7\text{-}3.0 \text{ \AA}$  の範囲であり、より高分解能で回折データを収集することが出来れば阻害剤の電子密度を観察できるかもしれないが、阻害剤に含まれている DMSO が結晶の品質を低下させている可能性が考えられる。アガロースを用いた固相ゲル中で作製した結晶は有機溶媒に耐性をもつことが知られている。次の研究では、固相ゲル中で作製した結晶に高濃度の阻害剤をソーキングし、X線回折実験を試みることで、Cタンパク質に結合する可能性のある

阻害剤を網羅的に調査することを考えている。またアクリドン構造をもつ化合物を中心として抗ウイルス試験の実施を予定している。

【1】Signal to background (S/B 比) =  $Av_{100\%}/Av_{0\%}$ ; Coefficient of variation (CV)  $_{100\%} = SD_{100\%}/Av_{100\%}$ ;  $CV_{0\%} = SD_{0\%}/Av_{0\%}$ ; Z' 因子 =  $1 - (3 \times SD_{100\%} + 3 \times SD_{0\%}) / (Av_{100\%} - Av_{0\%})$ ;  $Av_{100\%}$ , 100%阻害の平均値;  $SD_{100\%}$ , 100%阻害の標準偏差。

#### 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3件)

- (1) Ohmine, T., Narai, S., Matsubara, T., Nomura, T., Oda, K., Fukushi, M., Irie, T., Komatsu, T. Tohya, Y., Sakaguchi, T. Eligibility of feline calicivirus for a surrogate of human norovirus in compassion with murine norovirus, poliovirus and coxsackievirus. *Biocontrol Science*, in press, 査読あり
- (2) Nomura, T., Yoshimoto, R., Kawabata, R., Matsubara, T., Narai, S., Oda, K., Fukushi, M., Irie, T., Sakaguchi, T. Inactivation of influenza virus by a supplemental fermented plant product ('Manda Koso'). *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 66: 97-101, 2017, 査読有り
- (3) Oda, K., Oda, T., Matoba, Y., Sato, M., Irie, T., Sakaguchi, T. Structural analysis of the STAT1-STAT2 heterodimer revealed the mechanism of Sendai virus C protein-mediated blockade of type 1 interferon signaling. *Journal of Biological Chemistry* 292: 19752-19766, 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.786285, 査読有り

〔学会発表〕(計27件)

- (1) Kosuke Oda. Relationship between the inducibility of the IFN- $\gamma$  production in Sendai virus Cantell strain and the antagonistic action toward the IFN- $\gamma$  signal transduction by the C protein. 第11回次世代アジュバント研究会, 2018年1月23日
- (2) 小田康祐. IFN 受容体を介したセンダイウイルスCタンパク質によるIFNシグナル伝達阻害機構の解明. 7<sup>th</sup> Negative

Strand Virus-Japan Symposium, 2018年1月15-17日

- (3) Toshihito Nomura, Takashi Irie, Masaya Fukushi, Kosuke Oda, Takemasa Sakaguchi. KAMPO HERBAL MEDICINES USED FOR INFLUENZA OR RESPIRATORY DISEASES AND THEIR CRUDE DRUGS INHIBIT INFLUENZA REPLICATION. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年10月24-26日
- (4) Toshiki Matsubara, Reiko Yoshimoto, Ryoko Kawabata, Hiromi Abe-Chayama, Masaya Fukushi, Kosuke Oda, Takashi Irie, Kazuaki Chayama, Takemasa Sakaguchi. Inhibition of the release of virus-like particles by HBV S protein but not o HBV by tetherin/CD317/BST2. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年10月24-26日
- (5) Takemasa Sakaguchi, Reiko Yoshimoto, Ryoko Kawabata, Toshiki Matsubara, Toshihito Nomura, Kosuke Oda, Masaya Fukushi, Takashi Irie. Robust expression of TMPRSS2 in a trypsin-non-requiring MDCK cell line. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年10月24-26日
- (6) Takashi Irie, Ryoko Kawabata, Asuka Yoshida, Isao Okamoto, Jun Miyake, Kosuke Oda, Takemasa Sakaguchi. A novel anti-apoptotic role of Sendai virus V protein via its interaction with IRF3. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年10月24-26日
- (7) Kosuke Oda, Takayoshi Okabe, Yasuyuki Matoba, Takashi Irie, Takemasa Sakaguchi. Development of high-throughput screening to find an anti-human parainfluenza virus drug targeting C protein. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年10月24-26日
- (8) 小田康祐, 小田隆, 的場康幸, 佐藤衛, 入江崇, 坂口剛正. センダイウイルスC蛋白質によるIFN-alpha/betaシグナル伝達阻害機構. 第11回バイオ関連化学シンポジウム, 2017年9月7-9日
- (9) 小田康祐, 小田隆, 的場康幸, 佐藤衛, 入江崇, 坂口剛正. センダイウイルスCタンパク質によるIFN- $\gamma$  / 応答阻害機構の構造基盤解明. 第29回微生物シンポジウム, 2017年8月29-30日
- (10) Toshihito Nomura, Takashi Irie, Masaya Fukushi, Kosuke Oda, Takemasa Sakaguchi. KAMPO HERBAL MEDICINES COMMONLY USED FOR RESPIRATORY DISEASES AND THEIR CRUDE DRUGS ACTUALLY INHIBIT INFLUENZA REPLICATION. IUMS 2017, 2017年7月

17-21 日

- (11) Takashi Irie, Ryoko Kawabata, Asuka Yoshida, Isao Okamoto, Kosuke Oda, Takemasa Sakaguchi.: SENDAI VIRUS V PROTEIN PLAYS AN ANTIAPOPTOTIC ROLE DURING INFECTION. IUMS 2017, 2017 年 7 月 17-21 日
- (12) Kosuke Oda, Takashi Oda, Yasuyuki Matoba, Takashi Irie, Mamoru Sato, Takemasa Sakaguchi. STRUCTURAL INSIGHTS INTO STAT1-DEPENDENT INHIBITION OF STAT2 PHOSPHORYLATION BY SENDAI. IUMS 2017, 2017 年 7 月 17-21 日
- (13) 小田康祐, 小田隆, 的場康幸, 入江崇, 佐藤衛, 坂口剛正. Structural mechanism for unresponsiveness of Sendai virus C protein to interferon- $\gamma$  in a STAT1-dependent manner. 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 2017 年 6 月 20-22 日
- (14) 坂口剛正, 小田康祐, 福士雅也, 入江崇. トリプシン非要求性細胞株 MDCK (+) における TMPRSS2 の発現. 第 31 回インフルエンザウイルス研究者交流の会シンポジウム, 2017 年 6 月 8-10 日
- (15) 野村俊仁, 小田康祐, 福士雅也, 入江崇, 坂口剛正. 感冒時に適応となる漢方薬のインフルエンザウイルス増殖抑制作用. 第 32 回中国四国ウイルス研究会, 2017 年 6 月 10-11 日
- (16) 坂口剛正, 吉元玲子, 奈良井静香, 川端涼子, 小田康祐, 福士雅也, 入江崇. トリプシン非要求性細胞株 MDCK (+) における TMPRSS2 の発現. 第 32 回中国四国ウイルス研究会, 2017 年 6 月 10-11 日
- (17) 小田康祐, 小田隆, 的場康幸, 入江崇, 佐藤衛, 坂口剛正. センダイウイルス C タンパク質による STAT1:STAT2 ヘテロ二量体の阻害機構の解明. 第 32 回中国四国ウイルス研究会, 2017 年 6 月 10-11 日
- (18) 小田康祐, 岡部隆義, 的場康幸, 入江崇, 坂口剛正. 多機能性アクセサリー蛋白質を標的とした抗センダイウイルス阻害剤の高精度ハイスループットスクリーニング. 第 7 回スクリーニング学研究会, 2016 年 11 月 25 日
- (19) Toshiki Matsubara, Kosuke Oda, Takashi Irie, Masaya Fukushi, Takemasa Sakaguchi. Core-VLP を用いた B 型肝炎ウイルス出芽機構の解析. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016 年 10 月 23-25 日
- (20) Toshihito Nomura, Kosuke Oda, Masaya Fukushi, Takashi Irie, Takemasa Sakaguchi. 臨床的に用いられている漢方薬 (麻黄湯, 銀翹散) によるインフルエンザウイルス増殖抑制作用の検討.

第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016 年 10 月 23-25 日

- (21) Takashi Irie, Ryoko Kawabata, Kosuke Oda, Takemasa Sakaguchi. Selective manipulation of multifunctional Sendai virus C protein by single amino acid substitutions. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016 年 10 月 23-25 日
- (22) Takemasa Sakaguchi, Kosuke Oda, Takashi Irie, Toshiki Matsubara, Ryoko Kawabata, Masaya Fukushi. Dose Sendai virus need the C protein and the host factor Alix for virus budding?. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016 年 10 月 23-25 日
- (23) Kosuke Oda, Takashi Oda, Yasuyuki Matoba, Takashi Irie, Mamoru Sato, Takemasa Sakaguchi. Structural mechanism for unresponsiveness to interferon- $\alpha/\beta$  in Sendai virus-infected cells. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016 年 10 月 23-25 日
- (24) 小田康祐, 岡部隆義, 的場康幸, 入江崇, 坂口剛正. Development of an anti-Sendai virus drug targeting on the accessory protein. 第 68 回日本生物工学会大会, 2016 年 9 月 28-30 日
- (25) 松原稔樹, 小田康祐, 入江崇, 福士雅也, 坂口剛正. Core-VLP を用いた B 型肝炎ウイルス出芽機構の解析. 第 31 回中国四国ウイルス研究会, 2016 年 7 月 9-10 日
- (26) 川端涼子, 小田康祐, 坂口剛正, 入江崇. センダイウイルスアクセサリー蛋白質機能の選択的操作. 第 31 回中国四国ウイルス研究会, 2016 年 7 月 9-10 日
- (27) 坂口剛正, 小田康祐, 入江崇, 福士雅也. センダイウイルス C 蛋白質のウイルス出芽促進作用, 第 30 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 2016 年 6 月 23-25 日

〔その他〕

- Proceedings of international conference
- (1) Oda, K., Oda, T., Matoba, Y., Irie, T., Sato, M., and Sakaguchi, T. Structural insights into STAT1 dependent inhibition of STAT2 phosphorylation by Sendai virus C protein. *IUMS2017, XVII International Congress of Virology*, Sans Expo & Convention Center, Singapore. July 17-21, 2017.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 康祐 (ODA, Kosuke)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科

(医)・助教  
研究者番号：60571255