

201318013A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 永田 恭介

平成 26 (2014) 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-----	3
	永田 恭介 (筑波大学)	
	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創薬分子プロファイリング研究センター)	
	ウイルス複製時における変異導入を抑えたインフルエンザワクチン株の開発-----	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-----	19
III.	研究成果の刊行物・別刷-----	25

## I. 統括・分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
平成25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

学長

### 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。

ウイルスポリメラーゼはPB1、PB2、PAの3者複合体である。そのうち、PB1はRNA合成の活性中心として機能する。しかし、RNA合成の基質なるヌクレオチドの認識機構は不明である。本年度では、ヌクレオチドアナログであるリバビリンの耐性変異を単離することで、PB1のプリン塩基の認識に関与するアミノ酸部位を明らかにした。また、昨年度にウイルスRNP複合体の細胞内動態を決定する宿主因子として同定したYB-1が、感染細胞特異的に中心体へ集積し、中心体の核となる中心小体の周囲にプロペラ様に局在することを見出した。

#### 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) PB1 変異体の調製

A/PR/8/34 株の PB1 遺伝子に  $MnCl_2$  を用いた PCR によって変異を導入した。モデルレプリコンを用いたウイルスポリメラーゼ活性を指標に、リバビリンに耐性を示すクローンを単離した。

### (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) リバビリンを用いたウイルスポリメラーゼの遺伝学的解析

リバビリンは GTP のヌクレオチドアナログであり、細胞内では (1) プリンの *de novo* 合成系を阻害、(2) ウイルスポリメラーゼに取り込まれて伸長阻害、(3) ウイルスゲノムの新規合成鎖に取り込まれて変異を誘導することで、ウイルスの増殖を阻害すると考えられている。そこで、我々はウイルスポリメラーゼの機能ドメインを明らかにするため、リバビリンに耐性を示すウイルスポリメラーゼの活性中心サブユニットである PB1 の変異体の単離を試みた。その結果、PA サブユニットとの結合ドメイン (1~14 a.a.) に近接した Asp27 の Asn への点変異が耐性変異として同定された。また、Asp27 は A 型インフルエンザウイルスで特異的に保存されている部位であった。プリン合成を阻害するメソトレキサートを用いて、細胞内のプリンヌクレオチド量を低下させた場合でも、Asp27Asn 変異は耐性を示した。

### (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。一方、MTOC に集積した YB-1 の詳細な細胞内局在を超解像顕微鏡で観察したところ、YB-1 は中心体の構成因子として、中心小体の周囲でプロペラ様の局在を示すことも明らかにした。現在、中心体上での YB-1 の機能について解析中である。

#### D. 考察

(1) リバビリンを用いたウイルスポリメラーゼの遺伝学的解析

PB1 は活性中心として機能する重要なポリメラーゼサブユニットであるが、PA 結合ドメインと PB2 結合ドメインがそれぞれ部分結晶構造として決定されているのみである。その他、部分欠

損体を用いた解析より、プロモーター結合ドメインおよびヌクレオチド結合ドメインが報告されているが、詳細は不明である。今年度の解析より、GTP アナログのリバビリンに耐性を示す部位として Asp27 が同定され、プリン合成阻害剤のメソトレキサートにも耐性を示すことから、Asp27 はプリン塩基の認識に関与する部位であると推測される。

(2) 子孫ウイルス RNP 複合体の細胞内動態の解析

昨年度までの解析により、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 を同定している。感染特異的に MTOC へとリクルートされた YB-1 は、中心体の構成因子として特徴的な細胞内局在を示した。中心体は、9 本のシリンダー状の中心小体を核として、一部の構成因子はプロペラ様に局在し、微小管合成の足場となることが報告されている。よって、感染特異的に中心体へとリクルートされた YB-1 も微小管合成の足場として、中心体の機能制御に関与することが予測される。

#### E. 結論

PB1 はウイルスポリメラーゼの酵素活性中心であり、RNA 合成の基質となるヌクレオチドの認識に関与する部位を決定することは重要である。本研究から、プリン塩基の認識に関与する部位として Asp27 が同定された。ヌクレオチドアナログによるウイルス増殖阻害は、非常に有用な戦略であるが、細胞毒性が高い場合が多い。今後、さらにヌクレオチドの認識機構を解明することで、よりウイルスポリメラーゼに特異的な抗ウイルス薬の設計につながる可能性がある。

感染特異的に MTOC へとリクルートされた YB-1 は、中心体の構成因子として特徴的な細胞内局在を示したことから、YB-1 は中心体の機能制御に関与することが推測される。微小管および MTOC の時空間的なダイナミズムは細胞内物質輸送に必須であることから、YB-1 による中心体の活性制御メカニズムを明らかにすることで、ウイルスゲノムの細胞内動態を標的とした、非常に新規性が高い抗ウイルス薬を創出できる可能性がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K, Akimitsu N. Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli. *Mol. Cell.*, 2014; 53(3): 393-406.
- 2) Binh NT, Wakai C, Kawaguchi A, Nagata K. Involvement of the N-terminal portion of influenza virus RNA polymerase subunit PB1 in nucleotide recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014; 443(3): 975-979.
- 3) Binh NT, Wakai C, Kawaguchi A, Nagata K. The N-terminal region of influenza virus polymerase PB1 adjacent to the PA binding site is involved in replication but not transcription of the viral genome.

*Front. Microbiol.*, 2013; 4: 398.

- 4) Komatsu T, Sekiya T, Nagata K. DNA replication-dependent binding of CTCF plays a critical role in adenovirus genome functions. *Sci. Rep.*, 2013; 3: 2187.
- 5) Haruyama T, Nagata K. Anti-influenza virus activity of Ginkgo biloba leaf extracts. *J. Nat. Med.*, 2013; 67(3): 636-642.

### 2. 学会発表

- 1) Kawaguchi A. YB-1 is a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules for the virus production. The 2<sup>nd</sup> Meeting on RNA and Biofunctions-Asia Study "RNA Biofunctions and Viruses". Fukuoka : 2013.1.9-11
- 2) 原田芳美. 鳥インフルエンザウイルスのウイルスポリメラーゼによる哺乳類細胞への適応機構解析. 第10回ウイルス学キャンプ in 湯河原 熱海: 2013.5.30-31
- 3) 森幸太郎. インフルエンザウイルス cell-to-cell 感染による変異導入機構の解明. 第10回ウイルス学キャンプ in 湯河原 熱海: 2013.5.30-31
- 4) 原田芳美、川口敦史、永田恭介. ウイルスポリメラーゼによって規定されるトリインフルエンザウイルスの哺乳類細胞への適応機構. 平成25年度日本生化学会関東支部例会 甲府: 2013.6.15
- 5) 永田恭介. インフルエンザウイルスゲノムの機能発現機構と創薬展開. 第66回日本細菌学会九州支部総会・第50回日本ウイルス学会九州支部総会 長崎: 2013.9.6-7
- 6) 永田恭介. Host factor-dependent RNA replication of the influenza virus genome. The 12th Awaji International Forum on Infection and

- Immunity. 淡路: 2013.9.10-9.13
- 7) 森幸太郎、春山貴弘、永田恭介. Tamiflu resistant cell-to-cell transmission of cell associated influenza virus. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 淡路: 2013.9.10-9.13
- 8) Asaka MN, Kawaguchi A, Nagata K. EZH2, component of polycomb complex, regulates nuclear export of the influenza virus M1 and the viral genome. Leading Graduate Schools International Conference (Tsukuba Global Science Week) Tsukuba: 2013.10.2-10.4
- 9) Kenza Snoussi, Kawaguchi A, Kato K, Harald Wodrich, Nagata K, Michael Kann. *In cellulo* analysis of parvovirus-mediated changes of nuclear envelope integrity by real time microscopy. Leading Graduate Schools International Conference (Tsukuba Global Science Week) Tsukuba: 2013.10.2-10.4
- 10) 原田芳美、川口敦史、永田恭介. インフルエンザポリメラーゼ遺伝子間の適合性. 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸: 2013.11.10-11.12
- 11) 長利卓、川口敦史、永田恭介. インフルエンザウイルスゲノムの細胞内輸送機構における NS1 の新規機能. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸: 2013.11.10-11.12
- 12) 熊倉充子、永田恭介. インフルエンザウイルス増殖にかかわる細胞骨格関連因子. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸: 2013.11.10-11.12
- 13) 森幸太郎、春山貴弘、永田恭介. インフルエンザウイルスにおける NA 非依存的 cell-to-cell 感染機構. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸: 2013.11.10-11.12
- 14) 川口敦史、永田恭介. インフルエンザウイルス感染に応答した宿主因子 YB-1 による中心体の機能制御. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸: 2013.11.10-11.12
- 15) 大倉喬、国保健浩、小西美佐子、亀山健一郎、竹内薫. 牛感染症に対する新規ワクチンベクターとしての組換え牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス作製の試み. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸: 2013.11.10-11.12
- 16) 永田恭介. インフルエンザウイルスゲノムの複製機構に基盤をおいた創薬. 第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー 東京: 2013.12.9
- 17) 浅賀正充、川口敦史、永田恭介. ポリコム複合体因子である EZH2 はインフルエンザウイルスタンパク質 M1 およびインフルエンザウイルスゲノムの核外輸送を制御する. 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸: 2013.12.3-12.6
- 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25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し、高純度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。本年度では、昨年までのアッセイ法を基盤にスケールアップを試み、大量精製法を構築することに成功した。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、およびUAP56と結合部位が重複するインポーチンと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もしくはDE52を用いて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、インポーチンおよび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レジンはおよび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) RNA ポリメラーゼ複合体の構造解析

平成 24 年度までの解析より、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、精製ウイルス粒子からのウイルスポリメラーゼの精製法の構築を行った。本年度では、大量にウイルスポリメラーゼを精製するために、約 500 ml の精製ウイルス粒子 (約 50 mg のウイルスポリメラーゼに相当) を調製し、ウイルスポリメラーゼ精製法のスケールアップを試みた。その結果、グリセロール密度勾配遠心法の代わりに、イオン交換体である DE52 を用いて簡便にウイルス RNP 複合体を精製できることが明らかになり、回収率を向上することができた。また、DE52 を用いた場合でも、十分な RNA 合成活性を観察することができた。

#### (2) NP と相互作用する宿主因子との

#### 相互作用機構の解析

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。一方、NP の N 末端はインポーチンとも結合することが報告されている。よって、タンパク質合成後、NP はインポーチンと結合し、核移行後、インポーチンは RanGTP により NP から解離し、NP は UAP56 と結合することが予測される。現在、UAP56 と NP、およびインポーチンと NP の複合体を調製し、構造解析を進めているところである。

### D. 考察

UAP56 をノックダウンした細胞では、インフルエンザウイルスのゲノム複製は約 10% 程度まで抑制されることから、抗ウイルス薬設計の標的分子として、NP と UAP56 との相互作用面を想定して、構造解析を進めてきた。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。また、UAP56 と同じドメインを認識するインポーチンとの複合体構造も共に進めることで、さらなる知見が得られると考えている。

## E. 結論

平成24年度に構築したウイルスポリメラーゼ精製法では、活性は充分であるものの、収量に限界があった。しかし、回収率を低下させる要因であるグリセロール密度勾配遠心法の代わりとして、イオン交換体である DE52 を用いることによって、一度に大量のウイルスRNP複合体を精製できるようになった。また、NPとUAP56、NPとインポーチン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

- 6) Cho KJ, Lee JH, Hong KW, Kim SH, Park Y, Lee JY, Kang S, Kim S, Yang JH, Kim EK, Seok JH, Unzai S, Park SY, Saelens X, Kim CJ, Lee JY, Kang C, Oh HB, Chung MS, Kim KH. Insight into structural diversity of influenza virus hemagglutinin. *J Gen Virol.*, 2013; 94(Pt 8): 1712-22.
- 7) Kikuchi J, Shibayama N, Yamada S, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, Sugiyama K, Ohki M, Park SY, Furukawa Y. Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding. *PLoS ONE*, 2013; 8(4): e60649.
- 8) Rahman MM, Nakanishi N, Sakamoto Y, Hori H, Hase T, Park SY, Tsubaki M, Roles of conserved Arg(72) and Tyr(71) in the ascorbate-specific transmembrane electron transfer catalyzed by *Zea mays* cytochrome b561. *J. Biosci. Bioeng.*, 2013; 115(5):

497-506.

### 2. 学会発表

- 1) Sam-Yong Park, “Structural Studies of the Influenza RNA-polymerase for Novel Drug Design” Meeting of the Italian, Spanish and Swiss crystallographic associations, MISSCA2014, September 9-12 2013, Como Italy. (招待講演)
- 2) 朴 三用: 「新規抗ウイルス薬の開発基盤となる RNA ポリメラーゼの構造解析」CBI学会2013年大会 -生命医薬情報学連合大会-、タワーホール船堀、2013年10月28-31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25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よい約 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) エネルギーに基づく化合物結合ポケット予測

研究方法 (1) と同様に、PB1-PA の結晶構造情報をもとに、Q-site finder 法によって、メチルプローブを用いたタンパク質表面との van der Waals 相互作用エネルギーを計算し、相互作用エネルギーの順位によってポケットランキングを行った。

#### (4) 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。

#### (5) 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* 解析とバイオ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、化合物 No.38 とは異なる骨格をもつ化合物を探索した (Scaffold hopping)。約 300 万件の化合物ライブラリーよりドッキング計算によって、40 種類の化合物を選定した。その結果、数  $\mu\text{M}$  で抗ウイルス活性を示し、100  $\mu\text{M}$  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ている。現在、これらの類縁体を検索し、その抗ウイルス活性を測定中である。

PB1-PA 結合ドメインの結晶構造データより、PA は非常に大きなドームを

形成し、そこに PB1 の N 末端が挿入される構造を形成することが明らかになっている。本年度では、PA のドームを空間的に充填することで、PB1 との結合を阻害するような化合物を *in silico* で探索できる方法を構築し、データベースから化合物をスクリーニングした。その結果、303 種類の化合物が選定され、その抗ウイルス活性を検討したところ、IC<sub>50</sub> 値が 1 μM 前後の非常に阻害活性が高い化合物を取得することに成功した。

#### D. 考察

昨年度までの研究より、*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選定した No.38 に抗ウイルス活性が観察された。No.38 をリガンドとした、類似化合物計算としてスキップフォールドを同定し、毒性が低減した SH-4、SH-28 を同定することができている。今年度、Q-site finder 法を用いて同定した抗ウイルス活性をもつ化合物は、非常に SH-4 と SH-28 に類似していた。異なるプログラムから得られた化合物群でも、同様な化合物がヒットしてきていることから、これまでの Molecular dynamics 計算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が非常に高いことが予測された。

#### E. 結論

本年度、Q-site finder 法によって新たに抗ウイルス活性をもつ化合物を同定することに成功した。スキップフォールドホッピング法により、これまで同定してきた化合物とともにさらに誘導体展開を行う。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Goto T, Sato A, Adachi S, Iemura S, Natsume T, Shibuya H. IQGAP1 protein regulates nuclear localization of  $\beta$ -Catenin via Importin- $\beta$ 5 protein in Wnt signaling. *J. Biol. Chem.*, 2013; 28: 36351-36360.
- 2) Hoshi T, Tezuka T, Yokoyama K, Iemura S, Natsume T, Yamanashi Y. Mesdc2 plays a key role in cell-surface expression of Lrp4 and postsynaptic specialization in myotubes. *FEBS Lett.*, 2013; 587: 3749-3754.
- 3) Araki K, Iemura S, Kamiya Y, Ron D, Kato K, Natsume T, Nagata K. Ero1- $\alpha$  and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases. *J. Cell Biol.*, 2013; 202: 861-874.
- 4) Kakihana T, Araki K, Stefano V, Iemura S, Cortini M, Fagioli C, Natsume T, Sitia R, Nagata K. Dynamic regulation of Ero1 $\alpha$  and Peroxiredoxin 4 localization in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 29586-29594.
- 5) Tsuchiya Y, Taniguchi H, Ito Y, Morita T, Karim RM, Ohtake N, Fukagai K, Ito T, Okamuro S, Iemura S, Natsume T, Nishida E, Kobayashi A. The casein kinase 2-Nrf1 axis controls the clearance of ubiquitinated proteins by regulating proteasome gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 2013; 33: 3461-3472.
- 6) Aoki K, Adachi S, Homoto M, Kusano H, Koike K, Natsume T. LARP1 specifically recognizes the 3' terminus of poly(A) mRNA. *FEBS Lett.*, 2013; 587: 2173-2178.
- 7) Ono Y, Iemura S, Novak SM, Doi N,

Kitamura F, Natsume T, Gregorio CC, Sorimachi H. PLEIAD/SIMC1/C5orf25, a novel autolysis regulator for a skeletal-muscle-specific calpain, CAPN3, scaffolds a CAPN3 substrate, CTBP1. *J. Mol. Biol.*, 2013; 425: 2955-2972.

- 8) Goto T, Sato A, Shimizu M, Adachi S, Satoh K, Iemura S, Natsume T, Shibuya H. IQGAP1 functions as a modulator of Dishevelled nuclear localization in Wnt signaling. *PLoS One*, 2013; 8: e60865.

2. 学会発表

- 1) 夏目徹: ドラッグ・リプロファイリングから展開するドラッグ・リポジ

- ショニング、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月6日、神戸  
2) 夏目徹: 定量プロテオミクスから展開する分子プロファイリング、日本薬学会第134年回特別講演、2014年3月28日、熊本

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25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

ウイルス複製時における変異導入を抑えたインフルエンザワクチン株の開発

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

内藤忠相 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

インフルエンザワクチン株の増殖過程において、HA や NA タンパク質にアミノ酸置換が起こり、抗原性が変異する場合がある。そのようなウイルスは、増殖性が優れていてもワクチン候補株から除外される。

ゲノムに変異が導入される原因は、ウイルスポリメラーゼの忠実性の低さに起因している。ウイルスゲノム複製は、ウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (PB1) により起こるが、複製サイクル中において約1万塩基に1つの割合で変異が導入される。変異導入率を低下させることができれば、ウイルスゲノムの遺伝的安定性が確保された状態でワクチンの作製および製造が行える。

#### A. 研究目的

インフルエンザウイルスのゲノム複製時において、忠実性が向上した改変型ポリメラーゼを単離し、変異率を低下させたワクチン株の開発を試みる。

ワクチン製造時には大量のウイルスを培養する必要がある。そこで、遺伝的安定性に優れたワクチン株を作製できれば、ウイルス増幅時の抗原性変異の可能性を考慮せずに済む。本研究が完成することで、季節性および新型インフルエンザウイルスに対するワクチン製造時に大いに貢献する。

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

ポリオウイルスでは高忠実性のRNAポリメラーゼの単離に成功している。さらに、そのポリメラーゼを利用して、

ウイルスゲノムに変異が入りにくいワクチン株の作製も報告されており、本テーマは実用可能な技術であることが証明されている。

ポリオウイルスのポリメラーゼモチーフ D 内の Lys359 残基を Arg または His に置換することにより、忠実度が5倍以上に向上する。このアミノ酸残基は、ウイルス RNA 合成時においてポリメラーゼに RNA 塩基が取り込まれる「入り口」に位置しており、RNA 間のホスホジエステル結合の形成に機能する。Arg または His へ置換することで、アミノ酸側鎖と RNA との相互作用に影響を及ぼし、ゲノム複製時に基質の選択性が向上したと推測される。

注目する Lys 残基は、ほとんどの RNA ウイルスで保存されている (インフルエンザウイルスではウイルスポリメラーゼ PB1 の 481 番目の Lys 残基)。



そこで、同様に変異ウイルスを作製し、インフルエンザウイルスにおいても忠実度が向上するか検討する。ポリメラーゼに導入したアミノ酸変異による構造の不適合化により、RNA 合成活性が低下する場合がある。その際は、*in silico* 解析により構造の最適化を行い、機能を補完する追加の変異を導入する。このようにして、増殖性を回復させた高忠実性ワクチン株の開発を行う

#### (1) PB1 変異体の作製とウイルス RNA 合成活性の検討

ウイルスは、現行の A 型インフルエンザワクチンの作製に使用される母体ウイルス A/PR8 株を用いる。ウイルスポリメラーゼの PB1 サブユニットの Lys (K) 481 残基を Arg (R)、および His (H) に置換した変異体を作製する。ポリメラーゼの活性測定には、培養細胞内におけるモデル RNA ゲノム発現系を利用する。

#### (2) PB1 改変型ウイルスのゲノム複製時における変異導入率の検討

インフルエンザウイルスの逆遺伝学法を用いて、PB1 の K481R および K481H 変異体をコードするウイルス株を作製する。それら変異株を用いて感染実験を行い、複製後のウイルスゲノムに挿入される変異塩基の割合を野生株ウイルスと比較する。

#### (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

ウイルスポリメラーゼ PB1 の K481R および K481H 変異体を発現するプラス

ミドを作製し、RNA 合成活性を野生型 PB1 と比較検討した。細胞内レポーター発現系において PB1-K481R および K481H 変異体を用いると、モデル RNA ゲノムの発現量が顕著に減少した。

逆遺伝学的手法を用いて PB1 にアミノ酸置換を施した組換えウイルスが作製できるか検討した。発育鶏卵内で種ウイルスを増幅後、ウイルス生成量を HA 試験およびプラークアッセイにより確認した。その結果、PB1-K481H ウイルスは作製できたが、PB1-K481R ウイルスを得ることはできなかった。

PB1-K481H ウイルスについては、ウイルスゲノムへの変異導入率を野生型 PR8 株と比較した結果、忠実性の向上は認められなかった。

### D. 考察

モデルレポーター系において PB1-K481R および K481H 変異体の RNA 合成活性を測定した結果、野生型 PB1 より活性の低下が認められた。また、Lys481 番目のアミノ酸を Arg および His 以外に置換した変異体も作製して検討を行ったが、いずれも検出感度以下であった。この結果から、ポリオウイルスと同様にインフルエンザウイルスにおいても、ポリメラーゼモチーフ D 内の高度に保存された Lys 残基は、ほとんど他のアミノ酸への置換を許容せず、塩基性アミノ酸である事が活性保持に必須であった。

一般的に忠実性の向上により、ポリメラーゼの合成活性・合成速度が低下すると考えられている。従って、本研究で作製した 2 つの変異体 PB1-K481R と K481H も高忠実性を獲得した構造へ変換した可能性はあるが、実際にウイルスを作製して変異率を測定すると改善はされていなかった。また、

PB1-K481H ウイルスの増殖性は低下しており、高忠実化への改変を考慮する前に、ポリメラーゼとして正常に機能する構造を保持できていない可能性がある。今後は、ウイルスの増殖能を回復させる新たなアミノ酸変異をポリメラーゼに導入し、高忠実性および高増殖性を兼ね備えた母体ウイルス株の開発へと発展させる。

#### E. 結論

研究目的である「高忠実性 RNA ポリメラーゼの単離・同定」を達成できなかったが、インフルエンザウイルスポリメラーゼの変異導入効率に関わるアミノ酸部位を見出すことができた（未発表）。今後は、本研究で得られた結果を基盤情報として、ポリメラーゼの高忠実化への改良を目指す。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N,

Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M.  
The Host Protease TMPRSS2 Plays a Major Role in In Vivo Replication of Emerging H7N9 and Seasonal Influenza Viruses. J. Virol., 2014; 88(10): 5608-16.

##### 2. 学会発表

- 1) 中村一哉、白倉雅之、武藤亜紀子、内藤忠相、藤崎誠一郎、田代真人、信澤枝里 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのワクチン製造候補株の開発 第61回日本ウイルス学会 神戸 2013年11月

#### 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

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K, Akimitsu N.	Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli.	Mol. Cell	53(3)	393-406	2014
Binh NT, Wakai C, Kawaguchi A, Nagata K.	Involvement of the N-terminal portion of influenza virus RNA polymerase subunit PB1 in nucleotide recognition.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	443(3)	975-979	2014
Binh NT, Wakai C, Kawaguchi A, Nagata K.	The N-terminal region of influenza virus polymerase PB1 adjacent to the PA binding site is involved in replication but not transcription of the viral genome.	Front. Microbiol.	4	398	2013
Komatsu T, Sekiya T, Nagata K.	DNA replication-dependent binding of CTCF plays a critical role in adenovirus genome functions.	Sci. Rep.	3	2187	2013
Haruyama T, Nagata K.	Anti-influenza virus activity of Ginkgo biloba leaf extracts.	J. Nat. Med.	67(3)	636-642.	2013