

博士論文

A型インフルエンザウイルス NP

を標的とした創薬研究

柿坂 道範

目次

略語.....	P4-6
要旨.....	P7-16
緒論.....	P17-24
1. インフルエンザウイルス.....	P17
2. A 型インフルエンザウイルスとその変異性.....	P18-19
3. 高病原性トリインフルエンザウイルス.....	P19-20
4. 高病原性トリインフルエンザウイルス感染による対応と 抗ウイルス薬の意義.....	P20-21
5. 既存の抗インフルエンザウイルス薬と薬剤耐性の状況.....	P21-23
6. Nucleoprotein (NP)の構造と機能.....	P23-24
第 1 章 新規抗インフルエンザウイルス薬の探索.....	P25-65
1-1. 緒言.....	P25-26
1-2. 材料と方法.....	P27-41
1-3. 結果.....	P42-56
1-3-1. 新規抗インフルエンザウイルス化合物の同定	
1-3-2. RK188 及び WV970 の作用機構	
・ RK188 の構造最適化と <i>in vitro</i> 抗ウイルス活性評価	
・ WV970 のウイルスライフサイクルにおける作用点解析	
・ WV970 のウイルスゲノム転写・複製に与える影響解析	
・ WV970 の標的分子探索とキナーゼ阻害活性評価	
1-3-3. RK424 の作用機構	
・ RK424 の <i>in vitro</i> 抗ウイルス活性評価	

- RK424 薬物動態パラメーターの評価
- RK424 の *in vivo* 抗ウイルス活性評価
- RK424 の vRNP ポリメラーゼ活性に与える影響解析
- RK424 による NP の細胞内局在に与える影響解析
- RK424 と NP のドッキングシミュレーション
- RK424 誘導体を用いた構造活性相関解析
- RK424 の NP-RNA 間及び NP-NP 間の結合阻害効果の解析
- RK424 の NP オリゴマー形成阻害効果の解析
- RK424 による NP 核外移行阻害評価
- NP ポケット構造の相同性解析
- RK424 による耐性ウイルス産生実験
- RK424 結合予測サイトにおける変異ウイルス産生実験

1-4. 考察.....P57-65

第 2 章 NP-nuclear export signal (NES) 3 を標的とした新規阻害剤の探索.....P66-77

2-1. 緒言.....P66-67

2-2. 材料と方法.....P68-72

2-3. 結果.....P73-75

- AcGFP-NP-NES3 融合タンパク恒常発現細胞の樹立
- AcGFP-NP-NES3 恒常発現細胞の核外移行阻害剤に対する感受性評価
- NP-NES3 を標的としたハイスループットスクリーニング系の確立
- NP-NES3 を標的とした新規抗ウイルス化合物の同定

2-4. 考察.....P76-77

第 3 章 NP-intrinsically disordered region (IIDR) 2 の機能解析	P78-105
3-1. 緒言.....	P78-79
3-2. 材料と方法.....	P80-90
3-3. 結果.....	P91-100
• NP IDR2 のウイルス複製に与える影響解析	
• NP IDR2 のウイルスゲノム転写・複製に与える影響解析	
• NP IRD2 のウイルスゲノムパッケージングに与える影響解析	
• NP IDR2 の RNA 結合及びオリゴマー形成に与える影響解析	
• PI(4,5)P ₂ の NP 細胞膜局在に対する影響解析	
• PI(4,5)P ₂ のウイルスゲノムパッケージングに対する影響解析	
• NP IDR2 と PI(4,5)P ₂ の結合解析	
• PI(4,5)P ₂ 発現抑制による vRNP のウイルス粒子への取り込みとウイルス複製に 対する機能解析	
3-4. 考察.....	P101-105
結論	P106
謝辞	P107-108
引用文献	P109-121
図表	P122-181

略語

AcGFP	Aequorea coerulescens green fluorescent protein
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
CC ₅₀	half-maximal cytotoxic concentration
CRM1	chromosome region maintenance 1
cRNA	complementary RNA
D4	θ toxin D4 domain
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FBS	fatal bovine serum
FISH	fluorescence in situ hybridization
5ptase IV	phosphatidylinositol polyphosphate 5 phosphatase type IV
GST	glutathione S-transferase
HA	hemagglutinin
HEK293T	human embryonic kidney 293T
HRP	horseradish-peroxidase
HTS	high throughput screening
IC ₅₀	half-maximal inhibitory concentration
IDP	intrinsically disordered protein

IDR	intrinsically disordered region
Ig	immunoglobulin
M1	matrix protein 1
M2	matrix protein 2
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MEM	minimum essential medium
mRFP	monomeric red fluorescence protein
mRNA	messenger RNA
NA	neuraminidase
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
NP	nucleoprotein
NS1	non-structural protein 1
NS2	non-structural protein 2
nt	nucleotide
PA	polymerase acidic
PB1	polymerase basic 1
PB2	polymerase basic 2
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PFU	plaque forming units
PH	pleckstrin homology
PIP	phosphatidylinositol phosphate

PIP ₂	phosphatidylinositol biphosphate
PIP ₃	phosphatidylinositol triphosphate
PLC	phospholipase C
PtdIns	phosphatidylinositol
RNA	ribonucleic acid
RNP	ribonucleoprotein
SA	streptavidin
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPR	surface plasmon resonance
vRNA	viral RNA
vRNP	viral RNP
WSN	wilson-wmitch neurotoropic
WST-1	water soluble tetrazolium salt-1

要旨

目的と意義

A 型インフルエンザウイルスは、鳥類や人を含めた哺乳動物に感染する人獣共通感染症であり、その伝播力の強さと変異のおきやすさからパンデミックを引き起こすリスク要因として監視されている。また、高病原性トリインフルエンザウイルスによる家禽類への感染は、その伝播力の強さ及び致死率の高さから、多大な経済的損失を社会に与えるだけでなく、トリインフルエンザウイルスによるパンデミック発生時には、数千万人規模の死者を生む事態に繋がりがかねない。以上の背景より、A 型インフルエンザウイルスの蔓延防止策は、公衆衛生上極めて重要である。これらの観点から、家禽類へのトリインフルエンザウイルス感染が確認された場合、本国では原則殺処分を行う体制が整えられている。しかしながら、ウイルス感染を家禽の中だけで封じ込めることができず、トリ - ヒト間、及びヒト - ヒト間で感染が認められた場合や、殺処分を行うことが難しい野生動物への感染が認められた際には、周囲への感染拡大の防止と治療目的で抗ウイルス薬の使用が求められる。現在これらの対応時には、ウイルス粒子の外膜タンパクである Neuraminidase (NA) を標的とした抗ウイルス薬が使用されているが、その標的タンパク質である NA の変異による耐性ウイルスの出現が既に複数報告されているにもかかわらず、使用可能な抗ウイルス薬が NA 阻害薬のみに限られることが問題視されている。そのため、新たな耐性ウイルスの発生と蔓延を防ぐため、既存薬とは異なる作用点を有し、耐性化に強い新規抗ウイルス薬の開発が強く求められる。A 型インフルエンザウイルスタンパクの一つである NP (Nucleoprotein) は、その構造中に非常に多くの機能ドメインを有し、ウイルスのライフサイクルにおいて、複製に必須な役割を担っている。また NP のアミノ酸配列は、これらの機能的制約や粒子内タンパクである特性から、既存抗ウイルス薬の標的である M2 或 M2^e や NA 等の外膜タンパクに比べ遥かに保存性が高い。また、インフルエンザウイルス NP の配列は、宿主の異なるヒト、ブタおよびトリインフルエンザウイルス間においても高

度に保存されているため、種間交差による抗原シフトにより発生した新型インフルエンザウイルスにも有効性が期待できる。

以上より、NP を抗ウイルス薬の標的とすることで、全ての亜型に有効であり、耐性化に抵抗性を有する新規作用機序に基づいた抗ウイルス薬の開発が期待される。

本研究において、NP を標的とした新規抗ウイルス薬の探索と作用機序解析及び、NP の天然変性領域(intrinsically disordered region; IDR)の機能解析を行い、NP を標的とした新規抗ウイルス薬開発の候補化合物の獲得と NP の新たなウイルス複製制御機構の解明を行った。

材料と方法

1) 新規抗インフルエンザウイルス薬の探索

新規抗ウイルス薬探索のための化合物ライブラリーとして、理化学研究所が保有する 50,000 個の化合物ライブラリーを使用した。ファーストスクリーニングとして、water soluble tetrazolium salt-1(WST-1)アッセイによる high throughput screening (HTS)を実施し、Influenza A/Wilson-Smith Neurotropic (WSN)/1933 (A/WSN/33 (H1N1))ウイルス株を感染させた Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞に対する細胞変性阻害効果を評価した。評価した化合物の内、50%以上の細胞生存率を示したものをヒット化合物とした。セカンドスクリーニングとして WSN ウイルス株を MDCK 細胞に感染させ、プラーク形成阻害試験を行った。抗ウイルス活性として 50% inhibition concentration (IC₅₀) が 3 μM 以下のものをヒット化合物として選定した。細胞毒性試験として、MDCK 細胞を用いた WST-1 アッセイを行った。細胞内ウイルスゲノム RNA(vRNA)の発現は、FISH 法により解析した。ウイルスゲノムの転写活性は、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子としたレプリコンアッセイにより評価した。NP の細胞内局在は、抗 NP モノクローナル抗体を用いた免疫染色法により評価した。化合物の標的探索は ChemSpider による標的タンパク

との結合可能性予測に基づき、結合可能性の高い標的タンパクを検索した。化合物のキナーゼ阻害活性は、KINOMEscan による 456 種類のキナーゼと基質の結合に対する試験化合物の競合結合阻害活性を指標に評価した。化合物と NP のインシリコドッキングシミュレーションは Autodock(version 4.2)を用いて行った。化合物と NP の結合実験は、光親和型固定法にて化合物を結合させたアガロースビーズによる化合物-タンパク共沈降法により解析した。NP と ribonucleic acid (RNA)の結合実験は、Biacore を用いた surface plasmon resonance (SPR) 法により評価した。NP-NP 間の結合実験は、anti-FLAG 抗体ビーズに固定化した NP- monomeric red fluorescence protein(mRFP)-FLAG タンパクと NP-HA タンパクを用いた pull-down アッセイにより評価した。化合物の NP オリゴマー形成阻害試験は、ゲル濾過カラムを用いたサイズ分画により評価した。NP の核外移行能の評価は、*in vitro* 核外移行アッセイにより評価した。NP と chromosome region maintenance 1(CRM1)の結合評価は、anti-FLAG 抗体ビーズに固定化した CRM1-FLAG タンパクと NP-HA タンパクを用いた pull-down アッセイにより評価した。NP と PA のポケット構造相動性解析は PoSuuM 及び ProBiS を用いて行った。NP のアミノ酸配列存率の計算は、Perl により行った。

2) NP-nuclear export signal (NES) 3 を標的とした新規阻害剤の探索

AcGFP または AcGFP 融合タンパク恒常発現株は、導入したプラスミド上にコードされている Neomycine 耐性遺伝子を基に薬剤選択を行い、目的とするタンパクを恒常発現する細胞を限界希釈法によりクローニングすることで樹立した。AcGFP 融合タンパクと核の細胞内局在は、AcGFP の蛍光シグナルと hoechst 陽性画分を指標に、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した。新規核外移行阻害剤探索のための化合物ライブラリーとして、東京大学が保有する 9600 個のコア化合物ライブラリーを使用した。AcGFP-NP-NES3 を標的とした薬剤のスクリーニングは、核外移行阻害剤である LeptomycinB(LMB)に対するライ

ブラリー化合物処理時の核内領域における AcGFP 蛍光輝度の変化を指標に、CELAVIEW RS100 により評価した。ヒット化合物の抗ウイルス活性は、プラーク形成阻害試験により評価し、抗ウイルス活性として IC₅₀ を算出した。また、化合物の細胞毒性は WST-1 アッセイにより評価した。

3) NP-intrinsically disordered region (IIDR) 2 の機能解析

NP のアミノ酸配列保存性及び天然変性領域の予測はそれぞれ Perl 及び DISOPRED server を用いて解析した。変異ウイルス産生実験はリバースジェネティクス法を用いて実施し、産生した変異ウイルスの増殖性をプラークアッセイにより評価した。ウイルスゲノムの転写活性は、monomeric red fluorescence protein (mRFP) 及び enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子をレポーター遺伝子としたレプリコンアッセイにより評価した。ウイルスゲノムパッケージング効率は、レポーター遺伝子を含む変異ウイルスをリバースジェネティクス法により作成し、作成した変異ウイルスと A/WSN/1933(H1N1)ウイルスをヘルパーウイルスとして MDCK 細胞に共感染させ、MDCK 細胞内での mRFP 又は EGFP の蛍光を指標に FACS により解析した。NP と RNA 及び NP と phosphatidylinositol(4,5) biphosphate (PI(4,5)P₂) の結合実験は、Biacore を用いた SPR 法により評価した。NP のオリゴマー形成能は、ゲル濾過カラムを用いたサイズ分画により評価した。NP の細胞膜への局在は、抗 NP モノクローナル抗体及び mcherry- θ toxin D4 domain (D4) により、NP と細胞膜をそれぞれ染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した。脂質ラフト画分における NP タンパク量は、ショ糖密度勾配遠心法によりラフト画分を分画し、抗 NP 抗体を用いた Western blot 法により確認した。細胞内 PI(4,5)P₂ 発現量の低下は、mcherry- phospholipase C (PLC) δ -PH の細胞内局在の変化を指標に確認した。各種 PIP 誘導体と NP の結合は、PIPs が付加された PIPns ビーズと精製 NP タンパクとの pull-down アッセイにより評価した。

結果と考察

1) 新規抗インフルエンザウイルス薬の探索

理化学研究所が保有する 50,000 個の化合物ライブラリーを MDCK 細胞に添加し、ウイルスを感染させた後、細胞変性阻害効果を示す化合物を WST-1 アッセイにより選別した。さらに、プラーク形成阻害試験により抗ウイルス活性を評価した結果、強い抗ウイルス活性を有する化合物として、RK188(IC₅₀=2.2 μM)及び RK424(IC₅₀=0.5 μM)を同定した。RK188 はその構造中に不斉炭素を 2 つ有するラセミ混合物であったため、立体選択的に化合物を合成し、評価した結果、RK188 の C7 位と C14 が共に S 体である WV635 が活性本体であることが明らかになった。WV635 をリード化合物とし、抗ウイルス活性を指標にした構造最適化を行った結果、強い抗ウイルス活性を有する WV970 を見出した。レプリコンアッセイや fluorescence in situ hybridization (FISH)法、及びリアルタイム PCR による vRNA/mRNA の定量解析の結果、WV970 はウイルスゲノムの転写・複製を阻害することが明らかとなった。しかし、WV970 は構造改変の過程で、抗ウイルス活性と共に細胞毒性の亢進が認められ、活性と毒性の解離が困難であったことから宿主因子が標的として想定された。そこで、ChemSpider による標的タンパクとの結合可能性予測に基づき、WV970 のリード化合物である WV635 と結合可能性の高い標的タンパクを検索した結果、WV635 は宿主が有する複数のキナーゼと相互作用する可能性が高いことが明らかになった。そこで、KINOMEscan による 456 種類のキナーゼと基質の結合に対する WV970 の競合結合阻害活性を指標に WV970 のキナーゼ活性阻害効果を評価した結果、WV970 は複数のキナーゼに対して阻害活性を示す、マルチキナーゼ阻害剤として機能することが明らかとなった。

RK188 と同時に同定された RK424 は、細胞毒性が低く、多くの A 型インフルエンザウイルス株に対して強い抗ウイルス活性を示し、マウス感染モデルを用いた *in vivo* 薬効評価

においても抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった。レプリコンアッセイや fluorescence in situ hybridization (FISH)法、Western blot 法を用いた解析の結果、RK424 はウイルスゲノムの転写及び複製を阻害し、感染細胞内でのウイルスタンパクの発現を抑制することが明らかになった。ウイルスゲノムの転写・複製は NP を主構成要素とする一組のポリメラーゼ複合体 (PB2、PB1 及び PA) と vRNA からなる viral ribonucleoprotein(vRNP) により制御されているため、ウイルス感染細胞内での vRNP の細胞内局在に与える影響を NP の細胞内局在を指標に解析した。その結果、RK424 処理により、ウイルス感染細胞内での NP の細胞質への局在が抑制され、核内に局在が強く認められた。さらに、RK424 処理による NP の細胞内局在の変化は、NP のみを一過性に発現させた細胞内においても、ウイルス感染細胞と同様に認められたことから、RK424 は NP を標的としてその機能を阻害していることが推測された。そこで、NP と RK424 の結合可能性を評価するため、インシリコドッキングシュミレーションによる結合サイトの予測を行ったところ、RK424 は R162、S165、L264 及び Y487 から形成されるポケット構造に結合する可能性が高いことが示された。そこで、予測された NP 結合ポケットに対する RK424 の結合可能性を評価するため、RK424 をクロスリンキングさせた化合物ビーズを用いて NP の結合性を評価した。その結果、精製 NP タンパクが RK424 固定化ビーズへ結合したのに対し、予測された結合サイトを構成する 4 つのアミノ酸残基にアラニン変異を導入した変異体 NP タンパクでは顕著にビーズへの結合性が低下したことから、予測した結合サイトに対する RK424 の結合可能性が示された。次に、予測した結合サイトへの RK424 の結合によるウイルス複製阻害効果への影響を考察するため、予測した結合サイトを構成するアミノ酸残基を含む領域を機能ドメイン別に立体構造上に示した。その結果、これら 4 つのアミノ酸残基はそれぞれ、RNA 結合領域、NP-NP 相互作用領域、核外移行シグナルを含む機能ドメインにそれぞれ位置していることが明らかとなった。

そこで、予測した RK424 結合サイトを構成するアミノ酸残基によって制御されている

NP の機能に対する RK424 の阻害効果をそれぞれ解析した。その結果、RK424 は NP-RNA 間の結合、NP-NP 間の結合、及び NP の核外移行をそれぞれ抑制することが明らかとなった。また、RK424 によって同定した NP ポケット構造は非常に構造特異性及び配列保存性が高く、ウイルス複製に必須な役割を果たしていることが変異ウイルス産生実験の結果より示された。以上の結果から、スクリーニングにより同定されたヒット化合物及びその標的となるキナーゼタンパクや NP ポケット構造は、創薬リード化合物及び創薬標的として、共に新薬開発に向けた強力なツールとなると考えられる。

2) NP-NES3 を標的とした新規阻害剤の探索

NP-NES3 依存的な核外移行を指標に薬剤の探索を行うため、緑色蛍光タンパクである AcGFP の C 末端領域に NP の全長 (AcGFP-NP)、NP の核外移行シグナル (AcGFP-NP-NES3) 及び NP-NES3 のコンセンサス配列 (AcGFP-NES3co) のみを付加した融合タンパクを発現するプラスミドを作製し、各 AcGFP 融合タンパクの細胞内局在を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、AcGFP を付加していない NP が細胞質に強く局在したのに対し、AcGFP-NP は核に強く局在したことから、AcGFP-NP は本来の NP の局在を反映しないことが明らかになった。一方で、陽性コントロールとして使用した human immunodeficiency virus (HIV) が有する Rev-NES を AcGFP に融合したタンパク (AcGFP-Rev-NES) が細胞質に強い局在を示した結果と同様、AcGFP-NP-NES3 及び AcGFP-NP-NES3co は細胞質に強く局在したことから、NP-NES3 配列依存的に AcGFP の核外への移行が確認された。しかし、AcGFP-NP-NES3co は AcGFP-NP-NES3 に比べて細胞内の蛍光輝度が小さかったため、局在変化の評価には AcGFP-NP-NES3 を使用することとした。AcGFP-NP-NES3 の核外移行阻害剤に対する感受性を評価するため、既知の核外移行阻害剤である LMB を処理したところ、その局在が核内に強く集積することが明らかとなった。そこで、AcGFP-NP-NES3 の局在変化を指標に新規核外移行阻害剤の探索を行う

ため、AcGFP-NP-NES3 発現プラスミドを MDCK 細胞に導入し、G418 含有培地で選択培養し、生き残った細胞を限界樹積法によりクローニングすることで AcGFP-NP-NES3 恒常発現細胞株を樹立した。はじめに、樹立した恒常発現細胞株中の AcGFP に対する AcGFP-NP-NES3 の核内蛍光強度の変化を定量的に評価するため、hoechst により染色した核の輪郭(main object)から一定距離内側の輪郭(sub-object)を測定領域として定め、CELAVIEW RS100 により核内 AcGFP 平均蛍光強度を測定した。その結果、AcGFP の核内平均蛍光強度は AcGFP-NP-NES3 の核内平均蛍光強度に比較して 3 倍以上高い値を示した。そこで、AcGFP に NP-NES3 を付加したことで得られた核内蛍光強度の変化が核外移行阻害剤の評価に十分であるか検討するため、陽性コントロールとして既知核外移行阻害剤である LMB、陰性コントロールとして既存抗ウイルス薬である Oseltamivir 及び T-705 を用いて、核内 AcGFP-NP-NES3 の平均蛍光強度の変化を CELAVIEW RS100 により定量解析し、signal-to-background (S/B)比、及び Z' factor の算出を行った。その結果、Oseltamivir 及び T-705 処理細胞では、核内 AcGFP-NP-NES3 の平均蛍光強度の大きな変化が認められないのに対し、LMB 処理細胞では、核内 AcGFP-NP-NES3 の平均蛍光強度が強く上昇することが明らかになった。また、LMB 処理時の S/B 比は 2.59、Z' factor は、0.68 となり、スクリーニング系構築の際に求められるクライテリア(S/B \geq 2、Z' \geq 0.5)を満たすことが示された。構築したスクリーニング系を用いて、東京大学が保有するコア化合物ライブラリー9600 化合物の核外移行阻害活性を評価した結果、40 化合物をヒット化合物として同定し、同定した化合物の細胞毒性試験を行った結果、100 μ M 濃度において 10 化合物が 50%以上の細胞生存率を示した。また 10 化合物の内、細胞毒性が低かった 6 つの化合物について、AcGFP-NP-NES3 に対する強い核外移行阻害作用を確認した。またこれら 6 つの化合物について抗ウイルス活性を評価したところ、DP2392-E10 化合物について抗ウイルス活性を確認した。以上より、NP-NES3 を介した核外移行阻害は、新規抗インフルエンザ薬開発の新たな標的として有望であると考えられる。

3) NP-intrinsically disordered region (IIDR) 2 の機能解析

A 型インフルエンザウイルス NP の天然変性領域(Intrinsically Disorder Region; IDR)を DISOPRED server を用いて予測した結果、NP のアミノ酸配列中に IDR と思われる領域が 3 ヶ所存在することが明らかとなった。配列予測によって示された領域は、X 線結晶構造によって示された NP の構造上、電子密度が低く、構造が不明瞭な部分と一致していたことから、IDR であることが判明した。これら 3 つの NP IDRs (IDR1~3) の内、RNA 結合領域中に含まれる NP IDR2 (アミノ酸 72 位-92 位) は、ヒト・トリ・ブタ由来の A 型インフルエンザウイルスが有する NP において最も高度に保存されていることが分かった。さらに、NP IDR2 を構成するアミノ酸配列をアラニンに置換した変異ウイルスを作成し、ウイルス複製に与える影響を解析した結果、NP IDR2 を構成するアミノ酸配列の内、8 つのアミノ酸配列がウイルス複製に必須な役割を果たし、ウイルスゲノムのパッケージング制御に関与していることが示された。NP IDR2 のゲノムパッケージング制御機構を明らかにするため、NP IDR2 にアラニン変異を導入した NP IDR2 変異体と RNA の結合親和性を SPR 法により評価した結果、NP IDR2 に変異を導入した NP 変異体では RNA に対する結合活性が低下し、RNA と NP の結合によって誘導される NP オリゴマーの形成が抑制されることが明らかになった。さらに、免疫染色法およびショ糖密度勾配遠心法による細胞膜脂質への局在を解析した結果、野生型の NP が細胞膜脂質近傍に局在しているのに対し、NP IDR2 に変異を導入した NP 変異体では、細胞膜脂質への局在が抑制されていた。また NP の細胞膜への局在は、細胞膜脂質の構成成分である phosphatidylinositol 4,5- biphosphate (PI(4,5)P₂) の細胞内発現量を低下させる phosphatidylinositol polyphosphate 5 phosphatase type IV (5ptaseIV)発現細胞において抑制され、同細胞でウイルスゲノムパッケージング効率が低下することも確認された。そこで、NP と PI(4,5)P₂ の直接的な結合を PI(4,5)P₂固定化ビーズによる pull-down アッセイ及び SPR 法により評価した結果、両者が

結合することが明らかになった。また、NP IDR2 変異体において、PI(4,5)P₂ への結合が低下することが示された。以上より、NP IDR2 は RNA と PI(4,5)P₂ との結合に関与し、ウイルスゲノムのパッケージングを制御していることが明らかとなった。

総括

NP の凝集を誘導する化合物や NP-NP 間の塩橋形成阻害剤など、近年数多くの NP 阻害剤に関する研究が報告されており、本研究により同定した NP 阻害剤と併せて、NP が抗ウイルス薬の新たな標的として有望であることが改めて立証された。RK424 をリード化合物とした合成最適化研究に加えて、RK424 結合ポケットを基にした structure based drug design による薬剤の開発も新薬開発に有効なアプローチであると考えられる。また RK424 によって得られた知見を基に、NP-NES3 を介した核外移行阻害剤の探索を行った結果、NP-NES3 を介した核外移行を強く阻害し、抗ウイルス活性を示す化合物 DP2392-E10 を同定することに成功した。これは、NP-NES3 を介した NP の核外移行が抗ウイルス薬の標的となり得ることを強く示唆する結果である。さらに、NP の天然変性領域(IDR)を標的とした機能解析により、RNA に結合領域に位置する IDR2 が RNA と PI(4,5)P₂ の異なる分子の結合を制御し、ウイルスのゲノムパッケージングに重要な役割を果たしていることを明らかにした。IDR2 によるウイルスゲノムパッケージング制御は、ウイルス複製に必須な役割を担い、IDR2 を構成するアミノ酸配列自身も非常に配列保存性が高いことから、抗ウイルス薬開発の新たな標的対象として有望であると考えられる。

本研究成果により、A 型インフルエンザウイルス NP がウイルス複製に必須な役割を担う多機能タンパクであると共に、その機能部位が宿主の異なるウイルス間で高度に保存されていることから、人獣共通に有効な抗ウイルス薬標的分子として非常に有望であることが示された。本研究成果が、A 型インフルエンザウイルスを対象とした基礎研究と抗ウイルス薬開発の発展に大きく貢献することが期待される。

緒論

1. インフルエンザウイルス

インフルエンザは、発熱や頭痛を伴う全身症状と急性呼吸器疾患を主体とし、しばしば致死的な重症呼吸器不全を引き起こす人獣共通感染症である。発症原因はインフルエンザウイルスによる感染であり、世界中で毎年のように流行を繰り返す。感染者数は世界人口の5～15%に及ぶと推測され、その内30～50億症例が重症化し、年間50万人程の死者が報告されている(1)。インフルエンザウイルス感染による致死率は低いが、感染による長期欠勤や医療コスト等、実社会に及ぶ経済的損害は120～140億円に及び(2)、季節性インフルエンザウイルスとは抗原性が大きく異なる高病原性新型インフルエンザウイルス発生時には感染による死亡者数は数千万人規模に達すると予測されている(3)。これらの原因となるインフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科に属するマイナス鎖 ribonucleic acid (RNA)ウイルスであり、7～8本に分節された viral RNA(vRNA)は、RNAポリメラーゼ複合体(polymerase acidic(PA)- polymerase basic 1(PB1)- polymerase basic 2(PB2))及び核タンパクである nucleoprotein(NP)と結合し、パンハンドル構造をとった viral ribonucleoprotein (vRNP)としてウイルス粒子内に格納されている(4)(図1)。各vRNAは、RNA合成(PA、PB1、PB2)、細胞吸着(hemagglutinin (HA))、ウイルス脱殻・出芽(matrix protein (M)、neuraminidase (NA))、vRNPの核内輸送・ゲノム複製・転写(NP)、vRNP核外輸送(M、non-structural protein (NS))に関与するタンパクを別々にコードしている。さらに、インフルエンザウイルスは、ウイルス粒子を構成するNPとM1タンパクのヒトでの抗原性の違いからA、B、C型の3種類に分類される。このうち、最も宿主域が広く、パндеミック発生や家禽類への致死病的疾病の要因となるのは、A型インフルエンザウイルスのみである。

2. A型インフルエンザウイルスとその変異性

A型インフルエンザウイルスは、ヒトを始めとし、ブタ、トリ、ウマ、アシカ、クジラ等に感染する人獣共通感染症の原因ウイルスである(5)。1933年にSmithによって人類の歴史で最初にヒトから分離されたウイルスと、1918年のパンデミックウイルスのゲノムが現在のトリインフルエンザウイルスのvRNAと類似しているという事実から(6)、A型インフルエンザウイルス由来の宿主はトリであると考えられている(7)。また、A型インフルエンザウイルスは表面糖タンパク質ヘマグルチニン(HA)の抗原性から16種類、同じくノイラミニダーゼ(NA)の抗原性から9種類に分類され(8)、このうちH1N1、H3N2がヒトでの散発的な流行を引き起こす季節性インフルエンザの原因として知られている。これらの亜型に対しては、ワクチンによる制圧が古くから試みられているが(9)、インフルエンザウイルスの著しい変異性の高さのため、制圧には至っていない。A型インフルエンザウイルスが、他のウイルスに比べて高い変異性を示すのは、抗原ドリフト(10)と抗原シフト(11)と呼ばれる二つの突然変異メカニズムを有しており、多様性を獲得しやすい性質を備えているためであると考えられている。抗原ドリフトとは、全てのウイルスに共通に見られる変異であり、ゲノムの複製ミス等によって核酸が一塩基単位で変異を起こす現象である。RNAポリメラーゼにはdeoxyribonucleic acid (DNA)ポリメラーゼが持つエキソヌクレアーゼによる変異修復機構が存在しないため、インフルエンザウイルスの様にゲノムにRNAを持つウイルスは特に変異が起こりやすいと考えられている。1918年に大流行したスペイン風邪(H1N1)は、トリ由来のウイルスが抗原ドリフトにより人への感染能を獲得したものであり、強毒性のため数千万人に及ぶ死亡者が確認された。一方、抗原シフトとは、異なるウイルス株が一つの細胞に同時に感染した場合、細胞内で合成されたウイルス遺伝子やタンパク質が集合するときに混ざり合い、性質の大きく異なった変異ウイルスが発生する現象である。抗原シフトは、インフルエンザウイルスなど分節したゲノム遺伝子を持つウイルスのみに見られる突然変異である。この抗原シフトによる突然変異は、インフルエンザウイルスの

種間を越えた感染を可能にし、新型インフルエンザ発生の原因につながると考えられている。1957年にアジア風邪(H2N2)、1968年に香港風邪(H3N2)が流行した事例は、本来ヒトには感染性を示さないトリインフルエンザウイルスがヒト型インフルエンザレセプター(シアル酸 α 2-6 ガラクトース)とトリ型インフルエンザレセプター(シアル酸 α 2-3 ガラクトース)を共に有するブタに感染し、抗原シフトによって、ヒトレセプターへの結合能とトリインフルエンザの抗原性を併せ持ったウイルスが生じたことによるものだと考えられている。最近では、2009年に H1N1pdm09 ウイルスが世界的に大流行したことが挙げられるが、これはブタ由来ウイルス、トリ由来ウイルス及びヒト由来ウイルスの抗原シフトにより発生したトリプルアソータントウイルスが原因であることが分かっている(12)。H1N1pdm09 ウイルスの病原性は低かったため、感染者数に占める死亡者の割合は低く、大きな被害とはならなかったが、抗原シフトによる新型ウイルスの出現は不定期ではあるが、ある一定の頻度で必ず起こっているため、ヒトだけではなく、鳥類や豚におけるインフルエンザの流行や感染を把握するサーベイランス体制の確立が世界的に求められている。

3.高病原性トリインフルエンザウイルス

高病原性トリインフルエンザウイルスは、鳥類に感染した A 型インフルエンザウイルスの内、国際獣疫事務局が作成した診断基準により高病原性トリインフルエンザウイルスとして判定された A 型インフルエンザウイルスを指し、現時点では H5 又は H7 亜型のウイルスに限定されている。高病原性トリインフルエンザウイルスは、家禽類に感染すると致死的な疾病を起こすことが知られている。また、低病原性と判断されたトリインフルエンザウイルスも、ニワトリに感染すると短期間に高病原性化することから、H5 又は H7 亜型ウイルスの感染が確認された場合は、国際獣疫事務局に報告するよう義務付けられている。高病原性トリインフルエンザウイルス感染による家禽と野生水禽の被害は、アジア、中東、ヨーロッパ及びアフリカの 62 カ国にまで広がっており、こ

れまでに感染と防疫のために死亡した家禽類は 5 億羽を超えると推定されている(13)。高病原性トリインフルエンザは、国際連合食糧農業機関等の国際機関が「国境を越えてまん延し、発生国の経済、貿易及び食料の安全保障に関わる重要性を持ち、その防疫には多国間の協力が必要となる疾病」と定義する「越境性動物疾病」の代表例であり、一度まん延すれば、養鶏産業による影響が甚大であるほか、人への感染による致死率が高いことから、高病原性トリインフルエンザウイルスのまん延防止策の確立は非常に重要な課題である。

4. 高病原性トリインフルエンザウイルス感染による対応と抗ウイルス薬の意義

本国では家畜伝染病予防法に基づき、H5 又は H7 亜型のトリインフルエンザ発生時には、原則感染した家禽類の殺処分を行うことが求められている。一方で、高病原性トリインフルエンザウイルスはヒトにも感染し、サイトカインストームによる多臓器不全を伴う致死性の重症疾患を引き起こすことが知られている。高病原性トリインフルエンザウイルスの人への感染は、1997 年に香港で発生した H5N1 高病原性トリインフルエンザウイルスの人への感染事例から、生鳥の小売りマーケットが感染源であり、インフルエンザウイルスの異鳥種への感染と遺伝子再集合、病原性獲得、ヒトへの偶発的な伝播の場となっていると考えられている(14)。現在までに高病原性トリインフルエンザウイルスのヒト - ヒト間での感染事例は感染者との濃厚接触があったケースにおいて報告されているが、一般的にはヒト - ヒト間での感染は、トリインフルエンザウイルスのレセプター特異性により起こりにくいと考えられている。しかし、ヒトのインフルエンザウイルス感染モデル動物として使用されているフェレットを使った実験により、HA の特定のアミノ酸残基を数アミノ酸置換するだけで、病原性を維持したまま、容易に飛沫感染可能な変異ウイルスが産生されることが近年報告された(15)。これらの研究成果は、ヒト - ヒト間においても容易に感染可能な高病原性トリインフルエンザウイルスが

発生する可能性があることを示しており、現在感染が確認されている高病原性トリインフルエンザウイルスの HA タンパクにわずか数個のアミノ酸変異が生じるだけで、高病原性トリインフルエンザによるパンデミックが現実になり得ることを強く示唆している。これらの事態による被害の拡大を未然に防ぐためには、家禽へのウイルス感染を早期に摘発・淘汰し、高病原性トリインフルエンザを鳥だけに封じこめることが原則である。しかしながら、高病原性トリインフルエンザウイルスによる感染がトリ-ヒト間、及びヒト-ヒト間で成立してしまった場合、その感染を最小限に抑え込むため、公衆衛生上の感染拡大防止措置をとることが非常に重要である。この場合、公衆衛生上の対応として、ウイルス感染が認められた家禽や人に対して、外部との接触を防ぐための物理的な隔離措置を講じることに加え、感染源との接触リスクがある者には、抗インフルエンザウイルス薬による予防投与を行うことが防疫上大変有効であると考えられる。一方で、人での感染が認められたケースでは、高病原性トリインフルエンザは季節性インフルエンザとは異なり、致死率が高く、重症化し易いため、速やかに抗ウイルス薬による治療を施さなければならない。また、治療薬としての抗ウイルス薬の使用は人だけでなく、希少動物種に指定されている鳥類への感染が認められた場合においても、種の保存の観点からヒトと同様に抗ウイルス薬投与による治療を施すべき対象であると考えられる。以上より、抗ウイルス薬による予防と治療は、ウイルス感染による公衆衛生上のリスクを回避し、人と動物の健康を守るために重要な役割を担っている。

5. 既存の抗インフルエンザウイルス薬と薬剤耐性の現状

現在インフルエンザの治療・予防薬として、ウイルスの宿主細胞への侵入・脱殻過程を阻害する M2 阻害薬、感染した宿主細胞からウイルスの遊離を阻害する NA 阻害薬の使用が認められているが(図 2)、使用可能な薬剤の選択肢が限られているため、薬剤耐性の観点から問題視されている。M2 阻害薬は A 型インフルエンザウイルスのみに存在する M2 タン

パクのイオンチャネル活性を阻害し、脱殻を阻止することにより、抗ウイルス効果を発揮するが、既に M2 阻害薬耐性ウイルスの出現が多数報告されており、主としてアミノ酸 31 位のセリンからアスパラギン酸への変異(S31D)が生じることにより容易に耐性化することが分かっている。アマンタジンに対する耐性率は近年世界的に激増しており、2002 年までは季節性インフルエンザウイルスのアマンタジン耐性率は 1-3%程度であったが(16)、現在ではほぼ全ての季節性インフルエンザウイルスでアマンタジン耐性が確認されており、H5N1 トリインフルエンザウイルスにおいてもアマンタジン耐性ウイルスが既に確認されている(17)。これは、アマンタジンの耐性変異がウイルスの増殖性に影響を与えにくい部位に生じるため、アマンタジンに対する耐性変異をウイルスが獲得しやすい性質を備えていたことに加え、中国で養鶏用のニワトリにアマンタジンが乱用されたことが要因として考えられている。

NA 阻害薬は宿主細胞表面に存在するシアル酸とウイルス粒子との結合を切り離す NA のシアリダーゼ活性を阻害し、細胞内で増殖したウイルスが細胞外へ放出される過程を抑制することにより抗ウイルス活性を発揮し、A、B いずれの型のインフルエンザウイルスにも有効である。しかしながら M2 阻害薬と同様、既に NA 阻害薬耐性ウイルスの出現が確認されており、2007/08 年シーズンに初めて 274 位のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに変異(H274Y)したオセルタミビル耐性 H1N1(ソ連型)ウイルスが地域によって流行したことが報告されている。しかし、その翌年の 2008/09 年シーズンには世界中で分離された大部分の H1N1(ソ連型)ウイルスがオセルタミビル耐性株であることが判明し、日本でも分離された H1N1(ソ連型)ウイルスの 99.6%が耐性株であることが報告された(18)。また、H1N1pdm09 ウイルスにおいても既にオセルタミビル耐性ウイルスが複数例確認されており、アミノ酸 274 位のヒスチジンの変異以外にも耐性に関与するアミノ酸が複数報告されている(19)。

以上より、現在有効な抗ウイルス薬は NA 阻害薬のみであるが、その標的タンパクは M2

阻害薬と同様に、ウイルス粒子の表面タンパクであるため、変異の導入が起こりやすいと考えられる。また、長期頻回使用により、NA 阻害剤耐性ウイルスが蔓延化した場合、インフルエンザウイルスに対する対抗手段を完全に失うこととなるため、インフルエンザ対策として NA 阻害薬のみに依存し続けることは大変危険であり、NA 阻害薬とは異なる作用点を有する新規抗インフルエンザウイルス薬の開発が強く求められている。

6. Nucleoprotein (NP)の構造と機能

NP 遺伝子は 8 本に分節化された vRNA の内、1565 塩基からなる第 5 分節 vRNA にコードされており、498 アミノ酸からなる塩基性タンパクである。NP タンパクの三次元立体構造は、未解読部分の構造があるものの、X 線結晶構造解析によって明らかにされている(図 3) (20)。NP は RNA 結合ドメインを介して、約 24 塩基ごとに vRNA と結合し、一組のポリマーサブユニットと共に巨大な二重らせん構造から成る vRNP を形成する(21,22)。vRNP 中の NP は、二つの異なる結合様式を介して vRNP の基本骨格となる二重らせん構造を形成する。一つは、同一 NP オリゴマー鎖内の NP-NP 間の結合であり、NP が有する tail loop (アミノ酸 402 位-428 位)とその結合ポケットとの相互作用によって形成される(20)。もう一つは、NP のヘリックスターンモチーフ(アミノ酸 149 位-167 位)と C 末端領域(アミノ酸 482 位-498 位)を介して、異なる NP オリゴマー鎖間で形成される NP-NP 間の相互作用によるものである(23)。また、NP はその構造中に非常に多くの機能ドメインを有し、ウイルスライフサイクルの過程において、①NP/vRNP の核内移行、②vRNA の転写・複製、③NP/vRNP の核外移行、④vRNA パッケージングなど多機能タンパクとして働き、ウイルス複製に必須な役割を担っている(24-26)(図 4)。NP のアミノ酸配列は、これらの機能的制約や内部タンパクである特性から、亜型に関わらず、外膜タンパクである M2 や NA に比べ遥かに保存性が高い(27)。また、インフルエンザウイルス NP の配列は、種間交差が危惧されるヒト、ブタおよびトリインフルエンザウイルス間においても高度に保存されて

いることが分かっている。以上より、NPを抗ウイルス薬の標的とすることで、多くの亜型に有効であり、耐性化に抵抗性を有する新規作用機序に基づいた抗ウイルス薬の開発が期待される。

第1章 新規抗インフルエンザウイルス薬の探索

1-1. 緒言

現在インフルエンザの治療及び予防目的で使用可能な抗ウイルス薬は、NA 阻害薬のみであることから、抗ウイルス薬の限られた選択肢が問題となっており、新規作用機序を有する抗ウイルス薬の開発が求められている。

近年新たな抗ウイルス薬標的としてウイルス核タンパク質(NP)が注目を浴びており、NP を標的とした様々な阻害剤が報告されている(28)。最初に報告された NP 阻害剤として、NP の nuclear import signal (NLS)を標的とした天然物由来の低分子化合物である mycalamidA の誘導体が報告された(29)。本化合物は、約 6,800 種の低分子化合物が固定化された化合物アレイを用いて、NP の N 末端に位置する 3-13 アミノ酸から構成される NLS を含む 110 アミノ酸に特異的に結合する低分子化合物をスクリーニングすることにより同定されたものである。スクリーニングによってヒットした化合物 mycalamidA 自身は抗ウイルス活性を示さなかったものの、NLS との結合性を維持した光学異性体において、インフルエンザウイルス感染阻害効果が認められた。以上の結果から、mycalamidA 光学異性体は NP の NLS に結合する核内移行阻害剤として、抗ウイルス活性を示すことが示唆される。また、vRNP を形成するために必要な NP-NP 間の結合に関与する tail-loop とその結合ポケット構造の相互作用に必要である E339 と R416 間の塩橋結合を阻害する化合物がインシリコスクリーニングにより同定された(30)。本化合物は、tail-loop とその結合ポケットの相互作用により形成される NP の多量体形成を阻害し、抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった。さらに、最も強い抗ウイルス活性を示す NP 阻害剤として、NP-NP 間に特異的に結合し、タンパク凝集を誘導することで、包括的に NP の機能を阻害する Nucleozin が報告された(31,32)。本化合物は、季節性インフルエンザウイルス株に加え、強毒性の高病原性トリインフルエンザウイルス株においても、nM オーダーの非常に強い抗ウイルス活性を示した。しかしながら、Nucleozin と NP の結合に関わるわずか一つのアミノ酸残基

の変異によって著しく抗ウイルス活性が低下し、薬剤耐性を示すことが明らかとなった。Nucleozin に対する耐性を獲得する 289 位のチロシン(Y)からヒスチジン(H)へのアミノ酸変異は、2009 年にパンデミックを引き起こしたブタ由来の H1N1pdm09 ウイルス株において認められ、これらの変異はウイルス複製に影響しなかった。そのため、容易にアミノ酸変異による Nucleozin 耐性ウイルスが生じることが耐性ウイルス産生実験により示されている。これまでの研究成果から、NP が創薬の標的として妥当性のある標的分子であることは示されてきたが、未だ NP を標的とした抗ウイルス薬の開発には至っていない。

本研究では、ウイルス感染細胞を用いた HTS スクリーニングによる 50,000 化合物のライブラリースクリーニングを行い、既存の抗ウイルス薬とは異なる作用機序を有する新規抗インフルエンザウイルス薬の探索とヒット化合物の作用機序解析を行った。

1-2. 材料と方法

細胞培養とプラスミドの導入法

Madin Darby canine kidney (MDCK)細胞および human embryonic kidney 293T (HEK293T) 細胞は、10% fetal bovine serum (FBS, SIGMA 社製) および Pen-Strep Glutamine (Invitrogen 社製) 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen 社製) にて培養した。

Influenza A/Wilson-Smith Neurotropic (WSN)/1933 (A/WSN/33 (H1N1))は東京大学大学院医科学研究所ウイルス感染分野 河岡義裕教授より分与していただいた。Influenza A/Udorn/307/1922 (H3N2)は日本大学医学部感染症ゲノムセンター清水一史教授より分与していただいた。その他 A 型インフルエンザウイルス株は北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター迫田博教授より分与していただいた。全てのウイルス株は 1 μ g/mL の tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone-treated trypsin (TPCK-treated trypsin, Worthington Biochemical Corporation 社製) を含む DMEM(-FBS)を培地とし、MDCK 細胞にて増殖させた。

プラスミド

Influenza A/WSN/33 (H1N1)由来のウイルスタンパク発現プラスミド; PB2/pCAGGS, PB1/pCAGGS PA/pCAGGS PB2/pCAGGS、およびウイルスゲノム発現プラスミド ; PB2/pHH21, PB1/pHH21, PA/pHH21, NP/pHH21, HA/pHH21, NA/pHH21, M/pHH21, NS/pHH21, vRNA-luc/pHH21は東京大学大学院医科学研究所ウイルス感染分野河岡義裕教授より分与していただいた。

NP-mRFP-Flag/pCAGGS, NP-Flag/pCAGGS, NP-HA/pCAGGS及びGST-NP/pGEX6p3は分子ウイルス学特別学研究ユニットにて構築されたものを間陽子教授より分与いただいた。

NP/pHH21, NP/pCAGGS及びNP-FLAG/pCAGGS の内、任意のアミノ酸配列(Y52H、R162A、S165A、L264A、Y289H及びY487A)にアラニン変異を導入した変異体NP発現プラスミドは、NP/pHH21、NP/pCAGGS及びNP-FLAG/pCAGGSをそれぞれ鋳型とし、以下のプライマーとPrime STAR® Max DNA Polymerase(Takara bio 社製)を用いたPCR反応により調製した。

プライマー：

Y52H-(F) 5'-AGTGATCATGAGGGACGGCTGATTCAG-3'

Y52H-(R) 5'-TCCCTCATGATCACTGAGTTTAAGTTC-3'

R162A-(F) 5'-GATCCCCGCGATGTGCTCACTGATGCAG-3'

R162A-(R) 5'-GCACATCGCGGGATCCATTCCTGTGCG-3'

S165A-(F) 5'-ATGTGCGCACTGATGCAGGGCTCAACC-3'

S165A-(R) 5'-CATCAGTGCGCACATCCTGGGATCCAT-3'

L264A-(F) 5'-TCTGCAGCCATATTGAGAGGGTCAGTT-3'

L264A-(R) 5'-CAATATGGCTGCAGACCGTGCTAAAAA-3'

Y289H-(F) 5'-AGTGGACCACGACTTTGAAAGAGAGGGA-3'

Y289H-(R) 5'-AAAGTCTGTTCCACTGGCTACGGCAGA-3'

Y487A-(F) 5'-GGATCTGCTTTCTTCGGAGACAATGCA-3'

Y487A-(R), 5'-GAAGAAAGCAGATCCTTCATTACTCAT-3'

(変異導入部位に下線を引いた)

配列は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystem 社製)にてDNAを増幅後、理化学研究所脳科学総合研究センター生体物質分析支援ユニットにて配列解析し、GENETYX ver.10.0.0 (GENETYX Corporation社製)にてアライメント解析することで野生型の配列と比較して目的の部位に変異が導入されていることを確認した。

化合物

化合物ライブラリーは理化学研究所 創薬医療・技術基盤プログラムより提供いただいた。RK188、RK424、 Leptomycin B (LMB) 及びOseltamivir phosphateはSigma社、Enamine社、 Sigma社及びSundia MediTech社よりそれぞれ購入した。WV635、WV970 及びRK424誘導体は湧永製薬株式会社 創薬研究所にて合成されたものを提供いただいた。

プラーク形成阻害試験

MDCK細胞(5×10^5 個)を6ウェル培養プレート(Nunc社製)に播種し、10%FBS/DMEM培地中で37°C、24時間培養した。培養後、細胞をPBSで洗浄し、0.3% bovine serum albumin (BSA)/minimum essential medium (MEM)にてMOI=0.008に調製したウイルス液を37°Cにて1時間接種した。その細胞をPBS にて3回洗浄し、種々の濃度に調製した化合物と0.3% BSA/MEM、1% agarose 及び1 μ g/ml TPCK-treated trypsin の混合液2mlにて覆い、37°C、48時間培養した。48時間後に非感染生細胞を0.1% crystal violet (Wako社製)にて染色し、形成されたプラーク数をカウントした。DMSOを処理した細胞でカウントされたプラーク数に対して、50%のプラーク形成阻害効果を示す化合物濃度をHalf-maximal inhibitory concentration (IC₅₀)として算出し、抗ウイルス活性を評価した。

Water soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) アッセイ

MDCK細胞(1.0×10^5 個)を96ウェルプレート(Nunc社製)に播種し、種々の濃度に調製した化合物と共に10% FBS/DMEM中にて37°C、48時間培養した。その後、培養後の各ウェルに10 μ lのWST-1試薬を添加し、0.5~1.0時間、37°Cで培養した。培養後のプレートをWallac ARVO.SX 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer社製) にて450nmにおける吸光波長を測定し、DMSO処理を行った細胞に対する試験化合物を処理した細胞の吸光度を基にCC₅₀を算出した。

大腸菌由来タンパク質の精製

100mLのLB培地に、野生型NP及び変異体NPをコードするpGEX-6p-3プラスミドをトランスフォーメーションしたBL21 CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene社製)大腸菌株を添加し、濁度を示すOD600値が0.8~0.9 になるまで37°Cで振とう培養した。培養後、終濃度1 mMにて isopropyl-b-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG; SIGMA社製)を添加し、22°Cで10時間振とう培養した。培養後の大腸菌液を遠心分離し、ペレットをlysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1% Triton X100, 1 mg/mL lysozyme, 0.15 mg/mL RNase A)で懸濁し、ソニケーションにより菌体を破碎した。破碎した菌体液を遠心分離し、回収した上清に Glutathione Sepharose 4 Fast Flow ビーズ (GSH ビーズ; GE Healthcare社製) を加え、4°Cで一晩回転攪拌した。攪拌後、lysis buffer でビーズを洗浄後、PreScission budffer (10mM Tris-HCl (pH 7.0), 150mM NaCl)と PreScission Protease (GE Healthcare社製)を添加し、さらに4°Cにて、一晩回転攪拌を行った。攪拌後の上清を回収し、 Heparin Sepharose 6 Fast Flow ビーズ (GE Healthcare社製)を添加し、4°Cにて2-3時間回転攪拌後、ビーズをWash buffer (0.5 M NaCl and 50mM Tris-HCl (pH 7.4))で洗浄し、Eelution buffer (1.5 M NaCl and 50mM Tris-HCl (pH 7.4))にてNPタンパクをビーズから溶出し、上清を回収した。回収した精製タンパクをSDS-PAGEにより分離し、coomassie brilliant blue (CBB) 染色にてNPの精製度を確認した。

ゲル濾過カラムによるサイズ分画法

1 mg/mL濃度に調製した精製NPタンパクを、多量体から単量体に平衡をシフトさせるため、Amicon® Ultra 50K device (Merck Millipore社製)を用いた限外濾過法により、低塩濃度 buffer (100 mM NaCl , 50mM Tris-HCl (pH 7.4))に置換し、4°Cにて一晩静置した。単量体にシフトさせた精製NPとRK424 及び vRNA を加え、室温で1時間回転攪拌を行った。

反応後のサンプル100 μ lをÄKTA purifier chromatography system (GE Healthcare社製)に取り付けたSuperdex 200 Increase 10/300 GL Column (GE Healthcare社製)にロードし、溶出サンプルピークを同システムによりモニターし、検出されたピーク面積をInstruments software (UNICORN ver. 5.1; GE Healthcare社製)にて解析した。

マウス感染モデルを用いた*in vivo*薬効試験

RK424 を終濃度20% polyethylene glycol (PEG) 400を含む PBSに懸濁し、1 mg/mL 又は 2 mg/mL濃度のRK424溶液を調製した。6週齢のメス Balb/c マウス(CREA Japan社製)を1週間馴化飼育した後、 $10 \times 50\%$ lethal doses (LD_{50}) の濃度に調製したA/WSN/1933 (H1N1)ウイルス液をマウス経鼻より感染させた。感染試験は1群につき8匹のマウスを使用し、RK424 (5 mg/kg または10 mg/kg)またはOseltamivir (10 mg/kg) を感染2時間前に腹腔投与し、ウイルス感染後さらに5日間、1日2回腹腔投与を行った。ネガティブコントロール群であるPBS及びポジティブコントロール群であるOseltamivir 投与群については、それぞれ7匹のマウスを使用し、RK424処理群と同様の投与計画で評価を行った。*in vivo*の薬効評価は、マウスの体重変動を指標に評価し、初期体重の20%以上の体重減少を認めたものについては、人道的エンドポイントとして、ペントバルビタールを用いて安楽死させた。また、肺でのウイルス量の変動を評価するため、RK424またはPBS投与群において、感染6日目の個体から肺を採取し、乳鉢でPBSと共に懸濁させた肺懸濁液を用いてプラークアッセイによるウイルス力価の定量を行った。

血漿タンパク結合率の測定

マウス血漿を7週齢のBalb/cマウス血液より調製し、終濃度5mMとなるようにRK424とマウス血漿を合わせ、37°Cで30分反応させた。反応後、100 kDa size cut filterを用いた限外濾過法により、血漿タンパクに結合していないフリーのRK424を分離した。分離した血漿

タンパクフリーのRK424量をUltra Performance Liquid chromatography (UPLC)により定量し、血漿タンパク結合率を算出した。

薬物動態パラメーターの算出

RK424の薬物動態パラメーターの算出は Nemoto Science 社に試験を依頼した。N,N-Dimethylacetamide (Wako Pure Chemical Industries 社製) と 生理食塩水(Otsuka Pharmaceutical Factory 社製)に溶解した1 mg/kg RK424 は静脈内投与、 PEG 400 (Sigma社製)とPBSに溶解した10 mg/kg RK424は腹腔投与、 0.5% メチルセルロース (Wako Pure Chemical Industries社製) に溶解した10mg/kg RK424は経口投与にそれぞれ使用した。化合物の投与は8週齢の Balb/c マウス (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN社製)を使用し、腹腔投与後 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 及び 24 時間後に血液を採取した。経口投与及び静脈内投与後のマウスについては、投与後 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 6 及び24 時間後に血液を採取した。採取した血液サンプルは除タンパク処理後、 LC/MS/MS (ACQUITY UPLC system and Xevo TQ MS; Nihon Waters K.K.社製) を用いて、血中の RK424量を測定した。得られた血中濃度データを基に、Winnolin Ver.6.1 (Pharsight Corporation社製)を用いて薬物動態パラメーター (C_{max} , T_{max} , $AUC_{0-24 h}$, $t_{1/2}$, V_d 及び relative bioavailability) を解析した。

Replicon アッセイ

HEK293T 細胞 (2×10^5 個) を 24 ウェル培養プレート (Nunc 社製) に播種し、10%FBS/DMEM培地中で37°C 24時間培養した。培養後、PB2/pCAGGS、PB1/pCAGGS、PA/pCAGGS、NP/pCAGGS及びvNP-luc/pHH21を0.5 μ gずつHEK293T細胞にトランスフェクションし、種々の濃度に調製した化合物と共に37°Cで48 時間培養した。培養後の細胞を回収し、PBSで洗浄後、Piccagene luciferase lysis buffer (Tokyo Ink社製)にて細胞を溶

解した。細胞溶解後、回収した細胞上清100 μ lに10 μ lのPiccagene luciferase assay substrate (Tokyo Ink社製)を添加し、Wallac ARVO.SX 1420Multilabel Counter にてルシフェラーゼ活性を測定した。

リコンビナントウイルスの作成

MDCK細胞 (4×10^5 個) とHEK-293T細胞 (6×10^5 個)を6ウェルプレートに播種し、37°Cで24時間共培養した。培養後、第1~8分節のウイルスゲノムをコードプラスミドとvRNPを構成するウイルスタンパクを発現するプラスミド(PB2/pCAGGS、PB1/pCAGGS、PA/pCAGGS及びNP/pCAGGS)をFugene(promega社製)を用いてトランスフェクションし、6時間後に1 μ g/mL TPCK-treated trypsin/0.03% BSA/ DMEM(-FBS)に培地を交換し、さらに72時間培養を行った。培養後の培養上清を回収し、ウイルス量をプラークアッセイにより定量した。

免疫染色法による細胞内NPの局在解析

HeLa細胞(2×10^5 個)を24ウェルプレート(Nunc社製)に播種し、10%FBS/DMEM培地中で37°C、24時間培養した。培養後、HeLa細胞にNP/pCAGGSをトランスフェクションまたは、A/WSN/1933 (H1N1)ウイルス株をMOI=10で感染し、試験化合物と共に37°Cで48時間培養した。培養後、4%パラホルムアルデヒドで20分間、室温固定し、さらに冷メタノールで10分間、-20°Cで反応させた。反応後、0.1% Triton-X 100/PBSで膜透過処理をした。膜透過処理後、一次抗体として抗NPモノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology社製)を室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、二次抗体としてAlexa Fluor 488-抗マウスIgG抗体(Invitrogen社製)を用いて室温で1時間反応させた。PBS洗浄後、hoechst33342を室温で5分間反応させ、核を染色した。調製した観察用サンプルを共焦点レーザー顕微鏡(FV1000D, Olympus社製)を用いてNPの細胞内局在を観察した。

Nuclear export アッセイ

HeLa細胞(2×10^5 個)を24ウェル培養プレート(Nunc社製)に播種し、10%FBS/DMEM培地中で37°Cで24時間培養した。培養後、HeLa細胞にNP-mRFP-Flag/pCAGGSをトランスフェクションし、37°Cで48時間培養した。培養後、氷冷したtransport buffer (20 mM HEPES (pH 7.4), 110 mM potassium acetate, 2 mM magnesium acetate, 1 mM EGTA (pH 7.4), 2 mM DTT, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin) で2度洗浄し、transport bufferに溶解した 50 μ g/mL digitonin (Sigma社製)で氷冷下、5分間反応させ、細胞膜透過処理を行った。膜透過処理後、細胞を氷冷したtransport bufferで洗浄し、transport bufferに溶解した 10 U/mL apyrase (Sigma社製) を氷冷下、5分間反応させた。反応後、氷冷したtransport bufferで洗浄し、さらに氷冷下でtransport buffer に10分間浸した後、試験化合物を含むreaction mixture (40 μ g HeLa cell lysate, 10 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 10 mM ATP, 5 mM creatine phosphate, 0.64 U creatine kinase)に置換し、30°Cで1時間反応させた。氷冷したtransport bufferで3回洗浄後、mRFPの蛍光を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。観察した核内の蛍光強度をMetaMorph software (Molecular Devices Inc社製)で測定し、100細胞以上の集団を解析対象として、核外移行阻害率を算出した。

タグ配列を付加したNPタンパクの精製

10 μ gのNP-Flag/pCAGGS、NP-HA/pCAGGS、NP-mRFP-Flag/pCAGGSまたはmRFP-Flag/pCAGGSをHEK293T細胞にトランスフェクションし、37°Cで48時間培養した。培養後の細胞をPBSで洗浄後、500 μ Lのlysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA 及び 1% NP-40)で細胞を懸濁し、4°Cで1時間回転攪拌した。攪拌した後のライゼートを遠心分離し、回収した上清にANTI-FLAG M2 agarose ビーズ

(Sigma社製) または ANTI-HA agarose ビーズ (Sigma社製) を添加し、4℃で一晩回転攪拌した。攪拌後のサンプルを wash buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% NP-40) で3回洗浄し、ビーズに結合したタンパクを3× Flag peptide (Sigma社製) または HA peptide (Sigma社製) により溶出し、回収した。回収したタンパクは、SDS-PAGE により分離し、Western blot法及びCBB染色にてタンパクの精製を確認した。精製した mRFP-Flag, NP-mRFP-Flag及びNP-Flagタンパクは ANTI-FLAG M2 agarose ビーズ (Sigma社製) と反応させ、HA-NPまたはCRM1との結合実験に使用した。

化合物ビーズによる結合実験

CH-sepharose 4B ビーズ (Amersham Biosciences Corporation社製) に光親和性リンカーを導入し、UV照射によりRK424を不可逆的に結合させた。化合物ビーズは理化学研究所 長田抗生物質研究所 本田香織氏に作成いただいた。化合物ビーズまたは化合物を結合していないコントロールビーズ20 μ lと精製NP-FLAGタンパク溶液を混合し、4℃にて一晩回転攪拌させた。反応後、Wash buffer (0.01% NP-40, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)) で5回洗浄し、10% SDS-PAGE sample bufferをにより、ビーズに結合したタンパクを100℃で5分間熱変性させ、SDS-PAGEにて分離し、抗Flagモノクローナル抗体 (Sigma社製) を用いたWestern blot法により検出した。

CRM1とNPの結合実験

NP-Flag を固定化したANTI-FLAG M2 agarose ビーズ (Sigma社製) と HeLa細胞より調製したライゼート及び種々の濃度に調製したRK424またはLMBを反応させ、4℃で一晩回転攪拌した。攪拌後のサンプルを、Wash buffer (0.01% NP-40, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)) で5回洗浄し、10% SDS-PAGE sample bufferを加えて、ビーズに

結合したタンパクを100°Cで5分間熱変性させ、SDS-PAGEにて分離し、抗CRM1 MAb (BD Biosciences社製)を用いたWestern blotによりCRM1のビーズへの結合を検出した。

Surface plasmon resonance (SPR)法 によるNPとRNA の結合実験

ビオチン修飾を施した2-O-methylated RNA; 5-UUU GUU ACA CAC ACA CAC GCU GUG-3 (Hokkaido System Science社製) をストレプトアビジン付加したSAセンサーチップ (GE Healthcare社製)に結合量が100 resonance units (RU)となるように固定化した。精製NP-FLAGタンパクと種々の濃度に調製したRK424を室温で1時間反応させ、反応後のサンプルをrunning buffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.05% Tween 20) に添加し、RNA固定化センサーチップとの結合をBiacore T-100 (GE Healthcare社製)を用いて解析した。

NP-NP間の結合解析

mRFP-FLAGまたはmRFP-FLAG-NP を固定化したANTI-FLAG M2 agaroseビーズ (Sigma社製) と 精製HA-NPタンパク及び種々の濃度に調製したRK424を共に反応させ、4°Cで一晩回転攪拌した。攪拌後のサンプルを、Wash buffer (0.01% NP-40, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0))で5回洗浄し、10% SDS-PAGE sample bufferを加えて、ビーズに結合したタンパクを100°C で5分間熱変性させた。変性させたサンプルをSDS-PAGEにて分離し、抗HA モノクローナル抗体 (MBL社製)を用いたWestern blot法によりmRFP-FLAGまたはmRFP-FLAG-NPビーズへのNP-HAの結合を検出した。

*in vitro*トランスクリプションによるvRNA の合成

1027ntのA/WSN/1933(H1N1)ウイルス由来 第7分節ゲノムRNA をコードするプラスミド M/pHH21を鋳型とし、T7プロモーターと第7分節ゲノムRNA特異的な配列を含むプラ

イマーを設計した。設計したプライマーとprime starmax polymerase (Takara社製) を用いたPCR法により、ゲノムRNAをコードする配列を増幅した。得られたPCR産物をQIAquick PCR purification kit (Qiagen社製)を用いて精製した。5 μ gの精製PCR産物とtranscription buffer、rNTP mix (25 mM ATP, CTP, GTP, UTP) 及び T7 enzyme mix (final volume 100 μ L)を混合し、37 $^{\circ}$ C で4 時間反応させた。反応後のサンプルに5 units のRQ1 RNase-Free DNase I (Promega社製)を添加し、さらに 37 $^{\circ}$ Cで15分反応させ、DNAを消化した。反応後のサンプルをアガロース電気泳動にて分離し、目的のサイズに合成したRNAが検出されるのを確認した。以下に使用したプライマー配列を記載する:

T7_WSN_seg7-(F),5'-GACTCAGTTAATACGACTCACTATATAGTTTTTTACTCCAGCTC
TATGTTG-3'

T7_WSNseg7-(R), 5'-AGCAAAAGCAGGTAGATATTG-3'

(T7 promoter 配列に下線を引いた。)

RNA FISH法によるゲノムRNAの発現解析

PB2をコードするウイルスゲノムRNAに特異的なDNA配列をSTELLARIS RNA FISH PROBE DESIGNER (Biosearch Technologies社製) を用いて設計し、設計した配列をBiosearch Technologies社より購入した(33)。設計したプローブは、Quasar 670で標識した20 mer の長さからなるように設計したsingle-stranded DNAであり、48種類のプローブセットにより構成される。カバースリップを敷いた12ウェルプレートにMDCK細胞(2×10^5 個)を播種し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。MOI=5に調製したA/WSN/1933 (H1N1)ウイルス液を種々の濃度に調製したRK424またはOseltamivir phosphateと共にMDCK細胞に感染させ、感染6時間後の細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドにより室温で10分間固定化した。固定化後のサンプルをPBSで洗浄し、0.5% Triton X-100を含むPBSを用いて室温で1分反応させ、膜透過処理を行った。膜透過処理後のサンプルをPBSで洗浄し、10% ホ

ホルムアミドを含む 2 × SSC buffer (300 mM sodium chloride, 30 mM sodium citrate)で室温5分反応させた。ウイルス感染細胞内でのゲノムRNAを検出するため、hybridization buffer (10% dextran sulfate, 2 mM vanadyl ribonucleoside complexes (VRC; New England BioLabs社製), 0.02% BSA, 50 mg E. coli tRNA, 2 × SSC, 10% formamide)で2 μMに調製したFISHプローブをカバースリップサンプルに添加し、37°C で16時間反応させた。反応後のサンプルを10% ホルムアルデヒドを含む 2 × SSC buffer (300 mM sodium chloride, 30 mM sodium citrate, 2 mM VRC)を用いて、30°Cで30分間洗浄した。洗浄後のサンプルをhoechst 33342で染色し、染色後のサンプルをスライドガラスにマウント後、観察用サンプルとした。調製した観察用サンプルは共焦点レーザー顕微鏡(FV 1000, Olympus社製)を用いて解析した。

リアルタイムPCRによるウイルスmRNA及びvRNAの発現定量解析

MDCK細胞(1.2×10^6 個)を6ウェルプレート(Nunc社製)に播種し、10%FBS/DMEM培地中で37°C、24時間培養した。培養後、MDCK細胞にA/WSN/1933 (H1N1) ウイルス株をMOI=10で感染させ、感染5時間後又は10時間後の細胞からTrizol LS reagent (Invitrogen社製)を用いてRNAを抽出した。抽出したゲノムRNAをSuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen社製)及び以下の配列特異的なプライマーを用いてReverse transcription (RT) -PCR を行った。

vRNA NP (F) 5' -GGCCGTCATGGTGGCGAATGAATGGACGGAGAAC
AAGGATTGC-3';

viral mRNA NP (R) 5' -CCAGATCGTTCGAGTCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TCTTTAATTGTC-3'

mRNA MDCK actin (R) 5' -GGAACCGCTCGTTGCCAATG-3'

RT-PCRにより得られたcDNAを用いて、2 × SYBR GreenER qPCR

SuperMix (Invitrogen社製) 及び以下の配列特異的プライマーを用いて、ABI PRISM(Applied Biosystems社製)によりリアルタイムPCRを行った。

vRNA NP (F), 5'-GGCCGTCATGGTGGCGAAT-3'

vRNA NP (R), 5'-CTCAATATGAGTGCAGACCGTGCT-3'

viral mRNA NP (F), 5'-CGATCGTGCCCTCCTTTG-3'

viral mRNA NP (R), 5'-CCAGATCGTTCGAGTCGT-3'

mRNA MDCK actin (F), 5'-CGTGCGTGACATCAAGGAAGAAG-3'

mRNA MDCK actin (R), 5'-GGAACCGCTCGTTGCCAATG-3'

得られたデータは $\Delta\Delta$ CT法により解析し、actinの発現量をコントロールとして評価した。

耐性ウイルス産生実験

MDCK細胞(2×10^5 個)を12ウェルプレート(Nunc社製)に播種し、10%FBS/DMEM培地中で37°C、24時間培養した。培養後、MDCK細胞にA/WSN/1933 (H1N1) ウイルス株を100 PFU/wellで感染させ、種々の濃度に段階希釈した RK424 または Nucleozinと共に培養した。ウイルス感染の成立は細胞変性効果による形態変化を指標に評価した。培養は細胞変性効果が認められるまで継続し、細胞変性効果が認められたサンプルの内、最も高い薬剤濃度で処理をしたサンプルの上清を回収し、次の継代感染に使用した。継代は4回実施し、3回または4回継代後に回収したウイルス上清を用いて、10 μ MのRK424およびNucleozinに対する感受性を評価し、薬剤耐性化の評価を行った。また、3回または4回継代後のウイルス上清を用いて、ウイルスゲノムのシーケンス解析を行うため、回収したウイルス上清にTrizol LS reagent (Invitrogen社製) を加え、ウイルスゲノムRNAを抽出した。抽出したゲノムRNAをSuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen社製)及びウイルスゲノム特異的なプライマー; Uni12 (F), 5'- agcaaaagcagg-3'を用いてRT-PCR を行った。RTを行ったPCR産物のNP配列を増幅するため、NP特異的なプライマー

及びKOD -Plus- (Toyobo社製)を用いてPCRを行った。得られたPCR産物は ABI PRISM BigDye Terminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社製)を用いてシーケンス解析用サンプルを調製し、ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems社製)を用いて配列を解析した。

ChemSpiderを用いた標的タンパク検索

立体構造に基づいた仮想スクリーニングデータベースである ChemSpider (Royal Society of Chemistry社製)を用いて試験化合物に対するタンパクの結合可能性を検索した(34)。試験化合物とタンパクとの結合可能性は、0～1のLASSO (ligand activity by surface similarity order)スコアで表示され、スコアが高いほど標的タンパクとの結合可能性が高いことを示す。

KINOMEscanによるキナーゼ阻害活性評価

WV970のキナーゼ阻害活性は、DiscoverRx社が提供する競合的キナーゼ阻害活性評価を目的としたKINOMEscanにより評価した(35,36)。予めPCRで増幅可能なDNAタグを付加した456種類のキナーゼタンパクをリガンドに固定化した状態で50nM WV970を反応させ、リガンドから解離したキナーゼをDNAタグに対するプライマーを用いてqPCRにより定量し、競合阻害活性を算出した。解析値は% Ctrlで算出し、値が小さいほど強いキナーゼ阻害活性を有することを示す。

アミノ酸保存率の算出

ヒト、ブタ、トリ由来のA型インフルエンザウイルスのNPアミノ酸配列を NCBI's Influenza Virus Resourceより抽出した。抽出した配列をMAFFT (version 6) プログラムを

用いて、アミノ酸配列の比較を行い、アミノ酸保存率を算出した。ヒト由来NP; 3,759配列、トリ由来NP ; 3,273配列、ブタ由来NP; 651配列を含めた計7,683配列の解析を行った。

統計解析

平均値の差の検定にはt検定を用いた。また、マウスの生存曲線の比較検定にはlog-rank検定を用いた。有意確立p value <0.05のとき統計学的に有意差があるものとした。

RK424とNPのドッキングシュミレーション

RK424とNPタンパクのドッキングシュミレーションはAutoDock (version 4.2) (37)にて行った。単量体NPの立体構造は PDB (PDB ID: 2IQH)より取得した。得られたRK424 とNPの詳細な結合様式の解析は MOE version 2013.0801(38)にて行った。

NPポケット構造に対する構造相同性解析

インフルエンザウイルスNP タンパクとPAタンパクのX線結晶構造は PDBより抽出した(NP= ID: 2IQH, PA=PDB ID: 4E5E)。 解析対象として、NPのポケット構造をR162、S165、 L264及びY487のアミノ酸残基より半径10Åの範囲及び PAのエンドヌクレアーゼ活性部位として、P107、D108、E119及びK134のアミノ酸残基より半径10Åの範囲を抽出し、タンパク構造ライブラリーPoSSuM(39)及びProBiS(40)により抽出した構造に対して相同性を示すタンパクの検索を行った。

1-3. 結果

1-3-1. 新規抗インフルエンザウイルス化合物の同定

新規抗インフルエンザウイルス薬の探索を行うため、50,000 個の化合物を含む化合物ライブラリーを使用して、スクリーニングを実施した。1 次スクリーニングとして、ウイルス感染を行った MDCK 細胞の細胞生存率を指標に、感染阻害効果を評価した。その結果、評価した 50,000 化合物の内、83 個の化合物が 50%以上の細胞生存率を示し、43 個の化合物について再現性が認められた。2 次スクリーニングとして、プラークアッセイによる抗ウイルス活性評価を行った。その結果、83 化合物の内、 $IC_{50} \leq 3 \mu M$ の強い抗ウイルス活性を示す化合物として、4 つの化合物を選定した(図 5)。選定した 4 つの化合物の内、RK856 は既存薬と同じアダマンタン骨格を有する M2 チャネル阻害薬誘導体であったため、研究対象から除外した。また、RK852 は細胞毒性が高く、誘導体合成により薬効が向上した化合物の取得にも至らなかったため、作用機序解析の対象から除外した。

1-3-2. RK188 及び WV970 の作用機構解析

RK188 の構造最適化と誘導体の抗ウイルス活性評価

RK188 は強い抗ウイルス活性を示したが、C7 位と C14 位に 2 つの不斉炭素原子を有するため、立体構造の異なる 4 つの化合物から成るラセミ混合物であることが分かった(図 6A 左)。そこで RK188 の活性本体を明らかにするため、立体選択に合成した 4 つの化合物の抗ウイルス活性を評価した結果、C7 位及び C14 位が共に S 体である WV635 が RK188 の活性本体であることが明らかになった(図 6A 中央)。そこで WV635 をリード化合物として、抗ウイルス活性を指標に構造最適化を行った結果、大きく抗ウイルス活性が向上した WV970 を取得することに成功した(図 6A 右)。次に WV970 の抗ウイルス活性プロファイルを評価した結果、WV970 は季節性インフルエンザウイルス株だけではなく、強毒性の高病原性トリインフルエンザウイルス株及び B 型インフルエンザウイルス株に対しても強い

抗ウイルス活性を示すことが示された(図 6B)。一方で WV970 は、インフルエンザウイルスと同様にゲノムに RNA を有する日本脳炎ウイルス株やデングウイルス株に対しては抗ウイルス活性を示さなかったことから、インフルエンザウイルス特異的な複製メカニズムを阻害していることが示唆された。

WV970 のウイルスライフサイクルにおける作用点評価

WV970 のウイルスライフサイクルにおける作用点を解析するため、ウイルス感染の過程において、継時的に WV970 を処理し、感染 11 時間後の細胞培養上清を回収し、産生されたウイルス量を HA アッセイにより評価した。その結果、WV970 はウイルス感染時から感染 4 時間以内に投与した場合に、顕著なウイルス産生量の低下が認められたことから、ウイルスライフサイクルの初期から中期にかけて作用し、ウイルス複製を阻害していることが示唆された(図 7)。そこで、感染初期過程に認められる vRNP の細胞質から核内への移行について、vRNP の主構成要素である NP の細胞内局在を指標に WV970 による阻害効果を確認した(41)。その結果、感染 1.5 時間後の細胞内において、DMSO 及び WV970 処理を行ったいずれの条件下においても NP の核内での局在が確認されたことから、WV970 は NP の核内移行に関与しないことが明らかになった(図 8 上)。次に、核内で再構成された vRNP の核から細胞質への移行が認められる感染 5 時間後の NP の細胞内局在に与える WV970 の影響を解析した。その結果、DMSO 処理細胞では、NP の大部分が細胞質に局在し、一部が核に局在が認められたのに対し、WV970 処理細胞では、NP の局在が DMSO 処理細胞と同様細胞質に認められるものの、その発現レベルが大きく低下していることが確認された(図 8 下)。これらの結果から、WV970 は、vRNP による vRNA の転写・複製を阻害し、ウイルスタンパクの合成を抑制していることが考えられる。

WV970 の vRNP ポリメラーゼ活性に与える影響解析

そこで、ウイルス感染細胞内で vRNP により複製される vRNA の発現量に与える WV970 の影響を FISH 法により解析した(33)(図 9A)。ウイルス非感染細胞では、蛍光標識した DNA プロブの蛍光シグナルが認められないのに対し、ウイルス感染細胞では細胞質と核に強く蛍光シグナルが認められたことから、FISH 法による vRNA の検出系が機能していることが確認された。また、DMSO 処理を行ったウイルス感染細胞では vRNA の蛍光シグナルの低下が認められないのに対し、WV970 処理を行ったウイルス感染細胞ではその容量依存的に vRNA の蛍光シグナルの低下が認められることが分かった(図 9B-C)。次に、WV970 の vRNA の複製及び転写に対する阻害効果を定量的に評価するため、ウイルス感染細胞内の vRNA 及び mRNA の発現量を q-PCR により解析を行った。その結果、NA 阻害剤である Oseltamivir を処理した細胞では、DMSO 処理細胞と比較して、細胞内 vRNA 及び mRNA の発現量に大きな差は認められなかった。一方で、WV970 及びウイルスゲノムの転写・複製を阻害する NP 阻害剤である Nucleozin 処理を行った細胞では、感染 5 時間後及び 10 時間後の細胞において、共に vRNA 及び mRNA の発現量の低下が認められた。また、vRNP を構成する PB2、PB1、PA 及び NP タンパクを発現するプラスミドとウイルスタンパクの代わりにレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子をコードする vRNA を発現するプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼの化学発光を指標に WV970 のウイルスゲノムの転写活性に与える影響を解析したところ、qPCR による細胞内 vRNA 及び mRNA の定量結果と相関するように、WV970 処理細胞でルシフェラーゼによる化学発光が低下することが明らかになった(図 10A)。さらに、ウイルス感染細胞内でのウイルスタンパクの発現に対する WV970 の影響を Western blot 法により解析した(図 10B)。その結果、DMSO や Oseltamivir 処理細胞ではウイルスタンパクの発現低下が認められないのに対し、WV970 処理細胞では、NP だけではなく、HA、NA 及び M1 等のウイルスタンパクの発現抑制が認められた。以上より、WV970 は vRNP の転写・複製の過程を抑制することで、ウイルスタンパクの発現を抑制し、抗ウイルス作用を発揮すると考えられる。

WV970 の標的探索とキナーゼ活性阻害評価

WV970 の標的探索として、薬剤耐性ウイルスの獲得を試みたが、WV970 耐性ウイルスを獲得することはできなかった。その理由として、WV970 の構造最適化の過程において、抗ウイルス活性と細胞毒性のが共に亢進し、抗ウイルス活性と細胞毒性の解離が認められなかったことから、WV970 がウイルスタンパクではなく、ウイルス複製を制御する宿主因子を標的としていることが考えられる。そこで、WV970 の標的宿主因子を探索するため、立体構造から結合標的因子を予測する *in silico* スクリーニングデータベースである Chempidder を用いて標的探索を行った(34) (図 11)。その結果、WV970 に対して結合可能性が高い標的分子は得られなかったため、WV970 のリードとなった WV635 に対して結合可能性を示す標的分子の探索を行ったところ、複数のキナーゼ分子に対して高い結合可能性を示すことが示された(図 11A)。WV970 自体は標的分子検索によって結合候補分子を見出すことは出来なかったが、WV635 をリードとして開発した誘導体化合物であるため、その標的は同一分子である可能性が考えられる。予測された結果を検証するため、WV970 のキナーゼ阻害活性を Discoverx 社が提供するキナーゼ活性阻害試験である Kinomescan により評価した(35,36)。本試験方法は、ATP 結合サイトに非特異的に結同するリガンドとキナーゼ分子間の結合に対して、試験化合物の競合的阻害活性を評価する方法である。キナーゼに対する競合的阻害活性は、試験化合物反応後にリガンドから解離したキナーゼ分子に予め標識された DNA プローブを PCR により増幅し、定量することで評価可能である。本試験方法を用いて、465 種類のキナーゼに対する WV970 (50nM) の競合的阻害活性を評価したところ、15 種類のキナーゼに対して 50%以上のリガンドとキナーゼの結合阻害効果が認められた(図 11B)。これらの結果は、WV635 を基に予測した標的分子の推測結果と関連し、WV970 は、抗ウイルス活性を示すマルチキナーゼ阻害剤として機能することが明らかになった。

1-3-3. RK424 の作用機構解析

RK424 の *in vitro* 抗ウイルス活性評価

ライブラリースクリーニングによりヒットした 4 つの化合物の内、RK424 は最も強い抗ウイルス活性($IC_{50}=0.5 \mu M$)を示したことから、創薬リード化合物として有望であると考えられる。そこで本化合物について、より詳細な薬効プロファイルを評価するため、様々な亜型を有するインフルエンザウイルス株について抗ウイルス活性を評価した(表 1)。RK424 は季節性インフルエンザウイルス株である A/California/7/2009 (H1N1) ($IC_{50} = 0.40 \pm 0.07 \mu M$, $IC_{90} = 0.88 \pm 0.02 \mu M$)だけではなく、高病原性トリインフルエンザウイルス株である A/CX/yamaguchi/7/2004 (H5N1) ($IC_{50}=0.5 \pm 0.04 \mu M$, $IC_{90} = 0.93 \pm 0.02 \mu M$) や A/Anhui/1/2013(H7N9) ($IC_{50} = 0.60 \pm 0.12 \mu M$, $IC_{90} = 1.14 \pm 0.26 \mu M$)に対しても強い抗ウイルス活性を示した。また、RK424 は亜型の異なる多くのウイルス株に対して強い抗ウイルス活性を示したことから、本化合物は亜型の異なるウイルス感染細胞内で、共通の分子を標的としていることが考えられる。さらに、RK424 は既存薬である Oseltamivir 耐性株である A/Tex/131 E119V (H3N2) に対しても強い抗ウイルス活性を示したことから、既存薬とは異なる作用機序を有すると考えられる(42)。

RK424 の薬物動態パラメーターの評価

RK424 の *in vivo* での薬効評価を行うため、RK424 の薬物動態試験を行った(表 2)。投与方法は、静脈内投与、腹腔投与及び経口投与の 3 つの投与経路を検討し、薬物投与後の血中濃度から、最大血中濃度(C_{max})、半減期($t_{1/2}$)、吸収量(AUC)、分布容積(V_d)を算出した。また、別途マウス血液より調製したマウス血漿を用いて、RK424 の血漿タンパク結合率(Protein Binding rate: PB)を評価した。その結果、RK424 の PB は 99.6%と非常に高く、水溶性の溶媒に難溶性であったことから、脂溶性の高い化合物であることが分かった。そ

のため、RK424 を 1mg/kg 投与量で静脈内投与を行った際の Cmax は 2850ng/mL であるが、この内組織へ浸透可能な血漿タンパクフリーの最高血中濃度(Cfree max)は、PB を考慮すると 11.4ng/mL であり、*in vitro* 薬効評価で確認された有効薬物濃度 IC₅₀=162.7 ng/mL=0.5 μM を大きく下回ることが分かった。また、RK424 は水溶性溶媒への溶解性が低く、薬物投与量を上げて血中濃度を高めることが困難であったため、静脈内投与による検討は中止した。経口投与は、腹腔内投与に比較して Cmax が 4 倍ほど低値を示し、Cfree max が有効血中濃度に達しないことが分かった。一方で、腹腔内投与時の Cfree max は 156.8ng/mL であり、*in vitro* で認められた有効薬物濃度に近い値を示すことが確認された。以上より、RK424 の *in vivo* 抗ウイルス活性評価は腹腔内投与により実施することとした。

RK424 の *in vivo* 抗ウイルス活性評価

既存薬である Oseltamivir に対する RK424 の *in vivo* 抗ウイルス活性評価を行うため、投与計画は Oseltamivir phosphate のインタビューフォームに記載の方法に準じて実験を実施した。50% lethal doses (LD₅₀) の A/WSN/1933 (H1N1)ウイルス株をマウス経鼻より感染させ、体重の減少率を指標にマウス生存率を評価した(図 12 A-B)。試験化合物は、ウイルス感染前に一度腹腔内投与し、感染後 5 日間は、一日二回腹腔内投与を行った。その結果、PBS のみを投与したコントロール群は、感染後 6 日目までに生存率 0 %を示したのに対し、10mg/kg RK424 投与群では 25 %の生存率の回復を認めた。また、化合物投与中断直後の感染 6 日目では、コントロール群に比べて RK424 投与群で顕著な生存率の回復が認められた。しかしながら、RK424 の *in vivo* 抗ウイルス活性は Oseltamivir よりも低いものであった。そこで、*in vivo* での RK424 の薬効を確認するため、最も細胞生存率の回復が認められた感染後 6 日目のマウスから肺を採取し、PBS 及び RK424 投与群での肺中のウイルス量をプラークアッセイにより定量した(図 13 A-B)。その結果、PBS 投与群の肺中のウイルス量(1.6×10⁵ PFU/mL)に対し、10 mg/kg RK424 投与群では、肺中ウイルス量の

有意な減少(2.9×10^3 PFU/mL)が認められた。以上より、RK424 は *in vivo* においても抗ウイルス作用を発揮することが明らかとなった。次に、RK424 と Oseltamivir の併用投与により、相乗効果が確認されるか否か検討を行うため、予め予備検討により確認した中程度の生存率の回復を認める Oseltamivir 投与量(0.02mg/kg)に対し、RK424 を併用投与し、検討を行った(図 14 A・B)。その結果、Oseltamivir 単独投与では、29%の生存率の回復を認めたのに対し、RK424 との併用投与では、RK424 の投与量依存的に 57%まで生存率の回復が認められた。以上より、RK424 は Oseltamivir との併用投与により、抗ウイルス活性の相乗効果が認められることが明らかになった。

RK424 の vRNP ポリメラーゼ活性に与える影響解析

RK424 の作用機序解析を行うため、vRNP を構成する PB2、PB1、PA 及び NP タンパクを発現するプラスミドとウイルスタンパクの代わりにレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子をコードする vRNA を発現するプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼによる化学発光を指標に RK424 の vRNA の転写活性に与える影響を解析した(図 15)。

その結果、DMSO や Oseltamivir を処理した細胞ではルシフェラーゼの化学発光量に大きな影響が認められなかったのに対し、RK424 処理細胞では、その容量依存的にルシフェラーゼの化学発光量が低下することが明らかになった。次にウイルス感染細胞内で vRNP により複製される vRNA の発現量に与える RK424 の影響を FISH 法により解析した(33) (図 16)。ウイルス非感染細胞では、蛍光標識した vRNA に相補的な DNA プローブによる蛍光シグナルが認められないのに対し、ウイルス感染細胞では細胞質と核に強く蛍光シグナルが認められたことから、FISH 法による vRNA の検出系が機能していることが確認された。また、DMSO や Oseltamivir 処理細胞では vRNA の蛍光シグナルの低下が認められないのに対し、RK424 処理細胞ではその容量依存的に vRNA の蛍光シグナルの低下が認められる

ことが分かった。さらに、ウイルス感染細胞内でのウイルスタンパクの発現に対する RK424 の影響を Western blot 法により解析した(図 17)。その結果、DMSO や Oseltamivir 処理細胞ではウイルスタンパクの発現低下が認められないのに対し、RK424 処理細胞においてウイルスタンパクの発現抑制が認められた。以上より、RK424 は vRNP の転写・複製の過程を抑制することで、抗ウイルス作用を発揮することが明らかとなった。

RK424 の NP の細胞内局在に与える影響解析

ウイルス感染細胞内の vRNP の細胞内局在に与える RK424 の影響を免疫染色法により確認するため、vRNP の主要な構成因子である NP の局在を指標に解析を行った(41) (図 18)。ウイルス感染細胞内において、DMSO 及び Oseltamivir 処理を行った細胞では、NP の局在が核と細胞質に強く認められるのに対し、RK424 処理を行った細胞では、NP の局在が核に強く認められた(図 18 A 上)。また、RK424 により認められた細胞内局在の変化は、NP のみを発現させた細胞においても同様に認められた(図 12 A 下)。RK424 処理による NP の細胞内局在の変化を定量的に評価するため、NP を一過性に発現させた細胞をランダムに 500 細胞選択し、核と細胞質または核のみに強く NP の局在が認められる集団に分け、その割合を算出した(図 18 B)。その結果、DMSO や Oseltamivir 処理細胞では、核と細胞質に NP の局在が認められる細胞の割合が 90%程度占めるのに対し、RK424 を処理した細胞では核と細胞質に局在を示す細胞の割合が減少し、核にのみ強く局在を示す細胞の割合が約 40~60%に上昇することが示された。以上の結果から、RK424 は NP に作用し、vRNP による vRNA の転写・複製を抑制することでウイルスの増殖抑制に寄与していることが考えられる。

RK424 と NP のドッキングシミュレーション

RK424 と NP の結合可能性を評価するため、Protein data bank (PDB)より取得した NP

の立体構造情報(PDB code:2IQH)と RK424 の構造情報を用いて、Autodock(37)によるドッキングシュミレーションを行った。その結果、RK424 は NP の 3 つの異なる結合サイト(結合サイト 1~3)に結合する可能性が示された(図 19-21)。この内、結合エネルギーが高い上位 8 つの RK424 の立体配座の内、5 つが結合サイト 1 に結合性を示したことから、RK424 は結合サイト 1 に結合する可能性が高いと考えられる(図 19)。また結合サイト 1 について、最も NP との結合エネルギーが高い RK424 の立体配座(configuration0)は、NP の R162、S165、L264 及び Y487 の 4 つのアミノ酸残基との結合可能性が示されている(図 22 A-B)。そこで、RK424 と NP の結合可能性を明らかにするため、光化学反応性ビーズに RK424 をクロスリンキングさせた化合物ビーズと精製 NP タンパクを用いた化合物ビーズ結合アッセイにより両者の結合を評価した(図 23 A-B)。その結果、RK424 を固定化していないコントロールビーズに対しては、NP の結合が認められなかったのに対し、RK424 を固定化したビーズに対しては NP の結合が認められた。さらに、RK424 との結合が想定される 4 つのアミノ酸残基にアラニン変異を導入した変異体 NP では RK424 固定化ビーズへの結合が認められなくなった。以上の結果から、RK424 が NP の結合サイト 1 へ結合することが強く示唆された。

RK424 誘導体を用いた構造活性相関解析

ドッキングシュミレーションによって示された RK424 と NP 結合サイト 1 の結合モデルでは、RK424 のカルボキシル基、ビフェニル基及びキノリン骨格は NP との相互作用に関与していることが示されている。そこで、これらの官能基を置換した RK424 の誘導体を用いて、RK424 の抗ウイルス活性に対する構造活性相関を解析した(図 24)。RK424 のカルボキシル基をアミノ基に置換した RK424 誘導体 #1 では、抗ウイルス活性の低下が認められ、ビフェニル基やキノリン骨格を消失させた RK424 誘導体 #2 や #3 では抗ウイルス活性が著しく低下することが明らかになった。一方で、ビフェニル基をビフェニルエーテルに置

き換えた誘導体#4 では活性が維持されることが分かった。以上の結果から、NP の結合サイト 1 との相互作用に必要と推定される RK424 のカルボキシル基、キンリン骨格及びフェニル環は、RK424 の抗ウイルス活性の発現に必要であることが示された。

RK424 の NP-RNA 間及び NP-NP 間の結合阻害効果の解析

予測された結合サイトを構成する 4 つのアミノ酸残基は、NP の立体構造上、異なる機能ドメインに位置している。R162 及び S165 は RNA 結合領域に(20)、L264 は核外移行シグナルに(25)、Y487 は NP-NP 間の相互作用領域に(23)それぞれ位置している。そこで、1) NP-RNA 間の結合、2) NP-NP 間の結合、及び 3) NP の核外移行に対する RK424 の阻害効果をそれぞれ評価するため、まず NP-RNA 間の結合に対する RK424 の阻害効果について、Biacore を用いた SPR 法により評価した(図 25 A, B)。5'-末端と 2'OH 基をそれぞれビオチン化及びメチル化修飾した 24mer のオリゴ RNA 配列を SA センサーチップに固定化し、センサーチップ上の RNA に対する精製 NP タンパクの結合量を SPR シグナルの増減を指標に解析した。その結果、DMSO 処理した NP タンパクは、センサーチップ上の RNA に結合し、SPR シグナルの増加が認められた。一方で、RK424 を処理した NP タンパクでは、DMSO 処理をした NP タンパクと比較して、RK424 の用量依存的に NP と RNA の結合による SPR シグナルの低下が認められた。以上より、RK424 は NP-RNA 間の結合を阻害することが示された。

次に、NP-NP 間の結合に対する RK424 の影響を解析するため、HA タグを付加した NP タンパク(HA-NP)と mRFP-FLAG タグを付加した NP タンパク(mRFp-FLAG-NP)をそれぞれ精製した。抗 FLAG ビーズに mRFP-FLAG-NP タンパクを固定化し、mRFP-FLAG-NP ビーズと HA-NP タンパクの結合に対する RK424 の影響を pull-down アッセイにより解析した(図 26 A-B)。その結果、mRFP-FLAG-NP を固定化したビーズに対して HA-NP の結合が認められたのに対して、RK424 を処理したサンプルでは、その容量依存的に

mRFP-FLAG-NP に対する HA-NP の結合量が減少した。

以上の結果より、RK424 は NP-RNA、及び NP-NP 間の結合をそれぞれ阻害することが明らかとなった。

RK424 の NP オリゴマー形成阻害効果の解析

ウイルスの転写・複製を制御する vRNP は、複数の NP と一本の vRNA との結合による NP オリゴマーを基本骨格として構成されることから、NP-RNA 間及び NP-NP 間の結合を阻害する RK424 が、NP オリゴマー形成を阻害することが想定される。そこで、RK424 の NP オリゴマー形成に与える影響について、ゲル濾過カラムを用いたサイズ分画法により解析した(図 27 A-B)。サイズ分画に用いた NP タンパクは大腸菌発現系を用いて精製し、vRNA は *in vitro* トランスクリプションにより合成したものを使用した。vRNA を添加していない NP タンパクをゲル濾過カラムにより分離すると、単量体の画分に単一のピークが認められるのに対し、vRNA を添加した NP タンパクでは、分子サイズの大きい画分 (>1000kDa) にピークが認められたことから、vRNA の添加により NP がオリゴマーを形成していることを確認した。一方で、RK424 と vRNA を添加した NP サンプルでは、RK424 の用量依存的に分子サイズの大きな画分に認められたピークが減少し、単量体画分のピークが増加したことから、RK424 は NP-RNA 及び NP-NP 間の結合を阻害することで、NP オリゴマーの形成を阻害することが示された。

RK424 の NP 核外移行に与える影響解析

RK424 処理によって NP の局在が核に集積したことや、ドッキングシュミレーションにより RK424 が核外移行シグナルを構成する L264 と相互作用する可能性が高いことから、RK424 が NP の核外移行に与える影響を *in vitro* 核外移行アッセイにより解析した(図 28 A-B)。mRFP-NP を一過性に発現させた HeLa 細胞をジギトニンによる細胞膜透過処理を

行い、細胞質に存在する核移行に関わる宿主因子及び mRFP-NP を洗浄した。核移行に関わる宿主因子を含む細胞抽出液を反応させ、反応後のサンプルを再び洗浄することで消失する mRFP シグナルを指標に核外移行阻害率の評価を行った。細胞抽出液を反応させていないサンプルでは mRFP シグナルの消失が確認されないのに対し、細胞抽出液を処理した細胞では mRFP シグナルの消失が確認されたことから、細胞抽出液の添加により mRFP-NP が核内から細胞質に移行していることが確認された。一方で、既知の核外移行阻害剤である LMB や RK424 を処理した細胞では、細胞抽出液の添加による mRFP シグナルの消失が抑制されたことから、RK424 は NP の核外移行を阻害することが明らかとなった。

NP の核外移行は CRM1 依存的な経路で輸送されることが報告されている(43, 44)。そこで、RK424 の NP と CRM1 の結合に与える影響を検討するため、抗 FLAG ビーズに固定化した精製 NP-FLAG と HeLa 細胞より調製した細胞抽出液中に含まれる CRM1 との結合を pull down アッセイにより解析した(図 29A-B)。その結果、DMSO 処理サンプルでは NP と CRM1 の結合が確認されたのに対し、LMB 及び RK424 処理を行ったサンプルでは両者の結合阻害が確認された。以上より、RK424 による NP の核外移行の阻害は、NP と CRM1 との結合阻害によるものであると考えられる。

NP ポケット構造の相同性解析

新薬開発のプロセスにおいて、薬剤標的とするタンパク構造が特異的な構造を有していることがオフターゲット効果による副作用を回避するために重要な条件である。そこで、RK424 によって同定した NP のポケット構造が特異的な構造を有しているか解析を行うため、包括的な構造相同性解析データベースである Pocket Similarity Search using Multiple-sketches (PoSSuM) (39)と ProBiS (40)を用いて解析を行った。また NP と同様に、近年新たな創薬標的として注目を浴びているウイルスポリメラーゼサブユニットの一つである PA のエンドヌクレアーゼ活性を有する基質結合ポケット構造(45-47)を比較対象

として解析を行った(図 30 A-B)。その結果、構造既知の 20 種類のタンパクにおいて、PA の基質結合ポケットと類似の構造を有することが示された。一方で、同定した NP のポケット構造に対して相同性を有するタンパクは一つもヒットしなかったことから、RK424 の結合サイトと考えられる NP ポケット構造は、非常に特異的な構造を有している可能性が高いことが示された。

RK424 による耐性ウイルス産生実験

予測した NP の結合サイトを構成するアミノ酸残基が RK424 の薬効発現に関与しているか検討するため、既知の NP 阻害剤である Nucleozin を比較対象として、耐性ウイルス産生実験による変異導入配列の同定を試みた。RK424 または Nucleozin を段階希釈により種々の濃度に調製し、薬剤と共にウイルス感染細胞を細胞変性効果によるウイルス感染が認められるまで培養した。その後、感染が成立した一番高い薬剤濃度で培養した細胞の培養上清を回収し、継代培養を 4 回繰り返した(図 31 A-B)。その結果、Nucleozin を処理した感染細胞では、継代回数の増加と共に薬剤に対する感受性が低下したのに対し、RK424 処理した感染細胞では継代回数の増加による薬剤感受性の低下は認められず、ウイルス感染の成立は 3 回継代培養までしか認められなかった。また、薬剤共存下で継代ごとに回収した上清中に含まれるウイルスの増殖性は、Nucleozin 共存下で回収したウイルスに比較し、RK424 を処理したウイルスで低下することが確認された。そこで、薬剤処理下で産生されたウイルス粒子量を HA アッセイにより、また感染性ウイルス量をプラークアッセイにより定量し、RK424 及び Nucleozin 処理下で産生されたウイルス粒子量に対する感染性ウイルス量を比較した(図 31C)。その結果、RK424 処理下で産生されたウイルスは、Nucleozin 処理下で産生されたウイルスに対して、産生されたウイルス粒子量に対する感染性ウイルス粒子量の割合が低下していることが明らかとなった。また、継代感染の過程で NP のアミノ酸変異が認められるか否か確認を行うため、RK424 は 3 回継代培養したウイルス上清を、

Nucleozin は 4 回継代培養したウイルス上清を用いて、NP をコードするゲノム RNA の配列解析を行った。その結果、Nucleozin 存在下で回収したウイルスでは、NP の Y52H、Y289H 及び Y313S 変異が認められた。これらのアミノ酸配列で認められた変異は、Nucleozin 結合サイトへの変異導入であり、過去に報告された Nucleozin 耐性を規定するアミノ酸変異と同一のものであった(31)。一方で、RK424 処理下で回収されたウイルスでは、NP の配列に変異は認められなかった。実際、これらのウイルスの RK424 及び Nucleozin に対する耐性をプラークアッセイにより評価したところ、Nucleozin 共存下で継代したウイルスでは Nucleozin に対して耐性化が確認されたが、RK424 共存下で継代したウイルスでは RK424 に対する耐性化は認められなかった(図 31 D)。以上より、RK424 は既知の NP 阻害剤である Nucleozin よりも耐性ウイルスの産生に抵抗性を示す薬剤であることが分かった。

RK424 結合予測サイトにおける変異ウイルス産生実験とアミノ酸保存率の解析

RK424 に対する薬剤耐性化抵抗性について検討するため、RK424 の結合予測サイトである R162、S165、L264 及び Y487 にアラニン変異を導入した変異ウイルスと、比較対象として Nucleozin 耐性ウイルスに認められた Y52H 及び Y289H 変異ウイルスをリバースジェネティクス法により作成し、作成したウイルスの増殖性をプラークアッセイにより評価した(図 32 A-B)。その結果、Y52H および Y289H 変異ウイルスは野生型ウイルスと同程度の増殖を示したのに対し、RK424 結合予測サイトである R162、S165、L264 及び Y487 にアラニン変異を導入した変異ウイルス全てにおいて、ウイルス増殖性が全く認められなくなることが明らかとなった。以上の結果より、RK424 の結合予測サイトはウイルス複製に必要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、RK424 の結合サイトを構成する 4 つのアミノ酸残基(R162、S165、L264 及び Y487)及び Nucleozin 結合と耐性に関わる 2 つのアミノ酸残基(Y52 及び Y289)のアミノ酸保存性を解析した(表 3)。その結果、Nucleozin 結合サイトである Y52 及び Y289 のアミノ酸保存率は 70%前後と低い値を示したのに対し、

RK424 結合サイトを構成するアミノ酸残基は全て 99.9%以上の高い保存率を示すことが明らかとなった。

以上より、RK424 の結合サイトとして同定された NP のポケット構造を形成するアミノ酸残基は、アミノ酸配列保存性が高く、変異の導入が許容されにくいため、創薬の標的として非常に有望であると考えられる。

1-4. 考察

抗インフルエンザウイルス活性を有する化合物を探索するため、50,000 個の化合物ライブラリーを用いた HTS により、 $IC_{50} \leq 3 \mu M$ の強い抗ウイルス活性を有する化合物を 4 つ同定した(図 5)。

この内 RK852 はアダマンタン骨格を有する既存薬 M2 チャネル阻害剤の誘導体であったこと、また RK856 は抗ウイルス活性と細胞毒性を示す薬剤濃度域が非常に近く、抗ウイルス活性と細胞毒性の乖離が困難であると考えられたため、創薬シード候補化合物から除外した。

RK188 については、その構造最適化により、抗ウイルス活性が大きく上昇した誘導体 WV970 を得ることに成功し、宿主の複数のキナーゼを標的として抗ウイルス活性を示すことを本研究により明らかにした(48)。A 型インフルエンザウイルスの複製制御に関わる宿主因子の探索により、非常に多くの宿主因子が A 型インフルエンザウイルスの複製制御に関与していることが明らかにされてきたが、その大部分がキナーゼ分子を占めていることがこれまでの研究により明らかにされている(49-51)。これらの結果成果を裏付けるように、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CAMK)、protein kinase C (PKC)、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、receptor tyrosine kinases (RTKs) 及び MAPK/ERK kinase (MEK)等、様々なキナーゼを標的とした阻害剤が抗ウイルス活性を発揮し、特に PI3K 阻害剤は vRNP のポリメラーゼ活性を阻害することで強い抗ウイルス活性を発揮することが報告されている。以上の報告からも、種々のキナーゼ分子がウイルス複製の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。WV970 のキナーゼ阻害活性評価によりヒットした 15 のキナーゼ分子の内、DCLK1、EPHB2、JAK2、OXSR1 及び HIPK2 の 5 つのキナーゼ分子は、ウイルスゲノムの転写・複製の制御に関与していることが既に報告されているため、WV970 の抗ウイルス活性は、これらのキナーゼ活性の阻害によることが想定される。一方で、今回標的として同定された DSTYK、MAP3K1、SBK1、ULK1、IRAK4

及び INSR については、現在までにウイルス複製の制御に関わる報告はなく、ウイルス複製に与える影響については今後の解析が必要である。

インフルエンザウイルスのウイルスゲノムの転写・複製は、PB2、PB1、PA 及び NP の 4 つのウイルスタンパクと vRNA により構成される vRNP により制御されている。vRNP を構成するこれらのウイルスタンパクのリン酸化プロテオーム解析の結果、複数のアミノ酸残基がリン酸化を受けることが明らかにされている(52)。リン酸化そのものの機能的役割については不明な点が多いが、特定のアミノ酸残基のリン酸化がウイルス複製の制御に必須であることが報告されている。特に vRNP の主構成要素である NP のアミノ酸 165 位に位置する S を A に置換した変異体ではポリメラーゼ活性が低下し、逆にリン酸化を模倣したアスパラギン酸 (D) 変異体では転写活性が向上することから、NP のリン酸化は vRNA の転写・複製の制御に必須な働きをしていることが報告されている(53)。これらの結果は、ウイルスタンパクのリン酸化が vRNP のポリメラーゼ活性の制御に必須な役割を果たしていることを示しており、これらウイルスタンパクのリン酸化を制御する宿主由来のキナーゼ分子は抗ウイルス薬開発の標的として有望であると考えられる。しかしながら、宿主因子を創薬標的とする場合、宿主内での標的因子の機能阻害による細胞毒性の発現に留意する必要がある。事実、キナーゼ活性阻害活性を示した WV970 は、誘導体合成の過程で抗ウイルス活性の向上と共に細胞毒性も増強し、抗ウイルス活性と細胞毒性の乖離が困難であった。WV970 は非常に多くのキナーゼに対して阻害活性を有するため、ウイルス複製の制御に関わっているキナーゼの特定とそれらのキナーゼに対する選択性を高めることが細胞毒性低減のために必要であると考えられる。

一方 RK188 とその誘導体とは対照的に、RK424 は同定したヒット化合物の中で最も抗ウイルス活性が高く、抗ウイルス活性を示す濃度域と細胞毒性を示す濃度域が乖離していた。また本化合物は、季節性インフルエンザ株や高病原性トリインフルエンザウイルス株等、多くの異なる亜型を有数するウイルス株に対して同程度の強い抗ウイルス活性を示し、

Oseltamivir 耐性ウイルスに対しても有効であった。これは、RK424 が既存薬である Oseltamivir とは異なる作用機序を有し、ウイルス株間で保存された領域を標的としていることを強く示唆している。レプリコンアッセイや FISH 法、並びに Western blot 法による解析の結果、RK424 は vRNA の転写・複製を抑制し、ウイルスタンパクの発現を抑制することが明らかになった。vRNA の転写・複製は、一組のポリメラーゼサブユニット(PB2、PB1 及び PA)と複数の NP が vRNA に結合した vRNP の制御下にあることから、RK424 は vRNP を構成するウイルスタンパクを標的としている可能性が考えられた。実際、ウイルス感染細胞内及び NP 一過性発現細胞内において、RK424 の処理によって、NP の局在が核に集積することが明らかになったことから、RK424 が NP に直接作用し、その機能制御に関与している可能性を強く示している。

これらの背景から NP と RK424 のドッキングシミュレーションを行った結果、3つの異なる結合予測サイトが NP 上に示された。結合サイト 1 は、それぞれ異なる機能ドメインより形成されるポケット構造を形成しているのに対し、結合サイト 2 及び 3 は既知の機能ドメインによって構成されている領域ではなかった(図 20-22)。RK424 の結合サイト 2 への結合モデルでは、R422、S450、R452 及び D455 の 4 つのアミノ酸残基と RK424 の相互作用がドッキングシミュレーションの結果より示唆されている(図 20)。しかし、これらのアミノ酸残基の配列保存性は低く、NP の機能制御について現在までに報告例はない。また、RK424 の結合サイト 3 への結合予測モデルでは、R461、G462 及び P474 の 3 つのアミノ酸残基と RK424 との結合が示唆されているが、予測された結合モデルの中で最も低い結合エネルギーを示していた(図 21)。また、これらのアミノ酸残基の保存性は高いものの、ウイルス複製に対する機能的な重要性については不明であり、少なくとも P474 については変異ウイルス産生実験により、ウイルス複製に対する機能的な関わりはないことが報告されている(26)。以上の結果より、RK424 が結合サイト 2 及び 3 へ結合する可能性は低いと考えられる。一方で、結合サイト 1 は機能的に重要な複数のドメインより構成され、RK424

の結合サイト 1 への結合立体配座はどれも高い結合エネルギーを示す(図 19)。結合サイト 1 に対して最も高い結合エネルギーを示した RK424 立体配座(configuration 0) は、各々の機能ドメインにおいて重要な役割を担っている 4 つのアミノ酸残基との結合可能性が高いことを示している。RK424 をビーズへ固定化した化合物ビーズの実験結果より、結合が予測された R162、S165、L264 及び Y487 にアラニン変異を導入することにより、NP と RK424 との結合が低下したことから、RK424 が結合サイト 1 へ結合する可能性が高いことを示している。また RK424 の構造活性相関の結果から、RK424 のカルボキシル基、キノリン骨格及びビフェニル環が抗ウイルス活性の発現に重要な官能基であることが示された。これらの結果を結合サイト 1 に対して最も高い結合エネルギーを示した RK424 の立体配座(configuration 0)と照らし合わせると、RK424 のカルボキシル基と R162 の側鎖は水素結合を形成し、RK424 のキノリン骨格中の芳香環と L264 の側鎖は分子間相互作用を介して結合していることが示されている。さらに、RK424 のビフェニル環は Y487 の側鎖と CH- π 水素結合を形成しており、構造活性相関解析によって示された抗ウイルス活性の変化は、これらの結合モデルとの相関性が高いと考えられる。この結合モデルでは、S165 と RK424 との直接的な相互作用は認められないが、結合サイト 1 に対する他の立体配座(configuration 1, 2, 3 及び 5) では、S165 の側鎖と RK424 のカルボキシル基及びキノリン骨格中の芳香環との相互作用が示されている(図 24)。加えて、結合サイト 1 に対するいくつかの RK424 の立体配座では、F488 や F489 等のアミノ酸残基が RK424 と相互作用することが示されている。そのため、本研究成果からは、正確な RK424 と NP との結合モデルを特定することは困難である。本研究で示された結合予測モデルは、RK424 と NP ポケット構造との結合様式について一定の理解を与えるものであるが、正確な結合様式の把握には、NP と RK424 との X 線共結晶構造解析による更なる結合様式の解明が求められる。

宿主の核内で vRNA の転写・複製を制御する vRNP の構造は NP-NP 及び NP-RNA 間の結合により維持されている。また、核内での転写・複製後、再構成された vRNP は、CRM1

依存的な経路で核内から細胞質へ移行する(54-58)。この過程はウイルスの複製に必須であるため抗ウイルス薬の良い標的であると考えられる。RK424 が結合すると考えられる NP ポケット構造は、i) NP-RNA 相互作用、ii) NP-NP 相互作用、及び iii) 核外移行シグナルの 3 つの異なる機能ドメインより形成されることから、RK424 は NP-NP 間の結合、NP-RNA 間の結合、及び NP の核外移行を阻害することが推測される。RK424 との結合に関与すると推定される R162、S165 及び Y487 は NP のオリゴマー形成に関わる機能ドメインに位置している。RNA 結合領域中に存在する R150、R152、R156、及び R162 のアルギニン残基をアラニンに変異させると、RNA に対する結合親和性が著しく低下する(59)ことから、R162 は RNA との直接的な結合制御に深く関わるアミノ酸残基であると考えられる。一方で S165 は、RNA との直接的な結合制御とは関係が無く、自身のリン酸化状態が NP の多量体形成の制御に強く関わっていることが報告されている(53)。また NP-NP 間の結合制御に関して、従来から報告されていた tail loop 結合ポケットとは異なる NP-NP 相互作用のモデルが Δ 402-429 NP 変異体の X 線結晶構造解析結果により示された(23)。新たに示された相互作用モデルでは、149-167 位と 482-498 位のアミノ酸残基が NP-NP 間の結合に関与していることが示されている。その中でも、Y487 に変異を導入すると、NP-NP 間の結合力の低下による vRNA の転写及び複製が抑制されることが報告されている(23)。実際、RK424 は直接 NP-NP 及び NP-RNA の結合阻害により NP の多量体形成を抑制し、vRNA の合成を阻害する。これらの結果は、R162、S165 及び Y487 依存的な NP の機能阻害によって引き起こされる結果と強い相関性があることを示している。

NP の多量体形成により核内で再構成される vRNP は NS2/NEP 及び M1 と結合し、核外へと輸送される。最近の研究報告によると、NES を有する NP は vRNP の主構成要素であるため、NP の核外移行と vRNP の核外移行は密接に関係していることが報告されている(25,41)。NP はその配列中に 3 つの異なる機能的な NES (アミノ酸 24-49 位 (NES1)、183-197 位 (NES2)及び 248-274 位 (NES3)を有することが報告されているが、NP の核

外移行に本質的に機能しているのは NES3 を介した CRM 依存的な経路であることが報告されている(52)。特に NES3 配列中の 2 つの疎水性アミノ酸残基 L264 及び L266 は、NP の核外移行、NP と CRM1 との結合、及びウイルスの複製に重要であることが報告されている(43)。実際、CRM1 の阻害剤である LMB 処理により、NP の核外移行が阻害されることから NP の核外移行が CRM1 依存的であることが示されている。LMB は CRM1 の S528 と非可逆的に結合し、NP と CRM1 の結合を阻害することで NP の核外移行を阻害する(60)。一方、RK424 と NP の結合モデルでは、RK424 は核外移行に必須な L264 と結合しながら部分的に NES3 を覆うように NP と結合している(図 19,22)。このモデルを基に考察すると、RK424 は同定したポケット構造に結合することで、CRM1 と NES3 の結合を阻害し、NP の核外移行を阻害することが十分に考えられる。また、LMB と CRM-1 との結合が非可逆的な結合であるため、LMB 処理により強い細胞毒性が認められるが、RK424 は NES3 との部分的な結合のため、LMB よりも低い細胞毒性を示すことが考えられる。

新薬の開発にあたり、予め起こりうるオフターゲット効果を予測することは重要な検討事項である。創薬標的として有望であるか判断するために、標的のポケット構造が既知の宿主タンパクが有するポケット構造と比較し、その構造がどの程度特異的であるかを推測することが可能である。標的分子が宿主由来の分子に対して高い相同性を示す場合、細胞毒性を生じる危険性が高まるため、そのような分子は創薬の標的として適切ではないと考えられる。同定した NP ポケットは PDB 上に登録されているいずれのタンパクに対しても相同性を示さなかったのに対し、新たな創薬候補として注目を浴びている PA のエンドヌクレアーゼ活性を有するポケット構造は、いくつかの宿主タンパクに対して高い相同性を示した。以上の結果は、NP のポケット構造は非常に特異的であり、オフターゲット効果による副作用リスク回避の面から、より有望は創薬ターゲットであることを示している。

近年、NP を標的とした複数の低分子化合物が報告されており、新薬開発のための候補化合物として注目を集めている。しかし、核内移行阻害剤や塩橋阻害剤は多機能タンパクで

ある NP の単一の機能のみしか阻害しないため、 μM オーダーの弱い抗ウイルス活性しか認められなかった(29-31)。一方で、凝集誘導により NP の機能を包括的に阻害する Nucleozin は nM オーダーの非常に強い抗ウイルス活性を示した(31,32)。これらの結果は、複数の機能を同時に阻害するような NP 阻害剤を設計することが強い抗ウイルス活性を発揮するためには効果的であることを示している。しかし、Nucleozin のような多機能阻害剤であっても、その結合標的部位のアミノ酸の保存率が低く、機能的な制約を受けない場合は、容易に耐性ウイルスが出現する可能性が高いと考えられる(32,61)。RK424 は NP の複数の機能を阻害し、季節性や高病原性トリインフルエンザウイルス株を含む非常に多くの亜型を有する A 型インフルエンザウイルス株に対して強い抗ウイルス活性を示す。これらの結果は、RK424 が亜型の異なるウイルス間で保存された領域を標的としていることを強く示唆している。本研究においても Nucleozin 耐性ウイルスが容易に出現することを確認したが、RK424 耐性ウイルスの出現を確認することは出来なかった。これは、RK424 の結合サイトとして想定されるアミノ酸部位にそれぞれアラニン変異を導入した R162A、S165A、L264A 及び Y487A 変異体ウイルスではウイルス複製能を失う結果と相関しており、RK424 はウイルス複製に必須な過程を阻害していると想定される。NP-RNA 間の結合及び NP の核外移行は、ウイルスゲノムパッケージングに必要な過程であるため、RK424 処理による阻害効果の結果、ウイルス粒子中にゲノム RNA を欠損した不感染性粒子が多数產生されている可能性が考えられる(図 31C)。

RK424 は *in vitro* での抗ウイルス活性に加え、*in vivo* においても抗ウイルス活性を発揮した。しかし、RK424 投与群の感染 6 日後マウス肺では、ウイルス量の顕著な減少が認められたのにもかかわらず、感染後 14 日目までの RK424 投与群のマウス体重減少及び生存率の回復はわずかであった。これは、RK424 投与期間に減少したウイルスが、投与中止後再び増殖してしまったことが原因として考えられる。同じような現象がウイルスポリメラーゼの阻害薬 T-705 を用いた試験でも確認されている(62)。T-705 を用いた動物試験では、

50 mg/kg 用量の T-705 を 5 日間投与後、感染 6 日後の肺において顕著なウイルス量の減少が認められているが、生存率の回復はわずか 20%ほどしか認められなかった。これらの結果は、薬物投与中止後に減少したウイルスが、薬物投与中断後に再び生体内で増殖したためだと報告されている。また、*in vivo* 薬効評価で認められた限定的な抗ウイルス効果は、RK424 の高い脂溶性が一つの要因として考えられる。化合物の脂溶性は、溶解性、吸収性、安定性などの薬物動態に関与するパラメーターに影響するため、重要な物性である(63)。生体内では、血漿タンパクに結合していない血漿タンパクフリーの薬物のみが細胞膜を通過し、組織に浸透して薬効を発揮するため、少なくとも血漿タンパクフリーの薬物濃度が有効血中濃度に達していることが必要である。RK424 の PB(血漿タンパク結合率)は 99.6%であることから、血中濃度の内、わずか 0.4%のみがフリー体として存在することとなる。実際、腹腔内投与時の RK424 の $C_{max}=39200$ ng/mL は *in vitro* での抗ウイルス活性 IC_{50} ($0.5 \mu M=162.7$ ng/mL)を示す濃度の 200 倍以上高い値を示すが、PB を考慮したフリー体の濃度は $C_{free\ max}=156.8$ ng/mL であり、*in vitro* の IC_{50} よりもわずかに低い値となる。本研究で行った薬物投与計画では、一日二回腹腔投与を行っているため、フリー体の RK424 血中濃度が IC_{50} ($0.5 \mu M=162.7$ ng/mL)付近の濃度には達していると考えられるが、*in vivo* で認められる薬効は非常に弱い。これは、*in vivo* で十分な効果を示すためには、 IC_{50} ほどの薬物濃度では不十分であり、 IC_{90} ($1.2 \mu M=390.5$ ng/mL) 程度の高い血中濃度を必要とすることが考えられる。10 mg/kg 用量の RK424 腹腔内投与下では、フリー体の血中濃度は IC_{90} 濃度まで達していないが、RK424 の溶解性が低いため、これ以上濃度を高く設定して投与することが出来なかった。経口投与では溶解性が低くとも、溶媒に懸濁させて高用量で薬剤の投与が可能であるが、代謝の影響を受けるため、腹腔内投与よりもバイオアベイラビリティが腹腔内投与よりも低くなる。そのため、フリー体の濃度を IC_{90} ($1.2 \mu M=390.5$ ng/mL) に近い値になるように血中で維持するためには、100 mg/kg 用量の RK424 を一日に複数回投与する必要があるため現実的ではない。また、RK424 の V_d (分布

容積)=583mL/kg はマウスの総体液量 (725 mL/kg)よりも低く、組織浸透性が低いため、標的組織での薬物吸収効率が低いことが予想される(64)。以上の結果より、RK424 の薬物動態パラメーターは *in vivo* で十分な薬効を発揮するためには不適切であり、化合物の構造変換による物性の向上と薬物動態パラメーターの改善が求められる。

本研究成果から、NP を標的とした抗ウイルス薬の開発に向けて 2つのアプローチをとることが可能である。1つ目は、RK424 をリード化合物とした構造最適化によって薬物動態パラメーターを改善し、*in vivo* で有効な抗ウイルス活性を示す化合物を獲得することである。2つ目は、RK424 によって同定された結合ポケットを基にした structure based drug design による薬剤の開発である。同定した NP ポケット構造を構成するアミノ酸配列は保存性が高いことに加え、POSSSUM や ProBis による空間類似性検索の結果が示すように、宿主タンパクが有するポケット構造と比較して非常に特異的なポケット構造を有していることが分かる。以上の結果は、同定したポケット構造に特異的な化合物を設計することで、宿主タンパクへのオフターゲット効果を引き起こすことなく、インフルエンザウイルス NP タンパクに高い特異性を有する阻害剤を開発することが出来る可能性を示している。既存の抗ウイルス薬である NA 阻害薬が structure based drug design により開発され、功を奏しているように、我々が同定した NP ポケットに対しても同様なアプローチをとることで、NP の複数の機能を同時に阻害可能な画期的な新規抗ウイルス薬の開発が期待される。

第2章 NP-Nuclear export signal (NES) 3を標的とした阻害剤探索

2-1. 緒言

vRNPの主要構成要素であるNPは、その配列中にNLS及びNESを有し、vRNPの核内外への移行や転写・複製の制御に関わっていることが報告されている(25,65,66)。近年NPのNLSを標的とした核内移行阻害剤として天然物化合物由来化合物であるmycalamid A誘導体が報告された(29)。本化合物は、NPのNLS配列を標的とし、ケミカルアレイによるスクリーニングにより同定された化合物mycalamidAの誘導体であり、A型インフルエンザウイルス株に対して抗ウイルス活性を示すことが報告されている。また、ウイルス感染細胞を用いた化合物ライブラリースクリーニングによって我々が同定した化合物RK424は、NPが有する3つのNES配列(NP-NES1;

E24-L49、NP-NES2;V183-I197、NP-NES3;P248-S274)の内、NES3配列を含むNP特有のポケット構造に結合し、NPの核外移行阻害作用と共に強い抗ウイルス活性を示すことを明らかにした(67)。

A型インフルエンザウイルスは、NP、M1、NS1、及びNS2から成る4つのウイルスタンパク中に、7つのNESを有することが報告されている(25,68,69,70)。これら7つ全てのNES配列に変異を導入し、リバーズジェネティクス法による変異ウイルス産生実験を行ったところ、NPのNES3に変異を導入した場合のみ、ウイルス増殖が認められなくなることが報告されている(43)。また、NPの核外への移行はchromosome region maintenance 1 (CRM1)非依存的な経路で輸送されるNP-NES1及びNP-NES2への変異導入によっては阻害が認められないのに対し、CRM1依存的な経路で輸送されるNP-NES3に変異を導入した場合のみ核外への移行が強く阻害されることが示されている。以上の結果から、NP-NES3はNPの核外移行及びウイルス複製に必須な役割を果たしており、NP-NES3は創薬の標的として非常に有望であると考えられる。CRM1阻害剤であるLMBはCRM-1とNP-NES3の結合を阻害することで抗ウイルス活性を示すことが報告されてい

る(44)。しかしながら、LMBはCRM1の528位のシステイン(C)に非可逆的に結合することから強い細胞毒性を示すため、治療薬としての開発は困難である(60)。そのため、CRM1-NP-NES3間の結合を阻害し、NPの核外移行を阻害する新規阻害剤の探索は、新規抗インフルエンザウイルス薬の開発に向けて非常に有望なアプローチであると考えられる。そこで本研究では、NP-NES3を標的とした新規核外移行阻害剤を探索するため、緑色蛍光タンパクである *Aequorea coerulea* green fluorescent protein(AcGFP)をNP-NES3配列に付加した融合タンパク質 AcGFP-NES3 を恒常的に発現する MDCK 細胞株を樹立し、AcGFP-NP-NES3の核外移行を指標とした high throughput screening (HTS)評価系の確立と新規核外移行阻害剤の探索を行った。

2-2. 材料と方法

細胞培養、トランスフェクション、抗体

Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞は、10% FBS および Pen-Strep Glutamine 添加 DMEM にて培養した。プラスミドの導入には Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社製) を使用した。一次抗体として抗 NP モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社製)、二次抗体としてゴート 抗マウス IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen 社製)を使用した。

化合物

化合物ライブラリーは東京大学創薬イノベーションセンターより提供いただいた。LMB、Oseltamivir phosphate 及び T-705 は Sigma 社、Kemprotec 社及び PharmaBlock 社よりそれぞれ購入した。

プラスミド

pAcGFP1-Hyg-N1 ベクター (TakaraBio 社製)にコードされている AcGFP の遺伝子配列を Prime STAR Max DNA Polymerase (Takara Bio 社製)と下記のプライマーを用いて PCR により増幅した。下線部に制限酵素認識配列を記した。

Sall-AcGFP (F); 5'-TATGTTCGACGATGGTGAGCAAGGGCGCCGA-3'

ApaI-AcGFP (R); 5'-ATAGGGCCCGCTTGTACAGCTCATCCATGC-3'

PCR により増幅した遺伝子配列を pAcGFP1-Hyg-N1 のマルチクローニングサイト中にある Sall 及び ApaI サイトにクローニングした。また、pAcGFP1-Hyg-N1 ベクターに予めコードされている AcGFP 遺伝子配列を AgeI 及び NotI サイトで制限酵素処理することで取り除いた。調製したプラスミドを AcGFP1-Hyg-C とした。AcGFP1-Hyg-C は、AcGFP の C 末端側に AgeI 及び NotI サイトで任意の配列を挿入可能である。NP/pCAGGS は東京大学大学院医科学研究所ウイルス感染分野河岡義裕教授より分与していただいた。

AcGFP の C 末端領域に AcGFP を付加した AcGFP-NP 発現プラスミドは、NP/pCAGGS を鋳型として下記のプライマーを用いて増幅した NP 配列を pAcGFP1-Hyg-C の Age1 及び Not1 サイトに挿入することにより作成した。下線部に制限酵素認識配列を記した。

AgeI-NP (F); 5-TAACCGGTCGCGACCAAAGGCACCAAACG-3,

NotI-NP(R); 5-TAGCGGCCGCTTAATTGTCGTACTCCTCTG-3,

AcGFP の C 末端側に任意の NES 配列を融合した AcGFP-NES 融合タンパクを発現するプラスミド pAcGFP1-Hyg-C/AcGFP-Rev-NES、pAcGFP1-Hyg-C/AcGFP-NP-NES3co 及び pAcGFP1-Hyg-C/AcGFP-NP-NES3 は、下記に示すプライマーセットを 90°C で 15 分間反応後、室温に冷めるまで静置し、アニーリングさせたものをインサートとして使用した。

NP-NES3co-(F); 5-CCGGTCGAAGATCTCATCTTTTTAGCACGGTC-TGCAC
TCATATTGAGAGGGTAAGC-3,

NP-NES3co-(R); 5-GGCCGCTTACCCTCTCAATATGAGTGCAGACCGTGCT
AAAAA-GATGAGATCTTCGA-3,

NP-NES3-(F); 5-CCGGTCCCAGGAAATGCTGAGTTCGAAGATCTCATCTT
TTTAGCACGGTCTGCACTCATATTGAGAGGGTCAGTTGCTCACAAGTCCTAAGC-3,

NP-NES3-(R); 5-GGCCGCTTAGGACTTGTGAGCAACTGACCCTCTCAATA
TGAGTGCAGACCGTGCTAAAAAGATGAGATCTTCGAACTCAGCATTTCTGGGA-3,

Rev-NES-(F); 5-CCGGTCCTTCTCTACCACCGCTTGAGAGA-CTTACTCTT
GATTGCTAAGC-3,

NP-NES3-(R); 5-GGCCG-CTTAGCAATCAAGAGTAAGTCTCTCAAGCGG
TGGTAGAGGAAGGA-3

アニーリング後のインサートを pAcGFP1-Hyg-C の Age1 及び Not1 サイトに挿入し、ライゲーション反応により連結した。

作成した全てのプラスミドについて、理化学研究所脳科学総合研究センター生体物質分析支援ユニットにて配列解析し、GENETYX ver.10.0.0 (GENETYX Corporation 社製)にてアライメント解析することで目的の遺伝子を発現するプラスミドがベクターに導入されていることを確認した。

免疫染色法による細胞内 NP の局在解析

MDCK 細胞(2×10^5 個)を 24 ウェルプレート(Nunc 社製)に播種し、10%FBS/DMEM 培地中で 37°C、24 時間培養した。培養後、HeLa 細胞に NP /pCAGGS をトランスフェクションし、37°C で 48 時間培養した。培養後、4%パラホルムアルデヒドで 20 分間室温固定し、0.1% Triton-X 100/PBS で膜透過処理を行った。膜透過処理後、一次抗体として抗 NP モノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology 社製)を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488-抗マウス IgG 抗体(Invitrogen 社製)を用いて室温で 1 時間反応させた。PBS 洗浄後、hoechst 33342 を室温で 5 分間反応させ、核を染色した。調製した観察用サンプルを共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000D, Olympus 社製) 用いて NP の細胞内局在を観察した。

AcGFP-NP-NES3 の核外移行を標的とした HTS 評価系の確立と新規核外移行阻害剤の探索

AcGFP-NP-NES3 恒常発現 MDCK 細胞(NES3-MDCK)を 96 ウェルプレート(Nunc 社製)に播種(1×10^4 個)し、10%FBS/DMEM 培地中で 37°C、24 時間培養した。培養後、NES3-MDCK 細胞に、9600 個の化合物ライブラリーを 10 μ M となるように添加し、DMSO 及び 10 nM LMB をそれぞれ陰性および陽性対照コントロールとなるように添加した。さらに 8 時間培養後、4%パラホルムアルデヒドで 20 分間室温固定し、PBS 洗浄後、hoechst 33342 を室温で 5 分間反応させ、核を染色した。調製した細胞培養プレートを CELAVIEW

RS100 (Olympus 社製)にセットし、hoechst 33342 で染色された核の輪郭を main-object として認識し、その内側の一定領域を sub-object として認識するように設定を行った。核内の sub-object 領域の AcGFP 平均蛍光強度を測定し、陽性対照コントロールである LMB 処理細胞に対する試験化合物処理細胞の sub-object における AcGFP 平均蛍光強度を算出し、相対的核外移行阻害率として試験化合物の核外移行阻害活性を評価した。また、化合物評価の精度管理として、評価プレート毎に Z' factor を算出した。Z' の値が 0.5 以上を示したものを採用し、Z' の値が 0.5 未満であったものは、再評価を行った。また、試験化合物処理サンプルの内、細胞数が 1000 未満であったものは評価対象から除外した。

プラーク形成阻害試験

MDCK細胞(5×10^5 個)を6ウェル培養プレート(Nunc社製)に播種し、10%FBS/DMEM培地中で37°C、24時間培養した。培養後、細胞をPBSで洗浄し、0.3% bovine serum albumin (BSA)/minimum essential medium (MEM)にてMOI=0.008に調製したA/WSN/1933 (H1N1)ウイルス液を37°Cにて1時間接種した。その細胞をPBSにて3回洗浄し、種々の濃度に調製した化合物と0.3% BSA/MEM、1% agarose 及び1 μ g/ml TPCK-treated trypsin の混合液2mlにて感染細胞を覆い、37°C、48時間培養した。48時間培養した細胞を0.1% crystal violet (Wako社製)にて染色し、プラーク数をカウントした。DMSOを処理した細胞でカウントされたプラーク数に対して、50%のプラーク形成阻害効果を示す化合物濃度を Half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀)として算出し、抗ウイルス活性を評価した。

Water soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) アッセイ

MDCK細胞(1.0×10^5 個)を96ウェルプレート(Nunc社製)に播種し、種々の濃度に調製した化合物と共に10% FBS/DMEM中にて37°Cで48時間培養した。その後、培養後の各ウェルに10 μ lのWST-1試薬を添加し、0.5~1.0時間培養した。培養後のプレートをWallac

ARVO.SX 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer社製) にて450nmにおける吸光波長を測定し、DMSO処理を行った細胞に対する試験化合物を処理した細胞の吸光度を基に、CC₅₀を算出した。

統計解析

平均値の差の検定には t 検定を用いた。有意確立 p value < 0.05 のとき統計学的に有意差があるものとした。ライブラリー化合物評価時の精度管理として Z' factor を下記の式により算出した。

$$Z' = 1 - \frac{3 \times \text{陽性コントロール (LMB) の標準偏差} + 3 \times \text{陰性コントロール (DMSO) の標準偏差}}{(\text{陽性コントロール (LMB) の平均値} - \text{陰性コントロール (DMSO) の平均値})}$$

Z' factor \geq 0.5 で評価結果を採用し、Z' < 0.5 となったプレートについては再評価を行った。

2-3. 結果

AcGFP-NP-NES3 融合タンパクの発現コンストラクト作成と細胞内局在の解析

はじめに、NP の細胞内局在を簡便に観察可能にするため、緑色蛍光タンパク AcGFP の C 末端側に NP の全長配列を付加した融合タンパクを発現するプラスミドを構築し、その細胞内局在を観察した(図 33A-B)。その結果、AcGFP を付加していない NP は細胞質に局在を示したのに対し、AcGFP-NP 融合タンパクは AcGFP のみを発現させた場合と同様に、核に強い局在を示した。これらの結果は、AcGFP-NP は本来の NP の局在を反映していないことを示している。先行研究により、GFP に NES のコンセンサス配列のみを付加することで、NES による GFP タンパクの核外への移行が認められ、細胞質に局在が観察されることが報告されている(72)。また、NES のコンセンサス配列は $\phi 1 X_{2-3} \phi 2 X_{2-3} \phi 3 X \phi 4$ (ϕ は L、I、V 又は M、X は任意のアミノ酸残基)で規定されることが報告されている(73)。そこで、AcGFP の C 末端側に NP のコンセンサス配列(${}_{256}\text{LIFLARSALIL}_{266}$)を付加した融合タンパク AcGFP-NP-NES3co を作製した。加えて、NP-NES3 の全長配列(248–274 位 アミノ酸)を同じく AcGFP の C 末端領域に付加した融合タンパク AcGFP-NP-NES3 を発現するプラスミドを作製した。また比較対象として、強い核外移行能を有する human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-Rev-NES を AcGFP の C 末端側に付加した融合タンパク AcGFP-Rev-NES を発現するプラスミドを作製した(74)。作成した NES 融合タンパクを一過性に MDCK 細胞内に発現させたところ、HIV-1-Rev-NES 同様、AcGFP-NP-NES3co 及び AcGFP-NP-NES3 は細胞質に強く局在を示すことが確認された。しかしながら、蛍光強度は AcGFP-NP-NES3co よりも AcGFP-NP-NES3 の方が強く認められたため、細胞内局在の変化を指標にした薬剤スクリーニング系構築のため、より蛍光強度の強い AcGFP-NP-NES3 を採用することとした。

次に、AcGFP-NES3 の核外移行阻害剤に対する感受性を評価するため、既知の核外移行阻害剤である LMB に対する核外移行阻害効果を評価した(図 34)。その結果、LMB の濃度

依存的に AcGFP-NES3 の局在が核に集積し、細胞質への局在が抑制されることが確認された。

AcGFP-NP-NES3 融合タンパク恒常発現細胞株の樹立

一過性発現による AcGFP-NP-NES3 融合タンパクの発現のバラつきを抑えるため、AcGFP 及び AcGFP-NP-NES3 を恒常的に発現する細胞株の樹立を試みた。AcGFP および AcGFP-NP-NES3 を発現するプラスミドを MDCK 細胞にトランスフェクションし、pAcHyg ベクター上にコードされている Hygromycin 耐性遺伝子による選択を行うため、G418 含有培地で培養を行い、限界希釈法によりクローニングを行った。樹立した細胞株の AcGFP および AcGFP-NP-NES3 の細胞内局在を確認したところ、一過性発現時と同様に AcGFP は核内に、AcGFP-NP-NES3 は細胞質に強く局在することが確認された(図 35A)。また恒常発現株中の AcGFP-NP-NES3 の LMB に対する感受性を確認したところ、一過性発現時と同様に LMB の濃度依存的に AcGFP-NP-NES3 の核内への集積と細胞質への局在が抑制されることを確認した(図 35B)。また、AcGFP 及び AcGFP-NP-NES3 の恒常発現による細胞増殖に対する影響について、外来遺伝子をトランスフェクションしていない親株と比較評価したところ、細胞増殖に大きな差は認められなかった(図 36)。以上より、樹立した AcGFP-NP-NES3 恒常発現株(NES3-MDCK)は、AcGFP-NP-NES3 の蛍光シグナルの局在変化を指標にした核外移行阻害剤の探索に有用であると考えられる。

AcGFP-NP-NES3 の核外移行を標的とした HTS 評価系の確立

NP-NES3 を介した核外移行阻害を標的とした阻害剤を探索するため、核内の AcGFP の平均蛍光強度を自動蛍光測定装置 CELAVIEWRS100 により解析し、評価系の構築を検討することとした。まず、樹立した恒常発現細胞株中の AcGFP に対する AcGFP-NP-NES3 の核内蛍光強度の変化を定量的に評価するため、hoechst33342 により染色した核の輪郭

(main-object)から一定距離内側の輪郭(sub-object)を測定領域として定め、CELAVIEW RS100により核内 AcGFP 平均蛍光強度を測定した(図 37A)。その結果、AcGFP の核内平均蛍光強度は AcGFP-NP-NES3 の核内平均蛍光強度に比較して 3 倍以上高い値が得られることが分かった(図 37B)。そこで、AcGFP に NP-NES3 を付加したことで得られた核内蛍光強度の変化が、核外移行阻害剤の評価に十分であるか検討するため、陽性コントロールとして核外移行阻害剤である LMB、陰性コントロールとして既存抗ウイルス薬である Oseltamivir 及び T-705 を用いて、核内 AcGFP-NP-NES3 の平均蛍光強度の変化を CELAVIEW RS100 により定量解析し、多検体評価系の評価精度を確認するため、signal-to-background(S/B)比及び Z' factor の算出を行った(図 38)。その結果、Oseltamivir 及び T-705 処理細胞では、核内 AcGFP-NP-NES3 の平均蛍光強度の大きな変化が認められないのに対し、LMB 処理細胞では、核内 AcGFP-NP-NES3 の平均蛍光強度が強く上昇することが明らかになった。また、LMB 処理時の S/B 比は 2.59、Z' factor は 0.68 となり、スクリーニング系構築の際に求められる基準値(S/B \geq 2、Z' \geq 0.5)を満たすことが示された(75)。

AcGFP-NP-NES3 の核外移行を標的とした新規核外移行阻害剤の探索

構築したスクリーニング系を用いて、東京大学が保有するコア化合物ライブラリー9600 化合物の核外移行阻害活性を評価した結果、40 化合物がヒット化合物として同定された(図 39A)。また、同定したヒット化合物について細胞毒性試験を行った結果、100 μ M 濃度において 10 化合物が 50%以上の細胞生存率を示した(図 39B)。この内細胞毒性が低かった 6 つの化合物について、AcGFP-NP-NES3 に対する強い核外移行阻害作用を確認した(図 40A)。またこれら 6 つの化合物について抗ウイルス活性を評価したところ、化合物 DP2392-E10 について抗ウイルス活性を確認した(図 40B-D)。以上より、NP-NES3 を介した核外移行阻害は、新規抗インフルエンザ薬開発の新たな標的となり得ることが示された。

2-4. 考察

我々が第1章で報告した化合物 RK424 は、NP 特有のポケット構造に結合し、NP-NES3 及び CRM1 間の結合を阻害することで NP の核外移行を阻害し、強い抗ウイルス活性を示すことを報告した(67)。これらの知見は NP-NES3 が新規抗ウイルス薬開発の有望な標的であることを示している。しかしながら、NP-NES3 を標的とした阻害剤探索のための HTS 評価系については、現在までに報告されていない。本研究において、我々は AcGFP-NP-NES3 恒常発現株を用いて、NP-NES3 を標的とした HTS 系を確立し、NP-NES3 を標的とした複数の阻害剤の獲得に成功した。確立した方法ではウイルス感染、プラスミドを導入、免疫染色といった過程を必要とせずに、NP-NES3 依存的な核外移行を阻害する化合物の評価が可能である。また核外移行阻害効果は、薬剤処理後 12 時間以内に確認されるため、効率よく簡便に化合物ライブラリーのスクリーニングが可能である。さらに確立した HTS 評価系は、任意の NES 配列を AcGFP に組み込むことにより、ウイルスタンパクを始めとした様々なタンパクの核外移行を標的とした阻害剤の獲得が可能であると考えられる。

NP-NES3 を標的として構築した HTS 評価系を用いて核外移行阻害剤の探索を行ったところ、既知の核外移行阻害剤である LMB とは異なる化学構造式を有する核外移行阻害剤を複数取得することが可能であった。取得したこれらの核外移行阻害剤は、AcGFP-NP-NES3 の核外への移行を阻害し、LMB よりも低い細胞毒性を示した。さらに抗ウイルス活性を評価したヒット化合物の内、DP2392-E101 は最も強い抗ウイルス活性を示すことが明らかになった。しかしながら、DP2392-E101 による NP-NES3 を介した核外移行阻害機序についてはより詳細な作用機序の解明が求められる。

ウイルスタンパクの核外移行の過程は、nucleoporin をはじめとする様々な宿主因子により制御されていることが分かっている。第1章で示したように、NP の核外移行は NP-NES3 のコンセンサス配列と CRM1 との結合により制御されていることが報告されているが、

NP-NES3 に変異を導入するだけでは NP の核外移行が完全に抑制されないため、CRM1 とは別に異なる宿主因子が NP の核外移行に関与していることが想定される。NP を主構成要素とする vRNP の核外移行に関与する宿主因子については、HSP70 及び CHD3 がそれぞれ M1 及び NEP-NES1 と相互作用し、vRNP 核外移行の制御に関与することが報告されている(76,77)。またその他にも、TAP、NXF1、NTF2、NXT1、Rae1 及び E1B-AP5 といった細胞内 mRNA 核外移行因子が NS1 と相互作用し、RMB15B、DDX19B といった宿主因子がウイルスポリメラーゼと結合することで、vRNP 核外移行制御との関連性がそれぞれ指摘されている(78,79)。事実最近の報告では、細胞内 mRNA 核外移行因子 NXT1 が NP 及び CRM1 と直接結合し、NP の核外移行とウイルス複製の制御に関与していることが示されていることから、上述した宿主因子が NP と直接相互作用し、その核外移行を制御している可能性も考えられる(80)。そのため、我々が同定した核外移行阻害剤の作用機序をより詳細に解明するためには、標的分子が NP-NES3 配列そのものであるか、または宿主側の因子を標的としているかを明らかにすることが先決であると考えられる。

本研究成果により、NP-NES3 を標的とした阻害剤が NP-NES3 依存的な核外移行を阻害し、抗ウイルス活性を示すことが立証された。以上の結果より、NP-NES3 依存的な核外移行阻害剤が抗ウイルス薬開発の新たな標的と成り得ることが示された。

第3章 NP-intrinsically disordered region (IIDR) 2 の機能解析

3-1. 緒言

天然変性タンパク (Intrinsically disordered proteins ;IDPs) 及び天然変性領域 (intrinsically disordered regions; IDRs) を有するタンパクは、電荷や疎水性に富んだアミノ酸配列から構成される特徴的な性質を有するタンパクであり、これらのアミノ酸配列は、アミノ酸配列の折り畳みを阻害し、安定した立体構造を形成せずに、構造の定まらない柔軟な状態で存在していることが知られている(81)。IDPs や IDRs は、標的分子と一度結合するとその柔軟な構造から特定の安定した構造をとるが、多くの場合その安定性は極めて低く、再び柔軟な構造へと戻る。これらの性質は、状況に応じて自身の構造を変化させることで、配列の異なる様々な標的分子と結合することを可能にする。例えば、IDR として存在する p53 分子の C 末端領域は、4 つの異なる標的分子と結合可能であり、結合相手に応じて異なった構造を形成することが報告されている(81)。IDPs や IDRs の多くは、細胞内シグナルや重要な細胞内反応の制御に関わることから、生体内において機能的な役割を果たしており、病態の発症とも深く関わりがあることが報告されている。そのため、IDPs や IDRs は新たな治療薬開発のターゲットとしても注目を集めており、既にこれらを標的とした阻害剤も複数報告されている(82)。IDPs や IDRs は、真核細胞のタンパクだけではなく、ウイルスタンパクにおいても数多く存在し、多くの宿主タンパクとの相互作用を介して、その機能を制御することで宿主の細胞内環境に効率よく適応している(83)。A 型インフルエンザウイルスの NP は RNA 結合性を示す塩基性タンパクであり、RNA 結合領域にはアルギニンやリシン等の負に荷電したアミノ酸残基が数多く存在する(20)。NP は 3 つの polymerase subunits (PB2、PB1 及び PA) 及び vRNA と共に vRNP の基本骨格を構成し、ウイルスゲノムのパッケージング、vRNA の転写・複製、及び vRNP の核内外への輸送制御など多くの機能制御に関与することが報告されている(84)。NP の立体構造は X 線結晶構造解析により明らかにされているが、電子密度が低く、構造が不明瞭な IDR であると推

測される領域を3つ有している(20)。これら3つのIDRはそれぞれNPの核内移行(IDR1)、RNA結合(IDR2)、及びNP-NP間の相互作用(IDR3)に関わる機能制御に関与していることが報告されている(20)。中でも、RNA結合領域中に存在する塩基性アミノ酸に富んだ配列により構成されるIDR2(72-DEERRNKYLEEHPSAGKDPKKT-92)については、その生物学的重要性について不明なところが多く、未だ明らかにされていない。本研究ではIDR2がRNA結合領域に位置することから、ウイルスゲノムRNAの機能制御を中心に、NP IDR2の機能解析を行った。

3-2. 材料と方法

細胞培養、トランスフェクション、抗体

Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞および human embryonic kidney 293T (HEK293T)細胞は、10% FBS および Pen-Strep Glutamine 添加 DMEM にて培養した。プラスミドの導入には Lipofectamine 2000 または 3000 (Invitrogen 社製) を使用した。抗 WSN 血清は日本大学医学部感染症ゲノムセンター 清水一史教授より分与いただいた。Acti-stain 670 fluorescent phalloidin および cytochalasin D は Cytoskeleton 社 および Sigma 社よりそれぞれ購入した。精製 NP タンパク及び GST-PLC δ -PH タンパクは BL21 CodonPlus (DE3)-RIL 大腸菌株(Stratagene 社製)を用いた GST 融合タンパクとして発現させ、Glutathione Sepharose 4FF ビーズ (GE Healthcare 社製)システムを用いて精製を行った。精製した GST 融合タンパクは PreScission Protease (GE Healthcare 社製)を用いて GST タグを切断し、GST タグ切断後のタンパクを回収してアッセイに使用した。一次抗体として抗 NP モノクローナル抗体 (Abcam 社製)、抗 HA モノクローナル抗体 (GeneTex 社製)、抗 caveolin-1 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社製)、抗 PI(4,5)P₂ モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社製)、及び抗 β actin モノクローナル抗体 (Sigma 社製)、二次抗体として、horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated ゴート抗マウス IgG (Amersham Bioscience 社製)、HRP-conjugated ゴート抗ラビット IgG (Amersham Bioscience 社製)、ゴート抗マウス IgG Alexa Fluor 405 (Invitrogen 社製)、及びゴート抗マウス IgG Alexa Fluor 594 (Invitrogen 社製)を使用した。

プラスミド

NP/pHH21 及び NP/pCAGGS の内、任意のアミノ酸配列にアラニン変異を導入した変異体 NP 発現プラスミド(D72A, E73A, R74A, R75A, K77A, Y78A, E80A, P83A, G86A, K87A, D88A, P89A, K90A, K91A, 及び T92A)は、NP/pHH21 又は NP/pCAGGS を鋳型

とし、以下のプライマーと Prime STAR® Max DNA Polymeras(Takara 社製)を用いた PCR 反応により調製した。変異導入部位に下線を引いた。

プライマー：

D72A-(F); 5'-AGTGATCATGAGGGACGGCTGATTCAG-3',

D72A -(R); 5'-TCCCTCATGATCACTGAGTTTAAGTTC-3',

E73A -(F); 5'-GATCCCGCGATGTGCTCACTGATGCAG-3',

E73A-(R); 5'-GCACATTCGCGGGATCCATTCCTGTGCG-3',

R74A-(F); 5'-ATGTGCGCACTGATGCAGGGCTCAACC-3',

R74A-(R); 5'-CATCAGTGCGCACATCCTGGGATCCAT-3',

R75A-(F); 5'-TCTGCAGCCATATTGAGAGGGTCAGTT-3',

R75A-(R); 5'-CAATATTGGCTGCAGACCGTGCTAAAAA-3',

K77A-(F); 5'-AGTGGACACGACTTTGAAAGAGAGGGA-3',

K77A-(R); 5'-AAAGTCGTGTCCACTGGCTACGGCAGA-3',

Y78A-(F); 5'-TATCTAGCAGAACATCCCAGTGCGGGG-3',

Y78A-(R); 5'-TATCTAGCAGAACATCCCAGTGCGGGG-3',

E80A-(F); 5'-TATCTAGCAGAACATCCCAGTGCGGGG-3',

E80A-(R); 5'-TATCTAGCAGAACATCCCAGTGCGGGG3',

P83A-(F); 5'-ATGTGCGCACTGATGCAGGGCTCAACC-3',

P83A-(R); 5'-CATCAGTGCGCACATCCTGGGATCCAT-3',

G86A-(F); 5'-TCTGCAGCCATTATTGAGAGGGTCAGTT-3',

G86A-(R); 5'-CAATATTGGCTGCAGACCGTGCTAAAAA-3',

K87A-(F); 5'-AGTGGACACGACTTTGAAAGAGAGGGA-3',

K87A-(R); 5'-AAAGTCGTGTCCACTGGCTACGGCAGA-3',

D88A-(F); 5'-GGATCTGCTTTCTTCGGAGACAATGCA-3',

D88A-(R); 5'-GAAGAAAGCAGATCCTTCATTACTCAT-3',

P89A-(F); 5'-TCTGCAGCCATATTGAGAGGGTCAGTT-3',

P89A-(R); 5'-CAATATGGCTGCAGACCGTGCTAAAAA-3',

K90A-(F); 5'-AGTGGACACGACTTTGAAAGAGAGGGA-3'

K90A-(R); 5'-AAAGTCGTGTCCACTGGCTACGGCAGA-3',

K91A-(F); 5'-GGATCTGCTTTCTTCGGAGACAATGCA-3',

K91A-(R); 5'-GAAGAAAGCAGATCCTTCATTACTCAT-3',

T92A-(F); 5'-AAGAAAGCTGGAGGACCTATATACAGG-3',

T92A-(R); 5'-TCCTCCAGCTTTCTTAGGATCTTTCC-3'

HA/pCAGGS の内、HA の任意のアミノ酸配列にアラニン変異を導入(S534A, T535A, S538A, S539A)した変異体 HA 発現プラスミドは、HA/pCAGGS を鋳型とし、以下のプライマーと Prime STAR® Max DNA Polymeras を用いた PCR 反応により調製した。

プライマー配列中の変異導入部位に下線を引いた。

プライマー :

S534A-(F); 5' -AGTGATCATGAGGGACGGCTGATTCAG-3' ,

S534A -(R); 5' -TCCCTCATGATCACTGAGTTTAAGTTC-3' ,

T535A -(F); 5' -GATCCCGCGATGTGCTCACTGATGCAG-3' ,

T535A (R); 5' -GCACATCGCGGGATCCATTCCTGTGCG-3' ,

S538A-(F); 5' -ATGTGCGCACTGATGCAGGGCTCAACC-3' ,

S538A -(R); 5' -CATCAGTGCGCACATCCTGGGATCCAT-3'

PB2 のゲノムパッケージングシグナルと構造遺伝子として mRFP をコードするウイルゲノム RNA を発現する PB2-mRFP/pHH21 プラスミド及び NA のパッケージングシグナルと構造遺伝子として EGFP をコードするウイルスゲノム RNA を発現する EGFP/pHH21 プラスミドは、 PB2/HH21 及び NA/pHH21 プラスミドの PB2 及び NA の ORF 配列を

mRFP 及び EGFP の ORF 配列とそれぞれ任意の制限酵素サイトで切断し、配列を置換することにより作成した (27)。5-phosphat phosphatidylinositol polyphosphate 5 phosphatase type IV (5ptaseIV) と AcGFP 融合タンパク AcGFP-5ptaseIV を発現するプラスミドは以下のように作成した。5ptaseIV の構造遺伝子配列は HeLa 細胞ライゼートより調製した cDNA を鋳型として、5ptaseIV 特異的プライマーと KOD-Plus[®] (Toyobo 社製) を用いた PCR 法により増幅し、pAcGFP1 (Takara Bio 社製) ベクターにクローニングした。プライマー配列中の制限酵素認識配列に下線を引いた。

プライマー :

5phsphataseIV xho1-(F);

5'-TACTCGAGATGCCGTCCAAGGCGGAGAATCTGCGGCC3'

5phsphataseIV Not1-(R);

5'-TAGCGGCCGCTCAAGAAACGGAGCAGATGGTGCTGGAGT3'

PLC δ -PH と GST の融合タンパク GST-PLC δ -PH を発現するプラスミドは以下のように作成した。PLC δ -PH の構造遺伝子配列は mCherry-PLC δ -PH プラスミドを鋳型として、PLC δ -PH 特異的プライマーと KOD-Plus[®] (Toyobo 社製) を用いた PCR 法により増幅し、pGEX6p-3 (GE Healthcare 社製) ベクターにクローニングした。

プライマー配列中の変異導入部位に下線を引いた。

プライマー :

PLC δ -PH-EcoR1-(F); 5'-TATGAATTCATGGACTCGGGCCGGACTT-3',

PLC-PH-Xho1-(R); 5'-TATCTCGAGTCACTTCTGACGCTGGTCCATGG-3'

作成した全てのプラスミドについて、理化学研究所脳科学総合研究センター生体物質分析支援ユニットにて配列解析し、GENETYX ver.10.0.0 (GENETYX Corporation 社製) にてアライメント解析することで目的配列がベクターに導入されていることを確認した。

天然変性領域配列の予測

NP のアミノ酸配列及び立体構造は PDB (PDB code: 2IQH)より取得した。取得した NP のアミノ酸配列を用いて、DISOPRED server (85)にて天然変性領域配列の予測を行った。

Replicon アッセイ

HEK293T 細胞(2×10^5 個)を 24 ウェルプレート(Nunc 社製)に播種し、10%FBS/DMEM 培地中で 37°C 24 時間培養した。培養後、293T 細胞に PB2/pCAGGS、PB1/pCAGGS、PA/pCAGGS、NP/pCAGGS 及び PB2-mRFP/pHH21 または NA-EGFP/pHH21 を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、37°C で 48 時間培養した。NP の変異体評価の際は、野生型の NP を発現するプラスミドの代わりに、変異体 NP を発現するプラスミドを用いてトランスフェクションを行った。培養後の細胞を回収し、PBS で洗浄後、FACSCalibur (Becton-Dickinson 社製)で蛍光シグナルを発する細胞を測定し、CELLQuest software (Becton-Dickinson 社製)を用いて mRFP または EGFP を発現する細胞の割合を算出し、転写活性の評価を行った。

リバーシジェネティクス法によるリコンビナントウイルスの作成

MDCK 細胞 (4×10^5 個) と HEK-293T 細胞 (6×10^5 個)を 6 ウェルプレート(Nunc 社製)に播種し、37°Cで 24 時間共培養した。培養後、第 1~8 分節の vRNA 発現プラスミド (PB2/pHH21、PB1/pHH21、 PA/pHH21、 HA/pHH21、 NP/pHH21、 NA/pHH21、 M/pHH21 及び NS/pHH21)及び vRNP を構成するウイルスタンパクを発現するプラスミド(PB2/pCAGGS、 PB1/pCAGGS、 PA/pCAGGS 及び NP/pCAGGS)をトランスフェクションし、6 時間後に 1 μ g/mL TPCK-treated trypsin/0.03% BSA/ DMEM(-FBS)に培地を交換し、さらに 72 時間培養を行った。変異ウイルス作成の際には、野生型の NP をコードするプラスミドの代わりに、任意の配列に変異を有する NP 変異体をコードするプラスミドを

使用した。培養後の培養上清を回収し、ウイルス量をプラークアッセイにより定量した。

ウイルスゲノムパッケージングアッセイ

HEK-293T (1×10^6 個) 細胞を 6 cm dish(Nunc 社製)に播種し、37°Cで 24 時間培養した。培養後の細胞に第 1~8 分節のゲノム RNA 発現プラスミド(PB2/pHH21、 PB1/pHH21、 PA/pHH21、 HA/pHH21、 NP/pHH21、 NA/pHH21、 M/pHH21 及び NS/pHH21)及びウイルスタンパクをコードするプラスミド (PB1/pCAGGS、 PB2/pCAGGS、 PA/pCAGGS、 NP/pCAGGS、 NA/pCAGGS、 HA/pCAGGS、 NS2/pCAGGS、 M1/pCAGGS 及び M2/pCAGGS)を細胞にトランスフェクションし、37°Cで 48 時間培養した(26,86,87)。変異体 NP 評価の際は、野生型 NP をコードするプラスミドの代わりに、任意の配列に変異を導入した変異体 NP をコードするプラスミドを使用した。NP をコードする RNA を発現するプラスミドは、プラスミド導入細胞内で野生型 NP タンパクが発現しないように開始コドンを終止コドンに置換し、タンパクの発現が起こらないように改変した。また、レポーター遺伝子として PB2-mRFP または NA-EGFP をコードするプラスミドを PB2/pHH21 または NA/pHH21 プラスミドの代わりに使用した。プラスミド導入 6 時間後に、1 μ g/mL TPCK-treated trypsin/0.03% BSA/ DMEM(-FBS)に培地を交換し、さらに 72 時間培養を行った。培養後の細胞培養上清を回収し、回収した上清と共に A/WSN/1933(H1N1)ウイルス株をヘルパーウイルスとして MDCK 細胞に感染させ、37°Cで 16 時間培養した。感染培養後の細胞を回収し、PBS で洗浄後、FACSCalibur (Becton-Dickinson 社製)で蛍光シグナルを発する細胞を測定し、CELLQuest software (Becton-Dickinson 社製)を用いて mRFP または EGFP を発現する細胞の割合を算出し、ウイルスゲノムパッケージング効率の評価を行った。

大腸菌由来タンパク質の精製

100mLのLB培地に、野生型または変異体NPをコードする pGEX-6p-3 プラスミドと PLC δ -PH をコードする pGEX-6p-3 プラスミドをそれぞれトランスフォーメーションした BL21 CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene 社製)大腸菌株を別々に添加し、濁度を示す OD600 値が 0.8~0.9 になるまで 37°Cで振とう培養した。培養後、終濃度 1 mM にて isopropyl-b-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG; SIGMA 社製)を添加し、22°Cで 10 時間振とう培養した。培養後の大腸菌液を遠心分離し、ペレットを lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1% Triton X100, 1 mg/mL lysozyme, 0.15 mg/mL RNase A)で懸濁し、ソニケーションにより菌体を破碎した。破碎した菌体液を遠心分離し、回収した上清に Glutathione Sepharose 4 Fast Flow ビーズ (GSH ビーズ; GE Healthcare 社製)を加え、4°Cで一晩回転攪拌した。攪拌後、Lysis buffer でビーズを洗浄後、GST-PLC δ -PH が結合したビーズには、50mM のグルタチオンを添加し、ビーズから溶出した GST-PLC δ -PH タンパクをアッセイに使用した。GST-NP が結合したビーズには、PreScission buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.0)、150mM NaCl)と PreScission Protease (GE Healthcare 社製)を添加し、さらに 4°Cにて一晩回転攪拌を行った。攪拌後の上清を回収し、Heparin Sepharose 6 Fast Flow ビーズ (GE Healthcare 社製)を添加し、4°Cにて 2-3 時間回転攪拌後、ビーズを Wash buffer (0.5 M NaCl and 50mM Tris-HCl [pH 7.4])で洗浄し、Elution buffer (1.5 M NaCl and 50mM Tris-HCl [pH 7.4])にて NP タンパクをビーズから溶出し、上清を回収した。回収した精製タンパクを SDS-PAGE により分離し、coomassie brilliant blue (CBB) 染色にて NP の精製度を確認した。

Surface plasmon resonance (SPR)法 による NP と RNA および NP と PI(4,5)P₂ の結合実験

ビオチン修飾を施した 2-O-methylated RNA; 5-UUU GUU ACA CAC ACA CAC GCU GUG-3 (Hokkaido System Science 社製) または phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

diC8 (Echelon Biosciences 社製)を SA センサーチップ (GE Healthcare 社製)に固定化した。精製 NP タンパクをそれぞれのリガンドを固定化したセンサーチップ表面上に反応させ、SPR シグナルの変化を Biacore T-100 (GE Healthcare 社製)により測定した。NP と RNA との結合実験には Tris running buffer (200 mM NaCl、 20 mM Tris-HCl [pH 7.4]、 0.05% Tween 20)を、NP と PI(4,5)P₂ の結合には HBS running buffer (10 mM HEPES [pH 7.4]、 150 mM NaCl、 2% v/v glycerol、 0.1 mg/mL BSA) を running buffer として使用し、両者の結合を評価した。得られたデータは BIAevaluation software v. 4.1 (GE Healthcare 社製)により解析し、1:1 結合モデルに沿って結合速度定数、結合乖離定数、結合親和定数の算出を行った。

in vitro トランスクリプションによる vRNA の合成

約1027ntのA/WSN/1933(H1N1)ウイルス由来 第7分節ゲノムRNA をコードするプラスミド M/pHH21を鋳型とし、T7プロモーターと第7分節ゲノムRNA特異的な配列を含むプライマーを設計した。設計したプライマーとprime starmax polymerase を用いたPCR法により、ゲノムRNAをコードする配列を増幅した。得られたPCR産物をQIAquick PCR purification kit (Qiagen社製)を用いて精製した。5 μ gの精製PCR産物とtranscription buffer、rNTP mix (25 mM ATP, CTP, GTP and UTP)及びT7 enzyme mix (final volume 100 μ L)を混合し、37 $^{\circ}$ C で4 時間反応させた。反応後のサンプルに5 unitsのRQ1 RNase-Free DNase I (Promega社製)を添加し、さらに 37 $^{\circ}$ Cで15分反応させ、反応後のサンプルをアガロース電気泳動にて分離し、目的のサイズに合成したRNAが検出されるのを確認した。以下に使用したプライマー配列を記載する。プライマー配列中のT7 promoter 配列に下線を引いた。

T7_WSN_seg7-(F);5'-GACTCAGTTTAATACGACTCACTATATAGTTTTTTTAC

TCCAGCTCTATGTTG-3',

T7_WSNseg7-(R), 5'-AGCAAAAGCAGGTAGATATTG-3'

アミノ酸保存率の算出

ヒト、ブタ、トリ由来の A 型インフルエンザウイルスの NP アミノ酸配列を NCBI's Influenza Virus Resource より抽出した。抽出した配列を MAFFT (version 6) プログラムを用いて、アミノ酸配列の比較を行い、アミノ酸保存率を算出した。ヒト由来 NP ; 3,759 配列、トリ由来 NP ; 3,273 配列、ブタ由来 NP:651 配列を含めた計 7,683 配列の解析を行った。

蛍光免疫染色法

MDCK 細胞(2×10^5 個)を 12 ウェルプレート(Nunc 社製)に播種し、10%FBS/DMEM 培地中で 37°C、24 時間培養した。培養後、MDCK 細胞に NP /pCAGGS をトランスフェクションまたは A/WSN/1933 (H1N1)ウイルス株を MOI=1 で感染し、トランスフェクション時は 24 時間、ウイルス感染時は 8 時間、それぞれ 37°Cで培養した。培養後、細胞膜染色の際は mKate-D4 を用いて室温で 30 分間細胞と反応後、4% paraformaldehyde を用いて室温で 20 分間固定化処理を行った。固定後、細胞を 0.1% Triton X-100 /PBS で室温 1 分間反応させ膜透過処理を行った。膜透過処理後、NP の局在観察の際は、一次抗体として抗 NP モノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology 社製)を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488-抗マウス IgG 抗体(Invitrogen 社製)を用いて室温で 1 時間反応させた。PBS 洗浄後、hoechst 33342(ImmunoChemistry Technologies 社製)を室温で 5 分間反応させ、核を染色した。アアクチン染色の際は、膜透過処理後、Acti-stain 670 fluorescent phalloidin (Cytoskeleton, Inc 社製)を用いて、室温で 1 時間反応後、核を hoechst 33342 (ImmunoChemistry Technologies 社製)により染色した。調製し

たサンプルを用いて、共焦点レーザー顕微鏡により、目的分子の細胞内局在を確認した。

Z-軸方向の画像は X-Y 平面で撮像した画像を Olympus FluoView FV1000 confocal microscope software (Olympus 社製)を用いて重ね合わせるにより取得した。また細胞膜頭頂部での蛍光シグナルを Olympus FluoView FV1000 confocal microscope software (Olympus 社製)により定量化した。

シヨ糖密度遠心勾配法による脂質ラフト画分の分離

MDCK 細胞を (1×10^6 個) を 6cm dish に播種し、10%FBS/DMEM 培地中で 37°C、24 時間培養した。培養後、MDCK 細胞に種々のタンパクをコードするプラスミドをトランスフェクションし、37°Cで 24 時間培養した。培養後、MDCK 細胞を 1% Triton X-100 N

TE buffer (10 mM Tris [pH 7.4]、100 mM NaCl、1 mM EDTA)に溶解し、27 ゲージニードル (Terumo Corporation 社製)でライゼートを懸濁し、氷冷下 30 分静置した。脂質画分の分離のため、0.5 mL のライゼートと 1.5 mL の NTE buffer に溶解した 65% (wt/vol) シヨ糖液を合わせ、SW55Ti 遠心チューブ (Beckman Coulter 社製)にアプライした。さらに、2.0 mL の 35% シヨ糖液と 1.0 mL の 5%シヨ糖液を重層した。ライゼートとシヨ糖液を重層した遠心チューブを Beckman SW55Ti rotor (Beckman Coulter 社製)にセットし、4°C、46,000 rpm で 20 時間遠心分離を行った。遠心分離後のチューブから 0.5 mL ずつサンプルフラクションを回収した。回収したサンプルを SDS PAGE sample buffer で熱変性後、SDS PAGE により分離し Western blot 法により目的タンパクの検出を行った。

Phosphoinositide コーティングビーズ結合アッセイ

10 μ L のコントロールビーズまたは 8 種類の異なる phosphoinositides がコーティングされたビーズを PIP ビーズ sample pack (Echelon Bioscience 社製)より調製し、binding

buffer (10 mM HEPES [pH 7.4]、150 mM NaCl、0.5% (v/v) Nonidet P-40、5 mM dithiothreitol)に置換した。精製 NP タンパク (50 ng) に *in vitro* トランスクリプションにより合成した vRNA を非添加または添加条件で、4°C で 2 時間回転攪拌した。攪拌後、binding buffer で 5 回ビーズを洗浄し、SDS-PAGE sample buffer を加えて熱変性後、SDS-PAGE 法により分離した。ビーズへの NP タンパクの結合は抗 NP モノクローナル抗体(Abcam 社製)を用いた Western blot 法により確認した。

ゲル濾過カラムによるサイズ分画法

1 mg/mL濃度に調製した精製NPタンパクを、多量体から単量体に平衡をシフトさせるため、Amicon® Ultra 50K device (Merck Millipore社製)を用いた限外濾過法により、低塩濃度 buffer (100 mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH 7.4))に置換し、4°Cにて一晩静置した。単量体にシフトさせた精製NPとvRNA を加え、室温で1時間回転攪拌を行った。反応後のサンプル100 μ lをÄKTA purifier chromatography system (GE Healthcare社製)に取り付けた Superdex 200 Increase 10/300 GL Column (GE Healthcare社製)にロードし、溶出サンプルピークを同システムによりモニターし、検出されたピーク面積をInstruments software (UNICORN ver. 5.1; GE Healthcare社製)にて解析した。

統計解析

平均値の差の検定には t 検定を用いた。有意確立 p value <0.05 のとき統計学的に有意差があるものとした。

3-3. 結果

NP IDR2 のウイルス複製に与える影響解析

NP のアミノ酸配列の天然変性領域(Intrinsically disordered region;IDR)を DISOPRED server を用いて予測した結果、NP のアミノ酸配列中に非常に flexibility が高く、IDR と思われる領域が 3 ヶ所存在することが明らかとなった(図 41 A)。また、DISOPRED を用いた配列予測によって示された flexibility の高い領域は、X 線結晶構造によって示された NP の立体構造上電子密度が低く、構造が不明瞭な部分と一致していたことから、IDR であると考えられる(図 41 B)。これら 3 つの IDRs (IDR1~3) はそれぞれ異なる NP の機能ドメインに位置していることが分かっている。IDR1 (アミノ酸 1-26 位) は核内移行シグナルを含む領域に位置し、IDR2 (アミノ酸 72-92 位)は RNA 結合領域中に位置している。また、IDR3 (アミノ酸 391-406 位)は NP-NP 間の相互作用に関わる領域に位置している。これら IDR を構成する 3 つの領域は、ヒト・トリ・ブタ由来の A 型インフルエンザが有する NP において高度に保存されており、特に IDR2 は 3 つの IDR の中で最も高いアミノ酸保存率を示した(表 4)。IDR1 と IDR3 は、それぞれ NP の核内移行と NP-NP 間の相互作用を制御し、ウイルス複製に重要な役割を果たしていることが報告されているのに対し、IDR2 の機能的な意義やウイルス複製への影響については不明な点が多い(21)。そこで、IDR2 を構成するアミノ酸のウイルス複製に与える影響を解析するため、IDR2 中の任意のアミノ酸配列にアラニン変異を導入した変異体 NP を有する変異ウイルスをリバースジェネティクス法により作成し、ウイルス複製能に与える影響を解析した(図 42 A)。その結果、変異を導入した 15 つのアミノ酸残基の内、7 つのアミノ酸残基変異を導入した変異ウイルスでは、野生型ウイルスと同程度のウイルス増殖性を示した。一方で、D72、R74、R75、Y78、K87、K90、K91 及び T92 の 8 つのアミノ酸残基に変異を導入した変異ウイルスでは、ウイルス複製能が失われることが明らかとなった。また、ウイルスの増殖が確認されなかった NP 変異体について、細胞内タンパク発現量を Western blot 法により確認したところ、いずれ

の変異体においても野生型の NP と同程度の発現を認めることができた(図 42 B)。

以上の結果から、IDR2 を構成する 8 つのアミノ酸残基はウイルス複製に必須な役割を果たすことが明らかとなり、NP の機能制御への関与が示唆される。

NP IDR2 のウイルスゲノム転写・複製に与える影響解析

IDR2 は NP の RNA 結合領域に位置することから、RNA の機能制御に関与していることが考えられる。そこで、これらのアミノ酸残基のウイルスゲノム RNA の転写・複製に与える影響をレプリコンアッセイにより解析するため、PB2 または NA 遺伝子をコードするウイルス RNA の構造遺伝子領域を mRFP または EGFP の構造遺伝子に置換したウイルス RNA を発現するレポータープラスミドを作成し、mRFP または EGFP の発現量を指標にウイルスの転写・複製活性に与える影響を解析した(図 43 A-C)。その結果、いずれの NP 変異体においても mRFP および EGFP の有意な発現低下は認められず、これらのアミノ酸残基はウイルスの転写・複製制御に大きな影響を与えないことが分かった。一方で、これらの配列に複数の変異を導入した NP 変異体、D72/R74/R75/Y78 (D72A-Y78A)、K87/K90/K91/T92 (K87A-T92A)及び IDR2MT (D72A/R74A/R75A/Y78A/K87A/K90A/K91A/T92A)では、有意なレポーター遺伝子の発現低下が認められた。これらの結果は、IDR2 はウイルスゲノムの転写・複製の制御に関与することを示しているが、一アミノ酸変異の導入では転写・複製への大きな影響が認められないため、変異ウイルス産生実験によって認められたウイルス複製能の消失は、転写・複製より後期の RNA 制御に関わる機能抑制によって引き起こされている可能性が考えられる。

NP IDR2 のウイルスゲノムパッケージングに与える影響解析

転写・複製より後期の RNA 制御に関わるウイルス複製の過程に対する IDR2 中の 8 つのアミノ酸残基の影響を検討するため、ウイルスゲノム RNA パッケージングに与える影響を

解析した(図 44 A-D)。ウイルスゲノムのパッケージング効率の解析を行うため、mRFP または EGFP をレポーター遺伝子としてコードする vRNA を発現するプラスミドを用いてリバースジェネティクス法によりレポーター遺伝子を有する NP 変異体ウイルスを 293T 細胞の培養上清中に産生させた。作成した培養上清中の変異ウイルスを、ヘルパーウイルス (A/WSN/1933(H1N1)) と共に MDCK 細胞に感染させ、MDCK 細胞内に発現した mRFP または EGFP の発現レベルを指標にウイルスゲノムパッケージング効率の評価を行った。その結果、ウイルス産生に使用した 293T 細胞内での転写・複製及びウイルスタンパクの発現は変異ウイルスと野生型ウイルスで大きな差が認められなかったのに対し、MDCK 細胞内でのレポーター遺伝子 mRFP または EGFP の発現レベルが変異体ウイルスで顕著に減少していたことから、これらのアミノ酸残基はウイルスゲノムのパッケージング制御に参与していることが示唆された。

NP IDR2 の RNA 結合およびオリゴマー形成に与える影響解析

ウイルスゲノムが正常にウイルス粒子内にパッケージングされるためには、vRNA と NP を主構成要素として含む vRNP が両者の結合により、適切な立体配座を維持した複合体を形成する必要がある。そこで、RNA 結合に対する IDR2 の直接的な影響を解析するため、IDR2 に変異を導入した NP 変異体 と 1 分子の NP との結合に必要な長さを有する 24nt RNA との結合親和性を SPR シグナルの増減を指標に Biacore を用いて解析した(図 45) (51,88)。野生型 NP タンパクは RNA に対して、先行文献と同程度の結合親和性($K_d = 16.8$ nM)を示すことを確認した(89)。一方で、IDR2 の配列の内、D72A/R74A/R75A/Y78A または K87A/K90A/K91A/T92A に 4 つのアラニン変異を導入した D72A-Y78A 及び K87A-T92A NP 変異体では RNA に対する結合親和性が低下し、8 つのアミノ酸残基にアラニン変異を導入した IDR2 MT NP では、野生型 NP に比べ 3 倍程度結合親和性が低下することが明らかとなった。以上の結果より、IDR2 は NP と RNA 結合制御に参与すること

が明らかとなった。次に、vRNP の基本骨格となり、RNA-NP 間の結合によって形成される NP オリゴマー形成への IDR2 の影響をゲル濾過カラムによるサイズ分画法により解析した(図 46)。精製 NP タンパクをゲル濾過カラムによりサイズ分画を行った条件では、モノマーと思われる単一のピークが認められるのに対し、*in vitro* トランスクリプションにより合成した vRNA と NP を反応させた条件では、非常に分子量の大きな画分にピークが認められたことから、オリゴマーを形成していることが確認できた。一方で、IDR2 にアラニン変異を導入した変異体 NP では、導入したアラニン変異の数に応じて、オリゴマー画分のピークが減少することが明らかとなった。これらの結果は、IDR2 が NP-RNA 間の結合を制御し、NP のオリゴマー形成を制御していることを示している。

ウイルス感染細胞内で vRNP が再構成された後、ウイルス粒子内に vRNA がパッケージングされるためには、細胞膜直下に局在する必要がある(90)。vRNP の細胞内局在は、その主構成因子である NP の局在に依存しており、NP/vRNP は他のウイルスタンパク非共存下で細胞膜に局在することが報告されていることから、NP が vRNP の細胞膜への局在を制御している可能性が考えられる(90-92)。しかしながら、NP の細胞膜への局在を制御する因子については不明な点が多く、未だ明らかにされていない。そこで、IDR2 が NP の細胞膜への局在に関与するか検討を行うため、IDR2 MT NP の細胞膜への局在を免疫染色法により確認した(図 47)。細胞膜の染色には、細胞膜脂質の内側に存在するコレステロールに富んだ脂質ラフトに結合する θ -toxin の D4 ドメイン に mKate タグを付加した mKate-D を細胞膜染色用のプローブとして使用した(93)。MDCK 細胞内に一過性に発現させた WT NP は mKate-D4 陽性の細胞膜脂質と共局在が認められた。一方で、IDR2 MT NP と細胞膜との共局在は顕著に減少し、代わりに細胞質に NP の局在が強く認められた。免疫染色法により確認された NP の細胞膜への局在をより定量的に評価するため、シヨ糖密度勾配遠心法による脂質ラフト画分の分画を行い、脂質ラフト画分に含まれる NP を Western blot 法により確認した(図 48)。脂質ラフト画分の分画を確認するため、脂質ラフトに局在することが

しられている Caveolin と A 型インフルエンザウイルスの HA タンパクをラフトマーカーとした(94)。また、脂質ラフトには局在しないタンパクとして Trans-membrane(TM)ドメインに変異を導入した HA タンパクを非ラフト画分マーカーとしてそれぞれ Western blot 法により検出した。この分画条件において、WT NP は脂質ラフト画分と非脂質ラフト画分にタンパクが検出されるのに対し、IDR2 MT NP は非脂質ラフト画分のみタンパクが認められた。以上の結果より、IDR2 は NP の細胞膜への局在に関与していることが示唆された。

PI(4,5)P₂ の NP 細胞膜局在に対する影響解析

NP は多くの塩基性アミノ酸により構成されるため、正に帯電しているのに対し、細胞膜はその構成脂質の電気的特性により負に帯電していることから、静電的な相互作用を介して、NP が直接細胞膜へ結合する可能性が考えられる(20,95)。細胞膜を構成する脂質の内、フォスファチジルイノシトールのリン酸化体である PI(4,5)P₂ は細胞膜の内側に局在し、他の脂質と比較して強い負電荷を有するため、NP の結合候補として挙げられる(95)。実際、PI(4,5)P₂ の負に荷電した静電的な特徴により、正に帯電した塩基性タンパクが脂質のリン酸基と塩基性アミノ酸残基の静電的な相互作用により結合することが報告されている。そこで、PI(4,5)P₂ が NP の細胞膜への局在に必要であるか確認するため、細胞膜中の PI(4,5)P₂ の発現量を PI(4,5)P₂ に特異的に結合することが知られている PLC δ -PH に mcherry を付加した mCherry-PLC δ -PH の細胞内局在の変化を指標に確認した(図 49 A)(96)。また、phosphatidylinositol polyphosphate 5 phosphatase type IV (5ptaseIV)に AcGFP タグを付加した AcGFP-5ptaseIV を一過性に発現させることにより、細胞内 PI(4,5)P₂ の発現が減少するか検討を行った(97)。コントロールとして AcGFP のみを発現させた MDCK 細胞では mCherry-PLC δ -PH の細胞膜への局在が確認されるのに対し、AcGFP-5ptaseIV を一過性に発現させた細胞では mCherry-PLC δ -PH の局在が細胞膜ではなく、細胞質に局在していることが確認された。以上の結果は、AcGFP-5ptaseIV の発現

により、細胞膜に局在している細胞内 PI(4,5)P₂ の発現量が低下していることを示している(97)。細胞内 PI(4,5)P₂ 発現量の低下条件において、NP の細胞膜への局在を確認するため、NP と AcGFP または AcGFP-5ptaseIV を一過性に共発現させた細胞における NP の局在の変化を免疫染色法により観察した(図 49 B)。その結果、AcGFP 発現細胞では NP の細胞膜への局在が認められるのに対し、AcGFP-5ptaseIV 発現細胞では NP の細胞膜への局在が低下していることが認められた。次に、vRNP の細胞局在における PI(4,5)P₂ の影響を確認するため、AcGFP-5ptaseIV 発現ウイルス感染細胞内での vRNP の局在を NP の局在を指標に解析した(図 50 A)。その結果、AcGFP 発現ウイルス感染細胞では、細胞膜への NP の局在が認められるのに対し、AcGFP-5ptaseIV 発現細胞では細胞膜への NP の局在が抑えられていることが確認された。次に、PI(4,5)P₂ のウイルスゲノムパッケージングに与える影響を解析するため、AcGFP または AcGFP-5ptaseIV 発現 293T 細胞において、mRFP を発現するレポーター遺伝子を含むリコンビナントウイルスを産生させ、リコンビナントウイルス感染 MDCK 細胞内での mRFP の発現量を指標に解析した(図 50 B)。その結果、AcGFP 発現細胞内で産生させたウイルスに対して、AcGFP-5ptaseIV 発現細胞内で産生させたウイルスのゲノムパッケージング効率が低下することが明らかとなった。以上より、NP 一過性発現細胞及びウイルス感染細胞内における NP の細胞膜への局在制御に PI(4,5)P₂ が関与していることが示された。

PI(4,5)P₂ のウイルスゲノムパッケージングに対する影響解析

AcGFP-5ptaseIV の一過性発現により、細胞内 PI(4,5)P₂ の発現量が低下するが、PI(4,5)P₂ 細胞内発現量の変化はアクチンの脱重合制御にも関与していることが報告されている(98)。また、アクチンの脱重合は細胞膜での vRNP のアセンブリーにも関与していることが報告されていることから、AcGFP-5ptaseIV 発現時に認められるゲノムパッケージング効率の低下は、アクチンの脱重合によって引き起こされている可能性が考えられる(99)。

実際、アクチンの重合阻害剤である CytochalasinD 処理によって認められるように(100)、AcGFP-5ptaseIV 発現細胞内においてもアクチンの脱重合が確認された(図 51 A-B)。そこで、アクチンの脱重合によるゲノムパッケージングへの影響を解析するため、CytochalasinD 処理を行った 293T 細胞に、レポーター遺伝子を含むリコンビナントウイルスを産生させ、ウイルスゲノムパッケージング効率を評価した(図 51 C)。その結果、CytochalasinD 処理によりウイルスゲノムパッケージング効率の低下が確認されたが、AcGFP-5ptaseIV 発現時と比較するとその影響は限定的なものであった。以上より、PI(4,5)P₂ の発現量の低下は、アクチンの脱重合時に見られる影響よりも強くウイルスゲノムのパッケージング効率を低下させることが明らかとなった。これらの結果は、PI(4,5)P₂ の発現量自体が NP の細胞膜への局在とウイルスゲノムのパッケージングに強く関与していることを示している。

NP IDR2 と PI(4,5)P₂ の結合解析

Cryo-electron microscopy 及び cryo-electron tomography による解析により、ウイルス粒子内より精製した vRNP を基に NP と RNA の結合モデルが報告された(21,22)。この結合モデルでは、RNA は IDR2 とは離れた領域に結合しており、NP と RNA の結合状態において、RNA と IDR2 との相互作用は確認されていない(図 52 A)。この結果は、NP が RNA と結合し、オリゴマーを形成した後、IDR2 は RNA から乖離し、再び柔軟な構造を有する天然変性状態を維持することで、新たな結合標的分子と結合可能なことを示唆している。そこで、NP が PI(4,5)P₂ 特異的に結合するか否か確認するため、PI 及び一連のリン酸化フォームである PIPns が固定化されているビーズを用いて、精製 NP タンパクとの結合性を検討した(図 52 B)。その結果、NP はコントロールビーズ、PI 及び PIP には結合しなかった。一方で、イノシトール環のリン酸化により、強く負に帯電している PI bisphosphates [PI(3,5)P₂、PI(4,5)P₂] 及び trisphosphate [PI(3,4,5)P₃] に対して結合性を示した。こ

これらの結果は、PIP_nの電荷依存的にPIP_nとNPが結合することを示している。生理的条件下において、他のPIP_nに対してPI(4,5)P₂は最も存在比率が高く、細胞膜の内側に特異的に局在している(101)。以上の背景より、NPが結合したリン脂質の中からPI(4,5)P₂を選択し、より詳細な結合様式の解析を行うこととした。まず、IDR2がPI(4,5)P₂との結合に関与しているか否か確認するため、IDR2に変異を導入した変異体NPタンパクを用いてPI(4,5)P₂ビーズへの結合を検討した(図52C)。その結果、IDR2への変異導入数に応じてPI(4,5)P₂への結合性が低下したことから、IDR2はNPとの結合に関与していることが示唆される。次に、NPのPI(4,5)P₂への結合がRNAの存在下においても認められるか検討を行うため、精製WTNP及びIDR2MTNPタンパクを*in vitro*トランスクリプションにより合成した1027ntvRNAと反応させた後、PI(4,5)P₂ビーズと回転攪拌させたサンプルを調製し、ビーズへのNPの結合をWestern blot法により検出した(図52D)。その結果、WTNPはRNAの存在下においてわずかにビーズへの結合の低下が認められるものの、RNA存在下においてもPI(4,5)P₂ビーズへの強い結合が認められた。一方で、IDR2MTNPのPI(4,5)P₂ビーズへの結合は、RNAの存在下において顕著に減少した。WTNPとvRNA(++)を反応させたサンプルでは、図46で認められたように、ほぼすべてのNPがRNAと結合し、分子量の大きなNPオリゴマーを形成していることを確認している。一方で、IDR2MTNPとvRNA(++)の反応によって形成されるNPオリゴマーはWTNPに比較し、オリゴマー形成能が低く、より分子量の小さいオリゴマーの形成が認められる。これは、IDR2MTNPのRNA結合親和性の低下によると考えられる。これらの結果から、IDR2MTNPとPI(4,5)P₂ビーズの反応サンプル中には、NPと未反応のフリーのRNAが過剰に存在していると考えられる。これらの反応条件の違いを考慮すると、RNA存在下におけるNPとPI(4,5)P₂との結合阻害はNPのオリゴマー形成ではなく、RNAとIDR2の競合阻害によるものであると考えられる。以上より、NPはRNAの存在下においてもIDR2を介してPI(4,5)P₂と結合可能であることが示唆された。より詳細にNPとPI(4,5)P₂の結合親

和性を解析するため、SPR法を用いて、両者の結合親和定数(KD)の算出を行った。まず、評価系の確認を行うため、PI(4,5)P₂を固定化したセンサーチップと既知のPI(4,5)P₂結合タンパクであるPLCδ-PH及びPI(4,5)P₂に対するモノクローナル抗体(PI(4,5)P₂ MAb)を用いて解析を行った(図 53 A)。その結果、GST-PLCδ-PH 及び PI(4,5)P₂ MAb の結合親和定数はそれぞれ KD=0.31 pM、KD= 16.0 nM を示し、文献により報告されている数値とほぼ同程度の結合親和性を示すことを確認した(102)。次に、構築した評価系を用いて WT NP と PI(4,5)P₂ の結合親和性を評価した(図 53 B)。その結果、NP は PI(4,5)P₂ に対して KD=14.0 μM の結合親和性を示した。一方で、IDR2 MT NP は PI(4,5)P₂ に対して Kd=75.0μM の結合親和性を示したことから、WT と比較して 5 倍程度 PI(4,5)P₂ に対する結合親和性が低下することが明らかとなった。これらの結果は、IDR2 が NP と PI(4,5)P₂ の結合の制御に関わっていることを示している。

PI(4,5)P₂発現抑制による vRNP のウイルス粒子への取り込みとウイルス複製に対する機能解析

これまでに得られた結果より、IDR2 を介した NP と PI(4,5)P₂ の結合は NP/vRNP の細胞膜への局在及び、NP/vRNP のウイルス粒子内への取り込みに必要な過程であると考えられる。そこで、細胞膜での PI(4,5)P₂ の発現量の低下が、vRNP のウイルス粒子内へのパッケージングに与える影響を解析するため、リバーシジェネティクス法によって産生したリコンビナントウイルス粒子内の NP 量を Western blot 法により検出した(図 54 A-C)。リコンビナントウイルスの作成は AcGFP または AcGFP-5ptaseIV 発現下において、図 50 B と同様の手法により作成した。リコンビナントウイルスを含む培養上清を回収し、30%スクロース溶液を用いた超遠心法により沈殿したウイルスを回収し、Western blot 法によりウイルス粒子中に含まれる NP、M1 及び HA タンパクを検出した。ウイルス産生細胞内での NP、M1 及び HA の発現量は、AcGFP 及び AcGFP-5ptaseIV 発現下で同程度確認できたのに

対し、AcGFP-5ptaseIV 発現下で作成したリコンビナントウイルス中に含まれる NP の量は AcGFP 発現下で作成したウイルス中に含まれる NP と比較し、低下していた(図 54 A)。また、回収したウイルス粒子内の NP/M1 及び NP/HA の相対的な発現量は、AcGFP-5ptaseIV 発現下で作成したウイルスにおいて顕著に減少していたのに対し、AcGFP 発現条件で作成したウイルスにおいては大きな変化は認められなかった(図 54 B-C)。以上の結果は、vRNP のウイルス粒子内への取り込みは、PI(4,5)P₂ の発現抑制による影響を受けることを示している。最後に、5ptaseIV 発現による PI(4,5)P₂ 量の減少がウイルス複製に与える影響を評価するため、293T 細胞内に AcGFP-5ptaseIV を一過性に発現させた条件でウイルス感染を行い、得られるウイルス量を評価した(図 55)。その結果、AcGFP に比較して、AcGFP-5ptaseIV 発現細胞では、ウイルス感染の進行に伴って増殖するウイルス量が低下することが認められた。これは、AcGFP-5ptaseIV の発現によって認められたウイルスゲノムパッケージング効率の低下が、ウイルス複製の抑制に寄与していることを示唆する。

以上より、本研究成果により NP の IDR2 が vRNA と PI(4,5)P₂ の二つの異なる標的分子との相互作用を制御し、ウイルス粒子内へのウイルスゲノムの効率的な輸送に重要な役割を果たしていることが示された。

3-4. 考察

本研究において、NP の RNA 結合領域中に位置する IDR2 (72-DERRNKYLEEHPSAGKDPKKT-92)がヒト、トリおよびブタ由来の A 型インフルエンザウイルス株において高度に保存されていることを明らかにし、IDR2 中の 8 つのアミノ酸残基 (D72、R74、R75、Y78、K87、K90、K91 及び T92) が、ウイルスゲノムパッケージング制御によるウイルス複製に必須な役割を果たしていることが明らかとなった。また、IDR2 は vRNA と PI(4,5)P₂ の二つの標的分子との相互作用を制御し、ウイルス粒子内へのゲノムの効率的なパッケージングに寄与していることが示された。

ウイルス粒子内に vRNA がパッケージングされるためには、vRNA は複数の NP 分子と結合し、NP オリゴマーを基本骨格とした vRNP を形成しなければならない。IDR2 の変異の導入数に応じて RNA に対する結合親和性の低下が確認され、ウイルス複製に必須な役割を果たしていた 8 つのアミノ酸残基全てにアラニン変異を導入した IDR2 MT NP では、WT に比較して 3 倍程度結合親和性が低下した。これらの結果に加えて、IDR2 の 74~88 位のアミノ酸を欠失させた変異体では RNA への結合親和性が 6 倍程度低下することが報告されている。さらに、IDR2 の変異の導入数に応じて、RNA との結合によって形成される NP オリゴマーの形成が抑制され、より分子サイズが小さい不完全なオリゴマー形成が認められた。これらの結果は、IDR2 は NP-RNA 間の結合に加えて、NP オリゴマーの形成制御にも関与していることを示している。また、IDR2 を介した NP と vRNA の結合による NP オリゴマー形成の制御は、vRNA の転写・複製の制御に重要であることがレプリコンアッセイの結果より示唆される。しかし、IDR2 への 1 アミノ酸変異の導入によって顕著な vRNA パッケージング効率の低下が認められる一方で、大きな転写/複製への影響は認められなかった。これは、転写・複製の過程よりもウイルスゲノムパッケージングの過程はより厳密に IDR2 によって制御されていることを示唆している。IDR2 は負に帯電した RNA や PI(4,5)P₂ との相互作用に関与しているが、IDR2 への変異の導入により、結合活性が完全

に消失するわけではないことから、両者の結合に対する決定的な因子ではないと考えられる。以前に報告されている RNA 結合領域を構成する NP の G1-G4 領域への変異導入実験により、NP-G1 (R74A、R75A、R174A、R175A 及び R221A) 及び NP-G2 (R150A、R152A、R156A 及び R162A) の変異体は RNA との結合に最も重要な領域であることが示されている(59)。そのため、IDR2 は vRNA をこれら 2 つの強い RNA 結合領域に結合させるため、天然変性領域が標的分子を捕えるように接近し、相互作用を加速するという fly casting モデルと同一の機能を IDR2 が果たしていると考えられる(81)。NP は、RNA との共存下においても、幾分結合の低下が認められるものの、PI(4,5)P₂ と結合する。これは、PI(4,5)P₂ は NP-G1 及び NP-G2 とは異なる領域に結合することを示唆している。また、RNA 共存下で認められる部分的な NP と PI(4,5)P₂ の結合阻害効果は、RNA と PI(4,5)P₂ 結合サイトが近接していることによる立体障害による可能性が考えられる。NP-G1 や NP-G2 とは対照的に、NP-G1 の近接に位置し、部分的に IDR2 配列と重なるアミノ酸残基を有する NP-G3 (K90A、K91A、K113A、R117A 及び R121A)は正に荷電した塩基性アミノ酸に富んだ配列を有する一方で、RNA との結合には寄与しないことが報告されている(59)。そのため、PI(4,5)P₂ は vRNA 同様に、IDR2 の fly casting モデルを介して効率的に NP-G3 に結合する可能性が考えられる。実際、NP-G3 中の K90 及び K91 に変異を有する NP 変異体では、NP-G1 中の R74 及び R75 に変異を有する NP 変異体よりも PI(4,5)P₂ に対する結合が低下することを確認している。しかし、正確な RNA、PI(4,5)P₂ 及び NP 間の結合様式を明らかにするためには、これら相互作用分子間でのより詳細な解析が求められる。

PI(4,5)P₂に加えて、細胞膜は phosphatidylserine (PS) や phosphatidic acid (PA)等の様々な負に荷電したリン脂質により構成され、その電氣的に負に荷電した特性が維持されている(95)。ELISA を用いた予備検討試験では、NP の PS や PA に対する結合は認められなかった。しかし PIP_n をコートしたビーズを用いた結合試験の結果より、NP は PS や

PA よりも強く負に帯電した PI(4,5)P₂ や PI(3,4,5)P₃ に結合する傾向を示した。さらに、正に荷電した IDR2 中の配列に変異を導入することにより、NP の PI(4,5)P₂ への結合性が低下した。これは、NP が RNA の負に荷電したリン酸基と静電的相互作用によって塩基配列非特異的に結合するように(88)、負に荷電した PI(4,5)P₂ や PI(3,4,5)P₃ とも静電的な相互作用を介して結合していると考えられる。RNA と PI(4,5)P₂ の両分子間において、負に荷電したリン酸基が共通に認められることから、これらのリン酸基が NP と相互作用するための因子として機能していることが考えられる。PIPns の中で、PI(4,5)P₂ は最も細胞内含有量が高く、細胞膜の内側に局在している。一方で、PI(3,5)P₂ や PI(3,4,5)P₃ は細胞内含有量が少なく、特定の細胞内シグナルに応じて一過性にその発現が制御されている(101)。以上の背景から考察すると、PI(3,5)P₂ や PI(3,4,5)P₃ は生理的条件下で NP の細胞膜への局在に寄与する可能性は低いと考えられる。

NP-PI(4,5)P₂ 間の結合結果に加えて、PI(4,5)P₂ のイノシトール環の D5 位からリン酸基を除去し、細胞内 PI(4,5)P₂ 量を低下させる 5ptaseIV を細胞内に一過性に発現させることで、NP の細胞膜への局在が低下し、ウイルスゲノムパッケージング効率の低下が確認された。これらの結果は、PI(4,5)P₂ が NP の細胞膜への局在制御に関与していることを示している。細胞内 PI(4,5)P₂ の減少により、NP の細胞膜への局在及びウイルスゲノムパッケージングが抑制される要因として、NP と PI(4,5)P₂ 間の直接的な相互作用が低下することに加えて、PI(4,5)P₂ により制御されている細胞内環境の変化が想定される。PI(4,5)P₂ はアクチンの脱重合、クラスリン依存性エンドサイトーシス及びエキソサイトーシスの際の小胞輸送の制御に関与していることが報告されている(103)。しかし、アクチンの重合を阻害するために Cytochalasin D 処理を行った細胞では、ゲノムパッケージング効率の僅かな低下しか認められなかった。また、エンドサイトーシスの過程は、ウイルス粒子の細胞内への侵入過程で起こる反応であるため、ゲノムパッケージング効率に影響を与える可能性は低いと考えられる。一方で、エキソサイトーシスの過程で起こる小胞輸送の阻害により、

ゲノムパッケージング効率の低下を引き起こすことが想定される。実際、5ptaseIV の一過性発現により、PI(4,5)P₂ の細胞内発現量の低下に伴って、アクチンの脱重合による小胞輸送障害が起こることが報告されている(104-106)。しかし、5ptaseIV の一過性発現によるゲノムパッケージング効率に及ぼす影響は限定的であったため、アクチンに依存した小胞輸送経路はゲノムパッケージングの制御に大きく寄与しないと考えられる。

細胞内 PI(4,5)P₂ 量の制御は、5ptaseIV 等のフォスファターゼに加えて、small G protein ADP-ribosylation factor 6 (Arf6)などのキナーゼ群によって制御されている(107,108)。興味深いことに、GTP 加水分解能を欠失した恒常的活性型変異体 Arf6 Q67L は PI(4,5)P₂ に富んだエンドソーム様の構造を誘導し、PI(4,5)P₂ 結合タンパクの局在を細胞膜からエンドソーム様の構造にシフトさせることが報告されている(97,109,110)。そのため、Arf6 Q67L 変異体を用いた解析を行うことで、NP の細胞内局在の制御における PI(4,5)P₂ の役割をより明確にすることができると考えられる。

細胞膜に局在する PI(4,5)P₂ の強く負に帯電した電気的特性は、正に荷電した様々な塩基性タンパクの細胞内膜への局在制御に寄与していることが報告されている(95)。特に、細胞膜へのウイルスタンパクの局在は様々な RNA ウイルスのアセンブリーや出芽に重要であるとされている(11)。これらの RNA ウイルスの中でも、PI(4,5)P₂ を標的として細胞膜直下へ局在することが知られているウイルスとして、human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) が精力的に研究されている(112)。HIV のガプシドタンパクである Gag のマトリックスドメインには、塩基性アミノ酸残基が集中している highly basic region (HBR): 14-KWEKIRLRPGGKKQYKLIK-31が存在する。HBR は vRNA と PI(4,5)P₂ の両者の結合を制御することで、vRNA を細胞膜近傍へリクルートし、ウイルス粒子内へのゲノムパッケージングの効率化に寄与している。A型インフルエンザウイルス NP 中に含まれる IDR2 は、HIV Gag の HBR と同様に正に帯電した複数の塩基性アミノ酸から構成され、vRNA と PI(4,5)P₂ の結合を制御し、ウイルスゲノムパッケージング効率を高めることに寄与して

いる。しかし、インフルエンザ NP は HIV Gag と全く同等な働きをしているわけではないと考えられる。HIV Gag は細胞膜直下で直接 vRNA と細胞膜と結合するのに対し、細胞膜直下で M1 が NP/vRNP と細胞膜の間に存在しているため、NP/vRNP は直接細胞膜と結合している状態では存在しない。また、NP/vRNP は他のウイルスタンパクの助けを必要とせず、直接細胞膜へ移行するが、M1 は単独では細胞膜へ移行せず、細胞膜へ局在するためにはウイルス膜タンパクである NA や HA を必要とする(113)。加えて、M1 は NP/vRNP 相互作用領域と負に荷電した膜脂質と結合可能と思われる塩基性アミノ酸に富んだ領域を有している。これらの M1 の特徴は、NP/vRNP と M1 は異なる経路で細胞膜へ移行した後、M1 は NP/vRNP-細胞膜間の結合と競合し、NP/vRNP と細胞膜間に入り込む必要がある。NP の RNA に対する結合親和性は非常に強いのに対し、PI(4,5)P₂ に対する結合親和性は弱いのは、PI(4,5)P₂ と M1 間の結合変換を容易にするために寄与しているのかもしれない。しかし、どのように NP/vRNP が M1 と細胞膜間の結合を仲介するかについては不明な点が多く、NP/vRNP、M1 及び細胞膜間のアセンブリーや相互作用モデルを明らかにするためには、より詳細な機能解析が求められる。

結論

第 1 章において、化合物ライブラリーを用いた抗インフルエンザウイルス薬の探索により、NP を標的とした抗ウイルス化合物 RK424 の獲得に成功した。本化合物は NP の異なる機能ドメインより構成されるポケット構造に結合し、3 つの異なる NP の機能阻害 (NP-NP 間の結合阻害、NP-RNA 間の結合阻害、及び NP の核外移行阻害) を介して強い抗ウイルス活性を引き起こすことを明らかにした。また、RK424 によって同定した NP ポケット構造は非常に構造特異性及び配列保存性が高く、ウイルス複製に必須な役割を果たしていることが明らかになった。

第 2 章において、第 1 章の研究成果を基に、NP-NES3 を標的とした HTS 評価系の確立と化合物ライブラリーを用いた核外移行阻害剤の探索を行い、NP-NES3 依存的な核外移行を阻害する新規核外移行阻害剤の獲得に成功した。その内、DP2392-E10 は核外移行阻害作用と共に強い抗ウイルス活性を示した。

以上より、本研究により同定した NP 阻害剤と併せて、NP が創薬の新たな標的として有望であることが改めて立証された。

第 3 章において、NP の RNA 結合領域に位置する天然変性領域 (IDR2) が、RNA と PI(4,5)P₂ の異なる分子の結合を制御し、NP のオリゴマー形成と細胞膜局在を制御することでウイルスゲノムの効率的なパッケージングに寄与していることを明らかにした。また IDR2 を構成するアミノ酸配列には、非常に配列保存性が高く、ウイルス複製に必須な役割を果たすアミノ残基が複数存在することを明らかにした。近年、天然変性領域を標的とした阻害剤の開発が複数報告されていることから、NP の IDR2 を標的とした新たな抗ウイルス薬の開発も十分に期待できる。

以上より、本研究成果は、A 型インフルエンザ NP を対象とした基礎研究と創薬研究の発展に大きく貢献することが期待される。

謝辞

本研究の機会を頂き、終始多大なるご指導を賜りました・国立研究開発法人理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 分子ウイルス学研究グループリーダー・東京大学大学院新領域創成科学研究科 連携教授・東京大学大学院農学生命科学研究科 連携教授、間陽子先生に謹んで感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、P3 施設の使用に関しての懇切丁寧なご指導を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合機構 動物衛生研究部門 西藤岳彦先生に御礼申し上げます。

研究遂行にあたり、様々な協力をしていただいた国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループ 副センター長、長田裕之先生、国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループ、近藤恭光博士、国立研究開発法人産業技術総合研究所 人工知能研究センター インテリジェントバイオインフォマティクス研究チーム 研究チーム長 富井健太郎先生、東北大学大学院情報科学研究科 生命科学システム分野 大下・大林研究室、山田和範先生、国立感染症研究所 ウイルス第 1 部 第 2 室、田島茂博士、国立研究開発法人理化学研究所 佐甲細胞情報研究室 小林俊秀先生に深く感謝致します。

本論文の執筆にあたり、多大な御指導、御鞭撻および厳正な審査を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医学専攻 感染制御学研究室 芳賀猛教授に深く感謝の意を表します。

終始ご協力を賜りました国立研究開発法人理化学研究所伊藤ナノ医工学研究室 分子ウイルス学研究グループ・東京大学大学院新領域創成科学研究科 連携准教授・十文字女子大学 教授、竹嶋伸之輔先生、国立研究開発法人理化学研究所伊藤ナノ医工学研究室 分子ウイルス学研究グループ 佐々木裕博士、佐藤洋隆博士、Chutiwitoonchai Nopporn 博士、Bai Lanlan 博士、Mairepati Palati 博士、橋本容子氏、石塚鮎子氏、浜田佳奈子氏、若松敏枝氏、松本有生氏に深く感謝致します。

研究出向の機会を与えて頂き、本研究の遂行に当たり終始ご協力を受け賜りました湧永製薬株式会社 研究開発部門 研究開発総括 湧永寛信氏に感謝致します。

最後に、終始援助し支えてくれた家族、友人にこの場を借りて深く感謝の意を表します。

引用文献

1. World Health Organization WHO factsheet 211: influenza; 2003.
2. Arnold S. Monto, MD. *Am J Manag Care* 6 (2000) Epidemiology and virology of influenza illness. S255-264.
3. Treanor J (2004) Influenza vaccine--outmaneuvering antigenic shift and drift. *N Engl J Med* 350: 218-220.
4. Medina, R. A. and Garcia-Sastre, A. (2011) Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* 9: 590-603.
5. Webster, R.G, et al. (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179.
6. Smith, W., C.H, Andrewes, and P.P. Laidlaw (1933) A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 2: 66-68.
7. Taubenberger JK, Morens DM (2006) 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 12: 15-22.
8. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, et al. (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79: 2814-2822.
9. Soema PC, Kompier R, Amorij JP, Kersten GF (2015) Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharm Biopharm* 94: 251-263.
10. Both GW, Sleight MJ, Cox NJ, Kendal AP (1983) Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol* 48: 52-60.
11. Cox NJ, Subbarao K (2000) Global epidemiology of influenza: past and present.

- Annu Rev Med 51: 407-421.
12. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459: 931-939.
 13. World Health Organization: H5N1 avian influenza; http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/ai_time_line.htm
 14. Okazaki K, Takada A, Ito T, Imai M, Takakuwa H, et al. (2000) Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. *Arch Virol.* 145:885-893.
 15. Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, et al. (2012) Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 486:420-428
 16. Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Orozco G, Wallis TR, et al. (2005) Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 366: 1175-1181.
 17. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI (2006) Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* 295: 891-894.
 18. Hui DS, Lee N, Chan PK (2010) Clinical management of pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection. *Chest* 137: 916-925.
 19. Hatakeyama S. (2010) Drug-resistant influenza viruses: an overview. *Nippon Rinsho* 68:1671-1678.
 20. Ye Q, Krug RM, Tao YJ (2006) The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* 444: 1078-1082.
 21. Arranz R, Coloma R, Chichon FJ, Conesa JJ, Carrascosa JL, et al. (2012) The

- structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science* 338: 1634-1637.
22. Moeller A, Kirchdoerfer RN, Potter CS, Carragher B, Wilson IA (2012) Organization of the influenza virus replication machinery. *Science* 338: 1631-1634.
 23. Ye Q, Guu TS, Mata DA, Kuo RL, Smith B, et al. (2012) Biochemical and structural evidence in support of a coherent model for the formation of the double-helical influenza A virus ribonucleoprotein. *MBio* 4: e00467-00412.
 24. Aida Y, Sasaki Y, Hagiwara K (2012) Discovery of Novel Antiviral Agents Directed Against the Influenza A Virus Nucleoprotein. *Antiviral Drugs—Aspects of Clinical Use and Recent Advances*; 99–120.
 25. Yu M, Liu X, Cao S, Zhao Z, Zhang K, et al. (2012) Identification and characterization of three novel nuclear export signals in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 86: 4970-4980.
 26. Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, et al. (2009) Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 83: 4153-4162.
 27. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179.
 28. Cianci C, Gerritz SW, Deminie C, Krystal M (2012) Influenza nucleoprotein: promising target for antiviral chemotherapy. *Antivir Chem Chemother* 23: 77-91.
 29. Hagiwara K, Kondoh Y, Ueda A, Yamada K, Goto H, et al. (2010) Discovery of novel antiviral agents directed against the influenza A virus nucleoprotein using photo-cross-linked chemical arrays. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 721-727.
 30. Shen YF, Chen YH, Chu SY, Lin MI, Hsu HT, et al. (2011) E339...R416 salt bridge of nucleoprotein as a feasible target for influenza virus inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*

U S A 108: 16515-16520.

31. Kao RY, Yang D, Lau LS, Tsui WH, Hu L, et al. (2010) Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target. *Nat Biotechnol* 28: 600-605.
32. Gerritz SW, Cianci C, Kim S, Pearce BC, Deminie C, et al. (2011) Inhibition of influenza virus replication via small molecules that induce the formation of higher-order nucleoprotein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 15366-15371.
33. Chou YY, Heaton NS, Gao Q, Palese P, Singer RH, et al. (2013) Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis. *PLoS Pathog* 9: e1003358.
34. ChemSpider database, http://www.simbiosys.ca/ehits_lasso/LASSO_on_ChemSpider.pdf.
35. M.I. Davis, J.P. Hunt, S. Herrgard, P. Ciceri, L.M. Wodicka, G. Pallares, M. Hocker, D.K. Treiber, P.P. Zarrinkar. (2011) Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity, *Nat. Biotechnol.* 29: 1046–1051.
36. Jacoby E, Tresadern G, Bembenek S, Wroblowski B, Buyck C, Neefs JM, Rassokhin D, Poncelet A, Hunt J, van Vlijmen H. (2015) Extending kinome coverage by analysis of kinase inhibitor broad profiling data. *Drug Discov Today*. 20:652-658.
37. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, et al. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30: 2785-2791.
38. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2014.
39. Ito J, Tabei Y, Shimizu K, Tsuda K, Tomii K (2012) PoSSuM: a database of similar protein-ligand binding and putative pockets. *Nucleic Acids Res* 40: D541-548.

40. Konc J, Janezic D (2012) ProBiS-2012: web server and web services for detection of structurally similar binding sites in proteins. *Nucleic Acids Res* 40: W214-221.
41. Chase GP, Rameix-Welti MA, Zvirbliene A, Zvirblis G, Gotz V, et al. (2011) Influenza virus ribonucleoprotein complexes gain preferential access to cellular export machinery through chromatin targeting. *PLoS Pathog* 7: e1002187.
42. Okomo-Adhiambo M, Demmler-Harrison GJ, Deyde VM, Sheu TG, Xu X, et al. (2010) Detection of E119V and E119I mutations in influenza A (H3N2) viruses isolated from an immunocompromised patient: challenges in diagnosis of oseltamivir resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1834–1841.
43. Chutiwitoonchai N, Kakisaka M, Yamada K, Aida Y (2014) Comparative analysis of seven viral nuclear export signals (NESs) reveals the crucial role of nuclear export mediated by the third NES consensus sequence of nucleoprotein (NP) in influenza A virus replication. *PLoS One* 9: e105081.
44. Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, Medcalf L, Hallam R, et al. (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* 75: 408-419.
45. Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, et al. (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458: 914-918.
46. Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, et al. (2009) Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* 458: 909-913.
47. DuBois RM, Slavish PJ, Baughman BM, Yun MK, Bao J, et al. (2012) Structural and biochemical basis for development of influenza virus inhibitors targeting the PA

- endonuclease. *PLoS Pathog* 8: e1002830.
48. Sasaki Y, Kakisaka M, Chutiwitoonchai N, Tajima S, Hikono H, et al. (2014) Identification of a novel multiple kinase inhibitor with potent antiviral activity against influenza virus by reducing viral polymerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 450: 49-54.
 49. T. Watanabe, S. Watanabe, Y. Kawaoka.(2010) Cellular networks involved in the influenza virus life cycle, *Cell Host Microbe* 7:427–439.
 50. Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K.P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L.A., Hess, S., et al. (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463: 818–822.
 - 51 K.H. Muller, L. Kakkola, A.S. Nagaraj, A.V. Cheltsov, M. Anastasina, D.E. Kainov. (2012) Emerging cellular targets for influenza antiviral agents. *Trends Pharmacol. Sci.* 33: 89–99.
 52. E.C. Hutchinson, E.M. Denham, B. Thomas, D.C. Trudgian, S.S. Hester, G.Ridlova, A. York, L. Turrell, E. Fodor. (2012) Mapping the phosphoproteome of influenza A and B viruses by mass spectrometry. *PLoS Pathog.* 8: e1002993.
 53. Chenavas S, Estrozi LF, Slama-Schwok A, Delmas B, Di Primo C, et al. (2013) Monomeric nucleoprotein of influenza A virus. *PLoS Pathog* 9: e1003275.
 54. Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* 196: 249-255.
 55. Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Muller CW, et al. (2003) Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export

- protein (NEP/NS2). *EMBO J* 22: 4646-4655.
56. Shimizu T, Takizawa N, Watanabe K, Nagata K, Kobayashi N (2011) Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. *FEBS Lett* 585: 41-46.
57. Ye Z, Liu T, Offringa DP, McInnis J, Levandowski RA (1999) Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. *J Virol* 73: 7467-7473.
58. Noton SL, Medcalf E, Fisher D, Mullin AE, Elton D, et al. (2007) Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* 88: 2280-2290.
59. Ng AK, Zhang H, Tan K, Li Z, Liu JH, et al. (2008) Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J* 22: 3638-3647.
60. Sun Q, Carrasco YP, Hu Y, Guo X, Mirzaei H, et al. (2013) Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1303-1308.54
61. Su CY, Cheng TJ, Lin MI, Wang SY, Huang WI, et al. (2010) High-throughput identification of compounds targeting influenza RNA-dependent RNA polymerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19151-19156.
62. Furuta Y, Takahashi K, Fukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, et al. (2002) In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 977-981.
63. Arnott JA, Planey SL (2012) The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin Drug Discov* 7: 863-875
64. Davies B, Morris T (1993) Physiological parameters in laboratory animals and

- humans. *Pharm Res* 10: 1093-1095.
65. Sasaki Y, Hagiwara K, Kakisaka M, Yamada K, Murakami T, et al. (2013) Importin alpha3/Qip1 is involved in multiplication of mutant influenza virus with alanine mutation at amino acid 9 independently of nuclear transport function. *PLoS One* 8: e55765.
66. Cros JF, Garcia-Sastre A, Palese P (2005) An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* 6: 205–213.
67. Kakisaka M, Sasaki Y, Yamada K, Kondoh Y, Hikono H, Osada H, Tomii K, Saito T, Aida Y. (2015) A Novel Antiviral Target Structure Involved in the RNA Binding, Dimerization, and Nuclear Export Functions of the Influenza A Virus Nucleoprotein. *PLoS Pathog.* 11:e1005062. .
68. O'Neill RE, Talon J, Palese P (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* 17: 288–296.
69. Huang S, Chen J, Chen Q, Wang H, Yao Y, et al. (2013) A second CRM1-dependent nuclear export signal in the influenza A virus NS2 protein contributes to the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol* 87: 767–778.
70. Li Y, Yamakita Y, Krug RM (1998) Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4864–4869.
71. Cao S, Liu X, Yu M, Li J, Jia X, et al. (2012) A nuclear export signal in the matrix protein of Influenza A virus is required for efficient virus replication. *J Virol* 86: 4883–4891.
72. Watanabe, K., Noda, S., Kobayashi, N. (2008). Establishment of a new cell line

- for performing sensitive screening of nuclear export inhibitors. *Drug Discov. Ther.* 2: 7–9.
73. la Cour T, Kiemer L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, et al. (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17: 527–536.
74. Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., Taylor, S.S. (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82 :463–473.
- 75 Zhang, J.H., Chung, T.D., Oldenburg, K.R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* 4 : 67–73.
76. Watanabe, K.; Fuse, T.; Asano, I.; Tsukahara, F.; Maru, Y.; Nagata, K.; Kitazato, K.; Kobayashi, N. (2006) Identification of Hsc70 as an influenza virus matrix protein (M1) binding factor involved in the virus life cycle. *FEBS Lett.* 580: 5785–5790.
77. Hu, Y.; Liu, X.; Zhang, A.; Zhou, H.; Liu, Z.; Chen, H.; Jin, M. (2015) CHD3 facilitates vRNP nuclear export by interacting with NES1 of influenza A virus NS2. *Cell. Mol. Life Sci.* 72:971–982.
78. Munier, S.; Rolland, T.; Diot, C.; Jacob, Y.; Naffakh, N. (2013) Exploration of binary virus-host interactions using an infectious protein complementation assay. *Mol. Cell. Proteom.* 12: 2845–2855.
79. Satterly, N.; Tsai, P.L.; van Deursen, J.; Nussenzveig, D.R.; Wang, Y.; Faria, P.A.; Levay, A.; Levy, D.E.; Fontoura, B.M. (2007) Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:1853–1858.
80. Chutiwitoonchai N, Aida Y. (2016) NXT1, a Novel Influenza A NP Binding Protein, Promotes the Nuclear Export of NP via a CRM1-Dependent Pathway. *Viruses.* 8

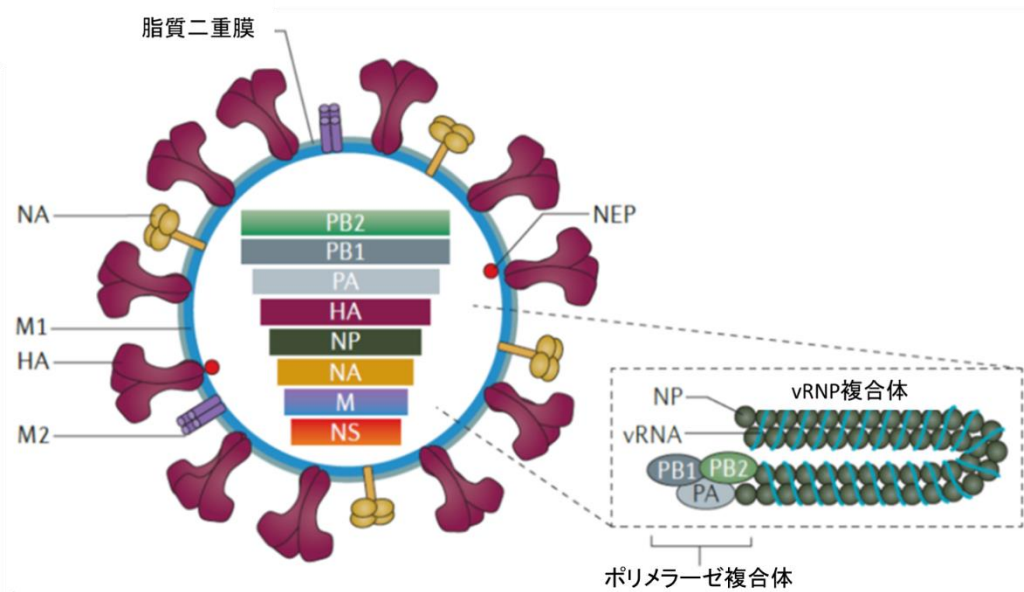
81. Uversky VN (2011) Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 1090-1103.
82. Metallo SJ (2010) Intrinsically disordered proteins are potential drug targets. *Curr Opin Chem Biol* 14: 481-488.
83. Xue B, Mizianty MJ, Kurgan L, Uversky VN (2012) Protein intrinsic disorder as a flexible armor and a weapon of HIV-1. *Cell Mol Life Sci* 69: 1211-1259.
84. Einfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y (2015) At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol* 13: 28-41.
85. Ward JJ, McGuffin LJ, Bryson K, Buxton BF, Jones DT (2004) The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* 20: 2138-2139.
86. Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y (2000) Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *J Virol* 74: 547-551.
87. Liang Y, Danzy S, Dao LD, Parslow TG (2012) Mutational analyses of the influenza A virus polymerase subunit PA reveal distinct functions related and unrelated to RNA polymerase activity. *PLoS One* 7: e29485.
88. Ng AK, Wang JH, Shaw PC (2009) Structure and sequence analysis of influenza A virus nucleoprotein. *Sci China C Life Sci* 52: 439-449.
89. Chan WH, Ng AK, Robb NC, Lam MK, Chan PK, et al. (2010) Functional analysis of the influenza virus H5N1 nucleoprotein tail loop reveals amino acids that are crucial for oligomerization and ribonucleoprotein activities. *J Virol* 84: 7337-7345.
90. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S (2009) Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* 143: 147-161.
91. Portela A, Digard P (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 83: 723-734.

92. Carrasco M, Amorim MJ, Digard P (2004) Lipid raft-dependent targeting of the influenza A virus nucleoprotein to the apical plasma membrane. *Traffic* 5: 979-992.
93. Hayashi M, Shimada Y, Inomata M, Ohno-Iwashita Y (2006) Detection of cholesterol-rich microdomains in the inner leaflet of the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 713-718.
94. Takeda M, Leser GP, Russell CJ, Lamb RA (2003) Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14610-14617.
95. DiNitto JP, Cronin TC, Lambright DG (2003) Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci STKE* 2003: re16.
96. Varnai P, Balla T (1998) Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol* 143: 501-510.
97. Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO (2004) Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14889-14894.
98. Janmey PA, Lindberg U (2004) Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 658-666.
99. Simpson-Holley M, Ellis D, Fisher D, Elton D, McCauley J, et al. (2002) A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* 301: 212-225.
100. Schliwa M (1982) Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J Cell Biol* 92: 79-91.

101. Payraastre B, Missy K, Giuriato S, Bodin S, Plantavid M, et al. (2001) Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *cellsignal* 13: 377-387.
102. Ferguson CG, James RD, Bigman CS, Shepard DA, Abdiche Y, et al. (2005) Phosphoinositide-containing polymerized liposomes: stable membrane-mimetic vesicles for protein-lipid binding analysis. *Bioconjug Chem* 16: 1475-1483.
103. Thapa N, Anderson RA (2012) PIP2 signaling, an integrator of cell polarity and vesicle trafficking in directionally migrating cells. *Cell Adh Migr* 6: 409-412.
104. Wen PJ, Osborne SL, Zanin M, Low PC, Wang HT, et al. (2011) Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat Commun* 2: 491.
105. Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, et al. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* 10: 311-320.
106. Benesch S, Lommel S, Steffen A, Stradal TE, Scaplehorn N, et al. (2002) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem* 277: 37771-37776.
107. Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, et al. (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99: 521-532.
108. Donaldson JG (2003) Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* 278: 41573-41576.
109. Aikawa Y, Martin TF (2003) ARF6 regulates a plasma membrane pool of

- phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *J Cell Biol* 162: 647-659.
110. Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG (2001) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* 154: 1007-1017.
111. Hurley JH, Boura E, Carlson LA, Rozycki B (2010) Membrane budding. *Cell* 143: 875-887.
112. Chukkapalli V, Ono A (2011) Molecular determinants that regulate plasma membrane association of HIV-1 Gag. *J Mol Biol* 410: 512-524.
113. Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP (2000) Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* 74: 8709-8719.

図表



Medina, R. A. and Garcia-Sastre, A. (2011) *Nat Rev Microbiol* 9: 590-603.

図1 インフルエンザウイルスの粒子構造と vRNP 複合体

- (A) ウイルスの粒子構造。脂質二重膜で構成されるウイルスエンベロープに、HA、NA、M2 が膜タンパクとして存在し、エンベロープの内側に M1 タンパクが分布している。ウイルス粒子内に 8 つに分節したウイルスゲノム RNA(vRNA)を有する。
- (B) 複数の NP と一組の PB2,PB1,PA 及び一本の vRNA が結合することで vRNP が形成される

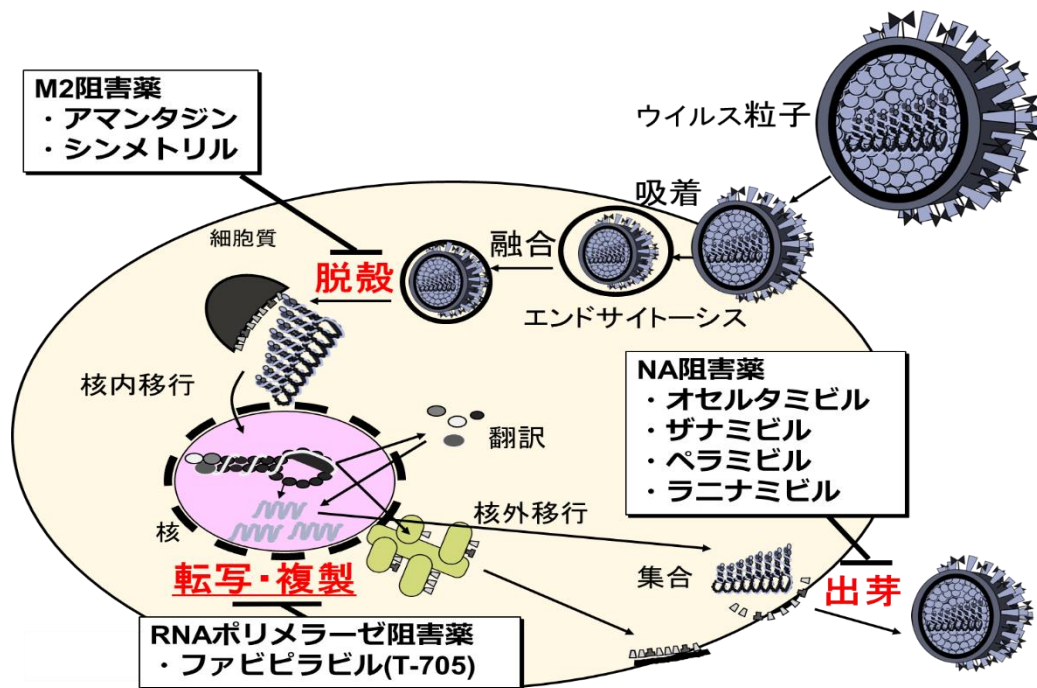
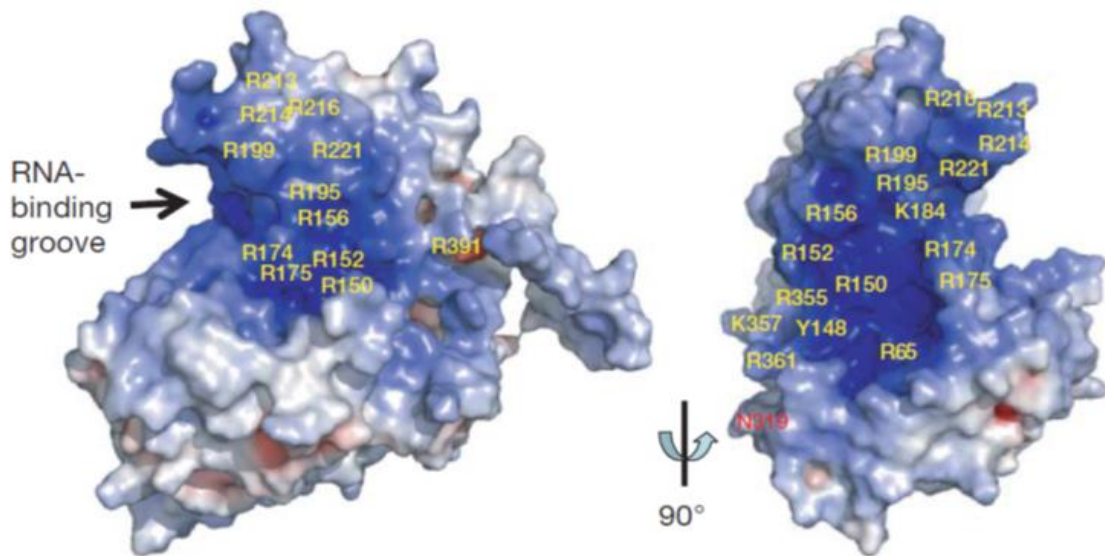


図 2 インフルエンザウイルスのライフサイクルと既存の抗ウイルス薬

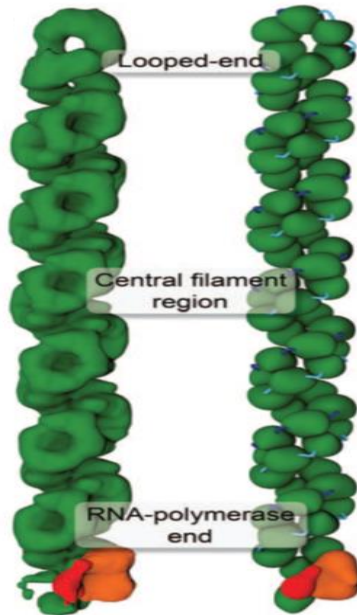
M2 阻害薬は M2 タンパクのイオンチャネルを阻害し、エンドソームからのウイルス粒子の脱殻を阻害する。NA 阻害剤は NA のシアリダーゼ活性を阻害し、ウイルス粒子の宿主細胞からの出芽を阻害する。RNA ポリメラーゼ阻害薬は核酸のアナログとして機能し、ウイルス RNA の転写・複製を阻害する。但し、RNA ポリメラーゼ阻害薬については安全性の面から緊急時のみ使用可能であり、臨床では治療薬として使用することはできない。

(A)



Ye Q, Krug RM, Tao YJ (2006) Nature 444: 1078-1082.

(B)



Moeller A, Kirchdoerfer RN, Potter CS, Carragher B, Wilson IA (2012) Science 338: 1631-1634.

(C)



Arranz R, Coloma R, Chichon FJ, Conesa JJ, Carrascosa JL, et al. (2012) Science 338: 1634-1637.

図 3 NP と vRNP の立体構造

(A) X線結晶構造解析による NP の立体構造。正に荷電している領域を青色、負に荷電している領域を赤色で示す。

(B) 単粒子解析クライオ電子顕微鏡解析による vRNP の立体構造

(C) vRNP 二重らせん構造中の NP の相互作用モデル

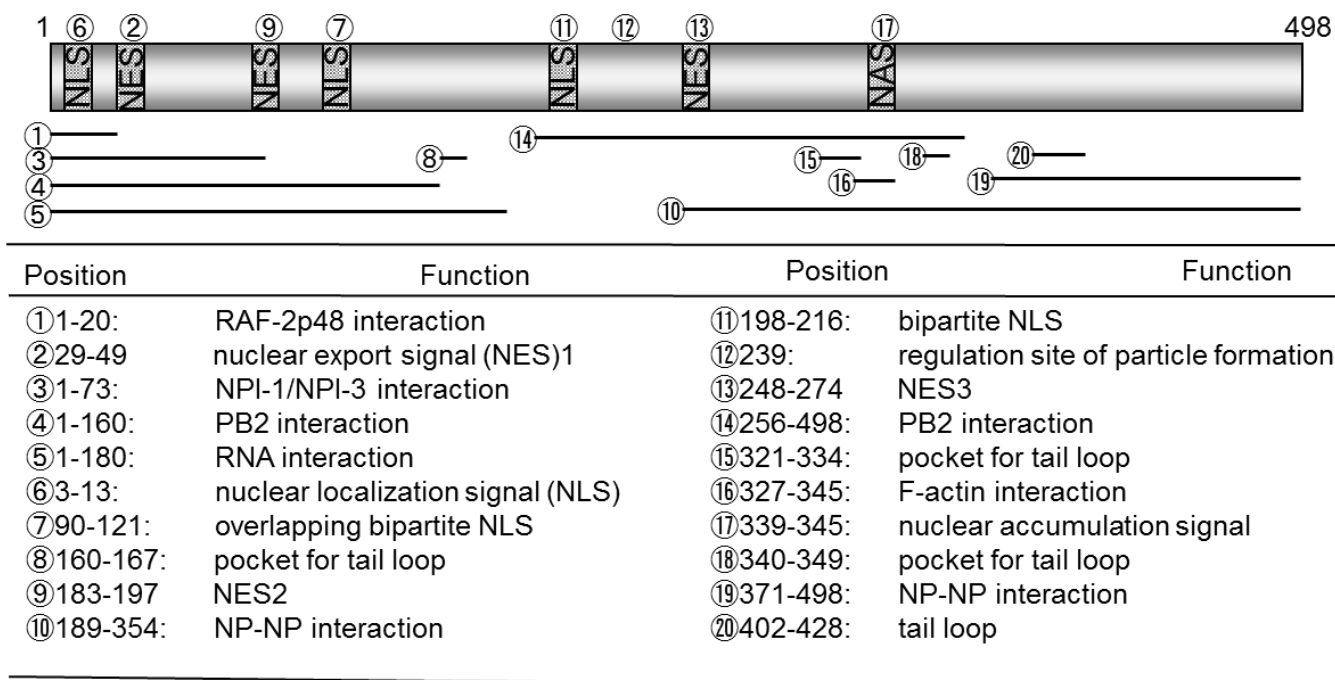
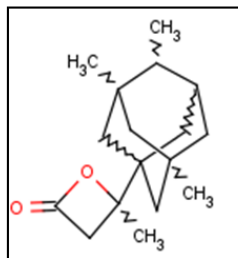


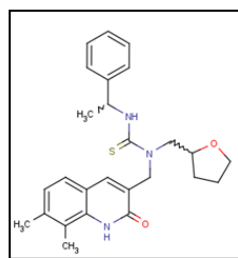
図 4 NP の配列と機能ドメイン

RK-856



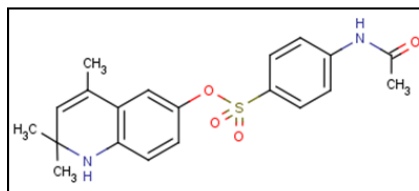
$IC_{50}=2.4 \mu M$

RK-188



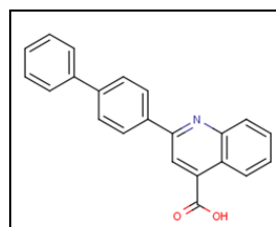
$IC_{50}=2.2 \mu M$

RK-852



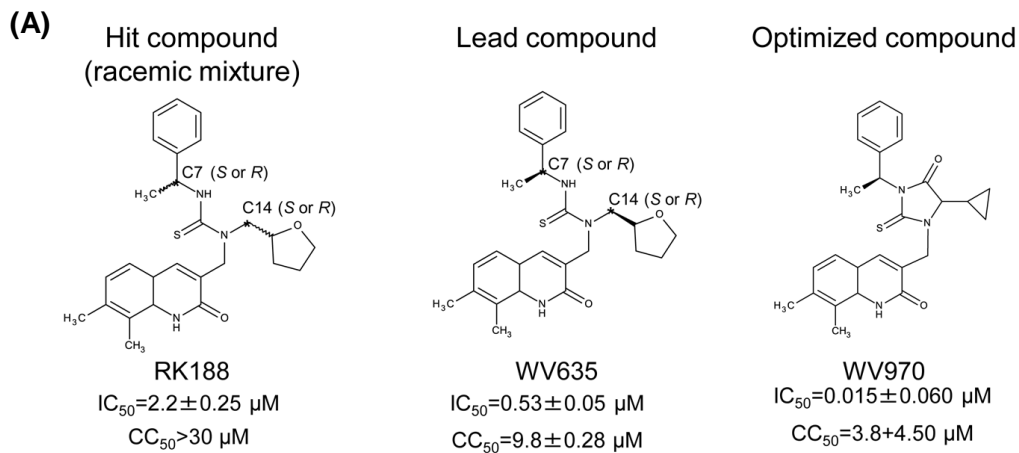
$IC_{50}=1.3 \mu M$

RK-424



$IC_{50}=0.5 \mu M$

図5 ヒット化合物の抗ウイルス活性と化学構造式



(B)

Host cell or Virus strain	WV970			Oseltamivir carboxylate	
	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	SI	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
MDCK	3.8 ± 4.5	-	-	>30	-
A/WSN/1933(H1N1)	-	0.015 ± 0.060	253.3	-	0.012 ± 0.004
A/Udm/307/1972 (H3N2)	-	0.024 ± 0.031	158.3	-	-
A/Ck/yamaguchi /7/2004(H5N1)	-	0.240 ± 0.100	15.8	-	0.570 ± 0.040
A/Anhui/1/2013(H7N9)	-	0.230 ± 0.180	16.5	-	0.600 ± 0.120
B/Yamagata/16/88	-	0.058 ± 0.014	65.5	-	0.098 ± 0.003
B/Nagasaki/1/87	-	0.020 ± 0.030	190.0	-	0.019 ± 0.004
Japanese encephalitis virus Mie/41/2002 strain	-	>30	-	-	-
Dengue virus type 1 NID 02-20 strain	-	>30	-	-	-

図 6 WV970 の *in vitro* 抗ウイルス活性評価

(A) ヒット化合物 RK188、リード化合物 WV635、構造最適化化合物 WV970 の化学構造式、抗ウイルス活性、細胞毒性。

(B) WV970 の *in vitro* 薬効プロファイル。

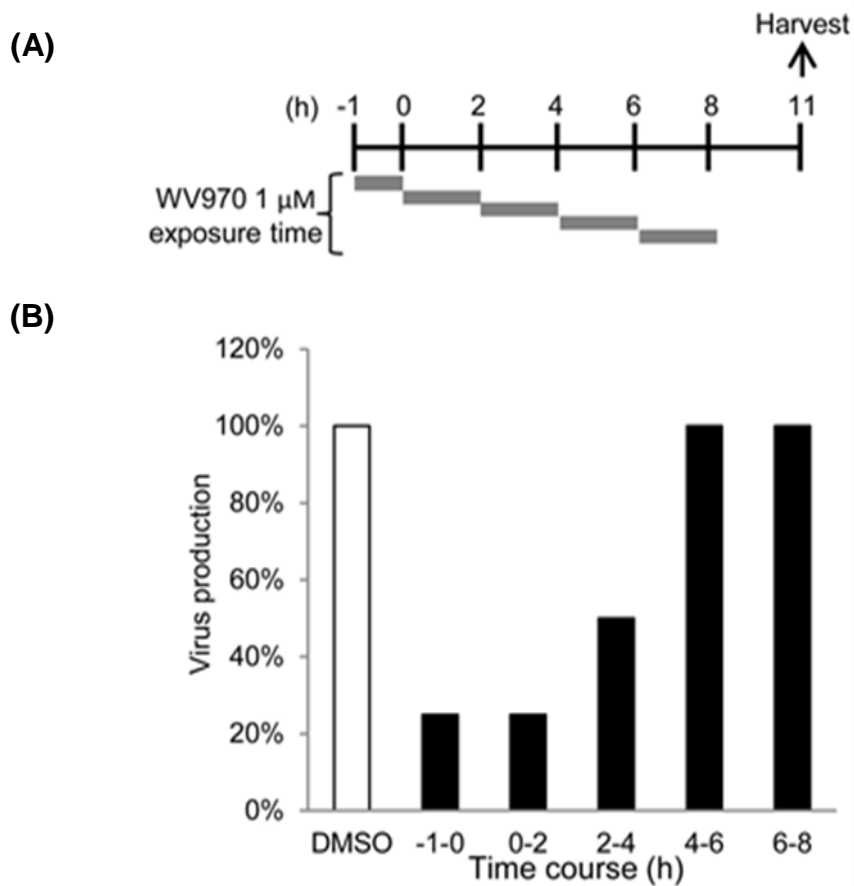


図 7 WV970 のウイルスライフサイクルにおける作用点解析

(A) 1 μ M WV970 を感染時(-1-0)及又は感染後、二時間毎の間隔(0-2、2-4、4-6、6-8)で処理し、細胞を PBS で洗浄後、再び培養培地に置換し、感染培養 11 時間後の培養上清を回収した。

(B) 回収した培養上清中に含まれるウイルス量を段階希釈したニワトリ赤血球と反応させ、HA の凝集反応を指標に定量した。上清中のウイルス量は HA 価で評価し、DMSO 処理を行った感染細胞の培養上清中に含まれるウイルス量を基準に相対評価した。

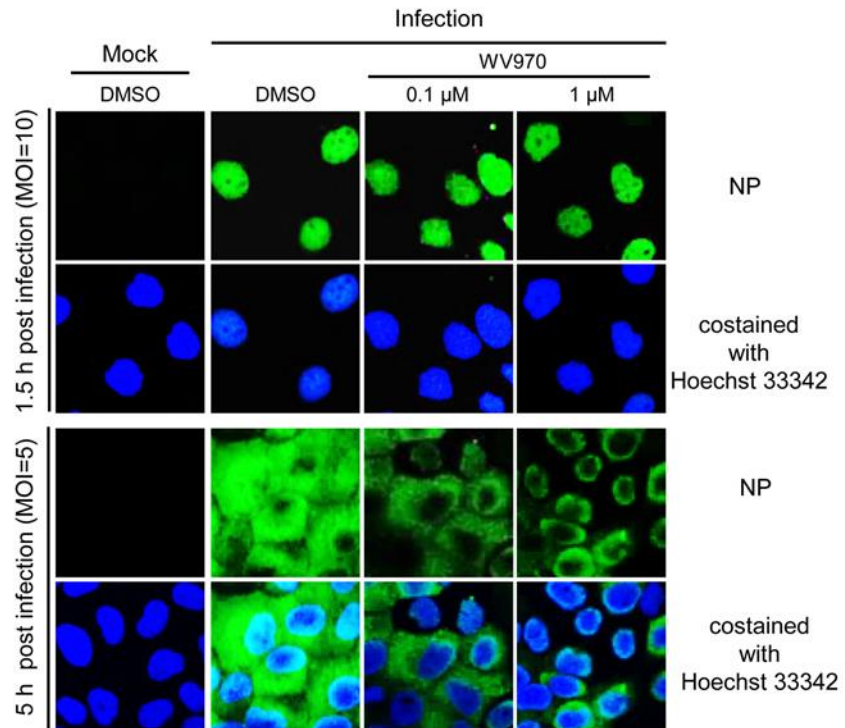


図 8 WV970 による NP の細胞内局在に与える影響

MOI=10 で 1.5 時間、又は MOI=5 で 5 時間それぞれウイルス感染を行った MDCK 細胞中の NP の細胞内局在を免疫染色法により観察した。

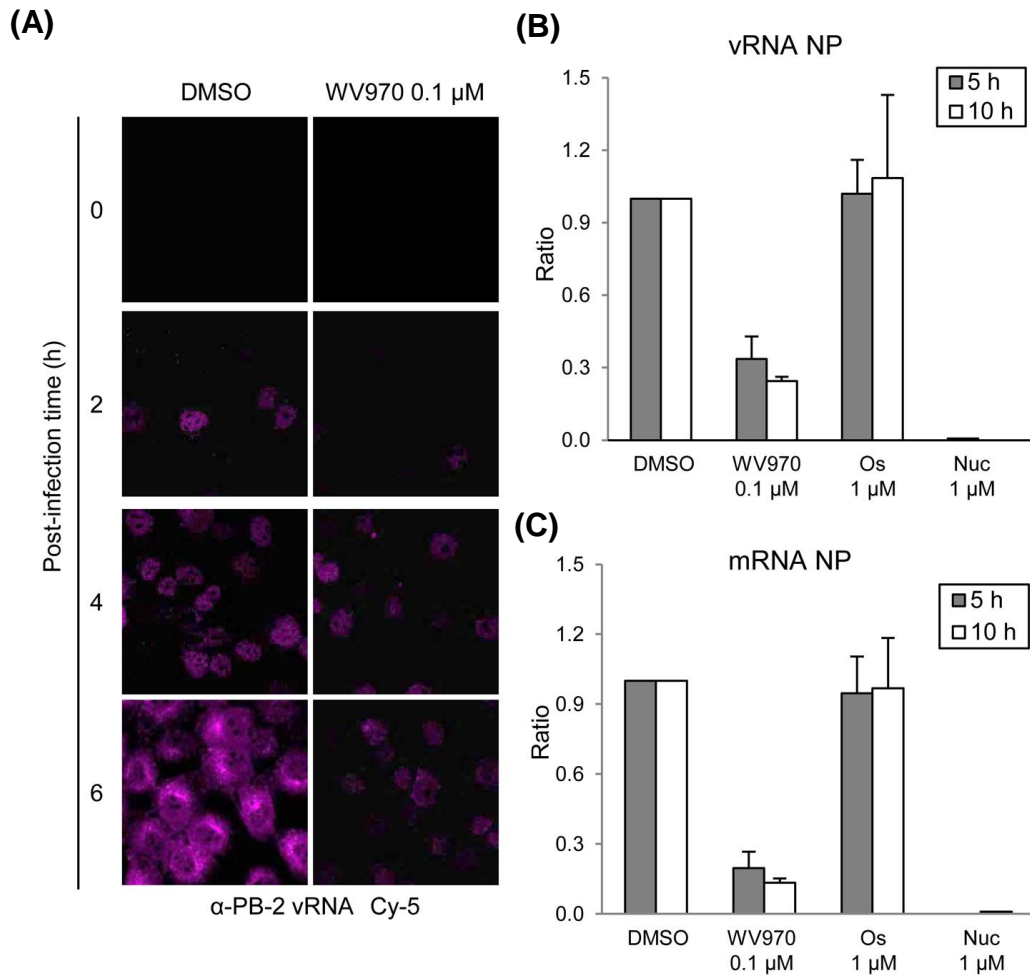


図 9 WV970 のウイルスゲノム転写・複製に与える影響解析

(A) MDCK 細胞に種々濃度に調製した WV970 と共に A/WSN/1933 (H1N1) ウイルスを MOI=5 で感染させた。感染 6 時間後の細胞内のウイルスゲノム RNA を PB2 特異的な FISH プローブを用いて可視化し、RK424 による vRNA の複製に与える影響を解析した。

(B 及び C) MDCK 細胞に種々濃度に調製した化合物と共に A/WSN/1933 (H1N1) ウイルスを MOI=10 で感染させた。感染 5 時間後、又は 10 時間後の細胞内 RNA を抽出し、NP をコードする (B)vRNA 及び (C)mRNA の発現量をそれぞれに配列特異的なプライマーを用いて、qPCR 法により定量した。

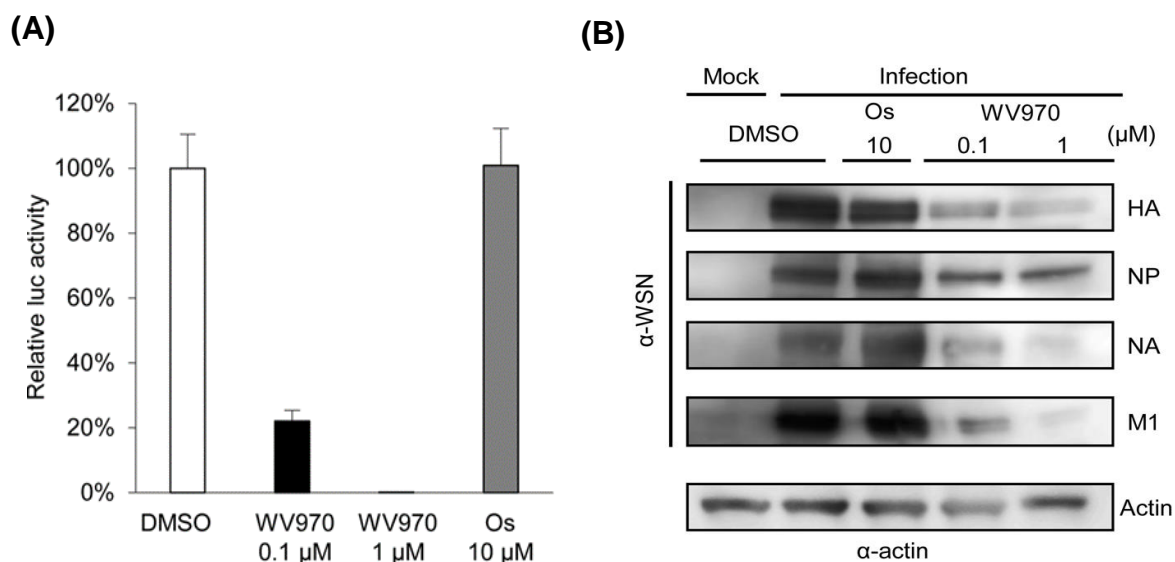
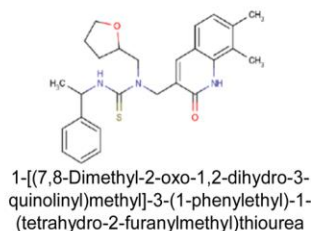


図 10 WV970 のウイルス転写活性およびウイルスタンパク発現に与える影響解析

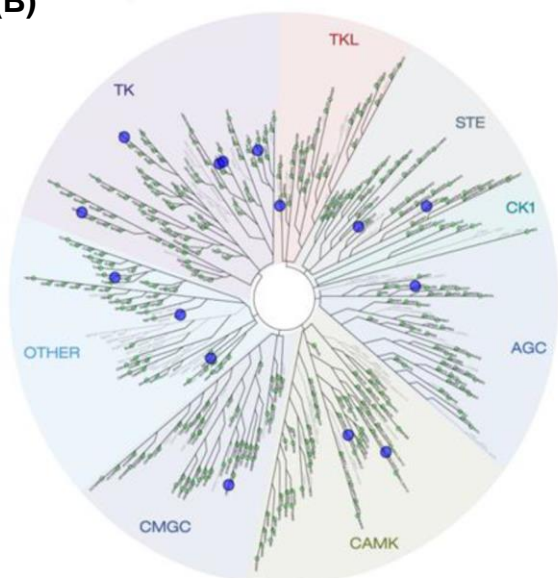
- (A) HEK293T 細胞に PB2/pCAGGS1、PB1/pCAGGS、PA/pCAGGS、NP/pCAGGS 及び vNP-luc/pHH21 をトランスフェクションし、種々の濃度に調製した化合物と共に 37°C で 48 時間培養した。培養後の細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定し、化合物の転写活性に与える影響を評価した。
- (B) MDCK 細胞に種々濃度に調製した化合物と共に A/WSN/1933 (H1N1) ウイルスを MOI=10 で感染させた。感染 18 時間後の細胞を回収し、抗 WSN 血清を用いた Western blot 法により、細胞内ウイルスタンパクの発現を解析した。

(A)



Category	Target	PDB Code	LASSO Score
Kinases	SRC, tyrosine kinase SRC	2src	0.81
Kinases	PDGFrb, platelet derived growth factor receptor kinase	N/A	0.7
Nuclear Hormone Receptors	GR, glucocorticoid receptor	1m2z	0.6
Kinases	FGFr1, fibroblast growth factor receptor kinase	1agw	0.39
Kinases	CDK2, cyclindependent kinase 2	1ckp	0.21

(B)



KINOMESCAN Gene Symbol	Entrez Gene Symbol	Assay Group	%Ctrl
RSK2(Kin.Dom.2-C-terminal)	RPS6KA3	CAMK	22
RIPK5	DSTYK	OTHER	29
DCAMKL1	DCLK1	CAMK	30
EPHB2	EPHB2	TK	36
JAK2(JH1domain-catalytic)	JAK2	TK	39
LYN	LYN	TK	40
OSR1	OXSR1	STE	40
MAP3K1	MAP3K1	STE	42
NDR1	STK38	AGC	43
SBK1	SBK1	OTHER	43
ULK1	ULK1	OTHER	43
IRAK4	IRAK4	TKL	47
INSR	INSR	TK	48
TYK2(JH1domain-catalytic)	TYK2	TK	48
HIPK2	HIPK2	CMGC	49

図 11 Chmespider を用いた WV635 の標的探索と WV970 のキナーゼ阻害活性評価

(A) WV635 の立体構造(左図)を基に、構造類似性探索データベースである Chmespider を用いて、WV635 の標的タンパクの検索を行った(右図)。

(B) 50nM WV970 の 456 種類のキナーゼに対する競合阻害活性を Kinomescan により評価した。競合阻害活性が認められたキナーゼを樹状図(左図)及び表(右図)に示した。

Host cells or Virus strains	IC ₅₀ (μ M)	IC ₉₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)
A/WSN/1933(H1N1)	0.48±0.19	1.19±0.36	-
A/Udorn/307/1972 (H3N2)	0.49±0.19	1.23±0.24	-
A/Ck/yamaguchi/7/2004 (H5N1)	0.57±0.04	0.93±0.02	-
A/Anhui/12013 (H7N9)	0.60±0.12	1.14±0.26	-
A/Massachusetts/3740/1965 (H6N2)	0.59±0.09	1.59±0.12	-
A/Ontario/6118/1968 (H8N4)	0.49±0.04	0.91±0.02	-
A/Germany/N/1949 (H10N7)	0.58±0.14	1.09±0.08	-
A/England/1/1956 (H11N6)	0.57±0.16	0.94±0.02	-
A/Alberta/60/1976 (H12N5)	0.62±0.23	1.51±0.87	-
A/Astrakhan/263/1982 (H14N15)	0.42±0.06	0.95±0.01	-
A/Tex/131 (H3N2)	0.59±0.13	0.98±0.02	-
A/Tex/131 E119V (H3N2)	0.63±0.08	1.46±0.02	-
A/California/7/2009	0.40±0.07	0.88±0.02	-
MDCK	-	-	>50

表 1 RK424 の各亜型に対する *in vitro* 抗ウイルス活性と細胞毒性評価

PK parameters of intraperitoneal and oral administration of RK424								
	C_{max} (ng/mL)	$C_{free\ max}$ (ng/mL)	T_{max} (h)	* $t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-24\ h}$ (ng · h / mL)	Vd (mL / kg)	Relative bioavailability (%)	Plasma protein binding rate (%)
intravenous administration (1 mg/kg RK424)	2850	11.4	0.25	3.58	10600	368	-	
intraperitoneal administration (10 mg/kg RK424)	39200	156.8	0.25	5.86	140000	583	100	99.6
oral administration (10 mg/kg RK424)	11600	46.4	0.50	2.88	66100	626	47.2	

* $t_{1/2}$ is calculated using plasma concentration of RK424 from 4 to 24 h.

C_{max} = maximum concentration during the dosing interval; $C_{free\ max}$ = maximum concentration free from plasma proteins during the dosing interval; T_{max} = time of maximum concentration; $t_{1/2}$ = time taken for half of the dose to be eliminated or metabolised; AUC_{0-12h} = area under the plasma concentration time curve from 0-24 h; Vd= volume of distribution.

表 2 RK424 の薬物動態パラメーター

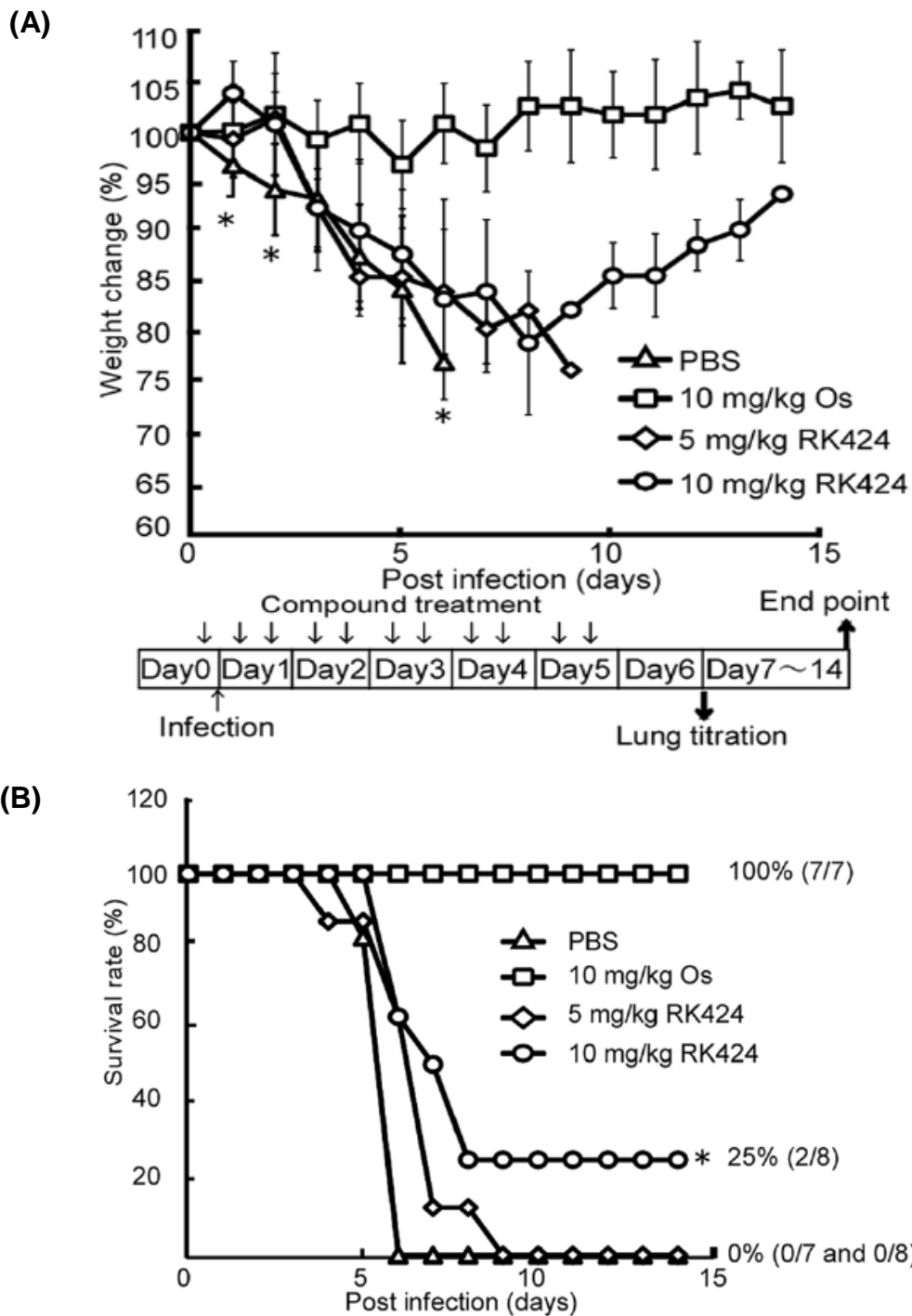


図 12 RK424 腹腔内投与によるマウス *in vivo* 薬効評価

(A) 6 週齢 BalbC マウスにウイルス感染 2 時間前に PBS または化合物を腹腔内投与し、以後ウイルス感染 5 日目まで、毎日二回化合物を腹腔内投与した。感染 6 日目以降 14 日目まで毎日体重測定し、体重が 20% 以上減少した個体を人道的エンドポイントとして安楽死させた。

(B) 体重が 20% 以上減少した個体を除いた割合を生存率として評価した。

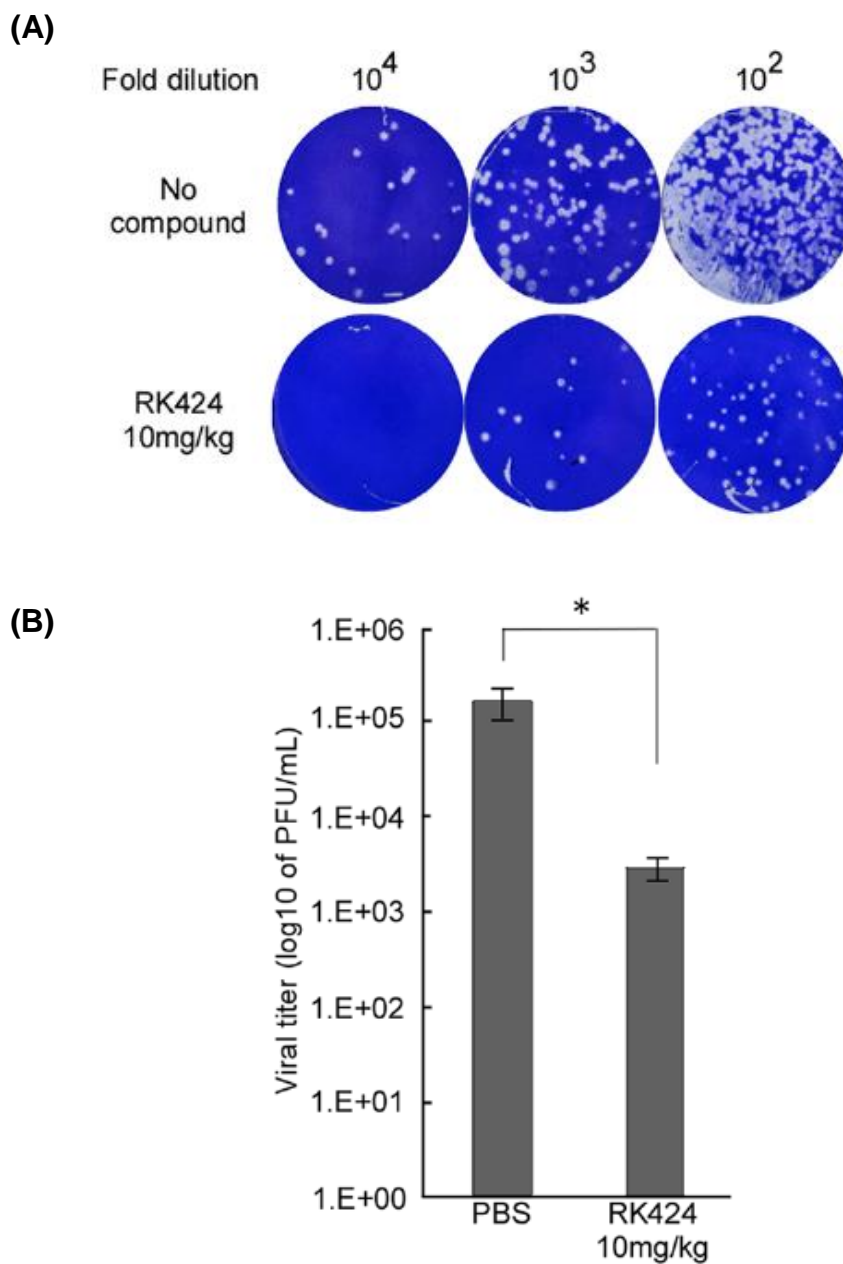


図 13 RK424 腹腔内投与時のマウス肺中ウイルス量の定量

(A) PBS (No compound)及び RK424 投与後 6 日後のマウスから肺を摘出し、PBS 1mL と共に乳鉢ですり潰したサンプルの上清を回収した。回収した上清を PBS で段階希釈し、MDCK 細胞と共に 2 日間感染培養した細胞を 0.5%クリスタルバイオレットで染色し、プラーク数をカウントした。

(B) プラークアッセイにより、カウントしたプラーク数からウイルス量を定量化した。

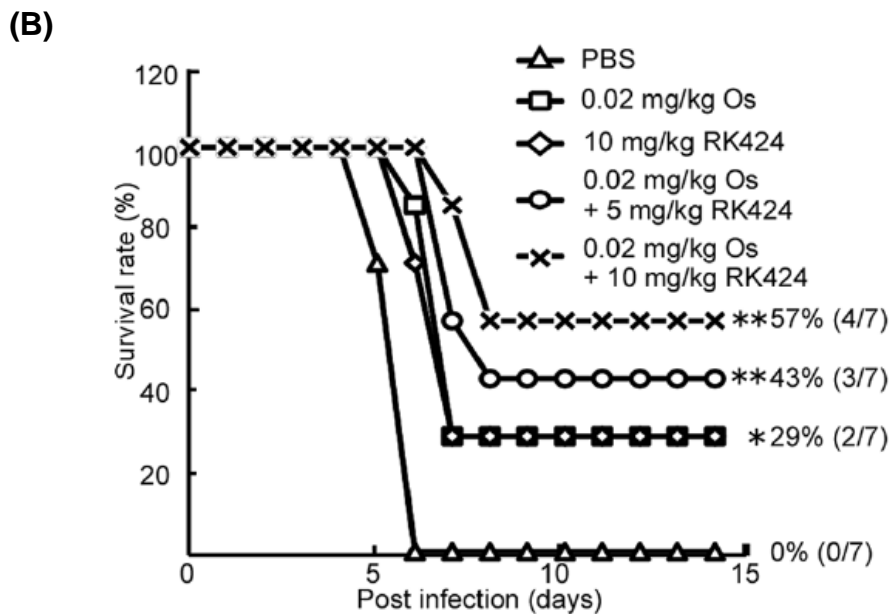
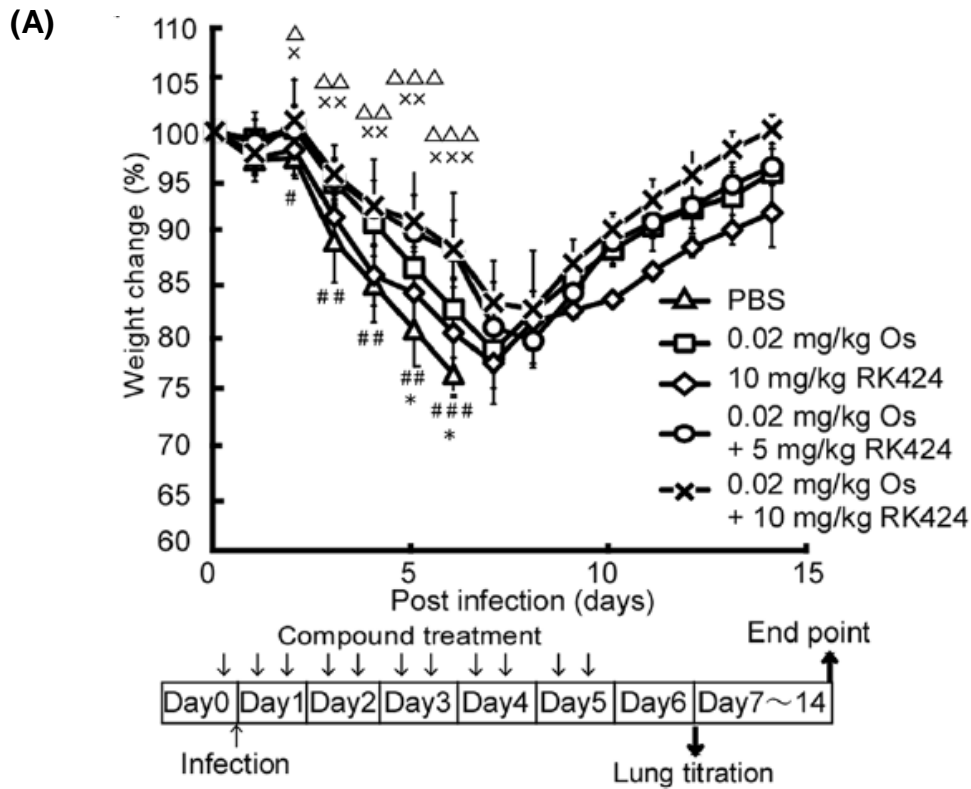


図 14 RK424 及び Oseltamivir 腹腔内併用投与時のマウス *in vivo* 薬効評価

(A) 6 週齢 BalbC マウスにウイルス感染 2 時間前に PBS または化合物を腹腔内投与し、以後ウイルス感染 5 日目まで、毎日二回化合物を腹腔内投与した。感染 6 日目以降 14 日目まで毎日体重測定し、体重が 20% 以上減少した個体を人道的エンドポイントとして安楽死させた。

(B) 体重が 20% 以上減少した個体を除いた割合を生存率として評価した。

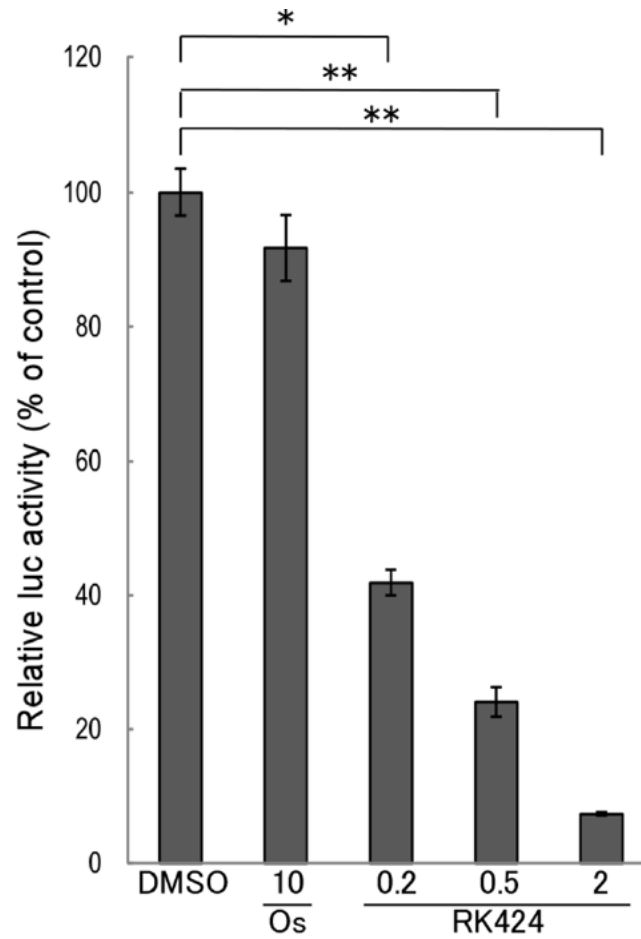


図 15 Replicon アッセイによる RK424 の転写活性に与える影響解析

HEK293T 細胞に PB2/pCAGGS、PB1/pCAGGS、PA/pCAGGS、NP/pCAGGS 及び vNP-luc/pHH21 をトランスフェクションし、種々の濃度に調製した化合物と共に 37C で 48 時間培養した。培養後の細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定し、化合物の転写活性に与える影響を評価した。

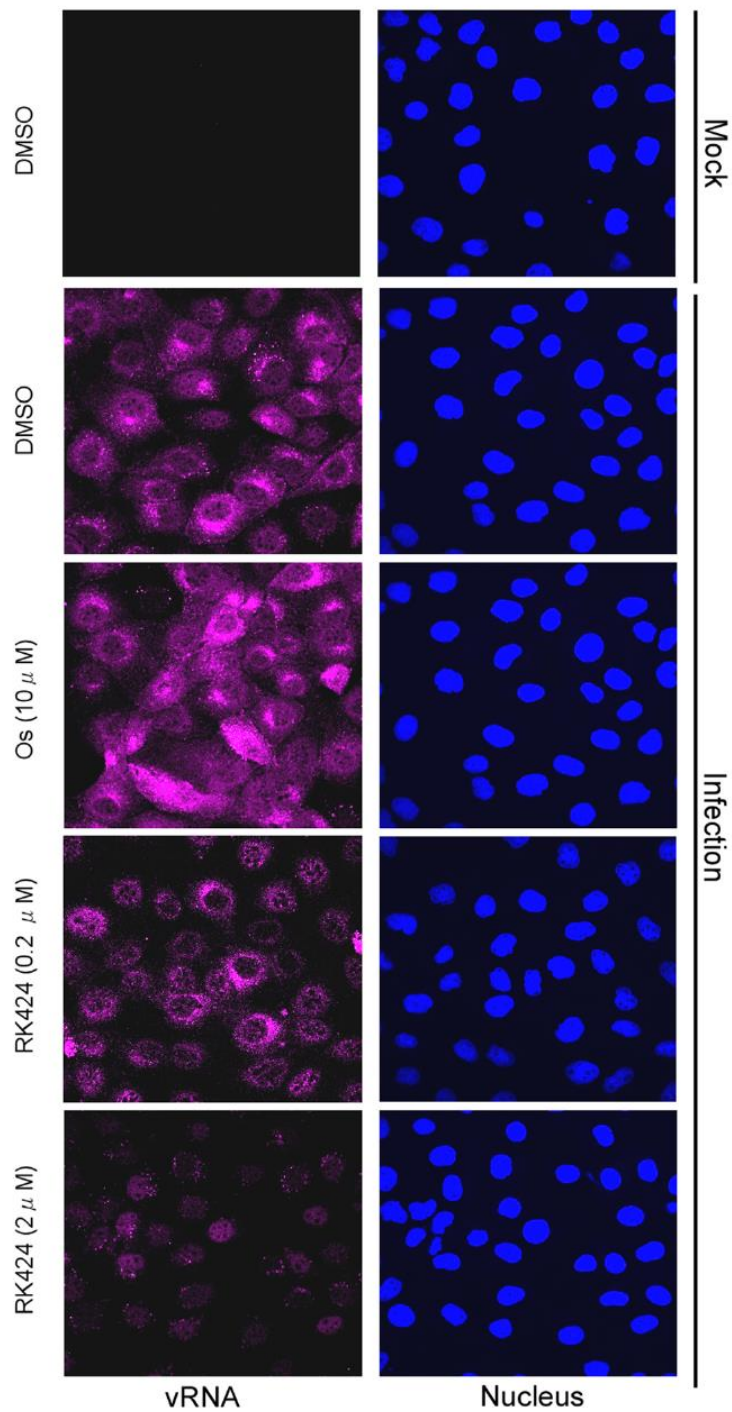


図 16 FISH 法による RK424 の vRNA の複製に与える影響解析

MDCK 細胞に種々濃度に調製した化合物と共に A/WSN/1933 (H1N1) ウイルスを MOI=5 で感染させた。感染 6 時間後の細胞内の vRNA を PB2 特異的な FISH プローブを用いて可視化し、RK424 による vRNA の複製に与える影響を解析した。

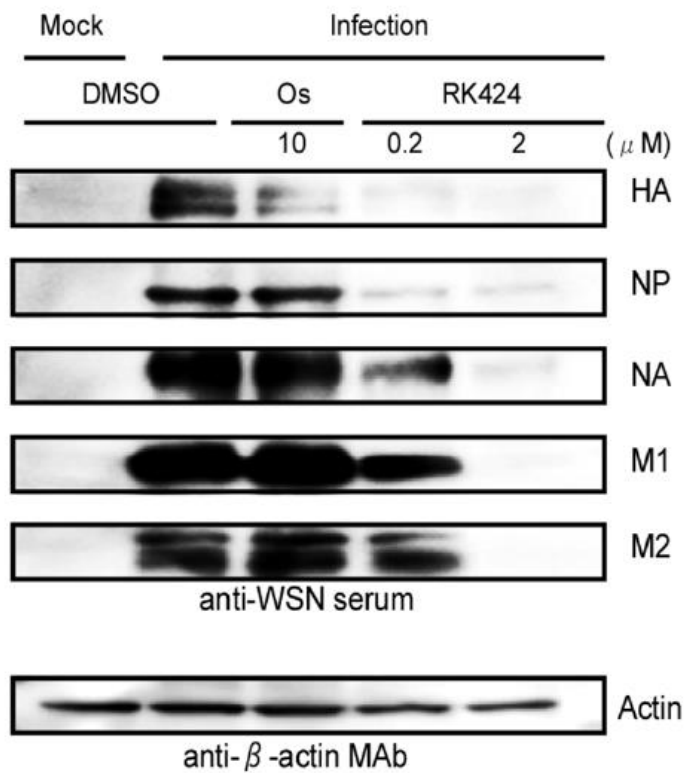


図 17 Western blot 法による RK424 のウイルスタンパク発現に与える影響解析

MDCK 細胞に種々濃度に調製した化合物と共に A/WSN/1933 (H1N1) ウイルスを MOI=1 で感染させた。感染 18 時間後の RK424 によるウイルスタンパク発現に与える影響を抗 WSN 血清を用いた Western blot 法により解析した。

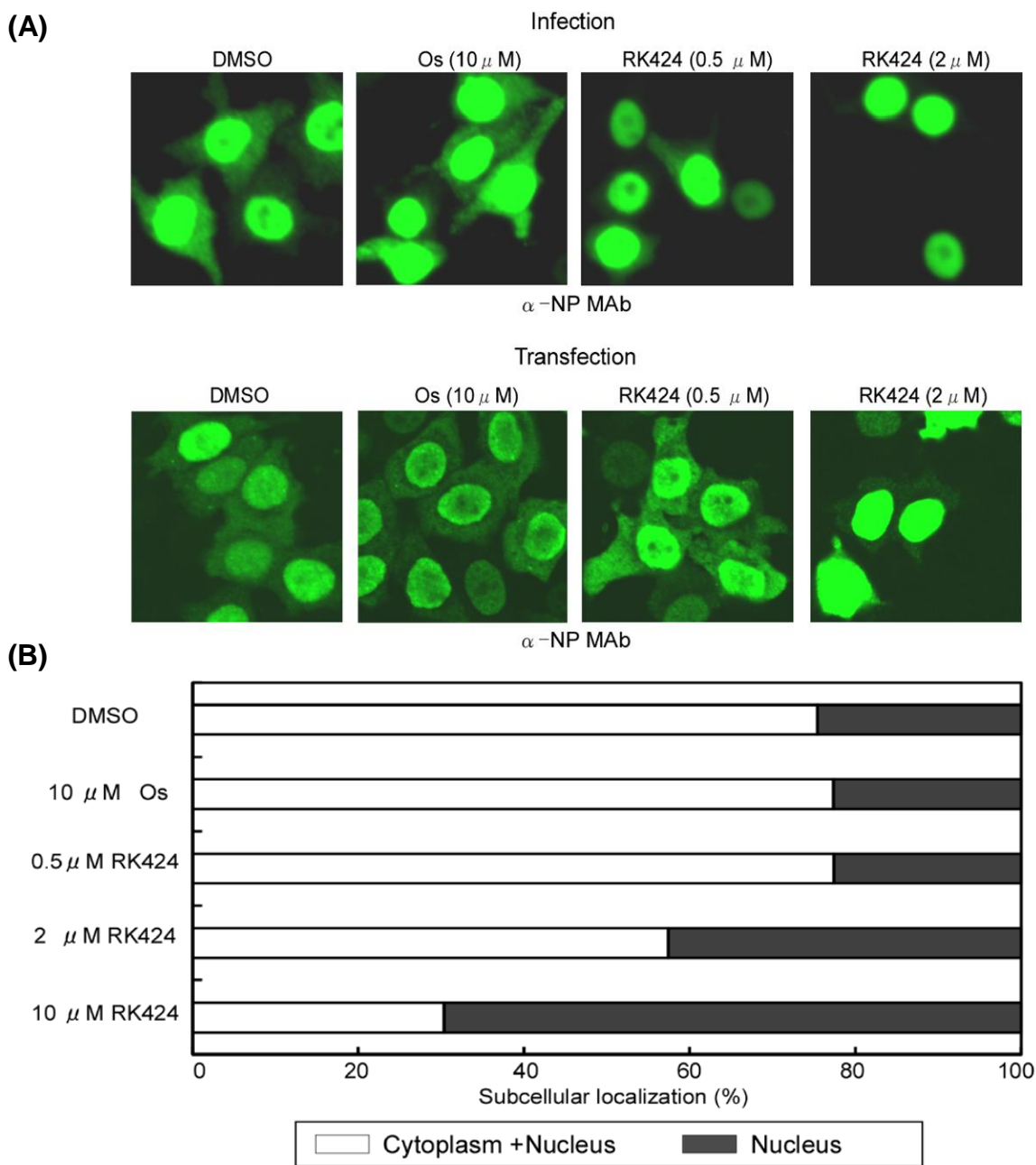


図 18 免疫染色法による RK424 の NP 細胞内局在に与える影響解析

(A) HeLa 細胞に A/WSN/1933 (H1N1) ウイルス株を MOI=10 で感染、または NP/pCAGGS をトランスフェクションし、試験化合物と共に 37°C で 48 時間培養した。抗 NP モノクローナル抗体及び Alexa Fluor 488-抗マウス IgG 抗体を用いて NP を可視化し、hoechst 33342 により核を染色した。調製した観察用サンプルの NP 細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(B) HeLa 細胞に NP/pCAGGS をトランスフェクションし、試験化合物と共に 37°C で 48 時間培養した細胞中の NP 細胞内局在を任意に 500 細胞観察し、核と細胞質に局在が認められるものと核にのみ強く局在が認められるものの割合を算出した。

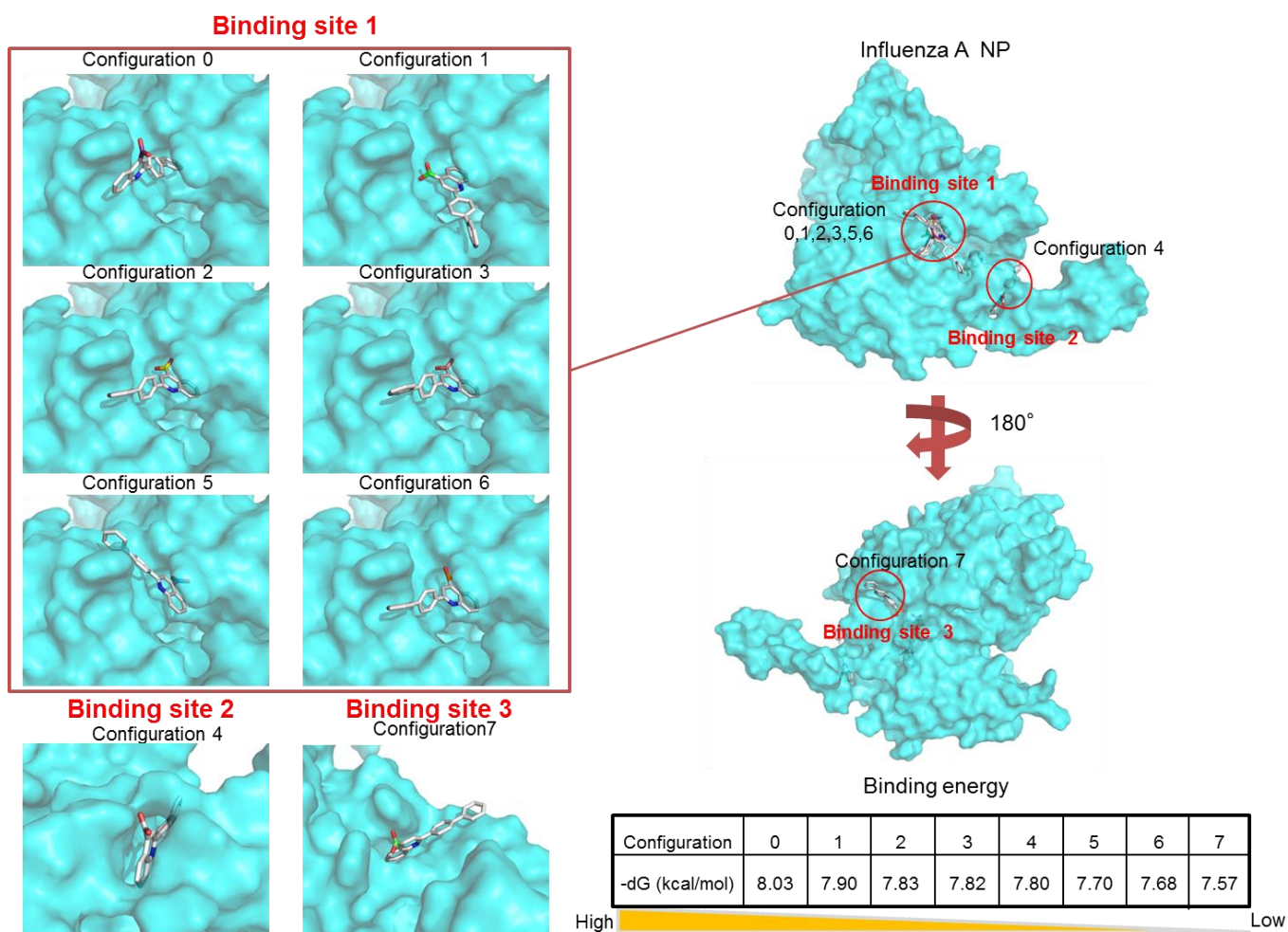
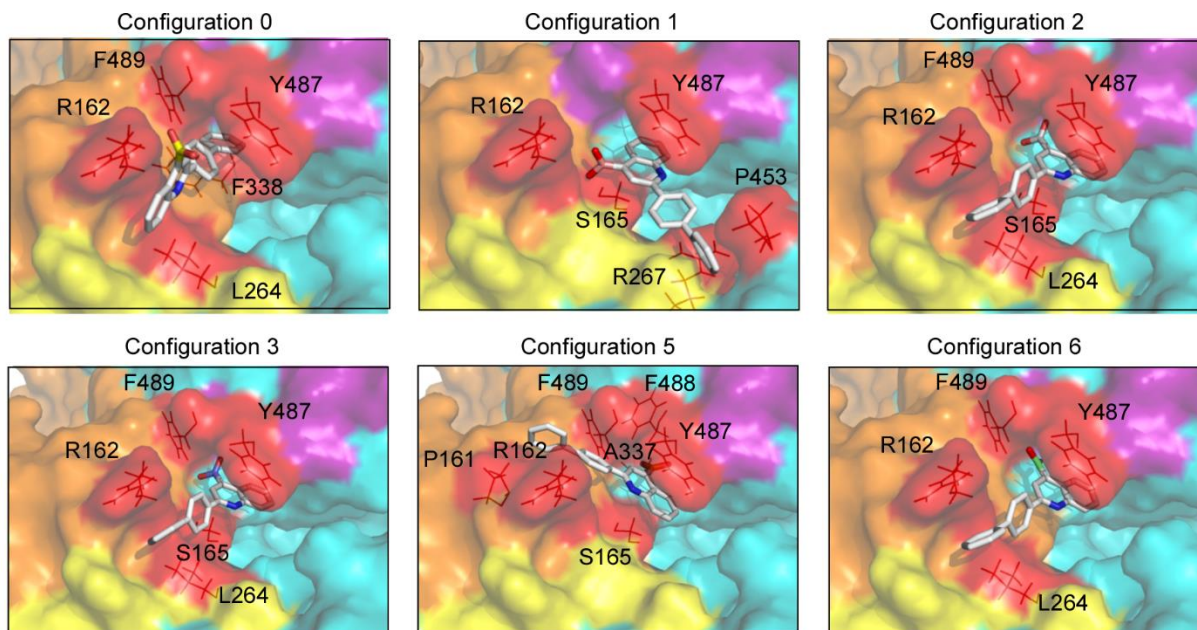


図 19 RK424 と NP のドッキングシュミレーションによる RK424 結合サイトの予測と各結合モデルにおける RK424 の立体配座及び結合エネルギーの算出

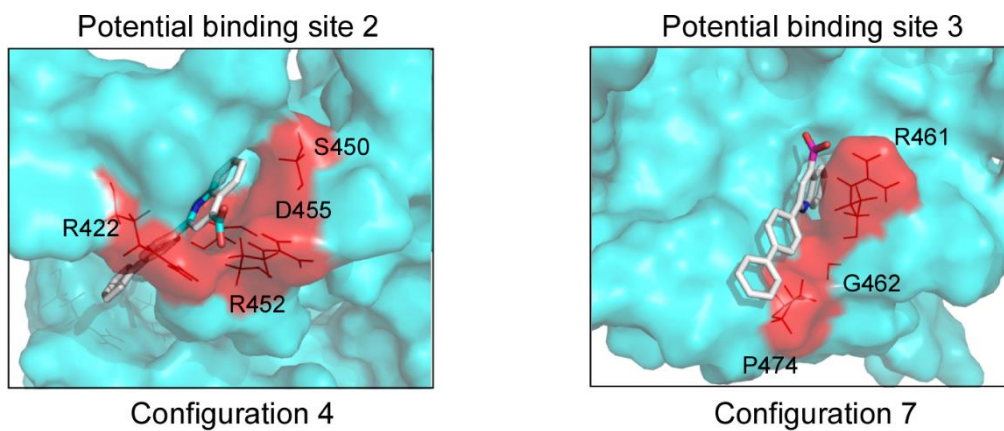


Perspective interaction map between RK424 and amino acid residues at binding site 1

	P161	R162	S165	L264	R267	A337	F338	P453	Y487	F488	F489
RK424 configuration No. 0		H		VDW			VDW		Arene-H		VDW
1		VDW	H		VDW			VDW	Arene-H		
2		VDW	Arene-H	VDW					Arene-arene		H
3		VDW	Arene-H	VDW					Arene-arene		H
5	VDW	VDW	Arene-H			VDW			H	H	VDW
6		VDW		VDW					Arene-arene		H

H : Hydrogen bond VDW : Van der Waals interaction Ion : Ionic bond Arene-arene : π - π interaction Arene-H : π -CH interaction

図 20 NP 結合サイト 1 に対する RK424 の立体配座と結合様式



Amino acid residue	Binding site 2				Binding site 3		
	R422	S450	R452	D455	R461	G462	P474
Mutant population	2272	3272	3732	2256	2	2	6
Conservation ratio (%)	70.43	57.41	51.43	70.64	99.97	99.97	99.92
Prospective binding force with RK424	Ion	VDW	Ion, H	VDW	H	H	VDW

H : Hydrogen bond VDW : Van der Waals interaction Ion : Ionic bond

図 21 NP 結合サイト 2 及び 3 に対する RK424 の立体配座、結合様式及び相互作用部位のアミノ酸保存率。

(A)

(B)

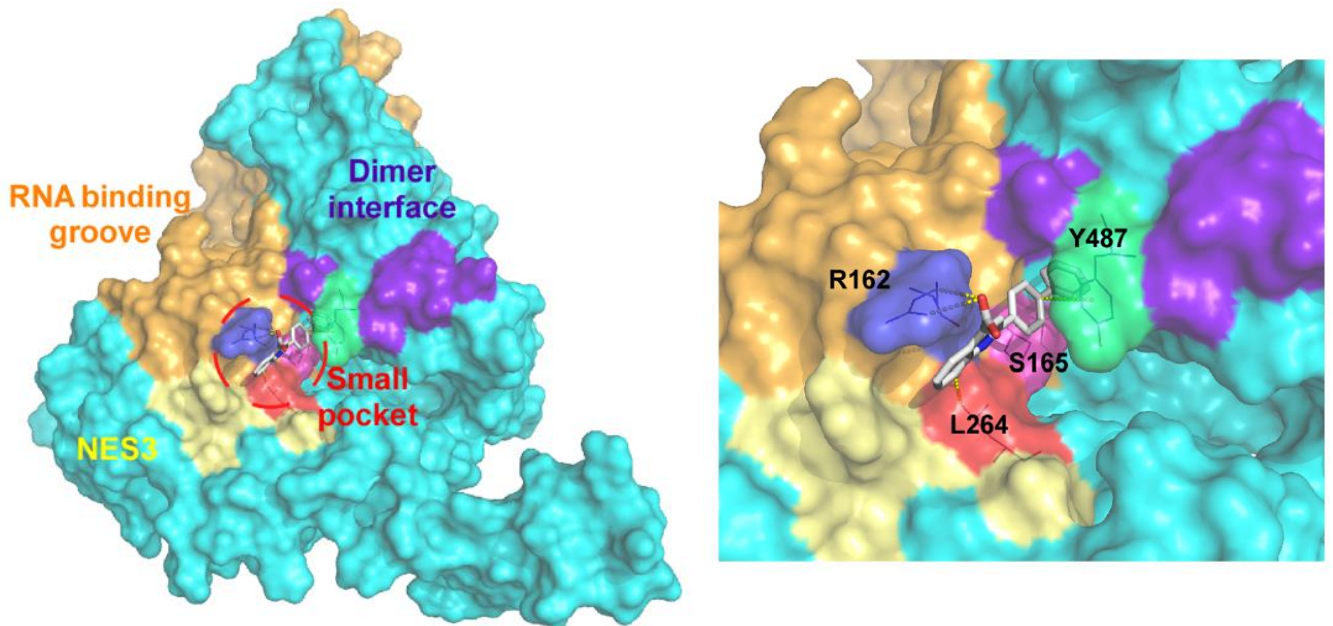


図 22 RK424(configuration 0)と NP の結合サイト 1 に対する結合予測モデル

- (A) 最も高い結合エネルギーを示した RK424 の立体配座(configuration0)と NP の結合サイト 1 に対する結合予測モデル。核外移行シグナル(NES) (黄色:アミノ酸 256–266 位)、RNA 結合グルーブ (橙色:アミノ酸 1–180 位)、及び NP-NP 相互作用 (紫: アミノ酸 482–489 位)を NP 表面構造上に示した。RK424 結合サイトは赤枠で提示した。
- (B) RK424 結合部位の拡大図。 RK424 との結合が想定される NP のアミノ酸残基をそれぞれ青色(R162)、桃色(S165)、赤色 (L264)及び緑色(Y487)で提示した。

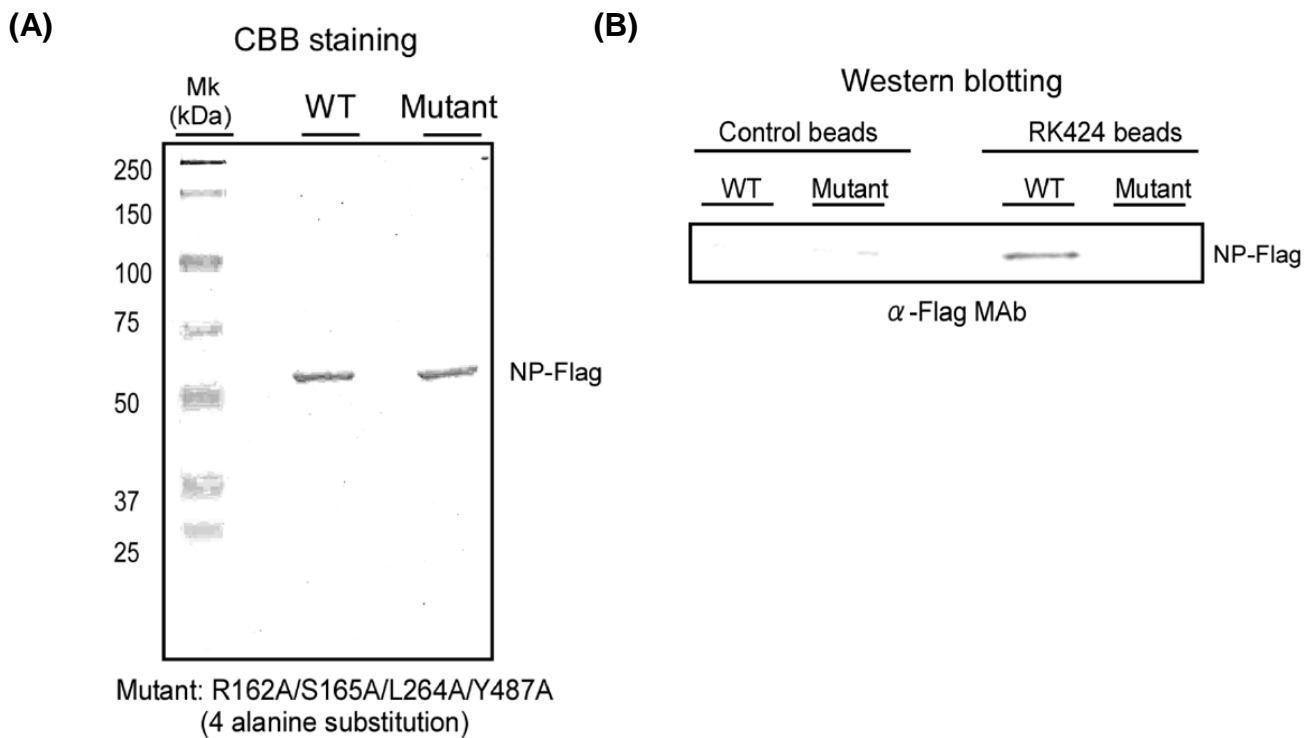
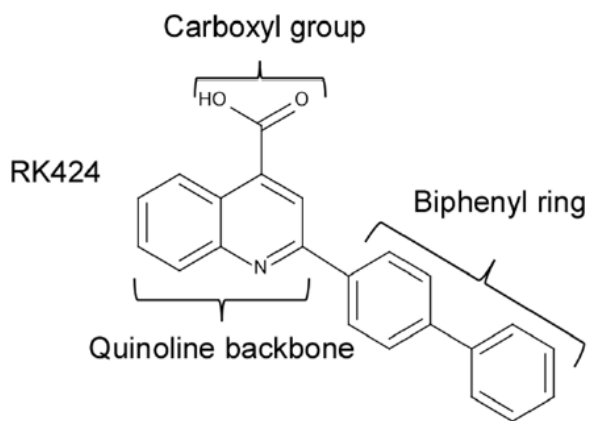


図 23 NP と RK424 化合物ビーズの結合解析

- (A) HEK293T 細胞に NP-FLAG WT/pCAGGS または NP-FLAG MT (S162A R165A, L264A 及び Y487A)/pCAGGS をトランスフェクションし、48 時間培養後の細胞を lysis buffer で可溶化し、抗 FLAG-agarose beads と 3×FLAG peptide を用いて NP-FLAG WT 及び NP-FLAG MT タンパクを精製した。精製したタンパクの純度を CBB 染色により確認した。
- (B) 精製した WT 及び MT NP タンパクを RK424 固定化化合物ビーズと反応させ、洗浄後の化合物ビーズを sample buffer と共に熱変性させた。熱変性によりビーズから分離した NP タンパクを抗 NP 抗体を用いて、Western blot 法により検出した。



Compound	Structure	IC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)
Analog #1		10.13 ±2.07	>10
Analog #2		>30	>10
Analog #3		>30	>10
Analog #4		0.43 ±0.15	>10

図 24 RK424 の構造活性相関解析

RK424 のカルボキシル基、キノリン骨格、ビフェニル環を変換した RK424 誘導体#1~4 の細胞毒性(CC₅₀)と抗ウイルス活性(IC₅₀)を WST-1 アッセイ及びプラークアッセイによりそれぞれ評価した。

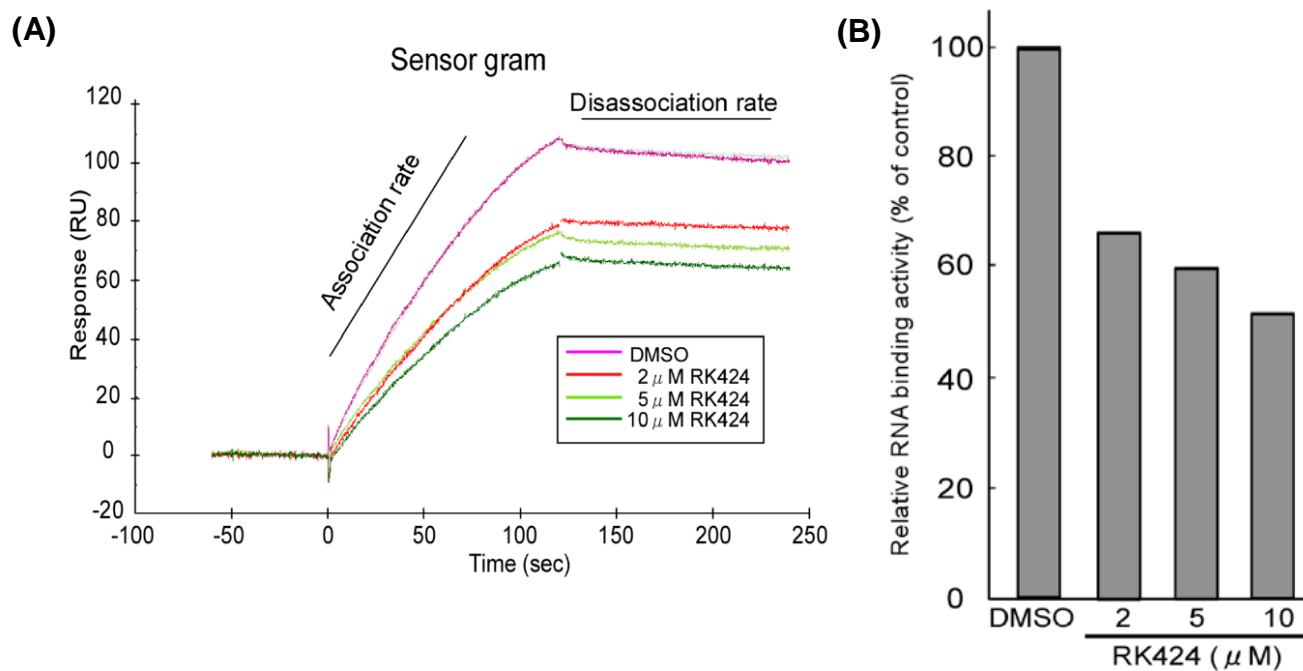


図 25 SPR 法による NP と RK424 の結合解析

(A) RK424 存在下での NP と RNA の結合センサーグラム

(B) RK424 存在下での RU 値を基にした NP と RNA の結合量の定量解析

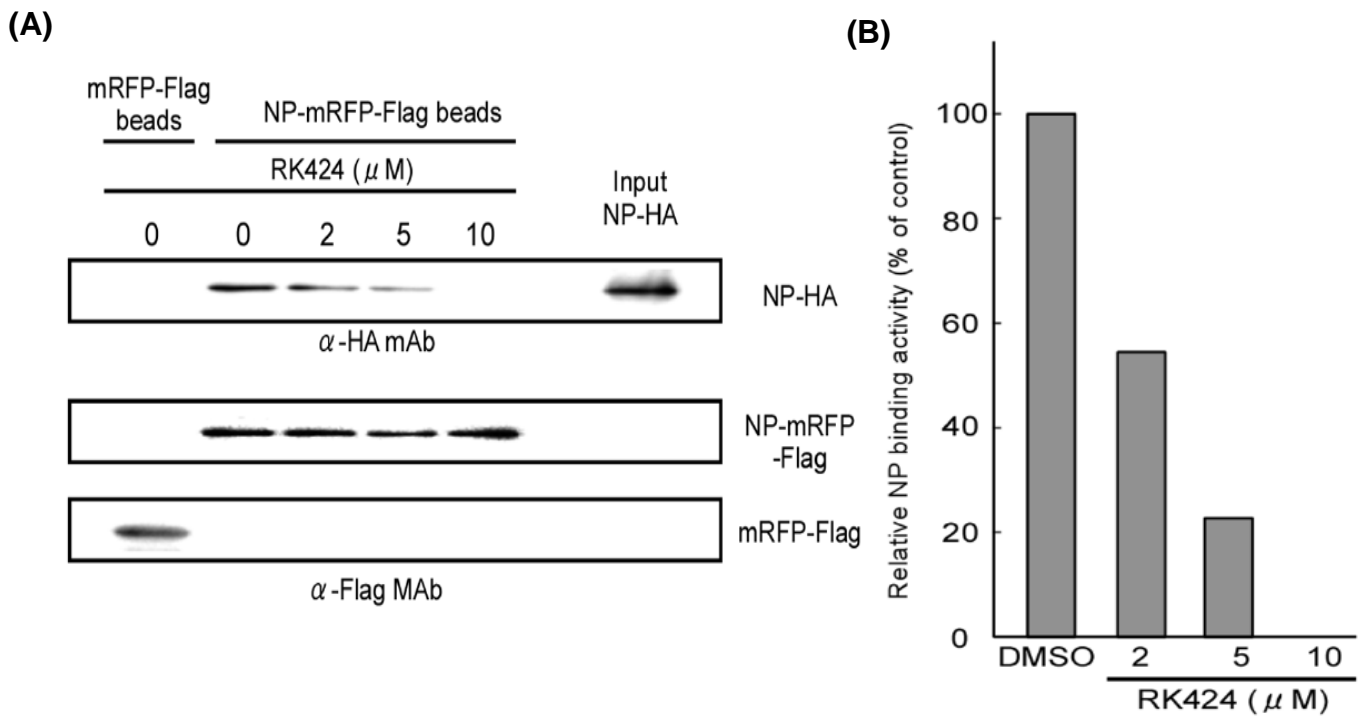


図 26 RK424 による NP-NP 間の結合に与える影響解析

- (A) 精製した NP-HA と FLAG アガロースビーズに固定化した mRFP-Flag または NP-mRFP-Flag を反応させ、洗浄後のビーズをサンプルバッファーと共に熱変性させた。熱変性によりビーズから分離した NP タンパクを抗 HA 及び抗 FLAG 抗体を用いた Western blot 法により検出した。
- (B) ビーズに結合した HA-NP タンパクの結合量を、Western blot により検出したバンドの intensity を定量化し、DMSO 処理をした HA-NP タンパクの結合量に対する RK424 処理した HA-NP タンパクの結合量を相対的に評価した。

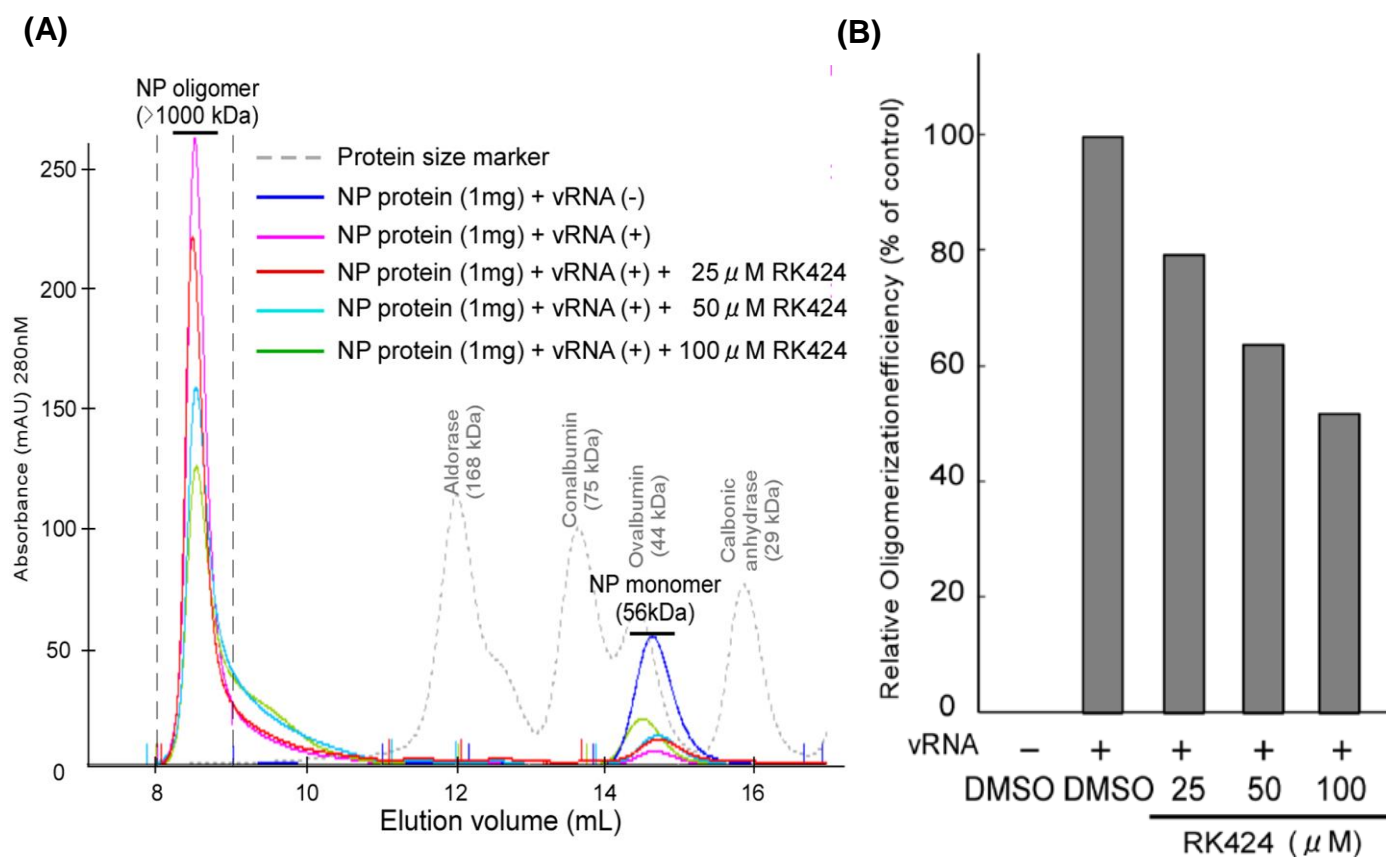


図 27 RK424 による NP オリゴマー形成に与える影響解析

- (A) 大腸菌発現システムにより精製した NP タンパクと *in vitro* transcription により合成した vRNA 及び DMSO または RK424 を共に反応させた。反応後のサンプルをゲルろ過カラムによりサイズ分画した。ゲルろ過カラムにより分画した溶出ピーク面積を Aktapurifier を用いて解析した。
- (B) NP オリゴマー画分のピーク面積を算出し、DMSO 処理条件のピーク面積に対する RK424 処理サンプルのピーク面積を相対的に評価した。

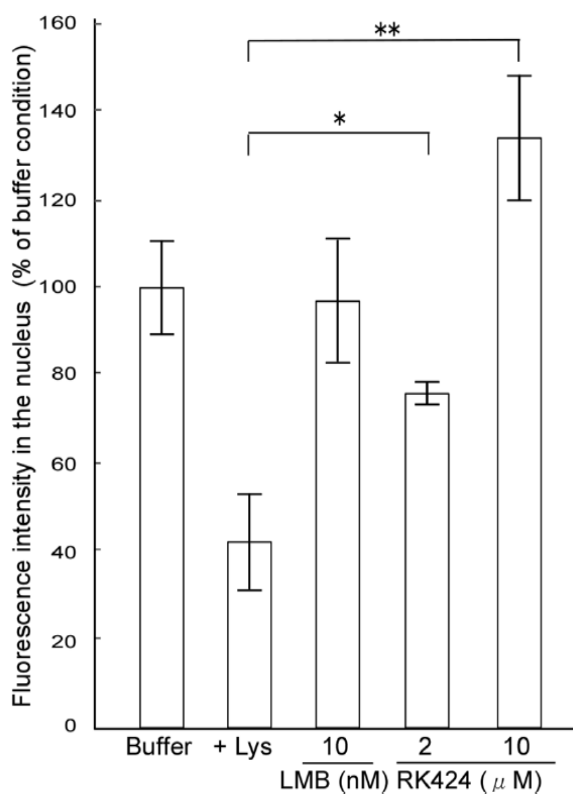
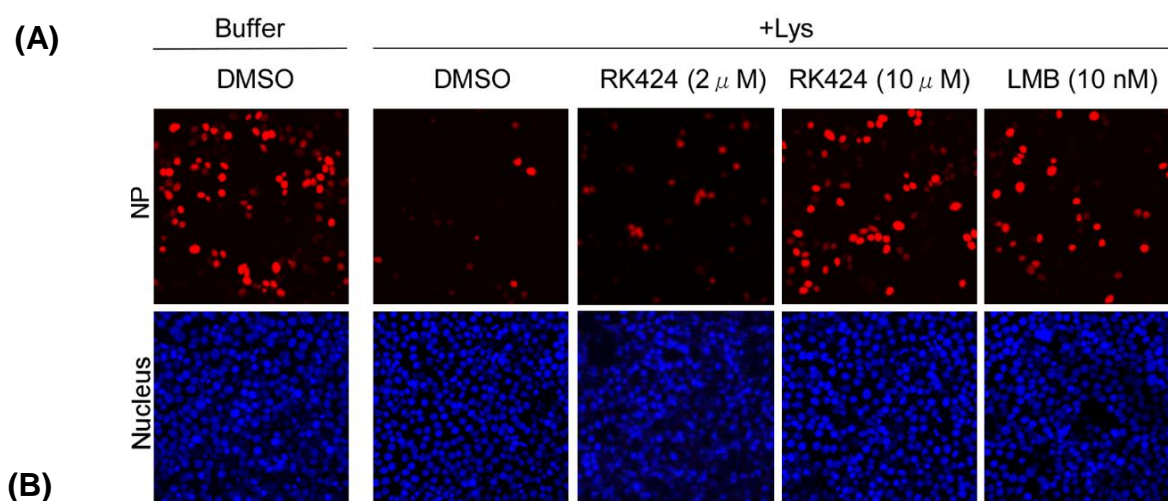


図 28 RK424 による NP の核外移行阻害に与える影響解析

(A) NP-mRFP-FLAG を発現させた HeLa 細胞をジギトニン処理による細胞膜透過処理を行い、wash buffer により洗浄した。洗浄後の細胞に再び HeLa 細胞の細胞抽出液と化合物を共に 1 時間反応させた。反応後の細胞を再び洗浄し、hoechst 33342 による核染色後、蛍光顕微鏡により mRFP と hoechst の蛍光を観察した。

(B) 化合物の核外移行阻害効果を定量的に評価するため、hoechst の蛍光を指標に 100 個以上の細胞をカウントし、カウントした細胞中の mRFP 陽性細胞数を指標に化合物の核外移行阻害効果を評価した。Buffer を反応させたサンプルに対する核外移行阻害率を相対的に評価した結果を棒グラフに示した。

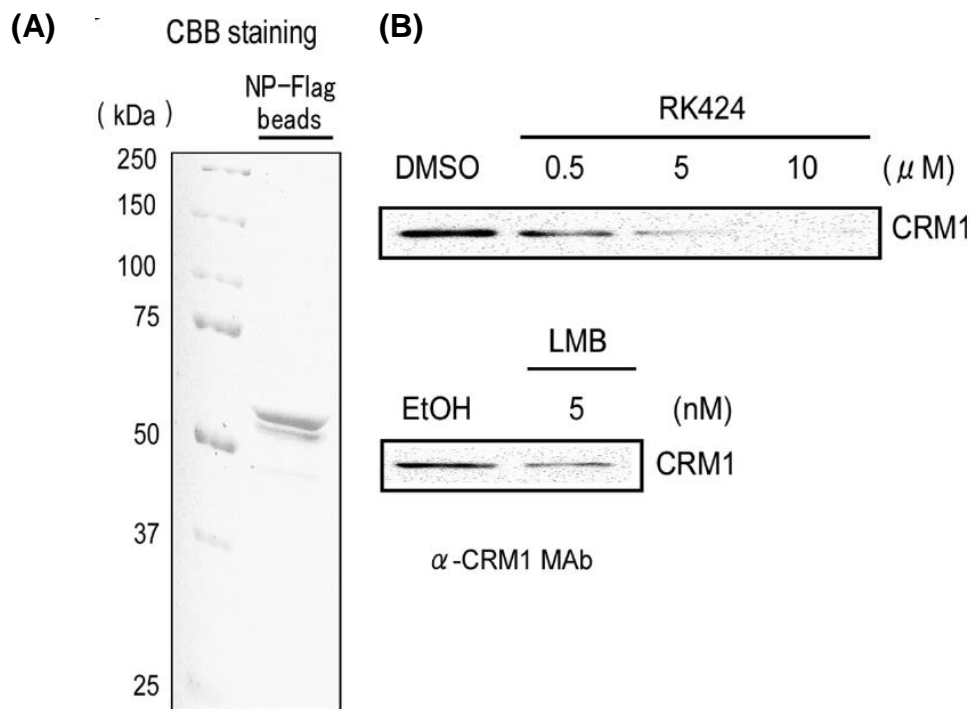


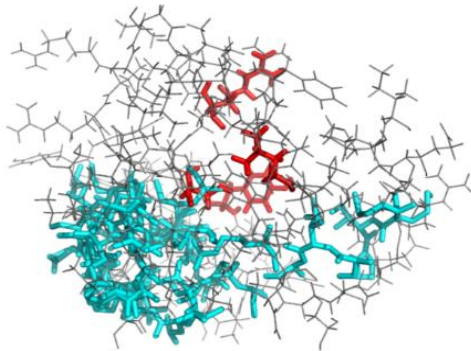
図 29 RK424 の NP と CRM1 の結合阻害に与える影響評価

(A) 精製 NP タンパクの CBB 染色

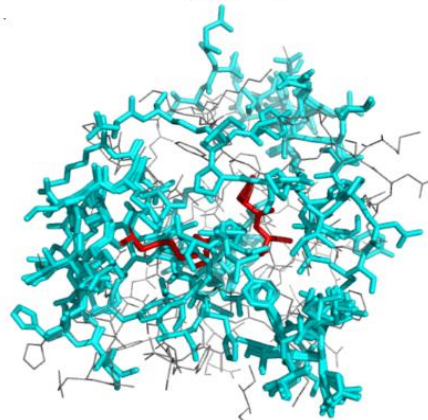
(B) 精製した FLAG-NP を固定化した抗 FLAG アガロースビーズに、Hela 細胞より調製した細胞抽出液を加え、化合物と共に 4°C で一晩回転攪拌して反応させた。反応後のサンプルを洗浄し、ビーズを sample buffer と共に熱変性させた。熱変性によりビーズから分離した NP タンパクと結合した CRM1 タンパクを抗 FLAG 抗体及び抗 CRM1 抗体を用いた Western blot 法によりそれぞれ検出した。

(A)

No significant hit structures
against NP pocket



Significant hit structures against
PA pocket



(B)

PDB ID	Chain ID	Protein Name	z-score
2gju	D	252AALONG HYPOTHETICAL PROTEIN	2.37
2zyz	C	PUTATIVE UNCHARACTERIZED PROTEIN PAE0789	2.36
1fqv	B	SKP1	2.36
3rys	B	ADENOSINE DEAMINASE 1	2.19
1r5x	A	AFJAMM	2.18
3op7	A	AMINOTRANSFERASE CLASS I AND II	2.16
2ool	A	SENSOR PROTEIN	2.16
3zmd	A	PUTATIVE TRANSCRIPTIONAL REGULATOR	2.16
2wps	A	TRIMERIC AUTOTRANSPORTER ADHESIN FRAGMENT	2.12
2p0u	B	STILBENECARBOXYLATE SYNTHASE 2	2.08
3p0r	A	AZOREDUCTASE	2.07
1v6c	A	ALKALINE SERINE PROTEASE	2.05
2i00	F	ACETYLTRANSFERASE, GNAT FAMILY	2.04
3n0g	A	ISOPRENE SYNTHASE	2.03
2o66	A	PII PROTEIN	2.03
3ren	A	GLYCOSYL HYDROLASE, FAMILY 8	2.02
3l6t	A	MOBILIZATION PROTEIN TRAI	2.02
4hqo	A	SPOROZOITE SURFACE PROTEIN 2	1.98
2ieq	B	SPIKE GLYCOPROTEIN	1.98
2c63	C	14-3-3 PROTEIN ETA	1.97

図 30 NP と PA のポケット構造に対する相同性解析

(A) NP のポケット構造を R162、S165、L264 及び Y487 のアミノ酸残基より半径 10 Å の範囲を抽出した。また、PA のエンドヌクレアーゼ活性部位として、P107、D108、E119 及び K134 のアミノ酸残基より半径 10 Å の範囲を抽出し、抽出した各々のポケット構造に対して相同性を示すタンパクの検索を行い、ヒットしたポケット構造を NP 及び PA のポケット構造上に重ね合わせた。

(B) PA ポケット構造に対する構造相同性解析結果。

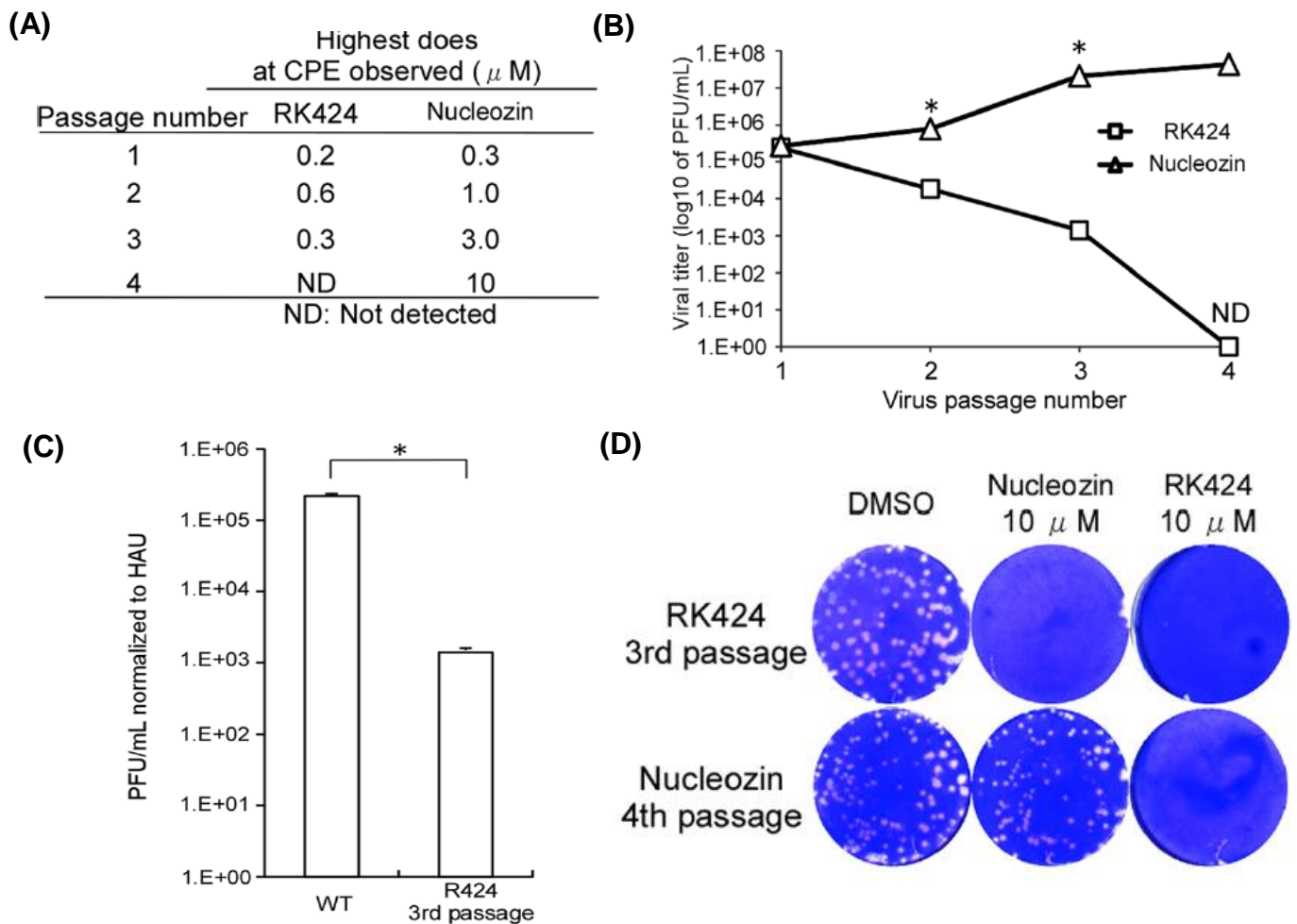


図 31 耐性ウイルス産生実験

(A) RK424 及び Nucleozin 存在下で MDCK 細胞をウイルス感染による細胞変性効果を認めるまでウイルス感染培養した。細胞変性効果が認められた培養条件の内、最も高い化合物濃度の培養上清を回収し、次の感染継代に使用し、計 4 回継代を行った。RK424 は、1 回目; 0.1–2 μM , 2 回目; 0.2–3 μM , 3 回目; 0.3–3 μM 及び 4 回目; 0.4–3 μM の濃度範囲で培養し、Nucleozin は、1 回目; 0.1–2 μM , 2 回目; 0.3–3 μM , 3 回目; 1–5 μM and 4 回目; 3–10 μM の濃度範囲で培養を行った。

(B) 継代時に回収したウイルス上清中のウイルス量をプラークアッセイにより定量した。

(C) 3 回継代時の RK424 処理サンプルの培養上清と 4 回継代時の Nucleozin 処理サンプルの培養上清に含まれるウイルス量をプラークアッセイにより定量した。

(D) 3 回継代時の RK424 処理サンプルの培養上清と 4 回継代時の Nucleozin 処理サンプルの培養上清に含まれるウイルスの RK424 及び Nucleozin に対する耐性化をプラークアッセイにより評価した。

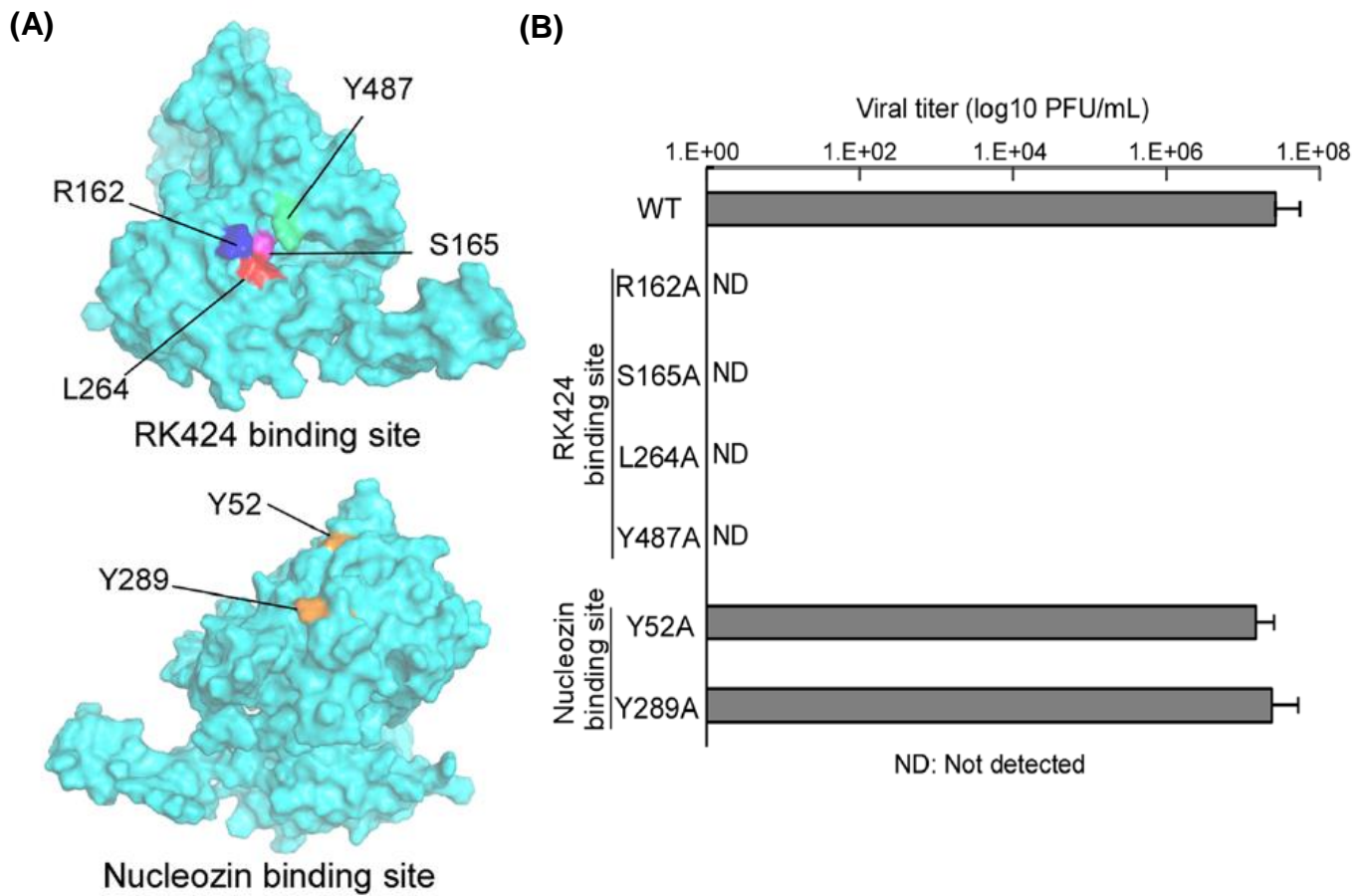


図 32 耐性ウイルス産生実験

(A) RK424 と Nucleozin の NP に対する結合モデル図

(B) RK424 の結合サイトと想定される NP の 4 つのアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異ウイルス (R162A、S165A、L264A、Y487A) と Nucleozin 結合サイトを構成する NP の 2 つのアミノ酸残基それぞれアラニンに置換した変異ウイルス (Y52H 及び Y289H) をリバーシジェネティクス法により作成した。作成した変異ウイルスを MDCK 細胞に感染させ、72 時間培養後の培養上清中に含まれるウイルス量をプラークアッセイにより評価した。

Position	Amino acid residue	Mutant population (conservation ratio %)	Function
162	R	9 (99.88)	RNA binding
165	S	3 (99.96)	Oligomerization
264	L	2 (99.97)	Nuclear export
487	Y	4 (99.95)	Dimer interface
52	Y	956 (87.56)	ND
289	Y	1836 (76.10)	ND

ND: Not determined

表 3 RK424 及び Nucleozin 結合サイトを構成するアミノ酸残基の配列保存性

RK424 の結合サイトを構成する NP の 4 つのアミノ酸残基(R162A、S165A、L264A、Y487A) と Nucleozin 結合サイトを構成する NP の 2 つのアミノ酸残基(Y52H 及び Y289H)の配列保存性をインフルエンザデータベースより抽出したトリ、ヒト、ブタ A 型インフルエンザウイルス NP 由来の 7683 配列を基に解析した。

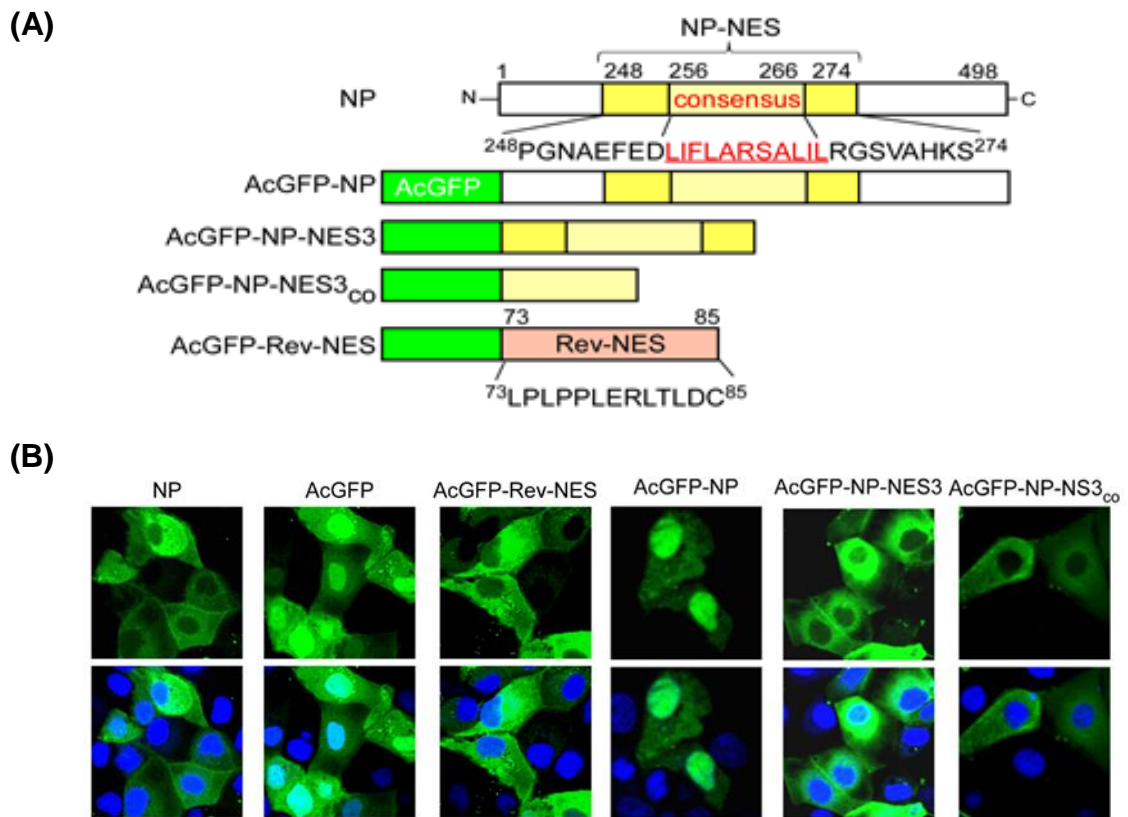


図 33 AcGFP-NP-NES3 発現コンストラクトの作成

(A) 各種 AcGFP-NES 融合タンパク発現コンストラクト

(B) AcGFP 又は各種 AcGFP-NES 融合タンパクをそれぞれコードするプラスミドを MDCK 細胞内に導入し、培養 24 時間後の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

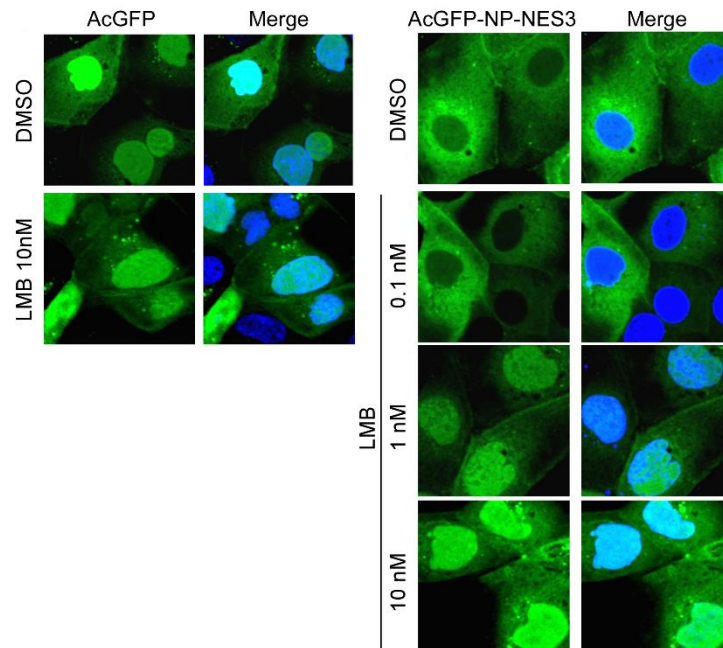


図 34 LMB による AcGFP-NP-NES3 の核外移行阻害評価

AcGFP 又は AcGFP-NP-NES を発現させた MDCK 細胞に種々の濃度に調製した LMB を処理し、8 時間培養した。培養後の AcGFP 又は AcGFP-NP-NES3 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

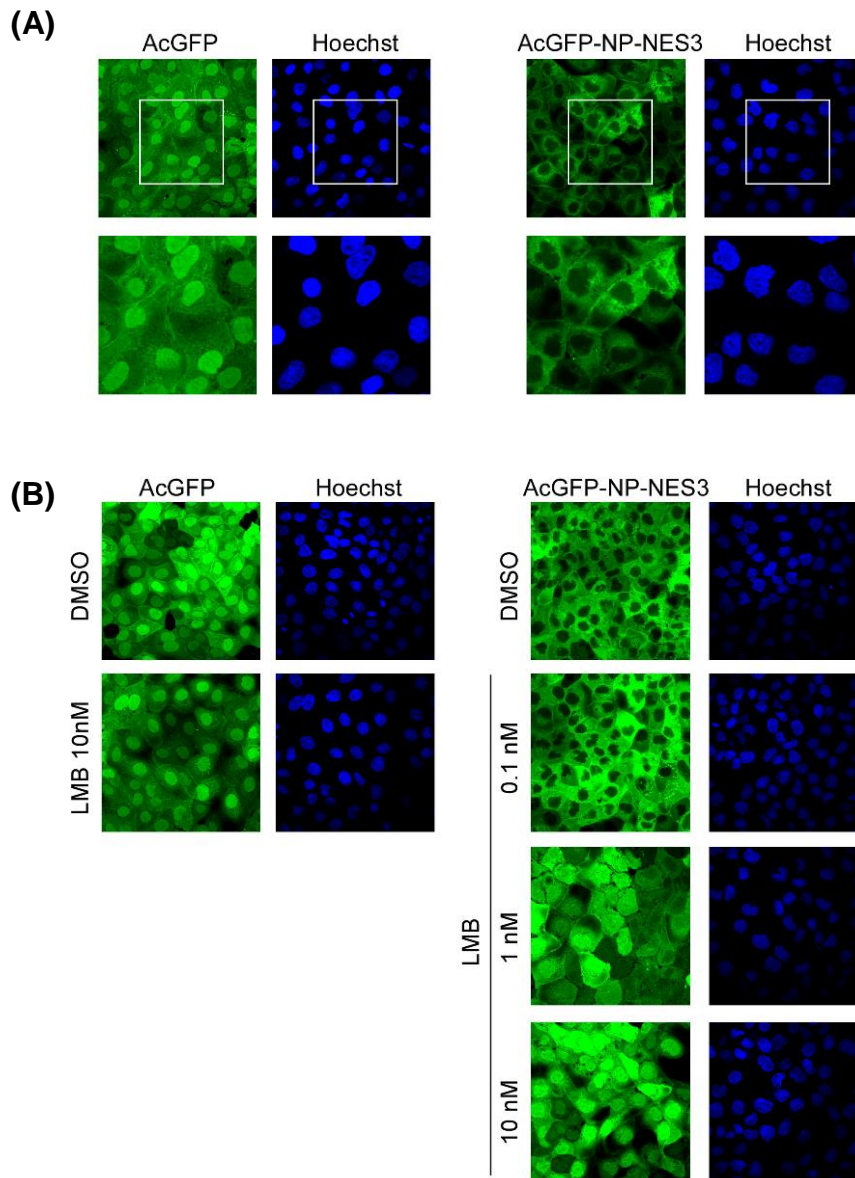


図 35 AcGFP-NP-NES3 恒常発現株の樹立と LMB に対する感受性評価

(A) AcGFP 及び AcGFP-NP-NES3 恒常発現細胞株内の AcGFP および AcGFP-NP-NES3 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

(B) AcGFP 及び AcGFP-NP-NES3 恒常発現細胞株に、種々の濃度に調製した LMB を処理し、8 時間培養した。培養後の AcGFP 又は AcGFP-NP-NES3 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

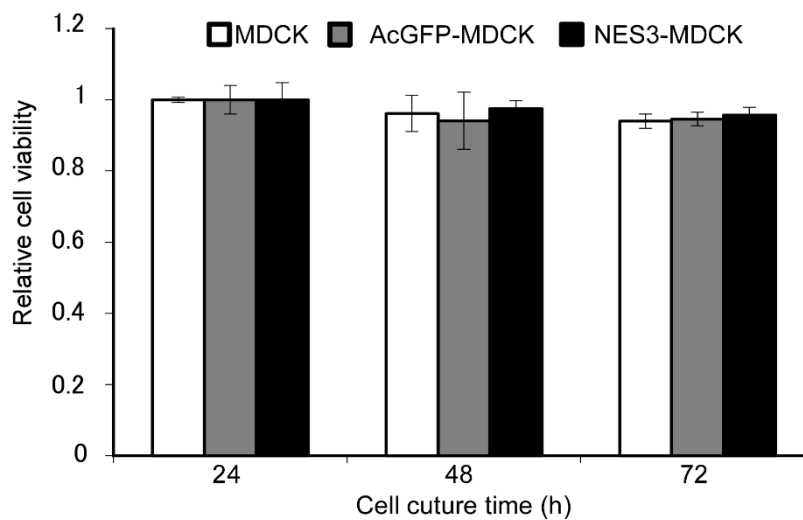


図 36 AcGFP-NP-NES3 恒常発現細胞株の細胞増殖性評価

MDCK、AcGFP 恒常発現 MDCK 細胞(AcGFP-MDCK)及び AGFP-NP-NES3 恒常発現 MDCK 細胞 (NES3-MDCK)を 96well plate に播種し、48 時間培養した。培養後の細胞に WST-1 試薬を添加し、37°C で 30 分インキュベーション後、450nm の吸光度を測定し、細胞増殖率を評価した。

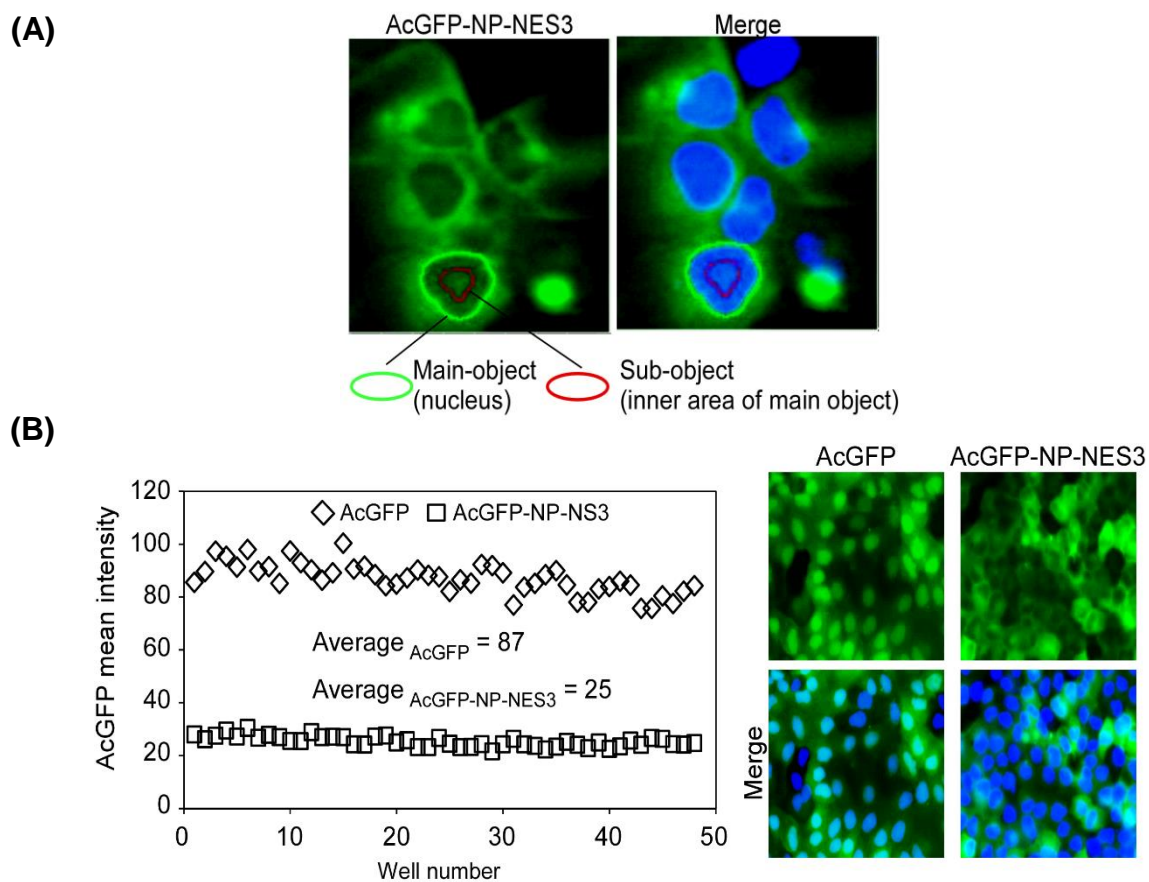
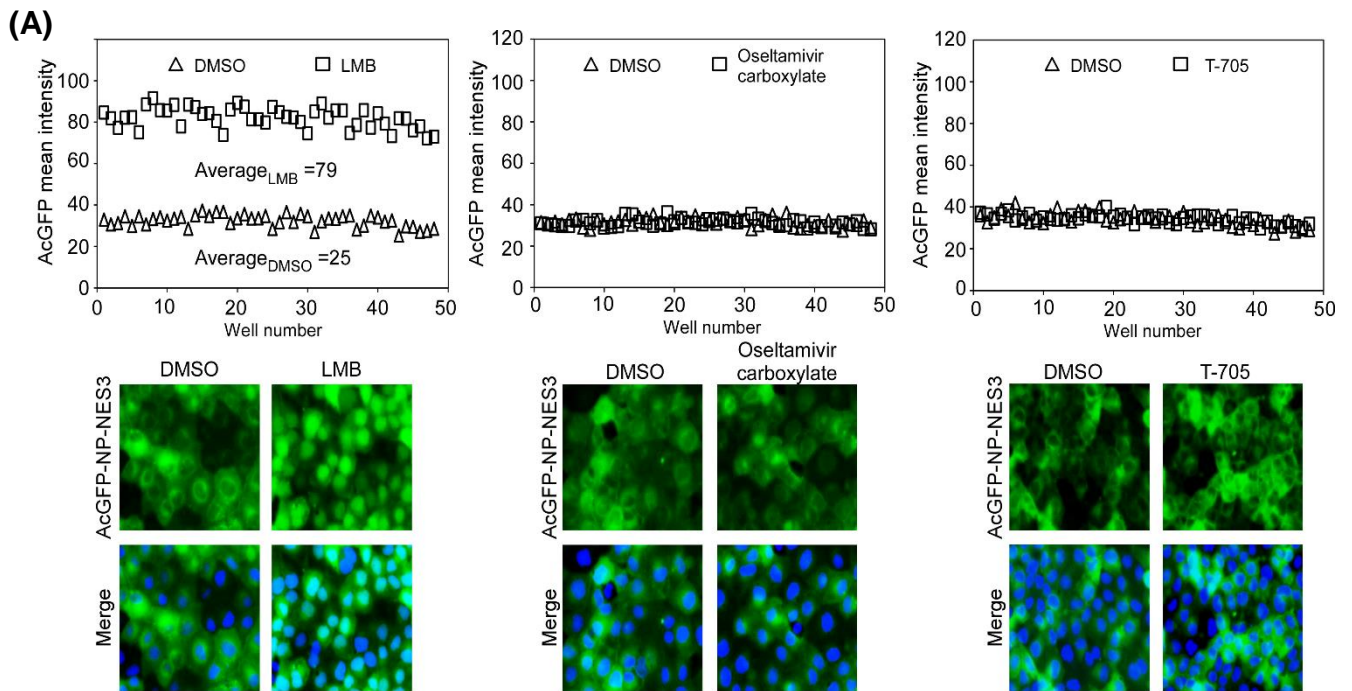


図 37 CELLVIEWRS100 による LMB の核外移行阻害活性評価

- (A) 化合物の核外移行阻害活性を定量的に評価するため、hoechst で染色された核の輪郭を Main-object として設定し、Main-object から一定距離内側の領域を Sub-object として設定した。
- (B) AcGFP 及び AcGFP-NP-NES3 恒常発現細胞株を 96well-plate に播種し、24 時間培養した。培養後の細胞の AcGFP 及び AcGFP-NP-NES3 の Sub-object 領域の AcGFP の平均蛍光強度を測定した。また、同時に AcGFP 及び AcGFP-NP-NES3 の細胞内局在も観察した。



(B)

$$S/B = \frac{\text{Average of positive control (LMB)}}{\text{Average of negative control (DMSO)}} = 2.59$$

$$Z' = 1 - \left[\frac{3 \times \text{SD of positive control (LMB)} + 3 \times \text{SD of negative control (DMSO)}}{\text{Average of positive control (LMB)} - \text{Average of negative control (DMSO)}} \right] = 0.68$$

図 38 CELLVIEWERS100 による核外移行阻害剤スクリーニング系の確立

(A) AcGFP-NP-NES3 恒常発現細胞株を 96well-plate に播種し、24 時間培養した。培養後の細胞に、DMSO、LMB、Oseltamivir phosphate 及び T-705 を処理し、8 時間培養した。培養後、AcGFP-NP-NES3 の Sub-object 領域の AcGFP の平均蛍光強度を測定した。また、同時に AcGFP-NP-NES3 の細胞内局在も観察した。

(B) スクリーニング系構築のために必要なアッセイバリデーションの指標として、S/B 比、Z'ファクターの算出を行った。

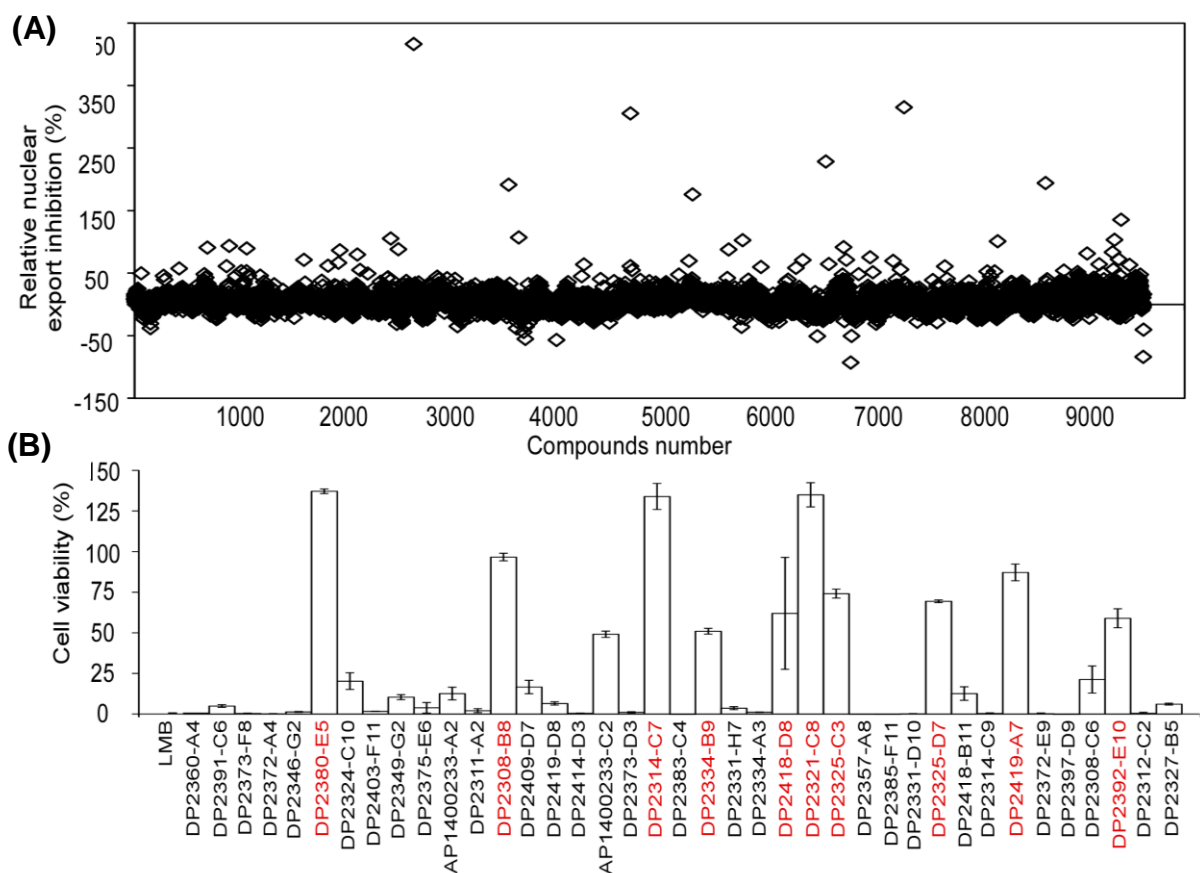


図 39 核外移行阻害を標的とした HTS 評価系による化合物ライブラリースクリーニング

- (A) AcGFP-NP-NES3 恒常発現細胞株を 96well-plate に播種し、24 時間培養した。培養後、陰性対照及び陽性対照として DMSO、LMB を細胞に処理し、評価対象として東京大学コアライブラリー9600 化合物の核外移行阻害率を評価した。核外移行阻害率の評価は、LMB に対して 50%以上の sub-object 領域における AcGFP 平均蛍光強度の増加が認められたものをヒット化合物として判断した。
- (B) ヒット化合物の細胞毒性を WST-1 アッセイにより評価し、50%以上の細胞生存率を示したものを選択した。

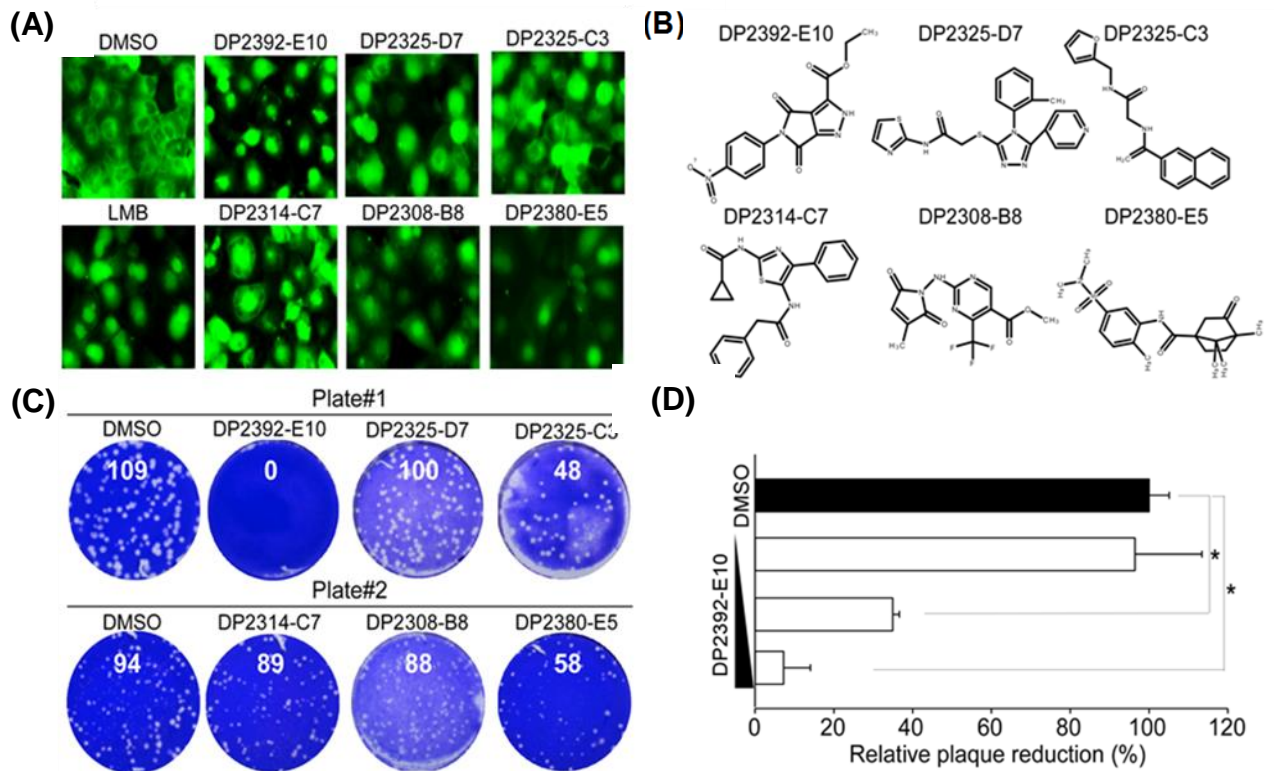


図 40 ヒット化合物の核外移行阻害能の確認と抗ウイルス活性評価

- (A) ヒット化合物の AcGFP-NP-NES3 に対する核外移行阻害作用を蛍光顕微鏡により観察した。
 (B) ヒット化合物の化学構造式
 (C) ヒット化合物の抗ウイルス活性をプラークアッセイにより評価した。
 (D) DP2392-E10 の抗ウイルス活性に対する濃度依存性をプラークアッセイにより評価した。

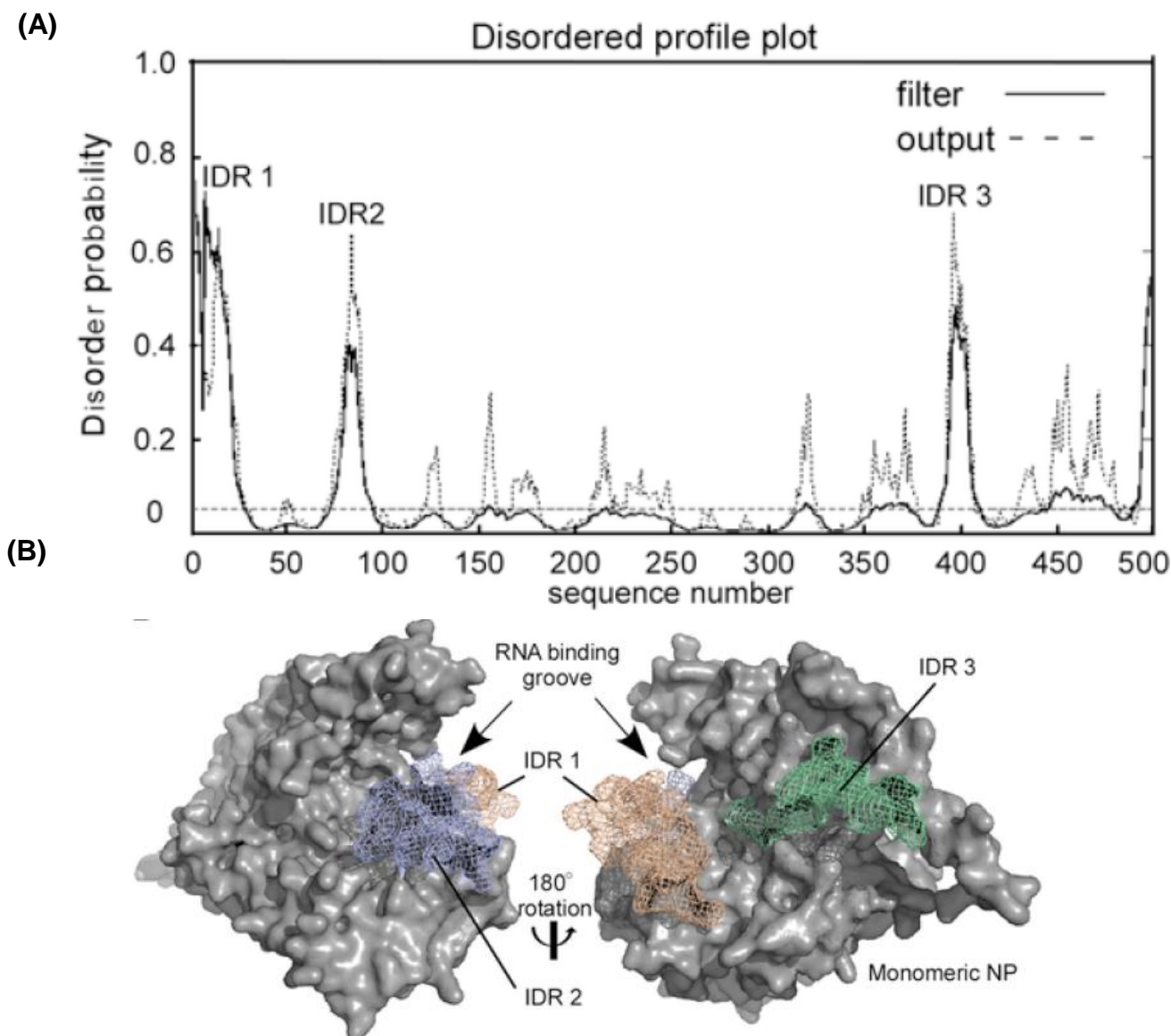


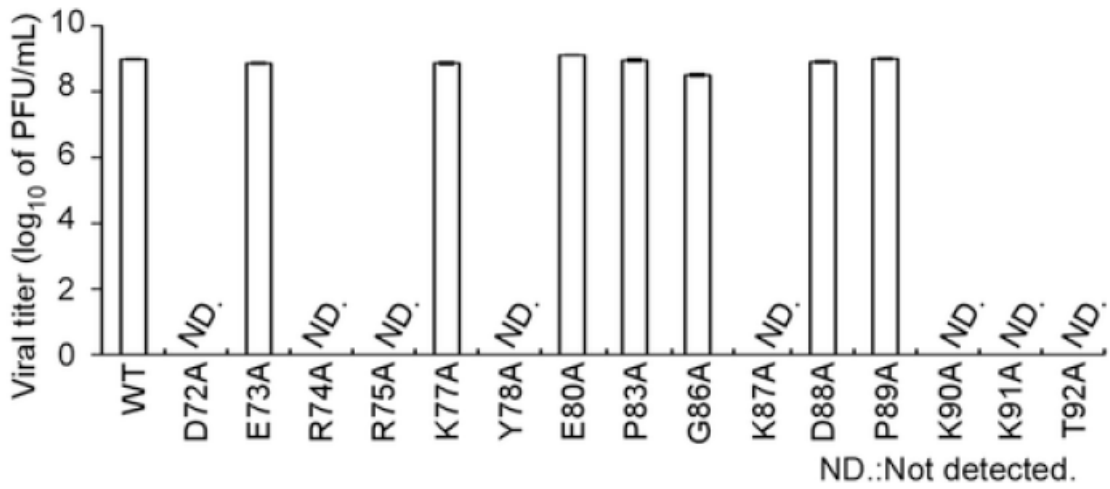
図 41 NP の天然変性領域

- (A) Disorder probability of NP sequences. NP sequences were obtained from PDB (PDB code: 2IQH), a NP のアミノ酸配列中の天然変性領域を DISOPRED server により予測した。実線 (filter) はより信頼性が高く、破線はより信頼性が低い予測結果を示す。
- (B) X線構造解析による NP の結晶構造。解析結果。明瞭な構造が示されていない IDR1 (アミノ酸; 1–26 位), IDR2 (アミノ酸; 72–92 位), 及び IDR3 (アミノ酸; 391–406 位) をそれぞれ、橙色、青色、緑色網掛け表示で示した。

IDR1			IDR2			IDR3		
Position ^b	Amino acid	Conservation rate (%)	Position ^b	Amino acid	Conservation rate (%)	Position ^b	Amino acid	Conservation rate (%)
1	M	100.00	72	D	99.96	391	R	99.69
2	A	99.88	73	E	99.90	392	S	99.97
3	S	98.56	74	R	99.96	393	G	99.99
4	Q	99.77	75	R	99.99	394	G	99.99
5	G	100.00	76	N	99.99	395	N	99.62
6	T	99.96	77	K	73.83	396	T	99.66
7	K	99.99	78	Y	100.00	397	N	98.06
8	R	99.97	79	L	99.97	398	Q	99.61
9	S	99.75	80	E	100.00	399	Q	99.13
10	Y	98.96	81	E	99.74	400	R	73.66
11	E	99.99	82	H	99.28	401	A	99.73
12	Q	99.83	83	P	99.97	402	S	99.84
13	M	100.00	84	S	99.28	403	A	99.86
14	E	99.96	85	A	98.80	404	G	99.93
15	T	99.83	86	G	99.96	405	Q	99.96
16	G	68.55	87	K	99.41	406	I	89.70
17	G	99.97	88	D	99.97			
18	E	84.19	89	P	99.99			
19	R	99.91	90	K	99.86			
20	Q	99.84	91	K	99.93			
21	N	76.21	92	T	100.00			
22	A	99.11						
23	T	99.34						
24	E	99.95						
25	I	99.96						
26	R	99.96						
Average (%)		97.06			98.56			97.40

表4 トリ、ブタ、ヒト由来A型インフルエンザウイルス由来NPにおける天然変性領域のアミノ酸配列保存性解析

(A)



(B)

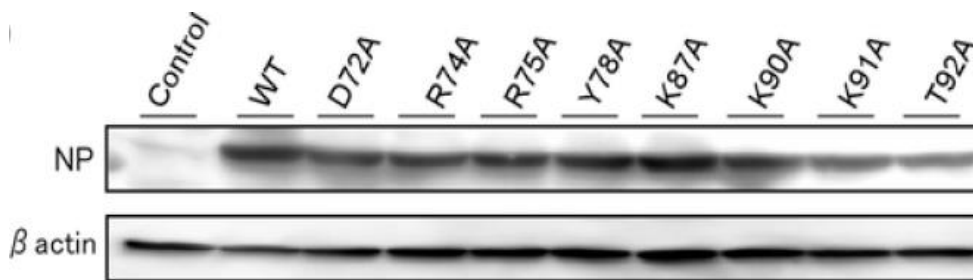


図 42 変異ウイルス産生実験

(A) IDR2 を構成する 15 のアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異ウイルスをリバースジェネティクス法により産生し、産生した変異ウイルスを MDCK 細胞に感染させた。感染後 72 時間後の培養上清を回収し、プラークアッセイによりウイルス量を定量した。

(B) 8 種類のアラニン点変異体 NP タンパクをそれぞれコードするプラスミドを 293T 細胞内に導入し、培養 48 時間後の細胞を回収した。抗 NP 抗体を用いた Western blot 法により、回収したサンプル中に含まれる NP タンパクの発現を解析した。

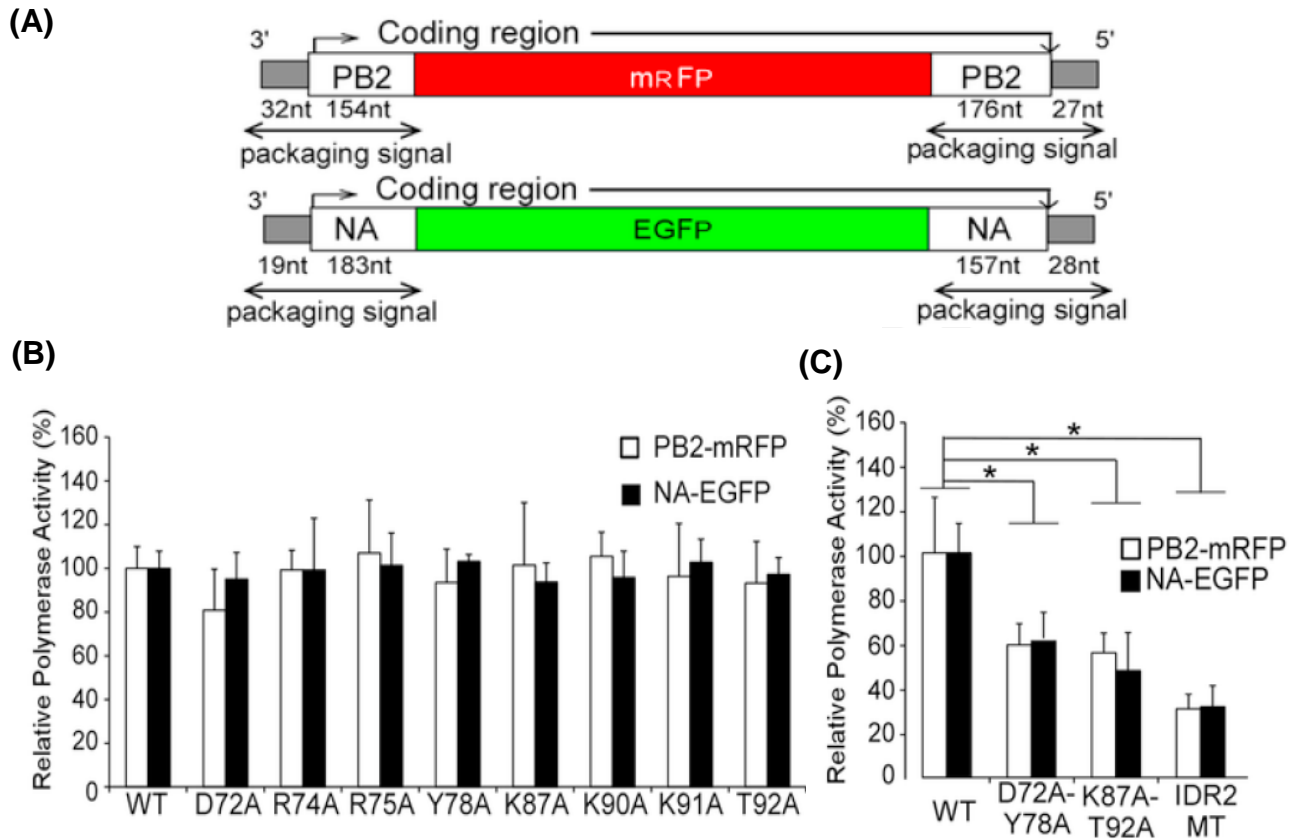


図 43 ウイルスゲノムパッケージング効率の解析

(A) mRFP 及び EGFP レポーター遺伝子と 3'及び 5'末端に PB2 及び NA セグメント由来のパッケージングシグナルを有する vRNA 発現プラスミドコンストラクト。

(B) HEK293T 細胞に PB2/pCAGGS、PB1/pCAGGS、PA/pCAGGS、NP/pCAGGS 及び vNP-luc/pHH21 をトランスフェクションし、48 時間培養した。アラニン点変異体 NP の転写活性評価の際は、WT NP の代わりに変異体 NP をコードする pCAGGS プラスミドをトランスフェクションした。培養後の細胞を回収し、細胞内 mRFP 及び EGFP 発現細胞の割合を指標に、NP 配列の変異導入による転写活性に与える影響を評価した。

(C) (B)と同様に NP の IDR2 に複数アラニンを導入した NP 変異体の転写活性を評価した。

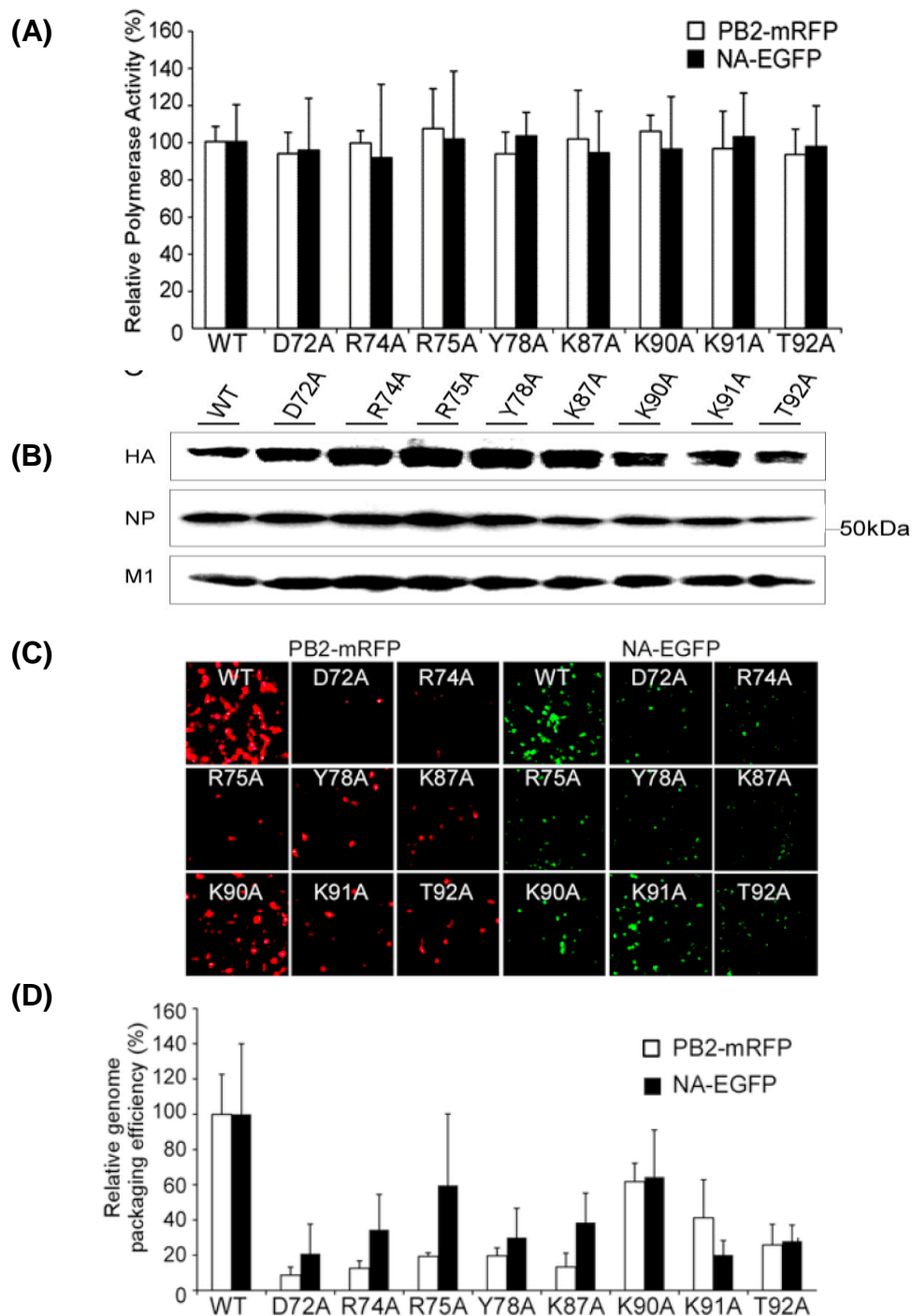
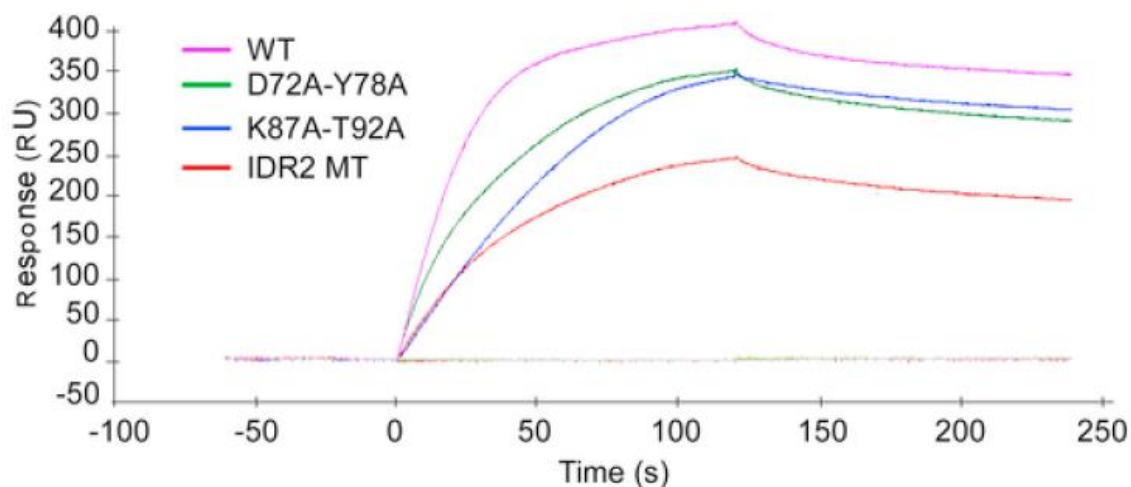


図 44 ウイルスゲノムパッケージング効率の解析

(A) リコンビナントウイルス産生細胞中のレポーター遺伝子の発現を FACS により評価した。

(B) リコンビナントウイルス産生細胞中のウイルスタンパクの発現を Western blot 法により評価した。

(C 及び D) レポーター遺伝子を有するリコンビナントウイルスをヘルパーウイルスと共に共感染させた MDCK 細胞を(C)蛍光顕微鏡で観察、または(D)FACS によりにより解析し、mRFP 及び EGFP の発現を指標にゲノムパッケージング効率を評価した。



NP proteins	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Kd (nM)	Fold change
WT	$1.5 \pm 0.01 \times 10^5$	$2.5 \pm 0.02 \times 10^{-3}$	16.8 ± 0.03	1
D72A-Y78A	$7.7 \pm 0.53 \times 10^4$	$2.7 \pm 0.12 \times 10^{-3}$	35.0 ± 0.41	-2.08
K87A-T92A	$1.2 \pm 0.09 \times 10^5$	$2.5 \pm 0.14 \times 10^{-3}$	21.2 ± 0.05	-1.26
IDR2 MT	$7.2 \pm 0.75 \times 10^4$	$3.1 \pm 0.10 \times 10^{-3}$	44.0 ± 0.60	-2.62

図 45 NP と RNA の結合親和性解析

精製野生型(WT)NP タンパク及び IDR2 領域にアラニン変異を導入した変異体 NP タンパクとセンサーチップ状に固定した RNA との結合を Biacore により解析した。センサーグラムの解析結果から、結合速度(k_a)、結合解離速度(k_d)、結合親和定数(KD)をそれぞれ算出した。

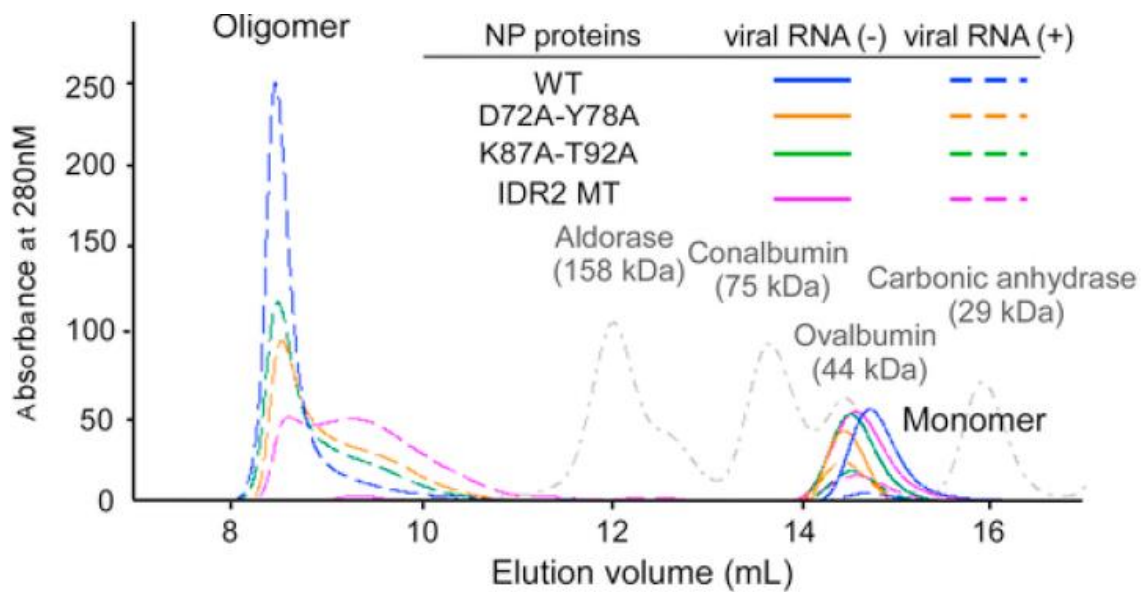


図 46 NP と RNA の結合による多量体形成解析

精製 NP タンパクと vRNA を加え、室温で 1 時間回転攪拌を行った。反応後のサンプルを ÄKTA purifier chromatography システム に取り付けた Superdex 200 Increase 10/300 GL Column にロードし、溶出サンプルピークを同システムによりモニターした。分子サイズマーカーを指標に、多量体 NP 画分と単量体画分のピーク面積を解析し、各精製 NP タンパクの多量体形成能を評価した。

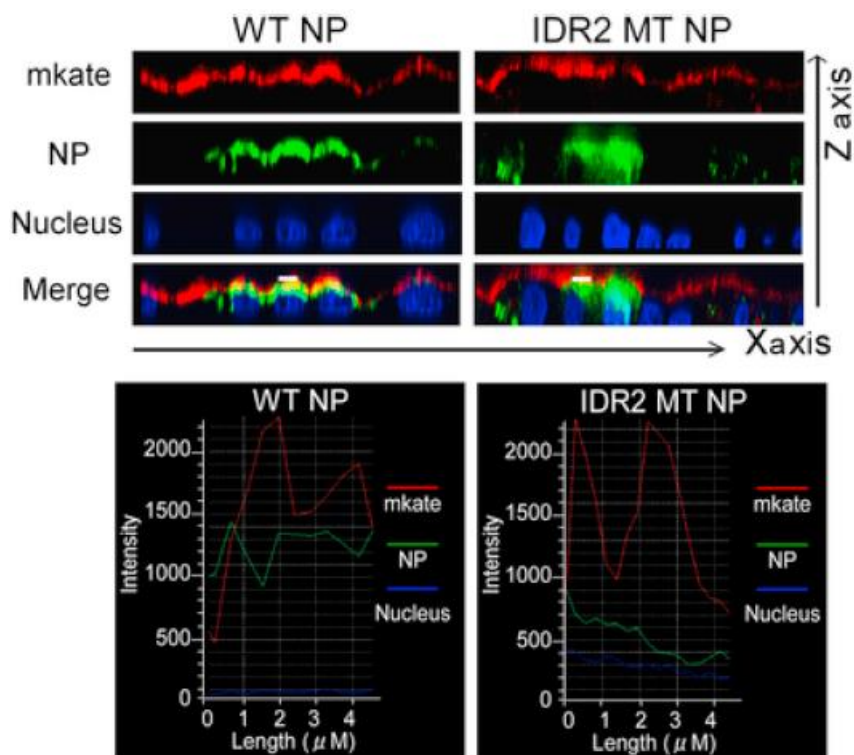


図 47 蛍光免疫染色法による NP の細胞膜局在の確認

MDCK 細胞に NP /pCAGGS をトランスフェクションし、24 時間培養した。培養後の細胞と mKate-D4 を室温で 30 分間反応させ、細胞膜を染色した。X-Y 平面及び Z 軸方向での染色した標的分子の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により確認した。また、細胞膜頭頂部(白色実線)での蛍光シグナルを Olympus FluoView FV1000 confocal microscope software により定量化した。

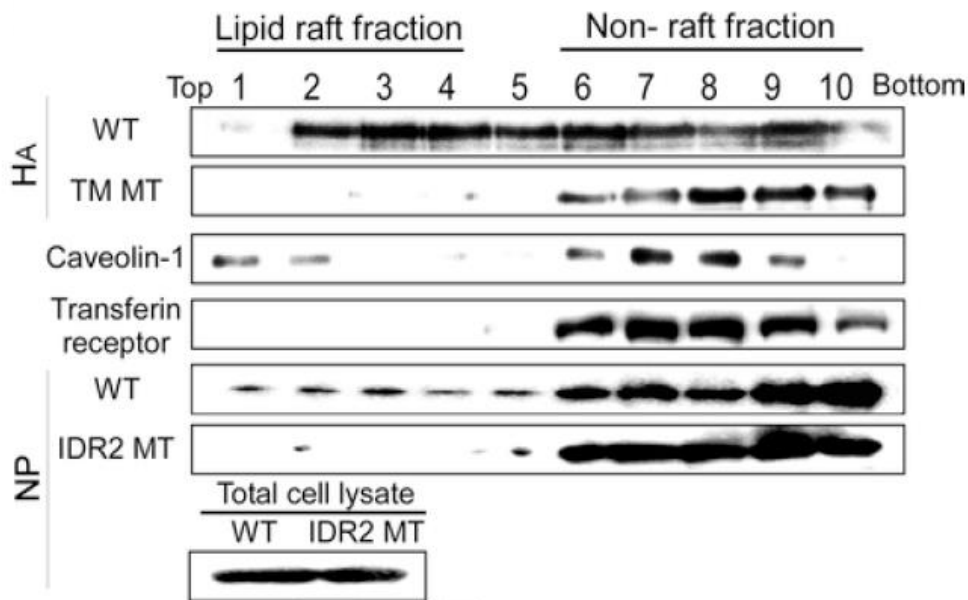


図 48 ショ糖密度遠心勾配法による脂質ラフト画分の分離

MDCK 細胞に種々のタンパクをコードするプラスミドをトランスフェクションし、37°Cで 24 時間培養した。培養後、MDCK 細胞を Lysis buffer で可溶化し、セルライゼートを調製した。調製したセルライゼートとショ糖液を重層した遠心チューブを Beckman SW55Ti rotor にセットし、4°C、46,000 rpm で 20 時間遠心分離を行った。遠心分離後のチューブから回収したフラクションサンプルを SDS PAGE により分離し Western blotting 法により目的タンパクの検出を行った。

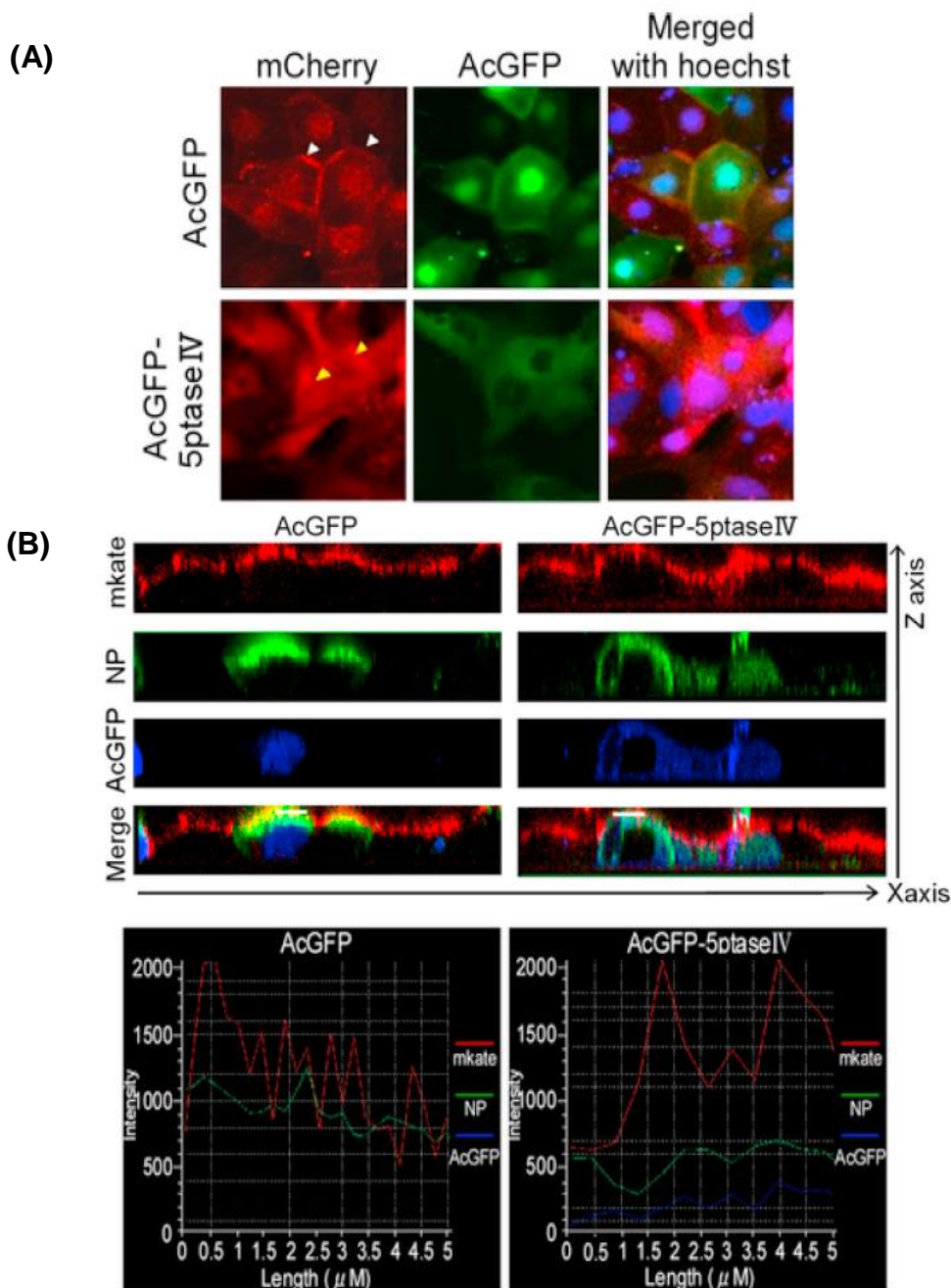


図 49 5ptaseIV による NP の細胞内局在の変化に与える影響解析

(A) mCherry-PLC δ -PH を恒常的に発現する MDCK 細胞に AcGFP または AcGFP-5ptaseIV を一過性に発現させ、24 時間培養した。培養後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、細胞内 mCherry-PLC δ -PH の局在変化を評価した。

(B) MDCK 細胞に AcGFP または AcGFP-5ptaseIV と NP を共発現させ、24 時間培養した。培養後の細胞と mKate-D4 を室温で 30 分間反応させ、細胞膜を染色した。X-Y 平面及び Z 軸方向での染色した標的分子の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により確認した(上図)。また細胞膜頭頂部(白色実線)の蛍光シグナルを Olympus FluoView FV1000 confocal microscope software により定量化した(下図)。

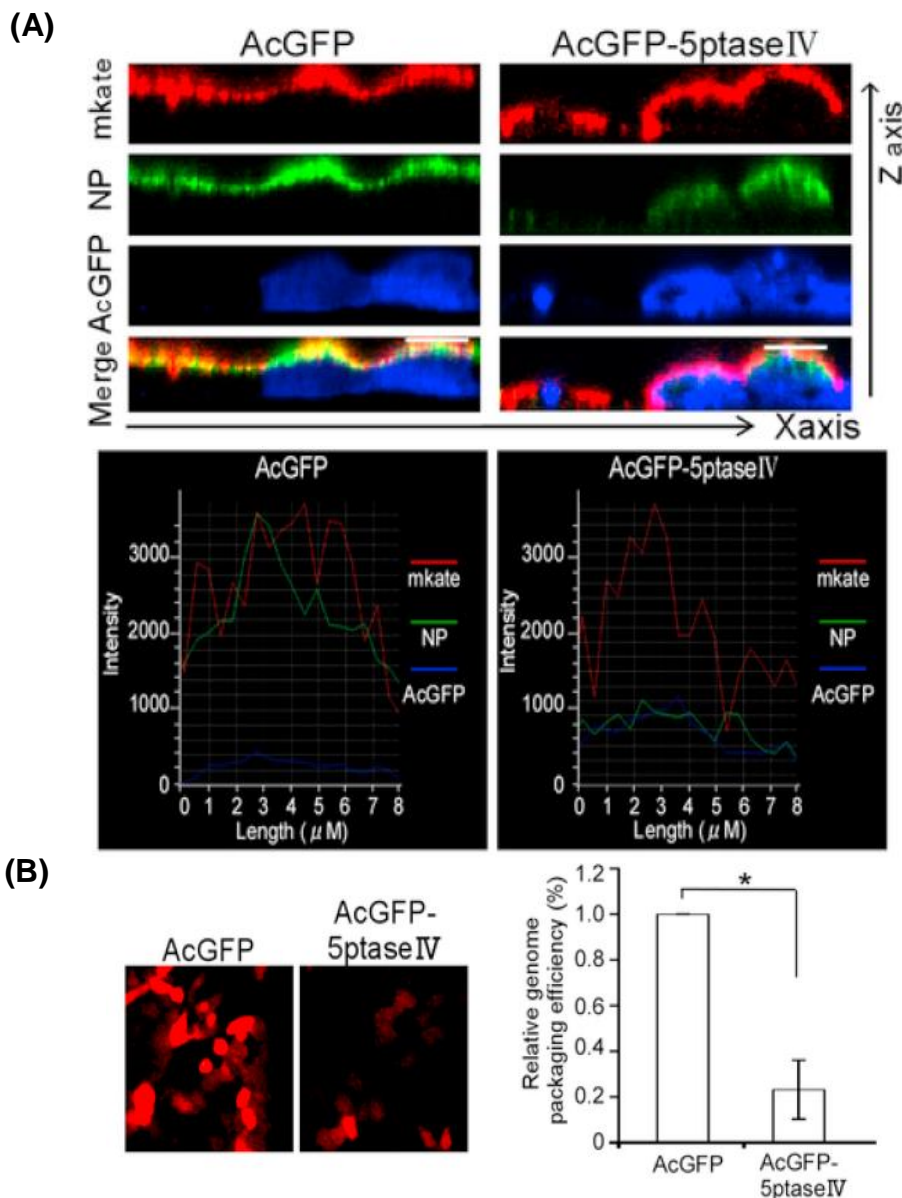


図 50 5ptaseIV によるウイルス感染時の NP の細胞内局在の変化に与える影響解析

(A) MDCK 細胞に AcGFP または AcGFP-5ptaseIV を発現させ、24 時間培養した。培養後の細胞に WSN ウイルス株を MOI=5 で 8 時間感染させた後、標的分子を免疫染色後、X-Y 平面及び Z 軸方向での標的分子の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により確認した(上図)。また、細胞膜頭頂部(白色実線)の蛍光シグナルを定量化した(下図)。

(B) AcGFP または AcGFP-5ptaseIV 発現プラスミドと共に mRFP レポーター遺伝子を含むウイルス粒子発現プラスミドセットを 293T 細胞に遺伝子導入し、48 時間培養した。培養後のウイルス上清を回収し、ヘルパーウイルスと共に MDCK 細胞に共感染させ、18 時間培養した。感染培養後、MDCK 細胞内に発現した mRFP の蛍光を共焦点顕微鏡と FACS により検出し、mRFP の陽性細胞数を指標にゲノムパッケージング効率を評価した。

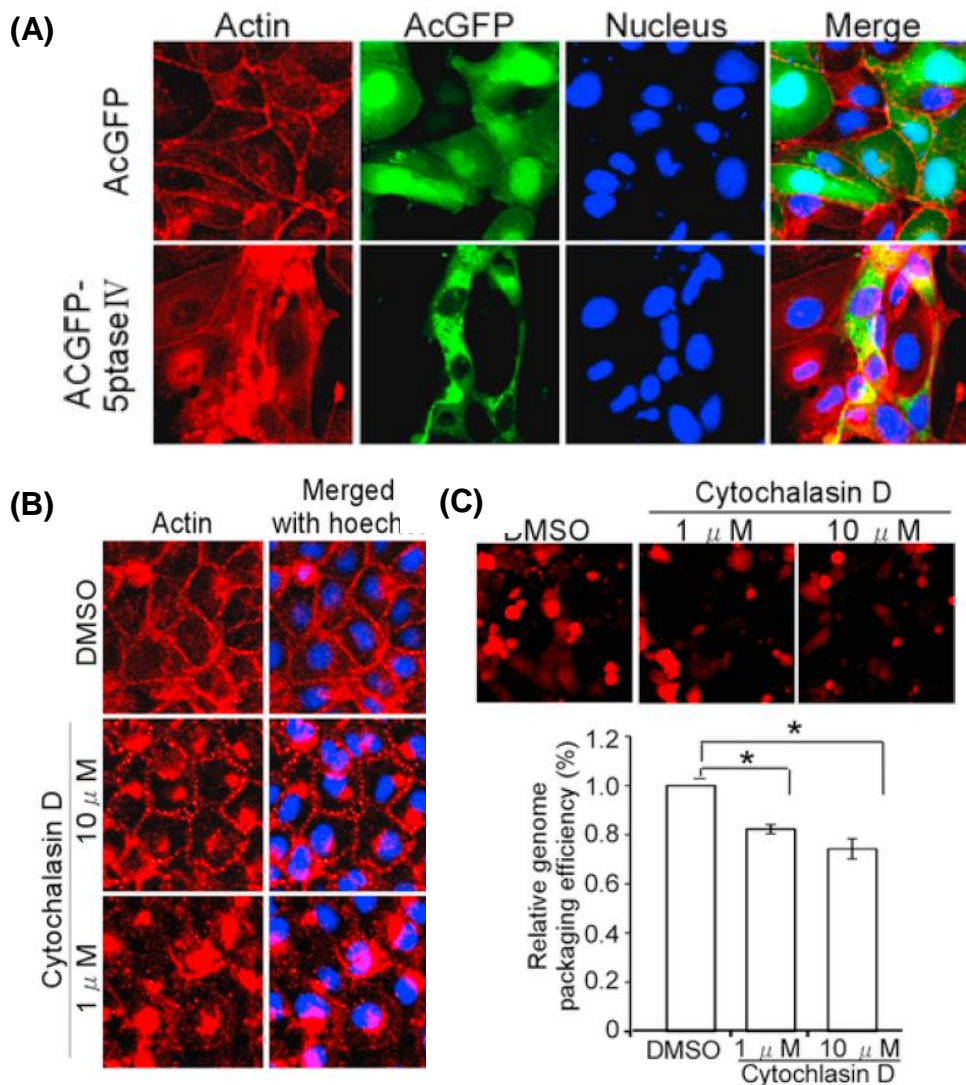


図 51 アクチン脱重合によるウイルスゲノムパッケージングに与える影響解析

- (A) MDCK 細胞に AcGFP または AcGFP-5ptaseIV を発現させ、24 時間培養した。培養後の細胞内アクチン及び核をそれぞれ Acti-stain 670 fluorescent phalloidin 及び hoechst 33342 を用いて染色した。標的分子の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により確認した。
- (B) MDCK 細胞に Cytochalasin D(1 or 10 μ M)を処理し、2 時間培養した。培養後の細胞内アクチン及び核をそれぞれ Acti-stain 670 fluorescent phalloidin 及び hoechst 33342 を用いて染色した。標的分子の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により確認した。
- (C) DMSO または Cytochalasin D(1 or 10 μ M)を処理させた HEK293T 細胞に mRFP をコードするウイルスゲノム RNA を有するリコンビナントウイルスを培養上清中に産生させた。培養上清中のリコンビナントウイルスとヘルパーウイルスを MDCK 細胞に共感染させ、MDCK 細胞内に発現した mRFP の蛍光を共焦点顕微鏡と FACS により検出し、mRFP の陽性細胞数を指標に、ゲノムパッケージング効率を評価した。

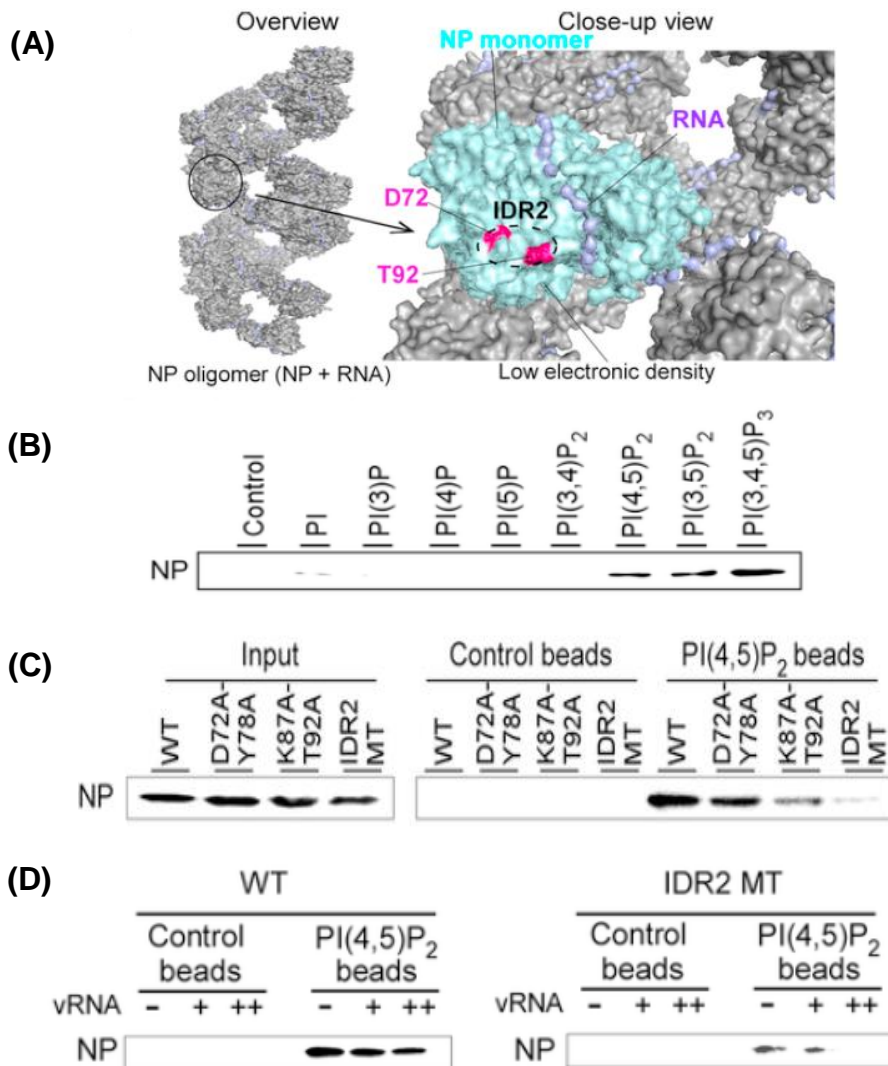


図 52 NP とフォスファチジルイノシトールリン酸との結合検討

- (A) NP と RNA の結合モデル。NP(灰色)と RNA(紫色)の結合モデルは PDB (PDBcode:4BBL) より取得し、Pymol を用いて立体構造情報を表示した。IDR2 構成するアミノ酸の N 末端側(72 位)と C 末端側(92 位)のアミノ酸残基を桃色で表示した。
- (B) 精製 NP タンパクと PI-(フォスファチジルイノシトール)及び PIPns-(リン酸化体フォスファチジルイノシトール)をコートしたビーズとの結合を pull-down アッセイにより評価した。
- (C) 精製 NP タンパクと PI(4,5)P₂をコートしたビーズとの結合を pull-down アッセイにより評価した。
- (D) vRNA と共に精製 NP タンパクを PI(4,5)P₂をコートしたビーズに反応させ、PI(4,5)P₂ ビーズへの結合を pull-down アッセイにより評価した。ビーズへの NP の結合は、全ての結合実験において、抗 NP 抗体を用いた Western blotting 法により検出した。

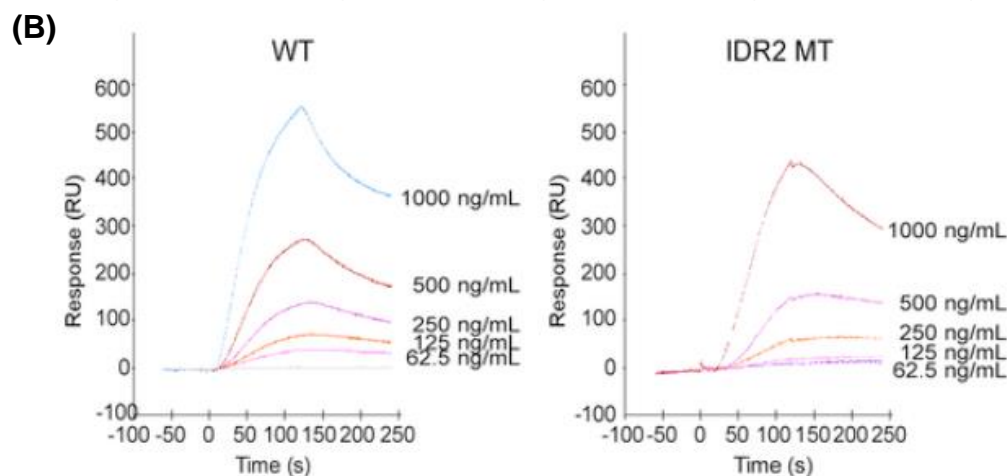
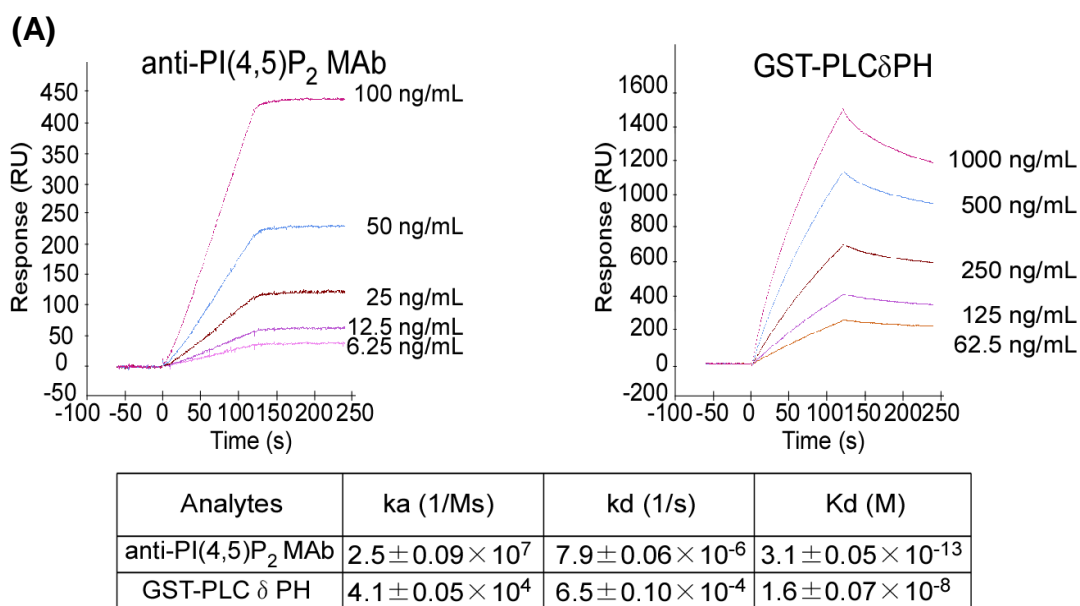


図 53 NP と PI(4,5)P₂ の結合親和性解析

- (A) 抗 PI(4,5)P₂ モノクローナル抗体及び精製 GST-PLC δ -PH とセンサーチップ状に固定した PI(4,5)P₂ との結合を Biacore により解析した。センサーグラムの解析結果から、結合速度(ka)、結合解離速度(kd)、結合親和定数(KD)をそれぞれ算出した。
- (B) 精製野生型(WT)NP タンパク及び IDR2 領域にアラニン変異を導入した変異(IDR2 MT)NP タンパクとセンサーチップ状に固定した PI(4,5)P₂ との結合を Biacore により解析した。センサーグラムの解析結果から、結合速度(ka)、結合解離速度(kd)、結合親和定数(KD)をそれぞれ算出した。

(A)

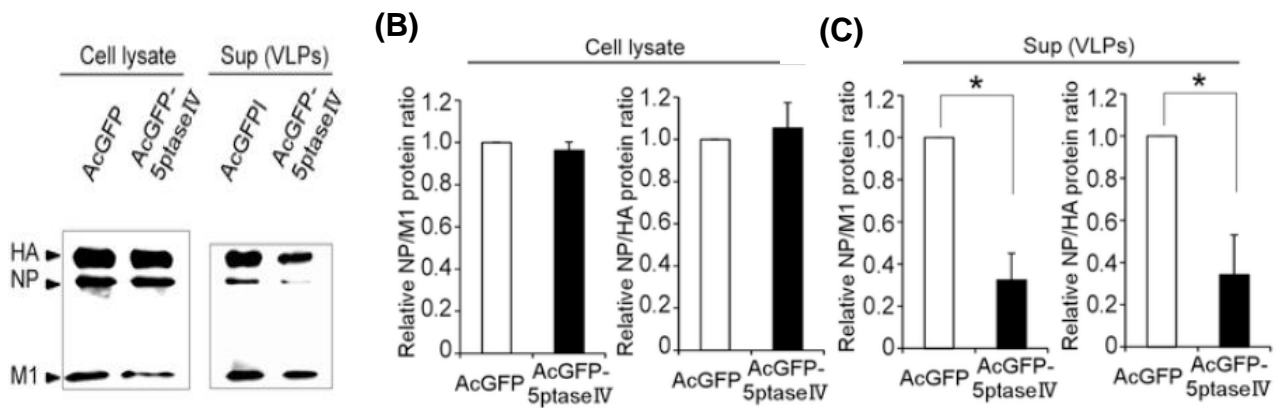


図 54 5tpaseIV 一過性発現細胞におけるウイルス産生細胞及び産生ウイルス粒子中の NP タンパク量の解析

(A) AcGFP または AcGFP-5ptaseIV 発現プラスミドと共に mRFP レポーター遺伝子を含むウイルス粒子発現プラスミドセットを 293T 細胞に遺伝子導入し、48 時間培養した。培養後の細胞とウイルス上清それぞれ回収し、抗 WSN 血清を用いた Western blot 法により、細胞内およびウイルス粒子中のウイルスタンパクの発現を確認した。

(B) HA または M1 の発現量に対するウイルス産生細胞中の NP の相対的発現量を示した。

(C) HA または M1 の発現量に対するウイルス粒子中の NP の相対的発現量を示した。

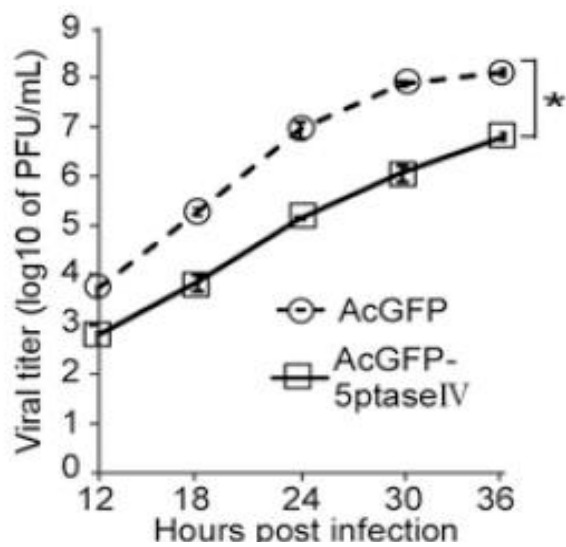


図 55 5ptaseIV 一過性発現細胞より産生されたウイルス増殖性の評価

AcGFP または AcGFP-5ptaseIV 発現プラスミドと共に mRFP レポーター遺伝子を含むウイルス粒子発現プラスミドセットを 293T 細胞に遺伝子導入し、継時的に培養清を回収した。回収した培養上清中のウイルス量を HA アッセイにより、また感染性ウイルス粒子量をプラークアッセイにより定量した。