

201123047A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

インフルエンザウイルス複製に関与する宿主因子と
ウイルス因子のインターフェースを標的とした
新規抗ウイルス薬探索の基盤研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 永田 恭介

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

インフルエンザウイルス複製に関与する宿主因子と
ウイルス因子のインターフェースを標的とした
新規抗ウイルス薬探索の基盤研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 永田 恭介

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総括・分担研究報告

インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼに作用する宿主因子の同定と機能解析----- 1

永田 恭介（筑波大学医学医療系）

インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼおよび宿主因子の構造解析 ----- 8

朴 三用（横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科）

タンパク質立体構造を基盤にした抗インフルエンザウイルス化合物のスクリーニング解析----- 11

夏目 徹（独立行政法人産業総合技術研究所バイオメディシナル情報研究センター）

高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1に対するワクチン製造用種株のタンパク質収量等の検討 ----- 15

信澤 枝里（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 18

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 23

I. 統括・分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
平成23年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
統括研究報告書

インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼに作用する
宿主因子の同定と機能解析

研究代表者

永田恭介

筑波大学医学医療系 教授

研究要旨

これまでの抗インフルエンザウイルス薬は、変異率の高いウイルス因子を標的としたものが主であり、容易に耐性ウイルス株が単離されている。従って、耐性ウイルス株が出現しにくく、広範なウイルス株を抑制する創薬設計が必要とされている。ウイルス因子と異なり、宿主のタンパク質は変異することは無い。本研究では、ウイルス-宿主間の相互作用を阻害することに着目し、インフルエンザウイルスの増殖に関わる宿主因子の新規同定およびその機能解析、ならびにウイルス因子と宿主因子の立体構造解析を行う。次いで、独自に同定した構造を基盤として、*in silico*でのドッキングシミュレーション、ならびにバイオアッセイによるドラッグスクリーニングを展開する。

新規に複製されたウイルスゲノムは、ウイルスタンパク質NPと結合してribonucleoprotein (RNP) 複合体を形成する。しかし、試験管内ゲノム複製反応に必須な宿主因子であるMCM複合体とNPを添加したのみでは、子孫RNP複合体は形成されない。本年度では、この過程を促進する宿主因子として、宿主のスプライシング因子であり、NPの分子シャペロン活性をもつUAP56に着目し、ウイルスゲノム複製と協調してUAP56によってNPがウイルスゲノム上に配置されることを明らかにした。また、ウイルスポリメラーゼの転写反応には、ウイルスポリメラーゼが宿主キャップ構造と結合することが必須である。その相互作用機構を明らかにした。

A. 研究目的

これまでの抗インフルエンザウイルス薬は、変異率の高いウイルス因子を標的としたものが主である。本研究ではウイルス因子と宿主因子のインターフェースの構造基盤を明らかにし、これを標的として宿主因子-ウイルス因子の相互作用を阻害する新しい作用機序の抗ウイルス薬を探索することで、インフルエンザウイルスの制御戦略に資する。

ウイルスゲノムの複製と転写を担うウイルスポリメラーゼは、他のウイルス遺伝子と比較して、高度に保存されている。また、ウイルスゲノムの複製・転写反応には、多くの宿主因子が必須である。従って、ウイルスポリメラーゼとその機能を制御する宿主因子（基本的に変異フリー）の相互作用面は、新規抗ウイルス薬の標的として

最適である。本研究では、インフルエンザウイルスゲノムの複製および転写に関わる宿主因子を同定し、ウイルス RNA ポリメラーゼの活性制御機構と、それに関わる機能構造を明らかにする。

B. 研究方法

(1) ウイルス

実験室株として汎用されているA/PR/8/34株を用いた。ウイルスRNP複合体は、精製ウイルスを可溶化後、グリセロール密度勾配遠心法で分画することで精製した。

(2) リコンビナントタンパク質の調製

A/PR/8/34株のNP遺伝子はpET-14bプラスミドに、UAP56遺伝子はpGEX-6Pプラスミドに組み込み、発現用大腸菌株である

BL21(DE3)RIL 株を用いて NP タンパク質および UAP56 タンパク質をそれぞれ発現した。MCM 複合体は、バキュロウイルス発現系を用いて発現した。各リコンビナントタンパク質には、His タグもしくは GST タグが付加されており、Ni-NTA レジンもしくは GST レジンを用いて精製した。

(3) 細胞

ヒト腎由来 293T 細胞、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を用いた。また、ウイルスの力価測定にはイヌ腎由来 MDCK 細胞を用いた。

(4) 試験管内ウイルス RNA 合成系

精製したウイルス RNP 複合体を酵素源として、各種ヌクレオチドに [α - 32 P]GTP を添加し、放射性標識することで検出した。

(5) ウイルス RNA 量の定量

5'末端を放射性標識したプライマーを用いたプライマー伸長法、もしくは Real-time PCR を用いた定量的 RT-PCR 法により、ウイルス RNA 量は定量した。

(6) キャップ付加された RNA 基質の調製

ワクシニアウイルス由来のキャップ付加酵素は、精製ウイルス粒子を界面活性剤で可溶化後、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画することで調製した。

(7) 細胞内ウイルス RNP 再構成系

インフルエンザウイルスの第 8 分節に *luciferase* 遺伝子を組込んだモデルウイルスゲノム発現ベクターと PB1、PB2、PA、NP タンパク質発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、細胞内でモデルウイルスレプリコンを再構成した。その際、キャップ構造認識に関わると推測されるアミノ酸部位に点変異を導入した PB2 を野生型のかわりにトランスフェクションし、その活性を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、特定の研究対象者や動物実験を含まないため、倫理面への配慮は該当し

ない。

C. 研究結果

(1) NP によるウイルスゲノム複製活性促進機構の解析

これまで、試験管内ウイルスゲノム複製活性を促進する宿主因子として MCM 複合体を同定している (EMBO J., 2007)。一方、遺伝学的には NP もウイルスゲノム複製に関与することが報告されており、リコンビナントの NP タンパク質を精製し、これまで構築した試験管内ウイルスゲノム複製系に添加し、その促進活性を検討した。その結果、NP は MCM 複合体と相加的にウイルスゲノム複製活性を促進し、MCM 複合体とは異なる作用機構をもつことが示唆された。また、NP は開始反応を促進せず、伸長反応過程において促進活性を示すことが明らかになった。

(2) 子孫ウイルス RNP 複合体の形成機構の解析

ウイルスゲノムは複製後、NP と結合して RNP 複合体を形成することで (エンキャプシデーション)、次の複製反応の鋳型として機能することができる。また、エンキャプシデーションはウイルスゲノムを核酸分解酵素から保護するためにも必須であると推測されている。研究結果 (1) では、試験管内ウイルスゲノム複製系に NP を添加することで、複製反応を再構成することに成功した。しかし、新規合成鎖に NP は結合せず、子孫ウイルス RNP 複合体を試験管内で再構成することはできていない。これまでに、我々は NP の分子シャペロンとして、宿主のスプライシング因子である UAP56 を報告している。しかし、UAP56 の詳細な作用メカニズムおよび分子シャペロンとして機能するプロセスは明らかにされていなかった。そこで、子孫ウイルス RNP 複合体形成過程における UAP56 の効果を検討した。その結果、複製反応時に UAP56 を添加することで、複製反応と協調して UAP56 は NP を子孫ウイルスゲノム上へとリクルートし、それによって複製反応自身も促進されることを明ら

かにした。

(3) PB2 ウイルスポリメラーゼが認識するキャップ構造部位の同定

インフルエンザウイルスの転写反応は、宿主キャップ構造をウイルスポリメラーゼのサブユニットのひとつである PB2 が認識することで開始される。この過程は、すべての型のインフルエンザウイルスで共通であり、転写反応に必須な過程であるが、その認識機構の詳細は不明である。そこで、A 型および B 型インフルエンザウイルスを用いて、PB2 とキャップ構造が結合するのに最も重要なキャップ構造側の部位を同定することを試みた。ワクシニアウイルス由来のキャップ付加酵素を用いて、GpppG、 m^7 GpppG、 m^7 GpppGm (m:7 位もしくはリボースに修飾されるメチル基) の 3 種類のキャップ構造を生化学的に合成した。各キャップ構造とウイルス RNP 複合体を試験管内で混合することで、PB2 のキャップ結合活性に依存したキャップ構造の切断活性を検出した。その結果、A 型は 7 位にメチル基が導入された m^7 GpppG および m^7 GpppGm を特異的に認識したが、B 型ではすべてのキャップ構造に対して同程度の結合活性を示した。

(4) キャップ構造に必要な PB2 ウイルスポリメラーゼのアミノ酸部位の同定

研究結果(3)より、A 型と B 型インフルエンザウイルスでは、PB2 が認識するキャップ構造の部位が異なることが明らかになった。そこで次に、PB2 遺伝子のキャップ構造結合ドメイン内の A 型と B 型間で保存されていないアミノ酸に着目し、キャップ構造認識に必要なアミノ酸部位を同定することを試みた。細胞内ウイルス RNP 再構成系を用いて、転写活性を測定することで、点変異を導入した PB2 のキャップ結合能を評価した。その結果、A 型の PB2 では、逆位のグアニン塩基とスタッキング相互作用する、Phe323、His357、Phe404、および同様に水素結合を形成する Glu361 と Lys376 がキャップ構造との結合に必須であることが明らかになった。一方、B 型の

PB2 では、グアニン塩基とスタッキング相互作用する Trp359、および水素結合を形成する Gln325 と Glu363 のみで十分であることが示唆された。

D. 考察

(1) NP によるウイルスゲノム複製活性促進機構の解析

NP は開始反応を促進せず、伸長反応過程において促進活性を持つことが示唆された。特に、ウイルスポリメラーゼがプロモーター部位から離脱した後に NP は必要であり、NP はウイルスポリメラーゼのプロモータークリアランスに関与することが明らかになった。さらに、MCM 複合体は PA サブユニットと結合して複製反応を促進するのに対し、NP は PB1 および PB2 サブユニットと結合することが報告されており、MCM 複合体とは異なる作用機構によって、NP は複製反応を促進していることが推測される。

(2) 子孫ウイルス RNP 複合体の形成機構の解析

UAP56 を NP とともに試験管内ウイルスゲノム複製系に添加することで、子孫ウイルス RNP 複合体形成を促進できることが明らかになった。これまでに我々は、UAP56 は NP の分子シャペロンとして機能し、RNA 上に NP を配置していく活性をもつことを報告している (J. Virol., 2001)。従って、UAP56 の分子シャペロン活性は、ウイルスゲノム複製過程において、複製反応と協調して必要とされることが新たに示唆された。また、UAP56 を添加することで、ウイルスゲノム複製活性も促進された。他の RNA ポリメラーゼでは、新規合成鎖が 2 次構造を形成することで、RNA ポリメラーゼの伸長が阻害されることが報告されている。インフルエンザウイルスポリメラーゼでは、UAP56 によって NP が新規合成鎖にリクルートされることで、新規合成鎖の 2 次構造が解消され、その結果、ウイルスゲノム複製が促進されていると推測される。

(3) PB2 ウイルスポリメラーゼが認識するキャップ構造部位の同定

メチル基の修飾が異なるキャップ構造 (GpppG, m⁷GpppG, m⁷GpppGm) を用いた生化学的なアッセイ系により、A 型は 7 位にメチル基が導入された m⁷GpppG および m⁷GpppGm を特異的に認識したが、B 型ではすべてのキャップ構造に対して高い結合活性を示すことを明らかにした。よって、A 型の PB2 は 7 位に修飾されたメチル基を主に認識するのに対し、B 型の PB2 は逆位に配置されたグアニン塩基を主に認識することが示唆された。

(4) キャップ構造に必要な PB2 ウイルスポリメラーゼのアミノ酸部位の同定

A 型と B 型の PB2 のキャップ構造認識ドメインは高度に保存されているが、グアニン塩基との結合に必須なスタッキング相互作用および水素結合形成部位に違いが観察された。これらの点変異体を用いた解析結果より、A 型および B 型の PB2 に共通して必要となる機能構造を同定することで、抗ウイルス薬の *in silico* スクリーニングを行う際、最適な標的部位を明らかにすることができた。

E. 結論

NP はウイルスゲノム複製を促進する活性をもち、子孫 RNP 複合体形成においては、ウイルスゲノム複製反応と協調して、UAP56 によって NP が子孫ウイルスゲノムへとリクルートされることが明らかになった。UAP56 と NP の結合部位を標的とした抗ウイルス薬を探索することで、ウイルスゲノム複製と子孫 RNP 複合体形成の 2 過程を阻害する抗ウイルス薬候補を同定することができると考えられる。

また、A 型の PB2 はキャップ構造の 7 位に修飾されたメチル基を特異的に認識するのに対し、B 型の PB2 は逆位に配置されたグアニン塩基を主に認識することが明らかになった。さらに、キャップ結合に必要なアミノ酸部位も A 型と B 型間で異なる部位があることが示唆された。よって、PB2 とキャップ構造の結合を標的とし

た抗ウイルス薬を探索する場合、ともに共通で必須となるグアニン塩基との相互作用部位を標的とした抗ウイルス薬を探索することが、型に依存しない抗ウイルス薬を開発する上で重要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tojino M, Mori M, Kasuya MC, Hatanaka K, Kawaguchi A, Nagata K, Shirai T, Mizuno M. Immobilization of fluoros oligosaccharide recognized by influenza virus on polytetrafluoroethylene filter. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012; 22(2):1251-1254.
- 2) Fukuoka M, Minakuchi M, Kawaguchi A, Nagata K, Kamatari YO, Kuwata K. Structure-based discovery of anti-influenza virus A compounds among medicines. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2012; 1820(2):90-95.
- 3) Takeuchi K, Nagata N, Kato SI, Ami Y, Suzaki Y, Suzuki T, Sato Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Mori K, Van Nguyen N, Kimura H, Nagata K. Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol.*, 2012; 86(6): 3027-3037.
- 4) Kawaguchi A, Momose F, Nagata K. Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J. Virol.*, 2011; 85: 6197-6204.
- 5) Numata M, Nagata K. Synergistic requirement of orphan nonamer-like elements and DNA bending enhanced by HMGB1 for RAG-mediated nicking at cryptic 12-RSS but not authentic 12-RSS. *Genes to Cells*, 2011; 16(8):879-895.
- 6) Wakai C, Iwama M, Mizumoto K, Nagata K. Influenza B virus RNA polymerase recognizes the cap structure less

- dependently on the methyl residue than influenza A virus polymerase. *J. Virol.*, 2011; 85(15):7504-7512.
- 7) Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS ONE*, 2011; 6(6): e21123.
 - 8) Kato K, Okuwaki M, Nagata K. Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J. Cell Sci.*, 2011; 124(Pt 19):3254-3265.
 - 9) Numajiri Haruki A, Naito T, Nishie T, Saito S, Nagata K. IFN-inducible antiviral protein MxA enhances cell death triggered by ER stress. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2011; 31(11):847-856.
 - 10) Mori K, Haruyama T, Nagata K. Tamiflu-Resistant but HA-Mediated Cell-to-Cell Transmission through Apical Membranes of Cell-Associated Influenza Viruses. *PLoS one*, 2011; 6(11) e28178.
2. 学会発表
- 1) Kato K, Okuwaki M, Nagata K. Histone H1 chaperone-dependent histone H1 dynamics and transcriptional regulation. *Physicochemical Field for Genetic Activities. Awaji*: 2011.1-24-26
 - 2) Komatsu T, Haruki H, Nagata K. Cellular and Viral Chromatin Protein Positively Regulate Adenovirus Gene Expression. *Physicochemical Field for Genetic Activities. Awaji*: 2011.1-24-26
 - 3) 永田恭介. インフルエンザウイルスゲノム複製・転写の酵素機構. 日本薬学会第131年会. 静岡: 2011.3.28-31
 - 4) 永田恭介. ウイルス複製の分子機構の解明からウイルス疾患制御へ. 日本薬学会第131年会. 静岡: 2011.3.28-31
 - 5) 若井ちとせ, 永田恭介. インフルエンザウイルスポリメラーゼを標的とした新規抗ウイルス薬の開発. 日本薬学会第131年会. 静岡: 2011.3.28-31
 - 6) Oshiro Y, Yasue H, Hattori S, Chiba M, Naito T, Takeuchi K, Nagata K, and Ohkohchi N. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in human hepatocytes. 46th Annual meeting of the European association for the study of the liver, Berlin, Germany: 2011.3.30-4.3.
 - 7) 大城幸雄, 服部眞次, 内藤忠相, 竹内薫, 永田恭介, 千葉満, 安江博, 大河内信弘. ヒト初代培養細胞へのブタ由来E型肝炎ウイルス感染実験. 第47回肝臓学会総会 東京: 2011.6.2-3
 - 8) 村野健作, 加藤広介, 永田恭介. マウス胚発生におけるヒストンシヤペロンTAF-Iの機能解析. 生殖サイクル若手勉強会2011 大阪: 2011.7.13-15
 - 9) Wakai C, Mizumoto K, Nagata K. Influenza B virus RNA polymerase recognizes the Cap structure in a manner different from other cap-binding proteins. *IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌*: 2011.9.11-16
 - 10) Kawaguchi A, Matsumoto K, Nagata K. Identification of a novel cellular protein involved in influenza virus genome trafficking. *IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌*: 2011.9.11-16
 - 11) Komatsu T, Haruki H, Nagata K. POSITIVE REGULATION OF ADENOVIRUS GENE EXPRESSION BY CELLULAR AND VIRAL CHROMATIN PROTEINS. *IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌*: 2011.9.11-16
 - 12) Nishie T, Takeuchi K, Nagata K. Characterization of RNA binding activity of measles virus C protein. *IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌*: 2011.9.11-16
 - 13) Takeuchi K, Kato S, Nagata N, Suzuki T, Ami Y, Mori K, Tsunetsugu-Yokota Y, Nagata K. INFECTION OF CYNOMOLGUS MONKEYS WITH RECOMBINANT WILD-TYPE MEASLES VIRUS BEARING VACCINE H PROTEIN. *IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌*: 2011.9.11-16
 - 14) Turan K, Kawaguchi A, Harada Y, Nagata K. Comparison of avian and human influenza virus RNA polymerases in mammalian cells. *IUMS2011 Sapporo*,

- XV International Congress of Virology.
札幌：2011.9.11-16
- 15) Kumakura M, Takizawa N, Nagata K. Roles of cytoskeletal filaments in cytoplasmic transport of influenza A virus vRNP. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌：2011.9.11-16
 - 16) Minakuchi M, Kawaguchi A, Nagata K. The template recognition mechanism of the influenza A virus RNA polymerase complex. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌：2011.9.11-16
 - 17) Mori K, Haruyama T, Nagata K. Tamiflu-resistant but HA-mediated Cell-to-cell Transmission through Apical Membranes of Cell-associated Influenza Viruses. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌：2011.9.11-16
 - 18) Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11a-positive recycling endosome. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌：2011.9.11-16
 - 19) Fukuoka M, Minakuchi M, Kawaguchi A, Nagata, Kamatari Y.O, Kuwata K. Discovery of anti-influenza virus compounds from medicines on the market. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌：2011.9.11-16
 - 20) 加藤広介、奥脇暢、永田恭介. ヒストン H1 結合因子によるクロマチン動態制御機構. 第 10 回核ダイナミクス研究会. 北海道：2011.10.26-28
 - 21) 門田伸一、永田恭介. INHAT 複合体構成因子による ISG 転写制御機構の解析. 第 10 回核ダイナミクス研究会. 北海道：2011.10.26-28
 - 22) 浅賀正充、村野健作、永田恭介. Sp1 による TAF-I α 遺伝子の脱抑制機構の解析. 第 10 回核ダイナミクス研究会. 北海道：2011.10.26-28
 - 23) Michiko K, Naoki T, Nagata K. Roles of non-muscle myosin IIA in cytoplasmic transport of influenza A virus vRNP. The 2nd Leading Graduate Schools International Conference. Tsukuba: 2011.11.1-2
 - 24) Hisaoka M, Ueshima S, Murano K, Nagata K, Okuwaki M. Nucleolar chromatin regulation by B23/nucleophosmin depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. The 2nd Leading Graduate Schools International Conference. Tsukuba: 2011.11.1-2
 - 25) Mori K, Haruyama T, Nagata K. Tamiflu-resistant Cell-to-cell Transmission of Influenza Virus Mediated by HA. Leading Graduate Schools International Conference. Tsukuba: 2011.11.1-2
 - 26) 村野健作、加藤広介、永田恭介. マウス胚発生におけるヒストンシャペロン TAF-I の機能解析. 「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第 4 回公開シンポジウム. 大阪：2011.11.17-18
 - 27) Murano K, Kajitani K, Kato K, Ema M, Takahashi S, Nagata K. TAF-I plays a critical role on cell growth during differentiation and development through its histone chaperone activity. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜：2011.12.13-16
 - 28) Okuwaki M, Sumi A, Nagata K. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplasmin/Nucleophosmin family proteins, NPM1, NPM2, and NPM3 in sperm chromatin remodeling. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜：2011.12.13-16
 - 29) Hisaoka M, Nagata K, Okuwaki M. Intramolecular regulation of the RNA binding activity of nucleolar protein nucleophosmin/B23. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜：2011.12.13-16
 - 30) Wakai C, Mizumoto K, Nagata K. Recognition of the cap structure by influenza B virus RNA polymerase is less dependent on the methyl residue than by other cap-binding proteins. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜:2011.12.13-16

- 31) Osari S, Kawaguchi A, Nagata K. A novel function of NS1 influenza virus protein in virus growth. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜: 2011.12.13-16
- 32) Kawaguchi A, Matsumoto K, Nagata K. Identification of a novel cellular RNA binding protein involved in intracellular trafficking of the influenza virus genome. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜: 2011.12.13-16
- 33) Ueshima S, Nagata K, Okuwaki M. Nopp140 regulates rRNA production in both RNA-dependent and -independent manners. 第 34 回日本分子生物学会年

会. 横浜: 2011.12.13-16

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
平成23年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
分担報告書

インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼおよび宿主因子の構造解析

研究分担者

朴 三用 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 教授

研究要旨

ウイルスポリメラーゼ複合体の完全長構造を決定するため、まず、組換えバキュロウイルス発現系を構築した。PB1、PB2、PA 発現用バキュロウイルスを昆虫細胞に共感染させ、感染細胞抽出液よりアフィニティーカラムを用いてウイルスポリメラーゼ複合体を精製した。しかし、昆虫細胞から抽出した組換えウイルスポリメラーゼ複合体は、RNA合成活性が著しく低下していた。このことから、組換えバキュロウイルス発現系では、正確な構造を持つウイルスポリメラーゼ複合体を調製することが困難であると考えられた。そこで次に、鶏卵を用いて大量のウイルス粒子を調製後、ウイルス RNP 複合体を精製し、RNase 処理および種々のカラムを用いてウイルスゲノムおよび NP を除去し、活性を保持したウイルスポリメラーゼ複合体を精製することに成功した。

A.

研究目的

既存の抗インフルエンザウイルス薬は、変異率の高いウイルス遺伝子を標的としたものが主体であり、薬剤耐性株が出現しやすい。この問題を克服する一案として、高度に保存されたウイルス因子、もしくはウイルス因子に作用する宿主因子とウイルス因子の相互作用を標的とした新規抗ウイルス薬を開発することが挙げられる。それには、第1段階のスクリーニングとして *in silico* でのドッキングシュミレーションによる立体構造を基盤にしたスクリーニングが必要である。そこで、本研究では、ドッキングシュミレーションを行うための、ウイルス因子および宿主因子の機能構造および立体構造の決定を目的とする。特に、本研究では、各ウイルス株間で高度に保存されているウイルスRNAポリメラーゼ複合体 (PB1、PB2、PA) およびウイルスRNAポリメラーゼ複合体と相互作用する宿主因子の構造解析を重点的に行う。

B. 研究方法

(1) ウイルス

実験室株として汎用されている

A/PR/8/34 株を用いた。ウイルス ribonucleoprotein (RNP) 複合体は、精製ウイルスを可溶化後、グリセロール密度勾配遠心法で分画することで精製した。

(2) リコンビナントタンパク質の調製

ウイルスポリメラーゼ複合体は、バキュロウイルス発現系を用いて発現した。リコンビナントタンパク質には、His タグが付加されており、Ni-NTA レジンを用いて精製した。

(3) 試験管内ウイルス RNA 合成系

精製したウイルスポリメラーゼ複合体の活性評価には、試験管内ウイルス RNA 合成反応を用い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を添加して新規合成鎖を放射性標識することで検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、特定の研究対象者や動物実験を含まないため、倫理面への配慮は該当しない。

C. 研究結果

(1) バキュロウイルス発現系を用いた組換えウイルスポリメラーゼ複合体の精製

ウイルスポリメラーゼ複合体の完全長構造を決定するため、まず、組換えバキュロウイルス発現系を構築した。精製時に用いる His タグは、各サブユニットの C 末端に付加した。哺乳動物細胞内では、C 末端に His タグを付加してもウイルス RNA 合成活性は低下しないこと確認済みである。発現系には、Invitrogen 社の pFastBac システムを用い、Sf9 細胞に PB1、PB2、PA 発現用バキュロウイルスを共感染させることでウイルスポリメラーゼを発現した。感染細胞抽出液より、Ni-NTA レジンをを用いてウイルスポリメラーゼ複合体を精製した。その後、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて PB1、PB2、PA からなる 3 者複合体を精製した。試験管内ウイルス RNA 合成系でその酵素活性を測定したところ、ウイルス粒子より精製したウイルス RNP 複合体を酵素源とした場合と比較し、昆虫細胞から精製した組換えウイルスポリメラーゼ複合体は、RNA 合成活性が著しく低下していた。

(2) ウイルス RNP 複合体からのウイルスポリメラーゼ複合体の精製

研究結果(1)より、組換えバキュロウイルス発現系では、正確な構造を持つウイルスポリメラーゼ複合体を調製することが困難であると考えられた。そこで次に、ウイルス粒子よりウイルスポリメラーゼ複合体を精製することを試みた。まず、発育鶏卵を用いてウイルスを回収し、スクロース密度遠心により、精製ウイルス粒子を調製した。大量のウイルス粒子を調製後、ウイルス粒子を界面活性剤で可溶化し、グリセロール密度勾配遠心法により、ウイルス RNP 複合体を精製した。次に、ウイルス RNP 複合体をマイクロソカルヌクレアーゼで処理することで、ウイルスゲノムを除去後、陽イオン交換カラムである MonoQ を用いて NP とウイルスポリメラーゼ複合体を分離した。このような方法で精製したウイルスポリメラーゼ複合体を、試験管内

ウイルス RNA 合成系にて活性を評価したところ、研究結果(1)で調製した組換えウイルスポリメラーゼ複合体と比較して、約 100 倍の RNA 合成活性をもつウイルスポリメラーゼ複合体を精製することに成功した。

D. 考察

昆虫細胞から精製した組換えウイルスポリメラーゼ複合体は、RNA 合成活性が著しく低下していた。感染細胞内では、ウイルスポリメラーゼ複合体形成を促進する宿主因子として Hsp90 が必要であること、およびウイルスゲノムのプロモーター配列がウイルスポリメラーゼ複合体の安定化に寄与することが報告されている。バキュロウイルス発現系では、これらの要因が欠損しており、そのため可溶性で回収されたウイルスポリメラーゼ複合体でも活性を持たないことが推測される。

E. 結論

バキュロウイルス発現系を用いた組換えウイルスポリメラーゼ複合体は、活性を保持せず、正確な構造をもつウイルスポリメラーゼ複合体の構造を決定することは不可能である。一方、ウイルス粒子より、ウイルスポリメラーゼ複合体を生化学的なカラムクロマトグラフィーにより精製することで、活性を維持したウイルスポリメラーゼ複合体を精製することに成功した。今後は、精製したウイルスポリメラーゼ複合体の結晶構造解析もしくは高解像度電子顕微鏡を用いることで、構造情報を得ていく予定である。さらに、ウイルス因子と結合する宿主因子の構造解析も進行中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shibayama N, Sugiyama K, Park SY. Structures and oxygen affinities of crystalline human hemoglobin C (beta6

- Glu) in the R and R2 quaternary structures. J. Biol. Chem., 2011; 286(38): 33661-8.
- 2) Tachiwana H, Kagawa W, Shiga T, Osakabe A, Miya Y, Saito K, Hayashi-Takanaka Y, Oda T, Sato M, Park SY, Kimura H, Kurumizaka H. Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. Nature, 2011; 476(7359): 232-5.
 - 3) Makino R, Park SY, Obayashi E, Iizuka T, Hori H, Shiro Y. Oxygen binding and redox properties of the heme in soluble guanylate cyclase : Implications for the mechanism of ligand discrimination. J. Biol. Chem., 2011; 286(18): 15678-87.
2. 学会発表
- 1) Park Sam-Yong, “*Structural Studies of the Influenza RNA-polymerase for Novel Drug Design*” The 9th International Symposium for Future Drug Design and Medical Care. September 29-30, 2011. Hokkaido University (招待講演)
 - 2) Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Suzuki Y, Tame JR, Nagata K, Park SY.

- Structure of PB1-PB2 subunit interface of influenza A virus RNA polymerase. IUCr. 2011, 22–30 August 2011. Palacio Municipal de Congresos, Madrid, Spain.
- 3) Yoshida H, Obayashi E, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, Tame JR, Park SY. The structural basis for the essential PA-PB1 subunit interaction in influenza RNA polymerase. IUCr. 2011, 22–30 August 2011. Palacio Municipal de Congresos, Madrid, Spain.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
平成23年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
分担報告書

タンパク質立体構造を基盤にした
抗インフルエンザウイルス化合物のスクリーニング解析

研究分担者

夏目 徹 独立行政法人産業総合技術研究所バイオメディシナルセンター
チーム長

研究協力者

広川 貴次 独立行政法人産業総合技術研究所生命情報工学研究センター
チーム長

研究要旨

本項目では、まず、抗ウイルス薬候補のスクリーニング系を確立する目的で、PB1-PA相互作用部位を標的として、*in silico* スクリーニング→低分子化合物ライブラリー→ウイルスポリメラーゼを阻害する候補化合物探索のシステムを構築する。これにより、既存の抗インフルエンザウイルス薬とは異なるメカニズムで、インフルエンザウイルス感染を阻害する新規抗ウイルス薬を創薬する方法論を構築する。ついで、ウイルスポリメラーゼと宿主因子の相互作用面を標的として、抗ウイルス薬候補のスクリーニングを行う。

A. 研究目的

これまでの抗インフルエンザウイルス薬は、変異率の高いウイルス因子を標的としたものが主である。本研究ではウイルス因子と宿主因子のインターフェースの構造基盤を明らかにし、これを標的として相互作用を阻害する新しい作用機序の抗ウイルス薬を探索することで、インフルエンザウイルスの制御戦略に資する。本研究では、まず、抗ウイルス薬候補のスクリーニング系を確立する目的で、PB1-PA相互作用部位を標的として、*in silico*スクリーニング→低分子化合物ライブラリー→ウイルスポリメラーゼを阻害する候補化合物探索のシステムを構築する。特に、ドッキングシミュレーションとMolecular dynamics計算における標的部位探索の最適化を目指す。これにより、既存の抗インフルエンザウイルス薬とは異なるメカニズムで、インフルエンザウイルス感染を阻害する新規抗ウイルス薬を創薬する方法論の構築に資する。ついで、ウイルスポリメラーゼと宿主因子の相互作用面を標的として、抗ウ

イルス薬候補のスクリーニングを行う。

B. 研究方法

(1) ドッキングシミュレーションによる化合物の *in silico* スクリーニング

PB1-PAの結晶構造(PDB ID: 2ZNL)に基づきドッキングシミュレーションを実施した。ドッキング箇所となるPB1-PA相互作用部位は、化合物でミミックするには非常に広範囲に及ぶため、本研究では、最初にMolecular dynamics計算(AMBER)を用いてPB1-PAの10 nsのシミュレーションを実施し、PB1-PA相互作用部位で相互作用占有率の高い、3つの水素結合相互作用と2つの疎水性相互作用を同定した。続いて、これらの高占有率の相互作用部位を結合する拘束条件を加えた化合物のドッキングシミュレーション(Glide)を実施し、約300万件の化合物ライブラリーから結合エネルギースコアの良い約200品目を選定した。

(2) スキャッフールドホッピングによる化合物の最適化

表面形状比較 (ROCS 法) により、形状類似性の閾値が、0.5 以上 (最小値 0、最大値 1) で、かつ、MACSS key による Fingerprint 計算を利用した構造式の類似性計算で、構造類似性の閾値が、0.5 以下 (最小値 0、最大値 1) の条件を満たす化合物を選定した。

(3) 候補化合物のウイルスポリメラーゼ複合体形成阻害活性の評価

PB1 および PA の組換え体を用いて、蛍光偏光法により PB1-PA 複合体形成の阻害活性を評価した。

(4) 候補化合物の抗ウイルス活性の評価

in silico でスクリーニングした候補化合物の抗ウイルス活性はプラークアッセイ法で評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、特定の研究対象者や動物実験を含まないため、倫理面への配慮は該当しない。

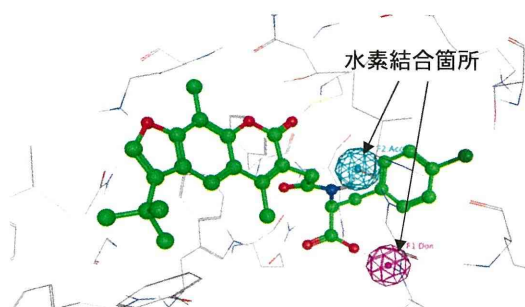
C. 研究結果

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは PB1 を中心として、PB1 の N 末端に PA、および C 末端に PB2 がそれぞれ結合した複合体を形成する。これまでに、PB1 と PA の相互作用部位の部分結晶構造は、永田・朴らの研究成果により決定されている (Nature, 2008)。本年度は、抗ウイルス薬候補のスクリーニング系を確立す

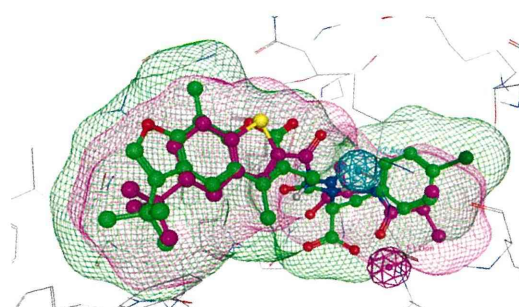
る目的で、PB1-PA 相互作用部位を標的として、in silico スクリーニング→低分子化合物ライブラリー→ウイルスポリメラーゼを阻害する候補化合物探索のシステムの構築を行った。

Molecular dynamics 計算とドッキングシミュレーションを活用した in silico スクリーニングにより、約 300 万件の購入可能な化合物ライブラリーから約 200 品目の化合物を選定した。そして、これらの化合物に対して、蛍光偏光法によるアッセイ評価を実施した。その結果、PB1 と PA の結合を阻害する低分子化合物として、化合物 No.38 が得られた。しかし、バイオアッセイの結果より、高い細胞毒性をもつことが指摘された。そのため、物性改善を目的として、in silico による化合物 No.38 と PA との相互作用モデルを模倣しながら化合物 No.38 とは新しい骨格をもつ化合物の探索

(Scaffold hopping) を実施した。化合物 No.38 をクエリーとした Scaffold hopping では、①PA と化合物 No.38 の相互作用モデルより、相互作用に重要とされる水素結合 2 カ所を拘束条件に、約 300 万件の化合物ライブラリー (化合物ライブラリーをもとに Drug-like 化合物をあらかじめ選定したライブラリー群) よりドッキング計算によって化合物を絞り込み、②前述で定義した水素結合を満たす化合物群を対象に、化合物 No.38 と表面形状が類似している化合物で、なおかつ、構造式が化合物 No.38 と異なる化合物を選定、の手順で行った (下図)。①の探索では、約 300 万件から、1,686 化合物がヒットし、②の過程では、1,686 化合物の中から、表面形状比較 (ROCS 法)



PAと化合物38の相互作用モデルより重要な水素結合2カ所を定義し、同じような水素結合を形成する化合物をドッキングによりスクリーニング



前のステップでヒットした化合物群から、化合物38と表面形状が類似しており、なおかつ、構造式がなるべく異なる化合物を選定

により、形状類似性の閾値が、0.5 以上（最小値 0、最大値 1）で、かつ、MACSS key による Fingerprint 計算を利用した構造式の類似性計算で、構造類似性の閾値が、0.5 以下（最小値 0、最大値 1）の条件を満たす 40 品目をアッセイ評価対象の化合物に選定した。現在、その細胞毒性および抗ウイルス活性を評価中である。

D. 考察

in silico スクリーニングを用いて、約 300 万の化合物データベースより約 200 の化合物を選定し、抗インフルエンザウイルス活性をもつ化合物として No.38 を同定した。*in silico* スクリーニングでは、Molecular dynamics シミュレーションを考慮することで、結晶構造のみでは解析が困難な溶液中での相互作用占有率を予測し、広範囲な相互作用範囲からより重要な結合部位を絞り込むことでドッキングシミュレーションの精度を向上させたと評価している。

E. 結論

本年度、独自に構築した *in silico* スクリーニング系により、非常に高い効率で目的としたタンパク質間相互作用を標的とした候補化合物を同定することが可能であった。今後、抗ウイルス活性の強化および細胞毒性の低下など、物性を改善していく予定である。本年度、得た知見により、ウイルス因子と宿主因子のタンパク質間相互作用についても解析を展開する基盤技術を構築することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohte S, Kokabu S, Iemura S, Sasanuma H, Yoneyama K, Shin M, Suzuki S, Fukuda T, Nakamura Y, Jimi E, Natsume T, Katagiri T. Identification and functional analysis of Zranb2 as a novel Smad-binding protein that suppresses BMP signaling. *J. Cell Biochem.*, 2011; 113(3): 808-814.
- 2) Tsuchiya Y, Morita T, Kim M, Iemura S,

- Natsume T, Yamamoto M, Kobayashi A. Dual regulation of the transcriptional activity of Nrf1 by b-TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, 2011; 31(22): 4500-4512.
- 3) Uchida Y, Hasegawa J, Chinnapen D, Inoue T, Okazaki S, Kato R, Wakatsuki S, Misaki R, Koike M, Uchiyama Y, Iemura S, Natsume T, Kuwahara R, Nakagawa T, Nishikawa K, Mukai K, Miyoshi E, Taniguchi N, Sheff D, Lencer WI, Taguchi T, Arai H. Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2011; 108(38): 15846-15851.
- 4) Kitazawa M, Nagano M, Masumoto KH, Shigeyoshi Y, Natsume T, Hashimoto S. Angiopoietin-like 2, a circadian gene, improves type 2 diabetes through potentiation of insulin sensitivity in mice adipocytes. *Endocrinology*, 2011; 152(7): 2258-2567.
- 5) Okazaki IM, Okawa K, Kobayashi M, Yoshikawa K, Kawamoto S, Nagaoka H, Shinkura R, Kitawaki Y, Taniguchi H, Natsume T, Iemura S, Honjo T. Histone chaperone Spt6 is required for class switch recombination but not somatic hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2011; 108(19): 7920-7925.
- 6) Hirose S, Kawamura Y, Yokota K, Kuroita T, Natsume T, Komiya K, Tsutsumi T, Suwa Y, Isogai T, Goshima N, Noguchi T. Statistical analysis of features associated with protein expression/solubility in an in vivo *Escherichia coli* expression system and a wheat germ cell-free expression system. *J. Biochem.*, 2011; 150(1): 73-81.
- 7) Hosoya T, Hirokawa T, Takagi M, Shin-ya K. Trichostatin analogues, JBIR-109, JBIR-110, and JBIR-111 from the marine sponge-derived *Streptomyces* sp. RM72. *J. Nat. Prod.*, 2012; 75(2): 285-289.
- 8) Watanabe M, Kobayashi T, Hirokawa T, Yoshida A, Ito Y, Yamada S, Orimoto N, Yamasaki Y, Arisawa M, Shuto S. Cyclopropane-based stereochemical diversity-oriented conformational restriction strategy: histamine H3 and/or H4 receptor ligands with the 2, 3-methanobutane backbone. *Org. Biomol.*

- Chem., 2012; 10(4): 736-745.
- 9) Shinohara R, Akimoto T, Iwamoto O, Hirokawa T, Yotsu-Yamashita M, Yamaoka K, Nagasawa K. Synthesis of skeletal analogues of saxitoxin derivatives and evaluation of their inhibitory activity on sodium ion channels Na(V)1.4 and Na(V) 1.5. *Chemistry*, 2011; 17(43): 12144-12152.
 - 10) Hitaoka S, Matoba H, Harada M, Yoshida T, Tsuji D, Hirokawa T, Itoh K, Chuman H. Correlation analyses on binding affinity of sialic acid analogues and anti-influenza drugs with human neuraminidase using ab initio MO calculation on their complex structures—LERE-QSAR analysis (IV). *J. Chem. Inf. Model.*, 2011; 51(10): 2706-2716.
 - 11) Yabuuchi H, Nijima S, Takematsu H, Ida T, Hirokawa T, Hara T, Ogawa T, Minowa Y, Tsujimoto G, Okuno Y. Analysis of multiple compound-protein interactions reveals novel bioactive molecules. *Mol. Systems Biol.*, 2011; 472: 1-12.
 - 12) Daiyasu H, Hirokawa T, Kamiya N, Toh H. Computational analysis of ligand recognition mechanisms by prostaglandin E2 (subtype 2) and D2 receptors. *Theor. Chem. Accounts*, 2011; 130: 1131-1143.
 - 3) モノづくり日本！で挑むプロテオミクス産業革命、夏目徹、奈良先端大学院大学シンポジウム『プロテオミクスを生命科学に生かす10の方法』、2011/11/24
 - 4) モノづくり日本！で挑むバイオの産業革命、夏目徹、愛媛大学医学部分子病態医学セミナー、2011/11/08
 - 5) モノづくり日本！で挑むバイオの産業革命、夏目徹、日本ウィルス学会ウィルス学キャンプ講演、2011/11/07
 - 6) 超々高感度質量分析への挑戦、夏目徹、第30回分子病理研究会講演、2011/07/23
 - 7) 超々高感度質量分析への挑戦、夏目徹、CBSM(Conference of BioSignal and Medicene)2011講演、2011/06/24
 - 8) タンパク質間相互作用研究から、夏目徹、「抗がん剤創薬を考える会 – アカデミアはこれから何をすべきか」、熱海、2011/05/28
 - 9) 超々高感度質量分析システムへの挑戦、夏目徹、筆頭・登壇、質量分析シンポジウム、東京(虎ノ門)、2011/05/19
 - 10) In silico screening for protein-protein interaction inhibitors, 広川 貴次, 3rd Symposium on Systems and Synthetic Biology, 中国、蘇州大学、2011/12/10

2. 学会発表

- 1) タンパク質ネットワーク解析から低分子化合物の標的決定へ、夏目徹、筆頭・登壇、日本化学会第92春季年会(2012)、横浜(慶応大学日吉キャンパス)、2012/03/25
- 2) 汎用ヒト型ロボットによるベンチワークの高度化、夏目徹、第6回先導技術交流会(社団法人研究産業・産業技術振興協会)、2012/03/09

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
平成23年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
分担報告書

高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 に対する
ワクチン製造用種株のタンパク質収量等の検討

研究分担者

信澤枝里 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 室長

研究協力者

有田知子 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 研究員

研究要旨

高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)に対するワクチン製造用種株候補ウイルス 12 株の総タンパク質収量、HA 含量、HA 収量の検討を行った。候補ウイルス中には、HA 収量が、著しく低い株が存在するが、培養条件を検討することで改善が見られた。

A. 研究目的

東南アジア、アフリカを中心とした高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) のヒト感染は依然続いている。各クレードのウイルスに対するワクチンは、必要に応じて随時準備されているものの、すべてのクレードに対応するワクチンは無く、クレードを超えて作用する抗ウイルス薬を探索する必要がある。そこで、各クレードのワクチン製造種株候補の HA を精製し、立体構造を決定し、各クレード間で共通して抗ウイルス薬の標的となりうるドメイン構造を同定することを目的とした。これまでに、鶏卵での増殖性およびタンパク質収量が低く、製造種株としての適正の検討を要する株の報告もあり、既存の候補株の種株としての適正を検討することは必要である。本研究では、これまでに作製された H5N1 ワクチン製造種株の増殖性、総タンパク質収量、HA 収量を比較し、その適正を検討し、立体構造解析に用いるための HA のタンパク質調製法を検討した。また、研究代表者へ各種のウイルス株の供給を行う。

B. 研究方法

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) に対するワクチン製造種株候補ウイルス 12 株 (サブクレードを含む 9 クレ

ードに属する) を孵化鶏卵に接種し、接種後漿尿液を回収し、その増殖性、総タンパク質収量、HA 収量を比較した。

(1) 培養条件

孵化鶏卵 (10 日卵) にウイルス接種後、48 時間で培養を終了し、ウイルスを回収した。

(2) 増殖性

七面鳥赤血球を用いた血球凝集反応により HA 価を求め、ウイルス間で比較した。

(3) 総タンパク質収量

漿尿液を回収後、濃縮し、20%スクロースを通して精製後、BCA 法によりタンパク質量を測定した。

(4) HA 収量

濃縮、精製したウイルスのタンパク質を SDS-PAGE にて分離し、HA が総ウイルスタンパク質中で占める割合を算出した。総タンパク質収量と HA 含量から HA 収量を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、特定の研究対象者や動物実験を含まないため、倫理面への配慮は該当しない。

C. 研究結果

(1) 増殖性

調べた全ての株で HA 価は 512~2048 の値を示し、HA 価から推定した増殖性は、全体的に高かった。

(2) 総タンパク質収量

クレード 1, 2.2, 2.2.1, 7.2 に属する多くのワクチン候補株のタンパク質収量は、(10~15 µg/ml 漿尿液) だった。これは、収量が低いと言われている A/(H1N1)pdm09 に対するワクチン株同様あるいは、それ以下の値である。

(3) HA 含量 (%)

各ウイルスの HA タンパク質が全ウイルスタンパク質に占める割合を、SDS-PAGE により解析した結果、いずれも 35~45% の範囲内であった。

(4) HA 収量

総タンパク質収量と HA 含量から、各ウイルスの HA 収量を算出した。その結果、総タンパク質収量、HA 含量がいずれも低い 2.2, 2.2.1 に属するワクチン株は、HA 収量が (4 µg/ml 漿尿液) 前後と低く、改善の必要があった。

(5) HA 収量の改善策

HA 収量の低いワクチン株は、用いる鶏卵の日齢を 11 日卵、培養時間を 72 時間とすることで、HA 収量が約 8 µg/ml 漿尿液まで増加した。

D. 考察

既存の H5N1 ワクチン製造用種株候補ウイルスには、総タンパク質収量、HA 収量が低い株が同定され、用いるウイルス株を検討する必要がある。このうち、4 クレードに属するウイルスは、特に低い HA 収量を示した。このうち、収量が最も低かった 2.2.1 に属するウイルスは、ウイルスの培養条件を検討することで、収量が約 2 倍増加し、改善が見られた。

E. 結論

一部のクレードにおいては、十分量の精製ウイルス粒子を調製することに成功した。今後、ブロメライン処理などにより、HA タンパク質を調製し、立体構造解析を行う予定である。また、ワクチン製造用種株候補の選定という意味では、既存の H5N1 ワクチン製造用種株候補ウイルスの総タンパク質収量、HA 収量を同一の手法で測定し、収量と言う観点から製造用に適さない株を明らかにすることもできた。一方、このような収量の低い株は、培養条件を変えることで、ある程度の収量改善の可能性を示した。また、永田研究代表との共同研究にて、各候補ウイルス株の HA による細胞侵入過程以外の細胞内での転写・複製など増殖効率に関しても、ウイルスに必要とされる宿主因子との関連性を含め、解析を展開しているところである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nobusawa E, Omagari K, Nakajima S, Nakajima K. Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. *Microbiol Immunol.* 2012; 56(2): 99-106.
- 2) Yoshioka A, Takematsu K, Kurisaki I, Fukuzawa K, Mochizuki Y, Nakano T, Nobusawa E, Nakajima K, Tanaka S. Antigen-Antibody Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation. *Theor. Chem. Acc.*, 2011; 130: 1197-1202.
- 3) Yoshioka A, Fukuzawa K, Mochizuki Y, Yamashita K, Nakano T, Okiyama Y, Nobusawa E, Nakajima K, Tanaka S. Prediction of Probable Mutations in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large-Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations. *J. Mol. Graph. Model.*, 2011; 30: 110-119.
- 4) Fukuzawa K, Omagari K, Nakajima K,