

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 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：2010～2012

課題番号：22791018

研究課題名（和文）Lタンパク質を標的としたパラミクソウイルス感染症治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of antiviral treatment for paramyxovirus infection that target the L protein

研究代表者

關 文緒（FUMIO SEKI）

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：20443111

研究成果の概要（和文）：Pタンパク質のアミノ酸307-336位を削除した変異体では、Pタンパク質とP変異体間およびLタンパク質とP変異体間の相互作用が減少した。この変異体を細胞内に強制発現させるとウイルス増殖が抑制された。この変異体のN末端側アミノ酸を欠損させても同様の効果が得られた。大腸菌を宿主としてLタンパク質、変異Pタンパク質を発現させた。

研究成果の概要（英文）：P protein with a deletion of amino acids between 307 and 336 (Pd307-336) decreased the interaction between P and P, and P and L protein. Expressing the Pd307-336 inhibited the virus growth. Similar effects were obtained when lacking the N-terminal amino acids of the Pd307-336. I was expressed L protein and mutant P proteins using Escherichia coli as a host.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	0	800,000
2011年度	1,200,000	0	1,200,000
2012年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	2,900,000		2,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児感染症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) パラミクソウイルス科には、乳幼児において重要なウイルス感染症の原因ウイルスが多く含まれる。例えば、RSウイルスやメタニューモウイルスによる呼吸器感染症は、乳幼児において重篤な場合があり、効果的な治療法の開発が期待されている。また、パラミクソウイルス科に属する麻疹ウイルスにおいては、有効な生ワクチンがあるものの、発症した場合は脳炎等死に至る症状を伴う危険性があり、治療法開発の必要が有る。加

えて、麻疹ウイルス感染後まれに発症する亜急性硬化性全脳炎は、難治性であり予後は極めて不良な疾患である。患者数は少ないが、根本的な治療法開発が待たれている。

パラミクソウイルスでは、Lタンパク質とその補因子として機能するPタンパク質が、ウイルスゲノムとNタンパク質からなるヌクレオカプシドを認識し、ゲノムの複製およびゲノムからの転写が行われる。このため、ウイルスゲノム複製を抑制する標的として、Lタンパク質阻害剤は、抗ウイルス薬として注

目されている。

(2) ウイルスタンパク質を標的とした医薬品開発の試みとして、ポリペプチドによる阻害薬は、医薬品という視点からみると、①化学合成技術が確立し、②すでにペプチドホルモン剤などで医薬品としての実績があるため、医薬品への応用はより容易であると推測される。また、膜透過ドメインの付加により、全身の細胞内へのペプチド導入が可能になった。この為、ウイルスタンパク質機能を阻害するペプチド配列の探索は、ウイルス感染症治療薬への応用が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究ではLタンパク質とその補因子であるPタンパク質との結合部位を解析し、当該部位の阻害によるウイルス抑制効果を明らかにする。また、Lタンパク質を標的とした薬剤スクリーニングに応用可能なLタンパク質の精製方法の構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Pタンパク質、Lタンパク質間の相互作用部位の特定(Two-hybrid法):N末端にGAL4を融合したGAL4-L(1-408)またはGAL4-PとN末端にVP16を融合したVP16-Pを作製し、GAL4プロモータ依存性にLuciferaseを発現するプラスミドとともに293T細胞に導入し、強制発現させtwo-hybrid法によりタンパク質間の結合を測定した。VP16-PにPタンパク質N末端より30-40アミノ酸を連続的に削除した変異体、またはN末端またはC末端を削除した変異体を作製し、結合部位の解析に用いた。

(2) Pタンパク質、Lタンパク質の相互作用の解析(免疫沈降法):C末端にEGFPを融合したL(1-1707)-GFPとN末端にFLAGを付加したP変異体FLAG-Pを用いて、細胞内で共発現させた後、抗GFP抗体で免疫沈降を行いP変異体が共沈するかを解析した。

(3) P変異体によるMV抑制効果の評価: MVゲノム上にLuciferase遺伝子をもつ組換えMV(MV-Luc)を用いた。哺乳類細胞にMV-Lucを感染後、N末端にFLAGタグを付加したP変異体を発現するプラスミドを導入、細胞内に強制発現させ、72時間後に細胞内のLuciferase活性を測定した。

(4) 大腸菌を宿主としたLタンパク質、変異Pタンパク質の発現: コールドショックプロテインプロモーターを有するベクターにL遺伝子を挿入し、大腸菌BL21に導入し発現させた。

(5) 発現タンパク質の粗精製: 発現タンパク質はN末端に6xHisタグを融合させ、Niレジンをを用いた。大腸菌細胞からの抽出および粗精製は、50mMリン酸バッファー(pH7.5)を用いて行った。

## 4. 研究成果

(1) N末端より連続的にアミノ酸を削除した変異体VP16-Pを作製しLタンパク質との結合活性を測定したところ、Pタンパク質のアミノ酸187-216間、367-396間、427-C末端間に結合部位が存在することがわかった(図1)。また同じ変異体を用いて、P変異体がPタンパク質との結合に与える影響を測定したところ、アミノ酸307-396間に結合部位が存在することがわかった(図2)。

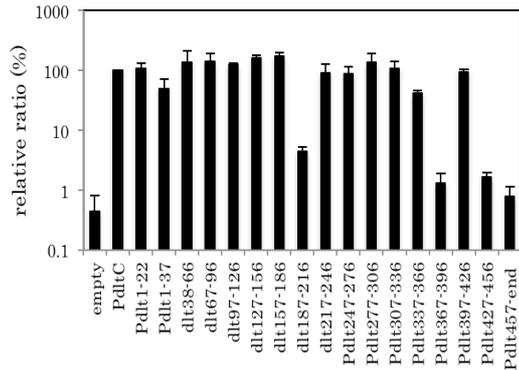


図1. Two-hybrid法によるL(1-408)とP変異体の結合部位の解析

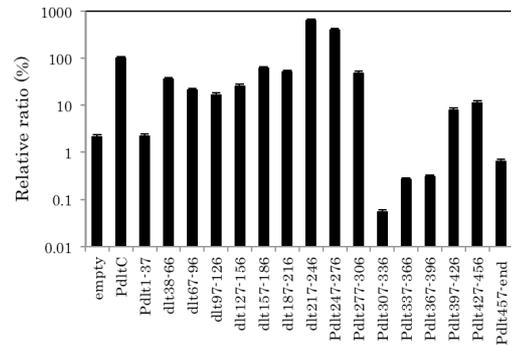


図2. Two-hybrid法によるPとP変異体の結合部位の解析

(2) (1)と同様にアミノ酸を欠如させたP変異体を用いてウイルス増殖に与える影響を解析したところ、アミノ酸307-336間欠損体ではウイルス増殖抑制効果が高いことが明らかになった(図3)。免疫沈降の結果からは



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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

該当なし

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

關 文緒 (FUMIO SEKI)

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：20443111

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし