

# 構造に基づく新規抗エボラウイルス化合物の探索

長崎大学熱帯医学研究所 新興感染症学分野

浦田 秀造

## 1. はじめに

**【背景】**我々人類はこれまでに多くの感染症を克服してきたにも関わらず、未だに克服できない新興・再興感染症が存在する。その中でもエボラウイルス感染によるエボラ出血熱 (エボラウイルス病)は、①致死率が高いこと、②抗ウイルス薬・ワクチンがないことから、抗エボラウイルス療法の確立が強く望まれている。

通常、エボラウイルスのアウトブレイクは中央アフリカで起きていたが、2014 年はじめから、これまで感染域ではなかったギニア、リベリア、シエラ・レオネの西アフリカ地域で感染が流行し、2015 年冬の今も終息していない。この間、西アフリカ地域を訪れ、先進国である自国に帰国後、エボラウイルス感染様症状を呈し一時隔離された例もあり、エボラ出血熱はアフリカ現地だけの問題ではないことを再認識させられた。

エボラウイルスは 1976 年に初めて同定されて以来、致死率(~90%)の最も高いウイルスの一つであるとされている。そのため感染性ウイルスの使用はバイオセーフティーレベル (BSL)-4 に限定されている。しかし、遺伝子組換え技術によるエボラウイルスタンパク質の単独発現や非感染性ウイルス粒子の作製は BSL-2 で行うことができる。2000 年以前はウイルス複製の前期過程、つまりウイルスの細胞侵入過程が多くの研究者の研究対象であり、抗体などによるウイルス感染防御等が注目されていた。世界的にもエボラウイルスに対するワクチンの開発が試みられているが、未だ認可には至っていない。

2000 年以降、ウイルス複製後期過程にも研究の焦点が当てられるようになった。HIV-1 を始め、多くのウイルスがその出芽過程において同様の宿主機構を用いることが明らかとされた (Garrus et al. Cell. 2001)。申請者らもウイルス出芽に着目し、特に高病原性ウイルスの出芽過程の解明に大きく貢献してきた。

このような状況において、米国スクリプス研究所の E. Saphire 博士らは、エボラウイルスタンパク質構造を解析することでエボラウイルス研究に新たな展開を見せた (Lee et al., Nature, 2008, Bale et al., J. Virol. 2013 など)。そして昨年、彼女らは本申請の根幹に当たるエボラウイルス VP40 の立体構造の解明と VP40 二量体化に関わる重要なアミノ酸を同定した (Bornholdt et al., Cell, 2013)。

**【目的】**エボラウイルス VP40 の立体構造情報を基に、エボラウイルス粒子形成・出芽を阻害する化合物をインシリコで探索し、その抗ウイルス効果をバイオアッセイにて検討することを目的とした。

## 2. 方法

### ・インシリコライブラリースクリーニング

Bornholdt らが Cell 誌に報告したエボラウイルス VP40 の二量体化必須アミノ酸情報・周辺アミノ酸構造情報より、①MOE (菱化システム)、②長崎大学所有のスーパーコンピューター DEGIMA、の二通りにて二量体化阻害化合物候補をインシリコにて探索した。尚、化合物ライブラリーは文部科学省最先端研究基盤事業「化合物ライブラリーを活用した創薬等最先端研究・教育基盤の整備」所有のものを使用した。

### ・レポータータンパク質を用いた1次スクリーニング (レポーター発現系)

本スクリーニングでは現在知られている最小かつ高感度の NanoLuc (Promega 社) を VP40 に付加し、細胞内で発現させることで超遠心分離を行わずに簡便にウイルス様粒子 (VLP) 産生を定量し、VLP 産生阻害候補化合物のスクリーニング法を確立した。293T 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、pC-Nluc-EBOV VP40 プラスミドを 0.1 $\mu$ g トランスフェクションにより導入した。トランスフェクション 6 時間後に化合物を含む培地に置換し (最終濃度 100 $\mu$ M)、更に 18 時間培養した。培養上清を回収し、細胞は溶解させ細胞溶解液を作製した。それぞれを NanoLuciferase 基質と 1:1 で混合させ、相対的発光量 (RLU) を測定した。VLP 産生効率は培養上清(RLU)/細胞溶解液(RLU)を計算することで求めた。DMSO (コントロール) 処理によるものを 1.0 と設定し、それぞれの化合物処理による産生効率を数値化した。VLP 産生阻害効率が 50% 以下で細胞生存率が 80% 以上である化合物を選定した。①に関しては選定化合物を改めて請求し、再度 VLP 産生阻害効率を確認した。その際、ポジティブコントロールとしては近年報告されたカルシウム拮抗剤 (Synta66) を用いた (Han et al., PLOS Pathogen, 2015)。Synta66 処理と同等もしくはそれ以下の VLP 産生効率を示した化合物を選定した。

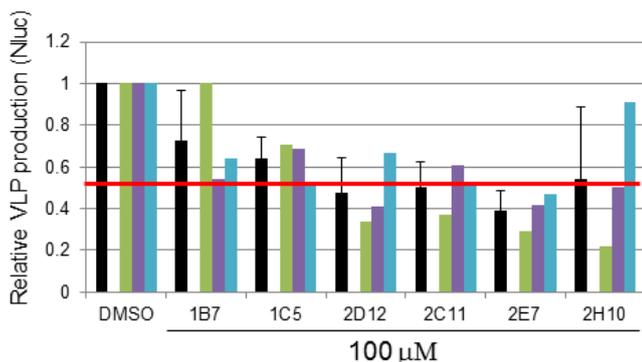
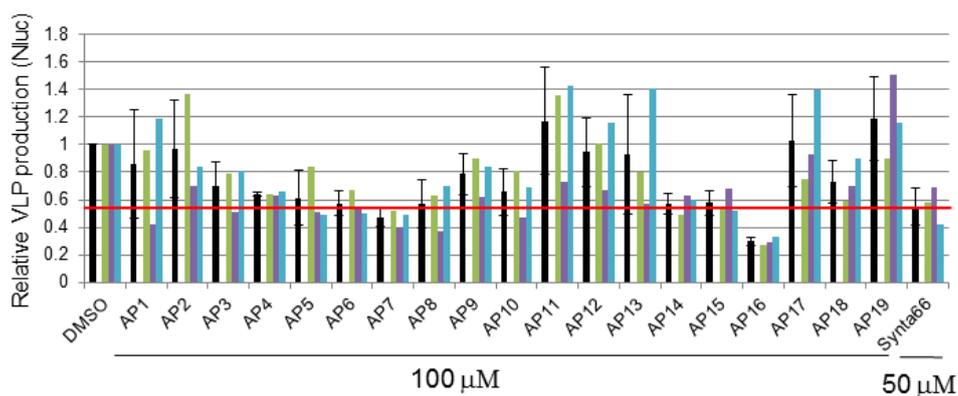
## 3. 結果 研究成果

### ・インシリコライブラリースクリーニング

方法欄に記載した手法を用いてヒット化合物の上位385化合物 (①)、分子量200以下の上位164化合物 (②) を選定し、東京大学創薬イノベーションセンターに化合物を請求し以降の1次スクリーニングに進めた。

### ・レポータータンパク質を用いた1次スクリーニング (レポーター発現系)

上のグラフは①MOE によるスクリーニングから得られた 19 化合物及び Synta66 を用いて行った実験結果である。下のグラフは②DEJIMA によるスクリーニングによって得られた結果である。尚、実験結果はそれぞれ 3 回の独立した実験結果より計算したものであり、黒カラムは 3 回の平均及び標準偏差を示している。空のカラムを挟んで緑、紫、青のカラムはそれぞれの独立した実験結果を示している。赤線は Synta66 による VLP 産生効率を示している。



#### 4. 考察 まとめ

今回の結果から、MOEを用いたスクリーニングからAP7、AP16が最もVLP阻害効率が高い化合物である可能性が示唆された。また、AP4、AP5、AP6、AP14、AP15もVLP阻害効率がSynta66と同程度である可能性が示された。その他、AP3、AP8、AP10、AP18も一定のVLP阻害が確認された。DEJIMAによるスクリーニングにおいては2E7のVLP阻害効果が高く、2D12、2C11もVLP阻害効率がSynta66と同程度であることが確認された。

これらの構造は開示されておらず、提供を受けている化合物量も限定的であることから、構造開示請求を行い、よりVLP阻害効率が高く、細胞毒性が低い化合物合成を目的とした化合物合成展開を試み、今後の実験に必要な化合物量も確保する。

その後、これらの化合物のVLP阻害効果を確認するとともに、感染性エボラウイルスを用いた抗エボラウイルス効果の確認 (南アフリカ共和国国立伝染病研究所 BSL-4施設)、更には化合物の作用点が当初の計画通りエボラウイルスVP40の二量体化阻害であることを確かめる。

#### 5. 発表論文、参考文献

なし