

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03140

研究課題名（和文）汎フィロウイルス治療薬開発に向けたドライ-ウェット融合型研究基盤の構築

研究課題名（英文）A fundamental study for developing broad-spectrum antivirals against different filoviruses by combining experimental and computational approaches

研究代表者

五十嵐 学（IGARASHI, Manabu）

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・准教授

研究者番号：10374240

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,940,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、計算機解析と実験的手法を有機的に連携させて、フィロウイルスに広く効果を示す治療薬開発の研究基盤の構築を目的としている。一般にウイルス蛋白質が、宿主分子等と相互作用する機能領域は、抗ウイルス薬の標的になる可能性がある。本研究では、ウイルス蛋白質が持つ新たな相互作用/機能領域の探索手法の開発を行った。またフィロウイルスの蛋白質と宿主分子等との複合体構造を分子シミュレーションにより解析し、フィロウイルスに共通の薬剤標的部位を探索した。その結果、ウイルス表面糖蛋白質の受容体結合部位や核蛋白質上の複合体形成部位では、相互作用に重要なアミノ酸残基がフィロウイルス種間で高度に保存されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フィロウイルスに含まれるエボラおよびマールブルグウイルスは、ヒトに致死率の高い感染症を引き起こす。しかし、これまで治療薬研究はザイルエボラウイルス種が主対象であり、フィロウイルス全般に効果のある抗ウイルス薬の探索は十分に行われていない。本研究で開発したインシリコおよび実験的手法や、本研究で予測・同定したフィロウイルスに共通の創薬標的部位に関する知見は、今後の汎フィロウイルス治療薬開発研究を支える重要な基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop widely effective antivirals against multiple filovirus species by combining computational and experimental methods. Herein, potential common target sites for antiviral drug design among filovirus species were identified. As an example, we computationally constructed the complex structures between the surface glycoprotein (GP) of several filovirus species and their endosomal receptor (NPC1), analyzing their molecular interaction. Our results suggest that the binding site of NPC1 present in GPs might be a potential target site for broad-spectrum antivirals against multiple filovirus species.

研究分野：計算構造生物学

キーワード：フィロウイルス エボラウイルス マールブルグウイルス 医薬分子設計 抗ウイルス薬 分子間相互作用 分子動力学 立体構造

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

フィロウイルスにはエボラウイルス 6 種とマールブルグウイルス 1 種が含まれ、そのほとんどがヒトに重篤な出血熱を引き起こす人獣共通感染症病原体である。2014 年西アフリカで発生したエボラウイルス病は未曾有の大流行となり、11,000 人以上の死者を出した。また 2018 年 8 月コンゴ民主共和国で発生したエボラウイルス病は現在 (2019 年 10 月時点) も終息せず、国際的な感染拡大の可能性が懸念されている。現在フィロウイルス感染症の研究ではエボラウイルスの 1 種であるザイルエボラウイルス (EBOV) が主に用いられる。これは、EBOV の病原性が最も高く、アウトブレイクの規模も大きいため、需要が大きいためである。しかし、EBOV 種以外のウイルスに対しても研究を進め、予防・治療法を開発する必要がある。

ごく最近、エボラウイルス病に対する抗体医薬の治療効果が臨床試験で認められ、エボラウイルス病の治療に光が見えてきた。一方で、抗体医薬は EBOV に特異的なものが優先的に開発されており、将来のアウトブレイクに備えるためにも、汎フィロウイルス治療薬を開発する必要がある。しかし、フィロウイルスは最も危険度の高いウイルスとして位置づけられ、感染性ウイルスは高度安全実験 (BSL4) 施設で使用しなければならない。このため、限られた機関でしか研究ができず、フィロウイルス全体に効果のある抗ウイルス薬の探索が十分に行われていない。

2. 研究の目的

上述した背景を受け、研究代表者らは計算機 (インシリコ) 解析を活用し、フィロウイルス全般に共通する蛋白質の構造やその機能を探索することを着想した。ウイルスの増殖過程において、個々のウイルス蛋白質は、ウイルス蛋白質同士あるいは宿主分子と相互作用することで機能を発揮する。したがって、ウイルス蛋白質上の相互作用および機能に関連する部位 (相互作用/機能部位) は、近縁ウイルス間で保存されている可能性が高い。

これまでに研究代表者らは、配列・構造情報のインシリコ解析により、ウイルス蛋白質上の相互作用/機能部位を推定する手法を開発してきた。また、感染性ウイルスを用いずにフィロウイルス蛋白質の機能解析や抗ウイルス化合物のスクリーニングを行える実験系も確立している。

そこで本研究では、インシリコ手法 (ドライ) と実験的手法 (ウェット) の有機的な融合により、フィロウイルスの新規治療薬開発を目指す研究基盤の構築を目的とする。具体的には、

- (1) フィロウイルス種のウイルス蛋白質の相互作用/機能部位を計算機上で推定する。
- (2) 推定した相互作用/機能部位を実験で評価する基盤技術を整備する。
- (3) 相互作用/機能部位の創薬標的としての可能性を計算機上で評価する。

3. 研究の方法

(1) 近縁種のウイルス蛋白質に共通する相互作用/機能部位の推定

解析には、公共データベース PDB および NCBI に登録されているエボラおよびマールブルグウイルスの立体構造および配列データを用いた。構造が解かれていない近縁種の蛋白質の構造は、既知構造を用いて、ホモロジーモデリング法により構築した。

(2) 推定した領域の実験的検証

ルシフェラーゼ遺伝子等をレポーターとしたミニゲノムアッセイを用いて、ウイルス遺伝子転写複製効率への影響を解析した。

(3) 機能部位の創薬標的としての可能性の評価

蛋白質間相互作用 (Protein-Protein interaction: PPI) の界面は広く平坦なため、創薬標的となるかを判断するのは困難である。本研究では、市販ソフトウェアのポケット探索プログラムと分子シミュレーション手法 (mixed-solvent MD 法) の結果を用いて、機能部位の創薬標的としての可能性を総合的に評価した。

4. 研究成果

1. エボラウイルスの増殖に関わる新たな機能部位の同定

蛋白質の表面には、疎水性アミノ酸が集まった疎水性パッチ、荷電アミノ酸が集まった正電荷パッチ、負電荷パッチが存在する。このようなパッチは分子間相互作用に重要であると考えられている。特に、疎水性パッチは高親和性の相互作用に重要な役割をしていると言われている。本研究では、エボラウイルスのウイルス蛋白質 VP35 の新たな機能領域 (ウイルス蛋白質同士や宿主分子との相互作用領域) を予測するため、計算機を用いてパッチ解析を行った [1]。

エボラウイルスの複製に重要な VP35 は、ポリマーゼ補因子、IFN 産生阻害、PKR シグナル阻害としての機能を有し、その C 末端領域の構造が決定されている (PDB code: 3FKE)。この構造に対してパッチ解析を行った結果、十分な面積を持つパッチが全部で 18 個存在した (図 1)。このうち 8 個は機能に重要であると報告されているアミノ酸残基が含まれていた。

すなわち、パッチ解析により、機能に関わる領域を予測できる可能性が示唆された。そこで本研究では疎水性パッチに着目し、パッチが実際に機能に重要かを実験により検証した。VP35 の C 末端領域には疎水性パッチが全部で 3 つ存在していた。そのうち 2 つは機能が報告されているアミノ酸を含んでいるが、もう 1 つは完全に機能が不明であった。そこで、これらの領域に変異を導入し、パッチを消失させることで、その影響を調べた。

導入するアミノ酸は、パッチ面積と安定性を計算機上で計算し、構造に影響せず、当該パッチだけを消失させるものを選んだ。選択した変異を導入したパッチ変異体 VP35 発現プラスミドを作成し、293T 細胞での発現をウエスタンブロットングにより確認した。次に、これらの変異体について、VP35 の持つ機能のうち、直接ウイルス増殖に関わる機能であるポリマーゼ補因子としての活性をミニゲノムアッセイにより調べた。VP35 発現プラスミドに加え、ポリマーゼ L、NP、VP30 の発現プラスミド、さらにレポーターとしてルシフェラーゼを発現するミニゲノム RNA を発現するプラスミドを細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。このアッセイでは、VP35 を含む 4 つのウイルス因子が揃うことで、エボラウイルスのミニゲノムが複製・転写され、ルシフェラーゼ活性が見られるようになる。はじめに、既報の VP35 の機能を欠損させる変異体 (R225E) を用いてルシフェラーゼ活性が下がることを確認した。つづいて、これまで機能との関係が報告されていない疎水性パッチでも、ルシフェラーゼ活性が低下するアミノ酸置換 (F239K) が確認された。すなわち、当該疎水性パッチ領域にもポリマーゼ補因子活性に重要なアミノ酸が含まれていることが明らかになった。このようにパッチ消失計算により、効率よく機能に重要な部位を同定できる可能性が示された。

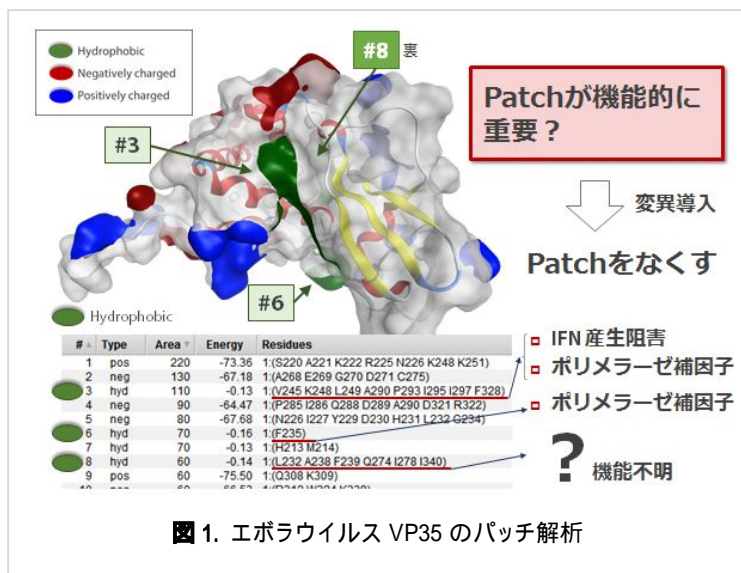


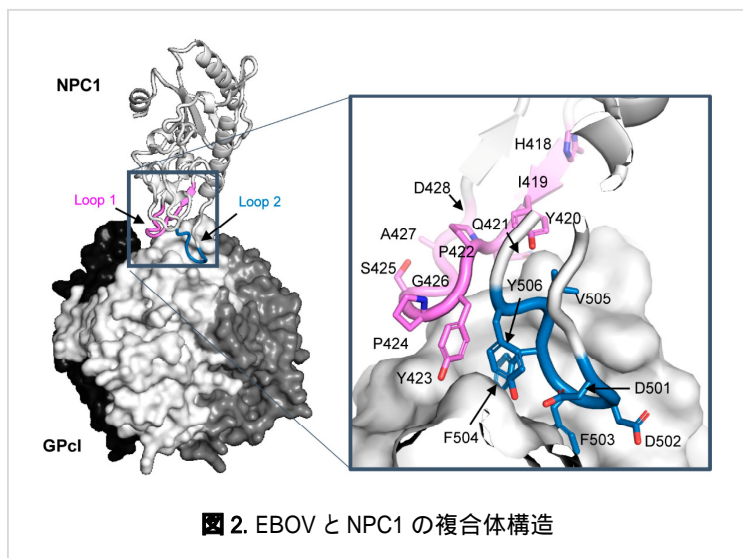
図 1. エボラウイルス VP35 のパッチ解析

2. ウイルス蛋白質アミノ酸配列に対する Short Linear Motif (SLiM) 検出法の開発

ウイルス蛋白質のアミノ酸配列には、増殖過程において宿主因子等との相互作用に重要なアミノ酸モチーフ配列 (SLiM; Short Linear Motif) が数多く同定されている。しかし、既知の SLiM をアミノ酸配列に対して検索することは容易だが、アミノ酸配列の保存性のみから未知の SLiM 候補を予測するとモチーフ配列の長さのため、多くの候補が得られてしまい、新規の SLiM 候補を効率的に見つけ出すことが難しい。アミノ酸の保存性ととも、異なるアプローチを組み合わせた SLiM 候補を効率的に絞り込む手法の開発が必要である。本研究では、アミノ酸の出現頻度から計算される位置重み行列 (PWM; Position Weight Matrix) とクラスタリング手法を用いて、異なるウイルス種間の蛋白質に共通して存在する新たな SLiM 候補を検出する手法のプロトタイプを開発した。また、開発した手法を用いて、高病原性ウイルスとその関連ウイルス (ラッサウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、重症熱性血小板減少症候群ウイルス) の蛋白質で、表面糖蛋白質以外の蛋白質を対象に SLiM 候補の検出を行った。解析には、Virus Pathogen Resource (ViPR) に登録されているデータを用いた。解析から得られた SLiM 候補を真核生物の機能既知の SLiM と照合した結果、96.6% が一致していた。すなわち、本手法により非常に高い精度で SLiM 候補を検出できることが確認できた。

3. フィロウイルスに共通の薬剤標的部位の同定

フィロウイルスの粒子表面には単一の GP があり、ウイルスの細胞への吸着、侵入および膜融合を担っている。GP は後期エンドソームで、宿主カテプシン(カテプシン L および B)により、グリカンキャップおよびムチン様ドメインが取り除かれ、レセプター結合部位(Receptor binding site: RBS)が露出する。RBS が露出した GP (Cleaved GP: GPcl) は、エンドソーム受容体である Niemann-Pick C1 (NPC1) 蛋白質に結合し、続いて膜融合が起こる。最近、エボラウイルスの 1 種である EBOV の GPcl と NPC1 との複合体構造が決定された(図 2)。この複合体構造は、NPC1 の 2 つのループ(loop 1 と loop 2)が、GPcl 頭部にある RBS の疎水性ポケットに突き刺さる形で相互作用していた[2]。Li らは、この構造を基に分子動力学計算を行い、loop 1 よりも loop 2 の方が EBOV GPcl との結合への寄与が大きいことを示した[3]。つづいて、loop 2 にコンピュータ上でアミノ酸置換を導入し、GPcl に対する結合親和性が loop 2 よりも高い環状ペプチドを設計した。さらに、この環状ペプチドが NPC1 と GPcl との相互作用を阻害し、シュドタイプ EBOV の感染性を有意に減少させることを実験で確認した。これらの結果は、蛋白質の相互作用部位を標的に、コンピュータ支援による阻害剤設計が可能であることを示唆している。



一方、EBOV 以外のフィロウイルスも、感染時は GPcl が NPC1 に結合する。すなわち、RBS は汎フィロウイルス治療薬の標的として機能する可能性がある[4]。しかし、EBOV 以外のフィロウイルスに関しては、NPC1 と GPcl との結合構造についての知見はない。そこで本研究では、EBOV 以外のエボラウイルス種であるスーダンウイルス(SUDV)やマールブルグウイルス(RAVV)の GPcl と NPC1 との複合体構造をコンピュータ上で構築し、分子動力学計算を用いて相互作用解析を行った[5]。その結果、結合構造はウイルス間でいくぶん違いがある一方、GPcl との結合に重要な NPC1 上のアミノ酸残基は共通していた。また、EBOV 同様、SUDV や RAVV でも、loop 1 よりも loop 2 の方が GPcl との結合に大きく寄与していた。さらに、EBOV GPcl に対して、分子シミュレーション手法(mixed-solvent MD 法)を行い、RBS が創薬標的となる可能性を確認した。

[1] Kasajima N, Matsuno K, et al : Viruses. 13(11) : 2316, 2021

[2] Wang H, Shi Y, Song J et al : Cell. 164 : 258-268, 2016

[3] Li Q, Ma L, Yi D et al : Antiviral Res. 155 : 1-11, 2018

[4] Wang LL, Palermo N, Estrada L et al : Antiviral Res. 189 : 10509, 2021

[5] Igarashi M, Hirokawa T, Takadate Y et al : Viruses. 13(5) : 913, 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Igarashi Manabu, Hirokawa Takatsugu, Takadate Yoshihiro, Takada Ayato | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Structural Insights into the Interaction of Filovirus Glycoproteins with the Endosomal Receptor Niemann-Pick C1: A Computational Study | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Viruses | 6. 最初と最後の頁 913 ~ 913 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13050913 | 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 Kasajima Nodoka, Matsuno Keita, Miyamoto Hiroko, Kajihara Masahiro, Igarashi Manabu, Takada Ayato | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Functional Importance of Hydrophobic Patches on the Ebola Virus VP35 IFN-Inhibitory Domain | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Viruses | 6. 最初と最後の頁 2316 ~ 2316 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13112316 | 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 Abe Takashi, Furukawa Ryuki, Iwasaki Yuki, Ikemura Toshimichi | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Time-Series Trend of Pandemic SARS-CoV-2 Variants Visualized Using Batch-Learning Self-Organizing Map for Oligonucleotide Compositions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Data Science Journal | 6. 最初と最後の頁 29 ~ 29 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5334/dsj-2021-029 | 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 Fujita-Fujiharu Yoko, Sugita Yukihiko, Takamatsu Yuki, Houri Kazuya, Igarashi Manabu, Muramoto Yukiko, Nakano Masahiro, Tsunoda Yugo, Taniguchi Ichiro, Becker Stephan, Noda Takeshi | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Structural insight into Marburg virus nucleoprotein-RNA complex formation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 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) 10.1038/s41467-022-28802-x | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 五十嵐 学 | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 タンパク質の立体構造情報を活用した抗フィロウイルス薬の探索 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 生体の科学 | 6. 最初と最後の頁 321 ~ 325 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201376 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Igarashi Manabu, Hirokawa Takatsugu, Takada Ayato | 4. 巻 228 |
| 2. 論文標題 Structural and Energetic Basis for Differential Binding of Ebola and Marburg Virus Glycoproteins to a Bat-Derived Niemann-Pick C1 Protein | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases | 6. 最初と最後の頁 S479 ~ S487 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiad120 | 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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤田陽子、杉田征彦、高松由基、祝部和也、五十嵐学、角田優伍、村本裕紀子、中野雅博、野田岳志 |
| 2. 発表標題 マールブルグウイルス 核タンパク質-RNA複合体の構造解析 |
| 3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋侑嗣、高館佳弘、宮本洋子、梶原将大、五十嵐学、高田礼人 |
| 2. 発表標題 Niemann-Pick C1のループ構造由来環状ペプチドによるフィロウイルス侵入阻害効果 |
| 3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 広川 貴次 (HIROKAWA Takatsugu) (20357867) | 筑波大学・医学医療系・教授 (12102) | |
| 研究分担者 | 阿部 貴志 (ABE Takashi) (30390628) | 新潟大学・自然科学系・教授 (13101) | |
| 研究分担者 | 松野 啓太 (MATSUNO Keita) (40753306) | 北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・講師 (10101) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|