

トピックス

1. A型およびB型インフルエンザウイルスの複製に必須の宿主因子と阻害剤の同定

塚本 雄太¹⁾, 五十嵐 学²⁾, 加藤 博己¹⁾

1) ボン大学 Institute of Cardiovascular Immunology

2) 北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 国際疫学部門

1. はじめに

インフルエンザウイルスに代表されるオルソミクソウイルス科, およびリフトバレー熱ウイルスを含むブニヤウイルス目のウイルスは, 宿主 mRNA のキャップ構造を盗む「キャップスナッチング」によって, ウイルスの mRNA 合成を開始する. 哺乳動物のキャップ構造において, 7メチルグアノシンと 5' -5' 三リン酸結合で結合している最初のヌクレオチドの 2' -O 部位のメチル化修飾は, 宿主の自然免疫系から感知されるのを回避するための自己 RNA 標識として重要である^{1,2)}. このメチル化は, RNA メチル基転移酵素 MTr1 によって, メチル基供与体である S-アデノシルメチオニン (SAM) を用いて行われる³⁾. キャップスナッチングウイルスは, 自己 RNA 標識を受けたキャップ構造を盗むことで, 自然免疫系から巧みに逃れているといえる. では, 自己標識が適切に行われなかった RNA が存在した場合, ウイルスの複製, および自然免疫系の活性化はどうなるのだろうか.

2. A型およびB型インフルエンザウイルス複製における宿主 RNA メチル基転移酵素 MTr1 の必要性

MTr1 を欠損させた, ヒト胎児腎由来 HEK-293T 細胞に, A 型インフルエンザウイルス (IAV) を感染させたところ, 野生型細胞で見られるような細胞死が全く起こらないこと

を発見した (図 1). この現象は B 型インフルエンザウイルス (IBV) においても同様であった. MTr1 を欠損させたヒト肺上皮由来 A549 細胞で詳しく調べてみると, インフルエンザウイルスの複製が起こっていないことが明らかとなった. そして, キャップスナッチングによって合成されたウイルス RNA のみを特異的に検出する定量的逆転写 PCR 法により, 複製過程の中でも, キャップスナッチングの機構に異常が生じていることを突き止めた. H1N1 のみならず, H7N7 や H5N1 といった高病原性鳥インフルエンザウイルスを含む IAV のサブタイプにおいても, 一様に複製異常が認められた. MTr1 欠損細胞に, MTr1 を発現させることで, ウイルスの複製が検出されるようになった一方, 酵素活性を示さない変異 MTr1 を発現させた場合には, ウイルスの複製は認められなかったことから, MTr1 のメチル化転移酵素の酵素活性に依存した現象であることが判明した. 興味深いことに, 他のオルソミクソウイルス科である D 型インフルエンザウイルス及びトゴトウイルスは MTr1 欠損細胞においても, 野生型細胞とほとんど同じようにウイルスが複製できることが分かった. さらに, リフトバレー熱ウイルス, そしてハザラウイルスを含む 4 種類のナイロウイルス科, いずれのブニヤウイルスにおいても, MTr1 欠損細胞での顕著な複製阻害は確認できなかった (図 2).

3. MTr1 欠損細胞における自然免疫とウイルス複製

MTr1 欠損細胞では, 自己標識となるメチル化が行われないため, 不完全な RNA が自然免疫因子である RIG-I および IFIT1 の標的となり得る^{1,2)}. しかしながら, RIG-I および IFIT1 を欠損させても, MTr1 欠損細胞において, IAV は複製できないままであった. さらに, MTr1 欠損細胞において, センダイウイルス, 水疱性口内炎ウイルス, 脳心筋炎ウイルスといった, インターフェロンによる自然免疫系に高い感受性を持つウイルスの複製が抑制されることもなく, 過剰にインターフェロンの産生が検出されるこ

連絡先

〒 53127, Bonn
Venusberg-Campus 1
University Hospital Bonn,
Germany
TEL: +49 228 287 54761
FAX: +49 228 287 9080 137
E-mail: hkato@uni-bonn.de

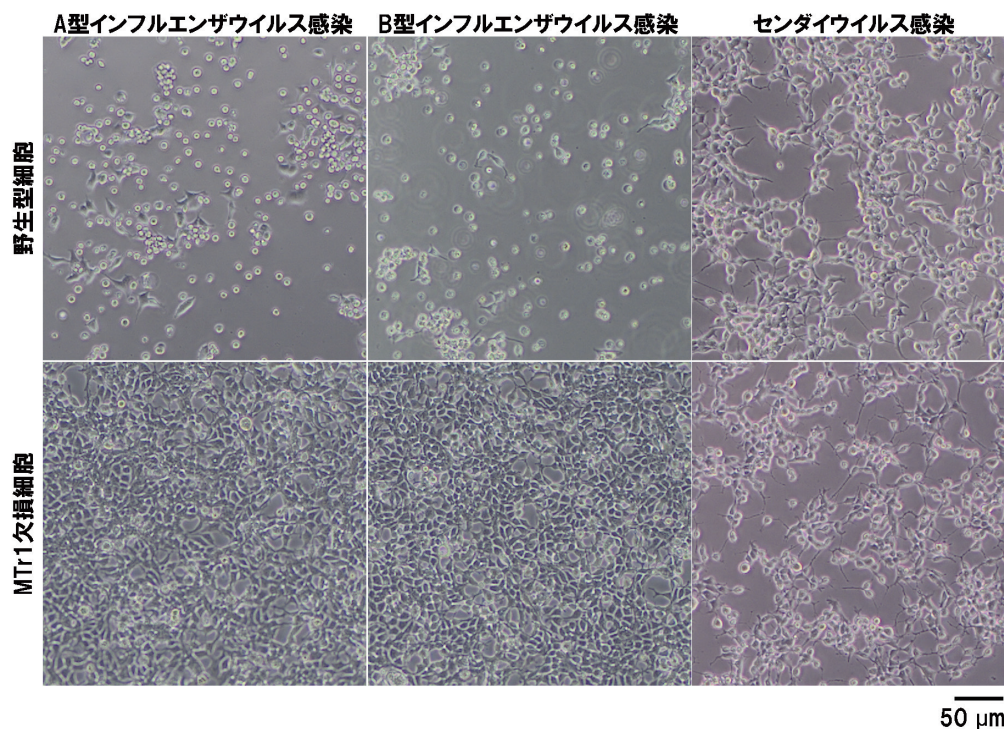


図1 MTr1欠損細胞におけるウイルス感染による細胞変性効果

A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、およびセンダイウイルスに2日間感染させた野生型およびMTr1を欠損させたHEK-293T細胞を、明視野顕微鏡を用いて撮影した画像。MTr1欠損細胞は、A型およびB型インフルエンザウイルス感染に対して、特異的に細胞変性効果に対する耐性を示した（参考文献6より一部改変）。



図2 複製におけるMTr1の必要性に基づいたウイルスの分類

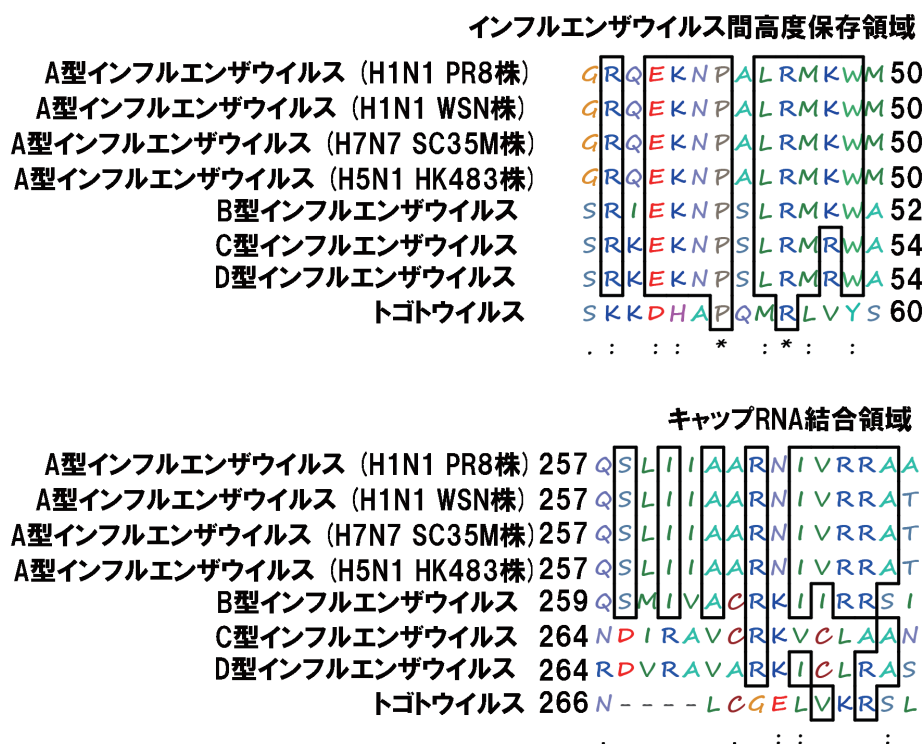


図3 オルソミクソウイルス科のポリメラーゼ PB2 サブユニットの一次構造比較

ともなかった。定常状態の MTr1 欠損細胞において、ウイルス複製を阻害できるほどの自然免疫の賦活化は起こっていないものと考えられる。

4. インフルエンザウイルスポリメラーゼと不完全なキャップ RNA との結合

自然免疫系によるウイルス抑制でないのであれば、IAV および IBV はどのような機構によって、MTr1 欠損細胞内での複製が制限されているのであろうか。この疑問に対処するため、著者らはキャップスナッチング機構については、インフルエンザウイルスにおけるポリメラーゼ複合体の PB2 サブユニットが、宿主のキャップ RNA に結合することが必要である。報告されている PB2-RNA の立体構造⁴⁾を用いた *in silico* 構造解析から、MTr1 が標的とする、一番目のヌクレオチドにおける 2'-O 位のメチル化は、PB2 との相互作用に大きく影響することが示唆された。実際に、MTr1 欠損細胞において、PB2 と RNA の結合が減弱することも明らかとなった。オルソミクソウイルス科の PB2 におけるキャップ RNA 結合部位の一次構造を比較してみると、IAV と IBV 間ではよく保存されている一方、D 型インフルエンザウイルスおよびトゴトウイルスでの保

存性は低かった (図3)。オルソミクソウイルス科において MTr1 の必要性が異なる理由は、PB2 と RNA の結合様式の違いに起因している可能性が示唆される。

5. 宿主メチル基転移酵素の抗ウイルス標的としての可能性

MTr1 の阻害薬が、IAV および IBV の抗ウイルス薬となることを期待し、著者らは段階的な薬剤スクリーニングを行った。はじめに MTr1 の結晶構造⁵⁾を基にした *in silico* スクリーニングを行い、MTr1 阻害剤の第一候補の化合物として、ストレプトマイセス属細菌が合成する天然化合物であるツベルシジンを得た。さらに、100 種以上のツベルシジン類似化合物のスクリーニングから、より毒性の少ない化合物として、トリフルオロメチルツベルシジンを同定した。この化合物は、MTr1 欠損細胞と同様、IAV および IBV の複製を特異的に阻害した。生化学実験により、リコンビナント MTr1 タンパク質との結合およびメチル基転移活性阻害も確認できた。さらに、生体外ヒト肺およびマウス生体内でも抗ウイルス活性を示し、抗インフルエンザ薬のバロキサビルとの相乗効果も見られ、バロキサビル耐性変異体にも抗ウイルス活性を示した^{6,7)} (図4)。

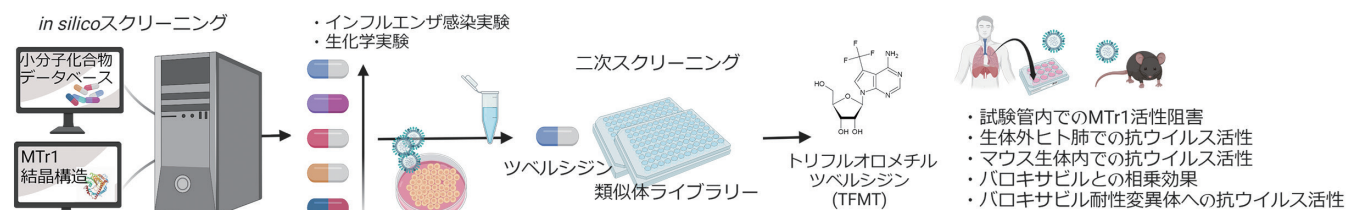


図4 段階的スクリーニングによる MTr1 阻害剤トリフルオロメチルツベルシジン (TFMT) の同定 (BioRender (<https://biorender.com>) を用いて作図)

6. おわりに

本研究において著者らは、宿主メチル基転移酵素 MTr1 が IAV および IBV の複製時における必須因子であり、さらに同定した MTr1 阻害剤が高い抗ウイルス活性を示すことを明らかにした。MTr1 は宿主因子であり、毒性への懸念から、MTr1 阻害剤の投与は短期的かつ最小限にとどめる必要があると考えられる。既存の抗インフルエンザ薬との併用が可能になれば、耐性ウイルスの出現頻度を効果的に抑えられることが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの先生方、学生やスタッフの皆様のご協力を賜りました。携わっていただきました全ての皆様に、この場をお借りして、心より感謝申し上げます。また、本稿の執筆の機会を与えてくださいました、学会誌編集委員長の野田岳志先生に厚く御礼申し上げます。

利益相反開示について

本稿に関し、開示すべき利益相反関係にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Habjan M, Hubel P, Lacerda L, Benda C, Holze C, Eberl CH, Mann A, Kindler E, Gil-Cruz C, Ziebuhr J, Thiel V, Pichlmair A.: Sequestration by IFIT1 impairs translation of 2'-O-unmethylated capped RNA. *PLoS pathogens* 9(10):e1003663, 2013.
- 2) Schuberth-Wagner C, Ludwig J, Bruder AK, Herzner AM, Zillinger T, Goldeck M, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Kerber R, Wolter S, Stumpel JP, Roth A, Bartok E, Drosten C, Coch C, Hornung V, Barchet W, Kummerer BM, Hartmann G, Schlee M.: A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'-O-Methylated Self RNA. *Immunity* 43(1):41-51, 2015.
- 3) Belanger F, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Pelletier J.: Characterization of hMTr1, a human Cap1 2'-O-ribose methyltransferase. *J Biol Chem* 285(43):33037-33044, 2010.
- 4) Fan H, Walker AP, Carrique L, Keown JR, Serna Martin I, Karia D, Sharps J, Hengrune N, Pardon E, Steyaert J, Grimes JM, Fodor E.: Structures of influenza A virus RNA polymerase offer insight into viral genome replication. *Nature* 573(7773):287-290, 2019.
- 5) Smietanski M, Werner M, Purta E, Kaminska KH, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Nowotny M, Bujnicki JM.: Structural analysis of human 2'-O-ribose methyltransferases involved in mRNA cap structure formation. *Nat Commun* 5:3004, 2014.
- 6) Tsukamoto Y, Hiono T, Yamada S, Matsuno K, Faist A, Claff T, Hou J, Namasivayam V, vom Hemdt A, Sugimoto S, Ng JY, Christensen MH, Tesfamariam YM, Wolter S, Juraneck S, Zillinger T, Bauer S, Hirokawa T, Schmidt FI, Kochs G, Shimojima M, Huang YS, Pichlmair A, Kummerer BM, Sakoda Y, Schlee M, Brunotte L, Muller CE, Igarashi M, Kato H.: Inhibition of cellular RNA methyltransferase abrogates influenza virus capping and replication. *Science* 379(6632):586-591, 2023.
- 7) Crunkhorn S.: Inhibiting cap snatching. *Nat Rev Drug Discov* 22(4):271, 2023.