

ウイルスポリメラーゼを標的とした新規抗インフルエンザ薬の作用機序解析

小林 沙羅 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 川口 敦史 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

インフルエンザウイルスはヒトで呼吸器疾患を引き起こす病原体で、その感染によって世界で毎年 25~50 万人の死亡者が報告されている。さらに数十年に一度新型ウイルスが出現し、パンデミックと呼ばれる世界的な大流行を引き起こしてきた。

感染の拡大や症状の重症化を防ぐため、これまでワクチンや抗インフルエンザ薬の開発が進められてきたが、新型ウイルスの出現時期やその型を予測することは難しく、ワクチンでは新型ウイルスに対処することができない。さらに、複製酵素であるウイルスポリメラーゼによってウイルスゲノムが変異するため、タミフルなど既存の抗インフルエンザ薬に対する耐性株の出現が問題となっている。このような背景から新型ウイルスにも効果があり、耐性株が出にくい創薬設計が求められている。そこで本研究では、ウイルス株間で高度に保存され、耐性変異獲得の原因となるウイルスポリメラーゼを標的とすることで、全てのウイルス株に作用し、変異を抑制できる抗ウイルス薬の創出を試みた。

インフルエンザウイルスのポリメラーゼは RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであり、異なる型間でも 90~95% のアミノ酸配列が保存されている。ウイルスポリメラーゼは PB1 に PA と PB2 がそれぞれ結合して複合体を形成し、PB1 と PA の複合体形成部位はウイルスゲノム上のプロモーター配列への結合に関与する。このプロモーター結合部位を標的とする化合物を分子動力学計算により *in silico* でスクリーニングしたところ、抗ウイルス活性を持つ化合物として No.293 を同定した。

本研究では No.293 の作用機序を解析するため、標的部位のアミノ酸を置換した変異体を作成し、ポリメラーゼ活性や複合体形成能を評価した。また、タミフル存在下と No.293 存在下でそれぞれウイルスを継代し、耐性株の出現頻度を調べた。

【材料と方法】

1. 変異体の作製

PB1 の①Asp27 を Ala に、②Pro28、Pro29、Try30 をそれぞれ Thr、Thr、Ser に、③His32 を Phe に置換した発現プラスミドを作製した。

2. PB1 変異体タンパク質の発現

作製したそれぞれの変異体と PA 及び、PB2 を発現するプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションした。所定の時間で細胞を回収し、細胞抽出液を調製後、各ウイルスタンパク質に特異的な抗体を用いてウェスタンブロットティングを行なった。

3. PB1 変異体の複合体形成能の評価

抗 FLAG 抗体を用いて、PB1、PA、及び Flag-PB2 を過剰発現した細胞抽出液からウイルスポリメラーゼ複合体を免疫沈降し、各ウイルスタンパク質に特異的な抗体を用いてウェスタンブロットティングを行なった。

4. PB1 変異体のポリメラーゼ活性の評価

作製した PB1 変異体と PA、PB2、及び NP を発現するプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションした。また、ウイルス MS 遺伝子の翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子に置換したウイルスゲノムを発現するプラスミドも同時にトランスフェクションした。その後、ウイルスポリメラーゼによって発現したルシフェラーゼ量をレポーターアッセイで検出し、ウイルスポリメラーゼの活性を評価した。

5. 薬剤耐性株出現頻度の評価

2.0×10^5 cells/dish となるよう MDCK 細胞を播種し、細胞接着後に A/Panama/2007/99 株を MOI=0.001 で感染させた。感染 1 時間後に細胞を洗浄し、細胞培養液にそれぞれタミフルと No.293 を添加し培養した。ほとんどすべての細胞で細胞変性が見られた時点で培養上清を回収した。上記と同様の感染実験を繰り返し、継代したウイルスを用いて、タミフルまたは No.293 存在下でプラークアッセイを行なうことにより、薬剤耐性株の出現頻度を評価した。

【結果と考察】

レポーターアッセイの結果、各 PB1 変異体ではポリメラーゼ活性が失われていることが示された。

またプラークアッセイの結果、タミフル存在下で培養したウイルスについて、第一世代からタミフル耐性株の出現が見られた。一方、No.293 存在下で培養したウイルスについては第一世代では耐性株は見られなかった。

尚、詳細な結果については発表会にて報告する。