

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659227

研究課題名（和文） 化合物ライブラリーを用いたウイルスポリメラーゼの機能解析

研究課題名（英文） Functional Analysis of Influenza Virus RNA Polymerase using compound libraries

研究代表者

竹内 薫 (TAKEUCHI KAORU)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00192162

研究成果の概要（和文）：化合物ライブラリーを用いた、インフルエンザウイルスポリメラーゼの機能を阻害する候補化合物の探索、およびケミカルバイオロジーに基づいた候補化合物の作用メカニズムの解明を行った。約 300 万種の化合物ライブラリーから、*in silico* 解析および感染阻害効果の評価を行い、有用な候補化合物およびそれに対する変異ウイルスを同定することに成功した。今後は、変異部位の詳細な機能解析を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：From compound libraries, we tried to isolate the candidate compounds which inhibit the function of influenza virus RNA polymerase and to clarify how they inhibit the polymerase using a chemical biology approach. We screened the libraries containing 3 million compounds by *in silico* analysis and the inhibitory effect on infection. Finally, we succeeded to isolate candidate compounds and the mutant viruses against them. Now, we are analyzing the function of mutations in more detail.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：ウイルス学

 キーワード：化合物ライブラリー、インフルエンザウイルス、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ、*In silico* 解析、抗ウイルス薬、分子生物学、ゲノム複製

1. 研究開始当初の背景

ウイルスポリメラーゼは PB1、PB2 および PA の 3 つのサブユニットからなる複合体である。我々はこれまでに横浜市立大学 朴三用 博士との共同研究により、ウイルスポリメラーゼ複合体形成に必要なドメインを部分構造として決定しており、また、ウイルスポリメラーゼと相互作用する宿主因子も複数同定している。近年、世界各地で脅威をもたらした高病原性トリ型インフルエンザウイルス (H5N1) の詳細な解析が行われた結果、ウイルスポリメラーゼ複合体を構成するサブユニットの 1 つ (PB2) の点変異が哺乳類動物での高病原性に関与していること

が示された。このようにウイルスポリメラーゼはゲノムの複製だけでなく、病原性や宿主域の決定にも重要な機能を持つと考えられる。また、ウイルスポリメラーゼの複雑な機能を解明することにより、従来の抗インフルエンザウイルス薬に耐性を示すウイルスにも有効な、新たなアプローチによる新規の抗インフルエンザウイルス薬の開発も期待される。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼはゲノムの複製だけでなく、病原性や宿

主域の決定にも関与し、ウイルス株間で非常に保存性が高い。よって、ウイルスポリメラーゼの機能を理解することで、ウイルスの増殖メカニズムを詳細に解明することができると考えられる。本研究では、ウイルスポリメラーゼの機能解明をめざした基盤研究として、化合物ライブラリーを用いた、(1) ウイルスポリメラーゼの機能を阻害する候補化合物の探索、および(2) ケミカルバイオロジーに基づいた候補化合物の作用メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず、化合物ライブラリーからウイルスポリメラーゼの構造を標的とした候補化合物を *in silico* 解析によりスクリーニングを行った。次に、候補化合物を用いて感染実験を行い、阻害効果について評価し、新規抗ウイルス薬の探索を行った。さらに、阻害効果の得られた化合物の中からポリメラーゼに変異を導入した変異ウイルスを用いてランダムスクリーニングを行い、野生型ウイルスと相反する阻害効果をもつ変異ウイルスを同定することで、候補化合物の作用メカニズムおよびウイルスの増殖機構の解明を試みた。

(1) ウイルスポリメラーゼの機能を阻害する候補化合物の探索。

① ウイルスポリメラーゼの構造を標的とした *in silico* 解析。近年、ウイルスポリメラーゼ複合体形成に必要なタンパク質構造および重要な機能ドメインに関する部分結晶構造は複数決定されている (図 1)。

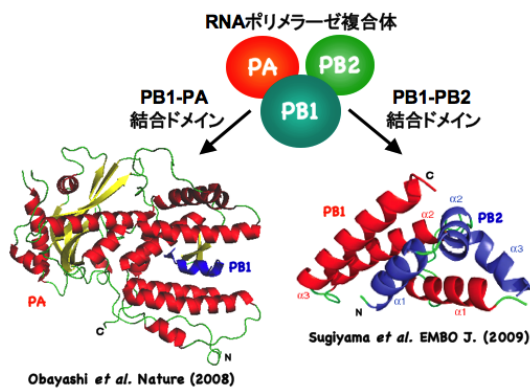


図 1. ウイルスポリメラーゼ複合体の部分構造

本研究では、約 300 万種の化合物ライブラリーを用いてポリメラーゼの機能ドメインを阻害するような候補化合物を産総研および横浜市立大との共同研究より *in silico* 解析した。② 候補化合物の感染阻害効果の評価。*in silico* 解析の結果を基に、スコアの高い化合物から順次、感染阻害効果を検討した。感染阻害効果の評価には、A 型インフルエンザウ

イルス WSN 株 (A/WSN/33, H1N1) を用い、候補化合物存在下でブランクアッセイ法によって評価し、2 次スクリーニングを行った。

(2) ケミカルバイオロジーに基づいた候補化合物の作用メカニズムの解明。

① ウイルスポリメラーゼに変異を導入した変異ウイルスの作製。リバーシジェネティクス法 (図 2) を用いて、ウイルスポリメラーゼにランダムに変異を導入した変異ウイルスライブラリーを作製した。本研究では、PB1、PB2、および PA のそれぞれについてランダムに変異を導入したウイルスゲノム発現用プラスミドを用いることで、3 種類の変異ウイルスライブラリーを作製した。

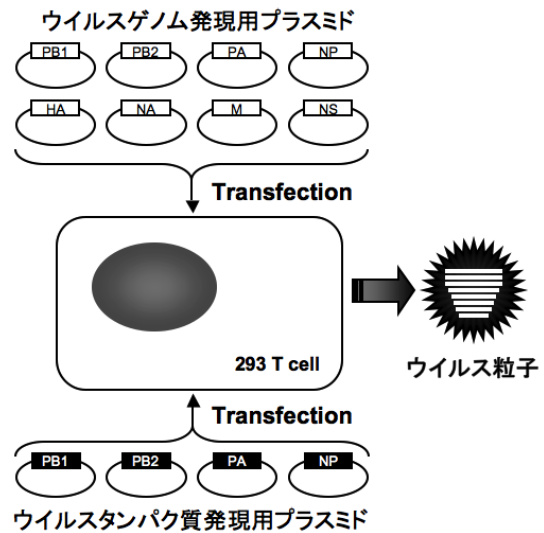


図 2. リバーシジェネティクス法

② 候補化合物の作用メカニズムの解析。野生型ウイルスと相反する感染阻害効果を示した変異ウイルスについて詳細な作用メカニズムを解析する。先行研究により、ウイルスポリメラーゼ複合体形成に関与するドメインは、複合体形成能のみならず RNA 合成活性を制御する機能をもつと推測される(杉山ら、EMBO J, 28: pp.1803-1811, (2009))。そこで、(1)によって得られた候補化合物が、(i) ウイルスポリメラーゼに結合することでポリメラーゼ複合体形成を実際に阻害しているのか、もしくは (ii) 複合体形成能を維持しつつ RNA 合成活性のみを阻害しているのかについて検討を行う。候補化合物を用いて、野生型および変異ウイルスのウイルスポリメラーゼ複合体形成能および RNA 合成活性阻害効果を比較することで、複合体形成能および RNA 合成に寄与しているアミノ酸を同定することができると期待される。さらに、そのアミノ酸の機能について詳細な作用メカニズムを解析する。

4. 研究成果

(1) ウイルスポリメラーゼの機能を阻害する候補化合物の探索。インフルエンザウイルスポリメラーゼ三量体のうち、PB1-PAおよびPB1-PB2の結合ドメインの結晶構造をもとに *in silico* スクリーニングを行い、約300万種の化合物ライブラリーの中から約300種類の機能阻害候補化合物を選定した。これら候補化合物について、野生型ウイルスを用いたプラークアッセイ法により感染阻害効果の評価を行い、感染阻害効果を示す化合物を数種類得ることができた (図3)。

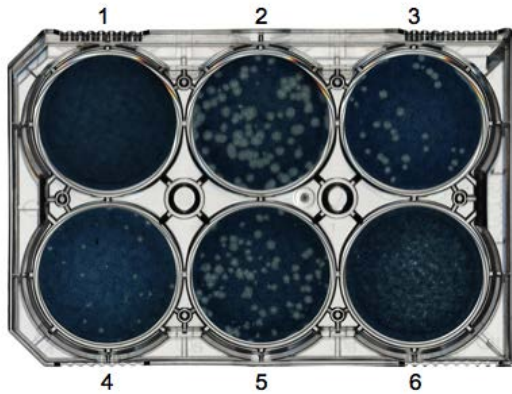


図3. 候補化合物を用いた感染阻害効果の結果の一例

1. 非感染、2. 感染、3. 感染+化合物A、
4. 感染+化合物B、5. 感染+化合物C、
6. 感染+化合物D

(2) リバーズジェネティクス法により、ウイルスポリメラーゼにランダムに変異を導入した変異ウイルスライブラリーを作製した。これらの変異ウイルスを用いて、野生型ウイルスと同様に約300種類の候補化合物について感染阻害効果の評価を行った結果、野生型ウイルスと異なる阻害効果を示す化合物Eおよび変異ウイルスXを単離することに成功した (図4)。この化合物Eは野生株および他の変異株二対する感染阻害効果を示さないものの、変異ウイルスXに対して顕著な阻害効果を示すことが明らかになった。

この変異ウイルス X は複数の変異を含んでいたため、我々はさらに点変異ウイルスを作製し、責任変異を同定することにも成功した。この変異ウイルス X は PB1 変異ウイルスライブラリーから単離したもので、変異部位は PA との結合ドメイン付近に位置していた。

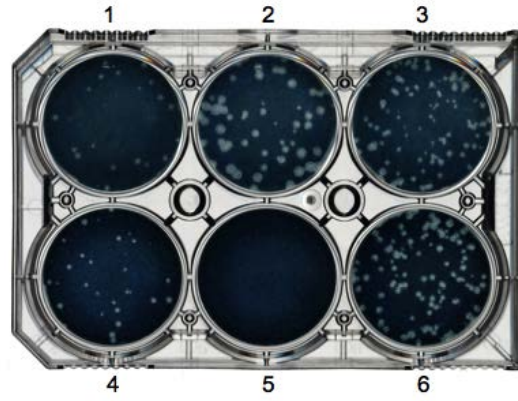


図4. 変異ウイルスを用いた感染阻害効果の結果

1. 変異ウイルス X、2. 変異ウイルス Y、
3. 野生型ウイルス、
4. 変異ウイルス X+化合物 E、
5. 変異ウイルス Y+化合物 E、
6. 野生型ウイルス+化合物 E

また、感染6時間後における変異ウイルス X の RNA 合成活性を解析したところ、変異ウイルス X は化合物 E 存在下および非存在下のいずれにおいても野生型ウイルスより高い RNA 合成活性を示したものの、化合物 E の RNA 合成活性阻害効率は野生型ウイルスとほぼ同じであった (図5)。

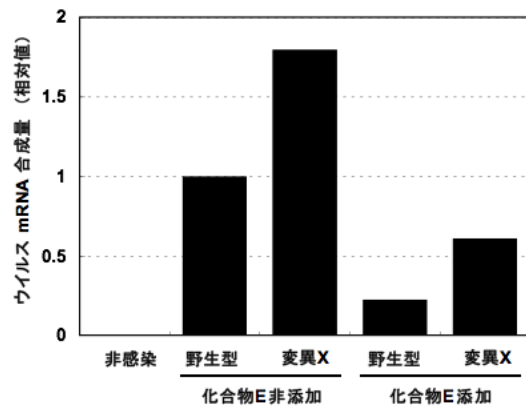


図5. RNA 合成活性に対する化合物 E の効果

今後は、この化合物 E がウイルスポリメラーゼに結合することでポリメラーゼ複合体形成を実際に阻害しているのかについて、ウイルス RNP 複合体形成の再構成系を用いて検討を行う予定である。また、現在、化合物 E および変異ウイルス X 以外の候補化合物および変異ウイルスについても詳細な解析を行っている。

本研究成果は、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に貢献し、新型および高病原性インフルエンザウイルス

スの脅威を取除くだけでなく、抗ウイルス薬を用いたインフルエンザウイルスの基盤研究の発展にも貢献すると考えられる。

トリ型インフルエンザウイルスなど、異なる生物種に由来するウイルス株が種を超えた感染能を獲得する際、レセプター認識の他にウイルスゲノム機能自体が異種の宿主因子へ適応することが必要であると推測されている。本研究を応用することで、ウイルスポリメラーゼと宿主因子の相互作用を詳細に解析することができると考えられる。それによって、インフルエンザウイルスの種を超えた感染能獲得過程を解析することも可能になる。これらの基盤研究を通じて、新たな創薬の分子標的の発掘に資することは、インフルエンザウイルス感染症を制御する上で意義深いと考えられる。

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)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 薫 (TAKEUCHI KAORU)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00192162

(2)連携研究者

若井 ちとせ (WAKAI CHITOSE)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：00383662