

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790348  
 研究課題名 (和文) デングウイルス非構造蛋白質の標的因子同定とウイルス増殖・病態誘導時の役割の解析  
 研究課題名 (英文) Identification of the association molecule and analysis of the function of dengue virus non-structural protein.  
 研究代表者  
 田島茂 (TAJIMA SHIGERU)  
 国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官  
 研究者番号：60311346

研究成果の概要：デングウイルス感染性 cDNA クローンを用いた解析により、非構造蛋白質 NS1 に 2ヶ所存在するグリコシレーション部位の 1 つがウイルスの増殖に必須であることを明らかにした。また非構造蛋白質 NS4A の N 端の細胞質ドメインがウイルス増殖に重要な役割を果たすことを明らかにした。NS1 と相互作用する因子候補を同定したが、確定までには至っていない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000		3,300,000

研究分野：分子ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

デング感染症は熱帯地域の国々を中心に毎年数千万人の患者が発生している。にもかかわらず 4 つの血清型からなるデングウイルスは、他のフラビウイルスと異なり、単純なワクチン接種プログラムを組むことが困難とされている。またインフルエンザウイルスやヘルペスウイルス、HIV に対する抗ウイルス薬のような有効な薬剤は無い。さらにウイルスの基礎生物学も停滞しており、このことが抗ウイルス薬開発の進展を妨げている主要因の 1 つである。

## 2. 研究の目的

ほとんど解析の進んでいない非構造蛋白質に着目し、これらの蛋白質の機能解明を目指す。そのためのアプローチ法として、1) 非構造蛋白質に変異を導入した変異ウイルスの性状解析、2) プロテオミクス的手法による非構造蛋白質と相互作用する因子の同定を行なった。これらの解析により、新たな創薬ターゲットを掘り起こすことを目的とした。

## 3. 研究の方法

上記 1) については、以前に研究代表者が確立したデング 1 型ウイルスのリバースジェネティクス法を用いた。クローン化したデング

1型ウイルス cDNA に変異を導入し、これよりウイルスゲノム RNA を合成後、培養細胞にトランスフェクトし変異ウイルスの増殖を観察した。上記2)については、各非構造蛋白質を培養細胞内で発現させ、免疫沈降法により非構造蛋白質と相互作用する因子を共沈させる。供沈産物を電気泳動後に回収し、質量分析(外注)を行うことにより蛋白質の同定を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では7種の非構造蛋白質のうち、詳細な機能が不明である2種、NS1 および NS4A について解析を行なった。

①NS1 については、その重要性について議論の分かれていたグリコシレーション部位にアミノ酸置換を伴う変異をウイルスゲノムに導入し、増殖に及ぼす影響を調べた。2ヶ所ある部位のうち1ヶ所(207番目のアミノ酸)は全く影響なかったが、残りの1ヶ所(130番目のアミノ酸)に変異を導入するとウイルス産生が確認できなくなった。また野生型 NS1 発現プラスミドを130番目変異ウイルスゲノムと細胞へ共導入すると変異ウイルスゲノムの複製および感染性粒子の産生が確認できた。さらに変異型 NS1 を発現させることにより、野生型ウイルスの増殖が阻害されることを見出した。以上より、NS1 の130番目のアミノ酸がウイルス増殖に必須であることが明らかとなった(誌上発表済み)。

②NS4A については、そのN端に存在する50アミノ酸からなる細胞質ドメインがウイルスの増殖に必要であるかを調べた。はじめに、N端の10アミノ酸を除く部位欠失させたもの、およびこの部位を同じフラビウイルス属に属する日本脳炎ウイルスのものに置換した変異ウイルスゲノムを作製しウイルス粒子の産生を試みた。しかし共にウイルス粒子の産生は確認できなかった。これより細胞質ドメインがウイルス増殖に必須であること、さらにこの部位は他のフラビウイルスのものと置き換えることが不可能であることが明らかとなり、この領域がウイルス側の蛋白質と相互作用して機能することが示唆された。今後、細胞質ドメインと相互作用するウイルス側あるいは細胞側因子の同定を進めて行きたい。

(2) NS1 と相互作用する細胞側因子を同定するため、Flag ペプチド融合 NS1 発現プラスミドを培養細胞に導入後、その細胞抽出液について抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。NS1 と共に沈殿してきた因子について SDS-PAGE により展開後、相互作用候補因子を切り出し、MS 解析により蛋白質を同定した。その結果、シャペロン蛋白質類や、翻訳伸張因子、グリコシレーション反応関連因子

が同定された。特異抗体を用いて、共沈殿産物中のこれらの因子の検出をウェスタンブロット法により試みたが、試みたすべてにおいて確認が出来なかった。確認できなかった要因については不明である。

#### 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 1 件)

Tajima, S., Takasaki, T., Kurane, I.  
Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein.  
Virus Genes 36: 323-329 (2008). 査読有

[学会発表] (計 1 件)

田島茂ら  
デング1型ウイルス NS1 糖鎖付加部位変異がウイルス複製に及ぼす影響  
第55回日本ウイルス学会学術集会  
平成19年10月22日  
北海道札幌市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島茂 (TAJIMA SHIGERU)  
国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者