

2009年5月22日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
公立大学法人横浜市立大学

筑波大学大学院人間総合科学研究科(基礎医学系感染生物学)の永田恭介教授と横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 朴准教授グループが

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼの構造を解明！ — 新型インフルエンザウイルスに対する新規薬剤設計が可能に —

～ 『欧州分子生物学機関誌 EMBO J 』 オンライン版

(5月21日午後3時付：日本時間5月21日午後11時)に掲載～

★研究成果のポイント

- サブユニット間の結合構造を X 線結晶構造解析により解明
- サブユニット結合に重要なアミノ酸残基を同定
- アミノ変異によるサブユニット結合阻害が、ポリメラーゼ活性を低下させることを確認
- 阻害剤設計による抗新型ウイルス薬発見に期待

筑波大学大学院人間総合科学研究科（基礎医学系感染生物学）の永田恭介教授と横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科の朴三用准教授（博士後期課程の杉山佳奈子氏・尾林栄治特任助教）らの研究グループ*1 は、インフルエンザウイルスの複製に中心的な役割を果たしている RNA ポリメラーゼのサブユニット間の構造を原子レベルで解明しました。この研究は、2008 年に同グループにより解明された構造（英国科学誌「Nature」発表）と合わせ、新規抗ウイルス剤開発に向けて非常に画期的な成果です。

メキシコで発生した新型インフルエンザは瞬く間に世界中に広がり、世界保健機関（WHO）による警報フェーズも 5 に引き上げられるなど（最高はフェーズ 6）、世界的な大流行の兆しを見せています。今回発生した新型インフルエンザは弱毒性であり、またタミフルが有効であることからその死亡率は高くないものの、いつこれが強毒型に変異を遂げるか、その脅威は想像に難くありません。特に最近、東南アジア諸国で家畜として飼われている豚の多くが強毒型鳥インフルエンザを保持していることが確認されており、今回の新型インフルエンザがこれらの豚に感染した際に新たな高病原性新型インフルエンザウイルスが生まれるのではないかと世界中で危惧されています。その対策として日本政府を含む世界の国々はタミフルの備蓄やプレパンデミックワクチンの作成を行ってきていますが、既にタミフル耐性のインフルエンザウイルスが何度か流行していること、また今回の新型インフルエンザに対してこれまでのワクチンが全く有効でなかったことなどから、実際にそのような新型ウイルスが出現した際のそれらの有効性は全く不透明であり、違った形での対策が世界中で求められています。

共同研究グループが構造を明らかにしたインフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは（A ソ連型: H1N1）、インフルエンザウイルスの複製(増殖)に中心的な役割を担っているため、その阻害

剤は抗インフルエンザ薬として非常に高い有効性を示すことが予想されています。また、これまでの薬剤ターゲットとは異なり、RNAポリメラーゼは変異を起こしにくい特徴を持っていることから、鳥インフルエンザを含めどのタイプのインフルエンザが新型インフルエンザに変貌を遂げるのか予想が難しい中、理想的な薬剤ターゲットとなっています。共同研究グループは、インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼがPA、PB1、PB2と呼ばれる3つのサブユニットを持っており、その3つがそろってはじめてポリメラーゼとしての機能を示すことに注目し、その結合を阻害することによってウイルスの増殖を防ぐことができると考え、薬剤ターゲットとしてPB1とPB2の結合部位の立体構造解析を行い、これに成功しました。さらに、明らかになった構造情報から、結合に重要な役割を果たしているアミノ酸を同定し、そのアミノ酸の変異によってポリメラーゼの活性が著しく低下することを確認しました。すでに同共同研究グループは、もう一つのサブユニット結合部位であるPA-PB1結合部位の構造を報告(英国科学誌「Nature」発表)しており、これら二つの構造の解明は、インフルエンザRNAポリメラーゼの特徴を理解するのに非常に重要であるだけでなく、これらのサブユニット間相互作用が、鳥インフルエンザウイルスをはじめとするインフルエンザウイルスに共通して存在するものであることから、本構造から設計される薬剤はどのタイプのインフルエンザウイルスにも作用する画期的な薬剤になると期待されます。

※本研究結果は、欧州分子生物学機関誌 *EMBO Journal* に掲載されます(5月21日オンライン発表)。

1. 背景

インフルエンザは、ウイルス感染によって引き起こされ、日本でも毎年冬になると決まって流行する病気として広く知られています。近年では、鳥インフルエンザウイルスやメキシコを中心に世界的な広がりを見せる豚インフルエンザの人への感染による世界的大流行が懸念されており、日本でもタミフルなどの備蓄に大変な金額が注がれています。しかし、既にタミフル耐性型の鳥インフルエンザウイルスが発見されるなど、ウイルスの変異は頻繁に起こりうるため、このような新型ウイルスに対するワクチンや新薬の開発が世界中で積極的に行われています。

2. 研究手法と成果

(1) インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼPB2-PB1サブユニット間結合の構造解析

PB2のN末端領域(1-37)とPB1のC末端領域(678-757)とが結合した複合体を調製し、その結晶化に成功しました。この結晶を用いて、X線結晶構造解析を行い、PB2-PB1複合体の原子レベルの構造を明らかにしました。PB2とPB1はそれぞれ3本の α ヘリックスで構成されており、PB2の一つのヘリックスにPB1の3つのヘリックスが覆いかぶさるような形で結合していました(図1)。この相互作用はこれまでに解明されている蛋白質にはない形であり、蛋白質間結合として非常に珍しい様式であることが確認されました。

(2) 変異蛋白質の機能解析

PB2-PB1複合体の立体構造上、PB2とPB1の結合に非常に大きく貢献していると思われるアミノ酸を、その結合を不安定にさせるようなアミノ酸に置換し、そのRNAポリメラーゼの転写活性を解析しました。その結果、結合の中心に位置するPB2サブユニットのVal7を置換した変

異体のポリメラーゼ活性は、PB2 非存在化と同じくらい著しく低下していることが確認されました（図2）。このことから、本研究結果で明らかになった PB2 の N 末端領域（1-37）と PB1 の C 末端領域（678-757）間の結合が、RNA ポリメラーゼ全体の機能に非常に重要な役割を果たしており、この結合能の欠失が直接ポリメラーゼ全体の不活性化につながるものが強く示唆されました。

3. 今後の期待

これまでに開発されている抗インフルエンザウイルス薬は、ウイルスが細胞に感染することを防ぐものであり、直接その複製を阻害するものではないために、感染後時間が経過してしまうとその効果が薄れてしまうことが問題となっています。また、効果が大きいとされるタミフルの備蓄に日本でも非常に多額の予算がつかまれています。既にタミフル耐性型の鳥インフルエンザが発見されており、異なる視点から新薬開発に取り組む必要があります。今回、RNA ポリメラーゼのサブユニット間の立体構造を明らかにしたことは、ウイルス複製に必須な部位を創薬ターゲットにすることを可能にし、抗インフルエンザウイルス創薬の新たな分野を開く成果となりました。今後、本構造を基にした PB2-PB1 結合阻害剤が設計され、抗インフルエンザ薬として応用されることが期待されます。さらにこのような新薬は、ウイルスの変異に強く、またこれまでのワクチンとは違い、どんなタイプの新型インフルエンザウイルスにも効果が出る画期的なものになると期待されます。

*1 今回の共同研究チーム

本研究は以下の研究者との共同研究による

筑波大学大学院人間総合科学研究科（基礎医学系感染生物学）

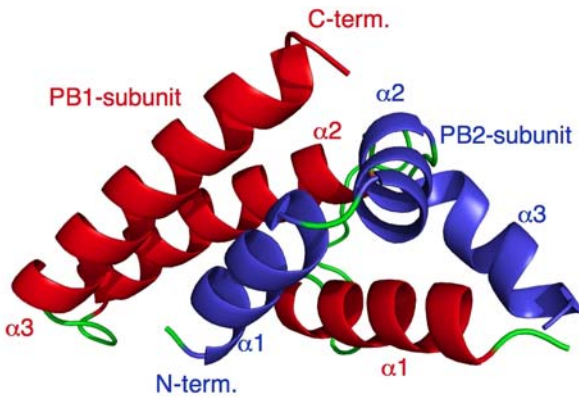
川口敦史、鈴木ゆかり、永田恭介

横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科

杉山佳奈子、尾林栄治、Jeremy Tame、朴三用

参考:図1

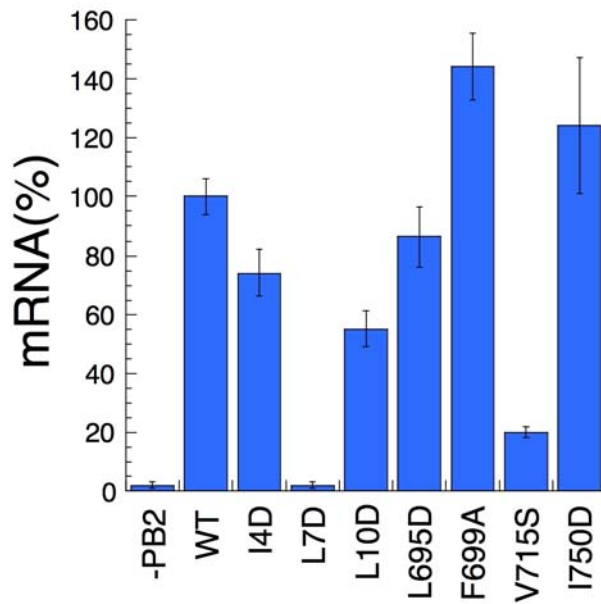
インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼ、PB2(1-37)-PB1(678-757)の結晶構造



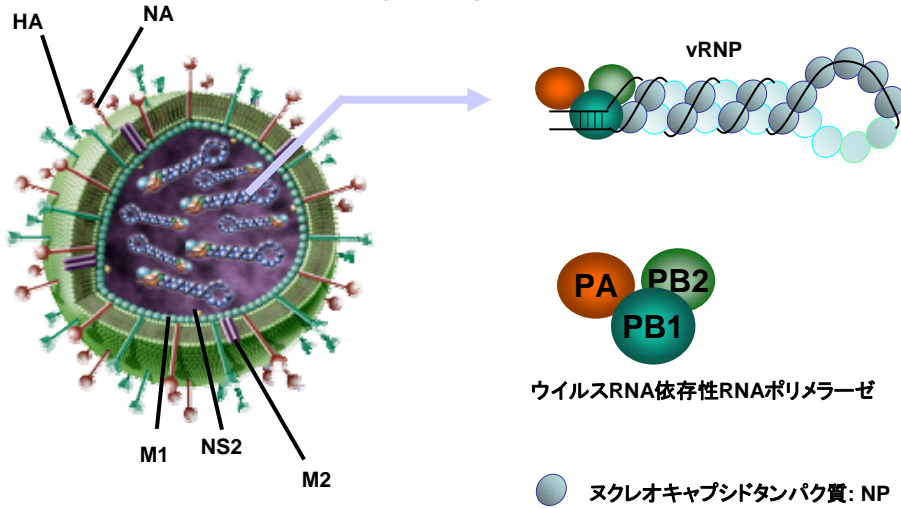
参考:図2

アミノ酸置換変異体による機能解析

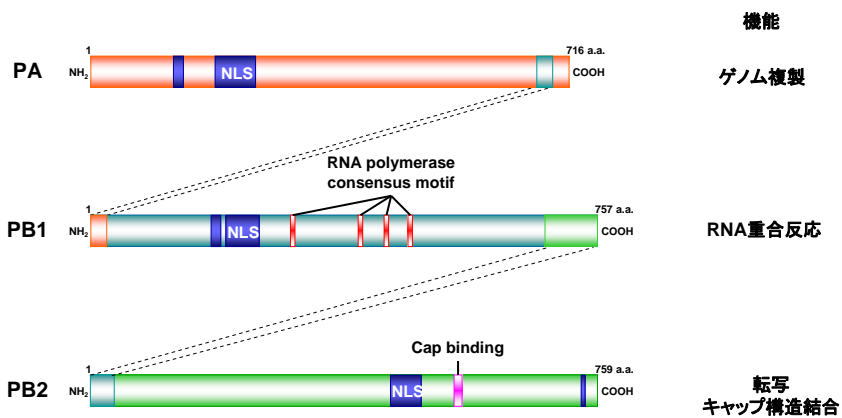
変異体を用いたポリメラーゼ活性を野生型と比較したところ、PB2の Leu7 を Asp に置換した変異体 (L7D) では野生型(WT)に比べ、ほぼ 10%以下と劇的にその活性が減少した。



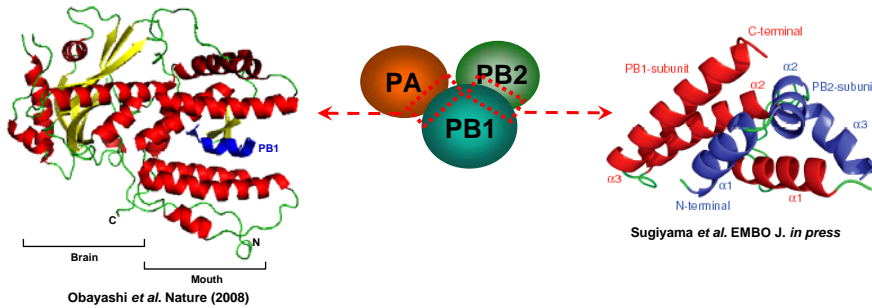
インフルエンザウイルス
ウイルスRNA-RNA ポリメラーゼ-ヌクレオキャプシドタンパク質
(vRNP) 複合体



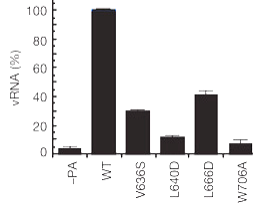
インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼの概要



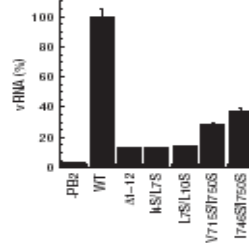
サブユニット相互作用部位の変異型ポリメラーゼの機能低下



ウイルスゲノム複製量



ウイルスゲノム複製量



インフルエンザウイルス ヒトH1N1型とトリH5N1型の RNAポリメラーゼのアミノ酸配列の比較

	410	420	430	440	450
H1N1	QNEFNKACELTDSSQWIELDEIGEDVAPIEHIASMRRNYFTSEV				
H5N1	QSEFNKACELTDSSQWIELDEIGEDVAPIEHIASMRRNYFTA EV				
H1N1	SGCRATEYIMKGVYINTALLNASCAANDDFQLIPMISKCRTEG				
H5N1	SGCRATEYIMKGVYINTALLNASCAANDDFQLIPMISKCRTEG				
H1N1	RRKTNLYGFIKGRSHLRNDTDVNVFVSMEFSLTDPRLPHKWE				
H5N1	RRKTNLYGFIKGRSHLRNDTDVNVFVSMEFSLTDPRLPHKWE				
H1N1	KYCVLEIDMLIRSAIGQVSRPMPFLYVRTNGTSTKIKMKWGMEMRR				
H5N1	KYCVLEIDMLLRTAVGQVSRPMPFLYVRTNGTSTKIKMKWGMEMRR				
H1N1	CLLQSLQQIESKIEAESSVKEKDMTKEFFENKSE TWPTIC SPKG				
H5N1	CLLQSLQQIESKIEAESSVKEKDMTKEFFENKSE TWPTIC SPKG				
H1N1	VEESSIGKYCRTLAKSVGNSLYASPQLEGFSAESRKLIVQAL				
H5N1	VEEGSIGKYCRTLAKSVGNSLYASPQLEGFSAESRKLIVQAL				
H1N1	RDNLEPGTFDLGGLYEAIEECLINDPWLLNASWFNSFLTHAL S				
H5N1	RDNLEPGTFDLGGLYEAIEECLINDPWLLNASWFNSFLTHAL K				

	1	10	20	30
H1N1	MERTKKEPRN	MSQRTREILTKTTVDHMAI	IKKYTSG	
H5N1	MERTKKEPRN	MSQRTREILTKTTVDHMAI	IKKYTSG	

	1	10
H1N1	MDVNF TL LF IK VP AO	
H5N1	MDVNF TL LF IK VP AO	

	680	690	700	710	720
H1N1	SQRGVLEDEQMYRCCNDFEKFPSSSYRRPVGISSMVEAMVS				
H5N1	SQRGILEDEQMYKCCNDFEKFPSSSYRRPVGISSMVEAMVS				
H1N1	RARIDARIDFESGRIKKEEFT EIMK CST TE				
H5N1	RARIDARIDFESGRIKKEEFA EIMK CST TE				

