

論文の内容の要旨

論文題目 抗インフルエンザウイルス薬創製に向けた基礎研究

氏名 山田 和範

【背景】

インフルエンザウイルスはオルトミクソ科に属するマイナス一本鎖 RNA ウイルスであり、その抗原性の違いから A, B および C 型に分けられる。特に、A 型インフルエンザウイルスは毎年冬期に流行を繰り返し、全世界で約 25-50 万人の命を奪う。2009 年のブタ由来インフルエンザウイルス (H1N1) によるパンデミックは記憶に新しいが、現在は高病原性トリ由来インフルエンザウイルス (H5N1) によるパンデミックの出来が危惧されている。現在のインフルエンザウイルス対策としては、hemagglutinin (HA) 抗体による感染の予防・軽減、およびオセルタミビルとその誘導体による neuraminidase (NA) の阻害が挙げられる。しかし、これらの標的タンパク質はウイルスの外殻に存在しており、インフルエンザウイルスが発現させる 11 種類のタンパク質の中でも特に変異を受け易い。事実、抗体は毎年更新する必要があるし、オセルタミビルに対する薬剤耐性株の出現も報告されている。以上のような背景から、変異の起こりにくい作用点をターゲットにした新規阻害薬の開発が渴望されている。

最近、ウイルス内部タンパク質、viral polymerase の阻害剤である favipiravir が、また、nucleoprotein (NP) を阻害する化合物である nucleozin、FA-2 および mycalamide 誘導体が、そして polymerase acidic (PA) と polymerase basic 1 (PB1) の阻害剤が開発されている。これらのタンパク質は、ウイルス粒子中でウイルス RNA (vRNA) を安定に保存する viral ribonucleoprotein (vRNP) 複合体の構成タンパク質である。vRNP 複合体は、PA, PB1, polymerase basic 2 (PB2) および NP から構成される。PA は、C 末端を介して PB1 と結合し、RNP を構成することにより、タンパク質の安定化、宿主 mRNA との結合、およびエンドヌクレアーゼとして機能することが知られているが、詳細な機能については未だ不明な点が多い。また、NP は非常に多機能なタンパク質であり、ウイルス増殖環の多くのステップに関与している。また、X 線構造解析にてほぼ全長に近い立体構造が解かれており、創薬のターゲットとして有用である。NP はその立体構造中に tail-loop と呼ばれる突起状の構造を有し、この tail-loop を他の NP の tail-loop 結合ポケットに挿入することで多量体を形成する。現在までに、NP の多量体形成を阻害した結果として生じる単量体 NP は vRNA の複製活性を示さなくなることが明らかになっている。そこで、本研究ではこの tail-loop 結合ポケットを標的に、バーチャル化合物ライブラリを活用した *in silico* スクリーニングによって創薬研究を行った。

【方法】

In silico シミュレーションは、300 万個を超える化合物ライブラリ ZINC より AutoDock (ver. 3.05) にて行った。*In silico* スクリーニングで得られた化合物は、セカンドスクリーニングとし

てウイルス株 Influenza A/Wilson-Smith N (WSN) /33 (H1N1) を Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に感染させてプラークアッセイを行った。細胞毒性試験として、MDCK 細胞を用いた water soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) アッセイを行った。化合物の正常な細胞周期およびアポトーシスに与える影響をフローサイトメトリーおよび caspase-3 アッセイにて解析した。化合物の NP 多量体形成阻害能は、COS-7 細胞に NP/pCAGGS および NP-FLAG/pCAGGS を共発現させ、その細胞抽出液、anti-FLAG 抗体ビーズおよび化合物 (50 μ M) を一晩転倒攪拌後に、NP および NP-FLAG 複合体を沈降させて SDS-PAGE にて解析した。また、NP-FLAG/pCAGGS を導入した COS-7 細胞の細胞抽出液、anti-FLAG 抗体ビーズにて精製した NP および化合物 (50 μ M) を反応後に HPLC にて解析した。タンパク質および化合物の結合実験は、光親和型固定化法にて化合物を結合させたアガロースビーズによるタンパク質-化合物共沈降法により解析した。化合物の濃度依存的なウイルス阻害効果を influenza A/WSN/33 (H1N1), A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), A/Udorn/307/1972 (H3N2), A/Sydney/5/1997 (H3N2), A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1) 株を用いて解析した。ミニゲノムアッセイは、PA/pCAGGS, PB1/pCAGGS, PB2/pCAGGS, NP/pCAGGS および vRNA-luciferase/pPOLI を 293T 細胞に共導入し、48 時間後にルシフェラーゼの蛍光を測定した。PA の全長構造の *ab initio* 予測は I-TASSER (ver. 1.1) にて、得られた全長構造の構造緩和は cosgene (ver. 4.204) による molecular dynamics (MD) 法にて、PA 全長構造における化合物結合ポケットの予測は POCASA (ver. 1.0) にて、NP の tail-loop と PA 全長構造のドッキングは ZDOCK (ver. 3.02) にて、化合物と PA のドッキングは sievgen (ver. 4.204) にて行った。

【結果・考察】

In silico スクリーニング・プラークアッセイによる THC19 の同定

300 万個の化合物より、既知のインフルエンザウイルス阻害薬、amantadine, oseltamivir および ribavirin が共通に有するパラメーター (分子量; 150~350 g/mol、水素結合供与体; 3 以下、水素結合受容体; 6 以下、XLogP3; -2~4) にて 300 万個の化合物を約 85000 個にフィルタリングした。これらの化合物について NP の tail-loop 結合ポケットにおける自由エネルギーをシミュレーションし、結合エネルギーが -11.5 kcal/mol 以下の 1052 化合物を選定した。

次に、結合エネルギーの高い順に 340 化合物をプラークアッセイにて 2 次スクリーニングしたところ、プラーク数を約 70%以上阻害する 7 種の化合物を同定した。これらの化合物の細胞毒性能を WST-1 アッセイにより解析したところ、THC19 のみが細胞毒性を示さなかった。THC19 の half-maximal cytotoxic concentration (CC₅₀) は 200 μ M 以上であった。次に、MDCK 細胞に THC19 を添加して 48 時間後にフローサイトメトリーおよび caspase-3 アッセイを行った結果、THC19 は正常細胞の細胞周期およびアポトーシスに影響を与えないことが示された。さらに、プラークアッセイにて濃度依存的なウイルス阻害効果を解析したところ、プラーク数の減退における half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) は 35.6 μ M、形成するプラーク面積における IC₅₀ は 41.1 μ M であった。

THC19 と NP の相互作用解析

THC19 による NP の多量体形成阻害能の有無を解析した。まず、NP/pCAGGS および NP-FLAG/pCAGGS 発現ベクターを共導入した COS-7 細胞の細胞抽出液に、THC19 (50 μ M) ま

たは DMSO、および anti-FLAG 抗体ビーズを添加して反応させて NP および NP-FLAG 複合体を沈降させた。沈降した NP-FLAG に対する NP の割合は、THC19 添加群およびコントロール群において差異が認められなかった。次に、HPLC により解析した。HPLC 解析において、NP (4 μM) は溶液中で 9 量体または 10 量体、および単量体のスペクトルを示した。そこに、THC19 (50 μM) を添加してもスペクトルは変化しなかった。以上の 2 つの結果から、THC19 は NP の多量体形成を阻害しないことが示された。

続いて、NP と THC19 との結合を THC19 ビーズにより解析した。THC19 ビーズに精製 NP を反応させ沈降後に SDS-PAGE で解析した結果、THC19 ビーズによって NP の沈降が起こらなかったことから、THC19 は NP に結合しないことが示唆された。

以上の結果から、THC19 の作用点は NP ではないことが示された。

THC19 とその誘導体の様々な株におけるウイルス阻害能の解析

THC19 の A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), A/Udorn/307/1972 (H3N2), A/Sydney/5/1997 (H3N2), A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1) における IC_{50} を解析した。THC19 の A/ Puerto Rico /8/1934 (H1N1), A/Sydney/5/1997 (H3N2), A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1) に対する IC_{50} は、それぞれ 30.7, 44.7 および 39.8 μM であった。一方、A/Udorn/307/1972 (H3N2) に対しては、90 μM でもウイルス阻害効果を示さなかった。次に、合計 10 個の種誘導体を作製し、ウイルス阻害効果を解析したが、THC19 よりウイルス阻害能の高い化合物は得られなかった。一方、THC19 構造中における 1,2,3,4-tetrahydrocarbazole 環への置換基の導入は化合物のウイルス阻害効果を下げること、また、propyl piperidine 側鎖への置換基の導入で化合物の毒性が上昇することが明らかになった。

THC19 の作用点の解析

THC19 の作用点の解析を行った。まず、ウイルス感染後の異なる時間に THC19 を添加して、感染 12 時間後に回収したウイルスの増殖能をプラークアッセイにて調べた。THC19 を添加する時間がウイルス接種後 0-2 時間の場合に最も顕著にウイルス増殖を阻害した。以上から、THC19 はウイルス再集合や出芽の段階ではなく、ウイルス増殖環における比較的早い段階に作用点を持つことが明らかになった。

ミニゲノムアッセイにて、THC19 のウイルス RNA の転写複製活性阻害能を解析したところ、THC19 は濃度依存的にルシフェラーゼ活性を低下させた。以上より、THC19 の作用点は、感染初期であり、インフルエンザウイルスの転写複製活性に関わるコンポーネント、PA, PB1, PB2, NP、であることが示唆された。

THC19 の耐性株 A/Udorn/307/1972 (H3N2) と IC_{50} が 35.6 μM を示した A/WSN/33 (H1N1)

の RNP 複合体の 4 つのコンポーネント PA, PB1, PB2, NP を交換してミニゲノムアッセイを行った (図 1)。その結果、A/Udorn/307/1972 (H3N2) をバックグラウンドに PA のみを A/WSN/33 (H1N1) 由来のものに交換した場合にのみ、全てのコンポーネントが A/WSN/33 (H1N1) 由来の

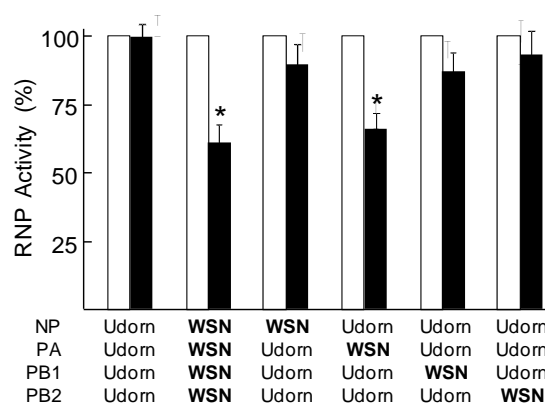


図 1. コンポーネントを交換したミニゲノムアッセイ
□; コントロール群 (DMSO) ■; THC19 添加群 (40 μM)

場合と同程度までルシフェラーゼ活性が低下した。以上の結果より、THC19 の作用点は転写複製に関わる 4 つのコンポーネントの中の PA であることが明らかとなった。

シミュレーションを活用した THC19 と PA の相互作用解析

そこで、THC19 の PA 構造中における作用部位を *in silico* シミュレーションにて解析した。現在までに、PA の全長構造が解明されてい

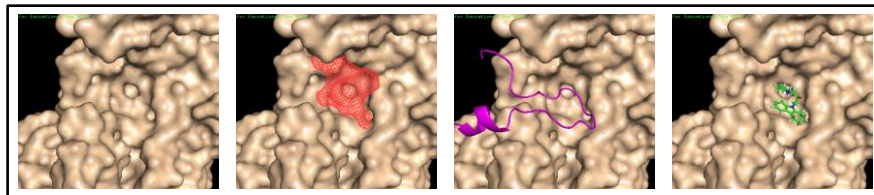


図 2. A. PA の予測構造、B. 予測結合ポケット、
C. NP の Tail-loop とのドッキング、D. THC19 とのドッキング

ないため、I-TASSER にて、PA の全長構造の予測を行った。I-TASSER はタンパク質の一次構造より *ab initio* にて三次構造を予測できるツールであり、critical assessment of protein structure prediction (CASP) 10 にて最も優れた構造予測能を示している。の I-TASSER により予測した構造候補は現在までに解かれている PA 構造 (PDB ID; 2W69, PDB ID; 2ZNL) を正確にサンプリングしていた (図 2A)。次に、本構造を MD 法にて構造緩和した後に、POCASA にて化合物の結合ポケットの予測を行ったところ、T123, P265, Y393, N412, E692 を中心としたポケット構造を得た (図 2B)。さらに、本研究における本来のスクリーニングターゲットであった NP の tail-loop と予測した PA 全長構造とのタンパク質間におけるドッキングを ZDOCK にて行った。その結果、tail-loop は前述の PA 構造中の E692 を中心とした化合物結合ポケットとドッキングした (図 2C)。そこで、当ポケットにおける THC19 のドッキング (図 2D) による結合エネルギーと NP の tail-loop 結合ポケットにおける THC19 のドッキングによる結合エネルギーを比較した。Sievene にてドッキングを行ったが、PA の予測結合ポケットと THC19 との結合エネルギーが -3.18 kcal/mol、NP の tail-loop 結合ポケットと THC19 との結合エネルギーが -2.85 kcal/mol と算出された。以上の結果は、THC19 は、NP の tail-loop 結合ポケットより、PA の E692 を中心とした予測結合ポケットに、より強く結合することを示している。

以上のシミュレーション解析より、PA の全長構造中に、本研究の当初のターゲットであった NP の tail-loop 結合ポケットに非常に類似した結合ポケットが存在し、それと THC19 との結合レベルは、NP のポケットより強いという可能性が示された。

【総括】

300 万を超える化合物ライブラリから、*in silico* スクリーニングにてウイルス阻害効果を有する化合物 THC19 を同定した。ミニゲノムアッセイ、化合物添加時間の差を利用したプラークアッセイ、コンポーネントをスワップしたミニゲノムアッセイ等の解析を行うことで、THC19 のウイルス阻害効果のターゲットは NP ではなく、PA であることが明らかになった。この結果は、*ab initio* 構造予測法にて得られた PA の全長構造を用いたシミュレーション解析によっても裏付けられた。即ち、PA には NP の結合ポケットに似た構造が存在する可能性があることが初めて示された。今後は、本研究で予測された PA の全長構造に対する最適化研究によりウイルス阻害効果が優れた誘導体の取得、それと PA との結合を実際の結合実験により立証する予定である。さらに、NP などのウイルスタンパク質と比較して、PA の機能は未だ不明な点が多いため、THC19 は PA の機能を解明する有用なツールとなり得ることが期待される。