

革新的インフルエンザウイルス創薬プロジェクト

研究概要集

平成 29 年 3 月 13 日

プロジェクトリーダー 朴 三用

公益財団法人 神奈川科学技術アカデミー

目次

1. はじめに	(1)
2. 基本構想	(1)
3. 研究成果	(3)
(1) 化合物の探索	(3)
(2) RNA ポリメラーゼによるモノクローナル抗体作製	(4)
4. 今後の展望	(4)
5. 業績	(6)
6. プロジェクト参加者一覧	(9)

<研究報告>

抗体を用いた抗インフルエンザウイルス薬の開発	1
インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PA-PB1 サブユニット間結合阻害剤の開発	7
宇宙の微小重力環境を利用した高品質タンパク質結晶の作製と創薬への応用	15
インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ複合体の核移行に関する構造生物学的研究	23

総 括

1. はじめに

インフルエンザウイルスには、抗原性の大きな違いからウイルス粒子の外被表面のタンパク質である HA(ヘマグルチニン)16 種類と NA(ノイラミニダーゼ)9 種類の組み合わせにより、144 通りの亜型が存在し得る。20 世紀に入り人類は3回の新型インフルエンザの登場を経験した。1918 年に出現したスペイン型インフルエンザ (H1N1) は、世界中で 2,000～4,000 万人の死者を出した。このウイルスは様々な変異を引き起こしつつ、流行が 39 年間続き、1957 年からは新型アジア型 (H2N2) と香港型 (H3N2) へ姿を変えた。新型インフルエンザが出現すれば、人類は過去にこの新型ウイルスの感染を受けたことがないため当然体内に中和抗体は存在せず、また対応するワクチンの開発にも時間がかかるため、新型ウイルスの感染者が一時的に増加し、世界規模での大流行 (パンデミック) となることは容易に予想される。

新型インフルエンザを始め、鳥インフルエンザ H5N1 は世界的な大流行が懸念され、日本を含め、世界的な規模による具体的な対策が必要とされている。我が国も新型インフルエンザウイルスの対策を昨年度から本格的に打ち出しており、新型インフルエンザに変異する可能性が高い鳥インフルエンザ (H5N1) をもとにすでに製剤化されているプレ・パンデミックワクチンや、抗ウイルス剤であるタミフルやリレンザなどの備蓄をしている。厚労省の報告によると日本でパンデミックが起きた場合、感染者 3200 万人、死者最大 64 万人と予想されている。しかし、インフルエンザは非常に変異を起こしやすいため、次のパンデミックを引き起こす亜型を予測するのは困難であり、その際に現在備蓄しているワクチンや薬剤が有効であるかは不透明である。このような観点から、変異をほとんど起こさないインフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼが全世界の製薬会社をはじめ各研究機関から重要な創薬ターゲットとして注目されている。

2. 基本構想

インフルエンザ RNA ポリメラーゼは、ウイルスの複製(増殖)に中心的な役割を担っていることから、創薬のターゲットとして注目されている。また、新型インフルエンザ H1N1 と鳥インフルエンザ (H5N1、H7N9) などのそれぞれインフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列は 96%以上が同じであり、他のインフルエンザウイルスのタンパク質より、変異が非常に起こりにくいことが知られている。このような観点から、RNA ポリメラーゼをターゲットとした阻害剤が開発されると普遍的にインフルエンザウイルスの増殖を抑える事が出来る。

近年、世界中に広がりを見せている鳥インフルエンザ（H5N1, H7N9）は深刻である。特に、東南アジアやエジプトでは鳥における H5N1 ウイルスの流行は毎年起きており、偶発的にヒトへ感染した数も数百人を超え毎年増加している。昨年では中国で発生した H7N9 によるヒトへの感染報告が続いており、確認された感染者が 664 人を超えた。国内でも、野鳥から鶏への感染事例は年々増え続けており、経済的損失や健康面での不安など社会へ深刻な影響を与えている。ただ、宿主となる生物種が亜型により異なるため、鳥型ウイルスはヒトにも感染できる型へ大きく変異しておらず、今のところ大流行を起こす状態には至っていない。しかし、ヒト型に変異する危険性は確実に存在しており、すでに、免疫システムが人と似ているフェレットの感染実験で、HA に 3 カ所の変異を入れた結果、次々とフェレット同士で感染が確認された（Nature, 2012）。この研究は、鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスが人に容易に感染するようになり、世界的パンデミックを起こす可能性があると報告している。また、この研究結果は世界保健機関（WHO）とアメリカ政府の要請で、生物テロに悪用されるとの懸念から、科学雑誌社（Nature, 2012）に対して公表を差し止めるなど異例の対応が求められた。現在でも持続的に感染の広がりを見せている中国では、鳥インフルエンザ H7N9 のヒトへの感染報告が続いており、確認された感染者が数百人を超え、WHO による警戒が続いている。今後、別の亜型の新型インフルエンザウイルスが出現する可能性はあるが、どのように変異を繰り返してどのような亜型が出現するのかを予測することは不可能に近い。

インフルエンザウイルスゲノム（vRNA）は 8 本に分節化された一本鎖 RNA であり、その極性は mRNA（プラス鎖）と逆の極性（マイナス鎖）RNA である。このマイナス鎖ゲノム RNA を鋳型にして、プラス鎖 cRNA（complementary RNA）が合成される。子孫 vRNA は cRNA を鋳型とした複製により増幅される。これらの反応は、ウイルスにコードされている RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとヌクレオキャプシドタンパク質（NP）の結合した vRNP 複合体（viral ribonucleoprotein complex）によって行われている。

本研究プロジェクトでは、インフルエンザ RNA ポリメラーゼが持つ 3 つのサブユニット（PA, PB1, PB2）のうち、どれか 1 つのサブユニットでも欠けるとウイルスの増殖機構が失われる事に注目し、PA-PB1 と PB1-PB2 サブユニット複合体の構造解析に世界で初めて成功した（Nature, 2008; EMBO J, 2009）。その知見を基に本研究では、これらの RNA ポリメラーゼの構造情報に基付きイン・シリコ（*in-silico*）手法による抗ウイルス剤の開発を目指す。

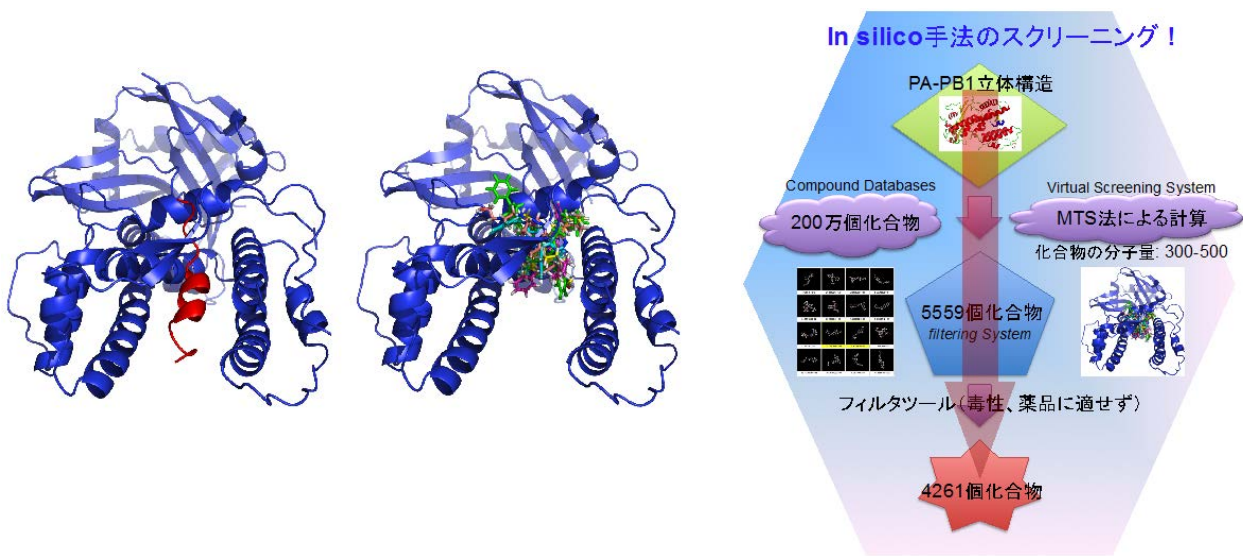


図. インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PA-PB1 の構造に基着くイン・シリコ手法
コンピュータ上で化合物をドッキングさせ、化合物の探索を行う。

3. 研究成果

本プロジェクトでは、創薬の基盤になる RNA ポリメラーゼの PA-PB1 と PB1-PB2 サブユニット複合体の構造解明に世界で初めて成功しており、その構造情報に基づき、イン・シリコ手法により、新規抗インフルエンザ剤の開発を行った。また、各インフルエンザウイルス亜型における RNA ポリメラーゼのタンパク質は、96%以上アミノ酸が保存されていることから、宿主細胞内でインフルエンザウイルスの増殖を阻害できる RNA ポリメラーゼを標的としたモノクローナル抗体を開発し、RNA ポリメラーゼタンパク質と抗体の立体構造解明を行った。このような抗インフルエンザ阻害剤や、ウイルス増殖を阻害する抗体は、インフルエンザウイルスの変異に強く、既存の抗インフルエンザウイルス剤やワクチンでは対応できないどんな新型インフルエンザにも対応できる画期的なものになることが期待される。

(1) 化合物の探索

インフルエンザ RNA ポリメラーゼが持つ 3 つのサブユニット (PA, PB1, PB2) のうち、どれか 1 つのサブユニットでも欠けるとウイルスの増殖機構が失われる。このことから、PA-PB1 サブユニット複合体の構造から探索される、PA と PB1 サブユニットの結合を阻害する化合物は、抗ウイルス剤の創薬につながると考えられる。PA-PB1 サブユニット複合体の構造を基にイン・シリコ手法により 200 万個の化合物の中から、有効な化合物数個を発見する事に成功した。現在までに有効性化合物の *in-vitro* での探索方法は確立しており、さらに有

効性化合物の開発を行った。上に示した図は、PA サブユニットの構造に 200 万個の化合物を結合させ、もっとも安定に結合する化合物の探索を行った手法を示している（イン・シリコ手法）。最終的に 200 万個の化合物から、化合物の分子量 300-500 の範囲で、4261 個の化合物を得る事ができた。イン・シリコ手法により探索された 4 千個あまりの化合物の中から、200 個程度の化合物で *in-vitro* によるより詳細な探索を行った。PA タンパク質と化合物との結合実験方法は、すでに確立している。その方法によりさらに、3 個の有効性化合物を見つける事ができた。また、ヒトの細胞による *in-vivo* 系によりウイルスの増殖を阻害する事も確認した。この方法に基づき、多くの化合物との結合を調べるスクリーニングを迅速に行うことが可能にした。また、化合物が PA タンパク質と PB1 タンパク質の結合を選択的に阻害する事を確認するための、ITC 測定や GST を用いた共沈殿法による技術も確立した。今後、化合物の最適化を行い、さらに有効性化合物の開発を目指す。

(2) RNA ポリメラーゼによるモノクローナル抗体作製

これまでタンパク質の精製すら困難であった RNA ポリメラーゼを標的としたモノクローナル抗体を作製し、宿主細胞内でインフルエンザウイルスの増殖を阻害する抗体開発を行った。さらに、抗体を応用したヒト宿主細胞内でのウイルス増殖メカニズムの解明、抗体とのタンパク質複合体の構造解明を行った。このようなアプローチは、新たな抗ウイルス剤の開発手法であり、今までの抗インフルエンザウイルスの阻害剤開発と全く異なる試みである。

PA-PB1 タンパク質 (A/H1N1 由来) を抗原としたマウスモノクローナル抗体を作製した。さらに精製抗体を蛍光ラベル化し宿主細胞へ簡便に導入する方法やウイルスの増殖を簡便に確認する技術を開発しながら、阻害抗体の樹立に成功した。宿主細胞である MDCK 細胞にインフルエンザウイルス (A/H3N2) を感染させ、8 時間後、ウイルスの増殖を観察すると、抗体が導入された細胞では、ウイルスの増殖は観察されなかった。一方、抗体が導入されていない細胞やコントロール抗体導入細胞では、ウイルスが増殖していることが確認された。また、抗体は、強毒性である H5N1 の PA-PB1 タンパク質とも強く結合することを確認しており、汎用性の高い阻害抗体であることが示唆された。また、PB2 の RNA 結合部位から作製した 2 個の抗体において、抗原タンパク質 (PB2) との結合が認められた。その中から、PB2 3-1.6 抗体は分子生物学的研究ツールでの診断試薬に使用可能なものとして特許出願 (特願 2014-068824) をしており、民間会社へのライセンス契約に成功した。

4. 今後の展望

本プロジェクト研究は、新型インフルエンザウイルス用薬剤開発の構造基盤である RNA

ポリメラーゼの構造に基づき、イン・シリコ手法による創薬を目指す研究である。世界中の製薬会社や研究機関において、普遍的にインフルエンザウイルスの増殖を抑えることができる化合物や、ワクチンなどの開発が行われており、世界的な競争になっている。本プロジェクトのリーダーによる RNA ポリメラーゼの構造解明の国内外での反響は大きく、各種メディアにも取り上げられ、社会的に大きな期待が集まっており、社会的に貢献できる成果である事を示している。本研究により新たな抗ウイルス薬が開発されれば、それは国内だけではなく全世界の医療への貢献が期待され、経済的な効果は計り知れない。その反面、厳しい競争になると予想される。そこで、より品質の高い研究データを得るために、独立行政法人宇宙航空研究開発機構（JAXA）の JEM 利用高品質タンパク質結晶生成実験（第 2 期第 1 回実験、第 2 期第 2 回実験に参加し、国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟の実験装置を使用したタンパク質結晶生成実験を行った。地上で作製するタンパク質の結晶と、宇宙環境で作製するタンパク質の結晶を比較し研究・実験を行うことにより、今後の抗ウイルス剤の創薬研究の発展に大いに期待が持てる。

5. 業績

原著論文

1. Sugiyama K, Iyori M, Sawaguchi A, Akashi S, Tame JR, Park SY, Yoshida S. The crystal structure of the active domain of Anopheles anti-platelet protein, a powerful anti-coagulant, in complex with an antibody. *J Biol Chem.* 289(23):16303–16312. 2014.
2. Yoshida H, Park SY, Oda T, Akiyoshi T, Sato M, Shirouzu M, Tsuda K, Kuwasako K, Unzai S, Muto Y, Urano T, Obayashi E. A novel 3' splice site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit. *Genes Dev.* 29(15):1649–60. 2015.
3. Ohki M, Sugiyama K, Kawai F, Tanaka H, Nihei Y, Unzai S, Takebe M, Matsunaga S, Adachi S, Shibayama N, Zhou Z, Koyama R, Ikegaya Y, Takahashi T, Tame JR, Iseki M, Park SY. Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(24):6659–64. 2016.
4. Hirano T, Sugiyama K, Sakaki Y, Hakamata W, Park SY, Nishio T. Structure-based analysis of domain function of chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEBS Lett.* 589(1), 145–151. 2015.
5. Shibayama N, Sugiyama K, Tame JR, Park SY. Capturing the hemoglobin allosteric transition in a single crystal form. *J Am Chem Soc.* 136(13), 5097–5105, 2014.
6. Kikuchi J, Shibayama N, Yamada S, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, Sugiyama K, Ohki M, Park SY, Furukawa Y. Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding. *PLoS One.* 8(4), e60649, 2013

総説

1. Yoshida H, Park SY. 「宇宙における高品質タンパク質結晶化技術の伝承と可能性」 *Int. J. Microgravity Sci. Appl.* 34(1). 2017
2. 杉山佳奈子. 「血小板凝集阻害蛋白質 AAPP の構造と機能」 *日本血栓止血学会誌*, 27(3), 358–364, 2016
3. 平野貴子, 杉山佳奈子, 坂木祐太, 上原理絵, 白石春香, 袴田航, 朴三用, 西尾俊幸. 「Vibrio 属細菌由来キチンオリゴ糖脱アセチル化酵素の諸性質・構造及び生成糖の生理機能」 *応用糖質科学*, 5(2), 113–119, 2015

口頭発表(招待講演)

1. Park S-Y. 「The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase」 MISSCA 2013 (MEETING OF THE ITALIAN, SPANISH AND SWISS CRYSTALLOGRAPHIC ASSOCIATIONS) Sep. 10, 2013, Como Italy.
2. Sugiyama K., Park S-Y. 「The crystal structure of the Active domain of AAPP, a powerful anti-coagulant, in complex with an antibody」 IUCR 2014 (CONGRESS AND GENERAL ASSEMBLY OF THE INTERNATIONAL UNION OF CRYSTALLOGRAPHY, Aug. 9. Montreal, Canada.
3. 朴三用、「新規抗ウイルス薬の開発基盤となる RNA ポリメラーゼの構造解析」CBI 学会 2013 年大会-生命医薬情報学連合大会、タワーホール船堀、2013 年 10 月 31 日.

口頭発表(一般講演)

1. 吉田尚史 「インフルエンザ RNA ポリメラーゼ PB1-imporitn α 複合体の試料調製と結晶化」 高品質蛋白質結晶化技術の宇宙科学研究拠点形成事業 技術プラットフォーム形成研究会 (株)丸和栄養食品(奈良県)、2015 年 9 月 15 日
2. 吉田尚史 「インフルエンザ RNA ポリメラーゼ PB1-imporitn α 複合体の試料調製と結晶化: 検討事例と適応例」 高品質蛋白質結晶化技術の宇宙科学研究拠点形成事業 技術プラットフォーム形成研究会 東京大学弥生講堂(東京都)、2016 年 2 月 22 日
3. 吉田尚史 「RNA 結合タンパク質の結晶化の精製と結晶化: スプライシング関連蛋白質 U2AF の立体構造解析」 高品質蛋白質結晶化技術の宇宙科学研究拠点形成事業 関東チーム若手向け研究会 神奈川サイエンスパーク(神奈川県)、2016 年 8 月 26 日
4. 杉山佳奈子. 「光活性化アデニル酸シクラーゼの構造解析」 高品質蛋白質結晶化技術の宇宙科学研究拠点形成事業 関東チーム若手向け研究会 神奈川サイエンスパーク(神奈川県)、2016 年 8 月 26 日
5. Sugiyama K, Yoshida H, Park SY. 「Structural and functional study of influenza viruses' RNA polymerase for develop a new medicine」 2nd international symposium on space science of high quality protein crystallization technology, Oct. 21, 2016, Young scientist 5 in Finding fruit of research -young scientist-, Japan

ポスター発表

1. 吉田尚史、朴三用「メチシリン耐性黄色ブドウ球菌由来ペニシリン結合タンパク質 3 の X 線結晶構造解析」、日本蛋白質科学会、ワークピア横浜/横浜産貿ホール(横浜市) 2014 年 6 月 27 日

2. Sugiyama K, Yoshida H, Urano T, Park SY.
Structural and functional study of the antibody against influenza viruses' RNA polymerase to discover a new medicine for the influenza disease.
The 30th European Crystallographic Meeting, 28th August - 1st September 2016, MS5-P9, Switzerland
3. Ohki M, Sugiyama K, Kawai F, Matsunaga S, Iseki M, Park SY.
Structural basis for photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase from the photosynthetic cyanobacterium *Oscillatoria acuminata*
The 30th European Crystallographic Meeting, 28th August - 1st September 2016, M13-P5, Switzerland
4. Yoshida H, Sugiyama K, Park SY.
The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase.
The 27th European Crystallographic Meeting, MS5-P50, August 2015, Croatia
5. Sugiyama K, Iyori M, Sawaguchi A, Akashi S, Tame R.H. J, Yoshida S, Park SY.
The crystal structure of the active domain of *Anopheles* anti-platelet protein (AAPP), a powerful anti-coagulant, in complex with an antibody.
The 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr), MS53.P40, August 2014, Canada
6. Yoshida H, Sugiyama K, Park SY.
The structural basis for the essential PA-PB1 subunit interaction in influenza RNA polymerase.
The 47th crystallographic course at Ettore Majorana Centre, Erice, May 30 to June 8 2014, Italy

記者発表・取材

1. 2013年4月20日(土)付けの読売新聞朝刊に掲載;
タイトル:「インフル新薬に取り組む」
2. 独立行政法人宇宙航空研究開発機構(JAXA)から取材を受け、同機構発行の機関誌「JAXA'S」に掲載
タイトル:「人類とウイルスの総力戦に挑む タンパク質結晶生成実験 in cosmo」
3. 2013年11月7日 NHK おはよう日本、「新型インフル進む新薬研究-宇宙実験開始」
4. 2014年1月24日 神奈川新聞 “新たな薬開発へ弾み”

特許 国内出願 2 件（うち未公開 1 件）

インフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの PB2 サブユニットに対するモノクローナル抗体（特願 2014-68824）

共同研究 7 機関 4 件

6. プロジェクト参加者一覧

氏名	役職	在籍期間
朴 三用	非常勤プロジェクトリーダー 横浜市立大学生命医科学研究科 教授 兼任	平成 25 年 4 月～平成 29 年 3 月
杉山 佳奈子	常勤研究員	平成 25 年 4 月～平成 29 年 3 月
吉田 尚史	常勤研究員	平成 26 年 4 月～平成 29 年 3 月
浦野 健	非常勤研究員 島根大学医学部 教授 兼任	平成 25 年 4 月～平成 29 年 3 月
西村 善文	非常勤研究員 横浜市立大学生命医科学研究科 教授 兼任	平成 26 年 4 月～平成 29 年 3 月
中平 徹	研究補助員	平成 26 年 10 月～平成 29 年 3 月
大木 規央	研究協力員（横浜市立大学大学院）	平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
長部 勇希	研究協力員（横浜市立大学大学院）	平成 26 年 4 月～平成 28 年 3 月
小川 洋司	研究協力員（横浜市立大学大学院）	平成 27 年 4 月～平成 29 年 3 月
北村 美佳	研究協力員（横浜市立大学大学院）	平成 27 年 4 月～平成 29 年 3 月
唐沢 朱音	研究協力員（横浜市立大学大学院）	平成 28 年 8 月～平成 29 年 3 月
鎌田 健一	研究協力員（横浜市立大学大学院）	平成 28 年 8 月～平成 29 年 3 月
田口 千絵子	事務補助員	平成 26 年 1 月～平成 29 年 3 月

研究報告

抗体を用いた抗インフルエンザウイルス薬の開発

杉山佳奈子・浦野健

1. はじめに

インフルエンザはインフルエンザウイルスが感染することによって発症する人畜共通感染症である。ウイルスが感染すると、発熱、咳、関節の痛みなどの症状が現れ、たいていの場合は3日～1週間程度で完治する。通常の季節性インフルエンザであれば、感染範囲も想定範囲内でおさまっており、多くの死者を出すこともなく数ヶ月程度で感染は終息する。時折、非常に感染力や病原性の強いウイルスが出現し、世界的な大流行(パンデミック)を起こすことがある。近年、高病原性の鳥インフルエンザウイルスの人への感染や、これまで用いられてきた薬剤に対して耐性を持つウイルスの存在が確認されており、多数の死者を出すようなパンデミックを引き起こすウイルスの登場が危惧されている。[1][2] 起こりうるパンデミックに対応するため、これまでに用いられてきた薬剤とは作用機序の異なる新規の薬剤の開発が求められており、本研究室では、そのターゲットとしてインフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼに注目した。

インフルエンザウイルスは遺伝子として1本鎖RNAを持つウイルスであるため、非常に変異を起こしやすい。実際に、現在の薬剤のターゲットとなっている表面タンパク質では、A型インフルエンザウイルスの亜種の中でもその相同性は30%程度である。一方で、RNAポリメラーゼの相同性は亜種

間でも90%以上に保たれている。これは、RNAポリメラーゼがウイルス遺伝子の複製と転写を行う、ウイルスの生存には必須なタンパク質であるためだと考えられている。よって、このタンパク質を阻害することで、ウイルスの増殖を高確率で阻害することができ、また、その阻害剤はどのタイプのウイルスに対しても同様の効果を発揮することができると期待されている。

本研究ではタンパク質の阻害方法として、モノクローナル抗体を用いた。RNAポリメラーゼを抗原として結合する抗体を作成し、その抗体が細胞内においてRNAポリメラーゼの活性を阻害すれば、抗体そのものが薬剤となり得るし、また、その結合部位が明らかになればRNAポリメラーゼと抗体との結合に関与しているアミノ酸を用いたペプチド創薬研究や低分子化合物の*in silico*の構築も考えられるためである。活性を阻害しなかった場合であっても、結合が確認できればウイルスの検知やRNAポリメラーゼを用いた分子生物学的なマーカーとして研究に大いに役立つ抗体を手に入れることができるため、非常に有効な手段だと考えている。

2. 実験及び結果

2-1.抗体の作成

抗原になるRNAポリメラーゼとしては、本研究グループで構造解析を行ったPA-PB1[3]及びPB1-PB2のサブユニット

結合部位[4]に加え、PA の Endonuclease ドメイン[5]、PB2 の C 末端側ドメイン[6]、Cap 結合ドメイン[7]を用意した。

精製した RNA ポリメラーゼをアジュバンドと共にマウス(BALB/c、8週齢メス)に注射し、抗体価が上がってきたところで脾臓を回収した。抗体を生産する B 細胞はそのままでは増殖できないため、増殖能を持つ細胞と融合させ、HAT 培地で選択することで抗体生産細胞を作成し、希釈法および ELISA、免疫沈降法を用いて、抗原に結合する抗体を生産する単クローンを分離した。分離した抗体生産細胞をマウス腹腔内に注射することで、抗体を含んだ腹水を得た。結果として、PB1-PB2 や PB2 の Cap 結合ドメインの抗体を得ることはできなかったが、PA-PB1 に結合する抗体 13 個、PB2 の C 末端ドメインからは 7 個の抗体が得られた。

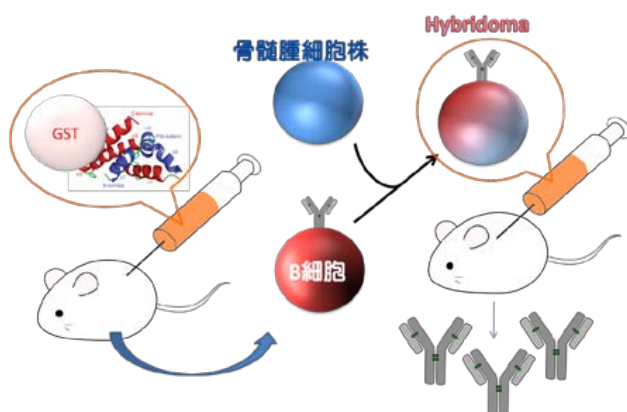


図 1. 抗体作成過程イメージ図

得られた腹水から、陰イオン交換カラム、ヒドロキシアパタイトカラムなどを用いて抗体を精製した。得られた抗体と抗原の結合を確認するために、各々精製したタンパク質をモル比で 1:1 になるように混ぜ、

超遠心分析を行った。超遠心分析によって結合が確認できたサンプルはゲル濾過に通し、結合及び分子量の確認を行った。

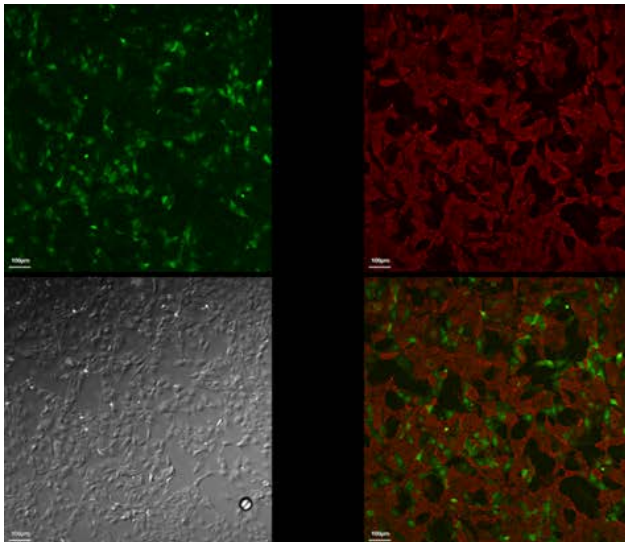
超遠心分析、ゲル濾過の結果、PA-PB1 では 1 つ、Cap 結合ドメインでは 2 つの抗体と抗原の結合が確認できた。Cap に結合する抗体は H1N1 型に限らず多くのタイプのインフルエンザウイルスの Cap 結合部位に結合することも明らかにしている。

2-2. 活性阻害能の確認

得られた抗体が RNA ポリメラーゼの活性を阻害できるかどうか確認するために、抗体を細胞に導入し、ウイルスの感染を確認した。

まず、抗体そのものでは細胞に導入するには大きすぎるため、抗原結合部位(Fab)だけを切り出しビーズ法により物理的に傷をつけた細胞に混ぜることで抗体を細胞内に導入した。その後、インフルエンザウイルスを感染させ、ウイルスの表面タンパク質である HA を認識する抗体を用いて、ウイルスを検出した。

その結果、抗体を組み込んでいない細胞と、Cap 結合ドメインから作成した抗体を導入した細胞ではウイルスが増殖したが、PA-PB1 に結合する抗体を導入した細胞では、ウイルスの増殖がみられなかった。このことからこの PA-PB1 結合抗体は RNA ポリメラーゼの活性を阻害し、ウイルスの増殖を防ぐことが明らかになった。そこで、PA-PB1 結合抗体によるウイルス増殖阻害機構を明らかにすべく、PA-PB1 および Fab の複合体の構造解析を目指した。なお、Cap 結合ドメインに結合する抗体に関しては、ウイルス検出や研究に用いる特異的抗体と



Alexa-488 PA11.9	anti-Aichi Flu Alexa-594 細胞表面
DIC	merge

図 2. 増殖実験結果

ウイルス感染 8 時間後に撮影

PA-PB1 抗体を緑、HA 抗体を赤で染色してある。

緑色の細胞の周囲には赤色のウイルスが出てきていない事がわかる。

して特許を取得し、コスモ・バイオ株式会社とのライセンス契約を締結している。

2-3.PA-PB1-Fab 結合部位の同定

2-3-1.結晶化

これまでの実験で得られたウイルスの増殖を阻害する抗体が、実際にどのように PA-PB1 に結合し、その活性を抑えているのかを解明するため、PA-PB1 および Fab の複合体の構造解析を目指し、実験を行った。

H1N1 型 PA-PB1 結合部位と Fab の複合体を用いて結晶化を行った結果、25%(w/v) PEG4,000、0.2M AmSO₄ を含む溶液中で結晶が得られたが、結晶中に含まれていたのは Fab のみであり、結合部位は明らかにできなかった。しかしながら、Fab の構造及び、抗原認識部位に位置するアミノ酸の候補を特定することができた。

また、PA-PB1-Fab 複合体の X 線小角散

乱実験を行ったところ、PA の head ドメイン側に抗体が結合していることが明らかになった。(図 3) このことから、head ドメインのみを作成して複合体構造を解析することを試みたが、残念ながら head ドメインを安定かつ大量に得ることができなかった。

H1N1 型 PA-PB1 および Fab を用いた結晶化では、粗結晶が得られても再現性がない、構造解析に用いるに適した単結晶が作成できない等の問題を解決することができなかった。この原因として、Fab のループ部位が自由に動いて均一ではないフォームを取り得ることと、PA-PB1 に多くのループ部位が含まれることが考えられる。そこで、まず、PA-PB1 のループ部位を短くしたものをいくつか作成してみたが、head ドメインと同じく、WT に比べて非常に不安定であり、結晶化に用いるには至らなかった。次に Fab のうち、抗原結合部位(Fv)のみを

作成し PA-PB1 との複合体の結晶化を試みた。Fv の作成としては、大腸菌発現系を用いて作成した不溶性蛋白質のリフォールディング法と、プレバチルス発現系を用いた可溶化 Fv の作成を行った。どちらも安定な Fv を 1L 培養あたり 0.5mg ほど得ることができたため、PA-PB1 との複合体を作成し、結晶化を行ったが、結晶化溶液中では非常に沈殿しやすく、良質な結晶を得ることができなかつた。しかしながら、これらの実験の過程において、結晶化における沈殿のしやすさが Fab よりも PA-PB1 に起因しており、構造解析に用いてきた H1N1 型 PA-PB1 よりも H5N1 型および H7N9 型の方が安定で沈殿しにくいという傾向が得られた。そこで、H7N9 型 PA、および PA-PB1 を作成し Fab、Fv との共結晶を作成した。(図 3) H1N1 型を用いていたときには結晶が得られなかつた複数の条件において結晶が得られたが、結果としては同様に再現性が乏しく、また非常に小さいことから、構造解析を行うことはできていない。

2-3-2. 変異体を用いた結合部位の同定

PA-PB1-Fab および Fv の結晶化が難しいことから、PA-PB1 のどの部位が抗体に結合しているのかを同定するため、変異体実験を行った。前述の通り、X 線小角散乱実験および PA 断片を用いた結合実験の結果から、抗体が PA の head ドメインに結合することはすでに明らかにしている。X 線小角散乱実験の結果、図 3 で示したように平面的に結合することがわかっていたことから、head ドメイン上部で表面に露出しているアミノ酸をアラニンに置換した変異体を複数作成し、抗体との結合実験を行った。変異体の部位と結合実験の結果を図 4 に示す。

図で示したように、表面に位置するアミノ酸のほぼ全ての変異体を作成し、結合実験を行ったが、全ての変異体において抗体が結合するという結果が得られ、PA-PB1 の抗体結合部位を明らかにすることは未だにできていない。

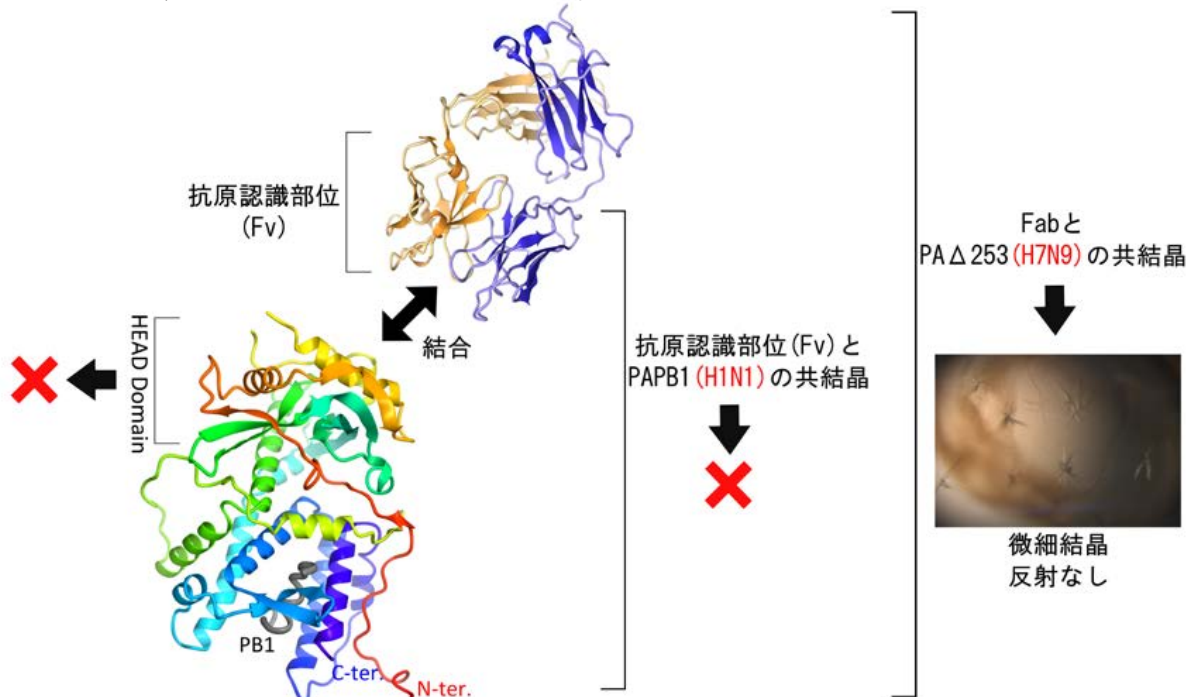


図 3 : PAPB1 と Fab の結晶化

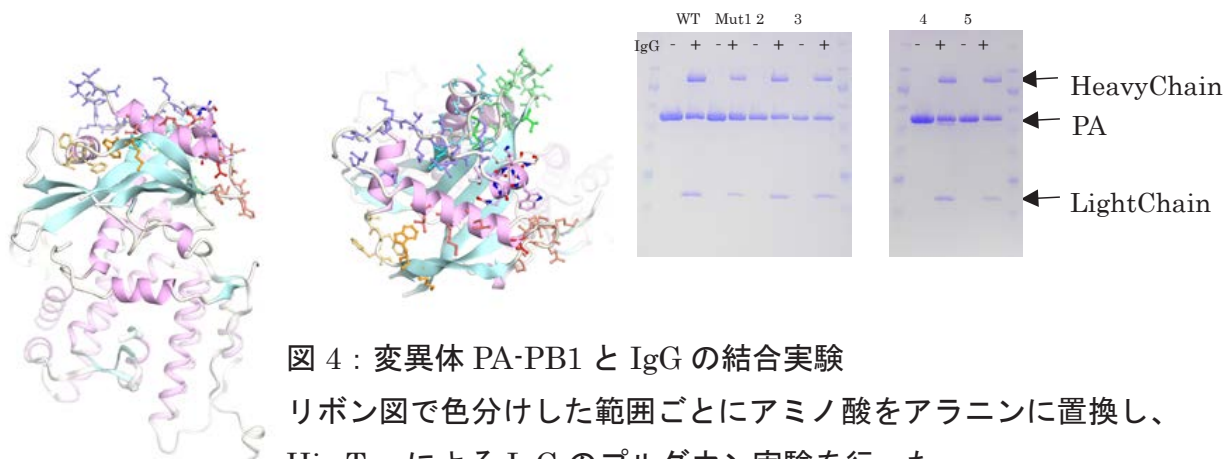


図 4 : 変異体 PA-PB1 と IgG の結合実験

リボン図で色分けした範囲ごとにアミノ酸をアラニンに置換し、His-Tag による IgG のプルダウン実験を行った。

左のゲルがループ部位、右がヘリックス部位の変異体の結果を示している。

3.まとめと今後の予定

新規抗インフルエンザウイルス薬のターゲットとして RNA polymerase とその抗体に注目して研究を行った結果、ウイルスの増殖阻害能を持つ抗体を得ることができた。

この抗体と PA-PB1 との結合部位を特定し、抗体がどのように RNA polymerase の機能を阻害しているのかを明らかにすることを目的として上記のような実験を行ってきたが、残念ながら、詳細を明らかにすることはできなかった。

しかしながらこれまでの研究と、2014 年度ドイツのグループから発表された B 型インフルエンザウイルスの RNAPolymerase の立体構造から、今回得られた PAPB1 結合抗体は図 5 で示したように、RNA と RNAPolymerase の結合部位付近に結合すると考えられ、PA と PB1、PB2 との結合にはおそらく影響せず、RNA の結合阻害もしくは宿主蛋白質との結合を阻害することによって、RNA polymerase の機能を阻害していると推測される。

今後は、これまでの研究の継続として、

PA-PB1 の抗体結合部位を同定し、結合部位と Fab との複合体構造の解析を目指すことで、抗体を用いた抗インフルエンザウイルス薬の開発を推進してきたいと考えている。

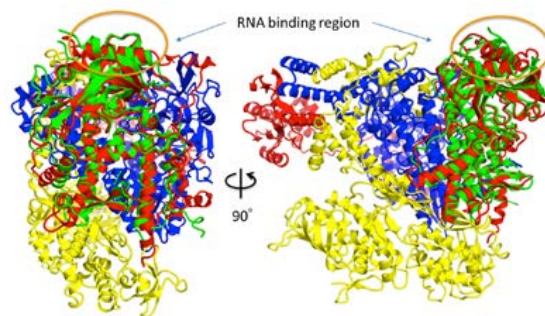


図 5 : B 型インフルエンザウイルス RNA polymerase の立体構造

PA を赤、PB1 を青、PB2 を黄色で示している。

A 型インフルエンザウイルスの PAPB1 結合部位の構造を緑で重ね合わせて示した。本研究で作成した抗体はオレンジの丸で示した範囲に結合すると考えられている。

1. 農林水産省インフルエンザ情報ページ
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/tori/>
2. 厚生労働省インフルエンザ情報ページ
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kekkaku-kansenshou/infuleenza/
3. Obayashi, E., et al., *The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase*. Nature, 2008. **454**(7208): p. 1127-31.
4. Sugiyama, K., et al., *Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase*. EMBO J, 2009. **28**(12): p. 1803-11.
5. Mochalkin, I., et al., *Discovery of antibacterial biotin carboxylase inhibitors by virtual screening and fragment-based approaches*. ACS Chem Biol, 2009. **4**(6): p. 473-83.
6. Tarendeau, F., et al., *Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit*. PLoS Pathog, 2008. **4**(8): p. e1000136.
7. Guilligay, D., et al., *The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(5): p. 500-6.

インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PA-PB1 サブユニット間結合阻害剤の開発

吉田尚史・朴三用

1. 研究背景

インフルエンザは、毎年冬季に流行する人間にとって身近な感染症である。人間が感染すると、高熱や関節痛、倦怠感などの全身症状や、喉の痛み、咳などの呼吸器系の症状を示す。さらに、インフルエンザは時にパンデミックと呼ばれる世界的大流行を引き起こし、多数の死者を出してきた。これまでに、スペイン風邪(A/H1N1)やアジア風邪(A/H2N2)、香港風邪(A/H3N2)などのパンデミックが発生し、特に1918年のスペイン風邪での犠牲者は4千万人とも言われている。

最近では、2009年4月にメキシコで発生した新型インフルエンザは瞬く間に広がり、世界中で脅威となっている。日本では幸い、新型インフルエンザ対策として備蓄されてきたタミフルやリレンザといった薬剤がこのウイルスには有効ということが確認され、この新型ウイルスが上陸してもそれほど大きな被害を及ぼさないだろうと予想されている。しかし、さらに深刻な問題は、インドネシアやタイの豚の多くが強毒型のトリインフルエンザ(H5N1)を保有しているという、最近の調査により明らかになった事実である。豚型から人型へと変異を遂げて新型ウイルスが発生した今、この豚の持つ強毒型がいつ人に感染するような新型インフルエンザとなって現れるのか、もはや時間の問題という見方もある。さらに、タミフル耐性型トリインフルエンザも出現していることから、実際にそのような新型インフルエンザが

出現した際の対策の有効性は不透明であり、新たな対策が世界中で求められている。

インフルエンザウイルスはRNAとタンパク質からなる単純な構造で、ウイルス自身では自己増殖することができない。そのため宿主の細胞に感染し、その増殖機構を利用してウイルスの複製を行う。これに対し、ウイルスの増殖を抑えるには、①ウイルスの感染を防ぐ、②ウイルスの増殖を防ぐ、③ウイルスの拡散を防ぐ、これら3つの方法が挙げられる。①について効果的なのは、ワクチンである。しかし、変異を起こしやすく多様なタイプを持つインフルエンザウイルスに対して、ワクチンはタイプが違うウイルスには効果がない欠点がある。すなわち、新たなタイプのウイルスが出現すると、それを基にワクチンは生成されなければならず、またそれには数ヶ月という期間を要することから、流行前に新型のワクチンを備蓄するのは不可能である。実際に、ワクチンが主に標的とするウイルス表面に存在するHA（ヘマグルチニン）、NA（ノイラミニダーゼ）というタンパク質は頻繁に変異を起こし、それぞれ16種類、9種類ものタイプが存在しており、今後どのタイプが流行するのか予想することは困難である。また、③については、現在有効なタミフルなど抗インフルエンザ薬による対処法があげられる。しかしこの方法では、ウイルスが一度増殖して体内で感染が広がってしまった後では、その効果は低くなってしまいうため、感染後早い時期での投与が必要という時間的制限がある。さらに、タミフルが標的とするNA（ノ

イラミニダーゼ)も変異が起りやすく、既にタミフル耐性ウイルスも確認されている。

一方で、②のようなウイルスの増殖を直接阻害する薬剤はこれまでに開発されていない。インフルエンザウイルスの増殖サイクルの中心であるウイルスゲノムの複製と転写を行うのは、インフルエンザが保有するRNAポリメラーゼであり、さらにRNAポリメラーゼはHAやNAと比べて変異の度合いが極端に少ないため、このインフルエンザRNAポリメラーゼが理想的な新規薬剤ターゲットとして注目されてきた。薬剤設計を行うためには、その標的部位の立体構造情報を得ることが近道であるため、本研究では新規薬剤開発に向けてインフルエンザRNAポリメラーゼの構造解析を行った。

これまでに世界中でインフルエンザRNAポリメラーゼの構造解析が試みられてきたが、薬剤設計に要求される高分解能での構造解析は未だに成功され

ていない。その理由として、構造解析を行うためには多量のタンパク質が必要であるが、RNAポリメラーゼは3つのサブユニットから成る複合体であること、またそれぞれが高分子量であることから、十分量のタンパク質を得ることが困難であることがあげられる。そこで、本研究ではRNAポリメラーゼの活性部位を中心とした部分的な構造解析を目指した。実際には、インフルエンザRNAポリメラーゼの2つのサブユニットPA-PB1間結合部位構造をX線結晶構造解析により解明した。インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼの3つのサブユニット、PA、PB1とPB2はポリメラーゼ活性に重要な役割をもっているだけでなく、3つの複合体形成なしでは効果的に働くことができないため、本研究で明らかになったサブユニット間結合部位は、効果的な抗インフルエンザ薬のターゲットとなり、本研究の成果は新規薬剤開発に向けて非常に有用なものとされた。

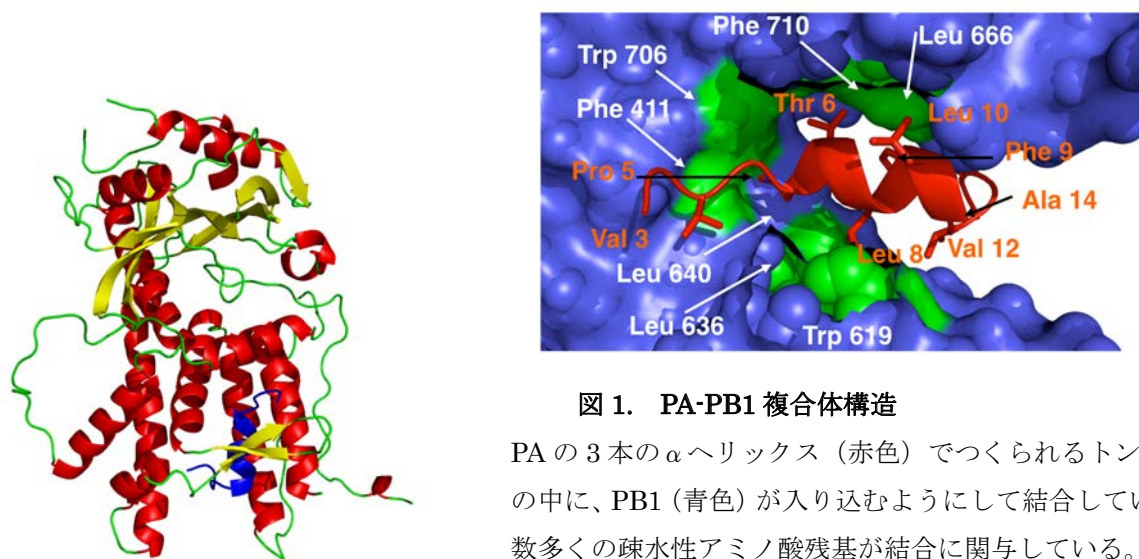


図1. PA-PB1複合体構造

PAの3本の α ヘリックス(赤色)でつくられるトンネルの中に、PB1(青色)が入り込むようにして結合している。数多くの疎水性アミノ酸残基が結合に関与している。

本研究において、PA が単体では非常に不安定で、PB1 が結合すると安定になることを発見した。このことを利用して、PA の C 末端ドメイン(239-716)と PB1 の N 末端部位(1-81)の共発現系を構築し、安定な PA-PB1 複合体を精製することに成功した。これが本研究を進める上での突破口になり、PA-PB1 複合体の構造を X 線結晶構造解析法により、原子レベルで明らかにした。PA サブユニットの立体構造は、

α 13 の 3 つの α ヘリックスでつくられるトンネルの中に PB1 サブユニットの N 末端が入り込むようにして結合していた。このとき、PB1 は 3-10 ヘリックスと呼ばれる構造をとっており、これはタンパク質間結合としては非常に珍しい様式であった。また、PA と PB1 の結合部位には疎水性アミノ酸残基が多く存在しており、各原子のファンデルワールス半径について調べたところ、疎水性残基どうしが隙間なく疎

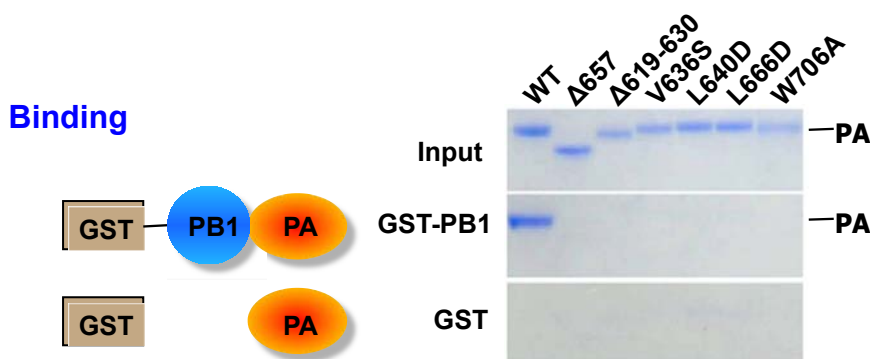


図 2. 変異体を用いた結合実験

結合に関わるアミノ酸の 1 残基の変異によって、PA-PB1 の相互作用がなくなる。

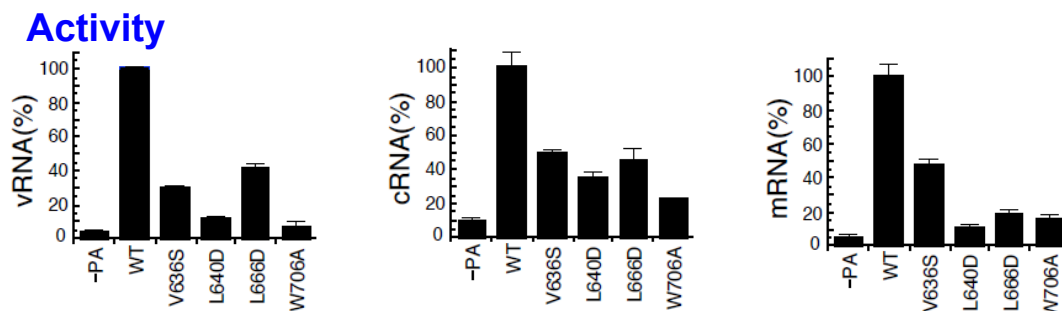


図 3. 変異体を用いた活性測定実験

結合に関わるアミノ酸の 1 残基の変異によって、WT と比べ極端に活性が減少する。

これまでに解明されているタンパク質にはない新規の構造であり、13 個の α ヘリックスと 9 個の β シートで構成されていた。また、PA と PB1 の結合は鍵と鍵穴の関係のようになっており、PA の α 10、 α 11、

水性相互作用していることが確認された。すなわち、PA と PB1 の結合は主に疎水性相互作用で構成されていることが明らかとなった。続いて、PA-PB1 サブユニット間の結合において重要なアミノ酸残基を

特定するために、解析した立体構造をもとに、PAの変異体を調製し、PB1との相互作用を調べた。その結果、Val636、Leu640、Leu666とTrp706を置換した変異体は、PB1と結合することができなくなっていた。さらに、同様の変異体PAを用いてRNAポリメラーゼの活性を調べたところ、どの変異体RNAポリメラーゼについてもその活性が40%以下に減少した。これらの結果から、本研究で特定したPAのアミノ酸残基(Val636、Leu640、Leu666、Trp706)が、PB1との結合だけでなくRNAポリメラーゼの活性においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

これまでに開発されている抗インフルエンザ薬は、ウイルスの拡散を防ぐものであり、直接その複製を阻害するものではない。そのため、感染後時間経過してしまうとその効果が薄れてしまうことが問題となっている。また、効果が大きいとされるタミフルの備蓄に日本も非常に多額の予算をつぎ込んでいるが、すでにタミフル耐性型のインフルエンザが発見されており、異なる視点から新薬開発に取り組む必要が出てきている。インフルエンザウイルスの保有するRNAポリメラーゼは、増殖サイクルの中心である複製と転写を行うため、新規抗インフルエンザ薬

のターゲットとして注目されてきたが、未だにそのような薬剤は開発されていない。これまでの薬剤開発は、細胞に対してランダムに化合物を投与しその効果を調べていく方法で、候補化合物を探索するだけで長期間を必要としてしまう。現在、新型インフルエンザが大流行となるのも時間の問題との見方もあり、従来よりも迅速な方法での薬剤開発が求められている。さらに、本研究が目的とするPA-PB1サブユニット間の結合阻害剤は、PAに結合するだけでなくPB1との結合を阻害できる必要があり、阻害剤のPAへの結合部位特異性や、PAとの高い親和性が求められる。また、化合物を実際に薬剤として使用するためには、化合物の血液中での溶解性が高いことや細胞内でのウイルスの増殖を実際に抑えること、細胞に対して毒性がないことなど、これらの点を解決しなければならない。

これまでに本研究において、RNAポリメラーゼのサブユニット間の立体構造を明らかにしたことは、ウイルス複製に必須な部位を創薬ターゲットにすることを可能にし、抗インフルエンザ創薬が抱える問題点や解決すべき点に対応できる大きな成果と考えている。そこで、この構造を利用してPA-PB1サブユニット間結合阻害剤の探索及び設計を行った。



図 4. 結合阻害の概要図

PAの結合ポケットに薬剤が入り込むことで、PB1の結合を阻害する。

2. 実験方法

化合物の研究開発はいくつかの段階において進められた。まず、解明した PA-PB1 の立体構造から、*in-silico* スクリーニングを行い、PA-PB1 サブユニット間の結合阻害剤として可能性のある化合物を算出した。次に、計算によって求められた化合物について、実際にサブユニット間の結合阻害に効果があるか、溶液中でタンパク質との相互作用の確認を行った。また、その化合物が実際にウイルスの増殖に対して阻害効果があるか、細胞内でのウイルスの増殖について調べた。最終的に、効果が確認された化合物について、さらなる改良を行い、有効な阻害剤を設計した。

具体的には、PA-PB1 立体構造をもとに *in-silico* スクリーニングによって、200 万種類の化合物ライブラリーから数千種類の候補化合物を算出した。これら膨大な数の候補化合物のうち、上位 200 種類の化合物について、溶液中でのタンパク質との相互作用の有無の確認をおこなった。溶液中での生化学的な実験は、これまでに明らかにしてきたタンパク質の性質を利用した。PA 単体は PB1 との結合部位が溶媒中に露出しているため不安定化し、室温で容易に沈殿してしまうが、PA に PB1 を結合させると安定化される。そこで、この PA 単量体と PA-PB1 複合体の性質の違いを利用して、溶液中での化合物の結合能を調べた。すなわち、PA の PB1 との結合部位に化合物が結合すれば沈殿しないことが予想され、PA への化合物の結合が容易に確認できる。この方法は他の方法と比べて、PA タンパク質の性質を利用した迅速なスクリーニング方法である。沈殿の有無により、PA に結合したと考えられる化合物に対しては、PA と PB1 の結合実験を化合物存在下で行うことで、その結合阻害効果を調べた。さらには、等温滴定型カロリメータ (ITC) 装置によって、PA と化合物

の結合比や結合定数など結合に関する情報を求めた。さらに、細胞内でのウイルスの増殖に対する化合物の効果や、細胞に対する化合物の毒性について調べた。最終的には、得られた情報を参考にし、PA と化合物との結合様式を明らかにするために、効果的にウイルスの増殖を阻害する化合物と PA との複合体の X 線結晶構造解析を行った。PA と化合物との立体構造情報をはじめ、これら結合に関わる情報は、以後、化合物を改良し、さらに効果的な阻害剤を設計していく上で非常に有用な情報である。

3. 研究成果

本研究はインフルエンザウイルスに対する新規薬剤開発を目指し、ウイルス増殖の中心的役割を果たしているインフルエンザ RNA ポリメラーゼの PA-PB1 サブユニットに対して、結合阻害剤のスクリーニングを行ってきた。研究計画通り、①コンピューターレベル、②タンパク質レベル、③細胞レベルの 3 段階に分けて研究を進めてきた。まず、上記①として *in-silico* スクリーニングを行い、PA-PB1 サブユニット間結合阻害剤として可能性のある候補化合物の探索を行った。その結果、約 200 万個の化合物ライブラリーの中から、約 4 千種類の化合物が阻害剤候補として算出された。

次に、コンピュータによって算出された 4 千種類の化合物のうち上位 200 種類の化合物について、溶液中において②タンパク質レベルでの結合阻害作用の有無を調べた。溶液中での生化学的な実験は、これまでに明らかにしてきたタンパク質の性質を利用した。PA 単体は PB1 との結合部位が溶媒中に露出しているため不安定化し、室温で容易に沈殿してしまうが、PA に PB1 を結合させると安定化される。そこで、この PA 単量体と PA-PB1 複合体の性質の違いを利用して、溶液中での化合物の結合能を調べ

た。すなわち、PA の PB1 との結合部位に化合物が結合することでタンパク質が沈殿しないことが予想されるため、沈殿の有無を調べることで PA への化合物の結合が容易に確認できる。この方法は他の方法と比べて、PA タンパク質の性質を利用した迅速なスクリーニング方法である。このスクリーニング法によって、200 種類の化合物の中から 2 種類の化合物

が PA の沈殿抑制効果が確認された。さらには、化合物存在下での結合阻害実験を GST プルダウンによって行い、これら 2 種類の化合物が PB1 との結合を阻害することが確認された。続いて、ITC (等温滴定型カロリメータ) を用いて、PA と化合物との結合比や解離定数を算出することができた。

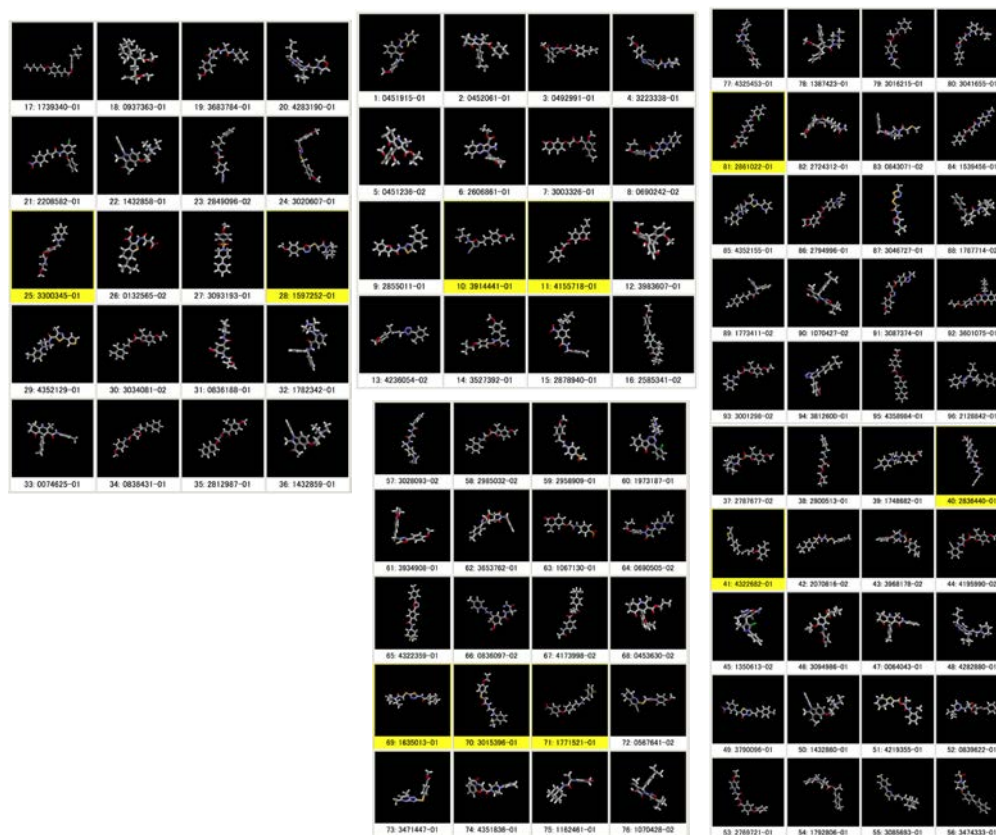


図 5. in-silico スクリーニングの結果例

200 万種類の化合物ライブラリーから、4 千種類の化合物を検索した。

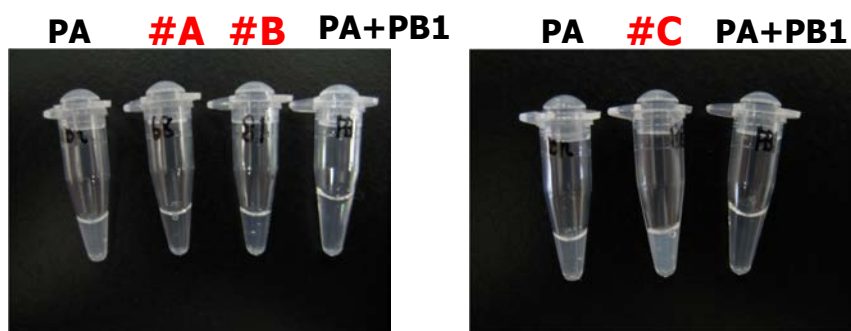


図 6. PA の沈殿による化合物の結合スクリーニング

化合物#A、#B を加えると PA の結合が抑えられるのに対し、#C では沈殿が生じる。

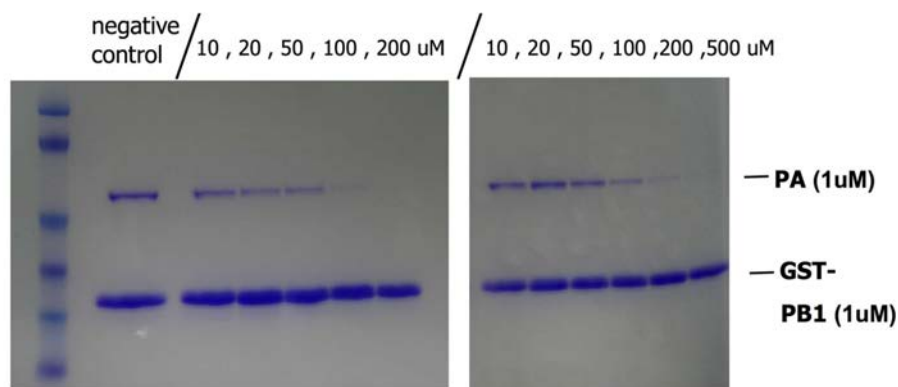


図 7. 化合物存在下でのプルダウンアッセイ

化合物の濃度上昇にともない、PA のバンドが消失する。すなわち化合物が PA と PB1 の相互作用を阻害していることが確認された。

続いて、③細胞内でのウイルスの増殖に対する化合物の効果や、細胞に対する化合物の毒性について調べた。その結果、2 種類の候補化合物は細胞毒性を有することが確認され、ウイルスの増殖阻害剤として適していないことが分かった。そこで、これら 2 種類の候補化合物を基に再度 *in-silico* スクリーニングを行い、2 種類の候補化合物の誘導体として細胞毒性のない阻害剤の設計を試みた。*in-silico* スクリーニングから算出された化合物について、これまでと同様に溶液中において PA との結合の有無を調べ、

GST プルダウン法による結合阻害の程度と ITC (等温滴定型カロリメータ) による PA と化合物との解離定数を算出した。この結果、2 種類の候補化合物から 13 種類の化合物を新たに見いだすことができ、さらに 13 種類のうち数個については、細胞毒性が低く、細胞内でのウイルス増殖を抑えられることが確認された。すなわち、これらの化合物がこれまでと異なる作用機序をもつウイルス増殖阻害剤として非常に有力であることが分かった。

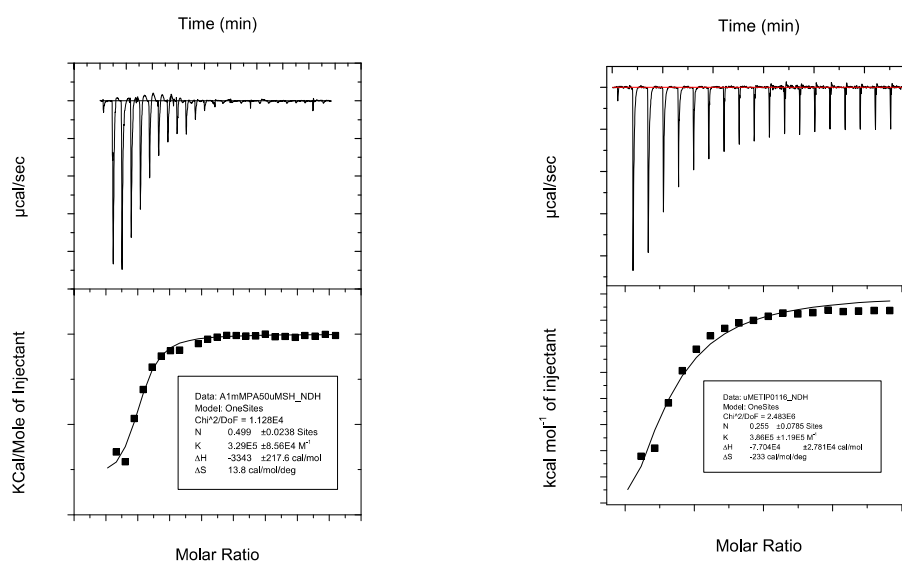


図 8. ITC による化合物と PA の相互作用実験

これらの結果を踏まえ、X線結晶構造解析法による PA タンパク質と化合物との結合様式の解明を試みた。複合体構造の解析には、PA 単体の結晶に化合物を浸漬し結合させる方法と、PA と化合物を混合し、結晶化する方法の 2 通りが考えられた。そこで結晶化前に、PA 単体と化合物との複合体それぞれについて、超遠心分析を行った。その結果、PA 単体と化合物複合体ではピークの変化が観測されたことから、化合物が結合することにより分子の構造が大きく変化することが示唆された。すなわち、化合物を浸漬する方法では、化合物の結合に伴い分子構造が変化してしまい、結晶が壊れてしまう可能性があり、この方法は不適であると考えられた。そのため、PA と化合物をモル比 1:1 で混合し、共結晶化を行った結果、いくつかの条件で結晶が得られ、放射光施設、高エネルギー加速器研究機構において X 線回折実験を行ったところ、最高 8 Å 付近までの反射を確認することができた。

4. 参考文献

- 1) E. Obayashi, et al.: Nature, 454 (2008) 1127.
- 2) K. Sugiyama, et al.: EMBO, 28 (2009) 1679.
- 3) G. Muratore, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109 (2012) 6247.

宇宙の微小重力環境を利用した 高品質タンパク質結晶の作製と創薬への応用

吉田尚史・中平徹・朴三用

1. 研究背景

近年、タンパク質立体構造を基にした薬剤開発が盛んにおこなわれており、それに向けて高分解能でのタンパク質立体構造解析の需要が高まっている。これまでに、高品質な結晶を作製し高分解能データを取得するために、様々な方法が提案されてきた。その中で、微小重力環境を利用した宇宙での結晶作製は、最も強力な方法の1つであると考えられている。微小重力環境では、密度差対流が抑制されるため、結晶への不純物の取り込みが減少し、ゆっくりと結晶成長が起こるため、良質な結晶生成が期待できる。実際に、今までに実施されてきた宇宙環境でのタンパク質結晶化実験では、回折分解能の向上や結晶学的統計値の改善、さらには結晶のクラスター化の抑制など様々な好影響が確認されている。しかし、地上での結晶化方法をそのまま宇宙環境での結晶化へと適用することができないため、宇宙実験に向けた結晶化技術が必要となる。さらに、宇宙実験の機会は限られており、確実に良好な結晶を作製するためには、良好なタンパク質試料と最適化された結晶化条件の確立が必須である。これまでに我々の研究グループは、インフルエンザウイルスの新規薬剤開発を目指し、インフルエンザ RNA ポリメラーゼの結晶構造解析をおこなってきた。インフルエンザ RNA ポリメラーゼは、ウイルス増殖の中心的な役割を担っており、創薬ターゲットとして注目されてきた。我々は宇宙環境下でのインフルエンザ RNA ポリ

メラーゼの結晶化をおこない、高分解能での構造決定を目指し研究を進めてきた。

2. 宇宙環境下での結晶化

タンパク質や核酸などの生体高分子立体構造を明らかにすることは、生体内で起こる様々な生命現象を理解する上で非常に重要である。近年、数多くのタンパク質、さらには複合体の立体構造が決定されており、タンパク質のもつ機能や相互作用に関する情報、生体反応メカニズムの解明が進んでいる。また、タンパク質の立体構造に基づいた医薬品の分子設計 (SBDD ;Structure-Based Drug Design) も盛んにおこなわれており、タンパク質の立体構造情報の需要は高まっている。このような生体反応の解明や新規医薬品の開発に向けては、ターゲットとするタンパク質の構造を原子分解能レベルで解析することが必須であり、その方法として X 線結晶構造解析法があげられる。X 線結晶構造解析は近年の技術開発によりめざましい発展をとげており、分解能 1 Å 付近での構造決定も珍しいものではなくなっている。一方で、X 線結晶構造解析のデータはそのタンパク質結晶の質に依存するため、高分解能データの収集には高品質結晶の作製が必要不可欠である。

これまでに、高品質結晶を作製するための様々な方法が提案されており、その中で宇宙での微小重力環境を利用したタンパク質の結晶生成が有効である

ことが示されている。微小重力環境では、溶液の密度差対流や沈降効果が抑制されるため、成長中の結晶の周辺にタンパク質及び不純物濃度の薄い層ができる。その結果、結晶表面の過飽和度が低下し、不純物の付着が減少するため、結晶周辺に理想的な拡散場が形成され緩やかに結晶が成長する。微小重力環境での結晶化において期待される効果として、分解能の向上や結晶学的統計値の改善、クラスター化の抑制があげられる。回折データセットの質は、結晶中のタンパク質分子の配向の乱れが少ないほど向上するため、微小重力環境下において分子を規則正しく配向させることで、より高品質なデータ収集が期待される²⁾³⁾。また、単結晶が集まったようなクラスターになりやすい試料は、結晶表面が2次核となって別の結晶が成長し始めるが、宇宙実験ではこのような2次核形成が抑制され、クラスター化を抑えることができる。構造解析で大きな問題となるツイーン結晶についても、宇宙環境下で結晶化をおこなうことで解消された事例がある⁴⁾。以上のように、宇宙環境下での結晶化はタンパク質の結晶化に様々な好影響があると考えられ、地上での結晶化実験が抱える問題を解決するための選択肢の1つとして大きな可能性をもっている。

3. インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの結晶構造解析

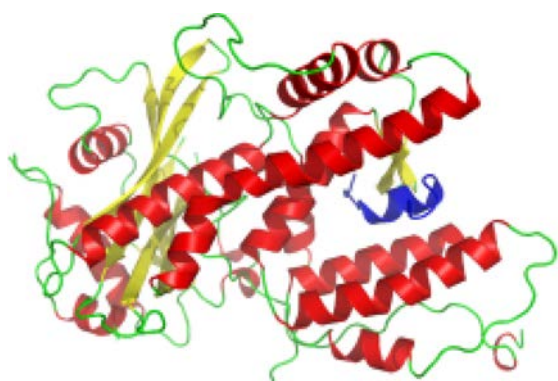
インフルエンザは、ウイルスの感染によって引き起こされる病気である。ヒトが感染すると、高熱や関節痛、倦怠感などの全身症状や、喉の痛みや咳などの呼吸器系の症状を示す。特に深刻なのは乳幼児や高齢者が感染した場合であり、インフルエンザ脳症や重度の肺炎などの合併症を起こし、死に至ることさえある。近年では、高病原性である鳥インフル

エンザウイルスの人への感染により、以前に世界で数千万人単位の死者を出したような世界的大流行が起こることが懸念されており、日本でも抗インフルエンザ薬であるタミフルなどの備蓄に大変な金額が注がれている。しかし、既にタミフル耐性型の鳥インフルエンザウイルスが発見されるなど、ウイルスの変異は頻繁に起こりうるため、このような新型ウイルスに対するワクチンや新薬の開発が世界中で積極的に行われている。

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、ウイルスの複製(増殖)に中心的な役割を担っているため、新規薬剤ターゲットとしてこれまで注目されてきた。また、これまでの薬剤ターゲットとは異なり、RNA ポリメラーゼは変異を起こしにくい特徴をもっていることから、鳥インフルエンザなど新型インフルエンザに対する理想的な薬剤ターゲットとされている。我々の研究グループは、インフルエンザウイルスの持つ RNA ポリメラーゼの3つのサブユニット (PA、PB1、PB2) のうち、どれか1つのサブユニットでも欠けるとその働きを失うことに注目し、サブユニット間結合阻害剤が、新規抗インフルエンザ薬として有望であると考えて研究を進めた。このような阻害剤を設計するためには、その部位の立体構造情報を得ることが近道である事から、インフルエンザの RNA ポリメラーゼの2つのサブユニット PA-PB1 結合部位構造を X 線結晶構造解析により解明した¹⁾。

PA-PB1 複合体の立体構造は、地上での結晶化実験によって分解能 2.3 Å で解析された (図 1)。PA の3本の α ヘリックスで形成されるトンネルに、PB1 の N 末端 14 残基が入り込んでおり、鍵と鍵穴の関係のように結合していた。さらに、その結合部位では、PA と PB1 の疎水性アミノ酸残基が隙間なく相互作用していることから、PA と PB1 は主に疎水性相互作用によって結合していることが明らかとなっ

た。これら疎水性アミノ酸残基の変異体を作製し、PA と PB1 の結合を調べたところ、変異体では PA と PB1 が結合できなくなることが明らかとなった。また、同様の変異体を用いて RNA ポリメラーゼの活性を調べると、変異体ではポリメラーゼ活性が劇的に低下することが確認された。すなわち、PA と PB1 の結合に関わるアミノ酸残基は、サブユニット間の結合だけでなく RNA ポリメラーゼの活性にも影響を与えることから、この結合部位に対する新規薬剤



は非常に有望な抗インフルエンザ薬となり得ることがわかった。現在までに、立体構造情報を基にした PA-PB1 サブユニット間結合阻害剤の探索を進めてきており、PA-PB1 結合阻害能及びウイルス増殖に対する抑制効果をもつ化合物の開発に成功している。また、阻害剤の開発と同時進行で、宇宙環境下での PA-PB1 複合体の結晶化実験を進めており、PA-PB1 立体構造について高分解能データを収集し、より効果的な阻害剤を設計することを目指している。

4. 宇宙実験に向けたタンパク質結晶化技術

宇宙環境下での結晶化において、地上での結晶化方法をそのまま適用しても結晶が生成しないということが頻繁にみられる。限られた宇宙実験機会で結

晶化実験を成功させるためには、宇宙実験向けの結晶化条件検討が必要である。以下に、良好なタンパク質試料の調製方法と宇宙環境下での結晶化方法を紹介する。

4.1 結晶化試料の成分分析

高品質なタンパク質結晶を生成するのに最も重要な技術の 1 つに、タンパク質試料の精製があげられる。精製にあたっては、結晶化試料に含まれる不純

図 1. PA-PB1 複合体構造

PA の 3 本の α ヘリックス（赤色）でつくられるトンネルの中に、PB1（青色）が入り込むようにして結合している。

物の排除だけでなく、試料の均一度が結晶品質の向上の要となる。以下の方法で、タンパク質試料の品質確認をおこなっている。まず、SDS-PAGE（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）で目的以外の成分が夾雑していないことを確認する。次に、Native-PAGE によりゲル中で想定通りの移動をするか、スミアバンドやマルチバンドになっていないかを確認する。必要があれば、2次元電気泳動を行い、タンパク質の電荷が均一であるかを調べる。さらに DLS（粒径分布測定）をおこない、タンパク質分子の粒径が想定の大きさであるか、大粒径成分が多くないかを確認する。タンパク質試料の精製度は、SDS-PAGE で単一と評価できても、Native-PAGE や DLS ではばらつきが出るという試料が散見される。これらは、タンパク質構造のフォールディングの違いや化学修飾や部分的な変性などに起因すると

考えられ、タンパク質試料が均一ではないと判断される。以上の分析から問題がみられた試料については、さらなる精製をおこなう必要があり、イオン交換カラムクロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーを適応する。特に、強陽イオン交換カラムや強陰イオン交換カラム（ともに GE ヘルスケア社または東ソー社）などの高分離能カラムを用いることで、タンパク質試料の均一性が向上する例が多く見られる。通常、1つの成分としてカラムから溶出される試料について、上記のカラムを用いて、緩やかに塩濃度を上昇させ精製すると異なる成分として溶出されることがある。

実際に、我々の研究対象であるインフルエンザ RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体についても、

晶が単結晶の成分とクラスター状の結晶成分に分離できた例（図 2）があり、再現性の向上や結晶品質の向上につながることもある。上記の結晶化試料の成分分析を実施し、均一性に問題がないと判断された試料については、蒸気拡散法による結晶化をおこない結晶生成を確認する。必要があれば、結晶化条件の最適化をさらに実施する。

4.2 カウンターディフュージョン (CD) 法による結晶化

宇宙実験での結晶化方法は、従来の蒸気拡散法ではなく、カウンターディフュージョン (CD) 法が用いられる。CD 法は、キャピラリーの中にタンパク質

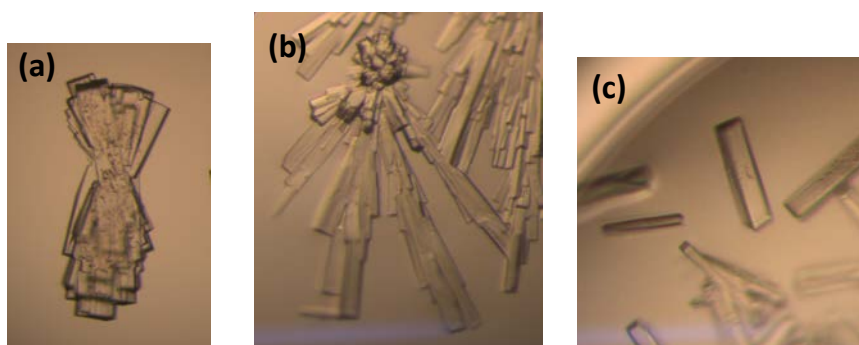


図 2. 試料均一度の向上による結晶改善例

(a)クラスター状結晶しか生成しない試料を強イオン交換で精製すると、クラスター結晶の成分(b)と、単結晶の成分(c)に分離することに成功した。

SuperQ カラム（東ソー社）を用いて精製をおこなうと、3つのピークに分かれて溶出された。これら3つのピークを別々に回収し、それぞれについて結晶化をおこなったところ、これまでの結晶化では再現性が悪く結晶生成確率が低いという問題が解決され、再現性良く結晶が生成できるようになった。また、この他の試料についても、結晶が生成する成分と生成しない成分に分離できた例や、クラスター状の結

溶液を、外側に結晶化試薬を充填し、それぞれを拡散させておこなう結晶化方法である（図 3）⁵⁾。アガロースゲルを介した 2 液は経時的に拡散し、キャピラリー内で濃度勾配がつくられ、結晶化条件に適した位置で結晶化が起こる。タンパク質溶液と結晶化試薬を直接混合する蒸気拡散法と比べ、CD 法では徐々に溶液拡散が起こるため、結晶生成までの時間が長く結晶核の形成を抑えることができ、より高品

質な結晶を生成できる可能性がある。さらに、溶液が乾燥してしまうことがないため、生成された結晶はキャピラリー内で長期間安定である。CD法のキット (C-Tube Kit) がコンフォーカルサイエンス社から市販されており、簡便にCD法による結晶化おこなうことができる。宇宙環境下での実験に向けて、必ず地上においてCD法で結晶が得られることを確

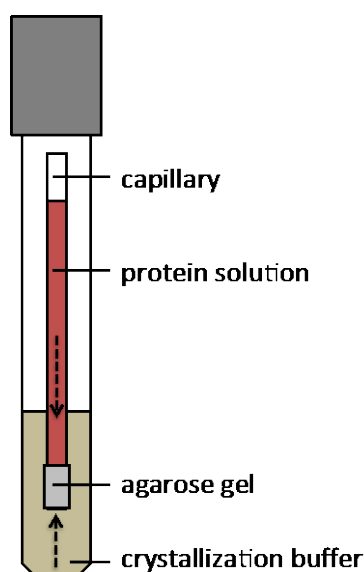


図3. カウンターディフュージョン (CD) 法による結晶化の模式図

キャピラリーの内側にタンパク質溶液、外側に結晶化試薬を充填すると、アガロースゲルを介した2液は徐々に拡散していく。矢印は各溶液の拡散方向を示す。

認しておくべきである。結晶によっては、蒸気拡散法で結晶が得られていた条件をそのままCD法に適用しても結晶が得られないことがあり、結晶化条件の検討が必要となる。CD法で結晶が生成しない場合、マイクロシーディング等で結晶の核形成を促すことも有効である。

5. 宇宙環境での結晶化実験の結果

我々の研究試料であるインフルエンザ RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体については、上述の試料分析とCD法による結晶生成を確認した後、宇宙環境下での結晶化実験をおこなった。約3カ月間、宇宙環境下で静置された結晶は、地上において取り出し作業が実施された (図4)。その後、シンクロトロン放射光施設 Photon Factory のビームライン BL17A でのX線回折実験をおこない、結晶の品質を評価した。宇宙環境下で生成した結晶では、分解能が1 Å 台に到達するような劇的な変化はみられなかったも

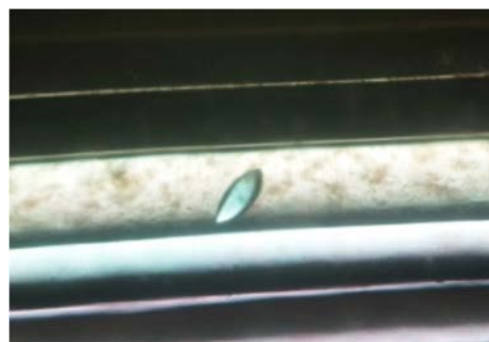


図4. 宇宙環境下で生成した PA-PB1 結晶
キャピラリー内で成長した PA-PB1 結晶。
大きさは約 200 μm 。

の、地上で生成した結晶と比較してモザイク性 (Mosaicity) の低下や完全性 (Completeness) などの回折パラメーターが改善されており (表1)、結果晶の品質が向上していることが確認された。さらに、得られたデータを用いて構造解析をおこなったところ、分解能の向上に伴いタンパク質構造の電子密度マップが全体的により明瞭になっていることが確認された (図5)。

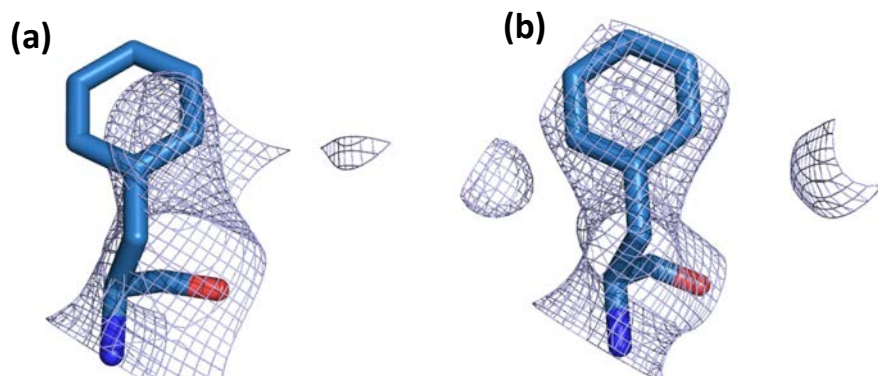


図 5. 電子密度マップの比較

地上で生成した結晶(a)と宇宙で生成した結晶(b)からデータ収集をおこない、得られた電子密度マップについて比較した。地上の結晶と比べ、宇宙環境で生成した結晶からは、より明瞭な電子密度マップを得ることができた。

表 1. 地上及び宇宙環境下で生成した結晶の X 線回折データの比較

Data sets	Ground crystal	Space crystal
Space group	$P3_221$	$P3_221$
Unit cell(Å) a, b, c	101.9, 101.9, 115.0	102.1, 102.1, 114.9
Resolution range (Å)	50.0 - 3.2	50.0 - 2.4
Completeness (Overall/Outer Shell,%)	78.5/70.6	94.8/86.2
R_{merge} (Overall/Outer Shell,%)	5.8/13.2	6.7/31.5
$\langle I \rangle / \sigma \langle I \rangle$ (Overall / Outer Shell)	29.2/8.6	21.9/1.6
Mosaicity	1.30 - 1.83	0.41 - 0.64

6. 今後の展望

宇宙環境下での結晶化実験では、分解能の向上や回折データの改善、またはクラスター結晶の抑制など様々な好影響が期待される。一方で、地上での結晶化方法をそのまま宇宙実験に適用することはできず、宇宙実験向けの試料調製や結晶化を検討する必要がある。タンパク質の性質は、各々のタンパク質によって異なるために一律的な対応策はない。例えば、タンパク質の精製や結晶化、さらには結晶の不

凍結処理方法などは種々のタンパク質によって様々である。我々の PA-PB1 複合体の結晶化については、DTT などの還元剤の添加が結晶化には必須であった。その他の例としては、グリセロールによってタンパク質が安定化され結晶が生成する試料や、イオン交換カラムで精製すると全く結晶が得られなくなる試料などがあつた。タンパク質が安定に存在できる pH や塩濃度などのバッファー条件も結晶化に大きな影響を与える。そのため、成分分析を厳密におこなう

ことで個々のタンパク質の性質を見極め、それに応じた対策をとることが宇宙実験を実施する上で最も重要な技術といえる。宇宙実験の機会は限られており、フライト期間は数ヶ月間に渡るため、宇宙実験に向けた試料調製に最善を尽くすこと、加えて、これまでに蓄積されてきた宇宙実験の結果を参考に進めていくことが実験を成功させる近道だといえる。

今後、タンパク質の立体構造に基づいた医薬品の開発がますます盛んにおこなわれることが予想され、高分解能で薬剤とタンパク質の結合様式を明らかにすることは非常に重要である。その際に微小重力環境下での結晶化が、有力な方法の1つとなる可能性がある。また、多数のサブユニットで構成される超分子複合体や膜タンパク質などの取り扱いが難しいとされる試料についても、宇宙環境下での結晶化の有効性を示されることを期待したい。

7 謝辞

本研究を行うにあたりご尽力いただいた、丸和栄養食品株式会社の伊中浩治博士、コンフォーカルサイエンス株式会社の田仲広明博士に謝意を表します。

8. 参考文献

- 1)E. Obayashi, et al.: Nature., 454 (2008) 1127.
- 2)H. Tanaka, et al.: J. Synchrotron Rad., 18 (2011) 88.
- 3)K. Inaka, et al.: Crystal Growth Des., 11 (2011) 2107.
- 4)H. Tanaka, et al.: Acta Crystallogr., F63 (2007) 69.
- 5)H. Tanaka, et al.: J. Synchrotron Rad., 11 (2004) 45.

インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ複合体の核移行に関する構造生物学的研究

吉田尚史・長部勇希・北村美佳・小川洋司・朴三用

1. はじめに

インフルエンザは、インフルエンザウイルスの感染によって引き起こされ、高熱や全身の倦怠感などの症状を伴い、重症化しやすく伝染性の強い感染症である。これまで、ウイルスの突然変異による新型インフルエンザウイルスの出現で、1918年にスペイン風邪(死者約4000万人)、1957年にはアジア風邪(同約200万人)といったパンデミック(世界的大流行)が起こっている。近年では、抗インフルエンザ薬であるタミフルに耐性をもったウイルスの出現や、トリインフルエンザウイルスの人への感染が報告されており、新たなパンデミックが危惧されている。

インフルエンザウイルスの増殖サイクルは、まずウイルス表面にあるヘマグルチニン(HA)が、細胞表面のシアル酸に結合することで開始される。結合したウイルスは細胞内に侵入後、脱核することにより、vRNP(vRNA、NP、RNAポリメラーゼから構成される複合体)が放出され、核内へと運ばれる。核内でRNAポリメラーゼ(PA、PB1、PB2の3つのサブユニットで構成される)の働きにより、ウイルスゲノムの複製と転写が行われる。新たに合成されたウイルスタンパク質とvRNAは細胞表面で新たなウイルス粒子を形成し、ノイラミニダーゼ(NA)により細胞表面から切り離され、ウイルスが遊離する。

このような増殖サイクルにおいて、ウイルスが宿主細胞に感染し、増殖するためには①細胞膜と②核膜の2種類の脂質二重膜を通過しなければならない。これまで、ウイルスの細胞への感染は、細胞膜表面でのHAのシアル酸への結合が最も重要であると考

えられてきたため、立体構造解析など盛んに研究が行われてきた。しかし近年、インフルエンザRNAポリメラーゼ複合体のウイルスタンパク質PA、PB1、PB2、NPの核膜の通過性がウイルスの感染に影響を与えるという報告がなされている。

vRNPを構成している4つのタンパク質PA、PB1、PB2、NPの核移行サイクルについて説明する(図1)。まず、核内で転写されたmRNAは、細胞質で翻訳され新たなタンパク質がそれぞれ合成される。新たに合成されたタンパク質PA、PB1、PB2、NPは、それぞれ異なった経路を経て核に移行する。PB2は核輸送体であるimportin $\alpha 5$ と結合して核に運ばれるのに対し、PAとPB1は細胞質でヘテロ二量体を形成し、これがRanBP5と結合することで核に運ばれる。すなわち、核内ではじめて3つのサブユニットが結合して、RNAポリメラーゼが形成される。一方で、NPはimportin $\alpha 5$ と結合して核に移行した後、ホモ三量体を形成することでRNA結合活性をもつ。このように別々の経路でタンパク質が核移行し、核内で新たなvRNPが形成される。

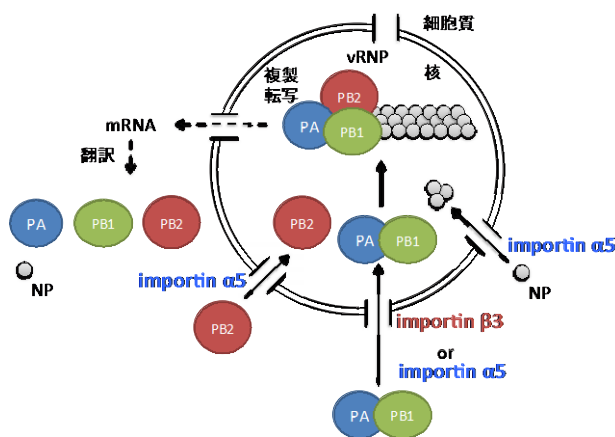


図1. ウイルスタンパク質の核移行サイクル

PA、PB1、PB2、NP は、それぞれ亜種間での相同性が 90%以上で保存性が高いものの、変異が起こることで、核移行が促進され RNA ポリメラーゼの活性が増大する。このように、タンパク質の核移行がウイルスの増殖効率に影響するものの、変異の影響など詳細な分子メカニズムは分かっていない。そこで本研究では、2つの核移行経路 NP - importin α 5 と PB1 - RanBP5 について X 線結晶構造解析を行い、その詳細な結合様式を明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 実験と結果

2.1 NP - importin α 5 複合体

図 1 に示すように、NP は細胞質では単量体として存在するのに対し、核内では三量体を形成する。すなわち、NP 単量体が、importin α 5 と細胞質で結合するため、複合体の構造解析には単量体 NP の調製が必要となる。しかし、大腸菌を用いて野生型 (WT) NP を大量発現させると、全て三量体として得られてしまう。過去の研究から、三量体形成に最も重要なアミノ酸残基は Glu339 と、Arg416 で、これらを Ala に置換すると、単量体 NP となることが報告されている。そこで本研究では、変異体 NP (R416A) を用いて複合体を調製することとした。

2.1.1 NP(R416A)の発現と精製

H1N1 インフルエンザウイルス由来 NP の遺伝子を鋳型とし、PCR 法で R416A の変異を導入した。PCR 産物を発現用ベクター pET28a に組み込み、NP の N 末端側に His-tag が付加するように発現系を構築した。作成したプラスミドベクターを用いて、大腸菌 BL21(DE3)codonplusRILP の形質転換を行った。37°C で培養後、OD₆₀₀ = 0.6 に達した時 IPTG (終濃度

0.5mM) を加え発現誘導を行い、15°C で一晚培養した。

大量培養で得られた菌体を超音波破碎にかけ、遠

心分離で上清を回収し、Ni-NTA カラムで精製した。次に、TEV プロテアーゼを加え His-tag を切断し、Ni-NTA カラム、陽イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて精製を行った。

SDS-PAGE の結果から、最終精製標品の NP (図 2 左) は単一バンドであり、高純度に精製することができた。また、NP のゲルろ過クロマトグラフィー (図 3) の結果、野生型 NP の溶出ピークに比べ、NP (R416A) は低分子量側に溶出された。すなわち、三量体を形成する WT に対し、調製した変異体 NP (R416A) が単量体であることが確認された。

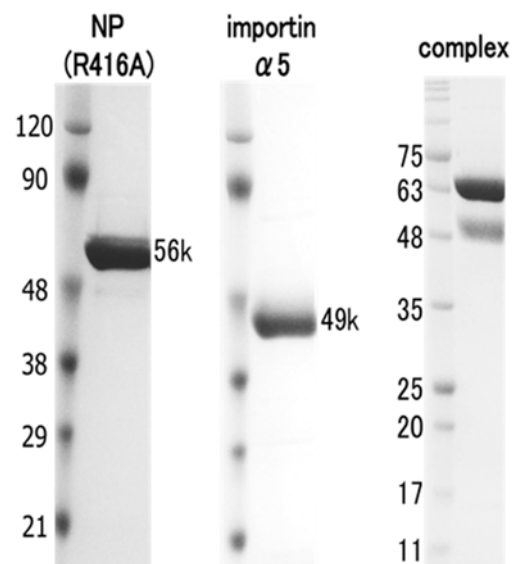


図 2. NP、importin α 5、複合体の SDS-PAGE 結果

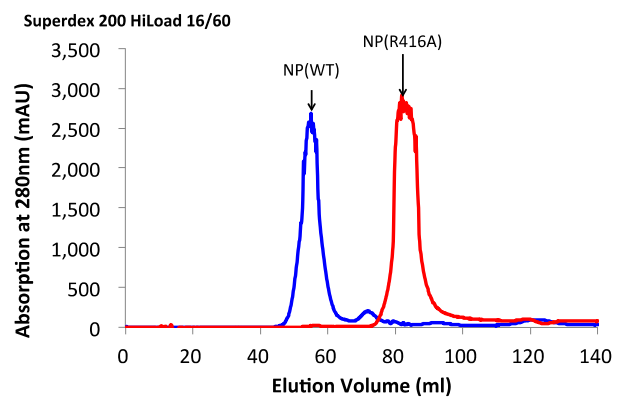


図 3. NP のゲル濾過クロマトグラフィー

2.1.2 importin α 5 の発現と精製

ヒト由来 importin α 5 の 66-512 の遺伝子領域を発現用ベクター pET28a に組み込み、大腸菌発現系を構築した。NP と同様の方法で、importin α 5 を発現させ、タンパク質の精製には Ni-NTA カラムと陰イオン交換カラムを用いた。SDS-PAGE の結果(図 2 中央)から、importin α 5 も高純度に精製することができた。

2.1.3 NP-importin α 5 の相互作用解析

精製した NP (R416A) と importin α 5 の相互作用を調べるため、超遠心分析実験を行った。3種類の試料 NP(12 μ M)、importin α 5 (12 μ M)、NP (12 μ M) と importin α 5 (12 μ M) の混合物について、超遠心分析装置 XL-I (Beckman Coulter 社)を用いた速度法による測定を行った。図 4 に NP と importin α 5 の超遠心分析結果を示す。importin α 5 の沈降係数は約 3.3S、NP の沈降係数は約 3.9S であるのに対し、NP と importin α 5 の混合試料では沈降係数が約 6S であった。この結果から、NP - importin α 5 複合体の形成が確認された。

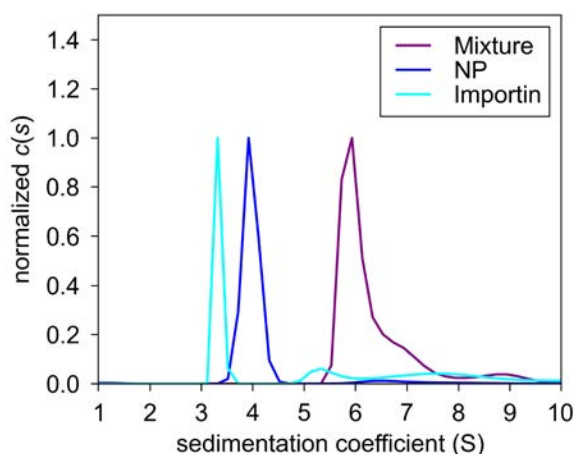


図 4. NP と importin α 5 の超遠心分析

2.1.4 NP - importin α 5 複合体の結晶化

次に、タンパク質の結晶化に向けて、NP - importin α 5 の共発現系を構築して、タンパク質の発現・精製を行った。importin α 5 は単体では不安定であり、精製途中で沈殿が生じてしまう。そこで、NP と importin α 5 を大腸菌内で共発現させ、複合体として精製することで結晶化試料の大量調製を試みた。T7 プロモーターの下流に 2 つの RBS (Ribosome Binding Site) を配置し、それぞれ His-tag 付き NP (R416A) と importin α 5 (66 - 512) を発現するように発現系を構築した。NP と同様の方法でタンパク質を発現させ、タンパク質の精製には Ni-NTA カラムとゲルろ過カラムを用いた。精製した NP - importin α 5 複合体を、サンプル濃度 7mg/ml に濃縮し、結晶化ロボット (Mosquito) による結晶化条件スクリーニングを行った。スクリーニングの結果、微小結晶は得られているものの、構造解析を行うにはさらなる結晶化条件の最適化が必要だと考えられる。

2.2 PB1 - RanBP5 複合体

PA と PB1 は、細胞質でヘテロ二量体を形成し、RanBP5 が結合することで核に移行する。RanBP5 との結合には PB1 が関与し、PA は結合に関与しない。そのため、PB1 の相互作用部位のみを用いて、PB1 - RanBP5 複合体の構造解析に向けた研究を行った。

2.2.1 PB1 の発現と精製

H1N1 インフルエンザウイルス由来 PB1 の遺伝子を手に入れ、RanBP5 との相互作用部位である 182-217 の遺伝子領域を PCR で増幅した。PCR 産物を発現用ベクター pGEX6P-1 に組み込み、PB1 の N 末端側に GST-tag が付加するように発現系を構築した。NP と同様の方法で PB1(182-217)を発現させた。

大量培養で得られた菌体を超音波破碎にかけ、遠心分離で上清を回収し、GST カラムで精製した。次に、陽イオン交換カラムとゲルろ過カラムにかけ、GST 融合型 PB1 を精製した。

2.2.2 RanBP5 の発現と精製

ヒト由来 RanBP5 全長の遺伝子領域を発現用ベクター pGEX6P-1 に組み込み、NP と同様の方法で発現させた。GST カラムで精製後、プレジジョンプロテアーゼを加え GST-tag を切断し、陰イオン交換カラムで精製した。

2.2.3 相互作用解析

精製した PB1(182-217)と RanBP5 が結合するか、GST プルダウンアッセイを行った。調製した GST-PB1(1.5 μM)と RanBP5(1.5 μM)を混合し、1 時間インキュベートした後 GST カラムによってプルダウンした。その後、結合の有無を SDS-PAGE により確認した。(図 5) PB1(182-217)とともに、RanBP5 のバンドが確認され、調製した PB1 及び RanBP5 が複合体を形成することが明らかとなった。RanBP5 全長に対して PB1 の NLS (Nuclear Localization Signal)領域のみで相互作用が確認され、これまでの *in vivo* での報告と一致する結果が得られた。

また、超遠心分析と等温滴定型カロリメータの 2 つの生物物理学的手法を用いて、さらなる相互作用解析を行った。まず、超遠心分析では調製した PB1 (20 μM) と RanBP5 (20 μM)、混合物 (20 μM) の 3 種類の試料を用いて測定を行った。超遠心分析装置 XL-1 (Beckman Coulter 社)を用いた速度法による測定を行った。図 5 に PB1 と RanBP5 の超遠心分析結果を示す。PB1 の沈降係数は約 2.2 - 3.6S、RanBP5 の沈降係数は約 6.5S であるのに対し、混合試料では沈降係数が約 7.2S であった。この結果から、PB1 と RanBP5 が 1:1 の複合体を形成すること確認された。

また、精製した PB1 は、単独では溶液中で 2 量体を形成しているが、RanBP5 と相互作用する際には単量体で結合することが明らかとなった。

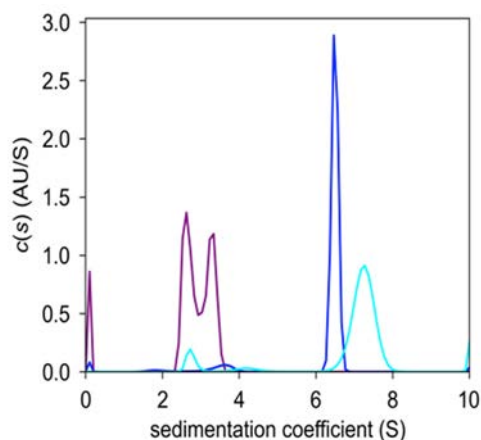


図 5. PB1 と RanBP5 の超遠心分析

一方、PB1 の濃度を 500 μM 、RanBP5 の濃度を 50 μM に調製し、等温滴定型カロリメータ (ITC200) を用いた熱測定を行った。その結果を図 6 に示す。試料の滴定に伴い熱量変化が観測され、得られた結果を 1:1 結合モデルでフィッティング解析を行ったところ、PB1 と RanBP5 の解離定数が 214 nM で算出することができた。このことから、PB1 と RanBP5 は結晶化に向けて十分に強い親和性をもっていることがわかった。

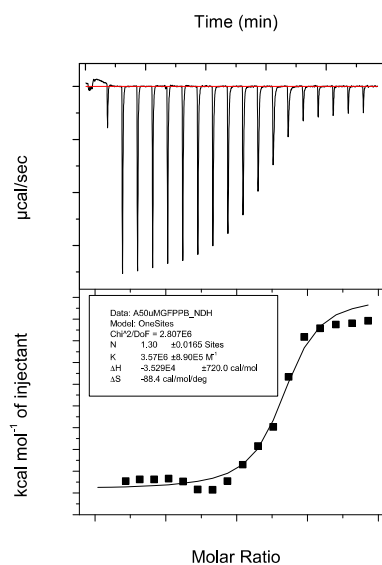


図 6. PB1 と RanBP5 の ITC 測定結果

2.2.4 結晶化

精製した RanBP5 (7mg/ml)に、1.2 倍量になるように PB1 を加えて調製した試料を、結晶化スクリーニングロボットを用いて、結晶化条件の探索を行った。その結果、0.1M MES(pH5.5)、15% PEG3350 の条件でタンパク質結晶を得ることに成功した。今後、立体構造解析に向けて結晶化条件の最適化を行い、X線回折実験を進めていく予定である。

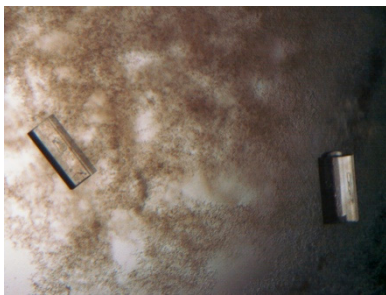


図 7. PB1 - RanBP5 複合体結晶

3. 考察及び今後の展望

NP-importin α 5 及び PB1-RanBP5 が *in vitro* においても、複合体を形成することが明らかとなった。また、それぞれ結晶構造解析に向けて十分な親和性であると考えられるため、今後結晶化条件の探索を進め、立体構造を明らかにしていく予定である。また、これらの実験と並行して、*in vivo* での実験系においても、タンパク質の細胞内局在を調べていく予定である。

4. 参考文献

1. Edward C. Hutchinson et al. Journal of General Virology 92, 1859 – 1869
2. Qiaozhen Ye et al. Nature 444, 1078 – 1082

革新的インフルエンザウイルス創薬プロジェクト
研究概要集

平成 29 年 3 月 13 日発行

発行 公益財団法人 神奈川科学技術アカデミー
川崎市高津区坂戸 3-2-1 / 〒 213-0012

TEL (044) 819-2034

印刷 野崎印刷紙器株式会社

●無断転載・複製を禁じます。