インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの構造解析と創薬研究

横浜市立大学大学院生命ナノシステム研究科 杉山佳奈子, 尾林栄治, 吉田尚史, 朴 三用

Kanako SUGIYAMA, Eiji OBAYASHI, Hisashi YOSHIDA and Sam-Yong PARK: Structure-Based Drug Design Targeting a Subunit Interaction of Influenza Virus RNA Polymerase

Influenza A virus is a major human and animal pathogen with the potential to cause catastrophic loss of life. Influenza virus reproduces rapidly, mutates frequently, and occasionally crosses species barriers. The recent emergence of swine-origin influenza H1N1 and avian influenza related to highly pathogenic forms of the human virus has highlighted the urgent need for new effective treatments. Here, we describe two crystal structures of complexes made by fragments of PA and PB1, and PB1 and PB2. These novel interfaces are surprisingly small, yet they play a crucial role in regulating the 250 kDa polymerase complex, and are completely conserved among swine, avian and human influenza viruses. Given their importance to viral replication and strict conservation, the PA/PB1 and PB1/PB2 interfaces appear to be promising targets for novel anti-influenza drugs of use against all strains of influenza A virus. It is hoped that the structures presented here will assist the search for such compounds.

1. はじめに

インフルエンザはインフルエンザウイルスが感染することによって発症する人畜共通感染症である。インフルエンザウイルスがヒトに感染すると、1～3日ほどの潜伏期を経て、急激な高熱および悪寒、頭痛、関節痛、全身の筋肉痛および倦怠感などの全身症状や喉の痛み、せきなどの呼吸器系の症状を表す。通常、体内での免疫機構が働き1～数週間程度で症状は治まるが、場合によってはインフルエンザ脳症や重度の肺炎などの合併症を起こし、死に至ることもある。

一般的なかぜと異なりインフルエンザは毎年流行を起こすが、これはインフルエンザウイルスが、複製時のチェック機構が存在しない非常に変異しやすいウイルスであるためであると考えられている。ウイルス表面にはヘマグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) と呼ばれる2つのタンパク質が存在しており (図1)、ヒトの体内にウイルスが侵入した場合、主にHAが抗原として認識される。¹⁾ しかしながらHAとNAは非常に変異が起りやすいタンパク質であり、現在わかっているだけでHAでは16種 (H1～H16)、NAでは9種 (N1～N9) の亜種が確認されている。²⁾ そのため、一度インフルエンザにかかってほかの亜種のウイルスが再び感染した場合、既存のHAに対する抗体が働かないために、毎年小さな流行を引き起こすことになっている。しかしこれらのインフルエンザの多くは低病原性であり、感染力の強さから広範囲にわたった流行を引き起こすが、気温および湿度の上昇により

おさまっていく。しかしながらこれまでに数十年に一度、高病原性のインフルエンザウイルスが現れ、多数の感染者および死者を出すような世界的な大流行 (パンデミック) を引き起こしてきた。

一番初めにパンデミックとして確認されたのは、1918～1919年、約6億人が感染し2,000～4,000万人の死者を出したといわれるスペインかぜであり、この流行によって日本でも2,400万人が感染し、約39万人の死亡が確認されている。^{3),4)} その後も1957年 (アジアかぜ)、1968年 (香港かぜ)、1997年 (ソ連かぜ) と大流行が起り、その都度数百から数千万人単位の死者が出ている。スペインかぜの原因となったインフルエンザウイルスは元々トリがもっていたインフルエンザウイルスが変異してヒトに感染し広まったものであり、^{4),5)} インフルエンザウイルスに対する免疫をもっていなかったために大流行を起こしたと考えられている。

現在、ヒトに感染するといわれているインフルエンザウイルスは、H1, 2, 3の3種のヘマグルチニンおよびN1, 2, 8の3種のノイラミニダーゼをもつものであると確認されており、ほかの亜種は主に水鳥などに感染するといわれている。

この感染性の違いはこれらのタンパク質が認識する糖鎖のシアル酸とガラクトースの結合様式の違いによるもので、 α 2-6結合の糖鎖をもつヒトの細胞に感染するウイルスは α 2-3結合の糖鎖をもつトリの細胞には感染できず、逆もまた同様であると考えられている。⁶⁾

しかしながら近年、高病原性トリインフルエンザであるH5N1型インフルエンザウイルスのヒトへの感染が報告

図1 インフルエンザウイルスの模式図と感染様式.
(influenza virus and its life cycle.)

A) ウイルスの模式図. インフルエンザウイルスは直径が80～120 nm程度で細胞膜由来のエンベロープをもっている. ウイルス表面にヘマグルチニン, ノイラミニダーゼ, M2という3つのタンパク質, エンベロープ内に膜を裏打ちするM1と8個のRNAタンパク質複合体が存在している. ウイルスのゲノム本体であるRNAは, RNAポリメラーゼ, NPタンパク質と複合体を形成しており, RNAはNPに巻き付いた形をとっている. B) 細胞内での感染様式. 体内に進入したインフルエンザウイルスは, まず, 細胞表面に存在する糖タンパクのシアル酸に結合し, 宿主細胞のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる. 本来, エンドサイトーシスによって取り込まれた異物はそのまま消化されるが, インフルエンザウイルスは取り込まれたエンドソーム内が酸性に保たれていることを利用し, ウイルスRNAおよびRNA結合タンパク質複合体(RNP)を細胞室内へと放出される(脱殻). 細胞質へと放出されたRNPはNPの作用によって核へと移行し, 複製および転写, 翻訳が行われる. ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼ, M2タンパク質は, 膜タンパクとして修飾を受けながら細胞膜に発現する. その他のタンパク質は細胞質で発現した後, 核へと移行し, 新たなRNPとして再構築された後, 細胞表面へと移動する. 細胞表面に集まったウイルスのタンパク質は8つのRNPを正しく含むように集合し, 新たなウイルス粒子として細胞外に放出される. しかしながら放出されたウイルスはすぐに元の細胞の糖鎖と結合してしまい, ほかの細胞へ感染することができないため, もう1つのスパイクタンパクであるノイラミニダーゼが放出後の宿主細胞の糖鎖-シアル酸結合部位を切断し, 宿主細胞から遊離, 新たな細胞へと感染する.

された.⁵⁾ WHOの調べによると2008年6月19日現在, H5N1型インフルエンザは2003～2008年の5年間で385人が感染し, そのうちの243人が亡くなっている. 現在, このH5N1型インフルエンザは病原性が強い反面, ヒトへの感染性は低く, ヒトからヒトへの感染は数えるほどであるために, 大流行へと至ってはいないが, スペインかぜがトリインフルエンザからの変異ウイルスによって引き起こされたことや, これまでの報告による致死率が63%という高いものであることから, 近い将来, H5N1型インフルエンザの世界的な大流行が起こることが危惧されている.

さらに, 2009～2010年にかけて, ブタのインフルエンザウイルスを起源とする新型インフルエンザウイルスが発生し, 世界的な流行を引き起こした. 幸いこの新型ウイルスは, 感染力は強いものの, 病原性はそれほど強くなく致死率が低かったために多数の死者を出す事態には至らなかった. しかし, ヒト, トリ両方のウイルスに感染するブタ由来のウイルスが流行したことから, 近いうちに, 感染性および病原性の高いウイルスが出現し, パンデミックを引き起こすのではないかと危惧されている.

また, これまで, インフルエンザの治療薬として, アマニタジンおよびオセルタミビル(タミフル)などが用いられてきたが, これらの薬剤に対して耐性をもつインフルエンザウイルスが確認されていることなどから,^{7,8)} 今後発生する季節性および新型インフルエンザウイルスに対して薬剤が効かない可能性も示唆されており, 新たな薬剤の設計が求められている. 実際に2008～2009年にかけてアメリカを中心に流行している季節性のインフルエンザはタミフル耐性ウイルスによって引き起こされているという報告が米疾病対策センター(CDC)からなされており, 「薬剤耐性ウイルス」「人から人へ感染能をもった豚由来のウイルス」「病原性の高い鳥インフルエンザウイルス」が同時に発生している現状では, この3つの特徴をあわせもった新型ウイルスが出現する可能性は高く, 新規薬剤の開発は緊急を要している.

そこで本研究では, 新規薬剤ターゲットとしてインフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼ複合体に注目した. RNAポリメラーゼはインフルエンザウイルスの遺伝子の複製および転写を行う, 生存に必須な酵素であり, ほかのウイルスのタンパク質と比較して亜種間での相溶性が非常に高い. 2009年に流行した豚インフルエンザウイルスと1918年のスペインかぜのウイルスのRNA合成酵素のアミノ酸相溶性は90%以上であり(図2), 今後起こり得る新型インフルエンザに対する薬剤ターゲットとして非常に有効なタンパク質であると考えられている.

2. RNAポリメラーゼについて

RNAポリメラーゼはPA, PB1およびPB2と呼ばれる3つのサブユニットの複合体であり, RNA複製, 転写活性の

表1 既存の抗インフルエンザウイルス薬. (List of the medicine for influenza.) これまでに用いられてきた抗インフルエンザウイルス薬の多くはNAに作用するものであり、ウイルスの撲滅ではなく、増殖阻害に働くものである。そのため、感染が進んでからでは効果がないものが多い。また、タミフル耐性ウイルスがラピアクタにも耐性をもつなど、ウイルス側が耐性をもちやすいこと、また、1つのタンパク質に作用するために大量の薬剤を投与しなくてはならないことなどから、まったく作用の異なる薬剤の開発が望まれている。

商品名	構造	作用機序	特徴
タミフル (オセルタミビル)		ノイラミニダーゼに結合し、ウイルスが細胞から遊離するのを阻害	錠剤薬, ドライシロップ 抗インフルエンザウイルス薬としては最もよく用いられているが, 耐性ウイルスの存在が報告されている。
リレンザ (ザナミビル)		ノイラミニダーゼに結合し、ウイルスが細胞から遊離するのを阻害	非経口経路投与薬(吸入投与) 吸入であるために, 特に小児や高齢者には用いられにくい
ラピアクタ (ペラミビル)		ノイラミニダーゼに結合し、ウイルスが細胞から遊離するのを阻害	点滴注射薬
イナビル		ノイラミニダーゼに結合し、ウイルスが細胞から遊離するのを阻害	非経口経路投与薬(吸入投与) 吸入であるために, 特に小児や高齢者には用いられにくい
アマンタジン		M2タンパク質に結合し、ウイルス遺伝子が細胞に放出されるのを阻害	睡眠障害や幻覚などの副作用がある。 耐性ウイルスが確認されており, 現在ではインフルエンザ薬としてではなく, パーキンソン病の薬として用いられている。

図2 ウイルスタンパク質の亜種間でのアミノ酸の保存. (conservation of amino acid sequence in HA, NA and RNA polymerase.) H1N1, H2N3, H5N7 型でのアミノ酸比較. アミノ酸が保存されているものは色つき, 保存されていないものは色なしで示している。

ほかに endonuclease 活性, Cap 結合活性を示す⁹⁻¹²⁾ インフルエンザウイルスは宿主の体内で図 1B に示したようなライフサイクルで増殖しており, こうした RNA ポリメラーゼの働きがウイルスの増殖にとって非常に重要である

ことがわかっている。

転写されたウイルスの mRNA は宿主細胞の系を利用してタンパク質へと翻訳されるが, ウイルスの RNA ポリメラーゼは, タンパク質合成に必要な Cap を宿主の

図3 mRNA 転写反応の流れ (Cap-snatching 機構). (transcription by influenza RNA polymerase: mechanism of Cap-snatching.) インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼは、宿主細胞内でmRNAとして認識されるために必要な5'G-Cap (図中Cap)とpolyA配列を独特な機構で自身のmRNAに付加させている。

mRNA から切断し、それをプライマーとしてmRNAの合成を行っていることがわかっている (cap-snatching 機構・図3)。それぞれの欠損実験などから、PAが宿主mRNAからのcapの切断、PB1がウイルスRNAのプロモーター認識やRNAの合成、そしてPB2がcap結合にかかわっていること、また複合体はヘテロ三量体の状態で活性を示し、単体ではその活性が失われることがわかっており、サブユニット間の情報伝達がRNAポリメラーゼの活性に重要であると考えられる^{9),13)-15)} (図4)。

RNAポリメラーゼはインフルエンザウイルスの生存にかかわる重要な酵素であるが、その詳細な機能などについてはいまだにわかっていないことも多く、構造に関しても一部分しか解かれていない。そこで、今回の研究では、RNAポリメラーゼがヘテロ三量体の形でのみ活性を示すこと、またその機能が複数のサブユニットに分散して存在していることに注目し、その相互作用と機能との相関、さらに新規薬剤開発への基盤となる構造情報を得ることを目的とし、サブユニット間相互作用部位の構造解析を行い、これに成功した。RNAポリメラーゼの3つのサブユニットはそれぞれPAとPB1、PB1とPB2が結合しており、PAとPB2間の相互作用は確認されていない。そこでこれ

ら相互作用部位の複合体を作製し構造解析を行った。

3. 複合体タンパク質の調整および構造解析

これまでの研究から、PA-PB1の結合にはPAの668-692残基、PB1の1-12残基が必要であることがわかってきたため¹⁶⁾⁻¹⁹⁾この部分を含みかつPAおよびPB1が安定に存在できる長さを検討した。その結果を基に、PAの239-716残基、PB1の1-81残基の共発現を行い、安定なPA-PB1複合体を得た。得られた複合体を2.4 Mギ酸ナトリウム条件下で結晶化し、良質な結晶を得ることができた。高エネルギー加速器研究機構のビームラインBL5および高輝度光科学研究センターSPring-8のビームラインにおいてX線照射実験を行い、高分解能のデータを得ることができた。また、位相問題を解決するために、結晶に1 mMの水銀化合物を浸漬し、重原子同型置換法によって良好な初期マップを得ることができた。測定したデータをHKL2000で処理し、位相の決定および初期モデルの構築 (Solve/Resolve)、モデルの改良 (COOT)、構造の精密化 (CNS および REFMAC)を行った。

PB1とPB2の結合にはPB1のC末端側が必須であることは明らかになっていたが、PB2のどの部位が結合しているかは明らかになっていなかった^{20),21)}。そのためさまざまなPB2断片とPB1のC末端部位 (678-757残基)との共発現実験を行い、PB1のN末端が必須であることを明らかにし、PB1の678-757残基とPB2の1-34残基からなる安定な複合体の発現に成功した。PA、PB1およびPB2断片は単独では非常に不安定であったため、複合体の発現には共発現系を構築して利用している。PB1-PB2複合体の結晶化を、0.1 M potassium phosphate pH 5.8, 15 % PEG4000条件下で行い、得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構のビームラインBL17AにおいてXAFS測定およびX線回折実験を行った。また、PB1-PB2複合体の発現にはSe-Metを含む培地を用いており、Seの異常分散によって位相問題を解決している。測定したデータをPA-PB1と同様に処理し、PB1-PB2複合体構造を得た。また、上記とは異なる、80 mM Citrate, 20 % PEG4000の条件下で高分解能の結晶を得ており、1.7 Åまでのデータおよび精密な構造を得ることができた。

4. PA-PB1の構造

PA-PB1複合体構造から明らかになったPA断片は、13個の α -ヘリックスと9個の β シートで構成されており、PDBに登録されているタンパク質にはない新規構造であった (図4)。PAの13個の α -ヘリックスのうち α -10, 11, 13の3つのヘリックス間にポケットが存在しており、そこにPB1が突き刺さる形で結合していた。このヘリックスとPB1は、疎水性相互作用によって結合しており、そのポケットのふたをする形で β 8および β 9からなるルー

図4 PA-PB1 複合体の構造. (Structure of PA-PB1 complex.) A) PA-PB1 複合体の構造をリボン図で示したもの. 矢印で示したヘリックスがPB1. B) 疎水性相互作用周辺のアミノ酸. PA を空間充填図, PA のβ8, β9 ループをリボン図で, PB1 をひも状の図で示した.

図5 PB1-PB2 複合体の構造. (Structure of PB1-PB2 complex.) A) PB1-PB2 複合体の構造をリボン図で示した. B) PB1 を空間充填図, PB2 をヘリックスで示した. C) 疎水性相互作用周辺のアミノ酸.

ブが, PB1 の主鎖と水素結合を作ることによって結合を安定化させていた. この2本のシートからなるループを欠損させたPAはPB1と結合できなくなることを確認しており, この水素結合が非常に重要であることがわかる. また, これまでの研究で, PB1 の1～14番までにあるアミノ酸の変異体実験では, ここにある疎水性残基を置換したものはPA

との結合ができなくなるとの報告がなされており, 得られた構造はこうした知見を裏付けるものであった.

5. PB1-PB2 の構造

PB1-PB2 複合体は図5に示すように, PB1, PB2 ともに3本のα-ヘリックスからなっており, PB1 の3つのヘリッ

クスは $\alpha 1$ と $\alpha 2$ が平行, $\alpha 2$ と $\alpha 3$ が逆平行に、曲面を描くように並んでいた。PB2のN末端側のヘリックス($\alpha 1$)はその曲面の内側にはまる形になっており、PB1とPB2は、主にこのPB2の $\alpha 1$ ヘリックス周辺の疎水性相互作用によって結合していた。このヘリックスからなる結合様式もPA-PB1複合体と同様にPDB内で見られない新規なものであった。結合の中心部位であるPB2の $\alpha 1$ ヘリックス周辺の疎水性相互作用についても図5に示した。PB2の $\alpha 1$ ヘリックス上のIle4, Leu7, Leu10の3つの疎水性残基はPB1の3本のヘリックス側に向いており、それぞれの疎水性残基がPB1の疎水性残基と4.2 Å以下の距離に存在しており、これらのアミノ酸の疎水性相互作用によりPB1とPB2が結合していることが明らかになった。

6. 薬剤開発に向けた研究

PA-PB1複合体およびPB1-PB2複合体の構造を解明し、それぞれのサブユニットが疎水性相互作用によって強固に結合していることを明らかにした。そこで、結合にかかわっていた残基の変異体を作製し、それによってRNAポリメラーゼの活性が低下するかどうかを確認した。

その結果、図6に示すようにPA-PB1ではPB1結合ポケットにある、PAのほぼすべての疎水性残基(Val636, Leu640, Leu666, Trp706)の変異体および $\beta 8-9$ を含むループ($\Delta 619-630$)の欠損体でRNAポリメラーゼの活性が低下し、PA-PB1の結合、さらにRNAポリメラーゼの活性に必須であることが明らかになった。また、PB1-PB2複合体でも疎水性相互作用の中心になっているPB2のLeu7が

結合に必須であり、その変異体で活性が低下することを確認した。これらのアミノ酸は、さまざまなウイルス亜種間で保存されており(図7)、このことから非常に重要であることがわかる。

図6 PA-PB1 およびPB1-PB2の変異体の結合実験と活性測定結果。(binding and activity analysis of PA-PB1 and PB1-PB2 by mutagenesis.) 上) PA-PB1複合体の実験結果. すべてのアミノ酸の変異体で結合、活性ともに低下していることがわかる. 下) PB1-PB2複合体の実験結果. Leu7の変異体(L7D)で結合、活性ともに低下した。

図7 PA-PB1複合体, PB1-PB2複合体の配列比較。(alignment of PA-PB1 and PB1-PB2.) 左) PA-PB1複合体のアラインメント図. 右) PB1-PB2複合体のアラインメント図. 結合および活性にかかわると思われるアミノ酸を白抜きで示した. H1N1, H5N1 (Avian) 間で完全に保存されていることがわかる. また, 立体構造中で得られた二次構造をアミノ酸配列上に示した。

そこで、PA-PB1 複合体における PB1 結合ポケットおよび PB1-PB2 複合体の PB2 結合面にはまる化合物が、非常に有効なインフルエンザウイルス阻害剤になると考え、*in-silico* 手法を用いて RNA ポリメラーゼのサブユニット間相互作用部位に結合する化合物の探索を行った。はじめに、PA-PB1 複合体および PB1-PB2 複合体の立体構造の MD 計算 (分子シミュレーション) を行い、その結果安定な構造が得られた。これらの構造を基に、200 万個の化合物データベースからドッキング計算を行い、サブユニットの結合部位を阻害する化合物を探索した結果、上位各 2,000 個のリストを得ることができた。現在、このリストの化合物を用いて、PA-PB1 および PB1-PB2 の結合阻害能を確認中である。

PA-PB1 結合部位に関しては PA 断片が PB1 断片非存在下では非常に沈殿しやすいのに対し、PB1 存在下では非常に安定であることから、化合物の結合が PA を安定化する可能性が高いと考え、複合体溶液中に化合物溶液を加え、PA が沈殿するか否かで一次スクリーニングを行っている。一方で、今回、研究に用いている PB1 および PB2 断片は単独では安定に存在しないため、現状のままでは化合物との結合検証が難しいが、PB1 と PB2 を連結したものを作製することで、連結タンパク質と化合物との結合を NMR (核磁気共鳴) および ITC (等温滴定型カロリーメータ) などを用いて確認することができる。これらの実験により、PA および PB1 の断片に結合すると確認できた化合物に対して、その相互作用機構を X 線結晶構造解析法によって解析し、さらに、候補化合物が同定されたのちには MDCK 細胞 (イヌ腎臓由来) を用いて抗インフルエンザ剤としての有効性の確認を行う。これらの手法によって、得られた薬剤候補化合物は、現行の薬剤とは異なり、非常に副作用が少なく、かつ効果的な薬剤の開発へとつながっていく。

以上のように、今回、RNA ポリメラーゼのサブユニット間相互作用部位の立体構造を明らかにしたことは、ウイルス複製に必須な部位を創薬ターゲットにすることを可能にし、抗インフルエンザウイルス創薬の新たな分野を開く成果である。前述のように、RNA ポリメラーゼはすべての亜型のインフルエンザウイルスにおいて、そのアミノ酸配列が高い割合で保存されており、特に、今回明らかになった相互作用にかかわる残基はすべて保存されていることから、今回の構造を基に開発される新薬はどのタイプのウイルスにも効果がある画期的なものになることが期待される。

7. おわりに

本研究では、インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼのサブユニット間相互作用を、構造解析をメインの手法として明らかにしたものである。また、今回の研究は、

これまでの創薬とは異なり、活性部位ではないが活性に必須な部位、また宿主側に存在しない部位をターゲットとした創薬の基盤となるものであると同時に、構造生物学の新たな活躍の場を提示する研究であったと考えている。今後、RNA ポリメラーゼの中でもいまだに構造解析がなされていない部分の構造がとかれるなど、さらなる研究が進むことによって、その機能の詳細も明らかになり、より一層、効果的な創薬へとつながることが期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたりご尽力いただいた、筑波大学基礎医学系感染生物学の永田恭介教授、川口敦史博士、鈴木由佳理氏に謝意を表します。

文 献

- 1) T. Noda, H. Sagara, A. Yen, A. Takada, H. Kida, R. H. Cheng and Y. Kawaoka: *Nature* **439**, 490 (2006).
- 2) K. Subbarao, D. E. Swayne and C. W. Olsen: *Influenza Virology; Current Topics* 229 (2006).
- 3) J. K. Taubenberger, A. H. Reid, R. M. Lourens, R. Wang, G. Jin and T. G. Fanning: *Nature* **437**, 889 (2005).
- 4) G. Vana and K. M. Westover: *Mol. Phylogenet. Evol.* **47**, 1100 (2008).
- 5) J. S. Peiris, M. D. de Jong and Y. Guan: *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 243 (2007).
- 6) T. Iwata, K. Fukuzawa, K. Nakajima, S. Aida-Hyugaji, Y. Mochizuki, H. Watanabe and S. Tanaka: *Comput. Biol. Chem.* **32**, 198 (2008).
- 7) P. J. Collins, L. F. Haire, Y. P. Lin, J. Liu, R. J. Russell, P. A. Walker, J. J. Skehel, S. R. Martin, A. J. Hay and S. J. Gamblin: *Nature* **453**, 1258 (2008).
- 8) A. C. Hurt, J. K. Holien, M. Parker, A. Kelso and I. G. Barr: *J. Virol.* (2009).
- 9) K. Nagata, A. Kawaguchi and T. Naito: *Rev. Med. Virol.* **18**, 247 (2008).
- 10) A. Dias, D. Bouvier, T. Crepin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack and R. W. Ruigrok: *Nature* **458**, 914 (2009).
- 11) P. Yuan, M. Bartlam, Z. Lou, S. Chen, J. Zhou, X. He, Z. Lv, R. Ge, X. Li, T. Deng, E. Fodor, Z. Rao and Y. Liu: *Nature* **458**, 909 (2009).
- 12) S. J. Plotch, M. Bouloy, I. Ulmanen and R. M. Krug: *Cell* **23**, 847 (1981).
- 13) M. A. Horisberger: *Virology* **107**, 302 (1980).
- 14) J. Braam, I. Ulmanen and R. M. Krug: *Cell* **34**, 609 (1983).
- 15) S. K. Biswas and D. P. Nayak: *J. Virol.* **70**, 6716 (1996).
- 16) T. Zurcher, S. de la Luna, J. J. Sanz-Ezquerro, A. Nieto and J. Ortin: *J. Gen. Virol.* **77** (Pt 8), 1745 (1996).
- 17) D. R. Perez and R. O. Donis: *J. Virol.* **75**, 8127 (2001).
- 18) Y. Ohtsu, Y. Honda, Y. Sakata, H. Kato and T. Toyoda: *Microbiol. Immunol.* **46**, 167 (2002).
- 19) A. Ghanem, D. Mayer, G. Chase, W. Tegge, R. Frank, G. Kochs, A. Garcia-Sastre and M. Schwemmle: *J. Virol.* **81**, 7801 (2007).
- 20) S. Gonzalez, T. Zurcher and J. Ortin: *Nucleic. Acids Res.* **24**, 4456 (1996).
- 21) E. L. Poole, L. Medcalf, D. Elton and P. Digard: *FEBS Lett.* **581**, 5300 (2007).

プロフィール

杉山佳奈子 Kanako SUGIYAMA
横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科
設計科学研究室 博士研究員
Protein Design Laboratory, Yokohama City University
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29
1-7-29 Suehiro, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan
e-mail: k-sugi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
最終学歴：横浜市立大学大学院国際総合科学研究
科博士課程 (2010 年修了)
専門分野：構造生物学・生物学
現在のテーマ：インフルエンザ RNA ポリメラー
ゼの構造生物学的研究

尾林栄治 Eiji OBAYASHI
横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科
設計科学研究室 特任助教
Protein Design Laboratory, Yokohama City University
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29
1-7-29 Suehiro, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan
e-mail: ejioba@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
最終学歴：中央大学大学院理工学研究科博士課程
(1999 年修了)
専門分野：構造生物学・生化学
現在のテーマ：病気関連タンパク質および RNA
結合タンパク質の構造生物学研究

吉田尚史 Hisashi YOSHIDA
横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科
設計科学研究室 博士 2 年
Protein Design Laboratory, Yokohama City University
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29
1-7-29 Suehiro, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan
最終学歴：横浜市立大学大学院国際総合科学研究
科博士課程 2 年在学中
専門分野：構造生物学・生化学
現在のテーマ：インフルエンザ RNA ポリメラー
ゼの構造生物学的研究

朴 三用 Sam-Yong Park
横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科
設計科学研究室 教授
Protein Design Laboratory, Yokohama City University
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29
1-7-29 Suehiro, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan
e-mail: park@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院基礎工学研究科博士課
程 (1995 年修了)
専門分野：構造生物学・生化学
現在のテーマ：疾患由来タンパク質の構造生物学