

令和元年6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18387

研究課題名（和文）タンパク質相互作用に基づいた新規抗ウイルス薬開発法の確立

研究課題名（英文）Establishment of novel method for development of antiviral drug based on protein interaction

研究代表者

中津 祐一郎（Nakatsu, Yuichiro）

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：70572113

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：麻疹ウイルスのウイルスタンパク質間相互作用の簡便な検出システムを構築するため、ルシフェラーゼ断片の機能補完を指標とした系の構築を検討した。麻疹ウイルスの細胞質内タンパク質を解析したところ、いくつかの相互作用が高感度に検出できた。また、段階的な欠損変異体を用いて、相互作用に重要なアミノ酸領域の同定も試みた。さらに、この相互作用検出系が可逆的であることも確認でき、今後、抗ウイルス薬の探索に応用可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したウイルスタンパク質の相互作用検出系は、ハイスループットな化合物スクリーニングに利用可能であり、今後、治療法の確立されていないウイルス感染症の治療薬開発に役立つことが期待される。また、他のタンパク質間相互作用解析法よりも生理的な条件下で解析可能なことから、これまでに報告されていない、比較的弱いタンパク質間相互作用が検出できる可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：To establish simple and high-throughput detection system of protein-protein interaction of measles virus, the functional complementation assay using split luciferase was applied. In this system, some interactions of measles virus proteins were detected. The important regions for the protein-protein interactions were also identified by the mutant assay. Moreover, this functional complementation of luciferase was severely disturbed by the overexpression of proteins that do not have split luciferase-tag, indicating that this system is reversible and can be applied to the exploration of novel antivirals in future.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス タンパク質間相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに開発された抗ウイルス薬の多くは、ウイルスタンパク質の持つ酵素活性（プロテアーゼ活性、ポリメラーゼ活性、シアリダーゼ活性など）を阻害するものであり、変異による薬剤耐性ウイルスの出現や副反応などの問題が指摘されている。ウイルスはタンパク質や核酸、脂質膜の集合体であり、それらの相互作用がウイルスの増殖サイクルの各段階に重要である。そのことから、これらの相互作用をピンポイントに阻害する方法を探索することで、これまでにない抗ウイルス薬を開発できる可能性が考えられる。

近年、様々なタンパク質間相互作用の解析法が開発されている。二分子補完法は、ルシフェラーゼなどのレポータータンパク質を二断片に分割し、それぞれの断片を相互作用を解析したい二つのタンパク質に融合させることで、二つのタンパク質が相互作用した場合のみ、分割したレポータータンパク質が補完され、機能が回復することを利用した相互作用解析法である。一番の利点は、レポータータンパク質に応じた単純な表現系（ルシフェラーゼの場合は発光）を観察するだけで相互作用が解析できる点であり、簡便性に優れ、ハイスループットな解析に有用である。現在までに、ウイルスタンパク質間の相互作用をこの方法で解析している例は少なく、ハイスループットな点に着目した応用も行われていない。

2. 研究の目的

培養細胞内でのハイスループットなウイルスタンパク質間相互作用の検出系を構築することを目的とした。その際、伝播性が高く比較的重篤な症状を引き起こし、特異的な抗ウイルス薬が実用化されていない麻疹ウイルスのウイルスタンパク質間相互作用検出系を作出することとした。さらに、作製した相互作用検出系が、将来的な抗ウイルス薬の探索に用いることが可能かどうかを検討することとした。

3. 研究の方法

二分子補完法を用いたウイルスタンパク質間相互作用解析系の作出には、NanoBiT法（プロメガ社）を用いた。NanoLuc ルシフェラーゼの2つの断片（LgBiTとSmBiT）を麻疹ウイルスの5種類の細胞質内タンパク質（N、P、V、CおよびMタンパク質）と融合させたタンパク質発現プラスミドを作製した。それらの発現プラスミドを様々な組み合わせで培養細胞に発現させ、NanoLucシグナルが見られる組み合わせを検索した。NanoLucシグナルが確認され相互作用していることが推測された組み合わせについては、他の方法を用いて、その相互作用を再検証した。相互作用していることが明らかとなった組み合わせについては、段階的な部分欠損体を作製し、ウイルスタンパク質間相互作用の責任領域の同定を試みた。また NanoBiT法による相互作用検出系が可逆的なことを確認するために、NanoLucシグナルが検出できる組み合わせを共発現させた状態で、ルシフェラーゼ断片を融合していない一方のタンパク質を追加で過剰発現させ、シグナルが減弱することを確認した。

4. 研究成果

(1) 麻疹ウイルスのウイルスタンパク質間相互作用検出系の構築

NanoLuc ルシフェラーゼの2つの断片（LgBiTとSmBiT）を、5種類の麻疹ウイルスタンパク質（N、P、V、CおよびMタンパク質）のN末端側およびC末端側に融合させた計20種類の組換えタンパク質発現プラスミドを構築した。SmBiT融合タンパク質とLgBiT融合タンパク質を293T細胞に共発現させ、NanoLucルシフェラーゼ活性を測定した結果、これまでに他の方法で相互作用が報告されているNタンパク質とPタンパク質、およびPタンパク質とPタンパク質の相互作用が本検出系でも高感度に検出できた（図1）。一方で、他の検出系では相互作用が報告されているNタンパク質とMタンパク質、およびNタンパク質とCタンパク質の相互作用は検出できなかった。また、これまでに報告されていないCタンパク質同士、およびCタンパク質とPタンパク質の相互作用も検出できた（図2）。

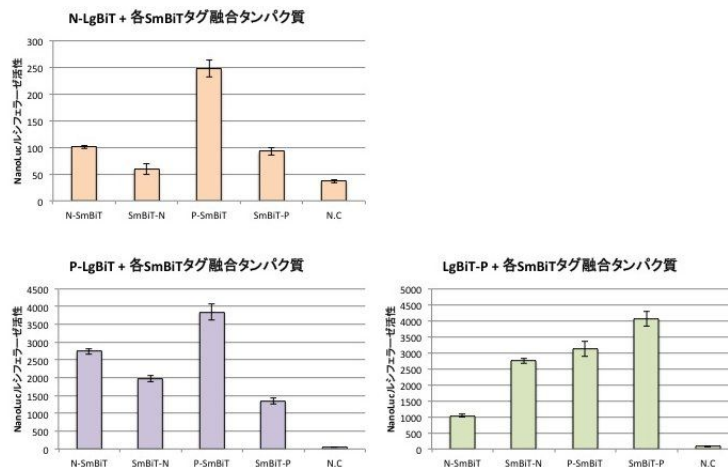


図1: Nタンパク質とPタンパク質の相互作用

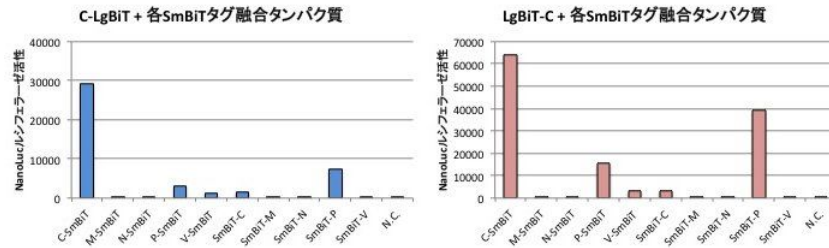


図2: Cタンパク質の相互作用

(2) 新規相互作用の確認

(1) で確認された相互作用が他の方法でも検出できるか確認するため、Strep タグを用いたアフィニティ精製による共精製を試みた。Strep タグ融合 C タンパク質と、任意の麻疹ウイルスタンパク質を 293T 細胞に共発現させ、細胞の溶解物を用いてストレプトタクチンビーズによるアフィニティ精製を行った。精製物をウエスタンブロット法により解析した結果、C タンパク質同士、および C タンパク質と P タンパク質の相互作用がこの方法でも検出できた(図3)。また、(1)の方法では検出できなかった C タンパク質と N タンパク質の相互作用が、この方法では検出できたことから、タグの影響などにより、(1)の方法で全ての相互作用が検出できるわけではないと考えられた(図3)。

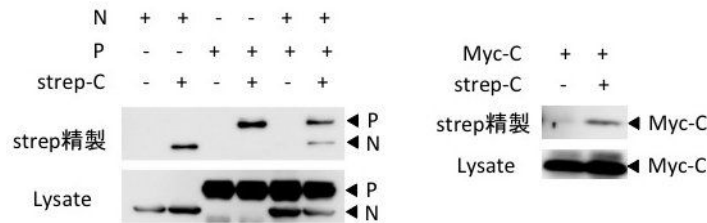


図3: Cタンパク質と共精製される麻疹ウイルスタンパク質

(3) 新規相互作用に必要な C タンパク質の領域解析

(1) で用いた NanoBiT 用 C タンパク質発現プラスミドをベースとして、末端欠損体および内部変異体を作製した。(1)と同様の方法で、変異 C タンパク質と、C タンパク質および P タンパク質の相互作用を解析したところ、両方(C-C および C-P)の相互作用ともに、C タンパク質の全長 186 アミノ酸の内、特に 43-168 番目のアミノ酸が重要であると考えられた(図4)。一方で、核移行シグナル(NLS)と考えられている 44-47 番目のアミノ酸(RKRR)を欠損させても、どちらの相互作用にも大きな影響がなかったことから、この特徴的な塩基性アミノ酸の連続は、これらの相互作用には必須ではないことが明らかとなった(図4)。

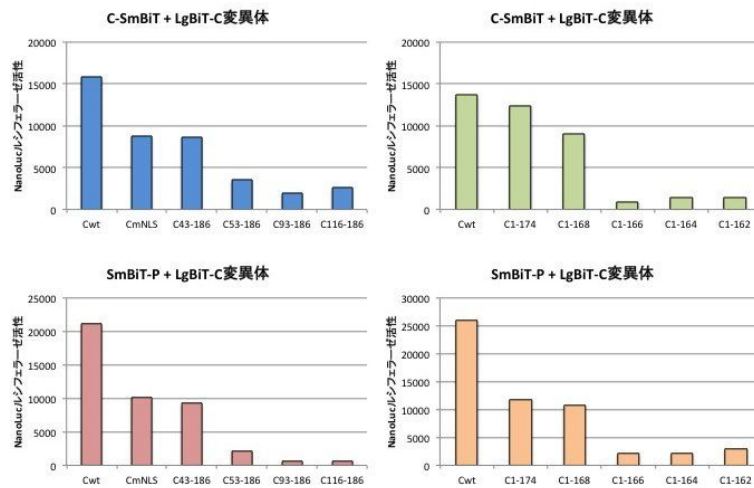


図4: Cタンパク質変異体とCおよびPタンパク質の相互作用

(4) 新規相互作用検出系の可逆性の確認

(1) で構築した N タンパク質-P タンパク質相互作用検出系に、過剰量のタグなし N タンパク質および P タンパク質を追加で共発現させた際の NanoLuc ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、N-P および P-P 相互作用とも、タグのない一方のタンパク質の発現量依存的にシグナルが減弱したことから、本相互作用検出系は可逆的であり、一度相互作用によりルシフェラ

ーゼが補完された後も、その相互作用を阻害することでルシフェラーゼ活性が消失することが明らかとなった(図5)。このことにより、将来的には麻疹ウイルス N タンパク質-P タンパク質および P タンパク質同士の相互作用を阻害し、抗麻疹ウイルス活性を持つ化合物が、大規模な化合物ライブラリーのスクリーニングにより探索可能であると考えられる。

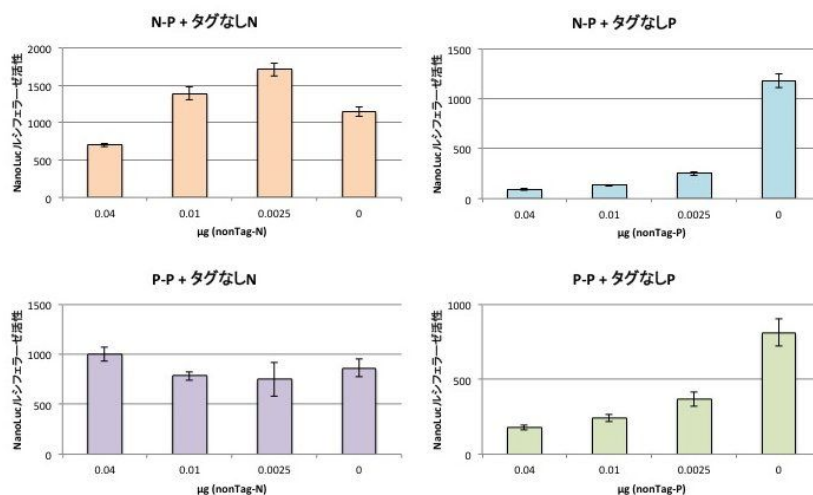


図5: タグなしタンパク質発現による相互作用の阻害

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。