

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08248

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスゲノムRNAの構造学的研究と新規インフルエンザ治療薬の開発

研究課題名(英文) Structural study of the influenza virus genome RNA and development of anti-flu medicines

研究代表者

近藤 次郎 (Jiro, Kondo)

上智大学・理工学部・准教授

研究者番号：10546576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はインフルエンザウイルス感染症治療薬のデザイン・開発を目的としたものである。申請者はまず、インフルエンザウイルスの8つに分節された一本鎖ゲノムRNA(vRNA)とそれらの対鎖RNA(cRNA)の立体構造をX線結晶解析を使って明らかにした。そして、得られた構造スナップショットをつなぎ合わせて動画を作り、vRNAとcRNAの動的構造変化を観察した。さらに、vRNAとcRNA、および立体構造が良く似たりボソームRNA分子スイッチへのアミノグリコシド薬剤の結合様式を解析した。以上で得られた立体構造情報を用いて、vRNAとcRNAに結合する候補薬剤のデザインを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスのゲノムRNA(vRNA)およびその対鎖RNA(cRNA)の立体構造およびその動的構造変化を高分解能で詳しく観察し、インフルエンザウイルス感染症治療薬のデザインのための立体構造情報を取得することに成功した。この構造情報は近日中にProtein Data Bankで公開され、全世界で利用可能になる。また、本研究ではRNAの結晶化と構造解析技術に進展が見られた。現在、RNAを標的とした低分子医薬品や核酸医薬品(中分子医薬品)の開発の機運が高まっており、本研究で確立された実験手法は幅広く活用されると期待できる。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study was to design and develop drugs for the treatment of influenza virus infection. We first revealed the three-dimensional structures of eight segmented single-stranded influenza virus genomic RNAs (vRNA) and their counter-stranded RNAs (cRNA) using X-ray crystallography. The obtained structural snapshots were then connected to create movies to observe the dynamic structural changes of vRNA and cRNA. Furthermore, we analyzed the binding mode of aminoglycosides to vRNA, cRNA and the ribosomal RNA switch. We designed drug candidates that bind to vRNA and cRNA based on the three-dimensional structural information obtained in this study.

研究分野：構造生命科学

キーワード：X線結晶解析 ドラッグデザイン インフルエンザウイルス 抗ウイルス薬 アミノグリコシド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス感染症は、高熱や激しい頭痛・筋肉痛・関節痛だけでなく、肺炎・急性脳症・ライ症候群などの深刻な合併症を伴う重篤な疾病である。季節性インフルエンザの国内感染者数は年間約 1000 万人、死亡者数は約 1 万人と推定されている。今日においてはタミフルなどのノイラミニダーゼ阻害剤がインフルエンザ治療薬として処方されているが、服用による異常行動や突然死といった重大な副作用に加えて、薬剤耐性ウイルスの出現もすでに報告されている。最近ではアビガンという RNA ポリメラーゼ阻害剤も開発されたが、胎児に対する催奇形性が指摘されており、条件付きの製造販売承認にとどまっている。このような状況において、新しい発想によるインフルエンザ治療薬の開発は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスは 8 つに分節された一本鎖ゲノム RNA をもっている。これら 8 つのゲノム RNA と、複製の過程で作られる 8 つの対鎖 RNA の両末端には、プロモーター領域と呼ばれる互いに相補的で保存性の高い配列が存在する。通常この領域は安定な二本鎖構造をとっているが、ここに RNA ポリメラーゼが結合すると二本鎖が一本鎖にほだけ、複製・転写が開始されることが最近明らかになった (図 1: Tomescu *et al.*, 2014 *PNAS*)。したがって、薬剤によってプロモーター領域の二本鎖から一本鎖への構造変化を妨げれば、ゲノム RNA の複製・転写の開始を阻害してウイルスの増殖を抑えることができる。しかし、RNA ポリメラーゼが結合した一本鎖状態のプロモーター領域の立体構造は最近解明されたものの (Pflug *et al.*, 2014 *Nature*)、二本鎖状態の構造と、一本鎖への動的構造変化は明らかにされていなかった。

そこで申請者は、インフルエンザウイルスのゲノム RNA・対鎖 RNA のプロモーター領域の二本鎖構造、および一本鎖への動的構造変化を観察して、インフルエンザゲノム RNA の複製・転写の開始機構を解明し、新しいタイプのインフルエンザ治療薬を設計・開発することを本研究の目的とした。

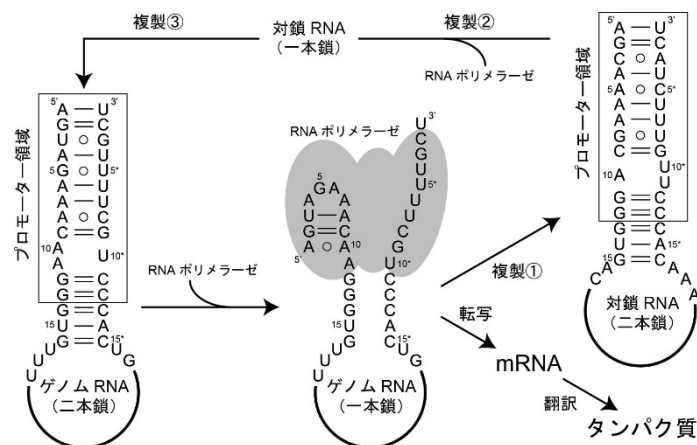


図 1. ゲノム RNA の複製・転写開始前後でのプロモーター領域の構造変化のモデル
* 対鎖 RNA (一本鎖) は構造を省略

3. 研究の方法

A 型インフルエンザウイルスのゲノム RNA (vRNA) および転写によって合成される対鎖 RNA (cRNA) のプロモーター領域を、二本鎖の両末端に導入したモデル分子を設計、化学合成した。このサンプルを精製し、当研究室独自の結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化初期条件を検索し、その結果を基に結晶化条件の最適化を行った。vRNA と cRNA プロモーターそれぞれの単体の結晶化と、7 種類のアミノグリコシドとの共結晶化を行った。X 線回折実験は Photon Factory (つくば) で行い、分子置換法によって立体構造を決定した。

4. 研究成果

(1) vRNA の動的構造変化の観察

vRNA の 4 種類の結晶系について構造解析を行った結果、vRNA プロモーターの内部ループ部分について合計 9 個の構造を明らかにすることができた。内部ループの上下では、共通して相補的な Watson-Crick 型 G=C、A-U 塩基対と、非相補的な CoA 塩基対によってステムが形成されていた。そして、内部ループのコンフォメーションは 3 種類に分類することができた (図 2)。

vRNA プロモーターの内部ループは、3 種類のコンフォメーションの間で柔軟に構造変化を起こすことがわかった。具体的には、5'末端から 10 番目 (青) と 11 番目 (赤) の A が、内部ループの内側に入って 3'末端側プロモーター配列と塩基対を形成したり、外側にバルジアウトしたりする。RNA 合成酵素は、vRNA プロモーター二本鎖構造の柔軟な内部ループを認識して、この位置から鎖をほどこき、コークスクリュー型構造へと変化させる可能性がある。

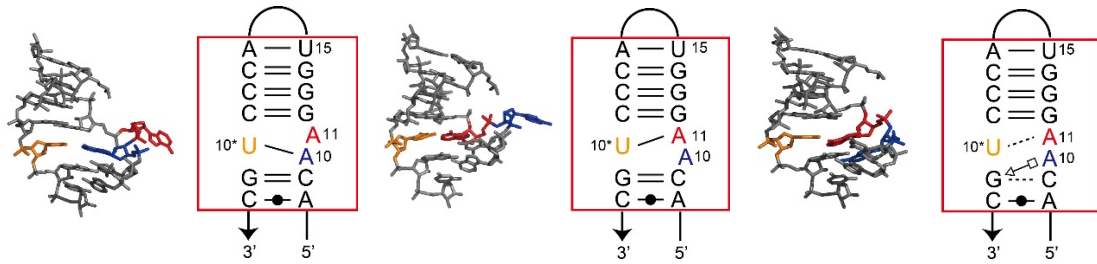


図 2. vRNA プロモーターの内部ループの 3 種類のコンフォメーション

(2) RNA 合成酵素結合による vRNA プロモーターの動的構造変化

今回得られた vRNA プロモーター単体の構造と、既に解かれている RNA 合成酵素 PA サブユニット単体の構造 (He *et al.*, 2008 Nature)、さらには RNA 合成酵素-PA-PB1-PB2 と vRNA プロモーターの複合体の構造 (Pflug *et al.*, 2014 Nature) とを合わせ、プロモーターの動的構造変化を考察した。

RNA 合成酵素は三量体であり、そのうち PA サブユニットが vRNA プロモーターの開裂に関わっているとされている。PA サブユニットは His510 を中心に楔の形を形成し、vRNA に結合すると内部ループの 5'末端側 10 番目の U とスタッキングする (図 3 右下)。このことから、PA サブユニットは今回の結晶構造からわかった vRNA プロモーターの柔軟な内部ループ部分を認識して、His510 を中心に二本鎖を開裂させていると考えられる。または His510 が内部ループの 5'末端側 10 番目の U の上に挿し込まれ、柔軟な内部ループの位置から二本鎖をほどいていると考えられる。

RNA 合成酵素と RNA プロモーターとの複合体を観察すると (図 3 右)、鋳型となる 3'末端側プロモーターは、RNA 合成活性をもつ PB1 (図 3 右: 水色のタンパク質) へと輸送されることがわかる。一方で 5'末端側プロモーターは PA-arch によって固定されていることがわかる。vRNA プロモーターが結合していない状態での RNA 合成酵素の PA-arch は、その構造が観察できていないことから、とても柔軟な動きをする部分であると考えられる。ここに vRNA プロモーターが結合すると、開裂した 5'末端側プロモーターが PA-arch と PB1 の一部に挟み込まれ固定されると考えられる。以上のことから、この PA-arch は vRNA プロモーターをコークスクリュー型構造に安定化して、転写・複製を開始させるはたらきをしていることがわかった。

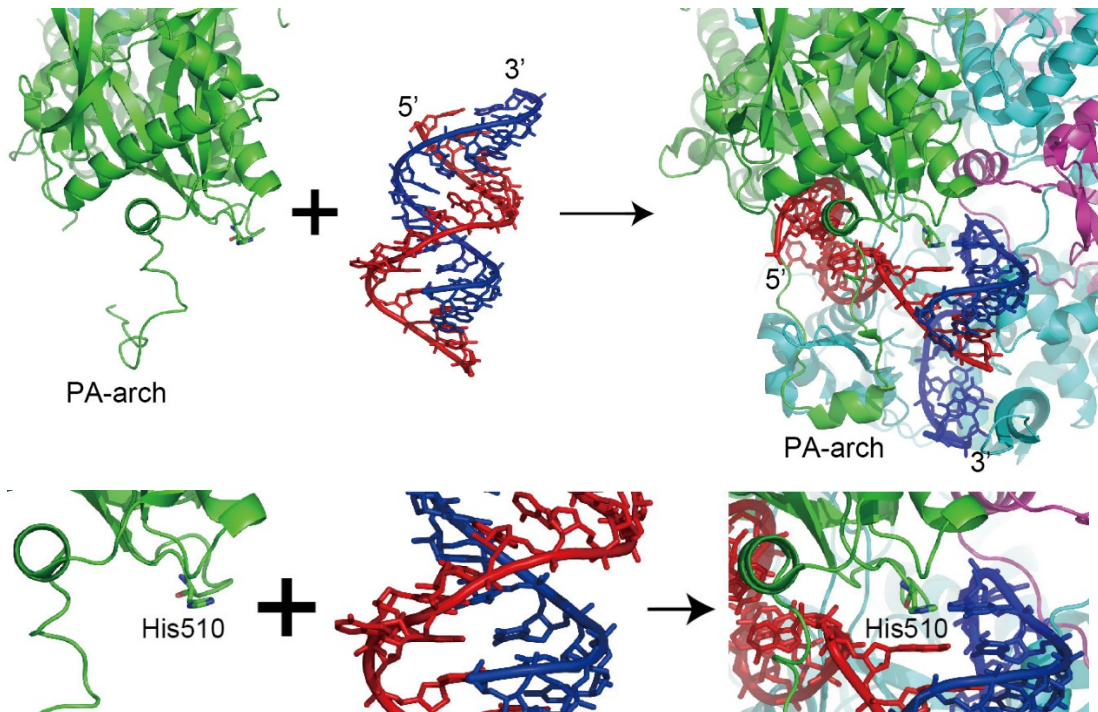


図 3. RNA 合成酵素結合による vRNA プロモーターの動的構造変化のモデル (上) と、RNA 合成酵素 PA サブユニットの His510 周辺の拡大図 (下)

- (左) RNA 合成酵素 PA サブユニット単体の結晶構造
- (中央) 今回明らかにした vRNA プロモーター二本鎖構造
- (右) RNA 合成酵素 PA-PB1-PB2 と vRNA プロモーターの複合体の構造

(3) cRNA の動的構造変化の観察

cRNA の 2 種類の結晶形について構造解析を行ったところ、プロモーターの内部ループ部分について、合計 3 個の構造を明らかにすることができた。内部ループの上下では、共通して相補的な G=C、A-U 塩基対と、非相補的な GoU 塩基対によってステムが形成されていた。そして、内部ループのコンフォメーションは 2 種類に分類することができた (図 4)。

cRNA プロモーターの内部ループは、コンフォメーション 1、2 の間で柔軟に構造変化を起こすことがわかった。具体的には、3'末端から 11 番目 (青) と 10 番目 (赤) の A のどちらかが内部ループの内側に入って、5'末端側から 10 番目の A (オレンジ) と塩基対を形成したり、外側にバルジアウトしたりする。RNA 合成酵素は、cRNA プロモーター二本鎖構造の柔軟な内部ループを認識して、この位置から鎖をほどこき、コークスクリュー型構造へと変化させる可能性がある。

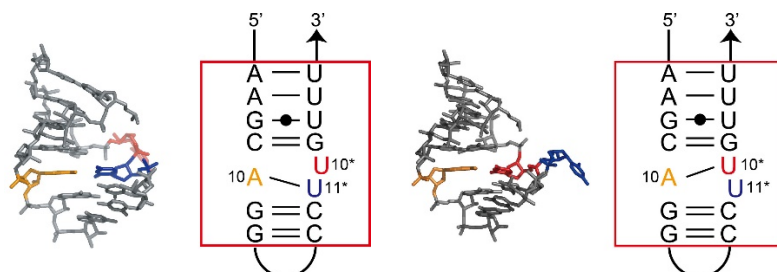


図 4. cRNA プロモーターの内部ループの 2 種類のコンフォメーション

(4) vRNA および cRNA を標的とする新規アミノグリコシドおよび核酸医薬品の設計

今回得られた構造情報を利用して、vRNA プロモーターの内部ループを標的とした新規アミノグリコシドの設計を行った。まず、アミノグリコシドが結合するリボソーム RNA 分子スイッチの内部ループ構造と、今回明らかにした vRNA プロモーターの内部ループ構造を比較したところ、後者のほうが結合ポケットの幅が広がっていることがわかった (図 5)。そこで、前者に結合するアミノグリコシドの ring I に糖環を 1 つ加えて、後者の広がった結合ポケットを埋めることで vRNA プロモーターの内部ループに強く結合することが期待できる新規アミノグリコシドを設計した (図 6)。さらに、vRNA および cRNA を標的とした核酸医薬品の設計にも着手しており、この医薬品の骨格となる 4 種類の RNA 構造モチーフの構造解析にも成功した。

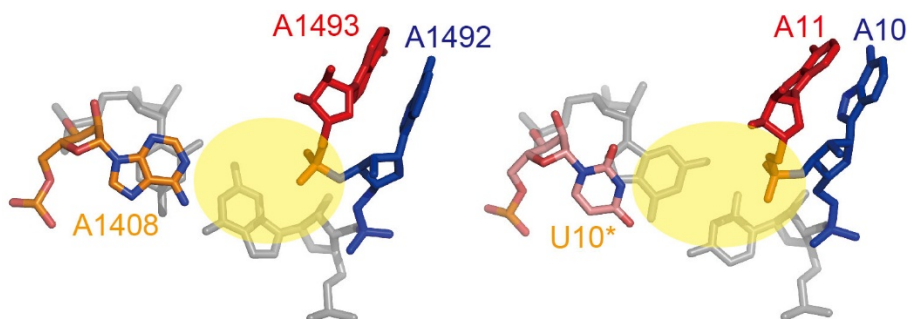


図 5. アミノグリコシド ring I 結合ポケットの比較

(左) 細菌リボソーム RNA 分子スイッチ
(右) インフルエンザ vRNA プロモーター

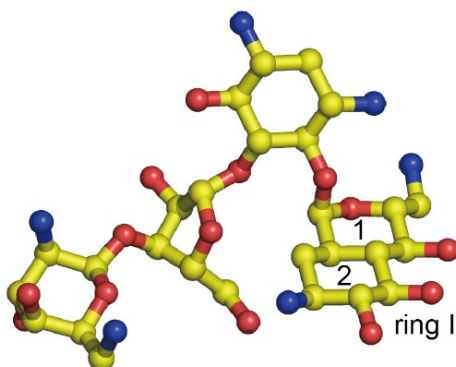


図 6. 設計した新規アミノグリコシド
既存のアミノグリコシドの ring I は糖環 1 のみをもつが、これに糖環 2 を付けた

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanazawa Hiroki, Saavedra Oscar M., Maianti Juan Pablo, Young Simon A., Izquierdo Luis, Smith Terry K., Hanessian Stephen, Kondo Jiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure-Based Design of a Eukaryote-Selective Antiprotozoal Fluorinated Aminoglycoside	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 1541 ~ 1548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.201800166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kanazawa Hiroki, Baba Fumika, Koganei Mai, Kondo Jiro	4. 巻 45
2. 論文標題 A structural basis for the antibiotic resistance conferred by an N1-methylation of A1408 in 16S rRNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 12529 ~ 12535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkx882	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 Kondo Jiro, Koganei Mai	4. 巻 25
2. 論文標題 Structural Bases for the Fitness Cost of the Antibiotic-Resistance and Lethal Mutations at Position 1408 of 16S rRNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 159 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25010159	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 Meyer Melanie, Walbott Helene, Olieric Vincent, Kondo Jiro, Costa Maria, Masquida Benoit	4. 巻 25
2. 論文標題 Conformational adaptation of UNCG loops upon crowding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1522 ~ 1531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.072694.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 8件)

1. 発表者名 長嶋未来、鈴木千晴、甘樂明里、内田ゆり子、窪寺健太、小野晶、近藤次郎
2. 発表標題 リボソームRNA分子スイッチの立体構造に与える銀・水銀の影響の解析
3. 学会等名 NART Meeting 2018 -未来核酸テクノロジー研究会-
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長嶋未来、鈴木千晴、甘樂明里、内田ゆり子、窪寺健太、小野晶、近藤次郎
2. 発表標題 リボソームRNA分子スイッチの立体構造に与える銀・水銀イオンの影響の解析
3. 学会等名 日本核酸医薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanazawa Hiroki、Saavedra Oscar M.、Maianti Juan Pablo、Young Simon A.、Izquierdo Luis、Smith Terry K.、Hanessian Stephen、Kondo Jiro
2. 発表標題 Structure-based design of a eukaryote-selective aminoglycoside
3. 学会等名 ISNAC2018 (The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miki Nagashima, Chiharu Suzuki, Akari Tsudura, Yuriko Uchida, Kenta Kubodera, Akira Ono, Jiro Kondo
2. 発表標題 Effects of Hg(II) and Ag(I) on the structure of the rRNA A site molecular switches
3. 学会等名 ISNAC2018 (The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Kanazawa, Nao Tsurumi, Jiro Kondo
2. 発表標題 Crystal structure of the human ribosomal decoding A site in complex with G418 possessing readthrough activity
3. 学会等名 ISNAC2017 (The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miki Nagashima, Jiro Kondo
2. 発表標題 Structural study of the kink-turn motif
3. 学会等名 ISNAC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Nagashima, Jiro Kondo
2. 発表標題 X-Ray analyses of natural and modified RNA kink-turn motifs
3. 学会等名 AsCA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sao Sekiguchi, Jiro Kondo
2. 発表標題 Structural study of the bulged-G motif observed in functional RNAs
3. 学会等名 AsCA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asaki Hayasaka, Jiro Kondo
2. 発表標題 Structural study of the GNRA tetraloop and its receptor motif observed in functional RNAs
3. 学会等名 AsCA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotomi Ishikawa, Jiro Kondo
2. 発表標題 X-Ray analyses of the ribosomal RNA A site molecular switch with fluorescent nucleobase 2-aminopurine
3. 学会等名 AsCA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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