

## 審査の結果の要旨

氏名 柿坂 道範

A 型インフルエンザは、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。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り、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。しかしながら、既存薬に対する耐性ウイルスの出現が既に複数報告されていることから、新規作用機序を有する抗ウイルス薬の開発が必要である。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、宿主の異なる A 型インフルエンザウイルス間において高度に保存されていることから、NP を創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。

本研究では、第 1 章において、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 RK424 が得られた。RK424 は NP の 4 つのアミノ酸残基 (R162、S165、L264 及び Y487) から形成されるポケット構造に結合し、NP の複数の機能 (NP-RNA 間の結合、NP-NP 間の結合及び NP の核外移行) を阻害することが明らかとなった。

第 1 章で獲得した化合物 RK424 が NP-NES3 と部分的に結合し、NP の核外移行を阻害することで強い抗ウイルス活性を発揮したことから、第 2 章では、NP-NES3 配列そのものを標的とした評価系構築と化合物スクリーニングを行った。その結果、NP-NES3 依存的な核外移行を阻害する化合物が複数得られ、最も強い抗ウイルス活性を示した化合物として DP2392-E10 が見出された。

第 1 章及び第 2 章の研究成果により見出された抗ウイルス活性化合物 RK424

及び DP2392-E10 は、共に NP の機能制御に必須な役割を担い、ウイルス株間で非常に配列保存性が高い領域を標的としていることが明らかにされた。またこれらの NP 阻害剤の標的と想定されるアミノ酸残基をアラニンに置換した変異ウイルスをリバーシジェネティクス法により作成したところ、ウイルス複製能が完全に失われることが示された。これらの結果は、アミノ酸配列が高度に保存された領域は、ウイルス複製における何らかの重要な役割を担っていると共に、変異導入が許容されにくい性質を有していることを示唆するものである。このため本領域は、薬剤耐性化に抵抗性を有する新規創薬標的として有望であると考えられる。そこで、第 3 章では、NP のアミノ酸配列高保存領域の抽出を行ったところ、アミノ酸配列保存性の非常に高い領域が 3 か所存在することが明らかにされた。これらの領域はいずれも定まった構造をとらず、柔軟な配列特性を有する天然変性領域 (Intrinsically disordered region: IDR) であった。IDR のうち、NP の RNA 結合領域中に存在する NP-IDR2 (アミノ酸 72 位-92 位) の機能を解析したところ、NP-IDR2 はウイルス複製に必須な役割を果たし、RNA と phosphatidylinositol 4,5- biphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) の両者と結合することで、効率的なウイルスゲノムのパッケージングの制御に関与していることが示された。

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、本研究により同定された NP 阻害剤である RK424 ならびに NP-NES3 を標的とした核外移行阻害剤 DP2392-E10 に象徴されるように、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 のアミノ酸配列高保存領域を標的とした機能解析により、ウイルスゲノムパッケージングを制御する NP-IDR2 が新たな創薬標的として有望であると結論づけた。

以上、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。これらの研究成果は、学術上かつ応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。