

研究題目 インフルエンザウイルス蛋白質の化学修飾の解析

研究組織

研究代表者：葛原 隆（徳島文理大学 薬学部 生化学教室）

共同研究者：篠原康雄（徳島大学 先端酵素学研究所）

研究分担者：畠山 大（徳島文理大学 薬学部 生化学教室）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

インフルエンザウイルスは現在でも注意すべき病原体であり、抗インフルエンザウイルス化合物の探索は重要な課題である。本研究課題では、その標的としてウイルスの RNA ポリメラーゼを構成する PA サブユニットのエンドヌクレアーゼ活性に着目した。PA のアセチル化修飾によるエンドヌクレアーゼ活性の変化を解析し、新規メカニズムの抗ウイルス化合物の発見を目指すことを目的とする。

PA のエンドヌクレアーゼ活性により宿主 mRNA から 5'-cap とそれに続く十数塩基を切り取り、プライマーとして利用することでウイルス mRNA が合成される。最近の当研究室での成果により、PA の N 末端部位 (PA_N) の部分組換えタンパク質がヒトのアセチル化酵素 PCAF と GCN5 によってアセチル化され、エンドヌクレアーゼ活性が高まることを報告した (Hatakeyama *et al.*, *FEBS J.*, 2022)。また、質量分析により PA_N の 19 番目のリジン残基 (K19) がアセチル化標的であることを示唆し、K19 をグルタミン (K19Q) とアルギニン (K19R) に変異させることでアセチル化レベルが減少することを見出した。アルギニンは、アセチル化はされないが、リジンの正電荷をミミックするもの、グルタミンは構造的に定常的なアセチル化リジンをミミックするものとして使用した。その結果、非常に興味深いことに、アセチル化リジンを模倣する K19Q 変異によりエンドヌクレアーゼ活性が高まることを発見し、K19 アセチル化の重要性が示された。

一方で、K19 をアルギニンまたはグルタミンに変異させても、PA_N のアセチル化修飾を示すシグナルは完全には消失しなかった。これ

は、K19 以外のリジンに対するアセチル化修飾の存在を示唆するものである。そこで、アセチル化標的として K19 を発見するに至った質量分析の結果を再検討したところ、新たに K104 と K158 もアセチル化修飾部位である可能性を見出した。

そこで、本研究では、PA_N の K104 と K158 を単独でグルタミンまたはアルギニンに変異させた組換えタンパク質、および K19・K104・K158 の 2 か所以上のリジンを組み合わせて同時にアルギニンに変異させた組換えタンパク質を作成し、アセチル化標的と考えられるリジン残基の点変異により PA_N エンドヌクレアーゼ活性、RNA ポリメラーゼ活性、およびウイルス増殖効率がどう変化するかを詳細に解析する。

[1-2]研究の方法・経過

徳島文理大学 薬学部において、大腸菌を用いて PA_N の変異組換えタンパク質を合成し、陰イオン交換法で精製した (Kuzuhara, *Methods Mol. Biol.*, 2022)。この組換えタンパク質を基質とし、試験管内においてヒストンアセチル化酵素 PCAF や GCN5 の組換えタンパク質と混合してアセチル化させた。このとき、アセチル基の供与体として、アセチル基に放射性同位体 [¹⁴C] を含むアセチル CoA を用いた。反応液を SDS-PAGE で分離した後、ポリアクリルアミドゲルを CBB で染色し、濾紙片上に乾燥させた。乾燥ゲルをイメージングプレートに圧着させることで、アセチル化されたタンパク質から発せられる β 線を検出した。

この β 線の検出および画像解析は、徳島大学 先端酵素学研究所の篠原康雄教授のご協力の下、徳島大学 放射線総合センターのフル

オロイメーシングアナライザー (FLA-9000) を用いて行った。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

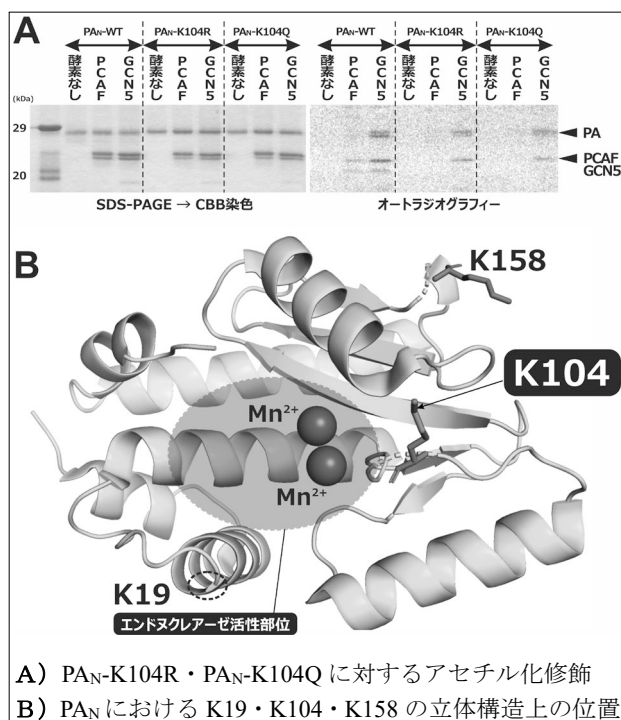
現在までに、以下の 8 種類の変異組換えタンパク質の発現と精製に成功した。

- | | |
|------------------------------|---------------------------------|
| ① PA _N -K104R | ② PA _N -K104Q |
| ③ PA _N -K158R | ④ PA _N -K158Q |
| ⑤ PA _N -K19/104R | ⑥ PA _N -K19/158R |
| ⑦ PA _N -K104/158R | ⑧ PA _N -K19/104/158R |

アミノ酸の点変異に伴う組換えタンパク質発現レベルの変化は見られず、どの組換えタンパク質も、同レベルの発現量が得られた。そして、この後のアセチル化レベルの測定、およびエンドヌクレアーゼ活性変化の解析に十分なタンパク質量を得ることができた。

このうち、K104 をアルギニンもしくはグルタミンに変異させた① PA_N-K104R および② PA_N-K104Q の組換えタンパク質を用いて、アセチル化レベルの変化を解析した。その結果、どちらの変異組換えタンパク質もアセチル化レベルの減弱が観察された (図A)。以上より、**K104 もアセチル化の標的である**ことを生化学的に明らかにした。

また、K19・K104・K158 の立体構造上の位置を可視化したところ、3つのリジン残基の中で K104 がエンドヌクレアーゼ活性部位に最も近いことを明らかにした (図B)。したがって、**K104 に対するアセチル化修飾はエンド**



ヌクレアーゼ活性の発現や調節に深く関与することが示唆された。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

PA アセチル化がウイルス増殖の鍵になることが示唆されたことから、PA アセチル化を阻害する化合物は新しい抗インフルエンザウイルス薬として期待できる。現在、信州大学農学部の藤田智之教授らとの共同研究により、新規なアセチル化酵素阻害剤であるアナカルジン酸誘導体に着目し (**論文投稿中**)、PA をアセチル化する宿主側の酵素を標的とする創薬研究を展開する。従来の「ウイルス側因子」ではなく「宿主側因子」へのアプローチという**新しい戦略をもつ新規抗インフルエンザウイルス薬の開発を目指す**。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

1. 畠山 大、他 6 名、葛原 隆「インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの PA サブユニットにおける新規アセチル化部位の生化学的検討」第 36 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2023 年 6 月 23 日、広島市
2. 畠山 大、他 8 名、篠原康雄、葛原 隆「インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの PA サブユニットにおける新規アセチル化リジン残基の点変異に伴うアセチル化レベルの変化」第 70 回日本ウイルス学会学術集会、2023 年 9 月 26 日、仙台市

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

「研究成果」の欄に記したとおり、現在までに、8 種類の PA_N 変異組換えタンパク質のうち、①と②のアセチル化レベルが減少することを示した。今後は、**残り 6 種類の変異組換えタンパク質のアセチル化レベルの変化を解析するとともに、変異に伴うエンドヌク**

レアーゼ活性の変化を生化学的に解析する
予定である。