

平成23年 6月 1日現在

機関番号：22701
 研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21689014
 研究課題名（和文） 新規抗インフルエンザ薬開発に向けた構造生物学的研究
 研究課題名（英文） Structural studies on influenza viral RNA polymerase for designing new anti-viral drug
 研究代表者
 尾林 栄治（OBAYAH I EIJI）
 横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・特任助教
 研究者番号：50321740

研究成果の概要（和文）：新型インフルエンザウイルス出現の脅威への対策の一つとして、新規抗インフルエンザ薬開発に向けた研究を行った。インフルエンザウイルスの複製に中心的な役割を果たしている RNA ポリメラーゼの働きを阻害する薬剤が効果的な抗ウイルス薬になるため、そのような薬剤を設計するために、RNA ポリメラーゼの立体構造を解明した。また、本研究で使用した RNA ポリメラーゼを基に、RNA ポリメラーゼの働きを抑制する抗体の作成にも成功した。今後、本成果を基にした薬剤開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：As one of the measures to the menace of the new influenza virus appearance, I performed structural studies for designing new anti-influenza viral drug. Because a compound which can inhibit the function of viral RNA polymerase playing a central role in the replication of the influenza virus will be a good candidate, I solved a crystal structure of the RNA polymerase. In addition, using purified RNA polymerase in this study, I succeeded in the making of the antibody which suppressed a function of RNA polymerase. Drug development based on these results is expected in future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2010年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：構造生物学、生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：インフルエンザ、RNA ポリメラーゼ、構造解析

1. 研究開始当初の背景

2009年に発生した豚由来新型インフルエンザによる世界的大流行は、一時的に世界中を混乱に陥れたものの、その毒性は季節性の亜型と同じで弱く、死者数は予想されたものよ

りもずいぶん少なかった。しかし、今後鳥インフルエンザのような強毒型による世界的大流行が起こりうると懸念されており、その対策は世界中の国々にとって非常に深刻な問題である。その対策として、ワクチンと抗

ウイルス薬の備蓄があげられる。実際に多くの先進国では、数千億円からなるような多額の予算を使ってこれらの備蓄が行われている。しかしながら、ワクチンは実際のウイルスを使って作成されるため、実際に流行したインフルエンザ亜型への有効性は全く不透明である。さらに、これまでに開発されている効果的なインフルエンザ薬は、主にウイルス表面に存在するノイラミニターゼ (NA) をターゲットにしているが、NA は変異しやすい性質を持ち、既に薬剤耐性ウイルスが確認されている。そのため、異なる部位をターゲットにした新規薬剤開発を行うなど、対策の手法を多岐に広げておくことが、変異を繰り返して生き延び、流行する感染症に打ち勝つためには重要である。

2. 研究の目的

本研究ではその対策の一つとして、インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼ (vRNAP) をターゲットとした新規抗インフルエンザ薬開発を目指した。vRNAP はウイルスの複製に中心的な役割を果たしているため、非常に良い薬剤ターゲットである。また、その変異はウイルスにとって致命的であり、実際にインフルエンザ亜型間でほとんど変異が確認されておらず、その保存性は非常に高い。そのため、vRNAP をターゲットとして開発された薬剤は、ヒト型のみならず豚型や鳥型などすべての亜型に有効となる可能性が高く、理想的な薬剤ターゲットとして近年注目を集めているが、これまでにそのような薬剤は開発されていない。そこで本研究では、vRNAP の立体構造を明らかにし、その構造を基に、vRNAP の機能を阻害するような新規薬剤開発を進めていく。

3. 研究の方法

(1) vRNAP は PA、PB1 と PB2 の 3 つのサブユニットからなる複合体であり、それぞれのサブユニットに機能性部位を持つ。そのため、vRNAP をターゲットとした薬剤開発を行うためには、vRNAP 全体の立体構造を基にした正確な機能解析を行うことが望ましい。しかしながら、vRNAP 複合体は 250kDa と比較的大きな蛋白質であり、構造解析を行うのに十分な量を得るのは非常に困難である。通常、蛋白質を大量に発現・調製するためには大腸菌を用いた系を構築するが、このような大きな蛋白質を発現する場合には酵母や昆虫細胞を使用するのが効果的であり、本研究でも大腸菌による大量発現を試みると同時に、これらの系も立ち上げた。

(2) 本研究では、vRNAP 全体の構造解析を目指しつつも、薬剤ターゲットになりうる部位の部分的な構造解析も試みた。具体的には、

各サブユニットの機能性ドメイン、サブユニット間結合部位などが挙げられる。実際に研究代表者は既に、vRNAP の PA-PB1 結合部位の立体構造解析に成功している (Obayashi et al. Nature 2008)。そこで PA-PB1 複合体の際と同様に、これらの部位の大腸菌大量発現系を構築し、X 線結晶構造解析による構造解析を行なった。

(3) これまでの本研究により既にその立体構造が明らかにされている PA-PB1 サブユニット複合体を用いて、新規抗インフルエンザ薬開発を目指した。vRNAP がその機能を発揮するためには、3 つのサブユニットすべてが必要であるため、そのサブユニット間結合阻害剤が新規抗インフルエンザ薬の候補となる。そこで PA-PB1 複合体の立体構造を基に *in silico* によるサブユニット間結合阻害剤を探索し、導き出された化合物と複合体の結合を生化学的に解析した。

(4) これまでの本研究により既にその発現に成功している PA-PB1 サブユニット複合体を用いて、PA-PB1 サブユニット複合体に結合することでウイルス複製を阻害するような抗体作成を目指した。調製した数十種類の抗体から強く PA-PB1 サブユニット複合体に結合するものを選び、その特性を調べた。

4. 研究成果

(1) 3 つのサブユニットからなる完全長の vRNAP の発現を、大腸菌及び酵母を用いて試みた。大腸菌を用いた場合、PA および PB2 の発現は確認できたが、PB1 の発現量は非常に少なく、さまざまな条件での発現によっても改善されなかった。また、発現された PB2 も可溶化されず、PB2 と結合する PB1 との共発現でも同様の結果であった。一方、PA は可溶性画分に確認されたものの、その量は少なく、精製および結晶化を行えるほどの量を得ることはできなかった。さらに、GST (グルタチオン S トラंसフェラーゼ) や TF (トリガーファクター) といった、目的蛋白質を可溶化しやすいタグを融合した系や、一般的な Lac および T7 プロモーター以外にも T5 プロモーターを使用した系を作成したが、いずれも劇的に改善することができなかった。そこで、酵母を用いた発現系を構築し、各々のサブユニットでの発現および複合体としての共発現を試みた。研究代表者はこれまでに、本酵母系を用いて 150kDa という比較的大きなタンパク質の発現に成功している。また、本系を用いた共発現により、二つもしくは三つの蛋白質からなる複合体の調製に成功しており、本研究でも同様の系を用いた。しかしながら、酵母を用いた場合でも、大腸菌を用いた際と同様に、PA サブユニット全長の

発現・可溶化には成功したが、PB1 及び PB2 全長の発現・可溶化は確認できなかった。さらに、昆虫細胞を用いた系を立ち上げ、現在まで様々な条件でその発現を試みているが、これまでのところ有用な発現系の構築には至っていない。

(2)薬剤ターゲットになりうる vRNAP の部分的な構造解析も試みた。各サブユニットの機能性ドメイン、サブユニット間結合部位の大腸菌発現系を構築した結果、特に、PB2 の二つのドメイン、Cap 結合ドメインと RNA 結合ドメイン、PB1 の C 末端ドメイン、PA の N 末端ドメイン、および PB2-PB1 サブユニット間結合部位の発現系構築に成功した。そのうち、PB2-PB1 サブユニット間結合部位の結晶作成に成功し、その立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにした(図 1)。さらにこの構造を基に、部位特異的にアミノ酸置換した変異体を調製し、変異体を用いた生化学的解析を行うことで、サブユニット間結合に重要な部位の同定に成功した(図 2)。

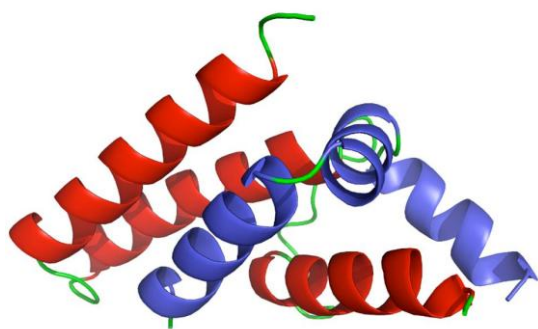


図 1 : PB2-PB1 結合部位の立体構造

PB2 が青色で、PB1 が赤色で示されている。

vRNAP は 250kDa と非常に大きなタンパク質複合体であるにもかかわらず、PB2 のわずかに一残基 (Leu7) の変異が、vRNAP 全体の機能をほぼ失活させるという結果は、新規薬剤開発に向けて非常に有用な情報である。今後は、この部位を阻害するような化合物の探索をその立体構造を基に行っていく。

(3) PA-PB1 サブユニット結合を阻害することでウイルス複製を抑制するような新規薬剤候補化合物を見つけるために、複合体の立体構造を基にして *in silico* によるサブユニット間結合阻害剤を探索した。数百万種類の化合物をコンピューターでスクリーニングし、サブユニット間結合部位に結合しうる化合物を四千種類に絞り込んだ。さらに、その中

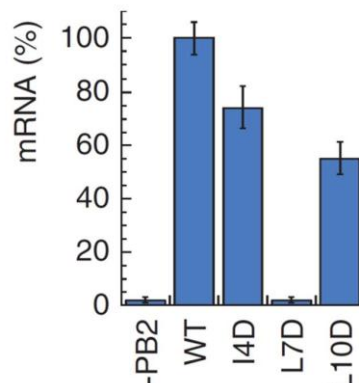


図 2 : 部位特異的アミノ酸置換による vRNAP の活性の変化

PB2 の Leu7 を Asp に置換すると、mRNA 転写活性がほぼ失活する。

からスコアの高いものを数百種類選び、実際に PA サブユニットに結合するか、また PA

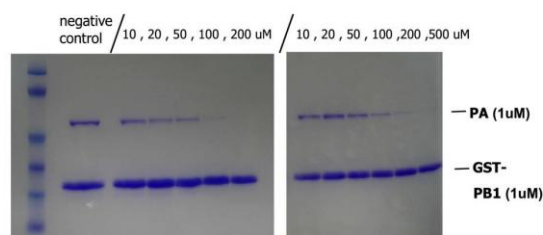


図 3 : 化合物による PA-PB1 結合阻害

薬剤候補化合物存在下で、GST を融合した PB1 を用いて、PA との共沈降実験を行った。左が化合物 1、右が化合物 2 の存在下での結果を示している。どちらも化合物の濃度が濃くなるに従い、PA の PB1 への結合阻害がかかっていることが分かる。

への PB1 結合を阻害するかどうかを確認した。その結果、数種類の結合阻害剤が見つかった(図 3)。これらは新規抗インフルエンザ薬の候補化合物であり、今後実際に vRNAP 活性阻害、ウイルス複製阻害及び細胞毒性を調べることで、新規薬剤としての評価を行っていくとともに、これら化合物構造を基にした *in silico* による化合物の再検索および実際の結合阻害実験を繰り返すことで、薬剤候補化合物の最適化を進めていく。

(4) 調製した PA-PB1 サブユニット複合体を用いて、vRNAP のモノクローナル抗体を作成した。得られた数十種類の抗体から強く PA-PB1 サブユニット複合体に結合するもの、特に PA-PB1 の変性状態でなく立体構造を認識するものを選び、その特性を調べた。その結果、ウイルスの感染した細胞内で vRNAP に結合して核内に運ばれ、ウイルス複製を抑制する抗体を見つけることに成功した。これは、抗体自身が新規薬剤候補となるだけでなく、PA と抗体の結合を利用した新規薬剤のスクリーニングなど、多岐にわたる利用が期待される非常に重要な成果である。今後、その結合部位をターゲットにした新規薬剤開発を進めていくとともに、抗体と vRNAP との結合型の立体構造解析を行い、抗インフルエンザ薬開発に向けたさらなる情報を引き出していく。

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 3 件)

① 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、日本結晶学会誌、査読有、52 巻、2010、271-278

② K. Sugiyama, E. Obayashi, A. Kawaguchi, Y. Suzuki, J. R. H. Tame, K. Nagata and S.-Y. Park, Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase, EMBO Journal, 査読有, Vol.28, 2009, 1803-1811

③ 尾林 栄治、朴 三用、ついに解明！インフルエンザ増殖の謎、化学、査読有、64 巻、2009、25-29

[学会発表] (計 4 件)

① Eiji Obayashi, The structural study on influenza RNA polymerase for designing new anti-viral drug, The 10th conference of the Asian Crystallographic Association (招待講演), 2010 年 11 月 2 日, BEXCO、釜山 (韓国)

② 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 47 回日本蛋白質科学会、2010 年 6 月 16 日-18 日、北海道大学

③ 吉田尚史、尾林 栄治、河合文啓、川口敦史、永田恭介、タイム 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 47 回日本蛋白質科学会、2010 年 6 月 16 日-18 日、北海道大学

④ 尾林 栄治、インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼにおけるサブユニット間相互作用、日本生物物理学会第 47 回年会、2009 年 10 月 30 日、アスティ徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾林 栄治 (OBAYASHI EIJI)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・特任助教

研究者番号：50321740