

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08502

研究課題名(和文) プライマー切り出し反応をターゲットとした抗インフルエンザ薬の探索

研究課題名(英文) Anti-Influenza drug screening targetted by cap-snatching mechanism

研究代表者

柴垣 芳夫 (SHIBAGAKI, Yoshio)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：90235565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ノイラミニダーゼ阻害薬の耐性株がすでに多数見つかり、その割合は増えている。2014年RNAポリメラーゼ転写阻害薬ファビピラビルが上梓されたが、その催奇性と新型インフルエンザへの対応という観点から一般には流通していない。また、2018年3月にPA阻害剤としてゾフルーザ上梓され、感染後期でも使用できると期待されているが、いずれは耐性株の出現が懸念されている。当研究室では、インフルエンザウイルスに固有な反応であるCap-snatching反応に着目し効率の良い反応定量法を確立し、北里大学薬学部微生物薬品製造学教室との共同研究により、新たな抗インフルエンザ薬のシード化合物の探索を行っている。

研究成果の概要(英文)： This cap-dependent endonuclease activity termed as cap snatching may provide a unique target for novel anti-influenza viral agents. For the screening of candidate inhibitors for cap-snatching activity, it is essential to establish a method to efficiently produce Cap1-RNA substrate and a convenient assay system for cap-snatching activity. A short 3'-biotinylated RNA oligonucleotide was prepared by an in vitro transcription system utilizing T7 RNA polymerase. Purified 3'-biotinylated RNA oligonucleotide by C18 cartridge column was subjected to a sequential capping reaction with recombinant enzymes of vaccinia virus D1R containing with RNA 5'-triphosphatase and mRNA guanylyltransferase, yeast ABD1 as (guanine-N7)-methyltransferase, and VP39 as (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase. Cap-snatching activity could be analyzed a pull-down assay based on the streptavidin-biotin interaction, yielding results consistent with those obtained by polyacrylamide gel electrophoresis.

研究分野：ウイルス学関連

キーワード：cap structure antiinfluenza drug cap-snatching

1. 研究開始当初の背景

毎年分離されるインフルエンザウイルス流行株には、ノイラミニダーゼ阻害薬、M2 チャンネルブロッカーの耐性株が多数見つかっている。2009 年から 2013 年までに日本で単離された A 型インフルエンザのほとんどが M2 チャンネルブロッカーのアマンタジン耐性を獲得しており、実質的に抗インフルエンザ薬として使用できなくなっている。ノイラミニダーゼ阻害薬のタミフルやリレンザでは、耐性株の出現は数%にとどまっているが、年々その割合は増えている(国立感染症研究所サーベイランス報告による)。また RNA ポリメラーゼ転写阻害薬ファビピラビルは、その催奇性と新型インフルエンザへの対応という観点から、緊急時にのみ慎重に使用することが求められており、一般には流通していない。また、本年 3 月に PA 阻害剤としてゾフルーザ上梓された。しかしいずれの薬剤に対しても耐性株の出現が懸念されており、新たな作用機序に基づく抗インフルエンザ薬の開発は社会的な急務となっている。こうした現状を踏まえ、既存薬とは標的を異にする抗インフルエンザ薬の開発は社会的な急務である。われわれは、インフルエンザウイルスに固有な反応である Cap-snatching 反応に着目した。

インフルエンザ RNA ポリメラーゼは、mRNA 5'末端 Cap 構造を合成することはできず、宿主 mRNA より Cap 構造を含む短鎖 RNA を切り出し、これをプライマーとしてウイルス mRNA 合成を行う。Cap-snatching とよばれるこの反応は、宿主細胞には存在しない反応であり、抗インフルエンザ薬の標的として適している。研究開始当初において、この反応を特異的に抑える抗インフルエンザ薬は存在せず、この反応をターゲットにした抗インフルエンザ薬の開発は社会的にきわめて意義のあることであった。

2. 研究の目的

1997 年香港で H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスがトリからヒトへの感染を引き起こし、2009 年にはメキシコから始まった N1N1 亜型の新型インフルエンザが世界的流行(パンデミック)を引き起こした。さらに、2014 年 3 月には中国上海市

周辺で、H7N9 亜型インフルエンザウイルスが初めてヒトに感染が確認され、ヒトからヒトへの感染例も確認された。その後の研究で 2009 年に流行したパンデミック(H1N1)ウイルスそのものの致死率は季節性のインフルエンザとそれほど大差のないことが確認されているものの、今後トリインフルエンザウイルスの変異によってパンデミックを引き起こす危険性は大きくなっている。

このような状況の中で、現在治療に使用される主な抗インフルエンザウイルス薬は、タミフルを代表とするノイラミニダーゼ阻害薬、アマンタジンに代表される M2 チャンネルのブロッカー、2014 年 3 月に製造販売が承認された RNA ポリメラーゼ阻害薬(ファビピラビル)があるが、アマンタジンは、日本で単離されるウイルスのほとんどが耐性を獲得しており現在治療には用いられていない。またタミフルやザナミビルにおいても、今年 2017 年に東京都内で単離されたウイルスの耐性速報で数%は、既に耐性のウイルスであったと報告されている。ファビピラビルはパンデミックウイルスに備えるという目的と、催奇性の問題から、現在一般の治療には用いられてはいない。今後、耐性ウイルスの増加に備え、これらの薬剤とは作用点の異なり、さらに感染後期においても効果が望めるような抗インフルエンザ薬の開発は、社会的にも急務であるインフルエンザウイルスは、ウイルス RNA ポリメラーゼが宿主の転写産物のキャップを含むオリゴ RNA を切り出し、これをプライマーとしてウイルスゲノムを転写することにより、その mRNA をキャップ化している。この反応は Cap-snatching とよばれ、宿主細胞には見られない反応であることから、研究新規抗ウイルス薬の標的として有望である。さらに、この反応は、ウイルスの感染過程ではなく、ウイルスの遺伝子発現に関与しているため、この反応を特異的に抑える薬剤は、感染後期(症状がある程度進行した後)においても効果が期待できる。

3. 研究の方法

われわれは、mRNA の 5'キャップ構造形成の機構について研究を行い、その過程で出芽酵母 mRNA キャッピング酵素遺伝子(*CEG1*、*CET1*)、ヒトキャッピング酵素遺伝子(*hCAP1a*)、ヒトグアニン-7-メチル基転移酵素遺伝子(*hCMT1a*)のクローニング、キャッピング酵素を用いたキャップ化 RNA の合成の技術を開発してきた。(Shibagaki et al J. Biol. Chem., 1992, Tsukamoto et al Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 1998)。この技術を生かし、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼを標的とした、新たな抗インフルエンザウイルス薬のスクリーニング系を開発し、特許申請を行った(新規キャッピング酵素並びに、キャップ化 RNA の製造法及びその用途、特願 2011-289732)。さらに、スクリーニングのハイスループット化を行

うため、RNA の 3'末端をピオチン標識し、5'キャップ構造を放射能ラベルした基質 RNA を用いて Cap-snatching 反応をストレプトアビジン固相化ビーズへの放射活性の結合量の変化によって定量する方法を考案した(Shibagaki et al. *J. Virol. Methods*, 2014)。高度に精製した 5'キャップ構造を持つ短鎖 RNA の合成は、酵素量や精製方法が難しく、均一な Cap 化 RNA を大量に合成することが困難であった。現在、平成 27 年度科学研究費補助金(課題番号 15K08502)の支援を得て、このプルダウン法により、北里大学が保有する天然物化合物ライブラリーについてスクリーニングが進行中である。プルダウン法で活性のあったサンプルについては、 $[^{32}\text{P}]$ Cap1-RNA 基質と切断された RNA プライマーをゲル電気泳動により分離後、オートラジオグラフィーを行うことにより、より正確な切断効率と阻害効率を算定した。

4. 研究成果

本研究は、北里大学薬学部微生物薬品製造学教室との共同研究で、同研究室で管理されている、微生物由来の代謝産物ライブラリーについて Cap-snatching 反応阻害活性を指標にスクリーニングを行った。微生物の代謝産物は、その培地成分や培養条件によりその組成や構造が変化することが知られている。したがって同じ微生物でも様々な培地中で培養することにより新たな生理活性物質を見出す可能性がある。そこで我々は、世界中の土壌より単離した真菌やカビなどの微生物を様々な培地で培養した培養上清をスクリーニングに用いた。1次スクリーニングとして、pull down 法(1st screening)によって約1,600サンプルの Cap-snatching 反応阻害活性を調べた。Cap-snatching 反応を行わせた後に、さらに活性のあったものについて Urea/PAGE によって分析することにより、偽陽性を除いて、Cap-snatching 反応阻害活性を再確認(2nd screening)した結果、48 サンプルについて、阻害活性が再確認できた。そのうち 11 種類は、再培養後の培養上清 50% エタノール抽出物中に強い Cap-snatching 阻害活性が確認できた。これについては、大量培養を行うと同時に、活性化化合物の精製を行っている。また、既に構造決定された 151 種の化合物について pull down 法、Urea/PAGE による解析によって 7 種に強い活性が認められた。中でも活性の強かった BN0024 について構造決定を行った結果、これまで、抗インフルエンザ活性が報告されていない新規化合物であることが分かった。Cap-snatching 反応に対する IC_{50} は $71 \mu\text{M}$ であった。現在培養細胞を用いて細胞毒性などについて検討中であるが、細胞に対しては酵素の阻害活性に比べ、1/100 の量で抗インフルエンザ活性がみられ、とても良い結果が得られている。

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 16 件)

4. Kanda S., Harita Y., Shibagaki Y., Sekine T., Igarashi T., Inoue T., Hattori S. 査読有り

“Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC-1 and Nephhrin: Effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis”

Mol. Biol. Cell 11, 1824-1835 (2011)

2. 水本清久、山崎学、服部成介、生田尚子、井口幸子、柴垣芳夫

特許「新規キャッピング酵素並びに、キャップ化 RNA の製造法及びその用途」(特許出願 2011-289732)

3. Koyama N., Tokura Y., Sshl HG, Schneider T., Shibagaki Y., Ikeda H., Tomoda H. 査読有り

“The nonantibiotic small molecule Cyslbadan enhances the potency of β -lactams against MRSA by inhibiting pentaglycine interpeptide bridge synthesis”

PLOS ONE 7, e48981 (2012)

2013 年

4. Minegishi Y., Shibagaki Y., Mizutani A., Fujita K., Tezuka T., Kinoshita M., Kuroda M., Hattori S., Gotoh N. 査読有り

“Adaptor protein complex of FRS2 β and CIN85/CD2AP provides a novel mechanism for RrbB2/HER2 protein downregulation”

Cancer Sci. 104, 345-352 (2013)

2014 年

5. Shibagaki Y., Ikuta N, Iguchi S, Takaki K, Watanabe S, Kaihotsu M, Masuda C, Maeyama K, Mizumoto K, Hattori S. 査読有り

“An efficient screening system for influenza virus cap-dependent endonuclease inhibitors.”

J Virol Methods. 202:8-14. (2014)

6. Otsuka H, Gotoh Y, Komeno T, Ono T, Kawasaki Y, Iida N, Shibagaki Y., Hattori S, Tomatsu M, Akiyama H, Tashiro F 査読有り

“Aralin, a type II ribosome-inactivating protein from *Aralia elata*, exhibits selective anticancer activity through the processed form of a 110-kDa high-density lipoprotein-binding protein: a promising anticancer drug.”

Biochem Biophys Res Commun. 10;453(1):117-23 (2014)

7. Shirakabe K, Shibagaki Y, Yoshimura A, Koyasu S, Hattori S. 査読有り

“A proteomic approach for the elucidation of the specificity of ectodomain shedding.”

J Proteomics. 26;98:233-43 (2014)

8. Shiheido H, Aoyama T, Takahashi H, Hanaoka K, Abe T, Nishida E, Chen C, Koga O, Hikida M, Shibagaki Y, Morita A, Nikawa T, Hattori S, Watanabe T, Shimizu J. 査読有り

“Novel CD3-specific antibody induces immunosuppression via impaired phosphorylation of LAT and PLC γ 1 following T-cell stimulation.”

Eur J Immunol. 44(6):1770-80. (2014)

9. Sato T, Akasu H, Shimono W, Matsu C, Fujiwara Y, Shibagaki Y, Heard JJ, Tamanoi F, Hattori S 査読有り

“Rheb protein binds CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamoylase, and dihydroorotase) protein in a GTP- and effector domain-dependent manner and influences its cellular localization and carbamoyl-phosphate synthetase (CPSase) activity.”

J Biol Chem. 290(2):1096-105 (2015)

10. Suzuki H, Shibagaki Y, Hattori S, Matsuoka M 査読有り

“Nuclear TDP-43 causes neuronal toxicity by escaping from the inhibitory regulation by hnRNPs.”

Hum Mol Genet. 15;24(6):1513-27 (2015)

11. Matsunaga A, Harita Y, Shibagaki Y, Shimizu N, Shibuya K, Ono H, Kato H, Sekine T, Sakamoto N, Igarashi T, Hattori S. 査読有り

“Identification of 4-Trimethylaminobutyraldehyde Dehydrogenase (TMABA-DH) as a Candidate Serum Autoantibody Target for Kawasaki Disease.”

PLoS One. 26;10(5):e0128189 (2015)

2016年

12. Minegishi Y, Sheng X, Yoshitake K, Sergeev Y, Iejima I, Shibagaki Y, Monma N, Ikee K, Furuno M, Zhuang W, Liu Y, Rong W, Hattori S, Iwata T 査読有

り

“CCT2 Mutations Evoke Leber Congenital Amaurosis due to Chaperone Complex Instability.”

Sci Rep. 20;6:33742 (2016)

13. Yamada H, Tsutsumi K, Nakazawa Y, Shibagaki Y, Hattori S, Ohta Y 査読有り

“Src Family Tyrosine Kinase Signaling Regulates FilGAP through Association with RBM10.”

PLoS One. 11;11(1):e0146593 (2016)

14. Sato T, Ishii J, Ota Y, Sasaki E, Shibagaki Y, Hattori S. 査読有り

“Mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2 regulates filamin A-dependent focal adhesion dynamics and cell migration.”

Genes Cells.;21(6):579-93 (2016)

2017年

15. Shirakabe K, Omura T, Shibagaki Y, Mihara E, Homma K, Kato Y, Yoshimura A, Murakami Y, Takagi J, Hattori S, Ogawa Y 査読有り

“Mechanistic insights into ectodomain shedding: susceptibility of CADM1 adhesion molecule is determined by alternative splicing and O-glycosylation.”

Sci Rep. 10;7:46174. (2017)

16. Sato T, Higuchi Y, Shibagaki Y, Hattori S. 査読有り

“Phosphoproteomic Analysis Identifies Signaling Pathways Regulated by Curcumin in Human Colon Cancer Cells.”

Anticancer Res. 37(9):4789-4798.(2017)

〔学会発表〕(計 件)

〔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 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴垣 芳夫 (SHIBAGAKI, Yoshio)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：90235565

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()