

# Gianne Eduard L. Ulanday 論文内容の要旨

主 論 文

Development and utility of an *in vitro*, fluorescence-based assay for the  
of novel compounds against Dengue 2 viral protease

( Dengue 2 型ウイルスプロテアーゼを標的とした新規抗ウイルス薬探索のための  
蛍光発色によるアッセイ法の開発 )

Gianne Eduard L. Ulanday, 岡本健太 , 森田公一

(Tropical Medicine and Health 2016 年掲載予定)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
新興感染症病態制御学系専攻  
(主任指導教員：森田公一教授)

## 【緒 言】

Dengue ウイルス感染症は熱帯地域に広く流行している蚊媒介性の急性ウイルス感染症で年間の感染者は 3 億 9 千万人、そのうち 9 千 6 百万人が発症すると見積もられている。 4 つの血清型の Dengue ウイルスが存在し、とくに二次感染では重症化率が高くなることが知られている。現時点では有効な抗ウイルス薬やワクチンは実用化されておらず一日も早い、実用化が望まれる。 Dengue ウイルスはフラビウイルス科の (+) 鎖 RNA ウイルスであり、ウイルス遺伝子 RNA の 5' 末端側には構造蛋白 (C, PrM, E)、その後非構造蛋白質 (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) がコードされている。このうち NS3 蛋白質はプロテアーゼ、トランスメチラーゼ、ヘリカーゼの機能を持つことが知られており、抗ウイルス薬の有望な標的である。本研究では、これらの機能のうち、プロテアーゼ活性を遺伝子工学的手法を用いて *in vitro* で再現できる系を構築し、 Dengue ウイルス治療薬の探索を実施するアッセイ系を創出することを目的とした。

## 【対象と方法】

Dengue 2 型ウイルス (16681 株) の NS2b-NS3 蛋白質遺伝子 cDNA をプラスミドベクター pET28a(Novagen) のクローニングサイトの *NheI* - *XhoI* 部位に挿入し、大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Agilent) に導入して大量発現させた。発現蛋白の N 末端には His-tag と付加し NS2b と NS3 の間には 8 残基のグリシンと 1 残基のセリンをス

ペーサーとして挿入した。菌体を破碎後、Cobalt Talon<sup>®</sup> (Takara-Clontech, Japan) resin カラムにて大腸菌発現 NS2b-NS3 蛋白質を精製した。プロテアーゼ活性は蛍光発色ペプチド基質 Bz-nKRR-MCA (Peptides International) を ARVO MX 1420 Multilabel Counter Microplate Reader (Perkin-Elmer, Japan) を用いて測定した。この系を用いてプロテアーゼ阻害の可能性のある化合物ライブラリーを検索した。阻害作用の確認できた化合物のバイオアッセイは、96 穴プレートに培養した Vero 細胞にデングウイルス新鮮分離株を感染させ、種々の濃度の化合物存在下でのウイルス抗原の産生を抗原検出 ELISA 法とフォーカスアッセイ法で定量的に解析した。IC50 値は非線形回帰分析法により算出した。

## 【結 果】

1. 大腸菌で発現させ、精製したデング 2 型ウイルスの NS2b-NS3 蛋白質は試験管内で蛍光発色ペプチド基質 Bz-nKRR-MCA を基質として高いプロテアーゼ活性を再現できた。
2. この組み換え蛋白プロテアーゼと蛍光発色ペプチド基質の組み合わせによりプロテアーゼ阻害薬スクリーニングに資するアッセイ系のプラットフォームが構築された。
3. プロテアーゼ活性は過剰な基質の存在下では抑制された。
4. この系を用いて、利用可能な化合物ライブラリーを検索した結果、3 つのリード化合物がえられた。
5. 3 つの化合物のプロテアーゼ抑制効果の IC50 値は 5~14 $\mu$ g/mL であった。
6. デング 2 型ウイルス新鮮分離株の増殖抑制を指標としたバイオアッセイではどの化合物も 5  $\mu$ g/mL の濃度でウイルスの増殖を 50%以下に抑制した。

## 【考 察】

今回構築した大腸菌で発現したデングウイルス NS3 プロテアーゼと高感度の蛍光発色基質を組み合わせた試験管内プロテアーゼ阻害薬アッセイ法は、安価、簡便でかつ、ハイスループットなプラットフォームにも装填可能な抗デング薬探索のアッセイ系として期待される。試験的にスクリーニングした化合物ライブラリーからはいくつかの阻害薬がヒットしたが、そのうち比較的高い阻害作用をしめした 3 つの化合物についてバイオアッセイを実施したところ、デング 2 型ウイルスの臨床分離株の増殖を阻害することが確認できた。過剰な基質濃度がプロテアーゼ活性を阻害することはこれまでに他のフラビウイルスのプロテアーゼアッセイ系でも報告されているが、これはおそらく過剰な基質が NS2b-NS3 プロテアーゼ複合体分子の酵素活性部位をブロックしている可能性がある。本システムは同じフラビウイルス属のジカウイルス等でも構築が可能であると思われるその応用が期待される。