

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790355
 研究課題名 (和文) インフルエンザウイルス RNP 核外輸送の解析とその機構を利用した新規阻害薬の探索
 研究課題名 (英文) Analysis of nuclear export of influenza viral RNP and search for novel inhibitors using the mechanisms
 研究代表者
 渡辺 健 (WATANABE KEN)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：00346909

研究成果の概要 (和文)：

インフルエンザ疾患には抗ウイルス剤が用いられているが既に耐性ウイルスが出現している。インフルエンザウイルスの遺伝子本体 (RNP) の核外輸送は新規抗インフルエンザウイルス剤の重要な開発標的であると考えた。そこで本研究では、RNP 核外輸送機構の詳細な解明を行った。またその機構を利用した新規阻害薬のスクリーニングを行った。海洋微生物ライブラリーより活性物質の候補が見つかり、現在精製同定を現在進めている。

研究成果の概要 (英文)：

Antivirals are used for influenza, however resistant viruses have been reported. I focus on the nuclear export processes of influenza viral RNP complex because the processes are important for the development of novel anti-influenza viral drugs. In this study, analysis of the mechanisms for the nuclear export of vRNP, and screening of novel influenza viral drugs were performed. Several candidates from marine bacteria library are found, and further purification and identification are in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス 宿主因子 核外輸送 阻害剤 インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景

- (1) A 型インフルエンザウイルス (IAV) が他のウイルスと大きく異なる特徴は、細胞の核内でウイルス遺伝子本体 (RNP)

が転写複製され、新生 RNP が核外輸送される点にある。RNP の核外輸送には M1 が必要 (Cell 67; 117- (1991)) との報告以来、多くの論文があるが、未だに RNP の核外輸送モデルは確立していな

い。研究代表者は RNP の核外輸送が CRM1 依存的経路による事を報告 (Watanabe K Virus Res (2001))。RNP 核外輸送に関与する未知の宿主因子が示唆されたので、M1 結合因子を探索、Hsc70 を同定した (Watanabe K, FEBSLett 2006)。

- (2) Hsc70 は Hsp70 ファミリーに属す、ヒートショック蛋白質 (Hsps) である。Hsps はウイルス増殖を抑制する事も知られているが、近年ウイルスが Hsps を自身の増殖に利用するという事でも注目されつつある。Hsp70 ファミリーはパピローウイルスカプシドの核内移行に必須 (J. Virol. 78; 5546- (2004))、狂犬病ウイルス、VSV 等の粒子に取り込まれる (Virology 190; 845-(1992))、イヌジステンパーウイルスの RNA ポリメラーゼ活性に必要 (J. Gen. Virol. 77 2125-(1996))、HIV-1 では粒子形成に重要 (J. Virol. 79, 5557- (2005))等報告された。IAV 増殖に Hsc70 が関与する事は申請者が初めて見いだしたものである。
- (3) 現在の研究代表者の仮説では Hsc70 に存在する核外輸送シグナル (NES) が宿主因子 CRM1 と結合し、RNP-M1-Hsc70-CRM1 複合体として核外輸送される。Hsc70 の NES が実際に機能的であるかは報告が無かったが現在申請者らは Hsc70 が IAV の RNP の核外輸送を CRM1 依存的に担っている事を突き止めた (Watanabe K, Drug Disov Ther 2008)。また、宿主の細胞質→核の主要な輸送因子である Importin, Transportin が Hsc70 により核外輸送される事が近年報告された (J Cell Biol. 171 19- (2005))。即ち Hsc70 は CRM1 と結合し標的蛋白質の核外輸送を仲介する重要な因子であると考えられる。
- (4) IAV は時に世界的に大流行し多くの死者を出すインフルエンザの原因ウイルスである。高病原性トリインフルエンザウイルスのヒトでの世界的流行の懸念、ノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤タミフルに耐性を示すウイルスの出現、重篤な副作用の懸念等が報道されている。従って、ウイルス表面抗原の変異に影響されない、宿主因子を標的とした抗 IAV 薬の開発は社会的要請である。

2. 研究の目的

- (1) 本研究は、研究代表者が発見したインフルエンザウイルスマトリックス蛋白質

(M1) 結合宿主因子、Hsc70 のウイルス増殖への関与についての解明と本機構を利用した阻害剤探索の基礎的研究である。具体的にはウイルス RNP の核外輸送を分子レベルでより詳細に解明する事、また Hsc70 を標的とした新規核外輸送阻害剤を探索・同定する事を目的とする。

- (2) 蛋白質の核外輸送はインフルエンザウイルスのみならず多くのウイルスの生活環で重要な役割を果たしている。従って本研究を遂行する事で、Hsc70 の持つ蛋白質核外輸送機能が解明されれば、これまでに例のない蛋白質の核外輸送を作用点とする阻害剤開発が将来的に可能になる。

3. 研究の方法

本計画は RNP 核外輸送機構の基礎研究および新規核外輸送阻害剤の探索 からなる。研究目的を達成するために2年間の研究期間を設定した。初年度 (2008年度) で解析、スクリーニング等を進め、2009年度に実験結果の検証 (培養細胞/マウス感染モデル) を行う。RNP 核外輸送機構の基礎研究で得られる知見は新規核外輸送阻害剤の探索における NES 配列の工夫や細胞株選定に役立つ。生化学的解析では組換え蛋白質を用いたプルダウンアッセイによる相互作用の検討などを行う。新規阻害剤の同定には生化学的カラムワークと質量分析計が有用である。阻害剤の効果は試験管内、培養細胞、マウスともに当研究室で検証が可能である。

4. 研究成果

- (1) 2008年度 インフルエンザウイルスの増殖に必須である宿主因子、Hsc70 の機能解析に着目した。Hsc70 は宿主ヒートショック蛋白質であり、ウイルス増殖に必須な蛋白質である M1 と相互作用するがその結合領域は分かっていなかった。そこで Hsc70 蛋白質の各種欠損変異体を作製し M1 との相互作用を明らかにした。Hsc70 は、核外輸送シグナル (NES) 配列をもつ。宿主因子 CRM1 は蛋白質の NES 配列を認識し、核から細胞質への蛋白質核外輸送を担う因子であるが、Hsc70 が CRM1 と結合することをプルダウンアッセイにより明らかにした。このことより、ウイルスの遺伝子本体である RNP は、M1 を介して Hsc70 に結合し、Hsc70 に存在する NES 配列依存的に CRM1 により核外輸送されることが推測された。この核外輸送阻害ができれば有用な抗ウイルス剤になる可能性がある。核外輸送阻害剤スクリーニング系の確立および、スクリーニングを行った。スクリーニングの材料としては、長崎県沿岸

より採取した5000株におよぶ海洋微生物ライブラリーを用いた。海洋微生物培養上清中に含まれる核外輸送阻害活性をスクリーニングした結果、強力的に核外輸送を抑制する活性を含む海洋微生物培養上清4種を見いだした。これらは熱安定性、分子量、その他の挙動より蛋白性因子である可能性が考えられた。以上の結果はほぼ2008年度の研究計画どおりに進行することができた。

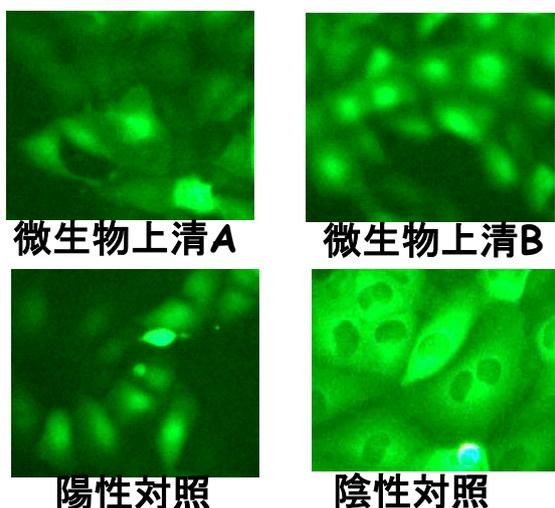


図 海洋微生物培養上清による核外移行阻害活性の例

(2) 2009年度 インフルエンザウイルスに対する核外輸送阻害剤の作用を検討する上でウイルス検体として、2009年5月に流行が始まった新型インフルエンザウイルスの収集も行った。長崎市保健所や長崎大学病院(第2内科等)との連携により当研究室のBSL3実験室の培養設備でウイルス分離を行った。秋以降、数度にわたり今シーズンの臨床検体を長崎市保健所の下部機関である長崎市保健環境試験所等より受領、ウイルス分離、PCR、塩基配列決定によりその大半が新型ウイルスであることを決定した。これら多数の臨床分離ウイルスの中から評価に使用する臨床ウイルス株のデータベース登録及び選定を進めている。

インフルエンザウイルスRNP核外輸送阻害剤の候補の評価: 京都薬大村上先生より新規核外輸送阻害剤(ACAおよびValtrate)を分与頂き抗インフルエンザウイルス活性を評価した。結果、培養細胞レベルでウイルス実験室株の増殖を抑制した。現在論文取り纏め中である。マウスモデルでの評価系はインフルエンザウイルス経鼻感染系を確立し、体重減少、血中および粘膜面への免疫応答の誘導がおきる事を証明し、論文報告を行った。これをもとに核外輸送阻害剤のマウスモデルでの評価を早急に行う予定である。2008

年度でのスクリーニングの結果見いだされた核外輸送阻害活性をもった物質候補について、硫安沈殿画分、陰イオン交換樹脂での部分精製および質量分析機による活性因子の同定を行った。活性因子は蛋白性因子であり、質量分析によりその候補を同定した。(論文準備中)現在その抗インフルエンザウイルス活性とともに作用機序の詳細な解明を行っている

(3)以上、本研究ではインフルエンザウイルスRNPの核外輸送機構について新たな知見が見いだされ、新規核外輸送阻害剤について抗インフルエンザウイルス効果があることが証明された。また海洋微生物ライブラリーより、従来の低分子化合物ではない新規抗ウイルス作用をもつ蛋白質が発見された。これらはインフルエンザウイルス実験室株での有用性を検証したが、2009年度に収集をおこなった新型インフルエンザウイルス臨床分離株でも今後有用性の検討を行う予定である。さらに核外輸送機構はインフルエンザウイルスのみならずHIVやHSVといった他のいくつかの、ヒトに疾患をもたらすウイルスでも利用されていることが報告されている。これらの研究成果を今後は更に発展させることにより、従来の抗ウイルス薬にない特徴をもった、核外輸送阻害剤の抗ウイルス薬としての応用が期待される。

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)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Takizawa N, Morita M, Adachi K, Watanabe K, Kobayashi N Induction of immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope by novel chimeric influenza viruses. Drug Discoveries & Therapeutics 査読有 Vol3 2009 252-259
- ② Watanabe K, Kobayashi N Nuclear export inhibitors; a possible target for novel anti-influenza viral drugs Drug Discoveries & Therapeutics 査読無 Supplement Vol. 2 2008 20-20

[学会発表] (計8件)

- ① 高月英恵、渡辺健、塚原富士子、丸義朗、小林信之 インフルエンザウイルスRNP核外輸送に関するヒートショック

ク蛋白質Hsc70 の挙動 日本生化学会九州支部会 2009 年 5 月 16 日 福岡
【口頭発表】

- ② **渡辺健**、野田彩衣子、高月英恵、塚原富士子、丸義朗、小林信之 インフルエンザウイルスRNP複合体の核外輸送に関与する宿主因子、Hsc70 の挙動 日本薬学会本会 2009 年 3 月 27 日、京都 【口頭発表】
- ③ **渡辺健**、滝沢直己、野田彩衣子、高月英恵、塚原富士子、丸義朗、小林信之 インフルエンザウイルスRNP核外輸送機構の解明：Hsc70 の役割 分子生物学会本会 2008 年 12 月 12 日、神戸 【ポスター発表】
- ④ **渡辺健**、野田彩衣子、高月英恵、塚原富士子、丸義朗、小林信之 インフルエンザウイルスRNPの核外輸送に関与するヒートショック蛋白質Hsc70 の挙動 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 26 日、岡山【口頭発表】
- ⑤ 野田彩衣子、**渡辺健**、塚原富士子、丸義朗、小林信之 インフルエンザウイルスマトリックス蛋白質(M1)結合宿主因子、Hsc70 のM1 との結合領域の検討 第45回日本ウイルス学会九州支部総会 2008 年 10 月 4 日、熊本【口頭発表】
- ⑥ **Ken Watanabe**, Nobuyuki Kobayashi Nuclear export inhibitors; a possible target for novel anti-influenza viral drugs Japan-China Joint Medical Workshop on Drug Discoveries and Therapeutics 2008. 2008 年 9 月 30 日、東京【口頭発表】
- ⑦ **Ken Watanabe**, Naoki Takizawa, Fujiko Tsukahara, Yoshiro Maru and Nobuyuki Kobayashi. Hsc70 regulates the nuclear export but not the import of

influenza viral RNP. XIV th International congress of virology (ICV) 2008 年 8 月 14 日 イスタンブール 【ポスター発表】

- ⑧ **渡辺健**、野田彩衣子、滝沢直己、塚原富士子、丸義朗、小林信之 ヒートショック蛋白質Hsc70 はインフルエンザウイルス増殖を制御する 平成 20 年度日本生化学会九州支部会 2008 年 5 月 18 日 福岡 【口頭発表】

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 健 (WATANABE KEN)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00346909

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：