

## 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25年 5月31日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590422

研究課題名（和文） インフルエンザウイルスのエンドヌクレアーゼに対する阻害薬の探索

研究課題名（英文） Screening of inhibitors of influenza A virus PA endonuclease

## 研究代表者

葛原 隆（TAKASHI KUZUHARA）

徳島文理大学・薬学部・生化学教室・教授

研究者番号：00260513

## 研究成果の概要（和文）：

抗インフルエンザウイルス化合物を探すために、ウイルス株間で保存性の高い、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ内のエンドヌクレアーゼの阻害化合物の探索を行った。インフルエンザ RNA ポリメラーゼのエンドヌクレアーゼドメインタンパク質を精製し、サリドマイドアナログ化合物・コケ由来の天然物であるマルカンチン・緑茶カテキンがこのエンドヌクレアーゼ阻害活性を有し、抗インフルエンザ活性を有することを見いだした。

## 研究成果の概要（英文）：

The H1N1 influenza A virus of swine-origin caused pandemics throughout the world in 2009 and the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus has also caused epidemics in Southeast Asia in recent years. The threat of influenza A thus remains a serious global health issue and novel drugs that target these viruses are highly desirable. Influenza A possesses an endonuclease within its RNA polymerase which comprises PA, PB1 and PB2 subunits. To identify potential new anti-influenza compounds in our current study, we screened 33 different types of phytochemicals using a PA endonuclease inhibition assay in vitro and an anti-influenza A virus assay. The marchantins are macrocyclic bisbibenzyls found in liverworts, and plagiochin A and perrottetin F are marchantin-related phytochemicals. We found from our screen that marchantin A, B, E, plagiochin A and perrottetin F inhibit influenza PA endonuclease activity in vitro. These compounds have a 3,4-dihydroxyphenethyl group in common, indicating the importance of this moiety for the inhibition of PA endonuclease. Docking simulations of marchantin E with PA endonuclease suggest a putative “fitting and chelating model” as the mechanism underlying PA endonuclease inhibition. The docking amino acids are well conserved between influenza A and B. In a cultured cell system, marchantin E was further found to inhibit the growth of both H3N2 and H1N1 influenza A viruses, and marchantin A, E and perrotein F showed inhibitory properties towards the growth of influenza B. These marchantins also decreased the viral infectivity titer, with marchantin E showing the strongest activity in this assay. We additionally identified a chemical group that is conserved among different anti-influenza chemicals including marchantins, green tea catechins and dihydroxy phenethylphenylphthalimides. Our present results indicate that marchantins are candidate anti-influenza drugs and demonstrate the utility of the PA endonuclease assay in the screening of phytochemicals for anti-influenza characteristics.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000

2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：

キーワード：RNAポリメラーゼ；インフルエンザ；エンドヌクレアーゼ；カテキン；サリドマイド；フェネチルフェニルサリミド；天然物化合物；阻害剤

### 1. 研究開始当初の背景

1918-1919年に世界中で大流行したスペイン風邪は、インフルエンザウイルスによって引き起こされたもので、死者5千万人とされている。最近でも、2009年H1N1型のブタ由来新型A型インフルエンザウイルスが世界的な大流行パンデミックを引き起こして多数の死者を出し、またH5N1型の高病原性トリインフルエンザのヒトへの感染が懸念されるなど、インフルエンザは現代でも人類にとって非常に大きな脅威となっている。インフルエンザRNAポリメラーゼは3つのサブユニットからなり、3本のゲノムRNAに分かれてコードされている。ノイラミニダーゼは細胞表面にあるため、比較的アミノ酸配列の保存性が低く、変異を起しやすいため、耐性ウイルスが出現しやすい。これに対して、RNAポリメラーゼはRNAゲノムに接触しているがために株間でのアミノ酸配列の保存性が高く、変異が起こりにくい。また、RNAポリメラーゼはRNAゲノムの複製と転写の両方を行うので、抗インフルエンザ薬の標的として最適である。

### 2. 研究の目的

インフルエンザウイルスは感染した細胞のmRNAを切断し、そのキャップを含む5'側の領域をプライマーとして利用してウイルスのmRNAを転写する。インフルエンザRNAポリメラーゼ内のエンドヌクレアーゼ阻害活性を指標にして抗インフルエンザ化合物を探索する。化合物としては植物から精製された天然化合物や有機合成・工業合成された化合物を用いる。例としてサリドマイドアナログは多様なタンパク質に作用できることが知られており、これを用いて抗インフルエンザ薬の種となる化合物を探索する。また徳島文理大学の所有する数十種類の天然物化合物をスクリーニングに用いる。

### 3. 研究の方法

(1) プラスミドの調製・タンパク質の発現と精製  
インフルエンザウイルス(A/PR/8/34) H1N1

RNAポリメラーゼPAプラスミド、pBMSA-PA、を鋳型にし、PAのN末端エンドヌクレアーゼドメイン(1-220残基)をpET28a(+)に組み込み、大腸菌にて発現、ニックルアガロースとイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

#### (2) PA エンドヌクレアーゼアッセイ

0.35gの精製したPAエンドヌクレアーゼドメインタンパク質を用い、1gのM13mp18 1本鎖DNAを基質として用いた。電気泳動により消化を検出した。

#### (3) 結合シミュレーション

MOEプログラムを用いて結合シミュレーションを行った。

### 4. 研究成果

1) インフルエンザRNAポリメラーゼのPAサブユニットのエンドヌクレアーゼ活性を阻害する緑茶カテキン群

緑茶カテキンをエンドヌクレアーゼのアッセイ系に加えて阻害するかどうかを検討した。緑茶カテキンにはエピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキンの4種類が主に含まれており、この4種類について検討した。すると、ガロイル基を有するエピガロカテキンガレートとエピカテキンガレートはエンドヌクレアーゼ活性を阻害するのに対して、ガロイル基を持たないエピガロカテキンとエピカテキンの2種類は殆ど阻害しなかった。この領域の立体構造に対してカテキン類がどのように当てはまるかを計算した。阻害活性のあるガロイル基を有するエピガロカテキンガレートとエピカテキンガレートは酵素のポケットに対してよく充填するのに対して、阻害活性の無いガロイル基を持たないエピガロカテキンとエピカテキンはポケットに対して隙間の多い状態であった。*in silico*と阻害活性が良く対応することが分かった。カテキンがインフルエンザのRNAポリメラーゼに作用することを見いだしたのは本研究が

初めてである。

### 3) インフルエンザ RNA ポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を阻害するサリドマイド類似化合物

この PA エンドヌクレアーゼの系を用いて、合成化合物に対して抗インフルエンザ薬の候補となりうる化合物を検索した。中でもサリドマイド類似化合物に着目した。サリドマイドは催奇形性ゆえに市場撤退した催眠剤であるが、近年エイズや癌を始め様々な疾病に対する薬効が再評価され、わが国でも多発性骨髄腫の治療薬として市販されている。そのサリドマイド類似化合物は東京大学・分子細胞生物学研究所の橋本祐一先生に御供与頂いた。構造展開した 34 種類のサリドマイド誘導体を用いて試験管内のエンドヌクレアーゼ阻害活性を検討した。また国立感染症研究所との共同研究で抗ウイルス活性も検討した。その結果、34 種類のサリドマイド誘導体のうち、PPT-65, PPT-66, PPT-67 の 3 種類の誘導体が PA サブユニットにおけるエンドヌクレアーゼ活性とウイルスの増殖を抑制した。これらの 3 種類の誘導体は全て共通してカテコール基を持っていた。サリドマイド由来誘導体は、新しい抗インフルエンザ薬としての可能性を持つことが示唆された。

### 4) インフルエンザ RNA ポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性のコケ由来成分マルカンチンによる阻害活性

天然物化合物に対して抗インフルエンザの候補となる化合物を検索した。徳島文理大学の浅川義範先生・橋本敏広先生に 33 種類の天然物化合物を御供与頂いた。試験管内にて、PA エンドヌクレアーゼ活性の系を用いて、抗インフルエンザ活性を有する化合物の候補を検索した。その結果、ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* に含まれるマルカンチン類が阻害活性を有すると分かった。マルカンチンは大環状ビスビベンジル構造を有するという面白い構造をしている。10 種類のマルカンチン類似体があるが、このうち、カテコール骨格を有する 5 種類のマルカンチンが PA エンドヌクレアーゼ活性を阻害した。次に阪大微研との共同研究により、抗ウイルス活性を検討したところ、A 型インフルエンザウイルス (H1N1, H3N2) では Marchantin E が、B 型インフルエンザウイルスでは Marchantin A, E, Perrottetin F がウイルスの増殖を抑制した。以上より、これらの分子が共通して持つカテコール基の水酸基がエンドヌクレアーゼ活性の阻害と抗インフルエンザウイルス活性に重要であることが示唆された。マルカンチン型化合物は、新しい抗インフルエンザ薬の

シードとして期待できるかもしれない。

### 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 11 件)

1. Shoji M., Takahashi E., Hatakeyama D., Iwai Y., Morita Y., Shirayama R., Echigo N., Kido H., Nakamura S., Mashino T., Okutani T., Kuzuhara T. Anti-influenza activity of C60 fullerene derivatives. *PLoS ONE*, in press. doi: 10.1371/journal.pone.0066337
2. Hiasa M, Isoda Y, Kishimoto Y, Saitoh K, Kimura Y, Kanai M, Shibasaki M, Hatakeyama D, Kirino Y, Kuzuhara T. Inhibition of monoamine oxidase A and stimulation of behavioural activities in mice by the inactive prodrug form of the anti-influenza agent oseltamivir. *British Journal of Pharmacology*. 2013, 169, 115-129. doi: 10.1111/bph.12102.
3. Hiasa M, Kurokawa M, Ohta K, Esumi T, Akita H, Niki K, Yagi Y, Echigo N, Hatakeyama D, Kuzuhara T. Identification and purification of resorcinol, an antioxidant specific to Awa-ban (pickled and anaerobically fermented) tea. *Food Research International*, in press. doi: 10.1016/j.foodres.2013.05.036
4. 葛原隆、インフルエンザ RNA ポリメラーゼ病原性の強さと種間の伝播に関する立体構造とエンドヌクレアーゼを阻害する化合物群 *ファルマシア*. 2012, 48, 499-503.  
<http://farumashia.pharm.or.jp/mokuji/2012/48-06.html>
5. Kuzuhara T, Tsuge H. The tertiary structures of the domains of influenza RNA polymerase. *Seikagaku*. 2012, 84, 780-785. PMID: 23320399.  
<http://www.jbsoc.or.jp/event/magazine/pdf/84-09-07.pdf>
6. Iwai Y, Murakami K, Gomi Y, Hashimoto T, Asakawa Y, Okuno Y, Ishikawa T, Hatakeyama D, Echigo N, Kuzuhara T. Anti-Influenza Activity of Marchantins, Macrocyclic Bisbibenzyls Contained in Liverworts. *PLoS ONE* (2011) 6(5), e19825. doi: 10.1371/journal.pone.0019825.
7. Ludwiczuk A, Saha A, Kuzuhara T, Asakawa Y. Bioactivity guided isolation of anticancer constituents from leaves of *Alnus sieboldiana* (Betulaceae).

- Phytomedicine (2011) 18(6): 491-498. doi: 10.1016/j.phymed.2010.10.005.
- Saha A., Kuzuhara T., Echigo N., Fujii A., Suganuma M., Fujiki H. Apoptosis of human lung cancer cells by curcumin mediated through up-regulation of growth arrest and DNA damage inducible genes 45 and 153. Biol. Pharm. Bull. (2010) 33(8): 1291-1299. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.1291>
  - Saha A., Kuzuhara T. Echigo N., Suganuma M., Fujiki H. New Role of (-)-Epicatechin in Enhancing the Induction of Growth Inhibition and Apoptosis in Human Lung Cancer Cells by Curcumin. Cancer Prevention Research (2010) 3, 953-962. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0247.
  - Kimura Y, Yamatsugu K, Kanai M, Echigo N, Kuzuhara T., Shibasaki M. Design and synthesis of resin-conjugated Tamiflu analogs for affinity chromatography. Bull. Korean Chem. Soc. (2010) 31: 588-594. doi: 10.5012/bkcs.2010.31.3.588.
  - Iwai Y, Takahashi H, Hatakeyama D, Motoshima K, Ishikawa M, Sugita K, Hashimoto Y, Harada Y, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Sei Y, Yamaguchi K, Kuzuhara T. Anti-influenza Activity of Phenethylphenylphthalimide Analogs Derived from Thalidomide. Bioorganic & Medicinal Chemistry (2010) 18, 5379-5390. doi: 10.1016/j.bmc.2010.05.035.
- [学会発表] (計 51 件)
- 磯田裕美子, 日浅未来, 岸本泰司, 齐藤健太, 木村康明, 金井求, 柴崎正勝, 桐野豊, 畠山大, 葛原隆, オセルタミビルによるモノアミン酸化酵素 (MAO) 阻害活性の検討, 第 133 回 日本薬学会年会, 2013 年 3 月 27 日-30 日, 横浜
  - 庄司正樹, 畠山大, 高橋悦久, 森田悠香, 奥谷武史, 岩井佑磨, 越後典子, 木戸博, 中村成夫, 増野匡彦, 葛原隆, Fullerene derivatives によるインフルエンザ PA サブユニットのエンドヌクレアーゼ活性及びウイルス感染阻害効果の検討, 第 133 回 日本薬学会年会, 2013 年 3 月 27 日-30 日, 横浜
  - 畠山大, 廣田丈典, 柳澤伸, 長江萌菜美, 庄司正樹, 葛原隆, インフルエンザウイルス RNA 合成酵素における自己アセチル化能の発見, 第 133 回 日本薬学会年会, 2013 年 3 月 27 日-30 日, 横浜
  - 黒河愛美, 仁木健悟, 秋田浩志, 植野遥, 太田佳那, 畠山大, 日浅未来, 江角朋之, 越後典子, 葛原隆, 阿波番茶に含まれる成分の精製とその生理作用検討, 日本薬学会第 132 年会 (2012 年 3 月 29-31 日, 北海道大学)
  - 磯田裕美子, 正木智久, 力武舞, 日浅未来, 越後典子, 木村康明, 金井求, 柴崎正勝, 葛原隆, タミフル固定担体を用いた脳におけるタミフル結合タンパク質の探索, 日本薬学会 第 132 年会 (2012 年 3 月 29-31 日, 北海道大学)
  - 葛原隆, インフルエンザ RNA ポリメラーゼの“病原性の強さと種間の伝播に関与する立体構造”と“そのエンドヌクレアーゼを阻害する化合物群”, 文部科学省特別経費プロジェクト・難治性感染症を標的とした創薬研究教育推進事業 平成 23 年度第二回教育シンポジウム (2012 年 3 月 8 日 岡山大学薬学部大講義室)
  - Dai Hatakeyama, Masaki Shoji, Takenori Hirota, Shin Yanagisawa, Monami Nagae, Takashi Kuzuhara. Autoacetylation activity in the PB2 subunit of RNA-dependent RNA polymerase of influenza A virus. 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress (2012 年 9 月 4-9 日, Spain)
  - Hao Qiu, 鶴村 俊治, 畠山大, 葛原隆, 津下 英明, A 型インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PB2 の構造と機能, 第 85 回 日本生化学大会, 2012 年 12 月 14-16 日 (福岡国際会議場)
  - 葛原隆, インフルエンザ RNA ポリメラーゼの新規モチーフとエンドヌクレアーゼを阻害する化合物, 大阪大学大学院特別講義, 2012 年 4 月 23 日, 大阪大学
  - 畠山大, 廣田丈典, 柳澤伸, 長江萌菜美, 庄司正樹, 葛原隆, インフルエンザウイルス RNA 合成酵素の PB2 サブユニットにおける自己アセチル化能の構造機能学的解析, 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡国際会議場) 2012 年 12 月 11-14 日
  - 畠山大, 廣田丈典, 柳澤伸, 長江萌菜美, 庄司正樹, 葛原隆, インフルエンザウイルス RNA 依存性 RNA 合成酵素の PB2 サブユニットにおける自己アセチル化能の構造学および機能学的解析, 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会 (大阪国際会議場), 2012 年 11 月 14 日
  - 畠山大, 廣田丈典, 柳澤伸, 長江萌菜美, 庄司正樹, 葛原隆, インフルエンザウイルス RNA 合成酵素における自己アセチル化能の構造学および生化学的解析, 第 51 回 日本薬学会・中国四国支部学術大会 (島根), 2012 年 11 月 10-11 日
  - 加藤 有介, 葛原隆, インフルエン

- ザ PB2 相互作用解析、第 21 回 日本バイオイメージング学会学術集会、2012 年 8 月 27, 28 日 (国立京都会館)
14. 畠山大, 岩井佑磨, 村上宏起, 五味康行, 奥谷武史, 橋本敏弘, 浅川義範, 奥野良信, 石川豊数, 越後典子, 葛原隆、コケ植物の環状ビスビベンジル分子マルカンチンによる抗インフルエンザウイルス活性、第 3 回日本生物物理学会中国四国支部会 (広島大学) 2011 年 5 月 14-15 日
  15. 畠山大, 岩井佑磨, 村上宏起, 五味康行, 奥谷武史, 橋本敏弘, 浅川義範, 奥野良信, 石川豊数, 越後典子, 葛原隆、コケ植物由来の大環状ビスビベンジル分子による抗インフルエンザウイルス活性、第 49 回日本生物物理学会年会 (兵庫県立大学) 2011 年 9 月 16-18 日
  16. 畠山大, 岩井佑磨, 村上宏起, 五味康行, 奥谷武史, 橋本敏弘, 浅川義範, 奥野良信, 石川豊数, 越後典子, 葛原隆、大環状ビスビベンジル分子による抗インフルエンザ活性、第 50 回日本薬学会・中国四国支部学術大会 (高松市) 2011 年 11 月 12-13 日
  17. 葛原隆、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ、第 8 回 HBS 公開シンポジウム「化合物ライブラリーからのメディスナルサイエンス」平成 23 年 11 月 19 日 (長井記念ホール 徳島大学 蔵本)
  18. 越後典子, 正木智久, 力武舞, 磯田裕美子, 木村康明, 金井求, 柴崎正勝, 葛原隆、オセルタミビル固定担体を用いた脳におけるオセルタミビル結合タンパク質の探索、日本薬学会 第 131 年会 (2011 年 3 月、静岡、参集中止・年会成立)
  19. 岩井佑磨, 高橋仁, 畠山大, 本島和典, 石川稔, 杉田和幸, 橋本祐一, 原田勇一, 板村繁之, 小田切孝人, 田代真人, 清悦久, 山口健太郎, 葛原隆、サリドマイド由来誘導体による抗インフルエンザ活性、日本薬学会 第 131 年会 (2011 年 3 月、静岡、参集中止・年会成立)
  20. 畠山大, 岩井佑磨, 高橋仁, 本島和典, 石川稔, 杉田和幸, 橋本祐一, 原田勇一, 板村繁之, 小田切孝人, 田代真人, 清悦久, 山口健太郎, 葛原隆「サリドマイド由来誘導体の抗インフルエンザ活性」日本生物物理学会第 2 回中国四国支部大会 (2010 年 5 月 8 日) 松山大学
  21. 畠山大, 岩井佑磨, 高橋仁, 本島和典, 石川稔, 杉田和幸, 橋本祐一, 原田勇一, 板村繁之, 小田切孝人, 田代真人, 清悦久, 山口健太郎, 葛原隆「サリドマイド・アナログの抗インフルエンザウイルス活性」日本生物物理学会第 48 回年会 (2010 年 9 月 20-22 日) 東北大学
  22. 畠山大, 岩井佑磨, 高橋仁, 本島和典, 石川稔, 杉田和幸, 橋本祐一, 原田勇一, 板村繁之, 小田切孝人, 田代真人, 清悦久, 山口健太郎, 葛原隆、サリドマイド由来誘導体による抗インフルエンザウイルス活性の構造学および生化学的解析、第 49 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (2010 年 11 月 6-7 日) 鳥取県米子市
  23. Hatakeyama D, Iwai Y, Takahashi H, Motoshima K, Ishikawa M, Sugita K, Hashimoto Y, Harada Y, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Sei Y, Yamaguchi K, Kuzuhara T, "Thalidomide analogs as a new strategy against influenza A", Cell Symposia "Influenza: Translating basic insights", 2-4 December 2010, Washington D.C., USA.
  24. 越後典子, 木瀬大輔, 吉田浩子, 堀田貴大, 村崎佳美, 西村明恵, 宇都宮敬子, 津下英明, 葛原隆、A 型インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PB2 の病原性関与ドメインの構造と機能の解析、日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月、岡山)
  25. 岩井佑磨, 高橋宏暢, 畠山大, 越後典子, 葛原隆、インフルエンザエンドヌクレアーゼ活性に対するカテキンの阻害効果、日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月、岡山)
  26. 葛原隆、カテキンによるインフルエンザ DNA/RNA 分解酵素阻害、第 25 回 茶学術研究会講演会 (2010 年 3 月、静岡)  
・以下、27-34 は文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業「疾患関連遺伝子及び疾患治療に用いる天然有機化合物の生合成遺伝子の包括的解析」第 5 回研究発表会 (2012 年 12 月、徳島)
  27. 庄司正樹, 畠山大, 高橋悦久, 森田由香, 奥谷武史, 岩井佑磨, 越後典子, 増野匡彦, 中村成夫, 木戸博, 葛原隆、Fullerene derivatives によるインフルエンザ PA サブユニットのエンドヌクレアーゼ活性及びウイルス感染阻害効果の検討
  28. 平尾昌哉, 庄司正樹, 奥谷武史, 江角朋之, 木戸博, 葛原隆、Bakuchiol によるインフルエンザウイルス感染阻害効果の検討
  29. 竹田裕文, 河野良造, 西園寺花恋, 木村若菜, 渡邊真衣, 畠山大, 葛原隆、ミツバチ感染性ウイルス Israeli acute paralysis virus (IAPV) における RNA 依存性 RNA 合成酵素の組み換えタンパク質作製の試み
  30. 柳澤伸, 畠山大, 廣田丈典, 長江萌菜美, 庄司正樹, 葛原隆、インフルエンザウイルス RNA 依存性 RNA 合成酵素を構成する PB2 サブユニットにおける自己アセチル化能の発見

31. 秋田浩志、黒河愛美、仁木健悟、太田佳那、原田聖大、畠山大、日浅未来、越後典子、江角朋之、八木康行、葛原隆、阿波番茶に含まれる成分 Resorcinol の生理作用検討
32. 高井寛範、葛原隆、加藤有介、津下英明、インフルエンザ RNA ポリメラーゼサブユニット PB2 の C 末端領域と核内輸送因子 Importin  $\alpha$  の NMR による相互作用解析
33. 宮崎 輝、越後 典子、葛原 隆、タミフル耐性インフルエンザウイルス膜タンパク質ノイラミニダーゼの昆虫細胞での発現・可溶性・精製
34. 谷口智紀、峯崎征隆、葛原隆、チューリングパターンへの生物への応用  
・以下、35-42 は文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業「疾患関連遺伝子及び疾患治療に用いる天然有機化合物の生合成遺伝子の包括的解析」第 3 回研究発表会 (2011 年 12 月、徳島)
35. 木村若菜、渡邊真衣、西園寺花恋、畠山大、葛原 隆、ミツバチ失踪原因候補ウイルスの殻タンパク質と相互作用するミツバチ由来タンパク質同定の試み：ブルダウンアッセイ法
36. 畠山大、廣田丈典、柳沢伸、葛原隆、インフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA 合成酵素 PB2 サブユニットにおける自己アセチル化能の生化学的解析
37. 森田悠香、加集美穂、越後典子、葛原隆、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの解析に向けた PA、PB1、PB2 全長の昆虫細胞での発現系構築
38. 佐野涼、葛原隆、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの酵母での結合タンパクの探索、発現
39. 黒河愛美、仁木健悟、秋田浩志、畠山大、日浅未来、江角朋之、葛原隆、阿波番茶に含まれる成分 Resorcinol の生理作用検討
40. 河野良造、畠山大、木村若菜、渡邊真衣、竹田裕文、葛原隆、ミツバチ失踪原因候補ウイルスのタンパク質の発現系の構築と Far Western Blotting 法を用いた殻タンパク質と相互作用するミツバチ由来タンパク質の探索
41. 奥谷武史、岩井佑磨、畠山大、日浅未来、葛原隆、橋本敏弘、浅川義範、インフルエンザ PA サブユニットのエンドヌクレアーゼ・プロテアーゼ活性に阻害効果を有する化合物の探索
42. 磯田裕美子、正木智久、力武舞、日浅未来、越後典子、葛原隆、木村康明、金井求、柴崎正勝、タミフル固定担体を用いた脳におけるタミフル結合タンパク質の探索  
・以下、43-51 は文部科学省戦略的研究基盤

形成支援事業「疾患関連遺伝子及び疾患治療に用いる天然有機化合物の生合成遺伝子の包括的解析」第 1 回研究発表会 (2010 年 12 月、徳島)

43. 越後典子、正木智久、力武舞、磯田裕美子、葛原隆、木村康明、金井求、柴崎正勝、タミフル固定担体を用いた脳におけるタミフル結合タンパク質の探索
44. 加集美穂、森田悠香、越後典子、葛原隆、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの解析のための PA、PB1、PB2 全長の昆虫細胞での発現系構築
45. 中野亜美、木瀬大輔、葛原隆、津下英明、インフルエンザ RNA ポリメラーゼ PB2 と核内輸送タンパク質 Importin  $\alpha$  による複合体の結晶構造解析
46. 廣田丈典、畠山大、葛原隆、インフルエンザ RNA 合成酵素の大腸菌によるタンパク発現及び機能解析
47. 岡田行正、越後典子、葛原隆、インフルエンザウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの HEK293T 細胞における過剰発現の効果の解析
48. 岩井佑磨、奥谷武史、越後典子、葛原隆、村上宏起、五味康行、奥野良信、石川豊数、橋本敏広、浅川義範、マルカンチンによる抗インフルエンザ活性
49. 畠山大、岩井佑磨、葛原隆、高橋仁、原田勇一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、本島和典、石川稔、杉田和幸、橋本祐一、清悦久、山口健太郎、新しい抗インフルエンザ薬としてのサリドマイド由来誘導体
50. 西園寺花恋、木村若菜、渡邊真衣、河野良造、竹田裕文、畠山大、葛原隆、ミツバチ失踪の原因と考えられるウイルス構成タンパク質の構造解析
51. 仁木健悟、黒河愛美、太田佳奈、畠山大、越後典子、葛原隆、江角朋之、阿波番茶に含まれる成分の精製とその生理作用検討

〔図書〕 (計 1 件)

伊東晃、藤木博太、分担執筆 葛原隆「薬学領域の生化学」改訂版第 3 版 廣川書店編集

〔その他〕

ホームページ等

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab/lab08/>

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab08/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

葛原 隆 (TAKASHI KUZUHARA)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：00260513