

201318013B

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 ～ 25 年度 総合研究報告書

研究代表者 永田 恭介

平成 26 (2014) 年 3 月

# 目 次

## I. 総合研究報告

インフルエンザウイルス複製に關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----- 1

永田 恭介 (筑波大学)

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)

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)

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 -----25

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----37

# I. 総合研究報告

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  
(総合) 研究報告書

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

研究代表者

永田恭介

筑波大学

学長

研究分担者

朴 三用

横浜市立大学

教授

夏目 徹

産業総合技術研究所

センター長

信澤 枝里

国立感染症研究所

室長

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。

ウイルスゲノム複製に必須な宿主因子として、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、複製されたウイルスゲノムの細胞内動態を決定する因子として、YB-1の同定にも成功した。

ウイルスポリメラーゼの分子機構解析を通じて、転写の開始反応に必須な宿主キャップ構造、およびRNA合成の基質となるヌクレオチドとウイルスポリメラーゼとの相互作用機構を明らかにした。また、さらに詳細な分子機構を明らかにするため、ウイルスポリメラーゼの構造解析をめざし、活性を保持したウイルスポリメラーゼの大量調製法の構築にも成功した。

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) 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。

### (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) 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 レジンおよび Glutathione セファロースをそれぞれ用いて精製した。

### (6) 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。

(7) 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。

(8) 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。

(9) 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。

(10) 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。

(11) 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

(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) 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。

### (4) 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、転写反応に必要な過程であるが、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<sup>7</sup>GpppG、m<sup>7</sup>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<sup>7</sup>GpppG および m<sup>7</sup>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。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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

組換えタンパク質の発現系では、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ため、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 複合体をマイクロコッ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、昆虫細胞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。また、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も明らかにし、大量調製も可能である。

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。そこで、NP を除去する条件検討を行ったが、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、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。

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

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った。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。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。

#### (9) *in silico* スクリーニング系の構築

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)。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。

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。

#### (10) スキャッフールドホッピング法の構築

バイオアッセイの結果より、No.38 は高い細胞毒性をもつことが指摘され

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、の順序で行った。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  $\mu\text{M}$  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。

(11) エネルギーに基づく結合ポケット予測

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、 $\text{IC}_{50}$  値が 1  $\mu\text{M}$  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

(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 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) 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。

### (4) 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、 $m^7$ GpppG、 $m^7$ GpppGm) を用いた生化学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  $m^7$ 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。

### (5) 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。

### (6) 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。

#### (7) 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

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、そのために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。

本研究結果より、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。

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

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。

また、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。

#### (9) *in silico* スクリーニング系の構築

*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。

#### (10) スキャッフールドホッピング法の構築

スキャッフ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。

#### (11) エネルギーに基づく結合ポケット予測

Q-site finder 法を用いて同定した抗ウ

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

### (1) NP によるウイルスゲノム複製と子孫ウイルス RNP 複合体の形成機構の解析

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。

### (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、これまでになく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。

### (3) PB2 ウイルスポリメラーゼのキャップ構造の認識機構

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となるアミノ酸部位も 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。

### (4) 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。

### (5) 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

昆虫細胞などを用いた組換えタンパク質発現系を用いた場合、ウイルスポリメラーゼの RNA 合成活性は観察されず、構造解析には不適であった。しかし、Panama 株由来の NP 遺伝子を用いて精製ウイルス RNP 複合体をウイルス粒子より調製することで、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。

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

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。

## (7) *in silico* スクリーニング系の構築

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。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) Tojino M, Mori M, Kasuya MC, Hatanaka K, Kawaguchi A, Nagata K, Shirai T, Mizuno M. Immobilization of fluorous

- 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) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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.
  - 13) Tsuchiya Y, Morita T, Kim M, Iemura S, Natsume T, Yamamoto M, Kobayashi A. Dual regulation of the transcriptional activity of Nrfl by b-TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, 2011; 31(22): 4500-4512.
  - 14) 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.
  - 15) 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.
  - 16) 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.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) 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.
- 20) 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.
  - 21) 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.
  - 22) 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.
  - 23) 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.
  - 24) 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.
  - 25) 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.
  - 26) 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.
  - 27) Fukuzawa K, Omagari K, Nakajima K, Nobusawa E, Tanaka S. Sialic acid recognition of the pandemic influenza 2009 H1N1 virus: binding mechanism between human receptor and influenza hemagglutinin. *Prot. Pept. Lett.*, 2011; 18: 530-539.
  - 28) 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.
  - 29) 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.
  - 30) 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.
  - 31) Komatsu T, Nagata K. Replication-uncoupled histone deposition during adenovirus DNA



- replication. *J. Virol.*, 2012; 86(12): 6701-6711.
- 32) Kato SI, Nagata K, Takeuchi K. Cell tropism and pathogenesis of measles virus in monkeys. *Front. Microbiol.*, 2012; 3: 14.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.

- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, Nobusawa E. Composition of Hemagglutinin and Neuraminidase Affects the Antigen Yield of Influenza A (H1N1)pdm09 Candidate Vaccine Viruses. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2013; 66(1): 65-68.
- 49) Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagwa Y, Tashiro M, Saito T. Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-2011. *Virus Res.*, 2012; 170: 109-117.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) Haruyama T, Nagata K. Anti-influenza virus activity of Ginkgo biloba leaf extracts. *J. Nat. Med.*, 2013; 67(3): 636-642.
- 55) 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.
- 56) 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.
- 57) 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.
- 58) 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.
- 59) 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.
- 60) 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.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) 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.
- 64) 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.
- 65) 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.
- 66) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Aina 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) 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
- 2) 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
  - 3) 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
  - 4) 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
  - 5) 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.
  - 6) 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
  - 7) 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
  - 8) 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
  - 9) 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
  - 10) 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
  - 11) 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
  - 12) 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
  - 13) 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
  - 14) 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
  - 15) 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