

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## 課題番号

### 第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

### 第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

### 第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリーシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

### 第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

## RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発

所属 国立感染症研究所 ウイルス第二部  
研究者 清水 博之

### 要旨

ウイルスRNAヘリカーゼを標的とする阻害剤探索のためフラビウイルスNS3蛋白質を用いRNAヘリカーゼ/NTPaseの酵素学的解析を行なった。また、ポリオウイルスの特異的阻害剤が $2C^{ATPase}$ を標的とすることを明らかにした。

### 1. 研究目的

ウイルスRNAヘリカーゼは、近年、RNAおよびDNAウイルスに広く存在することが明らかにされてきたウイルス特異的酵素である。RNAヘリカーゼはATPを加水分解するエネルギーで二本鎖のRNAを解離させる活性を持ち、ATPase活性、RNA結合活性およびATP依存性RNAヘリカーゼ活性を同時に持つことを活性の特徴としている。RNAヘリカーゼは、真核細胞、原核細胞からウイルスにいたるまで幅広い生物に存在し、蛋白質翻訳、リボゾーム合成、スプライシング、RNAの安定性、RNAの細胞内局在化等、RNA高次構造の変化を介した様々な生理活性において重要な役割を果たしている。共通するアミノ酸モチーフの相同性の比較により、RNAヘリカーゼは現在、大きく3種類のスーパーファミリー(SF1, SF2, SF3)に分類されている。プラス鎖RNAウイルスのRNAヘリカーゼの多くは、SF2およびSF3に分類されており、フラビウイルス、ペストウイルス、poty virus等のRNAヘリカーゼはSF2に、ピコルナウイルス、カリシウイルスのRNAヘリカーゼは、SF3に分類されると考えられている。ウイルスRNAヘリカーゼは、ウイルス核酸の複製過程で重要な役割を果たすと考えられているが、ウイルス増殖過程における生理的機能については、いまのところほとんど分かっていない。RNAヘリカーゼ活性の存在が証明されているウイルスには、临床上重要なフラビウイルスおよびC型肝炎ウイルス(HCV)が含まれており、RNAヘリカーゼ活性は示されていないが類似のアミノ酸モチーフを持つウイルスとしてピコルナウイルス等多くのプラス鎖RNAウイルスが含まれる。アミノ酸モチーフ比較解析によりRNAヘリカーゼの存在が推測されているウイルスは数多いが、実際にRNAヘリカーゼ活性が証明されているウイルス特異的酵素は限られている。

ウイルス特異的酵素の阻害剤が抗ウイルス化学療法剤として有用であることは、近年、AIDSの治療に使用され始めたHIVの逆転写酵素やプロテアーゼの阻害剤の例からも明らかである。これまでウイルス特異的酵素阻害剤の標的とされてきたポリメラーゼ、プロテアーゼ、逆転写酵素等続くあらたなウイルス特異的酵素として、RNAヘリカーゼ/NTPaseが注目されている。特に、临床上重要なHCVのRNAヘリカーゼ(NS3)に関しては、阻害剤探索を視野に入れた結晶構造解析および人工変異の導入による構造活性相関の研究が進められている。本研究では、有効な治療薬・ワクチンが存在しない重篤な感染症であるフラビウイルス(デングウイルス等)およびHCV感染症に対する抗ウイルス剤開発を念頭におき、ウイルス特異的RNAヘリカーゼであるNS3蛋白質(SF2)の酵素学的解析および酵素機能の解析を試みた。また、RNAヘリカーゼスーパーファミリーSF3に属すると考えられているポリオウイルス $2C^{ATPase}$ 蛋白質に作用する特異的阻害剤であるベンズイミダゾール誘導体MRL-1237を見だし、その作用機序を解析した。 $2C^{ATPase}$ 蛋白質の酵素活性およびウイルス増殖における機能については不明な点が多く、MRL-1237による $2C^{ATPase}$ 蛋白質阻害のメカニズムの解析は、 $2C^{ATPase}$ 蛋白質の機能を理解する上でも重要である。

## 2. 研究方法

### A. 日本脳炎ウイルスNS3蛋白質のRNAヘリカーゼ活性の証明と酵素学的解析

フラビウイルス非構造蛋白質NS3のC末端側2/3は、NTPase/RNAヘリカーゼ活性を持つことがアミノ酸モチーフの比較により示唆されている。日本脳炎ウイルス(JEV)NS3は、RNA-stimulating NTPase活性およびRNA結合活性を持つことがすでに報告されているが、RNAヘリカーゼ活性の証明はなされていなかった。JEV/NS3のRNAヘリカーゼ活性を証明し酵素学的解析を行なうため、PCR法により増幅したNS3のC末端領域(457aa)をpET-21bベクターにクローニングし、大腸菌BL21(DE3)pLysSで発現後、アフィニティーカラムによりC末端にヒスチジンタグ(6×His)をつけたNS3を精製した。IPTGで発現誘導後、凍結融解により細胞を破碎し可溶性画分から発現蛋白質を、アフィニティー・レジン(TALON affinity resin)を用いたバッチ法により精製した。400mMイミダゾール存在下で溶出した精製蛋白質は、透析後SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分子量および精製度を確認した。同様の方法で、HCVのNS3およびデングウイルスのNS3遺伝子のクローニングを行い、NS3蛋白質の発現精製を試みた。

精製NS3蛋白質のNTPase活性は、NTPからの遊離リン酸を測定するリン・モリブデン比色定量法により測定した。RNAヘリカーゼ活性測定とRNA結合活性測定の基質として、pSP72プラスミドDNAを鋳型として、T7ポリメラーゼを用いた、in vitro transcriptionにより<sup>32</sup>P標識51ntのRNAを合成した。蛋白質のRNA結合活性は、精製した<sup>32</sup>P標識51ntRNAと蛋白質を混合し、10% nativeポリアクリルアミドゲル電気泳動における標識RNAの移動度により測定した。<sup>32</sup>P標識51ntRNAと22bpの相補性を持つ非標識RNA(102nt)をin vitro transcriptionにより合成し、<sup>32</sup>P標識51ntRNAとアニーリングした部分二本鎖RNAをRNAヘリカーゼ活性測定の基質とした。RNAヘリカーゼ活性は、基質RNAと精製蛋白質を反応後、SDSを含んだ緩衝液で反応液を処理した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定した。RNAヘリカーゼの酵素学的性質を調べるため、pH、反応温度、カチオン濃度、ATP濃度、基質濃度等を変化させた条件で酵素活性を測定した。

大腸菌で発現精製した日本脳炎ウイルス NS3 RNA ヘリカーゼおよび人工変異を導入した酵素を用いてmotif IIの機能を解析した。RNAヘリカーゼに高度に保存されているアミノ酸モチーフのうち、motif II (DExH)は、NTPase活性発現に必須な領域であり、RNA結合による蛋白質の高次構造に変化に対応してNTPase活性が変化するうえで重要な役割をはたす部位であると考えられている。人工変異は、主にQuickChange Site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて導入した。変異導入したプラスミドのNS3領域の塩基配列決定により、目的とする変異の有無を確認した。変異を導入したアミノ酸は、下図に示した(Fig. 1)。

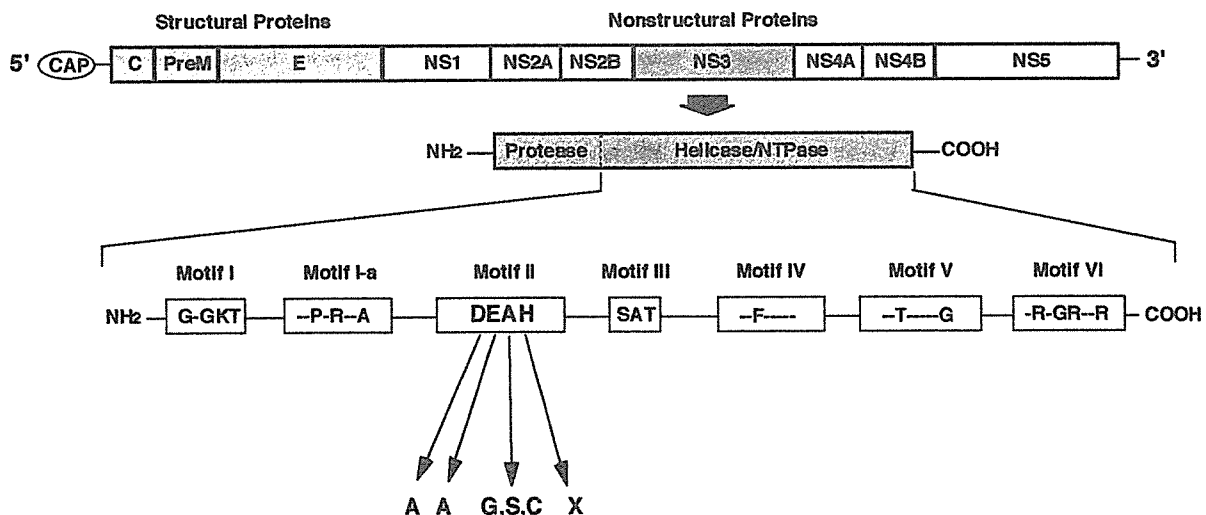


Figure 1. Genome structure of japanese encephalitis virus and conserved motifs of the NS3 protein

## B. ポリオウイルス阻害剤ベンズイミダゾール誘導体の作用部位の解析

ピコルナウイルスの選択的かつ強力な阻害剤であるベンズイミダゾール誘導体MRL-1237は、非構造蛋白2C<sup>ATPase</sup>の機能を阻害する事によりウイルス増殖を抑制すると考えられている。MRL-1237のポリオウイルス2C<sup>ATPase</sup>に対する作用点を明らかにするため、MRL-1237耐性変異株の選択および変異部位の解析を試みた。50 $\mu$ M および 10 $\mu$ MのMRL-1237存在下で継代培養したMahoney株をさらにブラッククロニングしMRL-1237耐性株を得た。MRL-1237耐性変異株の2C<sup>ATPase</sup>領域をPCRにより増幅して、塩基配列を解析し親株(MRL-1237感受性Mahoney株)の配列と比較した。ベンズイミダゾール系化合物MRL-1237耐性ポリオウイルスのアミノ酸変異部位は非構造蛋白質2C<sup>ATPase</sup>のNTPaseモチーフ近傍に存在した。この変異部位の解析をもとにポリオウイルスMahoney株由来感染性クローン(pVMT7pDS306(T))のNTPaseモチーフ近傍に人工的変異を導入し、MRL-1237感受性を規定しているアミノ酸変異を確認した。人工変異を導入したプラスミドを鋳型に *in vitro* transcription によりRNAを合成し、合成したRNAをリポフェクチンによりHeLa細胞にtransfectした。変異ウイルスストックを調整し、MRL-1237感受性を確認した。また、すでに報告されているグアニジン塩酸耐性および依存性に関与するアミノ酸変異を導入した変異ウイルスを作製し、薬剤感受性の変化を検討した。変異株の薬剤感受性測定には、グアニジン塩酸、MRL-1237および他のベンズイミダゾール化合物であるHBBおよびenviroximeを用いた。

## C. RNAヘリカーゼ/NTPase阻害剤のスクリーニングシステムの検討

ウイルスRNAヘリカーゼ活性は、通常、*in vitro* transcriptionによりRI標識したRNAを非標識RNAとアニールした二本鎖RNAを基質として、ゲルシフトアッセイにより測定する。RI標識と同程度の検出感度が期待でき、より簡便な方法として、蛍光イメージアナライザーを用いたヘリカーゼ活性測定法の検討を行なった。3'あるいは5'末端にFITC標識したRNAを合成し非標識RNAとアニールした二本鎖RNAを基質として、ゲルシフトアッセイによりRNAヘリカーゼ活性を測定した。

RNAヘリカーゼ/NTPase阻害剤のより簡便な測定法として、リン・モリブデン比色定量法を応用したマイクロプレート法によるATPase活性阻害物質のスクリーニング系を検討した。標的酵素として大腸菌で発現精製したC型肝炎ウイルス、日本脳炎ウイルスおよびデングウイルス非構造蛋白質NS3を用いた。

## 3. 研究成果

### A. 日本脳炎ウイルスNS3蛋白質のRNAヘリカーゼ活性の証明と酵素学的解析

JEV/NS3は大腸菌で効率良く発現し、可溶性画分から多量の精製NS3蛋白質を得ることが出来た。JEV/NS3はTALON affinity resin処理により、ほぼ均一に精製されることがSDS-PAGEにより確認された。精製したJEV/NS3はATPase活性を示し、ATPase活性はpoly(U)添加により顕著に増加した。poly(U)存在下および非存在下におけるNTPase活性の強さは、GTPase>ATPase>CTPase>UTPaseの順であった。ポリヌクレオチドによるATPase活性促進作用は、poly(U)>poly(C)>poly(A)の順に強く、poly(G)はATPase活性促進作用を示さなかった。JEV/NS3のATPase活性の発現には、二価のカチオン(Mg<sup>2+</sup>あるいはMn<sup>2+</sup>)が必須であり、至適濃度はともに2mMであった。ATPase活性の至適pHおよび至適反応温度は、それぞれ6.5と30℃であった。

RI標識したRNAと非標識RNAとをアニールした二本鎖RNAを基質として、精製NS3のRNAヘリカーゼ活性を測定した。JEV/NS3は、1~4 pmolの酵素濃度で、HCV/NS3と同様RNAヘリカーゼ活性を示した(Fig. 2)。JEV/NS3 RNAヘリカーゼ活性の発現には、ATPおよび二価のカチオン(Mg<sup>2+</sup>あるいはMn<sup>2+</sup>)が必須であり、高濃度の一価のカチオン(K<sup>+</sup>)およびCa<sup>2+</sup>はヘリカーゼ活性を阻害した。至適pHおよび至適反応温度は、それぞれ6.0と40℃であった。

<sup>32</sup>P標識51ntRNAを用いたゲルシフトアッセイにより、JEV/NS3のRNA結合活性を調べたところ、0.5pmol以上のJEV/NS3はssRNAと結合活性を示したが、HCV/NS3のRNA結合活性と比較すると弱い活性であった。

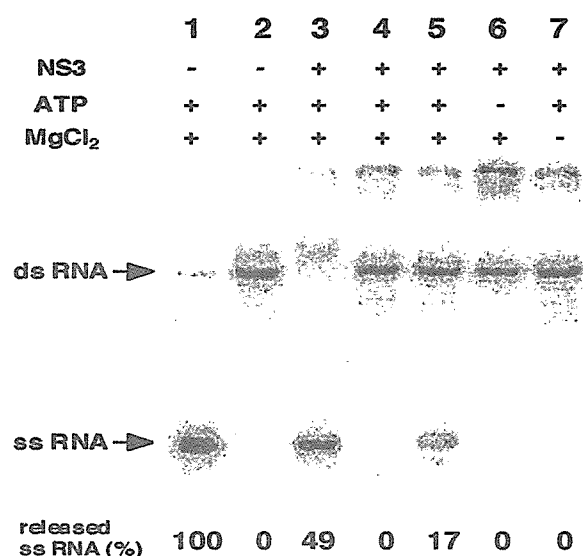


Figure 2. RNA helicase activity of JEV/NS3

Lane 1: boiled RNA (positive control), Lane 2: untreated (negative control), Lane 3: HCV/NS3, Lane 4: JEV/NS3-AEAH mutant, Lane 5: JEV/NS3-wild, Lane 6: JEV/NS3-wild without ATP, Lane 7: JEV/NS3-wild without MgCl<sub>2</sub>

フラビウイルスNS3のATPase活性およびRNAヘリカーゼ活性発現におけるDExHモチーフ(motif II, Fig. 1)の重要性をHCVと比較するため、JEV/NS3に人工変異を導入し酵素活性を検討した。Asp, GluをAlaに置換した変異NS3は、ATPaseおよびRNAヘリカーゼ活性を完全に消失した(Fig. 2, Table 1)。x位のAlaを置換したNS3は、RNA stimulating ATPase活性は維持していたもののRNAヘリカーゼ活性を消失していた(Table 1)。Hisを他の19種類のアミノ酸にそれぞれ置換すると、疎水性アミノ酸への置換によりATPase活性は消失し、親水性アミノ酸への置換では活性の低下が認められた。Hisを置換したNS3は置換アミノ酸残基の性質によりATPase活性は変化した。His以外のすべてのアミノ酸置換によりRNAヘリカーゼ活性が消失した。日本脳炎ウイルスNS3 RNAヘリカーゼのmotif II (DEAH)は、特にRNAヘリカーゼ活性発現に重要な部位であることが示された。また、JEVのNS3蛋白質のDEAHモチーフはATPase活性発現に重要であるがアミノ酸置換の影響はJEVとHCVで異なることが示された。

Table 1. Effect of mutagenesis in the motif II of JEV NS3 protein on ATPase and RNA helicase activities

Protein	ATPase activity (%) <sup>a</sup>		RNA helicase activity (%) <sup>b</sup>
	Without poly(U)	With poly(U)	
DEAH (wild)	100	390	100
AEAH	<1	<1	<1
DAAH	<1	<1	<1
DECH	61	160	<1
DEGH	11	72	<1
DESH	220	260	<1
DEAA	93	190	<1
DEAG	90	220	<1

<sup>a</sup> The activity of wild type protein without poly(U) was set as 100%.

<sup>b</sup> The amount of labeled RNA was quantified using MacBAS software (Fuji Photo Film, Tokyo). The activity of the wild type protein was set as 100%.

## B. ポリオウイルス阻害剤ベンズイミダゾール誘導体の作用部位の解析

ベンズイミダゾール系化合物MRL-1237は、エンテロウイルスに対して強い阻害作用を示す。MRL-1237の抗ウイルス活性は同様のベンズイミダゾール骨格を持つHBBよりも10~100倍程度強く、エンテロウイルスの中では、コクサッキーB群ウイルスに対し最も強い活性を示した。10  $\mu$ Mおよび50  $\mu$ MのF-PAB存在下の培養で得られたMRL-1237耐性株について変異部位の同定を行なった。2C<sup>ATPase</sup>領域全体の塩基配列を解析したところ、10  $\mu$ M存在下で得られた1株を除き14株が2C<sup>ATPase</sup>の同じアミノ酸に変異(F164Y)が起きることによりMRL-1237耐性となっていた。F164Yは、MRL-1237に対して強い耐性を示しグアニジン塩酸に対しても交叉耐性を示した。10  $\mu$ M存在下で得られた1株 (I120V) は、2C<sup>ATPase</sup>領域の異なる変異により耐性化していた。I120Vは、F164Yと比較すると弱いMRL-1237耐性を示し、グアニジン塩酸感受性であった。耐性ポリオウイルスのアミノ酸変異部位は非構造蛋白質2CMRL-1237のNTPaseモチーフ近傍に存在したので、この変異部位の解析をもとにポリオウイルス感染性クローンのNTPaseモチーフ近傍に人工的変異を導入し、薬剤感受性の変化を検討した。感染性クローン由来F164Y変異ウイルスはMRL-1237耐性であり、グアニジン塩酸に交叉耐性を示した(Fig. 3)。感染性クローン由来I120V変異ウイルスは、MRL-1237耐性であったがグアニジン塩酸には感受性であった。グアニジン耐性に関与することが、すでに報告されているN179AおよびN179Gに対応する感染性変異ウイルスを作製したところ、両変異ウイルスともにグアニジン塩酸およびMRL-1237耐性であった。以上の結果から、MRL-1237はグアニジンと類似した2C蛋白質への作用によりウイルス増殖を阻害していることが示された。

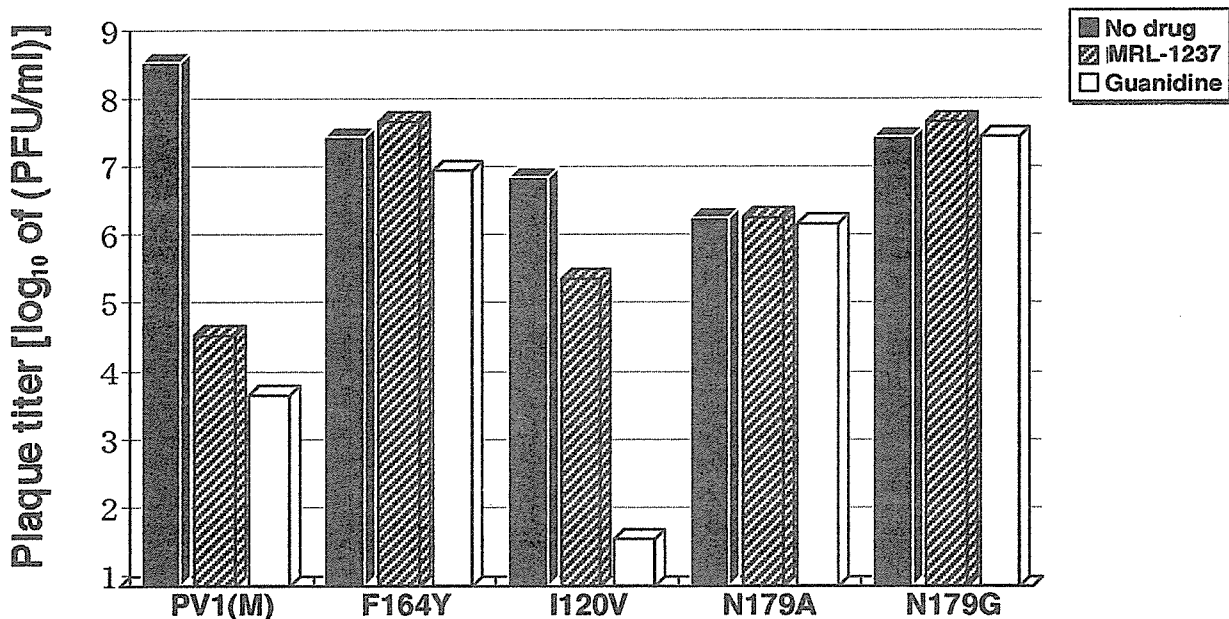


Figure 3. Drug susceptibility of cDNA-derived MRL-1237 resistant mutants

## C. RNAヘリカーゼ/NTPase阻害剤のスクリーニングシステムの検討

非RIヘリカーゼ活性測定法として、蛍光イメージアナライザーを用いた方法を検討した。HCV/NS3蛋白を用いた系では、RNAヘリカーゼ活性が検出可能であったが、JEV/NS3蛋白では活性が検出できなかった。蛍光標識RNAは、RI標識RNAよりも高濃度の二本鎖RNA基質を必要とし、RI標識RNAを用いた系の方がRNAヘリカーゼ活性の検出感度において優れていることが示唆された。

リン・モリブデン比色定量法によるNTPase活性の阻害剤のスクリーニング系を作製し、ウイルス特異的阻害剤の探索を試みた。HCVおよびJEVについては、酵素活性を持つ精製ATPaseが十分量得られ、マイクロプレートを用いた簡便な方法でATPase阻害物質のスクリーニングが可能となった。デングウイルスNS3は、同様の方法では可溶性画分への発現量が低く、スクリーニングに必要な量の精製蛋白質が得られなかった。



#### 4. 考察

これまで、ウイルスRNAヘリカーゼの特異的阻害剤は報告されておらず、ウイルスRNAヘリカーゼは、あらたな抗ウイルス剤の標的酵素として期待されている。RNAヘリカーゼの構造活性相関について詳細な研究が進められているHCVでは、今のところ簡便かつ効率のよいウイルスの試験管内増殖系が確立されておらず、RNAヘリカーゼ阻害物質がウイルス増殖を実際に阻害するかを検討するのは困難である。その点、試験管内ウイルス増殖系および感染性クローンを用いた reverse geneticsの系が確立されているピコルナウイルスおよびフラビウイルスは、ウイルス増殖における阻害剤の効果を検討するのに、より適したシステムである。

フラビウイルスに対するRNAヘリカーゼ/NTPase阻害物質のスクリーニング系について検討するために、JEV/NS3蛋白質の簡便な発現精製系を開発し、精製したNS3蛋白質のNTPase活性およびRNAヘリカーゼ活性を詳細に解析した。特に、JEVのRNAヘリカーゼ活性は、我々が始めて証明したものであり、酵素学的解析によりHCV/NS3ヘリカーゼとの類似性が示された。ウイルス特異的RNAヘリカーゼ(SF2)のアミノ酸モチーフの重要性はHCV/NS3およびワクシニアウイルスのNHP II蛋白質等を用いて解析されている。JEV/NS3蛋白質のmotif II (DExH) への変異導入により、このmotifの各アミノ酸の酵素活性への寄与が明らかとなった。高度に保存されているAspおよびGluは、NTPase活性およびRNAヘリカーゼ活性の発現に必須であった。x位のAlaの置換変異酵素は、NTPase活性は保持していたが、RNAヘリカーゼ活性は消失していた。Hisへのアミノ酸置換は、NTPase活性の低下および消失をもたらした。His以外のどのアミノ酸残基への置換もRNAヘリカーゼ活性の完全な消失をもたらした。以上の結果は、JEV/NS3蛋白質の motif II は、NTPase活性の発現に重要な役割をはたしているのみならず、NTPaseとRNAヘリカーゼの両酵素活性の調節に関与する領域でもあることが示唆された。JEV/NS3の motif IIの機能はHCV/NS3と類似していたが、アミノ酸置換の影響には違いが認められた。JEVおよびHCVのNS3の酵素学的性質は、阻害剤探索のための重要な情報となる。

NTPase/RNAヘリカーゼ阻害剤探索のためのスクリーニング系として、大腸菌で発現したJEV/NS3およびHCV/NS3を用いたリン・モリブデン比色法によるATPase活性測定法を開発した。この系は、簡便な非RIスクリーニング系であり多検体処理にも適している。JEV/NS3およびHCV/NS3の変異導入酵素を用いた実験により、NTPaseとRNAヘリカーゼの機能ドメインは分子内相互作用を持つことが示唆される。つまり、ATPase活性阻害物質は同時にRNAヘリカーゼ活性も阻害し、さらにウイルス増殖も阻害することが期待される。現在、このATPase活性測定系を用いNTPase/RNAヘリカーゼ阻害剤のスクリーニングを行なっている。

ピコルナウイルス非構造蛋白質2C<sup>ATPase</sup>は様々な機能を同時に有することが、おもにポリオウイルス2C<sup>ATPase</sup>を用いた研究により明らかにされている。ポリオウイルス2C<sup>ATPase</sup>は、アミノ酸モチーフからSF3 RNAヘリカーゼに分類することが示唆されているが、RNAヘリカーゼ活性は証明されていない。最近、大腸菌で発現後、精製したポリオウイルス2CがNTPase活性を示すこと、さらに、グアニジン塩酸がNTPase活性阻害作用を持つことが報告され、グアニジン塩酸のポリオウイルス阻害機序の一端が明らかとなった。しかし、ポリオウイルス2C<sup>ATPase</sup>のNTPase活性とウイルス増殖との関連あるいはRNAヘリカーゼ活性の有無等の疑問は解決されていない。MRL-1237耐性ポリオウイルスすべてが2C<sup>ATPase</sup>のNTPaseモチーフ近傍にアミノ酸置換を起こしていたことは、MRL-1237の主要な作用点が2C<sup>ATPase</sup>にあることを強く示唆する。また、F164Y変異ウイルスがグアニジン塩酸と交叉耐性を示すこともMRL-1237の作用点が2C<sup>ATPase</sup>にあることを裏付ける。Fig.4に示したように、グアニジン塩酸に関与するアミノ酸変異のうちもっとも多く報告されている変異は、Asn-179あるいはM-187であり、小さい矢印で示したアミノ酸変異もグアニジン塩酸耐性あるいは依存性に関与するとされる。MRL-1237耐性変異で多く認められたPhe-164は、グアニジン塩酸耐性ウイルスでは、ごくまれな変異であった。しかし、両薬剤耐性に関する変異は、ともにNTPase/RNAヘリカーゼ活性発現に重要であると考えられている conserved motif (motif A, B)の近傍に位置しておりMRL-1237のウイルス増殖阻害作用が2C<sup>ATPase</sup>蛋白質のNTPase/RNAヘリカーゼ活性に関与している可能性が高い。

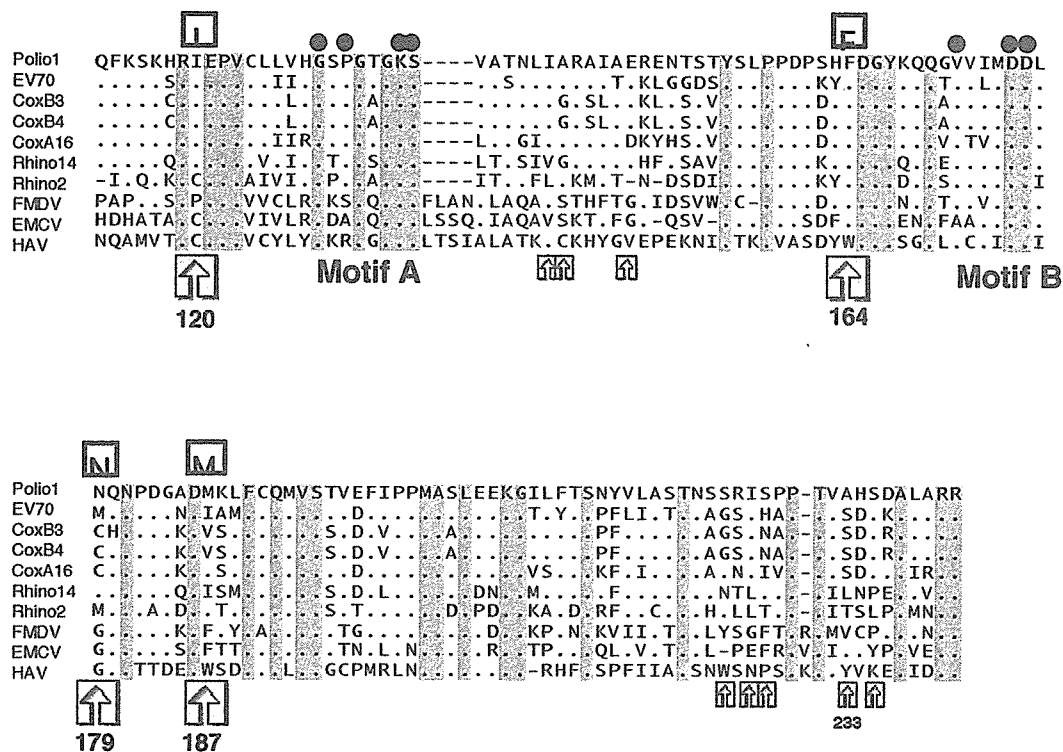


Figure 4. Amino acid alignment of the NTPase motif of the 2C proteins of picornaviruses

## 5. まとめ

近年その存在が明らかにされ解析が進められているウイルス特異的RNAヘリカーゼに着目し、NTPase/RNAヘリカーゼを標的とした阻害剤探索のため、酵素学およびウイルス学的解析を試みた。临床上重要なフラビウイルス(日本脳炎ウイルス等)のNTPase/RNAヘリカーゼを大腸菌で発現し酵素学的解析を行い、NTPase/RNAヘリカーゼ活性阻害剤のスクリーニング系を開発した。また、エンテロウイルス阻害剤MRL-1237の作用部位が2C<sup>NTPase</sup>のNTPase/RNAヘリカーゼ領域に存在することを見だし、作用機序を解析した。RNAヘリカーゼは、RNAウイルスに広く存在することから、現在治療薬の存在しない多くのRNAウイルス感染症に対する抗ウイルス剤の標的として期待できる。

## 6. 研究発表

1. Shimizu, H., Agoh, M., Agoh, Y., Yoshida, H., Yoshii, K., Yoneyama, T., Hagiwara, A. and Miyamura, T. (2000). "Mutations in the 2C region of poliovirus responsible for altered sensitivity to benzimidazole derivatives." *J Virol* 74(9): 4146-54.
2. Utama, A., H. Shimizu, Hasebe, F., Morita, K., Igarashi, A., Shoji, I., Matsuura, Y., Hatsu, M., Takamizawa, K., Hagiwara, A. and Miyamura, T. (2000). "Role of the DExH motif of the Japanese encephalitis virus and hepatitis C virus NS3 proteins in the ATPase and RNA helicase activities." *Virology* 273(2): 316-24.
3. Utama, A., Shimizu, H., Morikawa, S., Hasebe, F., Morita, K., Igarashi, A., Hatsu, M., Takamizawa, K. and Miyamura, T.. (2000). "Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein." *FEBS Lett* 465(1): 74-8.
4. Chiba, Y., H. Murakami, Kobayashi, M., Shimizu, H., Yoshida, H., Yoneyama, T., Miyamura, T., Jingjin, Y. and Libi, Z. (2000). "A case of poliomyelitis associated with infection of wild poliovirus in Qinghai Province, China, in October 1999." *Jpn J Infect Dis* 53(3): 135-6.
5. 清水博之 (2000). "エンテロウイルス71による脳炎." *化学療法の領域* 16(4): 46-50.

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団  
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社