

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：72801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659139

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスポリメラーゼの構造変化抑制を作用原理とした新奇阻害剤の同定

研究課題名(英文) Identification of a novel inhibitor of influenza virus polymerase based on inhibition of conformational change required for cap-dependent endonuclease activity

研究代表者

山崎 学 (YAMASAKI, Manabu)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：50442570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスがもつRNAポリメラーゼは、宿主mRNAからキャップ構造を含むRNA断片を切り出し、これをプライマーとしてRNA合成に利用することでウイルスmRNAにキャップ構造をもたらす。この特異な反応は宿主側の酵素には無く、有望な創薬標的とされている。本研究では、この活性の発現に重要な基質認識に伴う酵素の構造変化について解析し、この変化の抑制を指標にして阻害剤を探索した。その結果、キャップ構造の認識に伴って構造が変化する領域を見出すとともに、この変化を抑制する2種の化合物を同定し、これらがキャップ依存的なRNA切断反応を強く阻害することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Influenza viral polymerase cleaves capped RNA fragments from cellular mRNAs and uses them as primers for initiating viral transcription, which generates capped viral mRNA molecules. This unique mechanism is a target for the discovery of anti-influenza therapeutics. In this study, we investigated a conformational change of this enzyme required for the endonuclease activity, and screened enzymatic inhibitor based on inhibition of the identified conformational change. We identified the protein region showing the conformational change upon cap-binding and two small compounds as an inhibitor of both this change and cap-dependent endonuclease activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：インフルエンザウイルス RNAポリメラーゼ エンドヌクレアーゼ キャップ構造 質量分析フットプリント法 抗ウイルス薬

1. 研究開始当初の背景

新しい抗インフルエンザウイルス薬の開発が望まれている。インフルエンザウイルスは1本鎖マイナス鎖RNAをゲノムとして持ち、これを鋳型として転写と複製を行う。両反応は1種類のウイルスRNAポリメラーゼ(PA、PB1およびPB2サブユニットからなるヘテロ3量体)が担い、なかでも転写において特異な反応を行う。具体的には、ウイルスポリメラーゼはウイルスmRNAの5'末端にキャップ構造を付加する活性を持たないが、生体分子の宿主mRNAからキャップ構造を含むRNA断片を切り出し、これをプライマーとしてRNA合成に利用することで、ウイルスmRNAにキャップ構造をもたらす。このキャップ依存エンドヌクレアーゼ反応はウイルスに特有な機構であり、有望な創薬標的とされる。そこで、これまでに申請者らのグループも含めて、この反応を阻害する低分子化合物の探索が広く行われてきた。しかし、見出された阻害剤は僅かであり、有望なリード化合物はなく、新たな発想によるブレイクスルーが求められている。

2. 研究の目的

これまでの研究から、ウイルスポリメラーゼの酵素活性の発現には、基質やゲノム認識に伴うアロステリック制御による酵素サブユニット間のコンフォメーション(構造)変化が重要と考えられている。このことから、ウイルスポリメラーゼの阻害を、低分子化合物を用いて「正常な構造変化を妨げる」ことで達成できないかと考えた。しかし、酵素上のどの領域が高次構造を変化させて機能制御に関わるかは明らかとされていない。本研究では、キャップ依存エンドヌクレアーゼ反応時のタンパク質構造を質量分析法により解析し、変化を起こす領域を明らかにすることを目的とする。さらに、この構造変化を抑制する化合物を探索・同定し、これを用いて酵素活性の阻害を達成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 質量分析フットプリント法によるウイルスRNAポリメラーゼの構造解析

質量分析フットプリント法は液相中のタンパク質について、溶媒に露出している表面アミノ酸を化学修飾し、これを質量分析により同定してタンパク質構造の情報を得る手法である。本研究では、酵素「そのまま」、「キャップ化RNAを結合させたもの」および「キャップアナログ(RNAなし)を結合させたもの」を調製した。次に、酵素上のアミノ酸のリジン残基を、NHS-ビオチンにより化学修飾した(NHS-ビオチンは溶媒に露出しているリジン側鎖と反応するために、タンパク質表面のリジンが選択的に修飾される)。修飾した酵素をトリプシンにより消化した後、液体クロマトグラフ/質量分析計にて分析し、個々の

ペプチドの質量を測定するとともに配列情報を得た。化学修飾により固有の質量が付加(+226 Da)するペプチド(=酵素表面に局在するペプチド)の中で、キャップ化RNA(基質)の結合によって修飾の有無が変動するペプチドを、表面露出が変化(=構造変化)する領域の候補とした。

(2) 構造変化する領域の酵素活性における役割の検証

上記にて見出した領域の酵素活性における役割は、リバースジェネティクスの手法を用いたレポーターアッセイにより検証した。酵素を構成するタンパク質を発現する4種のプラスミド(PA、PB1、PB2およびNP)と、ウイルスゲノムRNA(翻訳領域をルシフェラーゼに置換)を発現するプラスミドを293T細胞に同時に導入し、細胞内にて酵素-ゲノムRNA複合体を調製した。このとき、見出した領域内の化学修飾されたリジンをアスパラギン酸に置換する変異処理を施した。ウイルスポリメラーゼによって転写されるルシフェラーゼの活性を測定することで、当該領域の酵素活性における役割を評価した。

(3) 構造変化を阻害する化合物の探索

スクリーニングには申請者の所属機関が所有する化合物ライブラリーから3万化合物を供した。まず、ウイルスポリメラーゼのRNA合成を指標にした酵素阻害アッセイを行い、目的の活性が期待される化合物からなる小規模ライブラリーを作製した。これにより、スクリーニングの迅速化とヒット率の向上を図った。次に、上記にて明らかにした領域の化学修飾に及ぼす化合物の影響を質量分析法により解析し、構造変化を妨げる化合物を同定した。最後に、同定した化合物について、キャップ依存エンドヌクレアーゼ反応の阻害活性を判定した。

4. 研究成果

(1) 構造変化する3つの候補領域の同定

これまでに、インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼについて質量分析フットプリント法を用いて解析した報告はない。そこで本研究では、まずこの手法の適用を試み、酵素反応や化学修飾等の処理条件の検討により、これを達成した。

基質であるキャップ化RNAの認識に伴い酵素上で構造変化する領域を明らかにするために、酵素「そのまま」と、「キャップ化RNAを結合させたもの」を調製した。2者を質量分析フットプリント法により比較解析した結果、キャップ化RNAの結合によってリジンの修飾効率が低下する3つの領域(①PAサブユニットのアミノ酸配列280~289番目、②PB1サブユニットの266~279番目、③PB2サブユニットの137~142番目)を見出した。さらに詳細に理解するために、RNAを除いた「キャップ構造のみを結合させた酵素」を調

製し、同様に解析した。その結果、PA サブユニットのアミノ酸配列 280~289 番領域は、キャップ構造の結合のみでリジンの修飾効率が低下することが確認された。

見出した3つの領域を既知の結晶構造や一次構造の機能マップにマッピングし、酵素活性における役割を以下のように推察した。

① PA サブユニットの 280~289 番領域は、これまでに機能に関する報告は無いものの、PAのエンドヌクレアーゼドメインとPB1結合ドメインの間に位置している。一方、キャップ結合ドメインはPB2上にある。これらのことから、キャップ結合という入力信号をヌクレアーゼ活性として発現する際に、PAのヌクレアーゼドメイン周辺に構造変化が起こり、この領域がタンパク質の内側に向くことで表面露出しなくなると推察された。

② PB1 サブユニットのアミノ酸配列 266~279 番目は、RNA 結合能を示す領域として報告されている。また、ポリメラーゼモチーフを有するドメインの末端に位置している。これらのことから、切断後のキャップ化 RNA をポリメラーゼドメインに導くために、この領域が RNA 結合の足場になると推察された。

③ PB2 サブユニットのアミノ酸配列 137~142 番目は、PB1 と結合するドメインの近傍に位置する。また、この領域内のアルギニン残基には RNA 合成活性を制御する役割が報告されている。これらのことから、この領域は、キャップ化 RNA の認識に続いて構造が変化する場所、または RNA 結合の足場になると推察された。

(2) 3つの領域の酵素活性における役割

上記にて同定した3つの領域内のリジン残基(①PAサブユニットの281番目、②PB1サブユニットの279番目、③PB2サブユニットの140番目)をアスパラギン酸に置換した結果、ルシフェラーゼの活性は著しく低下した。とくに、PAとPB1の領域内の変異では酵素活性の低下が著しかったことから、これらの領域は本酵素の機能に極めて重要な領域であることが明らかとなった。

(3) 構造変化を阻害する化合物の同定

酵素阻害アッセイの結果、約100化合物からなる小規模ライブラリーを作製した。このライブラリー化合物について、上記にて同定したタンパク質領域に及ぼす影響を解析した結果、構造変化を強く妨げる2種の天然化合物を同定した。具体的には、 β -RubromycinとFluvirucin B1であり、前者はPAサブユニットの領域、後者はPB2サブユニットの領域の正常な変化を妨げた。さらに、これらによる酵素阻害活性を検証した結果、キャップ依存的なRNA切断反応を強く阻害した(図1)。なかでも、 β -RubromycinはIC₅₀値として0.1 μ Mであり、強い阻害活性を示した。以上の結果は、「酵素特有の構造変化を指標として酵素反応

の阻害剤を探索する」という化合物探索ストラテジーの有効性を強く示唆する。

β -Rubromycinはヒトのテロメラーゼや、エイズウイルスの逆転写酵素に対する阻害作用が報告されている。しかし、その阻害活性はインフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼと比べて10~30倍ほど弱い。ウイルスポリメラーゼには、この違いを説明する特異的な理由が存在する可能性がある。これまでに報告されたキャップ依存エンドヌクレアーゼ阻害剤は、基質認識部位や活性中心を薬剤作用部位としているが、 β -Rubromycinはヌクレアーゼドメインに作用しないことを確認した。このことは、本化合物がこれまでとは異なる機序で酵素反応を阻害していることを示唆する。新たな薬剤作用部位の提案につながる可能性があり、現在、この阻害機構について詳細な解析を進めている。

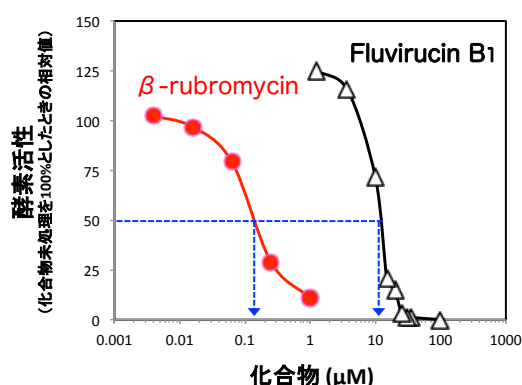


図1 キャップ依存エンドヌクレアーゼ活性に及ぼす2種の化合物の影響

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1件)

- ① Takizawa N, Fujiwara T, Yamasaki M, Saito A, Fukao A, Nomoto A, & Mizumoto K. The essential role for the RNA triphosphatase Cet1p in nuclear import of the mRNA capping enzyme Cet1p-Ceg1p complex of *Saccharomyces cerevisiae*. PLOS One 8(10); e78000 (2013) 査読有 DOI : 10.1371/journal.pone.0078000.

[学会発表] (計2件)

- ① 梅北まや、五十嵐雅之、澤竜一、山崎学、林千草、波多野和樹、藤原俊伸、水本清久、野本明男：新規 RNA 5'-トリホスファターゼ阻害物質 MI481-42F6 A, B, C および D に関する研究
日本農芸化学会 2014 年度大会
2014 年 3 月 30 日、明治大学生田キャンパス (川崎市)
- ② 山崎学、滝沢直己、藤原俊伸、水本清久、野本明男；インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼがもつキャップ依存エンドヌクレアーゼ活性を阻害する低分子化合

物の探索
第 61 回日本ウイルス学会学術集会
2013 年 11 月 11 日, 神戸国際会議場 (神戸市)

[その他]

ホームページ等

公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学
研究所

<http://www.bikaken.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 学 (YAMASAKI Manabu)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学
研究所・研究員

研究者番号 : 50442570

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

滝沢 直己 (TAKIZAWA Naoki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学
研究所・研究員

研究者番号 : 50448502

水本 清久 (MIZUMOTO Kiyohisa)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学
研究所・研究アドバイザー

研究者番号 : 80092344