

令和元年6月20日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10047

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの自己・非自己区別とその応用による新薬開発

研究課題名(英文) Development of new drug based on the self or non-self distictional mechanism of the influenza virus

研究代表者

柏木 孝仁 (KASHIWAGI, TAKAHITO)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：70320158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスの持つPAやPB2タンパク質を断片化すると、ウイルスを特異的に阻害できる事を見出し、特にPAの断片について阻害メカニズムの解析を行った。阻害活性を有する最小の断片はN末端から188アミノ酸であり、この最小断片にエンドヌクレアーゼ活性が存在することが確認できた。またエンドヌクレアーゼ活性を喪失させる変異体では、ウイルスに対する阻害活性がなく、断片のエンドヌクレアーゼが何かしらの核酸を介して、ウイルスを特異的に阻害していることが推測された。しかしながら断片のターゲットとなりうる核酸を見つけることができず今後のさらなるメカニズムの研究が必要とされる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主細胞内におけるウイルスの特異的な活動とそのメカニズムを解明することは、ウイルスに対して、特異性が高くかつ副反応の少ない安全な薬剤開発に直結し、社会的意義が高い。我々の注目するウイルスによる自己認識のメカニズムは未だ不明な点が多く、開拓すべき、また調査すべき項目が多く残されている。多くのウイルスは僅かなタンパク質で活動しているため、それぞれのタンパク質が多機能性を有していることが多く、これまでに知られている機能以外にも様々な機能を有している事が推測される。ウイルスによるウイルスの阻害という我々の研究は、多くの点で発展途上であり多くの課題があるが、新しい抗ウイルス薬開発への道筋を示している。

研究成果の概要(英文)：We found that the fragmented PA subunit of influenza virus could inhibit its replication. In this study, the mechanism of inhibition was investigated. 188 amino acids from the N-terminus were confirmed as the essential region of the fragment for inhibition. In addition, the 188 region was related to the endonuclease activity of PA subunit. Substitutions of the amino acids of the fragment revealed that the endonuclease activity is important for the inhibitory effect. This result supposed that the fragment inhibited the replication through some nucleic acids, although the target of the endonuclease was still unknown. To develop new drug for influenza virus, this study of inhibitory mechanism by 188 amino acids of PA fragment is still required for the future.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス RNAポリメラーゼ 阻害薬 抗ウイルス薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 2009年のインフルエンザパンデミックの我が国への影響は、他国と比較して小さかった。この理由として、早期受診、早期診断、早期治療が功を奏しており、抗インフルエンザウイルス薬の果たした役割が大きかった。しかしながら当時はNA阻害薬一通りであり、限られた作用機序に頼る状況は脆弱であったと言える。

(2) インフルエンザウイルスは宿主細胞に感染後、自己複製を行うが、偏性細胞内寄生体であり、多くの機能を宿主細胞に依存している。一方でウイルスは様々な方法で自己と非自己(宿主)を区別し自己に有利な細胞内環境を構築している。例えばウイルス一般によく知られているのが非自己(宿主)のタンパク質発現を遮断するシャットオフ機構である。インフルエンザウイルスにおいてはキャップスナッチング機構により自己の遺伝子発現を有利に進めている。しかしながら、ウイルスがどのように自己と非自己を区別しているかについては未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

自己・非自己の認識システムが崩壊した場合、ウイルスの優位性が失われ、正常にウイルスの活動が行えなくなることが想像される。つまり、自己・非自己の区別システムを解明し、これをターゲットとする薬剤を開発すれば、既存の薬剤とは作用機序が完全に異なり、また特異性の高い、新しい薬剤開発へと繋がる事が期待できる。そこで、これまでの知見を基に、自己認識からのアプローチ、非自己認識からのアプローチの双方向から、それぞれの認識機構を崩壊させる手法を探ることを目的とした。

(1) 自己認識からのアプローチ：インフルエンザウイルスは遺伝子の末端に存在するプロモーター構造を特異的に認識し遺伝子の複製・転写を行っている。そこでこれらの配列を特異的に破壊した場合に、ウイルスの増殖にどのような影響が現れるか検討する。

(2) 非自己認識からのアプローチ：インフルエンザウイルスは自己のmRNAを形成する際に、宿主(非自己)のmRNAからCap構造を奪い取る(キャップスナッチング)。この際に宿主mRNAのCap構造を認識するのはPB2であり、またCap構造を切り取るのがPAである。我々の研究で、PA全長ではなくPAの断片化によって非自己認識の特性が失われ、本来とは逆にインフルエンザウイルス(自己)に作用してしまう逆転現象を確認している(参考文献)。これを応用し特異的にインフルエンザウイルスのみを阻害できるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 自己認識からのアプローチ：インフルエンザウイルス遺伝子のプロモーター構造の解析データから、このエリアに特異的に作用するRNAiを用いてプロモーター構造の破壊によるウイルス複製への影響を見る。

(2) これまでの我々の研究で得られているエンドヌクレアーゼ部位を含むPA断片を基にして、インフルエンザウイルスのみをターゲットとするPA断片を探る。同時にエンドヌクレアーゼの活性をコントロールしている部位、または特異性を決定する因子を見つけ、より活性が高く、特異性の高い断片を作成する。

4. 研究成果

(1) PA断片の高発現と高精製：インフルエンザウイルスに対する阻害活性を持つ最小のPA断片が188アミノ酸からなることを突き止めた。阻害効果は確認できるものの、断片化により非自己認識の特性が失われる細胞内メカニズムが複雑であるため、高発現かつ高純度の188アミノ酸PA断片を生成し試験管内測定によって、作用機序を精密に調べる実験系の構築が必須と考えた。インフルエンザウイルスのRNA複製酵素を構成する、PB1、PB2、PAタンパク質はタンパク質の立体構造を探るために古くから様々な発現・精製系が試みられてきたが、十分な発現量と精製度を得ることが難しく、立体構造も部分的に知られるのみであった。まず大腸菌を用いた発現系を構築したが、発現量は比較的高値であったが、精製が困難であった。精製の塩条件を検討し、高濃度の塩条件により一定量の精製物を得ることができた。さらに発現・精製を改良するために、これまでに多くの実績があるバキュロウイルス発現系を構築した。PAのエンドヌクレアーゼ活性を失活させるアミノ酸変異を加えた変異断片(Mutant)は発現が確認できたが、活性を残した自然断片(Wildtype)は発現を確認できなかった。PA断片がインフルエンザウイルスを阻害するのと同様の機序(エンドヌクレアーゼ活性を介したタンパク質の発現抑制)でバキュロウイルスの増殖を阻害していることが示唆された。現在、PAのエンドヌクレアーゼ活性を特異的に阻害するパロキサビルが開発されており、PA断片の活性をこの薬剤で抑制しつつ、バキュロウイルスの発現系を構築する作業を進めている。

(2) PA断片の試験管内活性：大腸菌を用いた188アミノ酸PA断片の精製物を用いて、PAのエンドヌクレアーゼ活性を測定したところ、この断片にPA全長同様のエンドヌクレアーゼ活性があり、またインフルエンザウイルスの阻害活性のないPA断片にはエンドヌクレアーゼ活性がないことを確認できた。すなわち、インフルエンザの阻害効果にエンドヌクレアーゼの関与が強く示唆され、阻害メカニズムのターゲットが核酸であることが推測された。

(3) ターゲット核酸の検索： 188 アミノ酸 PA 断片によるインフルエンザウイルスの抑制活性に、この断片のエンドヌクレアーゼ活性が関与していることから、核酸がターゲットであることが示唆された。しかしながら、当初仮定していた DNA や mRNA への影響は確認できなかった。そこで、別にターゲットとなりうる細胞内の核酸として、Small RNA や miRNA を仮定しこれら RNA の量的・質的变化を測定した。PA 断片存在下・非存在下で細胞内の Small RNA および miRNA を抽出し RNA パターンを観察したが、顕著な変化は確認できなかった。PA 断片が細胞内のどの核酸を介してインフルエンザを阻害しているのか、さらなる仮説を立て検証する必要がある。網羅的な方法として、次世代シーケンスなどを用いて細胞内の全核酸を調べ、ヒントとなる変化が観測可能か検討している。

(4) プロモーター構造の破壊： 自己認識からのインフルエンザ阻害法のアプローチとして、インフルエンザのプロモーター構造の特異的破壊を試みた。PA、PB1、PB2 のゲノム遺伝子上に存在するインフルエンザプロモーター構造に対して、特異的に作用する RNAi を作成しその抑制効果を検討した。結果、PB2 のプロモーター構造を RNAi で阻害することで、PB2 タンパク質の発現が抑制可能であった。PA、PB1 においては、さらに特異配列を検討し、抑制効果のある RNAi を探し、PB2 については、タンパク質の発現抑制だけでなく、実際にインフルエンザウイルスの形成を阻止できるか今後検討を行う。

(5) 188 アミノ酸 PA 断片によるインフルエンザの阻害活性は現象のみが先行し、メカニズムについては未だに不明な点が多い。しかしながら、この重要な現象とアイデアは、他のウイルスにも応用可能であり、現在、RS ウイルスについても阻害効果のある自タンパク質小断片を見出している。

< 引用文献 >

Uemura Y, Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Hamada N, and Watanabe H. The N-terminal fragment of PA subunit of the influenza A virus effectively inhibits ribonucleoprotein (RNP) activity via suppression of its RNP expression. J Infect Chemother, 21(9): 296-301, 2015.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Hara K, Kashiwagi T, Hamada N, and Watanabe H. Basic amino acids in the N-terminal half of the PB2 subunit of influenza virus RNA polymerase are involved in both transcription and replication. J Gen Virol, 98: 900-905, 2017.
DOI: 10.1099/jgv.0.000750

[学会発表] (計 9 件)

上村勇作、柏木孝仁、原 好勇、濱田信之、渡邊 浩 「新作用機序によるインフルエンザウイルス阻害剤への応用」第 86 回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第 59 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 64 回日本化学療法学会西日本支部総会合同開催、沖縄、2016.11.26.

八板謙一郎、原 好勇、柏木孝仁、濱田信之、渡邊 浩 「RS ウイルスの P タンパク質 C 末端領域はウイルス RNP の合成を抑制する」第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会、第 65 回日本化学療法学会学術集会 合同学会、東京、2017.4.6.

上村勇作、柏木孝仁、原 好勇、濱田信之、渡邊 浩 「インフルエンザウイルスの PA 断片が持つエンドヌクレアーゼ活性は自身の遺伝子複製阻害に関与する」第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会、第 65 回日本化学療法学会学術集会 合同学会、東京、2017.4.7.

原 好勇、柏木孝仁、濱田信之、渡邊 浩 「インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PB2 サブユニットの転写および複製における役割」第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会、第 65 回日本化学療法学会学術集会 合同学会、東京、2017.4.7.

濱田信之、原 好勇、柏木孝仁、八板謙一郎、後藤憲志、大津 寧、渡邊 浩 「次世代シーケンサーによる病原体不明検体からのコロナウイルスの検出」第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会、第 65 回日本化学療法学会学術集会 合同学会、東京、2017.4.7.

八板謙一郎、原 好勇、柏木孝仁、渡邊 浩 「RS ウイルスの欠損型 P は RS ウイルスのポリメラーゼ活性を阻害する」第 65 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 60 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 87 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同開催、長崎、2017.10.27.

八板謙一郎、原 好勇、柏木孝仁、渡邊 浩 「RS ウイルスの増殖を抑制する欠損型 P の作用機序について」第 92 回日本感染症学会学術講演会、第 66 回日本化学療法学会

総会 合同学会、岡山、2018.6.1.

原 好勇、柏木孝仁、渡邊 浩「優秀演題賞（日本語）2、精製したRSウイルスのP断片はRSウイルスの増殖を抑制する」第93回日本感染症学会総会・学術講演会、名古屋、2019.4.4.

Koyu Hara, Kenichiro Yaita, Takahito Kashiwagi and Hiroshi Watanabe. The C-terminal fragment of the respiratory syncytial virus phosphoprotein inhibits the viral polymerase activity. Negative Strand RNA Virus meeting, Verona, Italy, 2018. 6. 18.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/virol>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：原 好勇

ローマ字氏名：(HARA, koyu)

所属研究機関名：久留米大学・医学部

部局名：感染制御学講座

職名：准教授

研究者番号(8桁)：40309753

研究分担者氏名：渡邊 浩

ローマ字氏名：(WATANABE, hiroshi)

所属研究機関名：久留米大学・医学部

部局名：感染制御学講座

職名：教授

研究者番号(8桁)：90295080

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。