

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14859

研究課題名(和文) 狂犬病ウイルスの複製を阻害する化合物の探索

研究課題名(英文) Identification of compounds that selectively inhibit rabies virus replication

研究代表者

小川 健司(Ogawa, Kenji)

国立研究開発法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：50251418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、狂犬病ウイルスを構成する5種類のタンパク質のうち、Pタンパク質に着目し、(1)Pタンパク質の二量体化、(2)狂犬病ウイルスNタンパク質および(3)宿主ダイニンのL鎖(LC8)との相互作用を、分割ルシフェラーゼを用いた二分子化学発光相補反応によって数値化するアッセイ系の構築に成功した。これらは、化合物の大規模探索にも応用可能である。128番目のTyrをAlaに置き換えた変異体Pタンパク質は、二量体形成能を失っているにもかかわらず、免疫抑制活性は野生型Pタンパク質と同程度に維持していることが明らかになり、免疫抑制活性は二量体形成とは異なる機能部位が担っていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Rabies virus phosphoprotein (P protein) play an important role in the virus replication and suppression of host immunity. We focused on the P protein as a drug target, and established assay for measuring (1) P protein dimerization, and the interaction between the P protein and (2) rabies virus nucleoprotein and (3) host dynein L chain based on the split-luciferase complementation assays. The assays can be adapted to a high-throughput format to identify novel anti-rabies virus compounds. We next examined the relationship between the dimerization and immunosuppressive activity of P protein. The split-luciferase assay and Western blotting revealed that a mutant P protein in which Tyr-128 was substituted with Ala (Y128A) was defective in dimerization. However, the Y128A mutant P protein has the immunosuppressive activity comparable to the wild-type P protein. Thus, different functional domains of the P protein may be responsible for the dimerization and immunosuppressive activity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は、狂犬病ウイルス (RV, Rabies virus: Rhabdoviridae, Lyssavirus) の感染によって発症する人獣共通感染症である。ヒトを含む全ての哺乳動物に感染し、治療がないことから、発症後の致死率はほぼ 100% の極めて危険な感染症であり、年間 50,000 人と 100,000 以上の動物の発症、死亡が推計されている。一方、我が国の国内においては、狂犬病は 50 年以上発生していない。これは、イヌへのワクチン接種や検疫などの制度によるものと同時に、我が国が島国であるという地理的な優位にも起因する。実際に、狂犬病の発生が見られない地域は、我が国をはじめ、オーストラリア、イギリス、台湾、ハワイ等の島国 (あるいは地域) に限定されている。しかし、狂犬病を根絶したイギリスにおいて、コウモリから RV と同じ Lyssavirus に属する European bat lyssavirus が単離され、2002 年には感染による死者が発生した。また、オーストラリアのコウモリからも Lyssavirus に属する Australian bat lyssavirus が単離されており、これらのウイルスによる狂犬病様疾患が我が国においても発生する危険性が危惧されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、狂犬病ウイルス (RV) の複製を阻害する新規創薬リード化合物を単離する事にある。そのために、感染性を有するウイルス粒子を使用せず、ウイルス由来のタンパク質を標的とし、生細胞を用いてウイルスの複製過程を可視化・数値化する高速評価系を構築し、これを RV の感染、増殖を阻害する化合物の大規模探索に応用することにある。

モノネガウイルス目 (Mononegavirales) は、非分節マイナス鎖 RNA をゲノムとするウイルスからなり、(1) ボルナウイルス科 (Bornaviridae)、(2) ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae)、(3) フィロウイルス科 (Filoviridae)、(4) パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) の 4 科によって構成される。この中には、ボルナ病ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、ニパウイルスなど、ヒトに対して致死率の高い感染症を引き起こすウイルスやニューカッスル病ウイルスや牛痘ウイルスなど獣医学領域で問題となる多くのウイルスが分類される。4 科に属する代表的なウイルスの配列は互いに類似しており、同様な複製機構によって増殖する。本研究では、その中でも治療法が確立されておらず、獣医学および医学の双方に重要な人獣共通感染症を引き起こす RV に着目し、新規化合物の探索を計画した。

3. 研究の方法

化合物探索研究で最も重要な点は、高速評価系をいかに構築するかという点にある。本

研究では、下記に示す三つの基本戦略に基づいて高速評価系の構築を行った。(1) 安全性を重視し、感染性のあるウイルス粒子を使用しない: 大規模スクリーニングには、安全性の確立、保証が必要不可欠な事象である。本研究では、培養細胞にウイルス由来のタンパク質を強制発現させるが、ウイルス粒子が産生されない条件でこれを実施する。また、ウイルスタンパク質の ORF は、コドンヒト細胞に最適化した人工合成遺伝子を使用し、ウイルスゲノムに由来する塩基配列は非翻訳領域以外には使用しない。(2) 副作用のない創薬リード化合物の探索を目指し、ウイルス由来のタンパク質を標的とする: 感染細胞内でウイルスの複製に重要な役割を果たすタンパク質に着目し、この機能を *in vitro* で可視化・数値化し得る評価系の構築を行う。(3) 生細胞を用いた高速評価系を構築する: 細胞毒性を有する化合物や、浸透性に問題のある化合物を一次スクリーニングで排除し、生体で確実に作用する化合物の探索が可能となる。

RV は、全長約 12kb のマイナス鎖 RNA をゲノムとするウイルスであり、ゲノム上には、N (核タンパク質)、P (リン酸化タンパク質)、M (マトリックスタンパク質)、G (糖タンパク質) および L (RNA ポリメラーゼ) の 5 種類の ORF が存在する。ウイルス粒子は、エンベロープを有し、幅 75~80 nm、長さ 180nm の特徴的な弾丸状の形態を呈する。ウイルス粒子内のゲノム RNA は N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質と結合してリボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体として存在する。RNP は、ウイルスタンパク質の発現とゲノムの複製の双方に重要である。この内 P タンパク質は、ウイルスの転写・複製に必須の役割を果たすと同時に、宿主の免疫応答の抑制にも働くことが知られている。また、P タンパク質は、宿主の細胞内輸送において重要な役割を果たすモータータンパク質ダイニンの L 鎖 (LC8) と結合することが報告されており、この相互作用は RV の軸索輸送または複製に重要であると考えられている。我々は、P タンパク質の創薬ターゲットとしての可能性に着目し、分割ルシフェラーゼとの融合タンパク質を用いた二分子化学発光相補反応により P タンパク質の二量体化を可視化・数値化するアッセイ系を構築した。

4. 研究成果

(1) P-P 二量体化評価系の構築

我々は、まず分割ルシフェラーゼとの融合タンパク質を用いた二分子化学発光相補反応により、P タンパク質の二量体化を可視化・数値化するアッセイ系を構築した。分泌型の海洋性カイアシ (*Gaussia princeps*) 由来ルシフェラーゼ (Gluc) の N 末端および C 末端の分割断片 (それぞれ GlucN および GlucC) とウイルスタンパク質 (全長または断片) の融合タンパク質をコードする哺乳動物細胞

発現ベクターを作製した。この発現ベクターを様々な組み合わせで HeLa 細胞に遺伝子導入し、培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、S/N 比 19,815 という高いレベルのルシフェラーゼ活性が 24 時間以内の培養で認められ、P タンパク質の二量体形成を数値化する評価系の構築に成功した。次に、二量体化を形成しない P タンパク質変異体の作製を試みた。分割ルシフェラーゼを用いた複合体形成アッセイおよびウェスタンブロッティングを用いた解析により、128 番目の Tyr を Ala に置き換えた変異体 P タンパク質 (Y128A) は、二量体を形成しないことが明らかとなった。

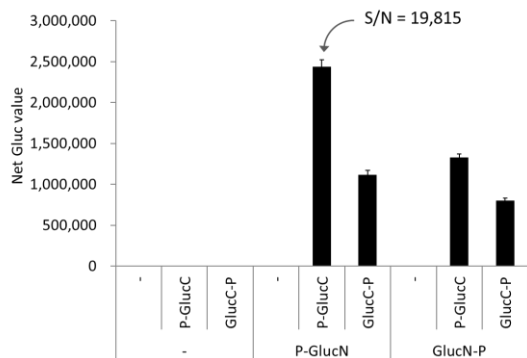


図1. 分割ルシフェラーゼを用いた P タンパク質二量体形成評価系の構築

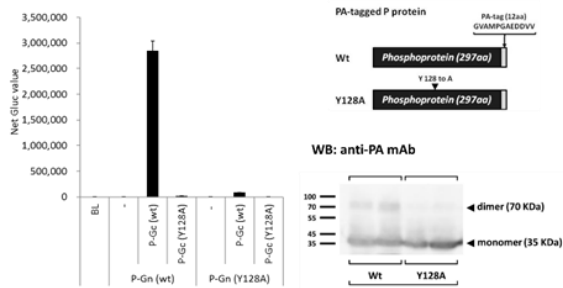


図2. 変異体 P タンパク質 (Y128A) は二量体を形成しない

(2) P タンパク質と宿主 LC8 および RV N タンパク質との相互作用の数値化

P タンパク質と LC8 の相互作用を可視化・数値化する評価系を構築した。LC8 は野生型 P タンパク質とは強く結合するが、二量体形成能を欠く変異型 P タンパク質 (Y128A) との結合能は著しく低いことが明らかとなった。さらに、RNP 複合体の主成分である N タンパク質と P タンパク質との相互作用を可視化・数値化する評価系の構築を試みた。P タンパク質および N タンパク質 N 末端領域と分割ルシフェラーゼ融合タンパク質発現ベクターを細胞内に導入すると、高いレベルのシグナルが得られ、P タンパク質は N タンパク質の N 末端領域と結合することが明らかとなった。一方、N タンパク質の多量体形成に重要な N タンパク質同士の結合部位は C 末端領

域にあることが明らかとなった。我々の構築したこれらの評価系は、いずれもシグナル/バックグラウンド比が高く、ハイスループットスクリーニングに応用可能である。

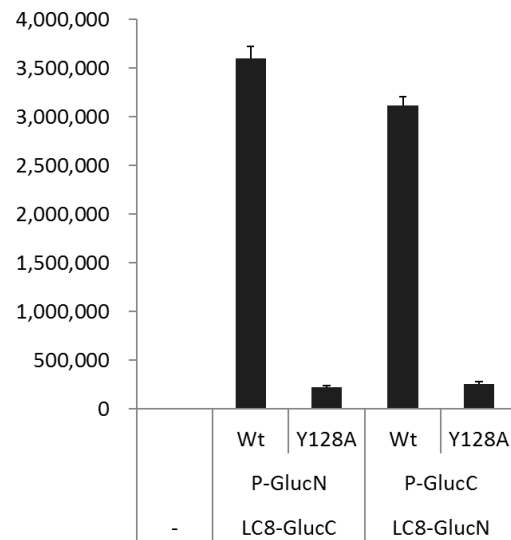


図3. P タンパク質と宿主ダイニン L 鎖 (LC8) 相互作用の数値化

(3) P タンパク質による宿主免疫抑制作用 抗ウイルス自然免疫におけるインターフェロン (IFN) の発現に及ぼす P タンパク質の影響をレポーターアッセイによって検討した。マウス IFN- β プロモーター (-490/+55) を、HeLa 細胞に導入すると、自然免疫刺激である LPS によって転写が促進される事が確認された。また、ヒト由来 HEK293 細胞を用いた実験では、NF κ B を構成する p50 および p65 により、協調的に転写が促進された。また、IRF-7 は単独で IFN- β の転写を促進した。この転写活性は、NF κ B との共発現により増強された。野生型 P タンパク質は、NF κ B および IRF-7 による IFN β 転写活性の誘導を抑制

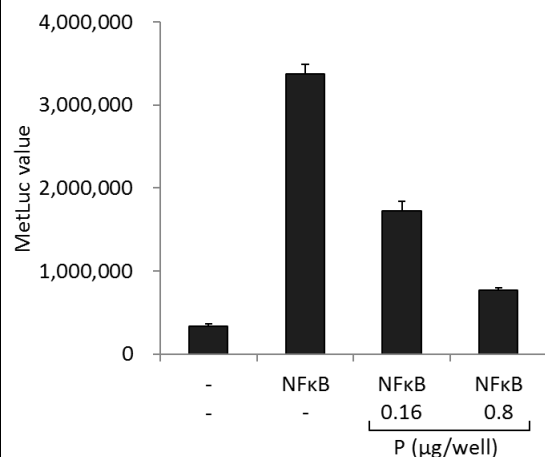


図4. P タンパク質による NFκB 誘導 IFN β 転写活性の抑制

することが示された。HeLa 細胞を用いたレポーターアッセイにより、Y128A 変異型 P タンパク質は、二量体形成能を失っているにもかかわらず、免疫抑制活性は野生型 P タンパク質と同程度に維持していることが明らかになった。P タンパク質による免疫抑制活性は、二量体形成とは異なる機能部位が担っていることが示された。

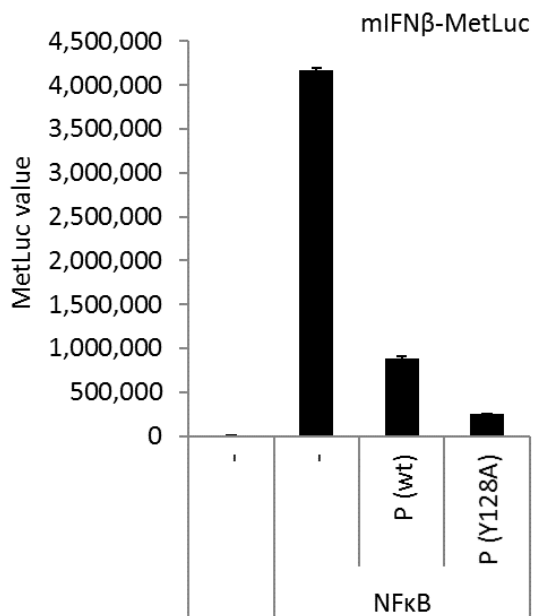


図5. 野生型およびY128A変異型Pタンパク質によるIFNβ転写活性の抑制

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①小川健司、市川保恵、吉田 稔
 狂犬病ウイルスPタンパク質の創薬標的としての可能性
 日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会
 2016年6月15日
 京都テルサ(京都市)

②小川健司、市川保恵、吉田稔
 狂犬病ウイルスPタンパク質による宿主免疫抑制機構の研究
 第158回日本獣医学会学術集会
 2015年9月7日
 北里大学獣医学部(十和田市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 健司 (OGAWA KENJI)
 国立研究開発法人理化学研究所・
 吉田化学遺伝学研究室・専任研究員
 研究者番号：50251418

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし