

| | |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名（本籍） | 吉 本 淳（北海道） |
| 学位の種類 | 博士（獣医） |
| 学位記番号 | 獣医博乙第49号 |
| 学位授与年月日 | 平成14年3月13日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文題目 | The studies on novel inhibitors of influenza virus hemagglutinin (インフルエンザウイルスの赤血球凝集素に働く新しい阻害 剤に関する研究) |
| 審 査 委 員 | 主査 帯広畜産大学 教授 品 川 森 一 副査 帯広畜産大学 教授 白 幡 敏 一 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

インフルエンザウイルスの赤血球凝集素（HA）は感染性に関係し、宿主の蛋白質分解酵素により HA1 と HA2 に開裂され、HA2 の N 端側の疎水性領域が露出する。この疎水性領域が宿主細胞膜に挿入され膜融合を誘導する。開裂部分に塩基性アミノ酸の置換、挿入がおきると HA を開裂する蛋白分解酵素種が変わることがある。全身臓器に分布する蛋白分解酵素により開裂される HA に変わると、その HA を持つウイルスは全身で増殖可能となり強い病原性を発揮する。

本論は、先ず、インフルエンザウイルスの HA による細胞融合を阻害する化合物スタキフリンを以下のように同定した。

カビの抽出液から分離された抗インフルエンザ物質、スタキフリンはウイルス増殖阻害試験、赤血球溶血試験において、A 型 H1 および H2 サブタイプにのみ阻害活性を示し、HA に作用する化合物であることが判った。HA は、酸性条件下では構造変化が起って HA2 末端の疎水領域が露出し、膜融合活性を持つようになる。酸性条件下で構造変化を起こした後で処理するとスタキフリンの効果は消失した。また、スタキフリン処理 HA は、構造変化後に見られるトリプシン感受性が消失した。これらのことから、スタキフリンは HA の構造変化を阻害することが明らかとなった。

次いで、インフルエンザウイルス HA 領域のスタキフリン耐性に関与するアミノ酸部位を以下のように同定した。

スタキフリンの HA 構造変化阻害作用を分子レベルで解明するために、A 型インフルエンザウイルス WSN 株 (H1N1) から、スタキフリン耐性ウイルスを分離した。これらの HA1 で V176I, HA2 で K51R, K121E および S206L のアミノ酸変異を 1ヶ所以上持つウイルスが見つかった。これらの変異と薬剤耐性の関係を知るため、各変異を導入した HA を発現する細胞を作製し、蛍光色素 R18 で処理した赤血球との細胞融合を位相差蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、上記 4 変異のうち HA2 の K51R および K121E がスタキフリン耐性に必要なアミノ酸変異であり、スタキフリンは HA2 に作用する化合物であることが明らかとなった。

審 査 結 果 の 要 旨

インフルエンザウイルスの赤血球凝集素 (HA) は感染性に関係し、宿主の蛋白質分解酵素により HA1 と HA2 に開裂され、HA2 の N 端側の疎水性領域が露出する。この疎水性領域が宿主細胞膜に挿入され膜融合を誘導する。開裂部分に塩基性アミノ酸の置換、挿入がおきると HA を開裂する蛋白分解酵素種が変わることがある。全身臓器に分布する蛋白分解酵素により開裂される HA に変わると、その HA を持つウイルスは全身で増殖可能となり強い病原性を発揮する。

本論分では、まず、カビの抽出液から分離された抗インフルエンザ物質、スタキフリンがウイルス増殖阻害試験、赤血球溶血試験において、A 型 H1 および H2 サブタイプにのみ阻害活性を示し、HA に作用する化合物であることを明らかにした。HA は、酸性条件下で構造変化が起きて膜融合活性を持つようになる。酸性条件下で構造変化を起こした HA をスタキフリン処理しても効果がなく、変化前にスタキフリン処理した HA は、構造変化後に見られるトリプシン感受性が消失した。これらのことから、スタキフリンが HA の構造変化を阻害することを示した。

次に、スタキフリンの HA 構造変化阻害作用を分子レベルで解明した。A 型インフルエンザウイルス WSN 株 (H1N1) から、スタキフリン耐性ウイルスを分離し、これらの HA1 のアミノ酸変異部位を調べた。見つかった変異と薬剤耐性の関係を知るため、各変異 HA を発現する細胞を作製して赤血球との細胞融合能を調べた。その結果、HA2 の K51R および K121E がスタキフリン耐性に必要なアミノ酸変異であり、スタキフリンは HA2 に作用する化合物であることを突き止めた。

最終的に、マウスおよびフェレットを用いたインフルエンザ感染実験を行い、スタキフリン誘導体の *in vivo* 抗インフルエンザ活性を測定した。マウスでは経口投与で肺のウイルス増殖抑制がみられ、スタキフリン系化合物は、*in vivo* でもウイルス抑制効果があることを証明した。次に、ヒトとよく似た症状を示すフェレットを用いて、スタキフリン系化合物の評価を試みた。経口投与では、ウイルス量を抑制でき

なかったが、鼻腔への直接投与により、鼻腔中のウイルス量を抑制すると共にインフルエンザによる発熱も抑えることができた。

上記のように、新規阻害剤スタキフリンの作用部位が、HA の構造変化を特異的に阻害することを証明し、動物実験でも抗インフルエンザウイルス活性を持つことを明らかにした。したがって本研究はインフルエンザの HA が新たな薬剤の標的となることを示しており、今後の新たな薬剤開発に途を開き、抗ウイルス薬研究の発展に大いに寄与する資料を提供した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Identification of a novel HA conformational change inhibitor of human influenza virus
著 者 名 : Yoshimoto Jun, Kakui Mayumi, Iwasaki Hiroko, Fujiwara Tamio, Sugimoto Hirohiko and Hattori Naohiko
学術雑誌名 : Archives of Virology
巻・号・頁・発行年 : 144 (5) : 865~878, 1999
- 2) 題 目 : Identification of amino acids of influenza virus HA responsible for resistance to a fusion inhibitor, Stachyflin
著 者 名 : Yoshimoto Jun, Kakui Mayumi, Iwasaki Hiroko, Sugimoto Hirohiko, Fujiwara Tamio and Hattori Naohiko.
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
巻・号・頁・発行年 : 44 (8) : 677~685, 2000
- 3) 題 目 : Development of anti-influenza drugs: II. Improvement of oral and intranasal absorption and the anti-influenza activity of stachyflin derivatives
著 者 名 : Yoshimoto Jun, Yagi Shigenori, Ono Junko, Sugita Ken-ichi, Hattori Naohiko, Fujioka Toshihiro, Fujiwara Tamio, Sugimoto Hirohiko and Hashimoto Naofumi
学術雑誌名 : Journal of Pharmacy and Pharmacology
巻・号・頁・発行年 : 52 (10) : 1247~1255, 2000

既発表論文

- 1) 題 目 : Comparative sequence analysis and expression of bovine PrP gene in mouse L-929 cells
著 者 名 : Yoshimoto Jun, Iinuma Toshiyuki, Ishiguro Naotaka, Horiuchi Motohiro, Imamura Masakatu and Shinagawa Morikazu
学術雑誌名 : Virus Genes
巻・号・頁・発行年 : 6 (4) : 343~356, 1992

- 2) 題 目 : Targeting of chrolamphenicol acetyltransferase to human immunodeficiency virus particles via Vpr and Vpx
著 者 名 : Sato Akihiko, Isaka Yoshitaka, Kodama Makoto, Yoshimoto Jun, Kawauchi Shinobu, Kuwata Takeo, Adachi Akio, Hayami Masanori, Yoshie Osamu and Fujiwara Tamio
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
卷・号・頁・発行年 : 39 (12) : 1015~1019, 1995
- 3) 題 目 : Evidence for direct association of Vpr and matrix protein p17 within the HIV-1 virion
著 者 名 : Sato Akihiko, Yoshimoto Jun, Isaka Yoshitaka, Miki Shigeru, Suyama Akemi, Adachi Akio, Hayami Masanori, Fujiwara Tamio and Yoshie Osamu
学術雑誌名 : Virology
卷・号・頁・発行年 : 220 (1) : 208~212, 1996
- 4) 題 目 : Development of anti-influenza virus drugs I: improvement of oral absorption and *in vivo* anti-influenza activity of Stachyflin and its derivatives
著 者 名 : Yagi Shigenori, Ono Junko, Yoshimoto Jun, Sugita Ken-ichi, Hattori Naohiko, Fujioka Toshihiro, Fujiwara Tamio, Sugimoto Hirohiko, Hirano Koichiro and Hashimoto Naofumi
学術雑誌名 : Pharmaceutical Research
卷・号・頁・発行年 : 16 (7) : 1041~1046, 1999