The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Novel anti-flavivirus drugs targeting the nucleolar distribution of core protein
Author(s)	徳永, 詢
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76463
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[Format-P02]

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	徳永　詢
論文題名 Title	Novel anti-flavivirus drugs targeting the nucleolar distribution of core protein (コア蛋白質の核小体局在を標的とした新規抗フラビウイルス治療薬)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

日本脳炎ウイルス（JEV）、デングウイルス（DENV）、ジカウイルス（ZIKV）、ウェストナイルウイルス（WNV）などのフラビウイルス科に属するウイルスは蚊やダニのような昆虫によって媒介され、脳炎や出血熱などの疾患を引き起こすことが知られている。特にデング熱に代表されるフラビウイルス感染症は地球の温暖化や交通網の発達により国内への流入が懸念される。したがって、フラビウイルス感染症への対策は世界的に急務な課題となっているが、未だ有効な治療薬はない。フラビウイルスの生活環に着目し、ウイルスの増殖に必須の過程を標的とすることで広範なフラビウイルス感染症に対する治療薬となる可能性を考えた。中でも、フラビウイルスのコア蛋白質は一部が核に局在し、ウイルス増殖および病原性に関与することが知られている。そこで我々は、コア蛋白質の核移行を阻害する低分子化合物が抗フラビウイルス治療薬としての可能性を検討するため、コア蛋白質の核移行を標的とした阻害剤を探索し、フラビウイルスの増殖への影響を検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

JEV、DENV、ZIKV、WNVのコア蛋白質を培養細胞に発現させると、いずれのコア蛋白質も１部が核に移行することが観察された。また、核の中でも核小体にコア蛋白質が局在していることがわかった。コア蛋白質の核移行を阻害する化合物を探索するため、スプリットGFP融合コア蛋白質を安定発現させ核に局在しているコア蛋白質のみを可視化できる培養細胞株を樹立した。得られた細胞株を用いて、High content imaging analysisを用いたハイスループットスクリーニングシステムを樹立した。4000種類の低分子化合物を用いたスクリーニングにより、Cyclin-dependent kinase(CDK)に対する阻害剤（Cdk1/2 inhibitor Ⅲ、Cdk2/9 inhibitor、Alsterpaullone, 2-cyanoethyl）が得られた。これらの化合物では、ウイルス感染でのコア蛋白質の核局在が減弱することを確認した。また、CDK阻害剤の作用機序の解析を行ったところ、候補化合物のCDK阻害剤はいずれも核小体に作用し、核小体の縮小と消失を誘導することがわかった。次に、CDK阻害剤のウイルス増殖への影響を検討した。得られたCDK阻害剤はいずれも細胞毒性を示さない濃度において、顕著にJEVの増殖を抑制することを確認し、そのSelective index（SI)は380と高値を示すことがわかった。また、これらCDK阻害剤は、DENVおよびZIKVの増殖も顕著に抑制した。候補化合物のCDK阻害剤を他のCDK阻害剤と標的となりうるキナーゼを検討した結果、核小体に影響を及ぼすCDK阻害剤はGSKも阻害できる化合物であったことから、GSK阻害剤を検討した結果、GSK阻害剤である1-Azakenpaulloneを処理した場合も同様に、核小体の縮小と消失が確認でき、ウイルス増殖が抑制された。したがって、コア蛋白質の核移行ではなく、核小体に影響を及ぼす化合物がフラビウイルスの増殖に関与していることを明らかにした。これらの成績は、核小体はフラビウイルスの効率の良いウイルス増殖に寄与していることが示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

コア蛋白質は核小体に移行することから、フラビウイルスの効率の良い増殖にコア蛋白質は核小体で何らかの機能を有していることが示唆される。本研究において新たに樹立したスクリーニングにより、核小体の機能がフラビウイルスの増殖に寄与していることを見出した。今後、本スクリーニングシステムを用いてさらなるスクリーニングを進めることにより、コア蛋白質の核移行を標的とした抗フラビウイルス治療薬の開発が期待される。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　德永　詢

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	岡市 厚
	副　査	大阪大学教授	塩田達雄
	副　査	大阪大学教授	上田浩次

論文審査の結果の要旨

フラビウイルスは蚊によって媒介され、脳炎や出血熱などの重篤な疾患を引き起こすため、治療薬の開発は急務である。これまでにフラビウイルスのコア蛋白質は共通して、細胞質だけでなく核、特に核小体に局在し、ウイルス増殖および病原性に関与することが知られていた。したがって、本研究ではコア蛋白質の核移行を標的とした阻害剤を探索することを目的とし、コア蛋白質の核移行を可視化した新規の化合物スクリーニング系を樹立した。このシステムを用いて、約4000種類の低分子化合物からコア蛋白質の核移行を阻害する化合物を探索し、約20種類の候補化合物を得た。これらの候補化合物は細胞毒性が低く、培養細胞において広範囲なフラビウイルスの増殖を抑制できることを示した。また、これらの化合物処理により核小体の形態に変化が認められたため、得られた化合物は核小体を標的としていることを明らかにした。したがって、核小体は、フラビウイルス増殖に重要であることを見出した。今後、このシステムを用いてさらなるスクリーニングを進めることにより、抗フラビウイルス治療薬の開発が期待されることから、本論文は学位論文に値すると考える。