

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16264

研究課題名（和文）インフルエンザRNAポリメラーゼとウイルス増殖阻害抗体のクライオ電子顕微鏡解析

研究課題名（英文）Structural analysis of Influenza viral RNA polymerase and inhibitory antibody

研究代表者

吉田 尚史（Yoshida, Hisashi）

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：90724774

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：クライオ電子顕微鏡による単粒子解析によって、インフルエンザRNAポリメラーゼとその阻害抗体について、複合体の立体構造解析を行った。その結果、分解能7.2 Åでの解析に成功し、それらの結合領域を明らかにすることができた。また、解析した立体構造を基に、抗体の増殖阻害作用について考察した。相互作用解析の結果から、抗体はインフルエンザRNAポリメラーゼのRNA結合を阻害することで、ウイルス増殖を抑制していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新型インフルエンザウイルスによるパンデミックが懸念されており、さらに薬剤耐性ウイルスの出現についても報告されていることから、新たな抗インフルエンザ薬の開発が急務とされてきた。インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼは、ウイルス増殖の中心的な役割を担っており、他のウイルスタンパク質と比べ変異が起りにくいという特徴から理想的な薬剤ターゲットとして注目されてきた。本研究では、インフルエンザRNAポリメラーゼに対する阻害抗体について、その結合領域や作用機構を調べた。本研究成果によって、阻害抗体から低分子医薬への展開など従来の発想にはない新規抗インフルエンザ薬の創薬が期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the complex structure of influenza RNA polymerase and its inhibitory antibody by single-particle analysis using cryo-electron microscopy. As a result, we could determine the structure at a resolution of 7.2 angstrom and identify the binding region. Based on the structure, we discussed the inhibitory mechanism of viral growth by the antibody. The results of the interaction analysis suggested that the antibody inhibits the viral replication by blocking the RNA binding of influenza RNA polymerase.

研究分野：構造生物学

キーワード：インフルエンザウイルス 阻害抗体 クライオ電子顕微鏡 インフルエンザRNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、毎年冬季に流行する人間にとって身近な感染症で、感染すると高熱や関節痛、倦怠感などの全身症状や、喉の痛み、咳などの呼吸器系の症状を示す。一方で、インフルエンザは時にパンデミックと呼ばれる世界的大流行を引き起こし、多数の死者を出してきた。近年では、2009年にメキシコで発生した新型インフルエンザは瞬く間に広がり、世界中で大変な脅威となった。今後、さらに深刻な問題として、東南アジアの豚の多くが強毒型のトリインフルエンザ(H5N1型)を保有しているという報告がなされており、タミフル耐性型トリインフルエンザも確認されていることから、実際にそのような新型インフルエンザが出現した際の対策の有効性は不透明であり、新たな対策が世界中で求められている。

インフルエンザウイルスはゲノムRNAとタンパク質からなる単純な構造で、ウイルス自身では自己増殖することができない。そのため宿主の細胞に感染し、その増殖機構を利用してウイルスの複製を行う。これに対し、ウイルスの増殖を抑えるには、(i)ウイルスの感染を防ぐ、(ii)ウイルスの複製を防ぐ、(iii)ウイルスの拡散を防ぐ、これら3つの方法が挙げられる。(i)及び(iii)の対策としては、ワクチンやタミフルをはじめとする抗インフルエンザ薬が用いられている。しかし、従来のワクチンや抗インフルエンザ薬は、ウイルス表面に存在するHA(ヘマグルチニン)、NA(ノイラミニダーゼ)というタンパク質を主に標的としており、これらは頻繁に変異を起こし、それぞれ16種類、9種類ものタイプが存在するため、新たなタイプのウイルスには効果が低いことが問題とされている。

一方で、(ii)のようなウイルスの増殖を直接阻害する方法が最も効果的と考えられてきた。ウイルスの増殖サイクルの中心であるゲノムの複製と転写を行うのは、インフルエンザが保有するRNAポリメラーゼであり、さらにRNAポリメラーゼはHAやNAと比べて変異の度合いが極端に少ないため、このインフルエンザRNAポリメラーゼが理想的な新規薬剤ターゲットとして注目されてきた。

本研究ではこれまでに、モノクローナル抗体を用いたインフルエンザRNAポリメラーゼの機能阻害を検討してきた。モノクローナル抗体がRNAポリメラーゼに特異的に結合しウイルス増殖を抑制することができれば、その抗体結合部位はペプチドや低分子化合物による新たな創薬部位としての展開が期待される。

実際に、インフルエンザRNAポリメラーゼの各ドメインに対して抗体の作製を試みたところ、PAサブユニットに特異的に結合し、細胞内でウイルス増殖を抑制するマウスモノクローナル抗体の取得に成功した。蛍光ラベル化した精製抗体をビーズローディング法により宿主細胞へ導入し、インフルエンザウイルスの増殖を観察した。その結果、コントロール抗体が導入された細胞では細胞周辺にウイルスの出芽が確認されるのに対し、作製した抗体ではウイルス増殖が著しく抑制されていることが確認された。さらに、作製した抗体は様々な型のインフルエンザRNAポリメラーゼに結合することが確認され、汎用性の高い阻害抗体であることが示唆された。以上の背景をもとに、抗体がウイルス増殖を阻害する詳細な作用機構や創薬への展開に向けて、本研究を実施した。

2. 研究の目的

これまでに開発した阻害抗体は普遍的にインフルエンザウイルスの増殖を抑える可能性を有しており、その抗体結合部位はペプチドや低分子化合物による新たな創薬ターゲットとしての展開が期待される。しかし、インフルエンザRNAポリメラーゼと阻害抗体の詳細な相互作用様式はわかっておらず、さらに阻害抗体がどのようにしてウイルス増殖を抑えるのかという阻害作用メカニズムについても不明である。今後、阻害抗体の特異性や親和性を向上させ、抗インフルエンザ薬へと発展させていくためには、抗体の結合様式や作用機構などの情報が必要不可欠である。研究代表者はこれまで、X線結晶構造解析によって立体構造解析を試みてきたが、RNAポリメラーゼは3つのサブユニットから成る複合体であること、またそれぞれが高分子量であることから、十分量のタンパク質を得ることが困難であり、成功には至っていない。そこで本研究では、比較的サンプル量が少なく、高分子量タンパク質の構造解析を得意とするクライオ電子顕微鏡の単粒子解析によって、インフルエンザRNAポリメラーゼと阻害抗体の立体構造解析を行い、詳細な結合様式の解明を第一の目的とした。また、構造解析と並行して、等温滴定型カロリーメータ(ITC)や超遠心分析(AUC)、ゲル濾過クロマトグラフィー(SEC)などの方法により、インフルエンザRNAポリメラーゼと阻害抗体の相互作用解析を行い、抗体によるウイルス増殖阻害機構の解明を第二の目的とした。

3. 研究の方法

これまで、X線小角散乱法や生化学的解析などの予備的な実験により、抗体はインフルエンザRNAポリメラーゼのPAサブユニットC末端ドメインに結合することがわかっていた。そのため、PAのC末端ドメインを含むインフルエンザRNAポリメラーゼ複合体を大腸菌またはバキ

ユロウイルス昆虫細胞の発現系を用いて、タンパク質試料を調製した。一方で、阻害抗体についてはマウス腹水から精製を行い、抗体の抗原結合部位を含む Fab 領域を調製した。また、相互作用解析に向けては大量の試料が必要となるため、大腸菌発現系を用いて抗体を組換えタンパク質として調製することを検討した。調製したインフルエンザ RNA ポリメラーゼ及び阻害抗体の試料を用いて、クライオ電子顕微鏡解析による単粒子解析や等温滴定型カロリメータ (ITC) による相互作用解析、生化学的解析を実施した。

4. 研究成果

インフルエンザ RNA ポリメラーゼの PA サブユニットまたは PA-PB1 サブユニット複合体について、大腸菌または昆虫細胞の発現系を用いて、タンパク質試料の調製を行った。一方、阻害抗体については、マウス腹水から Fab 領域を、大腸菌発現系から Fv 領域を精製した。どの試料も SDS-PAGE 上で単一バンドであることが確認され、ミリグラムオーダーの収量で高純度に精製することに成功した。また、立体構造解析を実施する前に、ゲル濾過クロマトグラフィーやブルダウンアッセイなど生化学的相互作用解析を行った結果、調製したインフルエンザ RNA ポリメラーゼと抗体がおよそ 1:1 の割合で結合することがわかった。さらに、調製した複合体試料について、ネガティブ染色法による電子顕微鏡観察を行ったところ、大まかな粒子の大きさや均一性を確認することができた。

次に、インフルエンザ RNA ポリメラーゼの 2 つのサブユニット PA-PB1 に阻害抗体の Fab 領域を結合させた複合体試料を調製し、クライオ電子顕微鏡 (JEM2100F) による観察を行った。その結果、インフルエンザ RNA ポリメラーゼと阻害抗体の複合体粒子が観察された。解析では、まず 307,324 個の粒子を選択し、2D クラス分類および 3D クラス分類を行い、最終的に 58,762 個の粒子から 7.2 Å 分解能のマップが得られた。既に構造解析に成功していたインフルエンザ RNA ポリメラーゼと阻害抗体のそれぞれのモデル構造を、単粒子解析で得られたマップに当てはめ、複合体構造を解析した。その結果、インフルエンザ RNA ポリメラーゼと阻害抗体の結合領域を同定することができた。

また、様々な亜種のインフルエンザウイルスに由来する RNA ポリメラーゼと阻害抗体について、ITC を用いてそれらの結合を調べた。その結果、季節性の H1N1 型のインフルエンザ RNA ポリメラーゼだけではなく、強毒性の H5N1 型や H7N9 型の RNA ポリメラーゼに対しても、阻害抗体は解離定数 1~20 nM 程度の高い親和性で結合することが明らかとなった。

単粒子解析によって解析した立体構造から、阻害抗体の結合領域を同定することができた。また相互作用解析から、インフルエンザ RNA ポリメラーゼの亜種間で配列類似性の高い領域に対して、抗体が結合することが示唆された。この結果から、開発した抗体はその作用機序として、(1)ウイルス RNA との結合を阻害、(2)ポリメラーゼの多量体化の阻害、のどちらかまたは両方の機能を有しているのではないかと考察された。(1)については、抗体の結合によってインフルエンザ RNA ポリメラーゼとウイルス RNA の結合が阻害され、新規 RNA 合成が抑制されている可能性があげられた。一方で(2)については、インフルエンザ RNA ポリメラーゼは多量体を形成することで、ゲノム RNA の複製が効率的に行われることが近年報告された。単粒子解析による立体構造モデルでは、抗体は RNA ポリメラーゼの多量体形成領域に結合していることから、多量体形成を阻害することでウイルス増殖を抑制している可能性が考えられた。

以上の考察を基に、本研究では(1)のウイルス RNA との結合阻害について生化学的解析を行った。抗体存在下または非存在下において、インフルエンザ RNA ポリメラーゼとウイルス RNA の相互作用を調べた結果、抗体が存在しない条件では両者の結合が確認されるのに対し、抗体が存在すると結合しなくなることが明らかとなった。すなわち、阻害抗体はインフルエンザ RNA ポリメラーゼの RNA 結合を阻害することによって、ウイルス増殖を抑制していることが示唆された。

以上の本研究では、インフルエンザ RNA ポリメラーゼと阻害抗体の結合領域をクライオ電子顕微鏡の単粒子解析によって明らかにすることができた。また、相互作用解析によって、阻害抗体は様々な亜種のインフルエンザ RNA ポリメラーゼに対して、高い結合能を有することがわかった。これらの研究結果から、抗体の作用機序について考察し実験を進めたところ、上記(1)のウイルス RNA との結合を阻害しているという考察が支持された。上記考察(2)のポリメラーゼ多量体化の阻害については、今後実験系を構築し調べていく予定である。一方で、本研究が最終目標とする阻害抗体が結合する部位への新規薬剤開発に向けては、より高分解能での立体構造解析を行い、詳細な結合様式を解明する必要がある。そのため、試料調製方法の改善やクライオ電子顕微鏡解析での測定条件の検討などを進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Park JH, Iwamoto M, Yun JH, Uchikubo-Kamo T, Son D, Jin Z, Yoshida H, Ohki M, Ishimoto N, Mizutani K, Oshima M, Muramatsu M, Wakita T, Shirouzu M, Liu K, Uemura T, Nomura N, Iwata S, Watashi K, Tame J, Nishizawa T, Lee W, Park SY	4. 巻 606
2. 論文標題 Structural insights into the HBV receptor and bile acid transporter Ntcp	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 1027 ~ 1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04857-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Naomi, Sakashita Gyosuke, Nagata Takashi, Kobayashi Naohiro, Yoshida Hisashi, Park Sam-Yong, Nariai Yuko, Kato Hiroaki, Obayashi Eiji, Nakayama Kentaro, Kyo Satoru, Urano Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Nucleus Accumbens-Associated Protein 1 Binds DNA Directly through the BEN Domain in a Sequence-Specific Manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 608 ~ 608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8120608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Hisashi, Park Sam-Yong, Sakashita Gyosuke, Nariai Yuko, Kuwasako Kanako, Muto Yutaka, Urano Takeshi, Obayashi Eiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Elucidation of the aberrant 3' splice site selection by cancer-associated mutations on the U2AF1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4744 ~ 4753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18559-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:101名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------