

201225035A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 永田 恭介

平成 25 (2013) 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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 永田 恭介

平成 25 (2013) 年 3 月

# 目 次

I. 総括・分担研究報告 -----	1
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 ----- 永田 恭介 (筑波大学医学医療系)	3
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 ----- 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)	9
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 -- 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)	13
高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 に対するワクチン株のタンパク質収量等の検討 --- 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)	17
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	21
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	27

# I. 統括・分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
平成24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。昨年度までの解析より、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によって、ウイルスゲノム複製と協調して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。本年度では、UAP56とNPの詳細な相互作用部位を明らかにした。また、ウイルスRNP複合体の細胞内動態を決定する宿主因子として、YB-1を同定し、その分子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 RNP 複合体の RNA 合成活性制御およびウイルス RNP 複合体の細胞内動態に関わる宿主因子を同定し、その機能制御機構と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。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。精製微小管は、ブタ脳抽出液からサイクリング法により調製した。

### (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) ウイルス RNA の Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法による検出

Biotin-16-UTP と他の NTP 存在下で T7 ポリメラーゼによりウイルスゲノムの相補鎖を合成した。合成した RNA は、アルカリ加水分解により、適切な鎖長に切断後、プローブとして用いた。感染細胞は、4% パラホルムアルデヒドで固定後、Proteinase K により賦活化処理し、エタノールにより脱水したものをを用いた。ウイルスゲノムと 2 重鎖を形成したプローブは、2xSSC による洗浄後、Avidine-FITC を用いて検出した。

### (5) 組換えウイルスの作出

インフルエンザウイルスの各ウイルスゲノムを組み込んだ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、組換えウイルスを作出した。点変異株を作出する際は、ウイルスゲノム発現ベクターに変異を導入して、同様に細胞に導入することで、組換えウイルスを作出した。

#### (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) インフルエンザウイルスゲノム結合タンパク質 NP と宿主因子 RAF-2p48/UAP56 の相互作用機構の解析

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要な宿主因子である 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。平成 23 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る 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。そこで、平成 24 年度では、UAP56 と NP の複合体形成機構を解析した。まず、NP および UAP56 の各種欠損変異体を作製し、結合領域を決定したところ、NP の N 末端から 20 アミノ酸の領域が UAP56 の C 末端部分と結合することが明らかになった。一方、細胞内での UAP56 の標的因子として U2AF<sup>65</sup> が報告されており、U2AF<sup>65</sup> の

UAP56 との結合領域も明らかにされている。そこで、NP と U2AF<sup>65</sup> の UAP56 結合部位の 2 次構造およびヘリカルホイールを予測して比較したところ、共通して、同じ表面上に疎水性アミノ酸残基が露出していることが明らかになった。さらに、それらの疎水性アミノ酸残基の点変異株を作出したところ、どの変異株でも顕著に UAP56 との結合が低下し、ウイルス増殖能が低下した。

#### (2) 子孫ウイルス RNP 複合体の細胞内動態の解析

感染細胞核内で複製されたウイルス RNP 複合体は、核外輸送後、細胞膜まで輸送されてウイルス粒子として出芽する。しかし、ウイルス RNP 複合体の細胞内動態を制御する機能分子はほとんど明らかにされていない。そこで、感染細胞より、ウイルス RNP 複合体を精製し、LC-MS 解析を行ったところ、Y-box binding protein-1 (YB-1) を新規ウイルス RNP 結合宿主タンパク質として同定した。YB-1 は、DNA/RNA 結合タンパク質であり、転写因子として機能すること、および細胞質にて mRNA の翻訳制御と安定性に関与することが報告されている因子である。

感染に応答して、YB-1 は核内ドメインの 1 つである、PML ボディでウイルス RNP 複合体と共局在し、感染後期に移行すると複製されたウイルス RNP 複合体と共に核外輸送され、細胞質で微小管合成中心 (Microtubule organizing center; MTOC) に集積することが明らかになった。YB-1 ノックダウン細胞では、ウイルス RNP 複合体は MTOC に集積できず、細胞質全体に拡散した局在を示すこと、ならびに、微小管を介したリサイクリングエンドソームとの結合も観察されなくなることを明らかにした。

## D. 考察

(1) インフルエンザウイルスゲノム結合タンパク質 NP と宿主因子 RAF-2p48/UAP56 の相互作用機構の解析

NP の結晶構造は、既に 2006 年に決定されている。しかし、本研究で明らかにした UAP56 との結合ドメインは、Unfolding な領域であり、NP 単独では特定の構造を形成できない。よって、UAP56 と結合することで、誘導適合し、初めて安定した構造をとることが推測され、抗ウイルス薬の標的部位として非常に良い候補であると考えられる。現在、NP-UAP56 複合体の構造解析の準備中である。

#### (2) 子孫ウイルス RNP 複合体の細胞内動態の解析

子孫ウイルス RNP 複合体の細胞内動態を制御する新規宿主因子として、YB-1 を同定した。YB-1 は、配列非特異的な RNA 結合活性をもつ。しかし、ドメイン解析の結果、RNA 結合活性をもたない YB-1 部分欠損体でも、ウイルス RNP 複合体と結合でき、YB-1 は、タンパク質—タンパク質間の結合を介して、特異的にウイルス RNP 複合体にリクルートされていることが示唆される。現在、上市されている抗インフルエンザウイルス薬である、アマンタジンはウイルス粒子の細胞への侵入、およびオセルタミビルはウイルスの出芽を阻害する。YB-1 とウイルス RNP 複合体との結合部位を標的とすることで、子孫ウイルス RNP 複合体の細胞内輸送および子孫ウイルス粒子への取り込みを阻害できると考えられ、非常に新規性の高い抗ウイルス薬を創出できる可能性がある。

## 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 が分子シャペロンとして機能することで NP が子孫ウイルスゲノムへとリクルートされる。UAP56 は、NP の N 末端から 1-20 アミノ酸を認識して結合することが明らかになり、抗ウイルス薬の標的候補部位として、非常に最適な領域であることが推測される。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化合物を同定することができると考えられる。

また、子孫ウイルス RNP 複合体の細胞内動態を決定する宿主因子として、YB-1 を同定した。YB-1 は、ウイルス RNP 複合体と特異的に結合するため、この結合を阻害することで、これまでにないウイルスの増殖過程を阻害する抗ウイルス薬を同定できると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Haruyama T, Nagata K. Anti-influenza virus activity of Ginkgo biloba leaf extracts. *J. Nat. Med.*, 2012; *in press*
- 2) Onomoto K, Jogi M, Yoo JS, Narita R, Morimoto S, Takemura A, Sambhara S, Kawaguchi A, Osari S, Nagata K, Matsumiya T, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T. Critical role of antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS one*, 2012; 7(8): e43031.
- 3) Kawamura M, Kusano A, Furuya A, Hanai N, Tanigaki H, Tomita A, Horiguchi A, Nagata K, Itazawa T, Adachi Y, Okabe Y, Miyawaki T, Kohno H. New sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay for human MxA protein in a whole blood using monoclonal antibodies against GTP-binding domain for recognition of viral infection. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2012; 26(3): 174-183.
- 4) Kawaguchi A, Matsumoto K, Nagata K. YB-1 functions as a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules. *J. Virol.*, 2012; 86(20): 11086-11095.
- 5) Komatsu T, Nagata K. Replication-uncoupled histone deposition during adenovirus DNA replication. *J. Virol.*, 2012; 86(12): 6701-6711.
- 6) Kato SI, Nagata K, Takeuchi K. Cell tropism and pathogenesis of measles virus in monkeys. *Front. Microbiol.*, 2012; 3: 14.
- 7) Okuwaki M, Sumi A, Hisaoka M, Saotome-Nakamura A, Akashi S, Nishimura Y, Nagata K. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplasmin/nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2 and NPM3 during sperm chromatin remodeling. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40(11): 4861-4878.
- 8) Samad MA, Komatsu T, Okuwaki M, Nagata K. B23/nucleophosmin is involved in regulation of adenovirus chromatin structure at late infection stages, but not in virus replication and transcription. *J. Gen. Virol.*, 2012; 93(6): 1328-1338.
- 9) Czene A, Nemeth E, Zoka IG, Jakab-Simon N, Kortvelyesi T, Nagata K, Christensen HEM,



Gyurcsik B. The role of the N-terminal loop in the function of the colicin E7 nuclease domain. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2013; 18(3): 309-321.

## 2. 学会発表

- 1) Nagata K. Histone Chaperones in Chromatin Organization and Regulation. The 12<sup>th</sup> Asian Conference on Transcription. Korea:2012.6.6-9
- 2) Murano K. The Species-specific Transcription Mechanism of rRNA Gene Revealed by a Novel Monitoring System Using RNA-dependent RNA Polymerase. The 12<sup>th</sup> Asian Conference on Transcription. Korea:2012.6.6-9
- 3) Kadota S. pp32, an INHAT Component, is a Transcription Machinery Recruiter for the Maximal Induction of IFN Stimulated Genes. The 12<sup>th</sup> Asian Conference on Transcription. Korea:2012.6.6-9
- 4) 大城幸雄、安江 博、服部眞次、坂井 薫、長利 卓、竹内 薫、永田恭介、大河内信弘. ヒト初代培養肝細胞におけるブタ由来 E 型肝炎ウイルスの感染様式の検討. 第 48 回肝臓学会. 金沢 : 2012.6.7-8
- 5) 水口萌子、川口敦史、永田恭介. プロモーターを介したインフルエンザポリメラーゼの RNA 合成活性制御機構. 平成 24 年度日本生化学会関東支部例会. 群馬 : 2012.6.23
- 6) 永田恭介. ウイルス研究が育んだ現代生命科学. 第 9 回ウイルス学キャンプ in 湯河原. 熱海 : 2012.7.10-11
- 7) 川口敦史. インフルエンザウイルスゲノムの細胞内輸送機構の解析. 第 9 回ウイルス学キャンプ in 湯河原. 熱海 : 2012.7.10-11
- 8) Kawaguchi A, Nagata K. YB-1 is a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules. The 3rd Leading Graduate Schools International Conference (Tsukuba Global Science Week). Tsukuba:2012.11.1-2
- 9) Gyurcsik B, Czene A, Nemeth E, Zoka I.G, Endreffy E, Christensen H.E.M. Nagata K. Design of a novel artificial metallonuclease for targeting the breakpoint in Duchenne Muscular Dystrophy. The 3rd Leading Graduate Schools International Conference (Tsukuba Global Science Week). Tsukuba:2012.11.1-2
- 10) Murano K, Okuwaki M. Nagata K. The Species-specific transcription mechanism of rRNA gene revealed by a novel monitoring system-using RNA-dependent RNA polymerase. The 7th Tsukuba Medical Science Research Meeting (Tsukuba Global Science Week). Tsukuba:2012.11.1-2
- 11) Binh N.T, Wakai C, Nagata K. The promoter binding sites in the influenza virus polymerase PB1. The 7th Tsukuba Medical Science Research Meeting (Tsukuba Global Science Week). Tsukuba:2012.11.1-2
- 12) Sugiyama K, Nagata K. Function of IREF-2, a newly identified for replication of the influenza virus RNA genome. The 7th Tsukuba Medical Science Research Meeting (Tsukuba Global Science Week). Tsukuba:2012.11.1-2
- 13) Osari S, Kawaguchi A, Nagata K. A novel function of NS1 viral protein in intracellular of the influenza virus genome. The 7th Tsukuba Medical Science Research Meeting (Tsukuba Global Science Week). Tsukuba:2012.11.1-2
- 14) 木村英樹、竹内薫、永田恭介. ヒト化マウスを用いた麻疹ウイルス感染モデルマウスの作製. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪 :

- 2012.11.13-15
- 15) 若井ちとせ、水本清久、永田恭介. インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの伸長活性に及ぼすキャップ構造の意義. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪: 2012.11.13-15
- 16) 熊倉充子、永田恭介. 細胞骨格関連因子によるインフルエンザウイルス増殖制御. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪: 2012.11.13-15
- 17) 川口敦史、松本健、永田恭介. 新規宿主因子 YB-1 によるインフルエンザウイルスゲノムの細胞内輸送制御. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪: 2012.11.13-15
- 18) 永田恭介、朴三用. 薬剤耐性ウイルスが出現しない抗インフルエンザウイルス薬開発に向けた宿主因子依存性ウイルス RNA ゲノムの複製転写機構. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡: 2012.12.11-14
- 19) 村野健作、奥脇暢、永田恭介. RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを用いた新規レポーターシステムによる rRNA 遺伝子の種特異的転写機構の解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡: 2012.12.11-14
- 20) 齋藤祥子、Sadik Cigdem、永田恭介. 細胞がん化に関わる核膜孔タンパク質の発現異常. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡: 2012.12.11-14
- 21) 川口敦史、松本健、永田恭介. 新規宿主因子 YB-1 によるインフルエンザウイルス RNP 複合体の微小管への輸送機構解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡: 2012.12.11-14
- 22) 加藤広介、永田恭介. VprBP, a Substrate Receptor Subunit of Cullin4-DDB1 E3 Ubiquitin Ligase Complex, is Involved Ubiquitination of Histone H1. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡: 2012.12.11-14
- 23) 浅賀正充、川口敦史、永田恭介. EZH2 はインフルエンザゲノムの核外輸送を制御する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡: 2012.12.11-14
- 24) Moriwaki Yoshihito, Mitsuru Okuwaki, Kyosuke Nagata, Yasuto Todokoro, Masahiko Sato, Aritaka Nagadoi, Yoshifumi Nishimura. Interaction between H2A/H2B heterodimer and the acidic domain of histone chaperone hNap1. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡: 2012.12.11-14
- 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24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、昨年度までに、発育鶏卵よりウイルスポリメラーゼを調製することで、活性を維持したウイルスポリメラーゼを精製することに成功した。しかし、超高解像度電子顕微鏡を用いた解析より、微量のNPが混入していることが明らかになり、さらに高純度のウイルスポリメラーゼを精製する必要がある。そこで、NPがウイルスポリメラーゼから解離しやすい、組換えウイルス株を作出した。また、昨年度、研究代表者の永田グループの解析より、詳細な作用機構が明らかになったUAP56とNPの相互作用部位に関しても、複合体精製と構造解析を展開中である。

## 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)およびその機能実体であるウイルスRNP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株および季節性インフルエンザウイルス(H1N1)のPanama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

RAF-2p48/UAP56およびNPタンパク質は、大腸菌発現系を用いて調製した。リコンビナントタンパク質には、HisタグおよびGSTタグが付加されており、Ni-NTAレジンおよびGlutathioneセファロースをそれぞれ用いて精製した。

### (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。

#### (4) 組換えウイルスの作出

インフルエンザウイルスの各ウイルスゲノムを組み込んだ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、組換えウイルスを作出した。点変異株を作出する際は、ウイルスゲノム発現ベクターに変異を導入して、同様に細胞に導入することで、組換えウイルスを作出した。

##### (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) 平成 23 年度に精製したウイルス RNA ポリメラーゼ複合体を用いた構造解析

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、平成 23 年度では、組換えバキュロウイルス発現系を構築した。しかし、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。そこで、発育鶏卵から PR8 株のウイルス粒子を大量に調製後、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を精製した。平成 24 年度では、このサンプルを用いて超高解像度電子顕微鏡による構造解析を行った（大阪大学、岩崎准教授との共同研究）。しかし、ごく少量の NP がウイルスポリメラーゼに結合したままであり、構造決定に十分なデータが得られなかった。

#### (2) ウイルスポリメラーゼ複合体からの NP の除去法の確立

(1) の結果を得て、ウイルスポリメラーゼ複合体から、さらに NP を除去する条件検討を行った。しかし、PR8 株の NP は、1 M NaCl 存在下でもウイルスポリメラーゼ複合体から解離せず、NP を除去することができなかった。そこで、分担研究者である信澤の協力を得て、複数のウイルス株でウイルスポリメラーゼと NP の相互作用を検討した。その結果、Panama 株の NP はウイルスポリメラーゼに結合しにくいことを見出した。そこで、Panama 株の NP 遺伝子を PR8 株に導入した組換えウイルスを作製した。組換えウイルスは、野生型の PR8 株と同等な増殖効率であったため、これまでと同様に発育鶏卵から精製ウイルスを調製後、ウイルスポリメラーゼ複合体を精製したところ、NP の混入がほとんど無い、さらに高純度のウイルスポリメラーゼ複合体を調製することができた。ちなみに、このウイルスポリメラーゼ複合体の RNA 合成活性を試験管内で測定したところ、精製前と同様に、非常に高い活性を保持していた。

#### (3) RAF-2p48/UAP56 と NP の相互作用面の構造解析

研究代表者である永田らの生化学的解析より、UAP56 は NP の N 末端から約 20 アミノ酸を認識して結合することが示唆された。UAP56 との結合に必須な NP の N 末端領域は、NP 単独では特定の構造を形成せず、変性状態である。よって、UAP56 と結合することで、誘導適合により機能的な構造を形成すると推測された。そこで、NP と UAP56 の複合体を精製し、構造解析を行うこととした。しかし、全長の NP では、NP が多量体化するため、均一な UAP56

と NP の複合体を調製することができなかつた。そこで、NP の多量体化ドメインの点変異体、もしくは部分欠損体を作製し、相互作用面の構造解析を検討している最中である。

#### D. 考察

本研究成果より、NP とウイルスポリメラーゼの結合には、ウイルス株特異性があることが示唆された。しかし、NP とウイルスポリメラーゼの結合は、*in vitro* ではウイルスの増殖には影響せず、その意義は明らかではない。一部の高病原性株では、NP がウイルスポリメラーゼに強く結合することが報告されている。PR8 株と Panama 株の NP を比較することで、ウイルスポリメラーゼとの結合に関与するアミノ酸を決定し、病原性との相関を検討し、その構造基盤を理解するのも重要であると考えられる。

また、NP の UAP56 結合ドメインは Unfolding な状態であり、UAP56 と結合することで一定の構造を形成すると推測される。NP と UAP56 の複合体構造を明らかにすることで、(1) 変性領域を介して、どのようにターゲット分子が認識されるのか、(2) 変性領域がどのように立体構造を形成するのか、など、構造生物学的にも重要な知見が得られると考えられる。

#### E. 結論

平成23年度に構築したウイルスポリメラーゼ精製法では、構造解析には不十分であった。しかし、Panama 株由来の NP 遺伝子を用いることで、容易に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、このウイルスポリメラーゼ複合体を用いて、構造解析に挑む。また、NP と UAP56 の相互作用面の構造解析も展開中である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nishiyama T, Noguchi H, Yoshida H, Park SY, Tame JR. The structure of the deacetylase domain of Escherichia coli PgaB, an enzyme required for biofilm formation: a circularly permuted member of the carbohydrate esterase 4 family. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 2013; 69(1): 44-51.
- 2) Noguchi H, Campbell KL, Ho C, Unzai S, Park SY, Tame JR. Structure of haemoglobin from woolly mammoth in liganded and unliganded states. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 2012; 68(11): 1441-1449.
- 3) Yoshida H, Kawai F, Obayashi E, Akashi S, Roper DI, Tame JR, Park SY. Crystal structures of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the apo and cefotaxime-bound forms. *J. Mol. Biol.*, 2012; 423(3): 351-364.
- 4) Hansman GS, Taylor DW, McLellan JS, Smith TJ, Georgiev I, Tame JR, Park SY, Yamazaki M, Gondaira F, Miki M, Katayama K, Murata K, Kwong PD. Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J. Virol.*, 2012; 86(7): 3635-3646.

##### 2. 学会発表

- 1) 朴 三用、吉田 尚史、杉山 佳奈子  
Structural studies of Influenza RNA-polymerase for novel drug design.  
第12回 日本蛋白質科学会年会、名古屋大学、2012年6月20日-6月22日 (招待講演)

**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24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。

#### (5) 組換えウイルスの作出

インフルエンザウイルスの各ウイルスゲノムを組込んだ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、組換えウイルスを作出した。点変異株を作出する際

は、ウイルスゲノム発現ベクターに変異を導入して、同様に細胞に導入することで、組換えウイルスを作出した。

(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

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を決定することに成功している (永田と朴の共同研究)。そこで、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。

これまでの *in silico* 解析とプラークアッセイの結果より、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 が得られている。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ていた。そこで、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



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。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) 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。その結果、数 $\mu$ M で抗ウイルス活性を示し、100  $\mu$ M でも細胞毒性が観察されない 2 種類の化合物 (SH-4、SH-28) を同定することに成功した。また、ドッキング計算より、この 2 種類の化合物は、共通して、PA の Cys415 番、Ile621 番、Glu623 番、Trp706 番などに結合していると推測された。そこで、SH-4 および SH-28 と結合すると予測される PA の各相互作用部位とその周辺のアミノ酸部位の点変異ウイルス株を作出し、ウイルスの増殖効率を検討したところ、Trp706 番の変異株ではウイルスの増殖が顕著に低下した。

#### D. 考察

昨年度では、*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、Molecular dynamics シミュレーションによる相互作用占有率の予測と、ドッキングシミュレーションの精度を向上することができた。今年度は、昨年度に得られた化合物をもとに、スキップフォールドホッピング法を構築することで、化合

物の物性 (細胞毒性やウイルス阻害効果) を改善する方策を構築できた。また、得られた化合物が相互作用するアミノ酸部位を予測し、そこに変異を導入することで、ウイルス産生量が顕著に低下したことから、ケミカルバイオロジーとしての Molecular dynamics シミュレーションの有用性も示すことができた。

#### E. 結論

本年度、独自に構築したスキップフォールドホッピング法により、非常に高い効率でウイルス阻害活性を維持しながら、母核の改変を行うことができ、その結果、細胞毒性を低下させることに成功した。今後は、SH-4 および SH-28 をもとに、さらに誘導体展開を行う。

また、これまでのスクリーニングでは、PB1 を模倣した化合物を探索してきた。さらに今後は、ペプチドミミックでなくとも、PA の結晶構造上、化合物の標的となりやすい立体構造を探索する方法論を構築し、実際にスクリーニングを展開する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Murakami K, Ichinohe Y, Koike M, Sasaoka N, Iemura S, Natsume T, Kakizuka A. VCP is an integral component of a novel feedback mechanism that controls intracellular localization of catalase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels. *PLoS ONE*, 2013; 8(2): e56012.
- 2) Sekine Y, Hatanaka R, Watanabe T, Sono N, Iemura SI, Natsume T, Kuranaga E, Miura M, Takeda K, Ichijo H. The kelch repeat protein

- KLHDC10 regulates oxidative stress-induced ASK1 activation by suppressing PP5. *Mol. Cell*, 2012; 48(5): 692-704.
- 3) Okatsu K, Iemura S, Koyano F, Go E, Kimura M, Natsume T, Tanaka K, Matsuda N. Mitochondrial hexokinase HKI is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 428(1): 197-202.
  - 4) Fujimoto M, Takaki E, Takii R, Tan K, Prakasam R, Hayashida N, Iemura S, Natsume T, Nakai A. RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Mol. Cell*, 2012; 48(2): 182-194.
  - 5) Ishfaq M, Maeta K, Maeda S, Natsume T, Ito A, Yoshida M. Acetylation regulates subcellular localization of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *FEBS Lett.*, 2012; 586(19): 3236-3241.
  - 6) Yoshihara H, Fukushima T, Hakuno F, Saeki Y, Tanaka K, Ito A, Yoshida A, Iemura S, Natsume T, Asano T, Chida K, Girnita L, Takahashi S. Insulin/insulin-like growth factor (IGF) stimulation abrogates an association between a deubiquitinating enzyme USP7 and insulin receptor substrates (IRSs) followed by proteasomal degradation of IRSs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 423(1): 122-127.
  - 7) Matsushita K, Kajiwara T, Tamura M, Satoh M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Yoshimoto R, Ito A, Kubo S, Natsume T, Levens D, Yoshida M, Nomura F. SAP155-mediated splicing of FUSE-binding protein-interacting repressor serves as a molecular switch for c-myc gene expression. *Mol. Cancer Res.*, 2012; 10(6): 787-799.
  - 8) Kobayashi H, Harada H, Nakamura M, Futamura Y, Ito A, Yoshida M, Iemura S, Shin-ya K, Doi T, Takahashi T, Natsume T, Imoto M, Sakakibara Y. Comprehensive predictions of target proteins based on protein-chemical interaction using virtual screening and experimental verifications. *BMC Chem. Biol.*, 2012; 12(1): 2.
  - 9) Ideue T, Adachi S, Naganuma T, Tanigawa A, Natsume T, Hirose T. U7 small nuclear ribonucleoprotein represses histone gene transcription in cell cycle-arrested cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012; 109(15): 5693-5698.
  - 10) Abe J, Nagai Y, Higashikuni R, Iida K, Hirokawa T, Nagai H, Kominato K, Tsuchida T, Hirata M, Inada M, Miyaura C, Nagasawa K. Synthesis of vitamin D3 derivatives with nitrogen-linked substituents at A-ring C-2 and evaluation of their vitamin D receptor-mediated transcriptional activity. *Org. Biomol. Chem.*, 2012; 10(38): 7826-7839.
2. 学会発表
- 1) 夏目徹, Purmacoproteomics: Target ID and Target Discovery , ChemBioChem Symposium , 2012/10/31, 京都センチュリーホテル (京都)
  - 2) 夏目徹, Purmacoproteomics: Target ID and Target Discovery , ChemBioChem Symposium , 2012/10/31, 京都センチュリーホテル (京都)
- 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24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

白倉雅之 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

東南アジア、アフリカを中心に、高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)ウイルス(H5N1)のヒトへの感染は依然続いている。HPAI ウイルスに対するワクチン株は、各クレード用に作製されているが、ワクチン製造用種株として用いる際は、その蛋白収量やHA収量が高いことが望ましい。しかし、既存のワクチン株の蛋白収量やHA収量の比較は、行なわれていない。本研究では、既存の14株のワクチン株と当室で作製した新たなワクチン株のタンパク収量とHA含量を同一条件下で検討し、各株の種株としての適性を検討した。その結果、既存のワクチン株中には、HA収量が、著しく低い株が存在するが、培養時間、使用する鶏卵の日齢を検討することで、収量の改善が見られた。今後、ワクチン株選定の際には、このような収量も考慮することが必要と考えられる。

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製造種株候補は、必要に応じて随時準備はされているものの、候補ウイルスのワクチン製造への適正を同一手法で比較した報告はない。これまでに、鶏卵での増殖性、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、既存のワクチン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ワクチン株および新たに当室で作製したクレード2.1.3.2のワクチン株の増殖性、総タン

パク質収量、HA収量を比較し、その適正を検討し、収量の低い株に関しては、その改善策を検討した。

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用株(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日あるいは11日卵)にウイルス接種後、48時間あるいは72

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、7.1 に属するワクチン株の大半が低いタンパク質収量 (10~15  $\mu\text{g/ml}$  漿尿液) を示した。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。上記以外の株は、タンパク収量 (15~20  $\mu\text{g/ml}$  漿尿液) を示し、収量としては十分であった。

#### (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量に占める割合を、

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  $\mu\text{g/ml}$  漿尿液) 前後と低く、改善の必要があった。これ以外の株は、HA 収量が 5~10  $\text{mg/ml}$  漿尿液であった。

#### (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  $\mu\text{g/ml}$  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。

一方、HA 価で示されるウイルスの増殖性とタンパク質収量、HA 収量との間に相関関係は無かった。

### 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