

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291016

研究課題名(和文) インフルエンザRNAポリメラーゼのウイルス増殖における分子制御

研究課題名(英文) The mechanism analysis of influenza RNA polymerase

研究代表者

朴 三用 (Park, Sam-Yong)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20291932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ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、他のタンパク質と比べ変異が起こることが少ないため新規薬剤ターゲットとして注目されている。本研究ではRNAポリメラーゼの断片に結合するモノクローナル抗体を作製し、ウイルス増殖の阻害抗体の開発をする目的で、抗原としてウイルスの増殖を阻害PA11.9抗体作製に成功した。

また、PB2のRNA結合部位からの抗体の中から二つ結合確認が認められた。抗体PB2 3-1.6については、抗原タンパク質と強く結合する事が確認された。抗体は分子生物学的研究ツールでの診断試薬として使用可能として特許出願行った(特願2014-068824)。

研究成果の概要(英文)：Influenza RNA polymerase plays vital roles in the virus life cycle and, since it is much more highly conserved than other influenza virus proteins, it is of great interest as a drug target. This laboratory has created monoclonal antibodies that bind to fragments of the polymerase and block viral replication. Antibody PA11.9 binds to the PA subunit carrying the RNA polymerisation active site.

Two other antibodies were shown to bind to the RNA-binding PB2 subunit of the polymerase, including antibody PB2 3-1.6, which has notably high affinity for its target. This antibody has been patented as a research tool and diagnostic reagent (patent number 2014-068824).

研究分野：構造生物学

キーワード：インフルエンザ RNAポリメラーゼ 抗体

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスには、抗原性の大きな違いからウイルス粒子の外被表面のタンパク質である HA(ヘマグルチニン)16種類と NA(ノイラミニダーゼ)9種類の組み合わせにより、144通りの亜型が存在し得る。20世紀に入り人類は3回の新型インフルエンザの登場を経験した。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)と香港型(A/H3N2)へ姿を変えた。新型インフルエンザが出現すれば、人類は過去にこの新型ウイルスの感染を受けたことがないため当然体内に中和抗体は存在せず、また対応するワクチンの開発にも時間がかかるため、新型ウイルスの感染者が一時的に増加し、世界規模での大流行(パンデミック)となることは容易に予想される。

本研究では、これまでタンパク質の精製すら困難であった RNA ポリメラーゼを標的としたモノクローナル抗体を作製し、宿主細胞内でインフルエンザウイルスの増殖を阻害する抗体開発を目指す。さらに、抗体を応用したヒト宿主細胞内でのウイルス増殖メカニズムの解明、および抗体とのタンパク質複合体の構造解明による抗体から創薬基盤構築を目指す。作製した抗体を効率よく細胞内へ導入する方法が開発されれば、抗体そのものが阻害剤になる。今までの抗インフルエンザの阻害剤開発と全く異なる試みである。また、得られる構造情報は、抗インフルエンザウイルスのペプチドおよび低分子創薬の基盤となり、将来的にどのインフルエンザウイルスにも効果のある画期的な創薬の基盤構築につながると期待される。

2. 研究の目的

インフルエンザ 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こることが少ないため新規薬剤ターゲットとして注目されている。本申請者は、RNA ポリメラーゼが持つ3つのサブユニット(PA, PB1, PB2)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、PA/PB1とPB1/PB2サブユニット複合体の構造解析に世界で初めて成功した(*Nature*, 2008; *EMBO J*, 2009)。その知見を基に本研究では、これらの RNA ポリメラーゼの断片に結合するモノクローナル抗体を作製し、ウイルス増殖の阻害抗体の開発を行う。さらに、抗体を用いたヒト細胞内におけるウイルス増殖メカニズムの解明、および抗体とのタンパク質複合体の構造解明による抗体から医薬への創薬基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

研究代表者グループ(朴三用、杉山佳奈子)は、抗原タンパク質 RNA ポリメラーゼの大量発現や構造解析、抗体の精製、タンパク質と抗体の結合測定を担当し研究を総括する。研究分担者(浦野健:島根大学医学部)は、モノクローナル抗体作製、細胞実験による阻害抗体の確認などを担当する。抗原タンパク質 RNA ポリメラーゼと阻害抗体との複合体の構造情報が得れば、相互作用に参与している抗体の超可変領域のアミノ酸を特定し、創薬につながる構造基盤の構築を目指す。

4. 研究成果

インフルエンザ 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、他のタンパク質と比べ変異が起こることが少ないため新規薬剤ターゲットとして注目されている。本研究では RNA ポリメラーゼの断片に結合するモノクローナル抗体を作製し、ウイルス増殖の阻害抗体の開発をする目的で、抗原としてウイルスの増殖を阻害 PA11.9 抗体作製に成功した。また、PB2 の RNA 結合部位からの抗体の中から二つ結合確認が認められた。抗体 PB2 3-1.6 については、抗原タンパク質と強く結合する事が確認された。抗体は分子生物学的研究ツールでの診断試薬として使用可能として特許出願を行った(特開 2015-189715)。

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 8 件)

1. Shibayama N, Sugiyama K, Tame JR, Park SY. Capturing the Hemoglobin Allosteric Transition in a Single Crystal Form. *J Am Chem Soc.* 2014 Apr 2;136(13):5097-105.
2. Sugiyama K, Iyori M, Sawaguchi A, Akashi S, Tame JR, Park SY, Yoshida S. The crystal structure of the active domain of Anopheles anti-platelet protein, a powerful anti-coagulant, in complex with an antibody. *J Biol Chem.* 2014 Jun 6;289(23):16303-16312.
3. Voet AR, Noguchi H, Addy C, Simoncini D, Terada D, Unzai S, Park SY, Zhang KY, Tame JR. Computational design of a self-assembling symmetrical -propeller protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Oct 21;111(42):15102-7.
4. Hirano T, Sugiyama K, Sakaki Y, Hakamata W, Park SY, Nishio T. Structure-based analysis of domain function of chitin oligosaccharide

- deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEBS Lett.* 2015 Jan 2;589(1):145-51.
5. Noguchi H, Ikegami T, Nagadoi A, Kamatari YO, Park SY, Tame JR, Unzai S. The structure and conformational switching of Rap1B. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jun 19;462(1):46-51. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.103.
 6. Yoshida H, Park SY, Oda T, Akiyoshi T, Sato M, Shirouzu M, Tsuda K, Kuwasako K, Unzai S, Muto Y, Urano T, Obayashi E. A novel 3' splice site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit. *Genes Dev.* 2015 Aug 1;29(15):1649-60. doi: 10.1101/gad.267104.115.
 7. Kaneko M, Watashi K, Kamisuki S, Matsunaga H, Iwamoto M, Kawai F, Ohashi H, Tsukuda S, Shimura S, Suzuki R, Aizaki H, Sugiyama M, Park SY, Ito T, Ohtani N, Sugawara F, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. A Novel Tricyclic Polyketide, Vanitaracin A, Specifically Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses by Targeting Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J Virol.* 2015 Dec;89(23):11945-53. doi: 10.1128/JVI.01855-15.
 8. Jo CH, Kim J, Han AR, Park SY, Hwang KY, Nam KH. Crystal structure of *Thermoplasma acidophilum* XerA recombinase shows large C-shape clamp conformation and cis-cleavage mode for nucleophilic tyrosine. *FEBS Lett.* 2016 Mar;590(6):848-56. doi: 10.1002/1873-3468.12109.
- [学会発表](計 10 件)
1. Sam-Yong Park, "Structural Studies of the Influenza RNA-polymerase for Novel Drug Design" Meeting of the Italian, Spanish and Swiss crystallographic associations, MISSCA2013, September 9-12 2013, Como Italy. (招待講演)
 2. 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」CBI学会2013年大会 -生命医薬情報学連合大会-、タワーホール船堀、2013年10月28-31日、(招待講演)
 3. Sam-Yong Park, "The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase" International School of Crystallography, 30 May-8 June 2014, Erice, Italy.
 4. リガンド結合状態及び非結合状態のケナガマンモスヘモグロビンの結晶構造。野口 大貴、雲財 悟、キャンベル ケビン、ホーチェン、朴三用、ティムジェレミー、第14回日本蛋白質学会 横浜、2014年6月25日-27日(ポスター)
 5. ムラサキイガイ由来レクチン Mytillec のX線結晶構造解析。寺田 大樹、河合 文啓、野口 大貴、雲財 悟、イムテイアジハサン、朴 三用、大関 泰裕、ティムジェレミー、第14回日本蛋白質学会 横浜、2014年6月25日-27日(ポスター)
 6. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌由来ペニシリン結合タンパク質3のX線結晶構造解析。吉田 尚史、朴 三用、第14回日本蛋白質学会 横浜、2014年6月25日-27日(ポスター)
 7. Jiro Kikuchi, Naoya Shibayama, Satoshi Yamada, Taeko Wada, Masaharu Nobuyoshi, Tohru Izumi, Miyuki Akutsu, Yasuhiko Kano, Kanako Sugiyama, Mio Ohki, Sam-Yong Park, and Yusuke Furukawa. Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding(口頭発表). 第75回日本血液学会学術集会,開催場所:ロイントン札幌・札幌芸文館、札幌市教育文化会館、開催日:平成25年10月11日(金)~10月13日(日)
 8. 伊関峰生、二瓶悠樹、田中瞳、大木規央、杉山佳奈子、河合文啓、松永茂、高橋哲郎、朴三用「シアノバクテリア由来の新規光活性化アデニル酸シクラーゼ」(口頭発表). 第79回日本植物学会、開催場所:朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター、開催日:平成27年9月6日(日)~9月8日(火)
 9. Hisashi Yoshida, Kanako Sugiyama, Mio Ohki, Sam-Yong Park. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. (ポスタ発表). The 29th European crystallographic meeting. August 23-28, 2015, Rovinj, Croatia.
 10. Mio Ohki, Kanako Sugiyama, Fumihiro Kawai, Shigeru Matsunaga, Naoya Shibayama, Mineo Iseki, Sam-Yong Park. Structural and functional insights into a photoactivated adenylyl cyclase (ポスタ発表). 第53回日本生物物理学会、開催場所:金沢大学、開催日:平成27年9月13日(日)~9月15日(火)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：インフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの PB2 サブユニットに対するモノクローナル抗体
発明者：朴三用、浦野健、成相裕子、杉山佳奈子
権利者：朴三用、浦野健、成相裕子、杉山佳奈子
種類：
番号：特開 2015-189715
取得年月日：平成 27 年 11 月 2 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 三用 (Park Sam-Yong)
横浜市立大学・生命医科学研究科・教授
研究者番号：20291932

(2) 研究分担者

杉山 佳奈子 (Sugiyama Kanako)
公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・革
新的インフルエンザウイルス創薬プロジェ
クト・研究員
研究者番号：20623226

(3) 研究分担者

浦野 健 (Urano Takeshi)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：70293701