

# 論文審査の結果の要旨

氏名 山田 和範

本論文は、インフルエンザウイルスに対する創薬研究について述べられている。

インフルエンザウイルスは再興感染症として注目されている人畜共通感染症である。2009年には、新型 H1N1 インフルエンザウイルスが発生し社会的な大問題となり、また、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス由来の新型インフルエンザウイルス出現が、国際的に大きく懸念されている。しかし、インフルエンザウイルスはその変異の速さから、主な予防・治療法であるワクチンの効力が完全とはいえず、また、既存の抗インフルエンザ薬はウイルス粒子表面の蛋白質である M2 およびノイラミニダーゼを標的にしているため、耐性ウイルスが生じ易いという欠点を持っている。そこで、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。そこで本研究では、表面抗原と異なり変異が起こりにくいインフルエンザウイルスの中でも高度に保存されている内部タンパク Nucleoprotein (NP) に着目した。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、*in silico* スクリーニングを行い、インフルエンザウイルス阻害能を持つ化合物の獲得を目指した。

300 万を超える化合物ライブラリから、AutoDock (version. 3.05) を用いた *in silico* シミュレーションにより、NP の tail-loop 結合ポケットに高い結合エネルギーを有する 1052 化合物を選定した。次に、結合エネルギーの高い順に 336 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。No.19 の Half-maximal cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) は 200 μM 以上であった。続いて、MDCK 細胞に No.19 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、No.19 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より No.19 は濃度依存的にウイルス増殖能を阻害することを明らかにした。プラーク数の減退における Half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) は 35.6 μM、形成するプラーク面積における IC<sub>50</sub> は 41.1 μM であった。本化合物、1-(3,4-dihydro-1*H*-carbazol-9 (2*H*)-yl)-3-(piperidin-1-yl) propan-2-ol は 1,2,3,4-tetrahydrocarbazole piperidine の誘導体であるため、THC19 と名付けた。

THC19 が NP の多量体形成能を阻害するかを解析した。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 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

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すが、THC19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可能性が示された。続いて、NPとTHC19との結合をTHC19ビーズにより確認した。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の作用点の解析へと進んだ。まず、化合物添加時間の差を利用したプラークアッセイにてTHC19のウイルス増殖阻害はウイルス生活環における比較的早期の段階で起こっていることが明らかとなった。そこで、感染初期におこる転写活性を測定するミニゲノムアッセイを行ったところ、THC19は濃度依存的にウイルスの転写・複製能を阻害した。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またはNPであることが示唆された。続いて、THC19の耐性株A/Udorn/307/1972 (H3N2)とIC<sub>50</sub>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。その結果、THC19のウイルス阻害効果の標的はNPではなく、polymerase acidic (PA)であることが明らかになった。

NPを標的にしてスクリーニングをしたにもかかわらずPAの阻害薬が取得された理由を*in silico*シミュレーションにて追求した。まず、*ab initio*構造予測法にて未同定のPAの全長構造を計算した。この予測構造中における化合物結合ポケットを予測し、さらにドッキングスコアを計算して、THC19が結合する可能性が高い部位を絞り込んだ。続いて、THC19とNPのtail-loopとのドッキングシミュレーションを行ない、THC19のドッキングスコアとNPのtail-loop結合ポケットに対するそれを比較したところ、THC19はNPよりPAにより強く結合することが示された。また、THC19の誘導体を用いた実際の感染阻害実験によるウイルス増殖阻害能とドッキングシミュレーションによるPAとの結合スコアもよく一致した。以上の結果から、PAにはNPの結合ポケットに似た構造が存在し、その部位にTHC19が結合している可能性が示された。PAに対する阻害剤は数少なく、また、PA自体の機能は未だ完全には解明されていない為、THC19はPAの機能を探る為の、更にはウイルス阻害に向けた基礎研究を進める為の有用な研究上のツールになり得ると考えられる。

なお、本論文は、古山浩子、萩原恭二、上田敦史、佐々木裕、金刺進之介、上野竜樹、中村寛則、桑田一夫、清水一史、鈴木正昭、間陽子との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。