

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07763

研究課題名(和文)ユニバーサルな抗パラミクソウイルス活性をもつナノ粒子薬の開発

研究課題名(英文)A universal design of nanoparticle-based antivirals against paramyxoviruses

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は抗RSウイルス活性をもつペプチド「PFr」を開発し、これがウイルスのPタンパク質の4量体形成部位を標的とすることを見出した。さらに、標的部位の立体構造は全てのモノネガウイルス目に共通していることが分かった。そこで、モノネガウイルス目で最大のパラミクソウイルス科に焦点を当て、RSウイルスのPFrと同じ設計手法をパラミクソウイルスにも適用した。作製したPFrはパラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルスに対し培養細胞レベルでIC50値が100 nM以下の強い抗ウイルス活性を示した。これらはPFrの設計手法が他の多くのパラミクソウイルスにも適用できることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗パラミクソウイルス薬は未だ開発されていない。本研究は、Pタンパク質の4量体形成領域を標的とした新しい抗パラミクソウイルス薬の開発が可能であることを裏付ける成果である。さらに、この創薬手法はパラミクソウイルス科以外の他のモノネガウイルスにも適用できることを示唆しており、広域な抗ウイルス活性をもつ阻害薬の開発に寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：We have previously developed a phosphoprotein (P)-derived peptide, PFr, from Respiratory Syncytial Virus (RSV). This peptide targets the oligomerization domain of P and inhibits RSV replication. The structural architecture of the oligomerization domain is conserved across all Mononegavirales. Therefore, in this study, we focused on the largest family within the Mononegavirales order, the Paramyxoviridae, and applied the same design principles used for RSV to create PFr for paramyxoviruses. The resulting PFr peptides exhibited potent antiviral activity against parainfluenza virus, measles virus, and mumps virus, with IC50 values below 100 nM in cultured cells. These findings demonstrate that the PFr design strategy can be broadly applied to a variety of paramyxoviruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：抗ウイルス薬 パラミクソウイルス モノネガウイルス ペプチド阻害薬 Pタンパク質 4量体形成部位

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス科およびニューモウイルス科(最近パラミクソウイルス科から独立)には多くの重要な病原ウイルスが含まれ、多彩な疾患を引き起こす。最も感染力の強い麻疹ウイルス、呼吸器疾患で重要なRSウイルス(RSV)、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)、ヒトパラインフルエンザウイルス(HPIV)、ムンプスウイルス(MuV)、致死的なヘンドラウイルス(HeV)やニパウイルス(NiV)が含まれている。これらパラミクソウイルス感染症の中心はやはり幼年層であり、ワクチンのある麻疹ですら毎年100万人の幼児が世界で亡くなっている。RSVは幼児の呼吸器疾患を重症化させ、毎年約20万人が死亡している。しかし、パラミクソウイルスに対する治療薬は未だ開発されておらず、治療法の確立と特異的な抗ウイルス薬の開発が急務である。

2. 研究の目的

新規抗パラミクソウイルス薬を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

これまで我々は、ウイルスタンパク質どうしの相互作用を狙った抗RSV薬の開発に取り組み、有力な治療薬候補「PFr」を開発した。PFrはウイルスのPタンパク質の4量体形成領域をもとに設計したペプチド(82アミノ酸)で、RNAポリメラーゼ必須因子のPに特異的に結合しRNAポリメラーゼ活性を阻害する。PFrの標的となるPの4量体形成領域は、ウイルスによってアミノ酸配列は大きく異なるが、全て同じようならヘリックス構造をとるという共通点がある(図1)。この共通点は、RSVが属するニューモウイルス科の他にパラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科を含めた全てのモノネガウイルス目にある。そこで、Pの4量体形成領域は抗ウイルス薬の重要な標的になりうると考え、RSVのPFr(RSV PFr)の設計手法をパラミクソウイルスに適用し、新規抗パラミクソウイルス薬の開発を試みた(図2)。

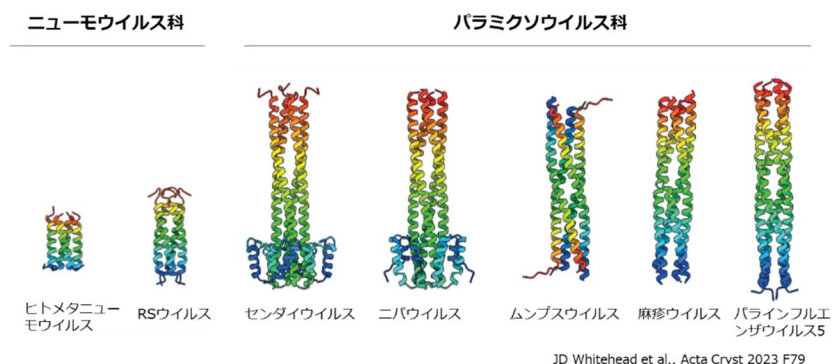


図1. Pタンパク質の4量体形成部位の立体構造

まず、PFrの改良を行った。これまでのPFrはC末端にTAPタグを付加していたが、精製後もTAPタグ由来の46アミノ酸がC末端に残存し、PFrのC末端の重要な機能部位が隠れていた。そこで、TAPタグをN末端側へ移動させてC末端を露出させ、かつ残存するタグ由来のアミノ酸残基を可能な限り短縮させ(7アミノ酸残基)、改良後のPFrの抗ウイルス活性を調べた。次に、この設計手法をもとに、HPIV3、MeV、MuVの3種類のパラミクソウイルスのPFr(HPIV3 PFr、MeV PFr、MuV PFr)を作成した。また、RSVと同じニューモウイルス科のHMPVのPFr(HMPV PFr)も作成した。バキュロウイルス・SF21昆虫細胞発現系を用いてPFrを発現させ、IgGセファロースを用いて回収し、TEVプロテアーゼでTAPタグを切断しPFrを精製した。そして、各PFrの抗ウイルス効果を培養細胞レベルで評価した。ウイルスを予め接種した細胞へPFrを取り込ませ、培養24~48時間後に培地中に産生されたウイルスを回収しプラークアッセイにてウイルス量を定量した。培養細胞にはLLC-MK2(HPIV)、Vero細胞(MeV、MuV)、HEP-2細胞(RSV)をそれぞれ用いた。

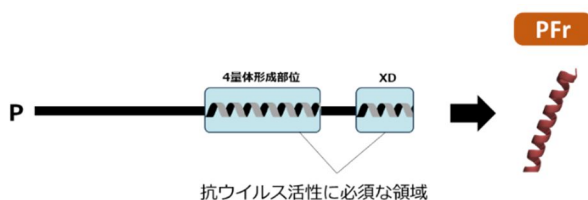


図2. PFrの設計図

4. 研究成果

最初に、改良した RSV PFr の RSV に対する阻害効果を調べたところ、 IC_{50} 値が 32 nM と強い阻害効果が見られ、また標的とする P タンパク質にも結合することが確認できた。さらに PFr の C 末端を露出させたことで N タンパク質にも結合できるようになり、P の 4 量体形成だけでなく、ウイルス複製中のヌクレオカプシドにも作用しウイルス複製を阻害していることが示唆された。次に、この RSV PFr が他のウイルスにも効果があるかどうか調べるため、パラミクソウイルス科の HPIV3 を対象にウイルス増殖阻害実験を行った。しかし、阻害効果はほとんど見られず、また標的の HPIV の P タンパク質にもほとんど結合しなかった。標的 P タンパク質の立体構造は広く保存されているが、PFr のウイルス科を超えた阻害効果 (RSV はニューモウイルス科) は得られにくいと判断した。そこで、新たに各種パラミクソウイルスに対応する PFr を作製し、それぞれ対応するウイルスについて阻害実験を行った。その結果、全ての PFr でそれぞれのパラミクソウイルスに対する強い阻害効果が得られた。 IC_{50} 値は、HPIV3 で 29nM、MeV で 83 nM、MuV で 87 nM といずれも 100 nM 以下の低濃度を示した (図 3)。一方、細胞毒性はほとんど見られなかった。また、PFr はそれぞれのパラミクソウイルスの P タンパク質と特異的に結合することが確認できた。これらの結果から、PFr は各ウイルスに対応させて設計すれば最大限の抗ウイルス活性が得られることが分かった。一方、HMPV に対しては阻害効果を確認することができなかった。これは、HMPV が感染時にプロテアーゼを必要とするため、培地にトリプシンを添加したのが原因と考えられる。トリプシンにより PFr が分解された可能性があり、実験系を修正する必要がある。しかし、HMPV の P タンパク質には HMPV PFr だけでなく RSV PFr も結合できることを確認している。

本研究は、P タンパク質の 4 量体形成領域を持つペプチドにより、P タンパク質の 4 量体化およびヌクレオカプシドの形成を阻害し、効率的にウイルス増殖を抑制するという新しい創薬法を実証するものである。今回はパラミクソウイルス科についての効果を明らかにしたが、さらに広くモノネガウイルス目全体に適用できると考えている。

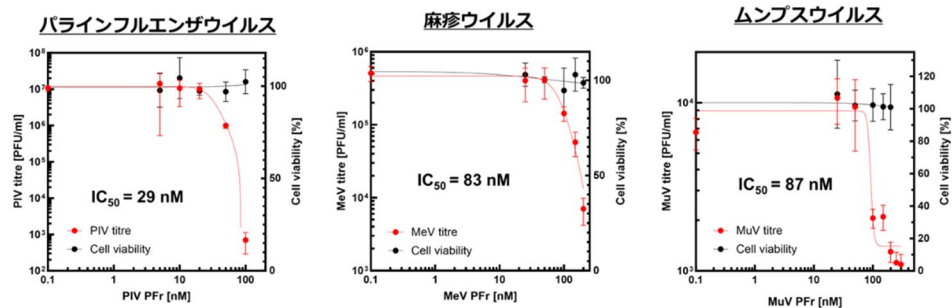


図3. パラミクソウイルスに対するPFrの増殖阻害効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 原 好勇、渡邊 浩
2. 発表標題 RNAポリメラーゼの必須因子Pを標的とした抗ウイルス薬の開発研究
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 好勇、渡邊 浩
2. 発表標題 Pタンパク質を標的とした抗パラミクソウイルス薬の設計
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023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	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
---------	---------