

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460577

研究課題名(和文) デングウイルスNS4Aの細胞質ドメインに結合する分子の同定とドメインの機能解析

研究課題名(英文) Identification of small compounds which are associated with NS4A and inhibit the growth of dengue viruses.

研究代表者

田島 茂 (Tajima, Shigeru)

国立感染症研究所・その他部局等・主任研究官

研究者番号：60311346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非構造蛋白質NS4Aと相互作用し、抗 Dengue 化合物を有する化合物の探索を行った。結局 NS4A では得られなかったものの、同じ非構造蛋白質 NS1 を用いた実験で抗 Dengue 活性を有する化合物がどうていされた。本化合物 サイクロフェニル (CF) はすでに別の用途で臨床現場で使用されていたが、抗ウイルス作用を有するとの報告は無かった。CF は哺乳動物細胞での Dengue ウイルス増殖を阻害したが、蚊由来細胞では阻害効果が確認できなかった。ウイルス接種後 CF を加える試験では、CF がウイルス増殖サイクルの後期過程に作用することが示唆された。また我々は、CF に対する エスケープ変異体の分離も行った。

研究成果の概要(英文)：Dengue virus (DENV) is the etiologic agent responsible for dengue fever, dengue hemorrhagic fever, and dengue shock syndrome. The infections have emerged and continue to spread rapidly. Now no effective antiviral drugs exist to treat DENV infection and licensed vaccine is only available in a few countries. We show here that a compound cyclofenil (CF) has an inhibitory effect on growth of DENV in mammalian cells in vitro. CF exhibited antiviral activity to DENV in mammalian cells but not in mosquito cells, suggesting that CF may interact with a mammalian cell factor. Time-of-addition experiment indicates that CF may inhibit the late stage of the life-cycle of the DENV. We also succeeded in isolating CF-resistant virus, and several mutations with amino acid substitutions were identified in the mutant virus genome.

研究分野：医歯薬学

キーワード： Dengue ウイルス 抗ウイルス薬 非構造蛋白質 サイクロフェニル

1. 研究開始当初の背景

デングウイルスにより引き起こされるデング熱・デング出血熱(まとめてデング感染症)は、ウイルス媒介蚊の生息する世界中の熱帯・亜熱帯地方において年間数千万~1億人が発症していると推定され、世界で最も深刻なヒト感染症のひとつに挙げられる。デング感染症に対するワクチン候補は複数あるものの依然として実用化に至っていない。デング蔓延地域は近年拡大傾向にあり、ワクチン以外のデング感染症制圧法および治療法の開発が世界的にも急務の課題となっている。デングウイルスゲノムには10個の遺伝子がコードされているが、その中のNS4Aに関しては、ウイルス増殖に重要であるもののその作用機序においては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス増殖やインターフェロン経路活性化阻害におけるNS4A、特にその細胞質ドメインの役割・作用機序解明を目指し、NS4Aの細胞質ドメインに相互作用する低分子化合物や蛋白質性因子を探索し、そこで得られた分子を使用してNS4Aの機能解析を進める。得られた低分子化合物がデングウイルスの増殖あるいは宿主自然免疫応答活性化阻害をブロックすること、さらには化合物および因子の詳細な作用点および作用機序が明らかとなれば、この化合物が抗デング薬開発のためのシーズとなる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) デングウイルス NS4A 細胞質領域蛋白発現ベクターおよびNS1 蛋白発現ベクターを構築し、これより合成される融合蛋白質を精製した。最初に以降の各スクリーニングのプロープとして使用する NS4A 細胞質ドメイン融合蛋白質を調製した。スクリーニングを容易に進めるため、デング1型ウイルス NS4A

のN端側 51 アミノ酸からなる細胞質ドメイン(NS4A(N51))が、赤色蛍光蛋白質(mRFP)およびそれに続くFlag タグのN末端側に連結した融合蛋白質(NS4A(N51)-mRFP-Flag)発現プラスミドを構築した。NS1にはFlag タグのみ連結した。これらをヒト培養細胞293T細胞に導入し、融合蛋白質を発現させた。細胞抽出液あるいは培養上清から、抗Flag抗体が結合したアフィニティーカラムを用いて融合蛋白質を精製した。

(2) 低分子化合物アレイを用い、NS4AおよびNS1に結合する低分子化合物をスクリーニングした。精製した融合蛋白質をプローブとして化合物アレイをスクリーニングした。実際のスクリーニングは理研分子ウイルス学特別研究ユニット間ユニットリーダーにご協力頂き行った。化合物アレイは理研基幹研究所ケミカルバイオロジ-研究基盤施設で作製されたものを使用した。

(3)(2)で得られた化合物が、ウイルスの増殖に影響するかを調べた。デングウイルス感受性細胞にウイルスを感染させる際、段階希釈した化合物を添加し、その後ウイルスによる細胞変性効果および培養上清の感染性ウイルス粒子をプラーク形成法により測定した。

4. 研究成果

(1) NS4Aに結合する化合物のスクリーニングを行った。29,707化合物中ヒット化合物として9化合物がみいだされた。プラーク法によりウイルス増殖に対する効果を検討したが、いずれにおいても50uM以下で増殖抑制効果はみられなかった。

(2) NS1に結合する化合物をスクリーニングしたところ、4化合物がヒット化合物として得られた。そのうちの3種類とそれらの誘導体32種類を用いてプラーク法による増殖抑制効果を調べたところ、1種類で抑制効果

が観察され再現性も得られた。この化合物は長年排卵誘発剤として臨床使用されている薬剤サイクロフェニル(CF)であった(図1)。

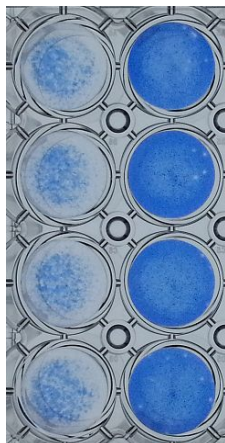


図1. プラーク法によるウイルス増殖抑制効果の確認。左列が薬剤を添加していないもので、右列が10 μ M CFを添加したもの。生細胞は青色に染まる。CF添加によりウイルス増殖が抑制され、細胞が生き残り青く染まっている。

以降 CF を使用して詳細な解析を進めた。デング1型から4型までのウイルス株を使用して抑制効果を調べた。血清型間で効果に差異があるものの、哺乳類由来培養細胞においてデングウイルスの増殖が抑制されることが明らかとなった(図2)。

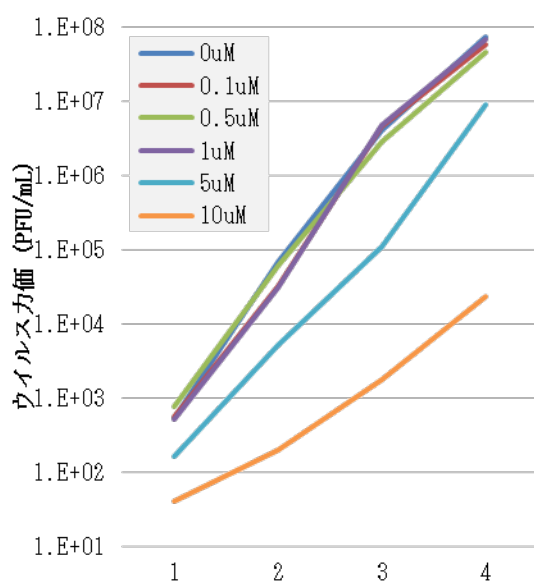


図2. CF添加によるウイルス産生量の変化。横軸はウイルス感染させてからの日数を表している。

また同じフラビウイルスである日本脳炎ウイルスに対しても抑制効果がみられた。一方C6/36細胞においては増殖抑制能を示さなかったことから、CFは宿主側因子を介して作用する可能性が示唆された。Time-of-additionアッセイにより、デングウイルス感染後18時間以上経過してからCFを添加してもウイルス粒子及び細胞内ウイルスRNAの合成が有意に抑制されないことがわかった。一方CF添加がデングウイルス感染後18時間未満の場合では、ウイルスRNA量に比べ、ウイルス粒子数の方が大きく減少していた。これらの結果より、CFはゲノム複製、およびゲノム複製より後期の過程に複合的に作用することでデングウイルスの増殖を抑制することが示唆された。CF含有培地内でデングウイルスを継代することにより、CF耐性ウイルスの分離を得ることに成功した。塩基配列を決定したところ、7ヶ所の塩基配列置換と5ヶ所のアミノ酸置換が認められた。今後耐性獲得に寄与する責任変異の同定を試みる予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

藤間大貴、佐藤洋隆、柿坂道範、加藤博文、日紫喜隆行、竹山春子、西條政幸、高崎智彦、間陽子、田島茂・サイクロフェニルのフラビウイルス増殖抑制効果。第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月22日、福岡県福岡市

〔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〕

ホームページ等

特になし

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

研究者番号：60311346

(2)研究協力者

藤間 大貴 (TOHMA, Daiki)