

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月22日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590153

研究課題名（和文） 人為的変異誘導によるインフルエンザウイルスの弱毒化とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文） Attenuation of influenza virus by drug treatment and elucidation of mechanism of the attenuation

研究代表者

林 京子（HAYASHI KYOKO）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・講師

研究者番号：60110623

研究成果の概要（和文）：放線菌 *Streptomyces* sp. 由来のスフィドロフラン誘導体、(1R, 2R)-1-(5'-methylfur-3'-yl)propan-1,2,3-triol (MFPT) によるインフルエンザウイルス弱毒化メカニズムの解明を検討し、以下の結果を得た。

- 1) MFPT 耐性ウイルスは、マウスの病原性を減弱させた。
- 2) 耐性ウイルスは、野生株と比較して細胞におけるウイルス増殖量低下を起こした。
- 3) ゲノム解析の結果、耐性ウイルスには、非構造タンパク質 NS1 に新規の変異が生じていた。
- 4) 化学的合成による MFPT の大量生産の可能性を確認できた。

研究成果の概要（英文）： The mechanism of attenuation of influenza A virus after treatment with a sphydrofuran derivative, (1R, 2R)-1-(5'-methylfur-3'-yl)propan-1,2,3-triol (MFPT) isolated from *Streptomyces* sp., was examined. The results were as follows:

- 1) MFPT-resistant viruses showed less pathogenicity in mice.
- 2) MFPT^r virus clones showed lower growth *in vitro*.
- 3) Direct sequencing revealed a novel mutation in NS1 protein.
- 4) We tried and succeeded chemical synthesis of the compound.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：インフルエンザウイルス・弱毒化・グリセロール誘導体・NS1 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、長寿化が進み、その裏では、依然として感染症が人命を脅かす重大な因子となっている。つまり、高齢者の増加や医療の高度化などの社会的状況は、易感染者を加速

度的に生み出し、感染症対策の重要性を高めている。感染症のなかでも特にインフルエンザは、毎年流行を繰り返して多数の罹患者を出す社会的に重大なウイルス感染症である。2009年に発生したブタ由来新型インフルエ

ンザウイルスによるパンデミックは、その一例である。

インフルエンザウイルスは、内部タンパク質の抗原性の違いにより A、B、C 型に分類される。この中で、A 型ウイルスは、大きな抗原変異を起こし易く、過去において 4 回の世界的大流行を引き起こしている。とりわけ、ヒト社会で流行する季節性インフルエンザだけではなく、鳥類が保有する高病原性トリインフルエンザウイルスによるヒトの感染例が増加していて、徐々にヒトからヒトへの感染力を有するウイルスへと遺伝子変異の蓄積が起こっていることがきわめて憂慮すべき問題となっている。従って、新型ウイルスが出現した時に、どのような対策を打てるかが大きな関心事となっている。

現在のインフルエンザ対策としては、ワクチンによる予防と、抗ウイルス剤による治療とがある。後者の治療薬は、ほとんどがウイルス特異的酵素の阻害剤であり、リン酸オセルタミビル(タミフル)に見られるように、耐性ウイルスの出現を避けて通ることはできず、常に耐性克服のための新薬の開発に追われている。一方、ワクチンによる予防対策も万全ではなく、RNA ウイルスであるために変異し易いインフルエンザウイルスを追って、毎年、流行株に合わせたワクチンの製造を必要としている。しかし、抗原性が大きく変異した新型ウイルスが突如として出現すれば、飛沫感染するというウイルスの特性から考えて、その流行範囲は短時間のうちに拡大し、従来の受精卵を使用するワクチン製造法ではヒトへの接種が可能になるまでに長時間を要することから、感染拡大に寄与する力は期待できない。

以前の単純ヘルペスウイルスを用いた研究によって、放線菌 *Streptomyces* sp. から単離したスフィドロフラン誘導体、(1R, 2R)-1-(5'-methylfur-3'-yl)propan-1,2,3-triol (MFPT) が、ウイルスの病原性を低減させるという結果を得た。この点に着目して、本物質を、インフルエンザウイルスの弱毒化に応用できないか、特に、短時間に確実に病原性を低下させる手法に応用することによって新規のワクチン開発法に結び付けられないと考えるに至った。

2. 研究の目的

予備実験において、インフルエンザウイルスを MFPT 存在下で増殖させてえられたウイルスは、マウスでの病原性を低下させていることが明らかになった。本研究では、① MFPT およびその関連化合物を化学的に合成し、ウイルス弱毒化能力の最も高い化合物を選択し、② その化合物の存在下で弱毒化ウイルスを作成し、ウイルス学的特性を解明して、ワクチン株としての可能性を探り、③

インフルエンザウイルスの病原性を規定する因子を分子生物学的に特定することを目的とした。

3. 研究の方法

1) MFPT および関連化合物の合成とそれらの弱毒化機能の比較： MFPT の合成方法を検討し、それをリード化合物として、種々の化合物を調製した。これらの化合物でウイルスを処理し、マウス感染実験によって病原性を比較検討し、最も有効な物質を選択した。

2) HA 及び NA に対する特異的抗体の調製： 単純ヘルペスウイルスの場合には、MFPT は、ウイルス糖タンパク質合成に影響を与える可能性が示唆された。そこで、インフルエンザウイルスについても、同様な作用が推察されることから、2種類の糖タンパク質 (HA、NA) の解析に必要となるモノクローナル抗体を、合成オリゴペプチドを用いて作成した。

3) MFPT 処理したウイルスクローンの作製： 1) で選択した化合物に対する耐性インフルエンザウイルスを、MDCK 細胞感染系で MFPT 存在下 10 代連続して増殖させることによって作成し、plaque purification 法でウイルスクローンとして得た。

4) In vitro での弱毒化ウイルスの特性の解明： 培養細胞 (MDCK 細胞) を用いて、上記 3) で得られた 10 個のウイルスクローンの増殖能を評価し、野生株と比較した。

5) In vivo での弱毒化 (病原性の低下) の検討： 同一ウイルス量の野生株と耐性ウイルスクローンとを、BALB/c マウスの鼻腔内に接種し、動物に対する病原性を、肺・気道のウイルス増殖量および体重の変化を指標にして評価した。さらに、生ワクチン株として価値があるかどうかは、ウイルス接種後のウイルス特異的抗体産生能に依拠することから、感染 4 週間後の気道及び血清中の中和抗体価を測定した。

6) ウイルスタンパク質の解析： 耐性ウイルスクローンにタンパク質レベルでの異常が生じているかを検討するため、2) で得られた抗 HA、NA 抗体及び抗インフルエンザウイルス抗体 (ポリクローナル抗体) を用いた Western blotting 法で分析した。

7) 耐性ウイルスクローンのゲノム解析： A 型インフルエンザウイルスは、PB1、PB2、PB1-F2、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1、NEP/NS2 というタンパク質をコードする遺伝子を有する。これらの全塩基配列を解明するため、各プライマーを設計し、シーケンシングを行なった。野生株との比較によって、変異が生じている遺伝子を特定し、ウイルス増殖における変異の重要性を検討した。

4. 研究成果

1) MFPT の化学的合成に成功した。さらにその化学的修飾によって、10種類の誘導体を合成した。これらの化合物の存在下で増殖させたインフルエンザウイルスの病原性を、BALB/c マウスへの感染実験によって比較したところ、MFPT 処理ウイルスが最も弱毒化を引き起こしていることが明らかになった。そこで、以後の研究では、MFPT を使用した。

2) HA 及び NA に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。これらのハイブリドーマ細胞を BALB/c マウスの腹腔内に接種し、得られた腹水から、アフィニティークロマトグラフィーによって抗体を精製し、Western blotting 解析に用いた。

3) MFPT 存在下で 10 代継代して得られた MFPT 耐性ウイルスから、20 個のクローンを調製した。そのうちの 10 クローンをを用いて、以下の研究を行った。

4) 同一のウイルス量に調節した耐性ウイルスクローンと野生株とを、マウスに経鼻接種し、感染 3 日後のウイルス産生量と、感染 14 日後までの体重変化及び死亡数とを記録した。その結果、肺および気道洗浄液中のウイルス量は、ほとんどの耐性ウイルスクローンにおいて、野生株と比較した有意の減少を示した。また、野生株接種マウスでは最大 36% の体重減少がみられたが、耐性ウイルス接種マウスでは最大 20% の減少に抑制された。また、生存率は、野生株では 40% になったのに対して、耐性ウイルスでは 0% となり全例生存した。以上の結果から、MFPT 耐性ウイルスは、マウスに対する病原性が低下していることを確認できた。

5) MFPT 処理によって生じる弱毒化のメカニズムを解明する一環として、*in vitro* での耐性ウイルスの特性を検討した。まず、培養細胞での増殖曲線を作成し、経時的な増殖パターンを野生株と比較した。その結果、耐性ウイルスクローンは、WT に比べて子孫ウイルス量が約 1/5 - 1/500 にまで低下していた。さらに、インフルエンザウイルスの感染成立や子孫ウイルスの細胞からの放出に重要な役割を果たすことが知られている HA と NA という 2 種類の糖タンパク質について、SDS-PAGE 後に、上記 2) で得たモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて検出を試みた。その結果、HA と NA に関しては、野生株と耐性ウイルスクローンとの間に顕著な差がないことがわかった。従って、これらの糖タンパク質は、弱毒化には直接的に関連がないと推察された。

6) これまでの結果から、MFPT 耐性ウイルスには、増殖能に関与する何らかの因子の異常が生じている可能性があると考えられた。この点を確認する目的で、耐性ウイルスクローンのゲノムについて、野生株との比較を行なった。

PB 2 遺伝子は、PB 1 および PA とヘテロ 3 量体を形成してポリメラーゼとして機能したり、PB 1 との協力で RNA の転写や複製を開始したりする。全クローンの PB 2 遺伝子の塩基配列を解析した結果、G682C と K627Q の変異がそれぞれ 1 クローンずつ見出された。K627Q 変異については、⁶²⁷Lys が宿主温度感受性に関わる重要なアミノ酸残基であることから、ウイルス増殖に関連する可能性がある。⁶²⁷Glu への変異は、これまでに報告されていない新規のものであり、今後温度感受性の変化も含めて、さらに詳細に検討する必要がある。

PB 1 遺伝子には、PB1-F2 及び PB1 がコードされている。前者は、宿主細胞のミトコンドリアに作用して、感染細胞のアポトーシスを促進させる。一方、PB 1 は、ポリメラーゼとしての機能を有する。全クローンの PB 1 遺伝子の塩基配列を解析したところ、PB1-F2 領域には変異が認められず、PB1 領域においては複数のクローンに変異がみられたが、いずれも、ウイルス増殖に関与するものではなかった。

PA 遺伝子は、PB 2、PB 1 と 3 量体を形成してポリメラーゼとして機能する PA がコードされている。このタンパク質は、エンドヌクレアーゼ活性やタンパク質分解活性を有することも明らかになっている。全クローンの PA 遺伝子の塩基配列を解析した結果、野生株に比べて変異が認められなかった。

HA 遺伝子にコードされる HA は、宿主細胞の表面に存在するシアル糖鎖を認識し、ウイルス粒子を細胞表面に吸着させる機能を持つ。さらに、細胞内にウイルスが侵入後、後期エンドソームにおいて、ウイルスエンベロープとエンドソーム膜とを融合させることによって細胞質へのウイルスゲノムの移動を可能にする。全クローンの HA 遺伝子の塩基配列を解析したところ、野生株との明瞭な差がみられなかった。

NP 遺伝子にコードされる NP は、vRNA やポリメラーゼと結合してリボヌクレオプロテイン (RNP) を形成し、RNA の合成や RNP の核内・核外への輸送に関与する。全クローンの NP 遺伝子の塩基配列を解析したところ、野生株と比べて、ウイルス増殖に関与すると考えられる明瞭な変異は認められなかった。

NA 遺伝子は NA をコードしており、このタンパク質は四量体を形成して、エンベロープに存在する。シアリダーゼ活性を有し、子孫ウイルスが宿主細胞から放出される段階に関与する。NA 遺伝子の塩基配列を野生株と耐性ウイルスとの間で比較したところ、ウイルス増殖に関わると考えられる変異はみられなかった。

M 遺伝子は、2 種類のタンパク質 (M1 および M2) をコードする。M1 は、ウイルス粒

子の中で最も多く含まれるタンパク質であり、RNPやエンベロープに存在するタンパク質のウイルス粒子内ドメインと相互作用したり、RNPの細胞質への移動に関与したりする。M2は、四量体を形成して、エンベロープに存在し、プロトンチャネル活性を示し、脱殻段階に作用する。全クローンのM遺伝子の塩基配列を解析した結果、変異は見られなかった。

NS遺伝子にコードされるNS1は、宿主細胞のインターフェロン(IFN)産生を抑制することからIFNアンタゴニストと呼ばれ、vRNAや宿主細胞の多数のタンパク質と相互作用し、ウイルスにとって増殖効率の良い環境を誘導する。全クローンのNS遺伝子の塩基配列を解析した結果、NS1タンパク質のP164S変異がすべてのクローンで確認された。この変異は、これまでに報告例のない新規のものであり、ウイルス増殖にどのような影響を与えるのかは詳細に検討する必要がある。¹⁶⁴Proは、P13Kのp85βサブユニットにあるi-SH2ドメインとの相互作用に関わる重要なアミノ酸の1つと考えられる。このことから類推して、MFPT処理によってP164S変異が生じると、そのウイルスはP13Kとの相互作用を限弱させるか、あるいは相互作用を不可能にするのではないかと考えられる。そのため、感染細胞のアポトーシスを抑制する機能が低下し、ウイルスが大量に複製される前にアポトーシスが起きてしまい、結果的にウイルス産生量の低下に結び付くという過程が推察される。この推察は、ウイルス増殖曲線を作成した時に、耐性ウイルスの感染によって生じる細胞変性効果が野生株の場合と同程度だったことと矛盾しない。NS1の変異については、感染細胞内におけるP13K/Aktシグナル伝達経路の活性化や、アポトーシスの誘導される時間などの点で野生株と比較することによって、MFPTがインフルエンザウイルスの弱毒化を引き起こすメカニズムの解明に直接的に連動する可能性が高く、現在、これらの点を検討している。

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 0件)

[学会発表] (計 3件)

- ① 佐々木宏平、林 京子、李 貞範、林 利光：A型インフルエンザウイルスの病原性に対するスフィドロフラン誘導体の影響。日本薬学会第132年会、札幌、2012年3月29日。
- ② K. Sasaki, K. Hayashi, J.B. Lee, T.

Hayashi: Effect of a sphydrofuran derivative on the pathogenicity of influenza A virus. Antiviral Congress, Amsterdam, 2010, Nov. 7.

- ③ 佐々木宏平、林 京子、李 貞範、林 利光：Sphydrofuran誘導体によるA型インフルエンザウイルスの人為的弱毒化の試み。日本薬学会第130年会、岡山、2010年3月29日。

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 京子 (HAYASHI KYOKO)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・講師
研究者番号：60110623

(2) 研究分担者

松谷 裕二 (MATSUYA YUJI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授
研究者番号：50255858

(3) 連携研究者

()

研究者番号：