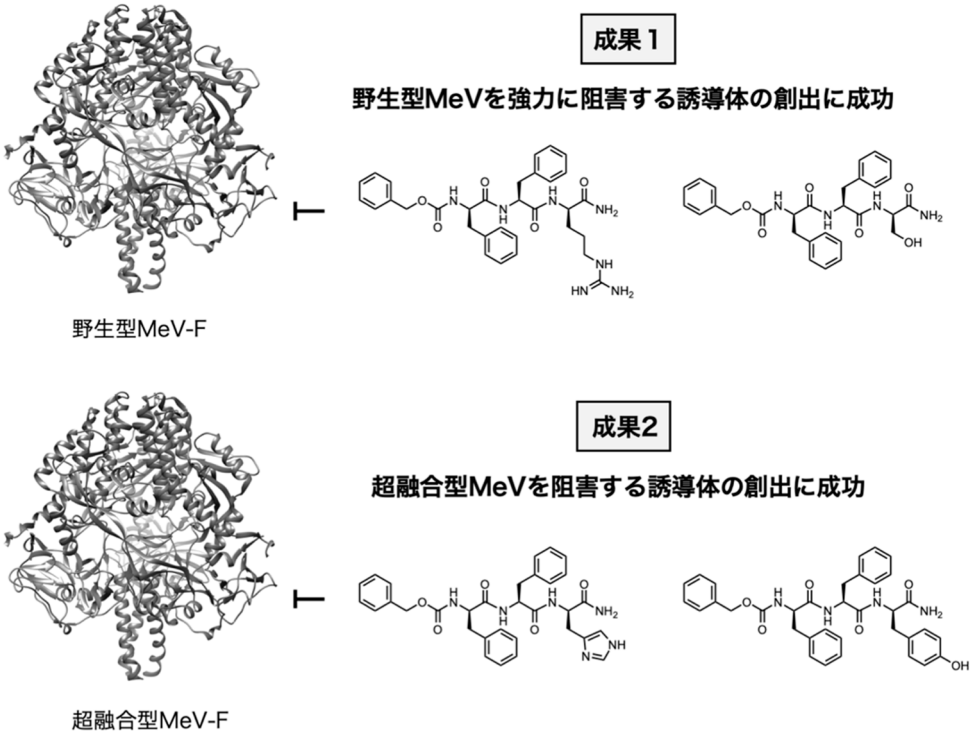
123　超融合型麻疹ウイルスに対する感染阻害剤の開発	森本　淳平

【目的】本研究では、麻疹ウイルスに対する感染阻害剤として知られる融合阻害ペプチド（FIP：Fusion Inhibitor Peptide）の構造展開を行い、より活性が高く、超融合型麻疹ウイルスに対しても阻害効果を発揮する阻害剤の開発を試みた。

【方法】本研究では、まず、FIP とその誘導体をペプチド固相合成法により合成し、HPLC により精製することによって、調製した。次に、これらの化合物の阻害活性を、細胞融合実験をもとに評価した。細胞融合実験で有望な結果を示した化合物については、共同研究先において、ウイルス感染の阻害アッセイについても行い、阻害活性を評価した。さらに、これらの化合物の構造活性相関を理解するために、各化合物と MeV-F との結合親和性の測定や MeV-F の熱安定性に対する効果など物理化学的な物性の評価を行った。

【結果】細胞融合アッセイの結果、合成した誘導体のうち 7 つについて FIP よりも低濃度で阻害活性を示し、阻害活性が向上していることを確認した。これらの化合物は、ウイルス感染の阻害アッセイにおいても FIP よりも高い阻害活性を示した。特に、最も強い阻害活性を示した 2 種のペプチドについては、FIP よりも 10 倍低い IC_{50}の値を示した。さらに、超融合型変異体の MeV-F を用いた細胞融合実験の結果、別の 2 種のペプチドが、FIP よりも低濃度で阻害活性を示した。本研究から、ペプチド性阻害剤である FIP は、合成が容易であることから多数の誘導体を容易に調製することが可能であり、それによって、超融合型変異体を含む MeV-F を強力に抑える阻害剤を創出することが可能であることが示された。今後、今回の誘導体化によって阻害活性が向上した理由を明らかにしていくことによって、さらに強力な阻害効果を示す FIP 誘導体や他の超融合型変異体の MeV-F にも有効な阻害剤が創出されると期待される。これらの阻害剤は、野生型と超融合型変異体の双方の MeV 感染に対して、有望な治療薬の候補となることが期待される。

本研究成果の概要



123. 超融合型麻疹ウイルスに対する感染阻害剤の開発

森本　淳平

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻

Key words：麻疹，融合タンパク質，阻害剤，ペプチド，構造展開

緒　言

麻疹ウイルス（MeV）は、有効なワクチンが普及しているにもかかわらず、いまだ子供の死者数は多く、治療薬が存在しない感染症である。MeV に感染すると、多くの場合は急性の症状が出るが、稀にウイルスが中枢神経系に持続的に存在し、亜急性硬化性全脳炎などの重篤な神経変性疾患を引き起こすことが知られている。そのため、MeV 感染症の治療薬の開発は急務の課題である。

これまでに薬剤候補となるような MeV の阻害剤が様々開発されてきている。特に、ウイルスエンベロープ上で感染に関わるウイルス特有のタンパク質は、ヒト細胞上に類似のタンパク質が存在しないため、特異性が高く副作用の小さい薬剤候補物質として有望である。MeV エンベロープ上には、F タンパク質（MeV-F）と H タンパク質（MeV-H）の 2 種類のタンパク質が存在する。ウイルス感染の際は、まず H タンパク質がヒト細胞上の SLAM などのタンパク質に結合する。次に、F タンパク質が融合前の状態から変形し、疎水性の領域が露出してヒト細胞の膜に突き刺さる。

これらエンベロープ上のタンパク質のうち、MeV-F に対して、Fusion inhibitor peptide（以下、FIP）と呼ばれる阻害ペプチドが報告されている［1］。このペプチドは、融合前の状態の MeV-F に結合してその変形を抑えることが知られている。分子量も小さいため、薬剤候補分子として有望であるが、阻害活性が十分ではない。

そこで本研究では、FIP の構造展開を行い、より阻害活性の高い MeV-F 阻害剤を創出することを目指した。また、合成した FIP 誘導体について、野生型 MeV-F に加えて、超変異型 MeV-F に対しても阻害活性を評価し、こうした変異型 MeV-F を有するウイルスの感染も抑えることが可能かどうか評価することとした。

方法および結果

1. FIP の F タンパク質との相互作用に重要な官能基の同定

まず、MeV-F と FIP の共結晶構造をもとに、相互作用に重要な官能基を明らかにすることとした。橋口らによって報告された MeV-F と FIP の共結晶構造中では、FIP の全てのフェニル基が相互作用に関与していることが示唆されている［2］。この相互作用を確かめるために、実際に FIP の各フェニル基が欠落した誘導体を合成し、これらの阻害活性を評価することとした。

FIP 誘導体の合成は、Fmoc 固相合成法を用いて行った。合成したペプチドは、固相から切り出した後、HPLC を用いて精製した。また、FIP については、市販されている試薬を購入して使用した。

阻害活性の評価には、ウイルス感染アッセイを用いた。MeV の受容体である SLAM を発現した Vero 細胞に対して、EGFP のベクターを有する MeV ウイルスを感染させ、FIP およびその誘導体の存在下で、ウイルスの感染がどれだけ抑制されるかを評価する。EGFP の蛍光を発する細胞の数がどれだけ減少するかによって、各ペプチドの阻害活性を評価した。

アッセイの結果、いずれのフェニル基が欠落した分子においても顕著に阻害活性が低下し、これらの官能基の相互作用への大きな寄与が示唆された（図 1、FIP-ΔZ、FIP-f1a、FIP-F2A）。一方で、FIP の C 末端は、F タンパク質とは相互作用せず溶媒中に露出していることが、共結晶構造から示唆された。そこで、FIP の C 末端をカルボン酸からアミ

ドに変換した誘導体を合成したところ、相互作用の低下はみられなかった（図 1，FIP-amide）。また、C 末端のグリシン残基をアラニン残基に変換した誘導体についても、阻害活性の低下はみられなかった（図 1，FIP-G3A）。これらのことから、FIP の C 末端部分に新たな官能基を導入することで、元の FIP と F タンパク質の相互作用を損なうことなく、新たな相互作用を生み出して、阻害活性の向上を実現できるのではないかと考えた。

(a)

	Peptide sequence	Inhibitory activity
FIP	Z-D-Phe-Phe-Gly-OH	+
FIP-amide	Z-D-Phe-Phe-Gly-NH_2	+
FIP-ΔZ	D-Phe-Phe-Gly-NH_2	-
FIP-f1a	Z-D-Ala-Phe-Gly-NH_2	-
FIP-F2A	Z-D-Phe-Ala-Gly-NH_2	-
FIP-G3A	Z-D-Phe-Phe-Ala-NH_2	+

(b)

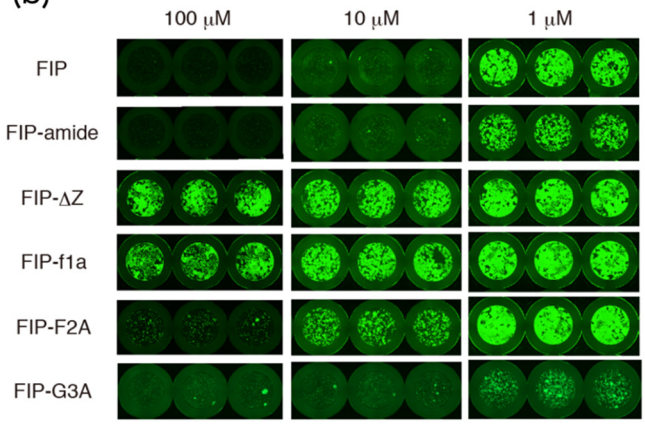


図 1. 細胞融合アッセイを用いた FIP 誘導体の阻害活性の評価

a） FIP および誘導体のペプチド配列と阻害活性。

b） ウイルス感染アッセイの結果。

2. FIP の構造展開

ここまでで、FIP の 3 つのフェニル基は相互作用に重要であり、一方で C 末端の構造は誘導体化を許容することがわかった。そこで、FIP の C 末端 Gly を別のアミノ酸残基に置換し、C 末端残基のα炭素上に新たな官能基を導入することで阻害活性の向上を試みることとした。具体的には、Gly 以外の 19 種類のタンパク質性アミノ酸側鎖を導入することとした。このとき、プロテアーゼによる分解を防ぐために、これらのアミノ酸残基は、D アミノ酸残基として導入した。

FIP 誘導体の合成は、前項と同様に、Fmoc 固相合成法を用いて行った。

合成した誘導体の阻害活性は、まず、細胞融合アッセイにより評価した。MeV の受容体である SLAM を発現した Vero 細胞に対して、MeV の F タンパク質と H タンパク質および EGFP のベクターをトランスフェクションし、FIP およびその誘導体の存在下で、細胞の融合がどれだけ抑制されるかを評価した。細胞融合が起きると、EGFP の蛍光が発せられる細胞の面積が大きくなるため、これを指標として定性的に阻害活性を評価した。この実験系により、ウイルスを使うことなくハイスループットに阻害剤の評価を行うことが可能である。

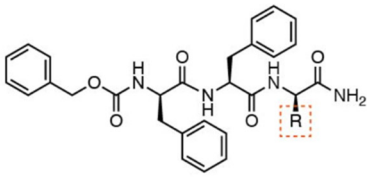
細胞融合アッセイの結果、19 種類の誘導体のうち、FIP の Gly を D-Ala、D-Phe、D-His、D-Arg、D-Ser、D-Thr、D-Tyr に置換した 7 種類の誘導体（FIP-G3a、FIP-G3f、FIP-G3h、FIP-G3r、FIP-G3s、FIP-G3t、FIP-G3y）が、FIP よりも高い阻害活性を示すことがわかった。

次に、細胞融合アッセイで FIP よりも強い阻害活性を示した誘導体について、実際の MeV の感染を抑制することができるかを評価するために、MeV を、SLAM を発現した Vero 細胞に感染させる実験を行い、上記 7 種類の誘導体がどれだけ MeV 感染を抑制するかを評価した。その結果、評価した全ての誘導体について、FIP よりも強い阻害活性を示すことがわかった（表 1）。特に、FIP-G3r、FIP-G3s の 2 つが最も高い阻害活性を示し、その IC_{50}はそれぞれ 0.07±0.02 nM、0.08±0.01 nM であった。

最後に、これらの誘導体が超融合型変異体の F タンパク質に対しても有効かどうかを検証することとした。T461I の変異をもつ超融合型変異体の F タンパク質を用いて、これまでと同様に細胞融合アッセイを行い、FIP と FIP-G3a、

FIP-G3f、FIP-G3h、FIP-G3r、FIP-G3s、FIP-G3t、FIP-G3y の 7 種類のペプチドについてその阻害活性を評価した。その結果、1μM の濃度において、FIP-G3h と FIP-G3y が FIP よりも強い阻害活性を示し、ほぼ完全に細胞融合を阻害した。

表 1. ウイルス感染阻害アッセイで評価したペプチドの阻害活性



Compound	FIP	FIP-G3a	FIP-G3f	FIP-G3h	FIP-G3r	FIP-G3s	FIP-G3t	FIP-G3y
IC_{50} (μM)	1.1 ± 0.1	0.25 ± 0.04	0.12 ± 0.06	0.12 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.09 ± 0.02

一段目には評価したペプチドの名称を記載している。二段目には IC_{50}（μM）の値を記載している。

3. FIP 誘導体 FIP-G3r、FIP-G3s の MeV-F との相互作用および熱安定性に対する寄与の計測

FIP 誘導体 FIP-G3r、FIP-G3s が FIP よりも高い阻害活性を示したのは、C 末端に新たに導入された官能基が F タンパク質と相互作用することにより、相互作用が増強し、F タンパク質の変形をより強く抑制したためではないかと考え、FIP 誘導体存在下での F タンパク質の熱安定性の評価を行った。

まず、表面プラズモン解析（SPR）での評価の結果、F タンパク質との相互作用の強さは、FIP とその誘導体で大きく違わないことが明らかとなった（表 2）。

一方で、FIP および FIP 誘導体の存在下で融合前の状態の F タンパク質の熱安定性の評価を行なったところ、FIP 存在下では F タンパク質の T_m がほとんど上昇しなかったのに対し、FIP 誘導体存在下では F タンパク質の T_m が大きく上昇した（表 3）。

これらの結果から、FIP 誘導体は、融合前の状態の MeV-F に対して顕著に強い相互作用を実現するわけではないものの、MeV-F の融合前の状態の熱安定性自体を向上させることが示唆され、その結果として FIP よりも高い阻害活性を示すことが示唆された。

表 2. 表面プラズモン解析で評価したペプチドの MeV-F に対する結合親和性

Compound	FIP	FIP-G3r	FIP-G3s
K_D (nM)	3.08	14.8	2.53

一段目には評価したペプチドの名称を記載している。二段目には IC_{50}（μM）の値を記載している。

表 3. 阻害剤存在下での MeV-F の熱安定性評価

Peptide	ΔT_m at 10 μM (°C)	ΔT_m at 1 μM (°C)
FIP	3.66 ± 0.03	0.25 ± 0.03
FIP-G3r	7.05 ± 0.04	3.29 ± 0.03
FIP-G3s	9.18 ± 0.02	7.00 ± 0.03

1 列目にはペプチドの名称を記載している。2、3 列目には、ペプチド濃度が 10、1 μM での MeV-F の ΔT_m を記載している。

考　察

本研究では、MeV の既知の阻害剤である FIP の構造展開を行うことで、元の阻害剤よりも 10 倍程度阻害活性の高い MeV 阻害剤の創出に成功した。また、MeV-F の超融合型変異体の 1 つである T461I 変異を有する MeV-F 変異体に対しても FIP よりも高い阻害活性を示す化合物の創出に成功した。今後、構造解析などさらなる実験を通じて、阻害活性向上の理由が明らかになれば、より効率的な構造展開が可能となり、より阻害活性の高い誘導体の創出が期待される。さらに、今回検証した T461I 変異体以外の超融合型変異体に対しても有効な薬剤候補分子が創出されることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院ウイルス・再生医科学研究所ウイルス制御分野の橋口隆生教授である。ウイルス感染アッセイは、橋口研究室で実施された。

文　献

1） Richardson CD, Scheid A, Choppin PW. Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. Virology. 1980 Aug;105(1):205-22. PMID: 7414950. DOI: 10.1016/0042-6822(80)90168-3.

2） Hashiguchi T, Fukuda Y, Matsuoka R, Kuroda D, Kubota M, Shirogane Y, Watanabe S, Tsumoto K, Kohda D, Plemper RK, Yanagi Y. Structures of the prefusion form of measles virus fusion protein in complex with inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Mar 6;115(10):2496-2501. Epub 2018 Feb 20. PMID: 29463726; PMCID: PMC5877970. DOI: 10.1073/pnas.1718957115.