

パンデミックウイルスに対する診断と薬開発のための応用化学的アプローチ

工学研究院物質工学研究系 教授

竹中 繁織(環57)



この度は、第1回明専会研究支援事業に採択していただきありがとうございます。ごさいました。研究支援によって私どもの研究を推進できました。ここでは、この分野の世界の状況と私どもが推進している研究について紹介させていただきます。

人類とウイルスとの戦い

ミヒヤエル・ヴォルゲムートの「死の舞踏」を読者の方々は一度は見たことがあると思います。「死の舞踏」は骸骨姿で死の恐怖を前に人々が半狂乱になって踊り続ける銅版画です。14世紀のフランスの詩が元になって

いとされています。ヨーロッパ全土でパンデミックを引き起こした黒死病(ペスト)が絵画の背景にあると言われています。これまで人類は多くの感染症に見舞われてきました。14世紀から始まったペスト、16世紀の梅毒、19世紀のコレラ、結核、20世紀から現在まで続いているインフルエンザ、20世紀のエイズ、21世紀のここ数年で世界的にパンデミックを引き起こした新型コロナウイルス感染症など、数えきれない多くの感染症が挙げられます。このような感染症は、紀元前から始まっていたようです。風疹(はしか)は紀元前三千年にシユメールで流行が始まり、インダス文明、ガンジス文明、漢を経て紀元後千年に平安時代の日本にまで到達したと言われています。実に伝播に四千年を経ています。これに対して新型コロナウイルス感染症は、2019年の後半から武漢で始

まってからわずかな期間で世界的なパンデミックを引き起こしました。現在は、これほどまでに人々の移動時間が短くなっており、世界が近くなりました。人類は、このような感染症に対し、抗生物質などの薬によって戦ってきましたが、最終的には、人類が本来持っている免疫によって克服してきたのです。

免疫は、外から侵入してきた細菌やウイルスを異物として記憶して、それらを攻撃する防御システムのことです。しかし、新型コロナウイルス感染症の原因であるSARS-CoV-2はRNAウイルスであります。RNAウイルスは、ヒトへの感染によって変異が頻繁に起こることが知られています。ほとんどが無毒化されるものと考えられますが、感染力やヒトの免疫から逃れる性質を持つものが突然発生すると、これが主流となってパンデミックを引き起こすこととなります。新型コロナウイルスのオミクロン型の流行を考えると、なげくと思えます。RNAワクチンによって新型コロナウイルス感染症も今年5月8日より、季節性インフルエンザと同じ5類に分類されるようになりました。人類が集団免疫を獲

四本鎖核酸の重要性

得したと考えられます。しかし、今後変異によって新たなウイルスがパンデミックを引き起こす可能性を秘めています。

現在、最新の技術によってワクチンや診断法が開発されてきました。無毒化したウイルスタンパクを体に入れることによるワクチン療法が行われてきましたが、新型コロナウイルス感染症で初めてRNAワクチンが開発されました。RNAはタンパクを作る設計図でヒトにその設計図を入れてワクチンとなるタンパクを体の中で作らせて免疫を活性化することに成功したのです。これは、古くから行われていた核酸医薬が実用化された最初の例と考えられます。また、検査では新型コロナウイルスに特徴的なタンパクの元となる設計図のRNAが体の中にあるかどうかを調べるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を検査法として発展させました。これらの手法はウイルスの特徴的なタンパクの設計図であるRNAの配列に基づく方法です。しかしながら、先に述べたようにRNAウイルスは変異によって変わりやす

く、RNAに基づくワクチンやPCR検査を逃れてしまう可能性がります。

残念ながら人類はこれからも新しいウイルス、特にRNAウイルスとの戦いが必須であります。これを達成できる新たな手法を見つけようとしていくのが私どもの研究です。

私どもは、これまで注目されていた核酸の配列だけでなく四本鎖構造といった核酸構造に注目しました。四本鎖構造は核酸配列に依存しているのですが、変異によっても四本鎖構造が形成できればウイルスの機能は損なわれません。四本鎖構造はウイルスが生きていくための必須のアイテムと考えられます。

四本鎖核酸とは何でしょうか？

二本鎖DNAである二重らせん核酸は、生命の二重らせんとして広く知られていると思います。これは、DNAが核酸塩基、デオキシリボース、リン酸エステルを単位とした直線状高分子であります。核酸塩基がアデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)のいずれかで構成されており、この並びが遺伝情報を持つことからそのように呼ばれています。AとT、GとCが水素

結合と呼ばれる相互作用で塩基対を形成することによって二重らせん構造を形成するのです。特にGはそれ自身でも四つ集まってG-カルテットと呼ばれる構造を形成する性質があります。核酸配列にGがいくつか集まった部分が四回繰り返し返してある

とそれらがG-カルテットを形成するように集まって、これらが積み重なってグアニン四本鎖(G₄)構造を形成する可能性があります。ここで可能性と述べたのはこの配列条件があればすべてG₄形成をするというのではなく、それ以外の配列や体内の環境に依存するという事です。このように環境によって変化することが核酸配列の並びだけではない生命情報をもたしていると考えられます。ヒトを含めたすべての生物にG₄が重要な役割を担うことが最近認知されてきました。ウイルスにおいても多数のG₄形成配列が存在しており、ウイルスの活動に重要な働きを示すことが認識されてきました。特にRNAウイルスのG₄は、G-カルテット二つで形成されることと折り畳まれる際のループ部分の核酸塩基が飛び出して特徴を持つております。このような三次元

構造は、DNA G₄とは大きく異なっており。逆に言えばこの構造的特徴を利用して特異的に結合できる分子の設計が可能になると期待されます。

著者がこれまで行ってきた研究

著者は、学生時代では有機化学に基づいた研究を行ってきました。特に複素環化合物の合成研究を行ってきました。分析化学の講座の助手に採用されてからバイオ分析の研究を行うことになりました。これまでの複素環化合物の中にDNAとインターカレーション結合する分子が知られていることがわかりました。このような化合物は、天然の薬剤の作用機構解明といった観点から研究されていることがわかりました。工学部なので積極的に分子設計によって新しいDNA相互作用分子を創成しようと考えました。特に、興味を引いたのは縫い込み型インターカレーション分子でした。縫い込み型インターカレーターは平面性の化合物がDNA二重らせんを構成する核酸塩基対平面の間に挿入(インターカレート)された際に二つの置換基がDNAの主溝と副溝に突き出したよ

うに配置され、それらが錨となつて二本鎖DNAとの複合体を安定化する働きを示します。著者は、この相互作用は一本鎖DNAには起こらないので、一本鎖DNAと二本鎖DNAとを識別するのに利用できると考えました。このような分子に電気化学的応答部位を導入することによって二本鎖DNAの電気化学的検出が可能になると考えました。ナフタレンジイミドの二つの置換基末端に電気化学活性を示すフェロセンを導入したフェロセン化ナフタレンジイミドを設計・合成することに成功しました。DNA修飾電極と組み合わせることによってDNAの電気化学的検出法を世界に先駆けて提案することができました。この手法を発展させて電気化学DNAチップの開発に成功しました。

ナフタレンジイミドは電子欠乏性芳香環です。G₄を形成するG-カルテットのグアニンは電子過剰芳香環です。すなわち、電子過剰なグアニン平面に電子欠乏性のナフタレンジイミド環が相互作用しやすいと期待されます。事実、G₄に対してナフタレンジイミド誘導体が強く結合することがわかりました。しかし、ナ

フタレンジイミドは二本鎖DNAにも結合します。そこで著者はリンカー部位を連結させた環状ナフタレンジイミドを設計・合成しました。これによって二本鎖DNAへの相互作用が阻害され、G4のみに結合させることに成功しました。環状ナフタレンジイミドの側鎖部分にフェロセンを導入すればG4に特異的に結合することができ、G4の検出が可能になると考えました。ここで合成に成功したフェロセン化環状ナフタレンジイミド(cFND)の環状部の長さや官能基の位置を変化させることによってG4の種類による結合選択性が得られると期待しました。このうちの一つのcFNDがSARSCoV-2ゲノムのRNA G4であるRG-1に強く結合することを見出しました。

提案研究の特徴

本提案研究は、新型コロナウイルスの診断と創薬への応用可能な分子の創製を実現し、診断と創薬へと発展することにあります。これを実用化するためには1年で行うのは不可能ではありますが、これまで行ってきた研究成果によってその足掛かりとなる基本的な概念を創製すること

ができたと考えております。具体的には新型コロナウイルス感染症の原因となるSARSCoV-2のRNAゲノム上で形成されるRNA G4、すなわちRG-1配列を標的とした分子の創製に成功することができました。このRG-1の検出手法を実現すれば検査法へと発展させることができ、まず、この部位に強く結合し、SARSCoV-2の働きを止めることができれば薬として発展できると期待されます。ここでは、これら二つに關しての成果について紹介します。

新型コロナウイルス感染症の 新規診断法の開発

新型コロナウイルス感染症はPCRによって診断されています。読者の皆様もPCR検査の経験はすでにある方もおられると思います。しかし、PCRはあらかじめわかっているRNA配列でないと検査できません。わからない変異型に対しては検査できません。そこで、著者は、SARSCoV-2のゲノム上で変異が起きても変化しない特徴的なRNA G4、RG-1の電気化学的検査法を開発しました。この成果は現在特許申請を行っています。また、海

外の論文誌であるElectroanalysis

に採択されました。編集委員からも認められ、図1に示したように学会誌の表紙を飾ることができました。

唾液からウイルスRNA抽出した後、著者らが開発したcFND溶液に加え、電極で電流測定を行うことにより特定の電位での電流シグナルが得られれば、新型コロナウイルス感染症陽性と判断できることを明らかにしました。電気化学的手法を利用することによって簡便かつ高感度な検査法を実現できました。更なる簡便化と高感度化を目指して現在も研究を継続しております。インフルエンザやジカウイルス、デング熱ウイルスなどすべてのRNAウイルスにはG4が存在することが知られております。また、異なったウイルスに対し、特徴的なRNA G4構造を持つことが知られています。そこでRG-1結合分子の設計方針を応用することによって、これらのウイルスに対しても特異的な診断法へと発展できる可能性があります。先に述べたように人類はこれからも新しいウイルスによってパンデミックが引き起こされる可能性をはらんでいます。この時に本手法が活躍できる可能性

があると考えています。

新型コロナウイルス感染症の薬開発

SARSCoV-2のRNA G4に結合

してウイルスの活動を阻害する分子は、薬としての働きが期待されます。診断のために開発したcFNDも薬への応用が期待されますが、本研究では、精密識別が可能な分子の設計と合成を行いました。この研究に携わってきた学生は、GE(Global competency for engineering)コースの学生です。GEコースは、学部3年生までの成績が優秀かつ研究意欲に燃えている学生が選定されます。GEコースとして3年後期より研究室に配属され、研究に携わることができ、このコースに選ばれた学生は、大学院に優先的に進学することができます。学部・大学院の一貫教育を受けることができます。著者の研究室に配属されたGEコース学生は、著者が設計した分子の合成法を検討し、大学院に進級するまでに目的分子の合成に成功しました。この合成分子は、まだまだ改善の余地が残されていますが、彼女は、この分子がSARSCoV-2のRNAゲノムのRG-1に極めて強く結合することを明らか

にし、この分子の RGI 複合体が安定化されることを証明しました。さらに、結合の特異性も高く、薬として期待されました。現在、特許準備中であり、特許申請が完了すれば、国際誌への投稿を考えています。ここの分子設計や合成法も他の RNA ウイルス薬へ発展できると期待しています。

支援していただいた予算によって、cFND や RNA G4 に結合してウイルスの活動を阻害する分子の合成材料へ合成、精製のための器具を準備しました。また、合成確認、化合物の純度確認に必要な高速液体クロマトグラフ (HPLC) や MALDI-TOF-MS のメンテナンスを行うことができ、有機合成を円滑に進めることができました。コロナウイルスの特徴的な RNA 配列の合成オリゴヌクレオチドも購入できました。また、関連した研究について教員および学生の学会発表を行い、これらの発表に関する旅費、参加費や、関連した研究成果の論文投稿料、英文校閲費に使用させていただきました。

最後に

著者の専門は工学部の化学です。



図1. 新型コロナウイルス感染症の電気化学的検査法を世界に先駆けて発表した論文誌にその概念のイメージ図が表紙に採用された。

学生時代は有機合成化学に没頭していましたが、九州大学工学部の分析化学講座に助手(現在の助教)の職を得たときにボスであった故・高木誠教授から「工学部でバイオの研究を行いたいから君やつてくれないか」と言われた時から著者の研究は始まりました。大変感謝しております。でもその当時は早すぎたようで、日本の製薬企業の知り合いを通じて共同研究をもちかけましたが、核酸に作用する分子は効果が高い反面、副作用が強すぎるので共同研究しないと言われました。その頃、著者が留学していた大学のある都市アトラントで抗ウイルスの国際会議が開催

されました。留学していた研究室への訪問を兼ねて学会に参加し、核酸に作用する抗ウイルス剤に関する研究の発表を行いました。その時、アメリカのある先生がほめてくれ、「製薬会社と共同研究をやっているのか?」と聞かれました。共同研究の話を持ち掛けて断られたと話したら、アメリカでの核酸に作用する薬の研究は活発に行われていることを聞きました。25年以上前の話です。現在コロナウイルス感染症の世界的なパンデミックで広まった RNA ワクチンも、アメリカでその頃から始まっていた核酸に作用する薬剤開発の、これまでの研究成果によるものだと

思います。コロナウイルス感染症は世界的に多くの苦難を強いられましたが、核酸関係の分野の研究を加速させました。この分野の発展のために、本学の教員を含めた多くの研究者が挑んでくれることを期待します。

【助成金の収支報告】

項目	費用	
有機合成関係	631,372円	Fmoc-Lys(Z)-OH、パスツールピペット、キムワイプ、窒素ガス、機器分析センター使用料、化合物作成ソフト
生化学試薬(コロナ RNA 等)	276,925円	RNA, DNA, PCR チューブ、キット
合成・測定器具(シリカゲルカラム、HPLC カラム等)	166,320円	精製用のシリカゲルカラム、純度チェック用の HPLC カラム、相互作用解析用シリンジ、蛍光セル
旅費	573,252円	研究成果報告および情報交換のため学会参加
学会参加費	107,500円	研究成果報告および情報交換のため学会参加
HPLC メンテナンス費	152,350円	フォトセンサー、メイン基板交換
MALDI-TOF-MS メンテナンス費	2,574,500円	レーザー、ポンプ劣化のため交換
論文投稿費・英文校正費	440,961円	
合計	5,000,000円	