

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370046

研究課題名（和文） インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PB1-PB2 複合体の構造解析

研究課題名（英文） Structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase PB1-PB2

研究代表者

朴 三用 (PARK SAM-YONG)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：20291932

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、ウイルスの複製（増殖）に中心的な役割を担っている事や、他のタンパク質と比べ変異を引き起こす事は少ないため、新規薬剤ターゲットとして注目されて来た。インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼが持つ 3 つのサブユニットのうち、どれか 1 つのサブユニットでも欠けるとウイルスの増殖機構が失われる事に注目し、PB1/PB2 のサブユニットの複合体での構造解明を行う事を目的と創薬の基盤構築である。本研究者は、RNA ポリメラーゼ PB1/PB2 複合体のタンパク質を発現・精製し成功して、分解能 1.7 Å で解析に成功した。PB1/PB2 の構造は、それぞれ 3 本の α -ヘリックスからなり、非常に強い疎水結合により、複合体を形成している。そのアミノ酸残基は、PB2 では Ile4, Leu7, Leu10 と、PB1 では、Val715, Ile750 が関与しており、これらの残基の変異体を作製し、mRNA 活性を測定した結果、極めて低下する事が確認でき、*in-silico* による基盤構造を確立する事が出来た。

研究成果の概要（英文）：Influenza virus RNA-dependent RNA polymerase is a multi-functional heterotrimer, which uses a "cap-snatching" mechanism to produce viral mRNA. Host cell mRNA is cleaved to yield a cap-bearing oligonucleotide which can be extended using viral genomic RNA as a template. The cap binding and endonuclease activities are only activated once viral genomic RNA is bound. This requires signaling from the RNA-binding PB1 subunit to the cap-binding PB2 subunit, and the interface between these two subunits is essential for polymerase activity. We have defined this interaction surface by protein crystallography, and tested the effects of mutating contact residues on the function of the holo-enzyme. This novel interface is surprisingly small, yet it plays a crucial role in regulating the 250 kDa polymerase, and is completely conserved among avian and human influenza.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物学

キーワード：インフルエンザ、RNA ポリメラーゼ、構造解析、創薬

1. 研究開始当初の背景

20世紀に入り人類は3回の新型インフルエンザウイルスの登場を経験している。1918年に出現したスペイン型インフルエンザ(A/H1N1)は、世界中で2,000~4,000万人の死者を出した。このウイルスは様々な変異を引き起こしつつ、流行が39年間続き、1957年からは新型アジア型(A/H2N2)へ姿を変えた。この時の死者は100~400万人であったと推定されている。アジア型のインフルエンザの流行は11年間続き、その後、1968年には香港型(A/H3N2)が新型インフルエンザとして現れた。死者数は同じく100~400万人であった。新型インフルエンザウイルスが出現すれば、人々は当然過去にこの新型ウイルスの感染を受けた事がないため抗体もなく、一時に新しい新型ウイルスの感染を受ける人が多くなり、世界規模での大流行(パンデミック)となる事が容易に予想される。

2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスの増殖機構の中心的な役割を担っているRNAポリメラーゼが持つ3つのサブユニットのうち、どれか1つのサブユニットでも欠けるとウイルスの増殖機構が失われる事に注目し、PB1/PB2のサブユニットの複合体での構造解明を行う事を目的とする。また、このPB1/PB2の構造の情報を基に、PB1/PB2相互作用部位に結合する化合物の探索をin-silico手法で行い、抗インフルエンザウイルス剤につながる構造基盤を構築する。

3. 研究の方法

- ①インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼPB1/PB2複合体でのタンパク質の大量生産
- ②PB1/PB2複合体の結晶化
- ③PB1/PB2複合体の構造解析
- ④PB1/PB2複合体の構造を基にin-silico計算による化合物の探索

4. 研究成果

- ①PB1とPB2の結合にはPB1のC末端側が必須であることは明らかになっていたが、PB2のどの部位が結合しているかは明らかになっていなかった。そのため様々なPB2断片とPB1のC末端部位(678-757残基)との共発現実験を行い、PB1のN末端が必須であることを明らかにし、PB1の678-757残基とPB2の1-34残基からなる安定な複合体の発現に成功した。
- ②PB1/PB2複合体の結晶化を、0.1M potassium phosphate pH5.8、15%PEG4000条件下で行い、得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器

研究機構のビームラインBL17AにおいてXAFS測定及びX線回折実験を行った。

③PB1/PB2複合体の発現にはSe-Metを含む培地を用いており、Seの異常分散によって位相問題を解決している。測定したデータをPA-PB1と同様に処理し、PB1/PB2複合体構造を得た。また、上記とは異なる、80mM Citrate、20%PEG4000の条件で高分解能の結晶を得ており、1.7Åまでのデータ及び精密な構造を得ることが出来た。

PB1、PB2共に3本の α -ヘリックスからなっており、PB1の3つのヘリックスは $\alpha 1$ と $\alpha 2$ が平行、 $\alpha 2$ と $\alpha 3$ が逆平行に、曲面を描くように並んでいた。PB2のN末端側のヘリックス($\alpha 1$)はその曲面の内側にはまる形になっており、PB1とPB2は、主にこのPB2の $\alpha 1$ ヘリックス周辺の疎水性相互作用によって結合していた。このヘリックスからなる結合様式もPA-PB1複合体と同様にPDB内でみられない新規なものであった。

PB2の $\alpha 1$ ヘリックス上のIle4、Leu7、Leu10の3つの疎水性残基はPB1の3本のヘリックス側に向いており、それぞれの疎水性残基がPB1の疎水性残基と4.2Å以下の距離に存在しており、これらのアミノ酸の疎水性相互作用によりPB1とPB2が結合していることが明らかになった。

④PB1/PB2複合体の結合模様は、疎水的な環境でヘリックス間での結合をしている。in-silico計算は、PB1及び、PB2それぞれの単量体、又はPB1/PB2複合体でのMD計算を生理食塩水中、T=300Kで1.5 nsecの条件で計算を行い、10個の構造を割り出す事が出来た。これらの構造ではPB1/Phe696アミノ酸は、ポケットの谷が狭く、深くなっている。この周辺に化合物をドッキングする事で、サブユニット間の結合を阻害する化合物の探索を行った。今後、結合評価系を開発や、化合物の選別の自動化による評価系の開発を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計18件)

1. Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Suzuki Y, Tame JR, Nagata K, Park SY. Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. EMBO J. 2009 28(12):1803-11.
2. Woo JS, Lim JH, Shin HC, Suh MK, Ku B,

- Lee KH, Joo K, Robinson H, Lee J, Park SY, Ha NC, Oh BH. Structural Studies of a Bacterial Condensin Complex Reveal ATP-Dependent Disruption of Intersubunit Interactions. *Cell*. 2009 136(1):85-96.
3. Watanabe M, Heddle JG, Kikuchi K, Unzai S, Akashi S, Park SY, Tame JR. The nature of the TRAP-Anti-TRAP complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 106(7):2176-81.
4. Tomita A, Sato T, Ichiyonagi K, Nozawa S, Ichikawa H, Chollet M, Kawai F, Park SY, Tsuduki T, Yamato T, Koshihara SY, Adachi SI. Visualizing breathing motion of internal cavities in concert with ligand migration in myoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 106(8):2612-6
5. Clarke T, Kawai F, Park SY, Tame J, Dowson C, Roper D. Mutational Analysis of the Substrate Specificity of Escherichia coli Penicillin Binding Protein 4 (PBP4). *Biochemistry*. 2009 48(12):2675-83.
6. Akashi S, Watanabe M, Heddle JG, Unzai S, Park SY, Tame JR. RNA and Protein Complexes of trp RNA-Binding Attenuation Protein Characterized by Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2009 81(6):2218-26.
7. Kawai F, Clarke TB, Roper DI, Han GJ, Hwang KY, Unzai S, Obayashi E, Park SY, Tame JR. Crystal Structures of Penicillin-Binding Proteins 4 and 5 from Haemophilus influenzae. *J Mol Biol*. 2010 396(3):634-45.
8. Kovalevsky AY, Chatake T, Shibayama N, Park SY, Ishikawa T, Mustyakimov M, Fisher Z, Langan P, Morimoto Y. Direct determination of protonation states of histidine residues in a 2 Å neutron structure of deoxy-human normal adult hemoglobin and implications for the Bohr effect. *J Mol Biol*. 2010 398(2):276-91.
9. Nishimura K, Tajima N, Yoon YH, Park SY, Tame JR. Autotransporter passenger proteins: virulence factors with common structural themes. *J Mol Med*. 2010 88(5):451-8.
10. Tajima N, Kawai F, Park SY, Tame JR. A novel intein-like autoproteolytic mechanism in autotransporter proteins. *J Mol Biol*. 2010 402(4):645-56.
11. Nishimura K, Yoon YH, Kurihara A, Unzai S, Lührink J, Park SY, Tame JR. Role of domains within the autotransporter Hbp/Tsh. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 66(Pt 12):1295-300.
12. 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.
13. 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.
14. Shibayama N, Sugiyama K, Park SY. Structures and oxygen affinities of crystalline human hemoglobin C

- (β 6 Glu→Lys) in the R and R2 quaternary structures. *J Biol Chem.* 2011 286(38):33661-8.
15. 朴 三用:「抗インフルエンザ薬の開発研究」 *Bipphilia* ビオフィリア (アドスリ社)、第5巻第4号、25-29, 2009
 16. 朴 三用:「新規抗インフルエンザ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」 *生物物理* Vol.50, No.2, 74-79, 2010.
 17. 浅賀 正充、朴 三用:「タンパク質発現プロトコール」 *実験医学別冊* (羊土社) 94-111, 2010.
 18. 杉山佳奈子、尾林栄治、吉田尚史、朴三用: 「インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの構造解析と創薬研究」 *日本結晶学会* 52, 271-278, 2010
- [学会発表] (計 17 件)
1. Sam-Yong Park, “*Structural Insight into the Essential PA-PB1 Subunit Contact of the Influenza Virus RNA Polymerase*” VII European Symposium of the Protein Society. June 14-18, 2009. Zurich, Switzerland.
 2. Sam-Yong Park, “*Structural Insight into the Subunit Contact of the Influenza Virus RNA Polymerase*” America Crystallographic Association, July 25-30, 2009. Toronto Canada. (招待講演)
 3. Sam-Yong Park, “*Structural Insight into the Subunit Contact of the Influenza Virus RNA Polymerase*” 9th KIAS-SUN Structure and Function, October 8-10, 2009. Seoul National University, Seoul, Korea (招待講演).
 4. E. Obayashi, K. Sugiyama, H. Yoshida, F. Kawai, A. Kawaguchi, Y. Suzuki, J. Tame, K. Nagata, SY Park. “*Structural Insight into the Essential Subunit Contact of the Influenza Virus RNA Polymerase*” 第47回日本生物物理学会 徳島文理大学、2009年10月30日-11月1日.
 5. S. Unzai, K. Imai, T. Yokoyama, SY Park, K. Nagai, J. Tame. “*Structure and function of Root effect fish hemoglobin*” 第47回日本生物物理学会 徳島文理大学、2009年10月30日-11月1日.
 6. Sam-Yong Park, “*Structural Insight into the Subunit Contact of the Influenza Virus RNA Polymerase*” The 9th R. O. C-Japan Joint Seminar on Crystallography. December 7-9, 2009. Osaka University (招待講演)
 7. 朴 三用 “新規抗インフルエンザ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” 第27回 PF シンポジウム 筑波、2010年3月9日-10日. (招待講演)
 8. 朴 三用 “インフルエンザ RNA ポリメラーゼの構造解析” 第47回日本蛋白質科学会 北海道大学、2010年6月16日-18日. (招待講演)
 9. 杉山佳奈子、尾林栄治、川口敦史、鈴木由佳理、タイム ジェレミー、永田恭介、朴三用:「インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼサブユニット PB1-PB2 サブユニット間相互作用の解明」, 第10回 日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2010年6月16日-18日 (ポスター)
 10. 吉田尚史、尾林栄治、河合文啓、川口

- 敦史、永田恭介、テーム ジェレミー、
朴三用：「インフルエンザウイルスの
 RNAポリメラーゼサブユニットPA-PB1
 サブユニット間相互作用の解明」, 第10
 回 日本蛋白質科学会年会, 札幌,
 2010年6月16日-18日 (ポスター)
11. 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」, 平成22年度 KAST フォーラム 1
 ドイツバイオ交流フォーラム, 川崎,
 2010年7月2日 (口頭)
12. 朴三用：「新規抗インフルエンザウ
 イルス薬の開発基盤となるRNAポリメ
 ラーゼの構造解析」, 第34回 阿蘇シ
 ンポジウム, 阿蘇, 2010. 7. 30-31 (口
 頭)
13. Sam-Yong Park, “*Structural Insight
 into the Subunit Contact of the
 Influenza Virus RNA Polymerase*” 2nd
 International Symposium on Drug
 Discovery and Design by NMR.
 September 29-30, 2010. Yokohama
 City University (招待講演)
14. 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」大阪大学蛋白質研究所セミナー、
 2010年10月21-22日、(招待講演)
15. Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A,
 Suzuki Y, Tame JR, Nagata K, Park SY.
 Structure of PB1-PB2 subunit
 interface of influenza A virus RNA
 polymerase. IUCr. 2011, 22-30
 August 2011 Palacio Municipal de
 Congresos Madrid, Spain.
16. Yoshida H, Obayashi E, Kawai F,
 Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K,
 Tame JR, Park SY. The structural

basis for the essential PA-PB1
 subunit interaction in influenza
 RNA polymerase. IUCr. 2011, 22-30
 August 2011 Palacio Municipal de
 Congresos Madrid, Spain.

17. Sam-Yong Park, “*Structural Studies
 of the Influenza RNA-polymerase for
 Novel Drug Design*” The 9th
 International Symposium for Future
 Drug Design and Medical Care.
 September 29-30, 2011. Hokkaido
 University (招待講演)

〔図書〕 (計6件)

朴三用：Newton 8月号 「メディカル・ト
 ピックス：万能インフルエンザ治療薬に道
 筋」, 第29巻第8号、117, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称：インフルエンザウイルス由来の NA ポ
 リメラーゼ発現系構築と結晶化及び、抗イン
 フルエンザ薬のスクリーニング方法

発明者：朴三用、尾林 栄治、永田恭介、川
 口敦史

権利者：公立大学法人 横浜市立大学、

国立大学法人筑波大学、

種類：特許権

番号：PCT/JP2009/062140

出願年月日：062140、2009年7月2日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/pd1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴三用 (PARK SAM-YONG)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究
 科・教授

研究者番号：20291932

(2) 研究分担者

福西 快文 (FUKUNISHI YOSHIHUMI)

産業技術総合研究所・バイオメディシナル
 情報研究センター・主任研究員

研究者番号：60357895