

論文内容の要旨

論文題目 A型インフルエンザウイルス NP を標的とした創薬研究

氏名 柿坂 道範

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常に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感染は、その伝播力の強さ及び致死率の高さから、ひとたびまん延すれば家禽類に及ぼす影響は甚大であり、多大な経済的損害を被る事となる。以上の背景から、A型インフルエンザウイルスの蔓延防止策は極めて重要であり、その制圧のためには人獣共通に作用するワクチンや阻害剤の開発が求められる。インフルエンザウイルス対策としてワクチン接種による予防が古くから行われているが、ウイルスが著しく速く変異するため、その予防効果は不完全であり、ウイルスの制圧には至っていない。また、現在使用されている既存の抗ウイルス薬は、ほぼ同一の作用点を有するため、これらの既存薬を使用し続けることにより、耐性ウイルスの蔓延による被害の拡大が懸念されている。そのため、既存薬とは異なる作用点を有し、耐性ウイルス誘導率の低い新規抗ウイルス薬の開発が求められている。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、既存薬の標的である M2 或は Neuraminidase (NA)等の外膜タンパクに比べ遥かに保存性が高く、宿主の異なる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。以上より、NP を創薬の標的とすることで、家禽類が保有するウイルスを含めた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。

結果

第 1 章 新規抗インフルエンザウイルス薬の探索

抗ウイルス活性を指標とした化合物ライブラリースクリーニングにより、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。ヒット化合物 RK188 の構造最適化を行った結果、ウイルスゲノムの転写・複製を阻害し、強い抗ウイルス活性を有する WV970 を見出したが、薬理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、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データベースより検索し、得られた解析結果を基に、WV970 のキナーゼ阻害効果を 456 種類のキナーゼに対して網羅的に評価した。その結果、WV970 は 11 種類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。また RK424 は、ウイルスゲノムの転写・複製を制御する viral ribonucleoprotein(vRNP)の主構成要素である NP の細胞質への局在を抑制し、ウイルス転写活性を阻害した。そこで、インシリコドッキングシミュレーションによる NP と RK424 の結合サイトの予測を行ったところ、RK424 は NP のアミノ酸残基 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、精製 NP タンパクと RK424 を固定化したビーズとの結合実験の結果から、両者が結合することが示された。また、RK424 結合サイトを構成するアミノ酸残基から想定される NP の機能阻害への影響を評価した結果、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示された。さらに、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明らかとなった。

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

第 1 章で獲得した化合物 RK424 が NP の核外移行を阻害し、強い抗ウイルス活性を示したことから、NP の核外移行阻害が新たな創薬標的とした有望であると考えられる。

そこで、NP の核外への移行を制御する 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 の核外移行シグナル (AcGFP-NP-NES3) を付加した融合タンパクを発現する AcGFP-NP-NES3 恒常発現細胞株を樹立した。樹立した恒常発現細胞株を用いて、AcGFP の局在変化を指標にした HTS (high-throughput screening) 評価系を確立し、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、細胞毒性が低く、核外移行阻害活性を有する化合物を 10 種類同定した。さらに、同定したヒット化合物の抗ウイルス活性評価を行った結果、強い抗ウイルス活性を示す化合物 DP2392-E10 を同定した。

3) NP-intrinsically disordered region (IDR) 2 の天然変性領域の機能解析

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 及び X 線結晶構造を基に解析した結果、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。これら 3 つの NP IDR (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、宿主の異なるインフルエンザウイルス間において最も高度に保存されている一方で、ウイルス複製に対する影響については明らかにされていない。そこで、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要な役割を果たし、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ヨ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た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 の 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

近年数多くの NP 阻害剤に関する研究が報告されているが、本研究により同定した NP 阻害剤である RK424 や NP-NES3 を標的とした核外移行阻害剤 DP2392-E10 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。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、NP の IDR2 がウイルス複製に必須な役割を担い、その構成アミノ酸配列自身も非常に配列保存性が高いことから、IDR2 は人獣共通に作用する新規抗インフルエンザウイルス薬開発に向けた新たな標的として有望である。

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、創薬の標的分子として非常に有望であることが示された。本研究成果は、A 型インフルエンザ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。