

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860835

研究課題名(和文)細胞膜透過機能をもたせた抗ウイルス低分子タンパク質投与によるウイルス抑制効果

研究課題名(英文) Effects of the cell penetrating peptides-fused protein on inhibition of virus replication

研究代表者

關文緒(SEKI, Fumio)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20443111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス増殖を抑制する効果をもつアミノ酸配列P336-507について、大腸菌を用いた発現系、ニッケルカラムによる精製系により、細胞膜透過ドメインを付加した精製タンパク質の作製に成功した。また、本タンパク質が細胞培地への投与で細胞内に導入されることを確認した。加えて、細胞膜透過ドメインを付加した場合のウイルス増殖抑制効果を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we detected the specific amino acid sequence, P336-507, has effect to inhibit virus replication. We succeeded in purifying the cell penetrating peptides-fused P336-507 protein by using Ni resin after expression with Escherichia coli. And after adding the cell penetrating peptides-fused P336-507 protein to the medium, the proteins existed in the cytoplasm. Then we elucidated the effects of the cell penetrating peptides-fused protein on inhibition of virus replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Pタンパク質 細胞膜透過配列 麻疹ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス科には、乳幼児および小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、パラインフルエンザウイルスによる呼吸器感染症は、乳幼児において重篤化する場合があります。また、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、麻疹ウイルス感染後に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、根本的な治療法の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であるPタンパク質からなるウイルスRNAポリメラーゼが、ウイルスゲノムの複製およびゲノムからの転写を行う。このため、ウイルスゲノム複製を直接抑制するウイルスRNAポリメラーゼ阻害物質は抗ウイルス薬として重要と考えられる。私達は、本研究に先立って、ウイルスPタンパク質のアミノ酸配列をもとにウイルスRNAポリメラーゼ阻害機能をもつアミノ酸配列を同定し、この分子が細胞内発現系によりウイルス増殖を抑制することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

細胞は脂質二重膜からなっており、通常のタンパク質は細胞外から細胞内へ侵入できない。細胞膜透過ペプチドは、細胞膜透過機能をもつアミノ酸配列であり、この配列を融合したタンパク質を細胞内へ導入する機能を持つ。本研究では、ウイルスポリメラーゼタンパク質機能を阻害する低分子タンパク質に、細胞への導入機能をもつ細胞膜透過ドメインを付加することで、細胞内への導入が可能になるか、またウイルス増殖を抑制するかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

ウイルスモデルとして麻疹ウイルスを用いた。麻疹ウイルスポリメラーゼであるLタンパク質機能を阻害する低分子タンパク質のモデルとして麻疹ウイルスのPタンパク質由来の低分子を用いた。研究試料として、P336に細胞膜透過ドメインを付加した精製タンパク質が必要であるため、大腸菌を用いた発現系と精製系の構築を行う。精製したタンパク質を用いて、細胞内導入を評価するとともに、ウイルス増殖に対する影響を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸菌発現系と精製系の構築

先行する研究において麻疹ウイルスの増殖抑制効果が明らかであった低分子タンパク質(P336-507)を用いて、大腸菌におけるタンパク質発現系の検討を行った。P336-507は麻疹ウイルス由来であるためヒト細胞のコドンに適応している。このため目的のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を大腸菌のコドンに適応させた人工合成遺伝子を作製した。大腸菌発現用プラスミドとしてpET(Invitrogen)およびpCold(TAKARA)を用いて発現を検討したところ、大腸菌コドン適応後の配列では共に十分な発現が確認された。

次に細胞膜透過機能を持つ配列をP336-507に付加して、大腸菌内での発現を検討した。ヒト免疫不全ウイルス1型のTATタンパク質由来アミノ酸(GRKKRRQRRPPQ)、ポリアルギニン(RRRRRRR)をリンカー配列(GSGS)でP336-507のN末端側に付加した。大腸菌発現プラスミドとしてpColdを用いて発現を検討したところ、ポリアルギニンを付加した場合は発現が認められたが、TAT由来配列を付加した場合は発現が認められなかった。このため、発現タンパク質が得られたポリアルギニン付加P336-507について精製方法を検討した。

精製用にN末端側に6×Hisタグ配列およびFLAGタグを付加し、(6×His)-FLAG-(polyArg)-(P336-507)の配列で構成した。大腸菌で発現後、ニッケルカラムを用いて精製することに成功した(図1)。

#### (図1)

目的タンパク質、6His-FLAG-9Arg-P336-507の発現(クマシー染色)

lane 1, 12: マーカー

lane 9~11: 目的タンパク質の抽出(矢印)

lane 13: 細胞抽出液



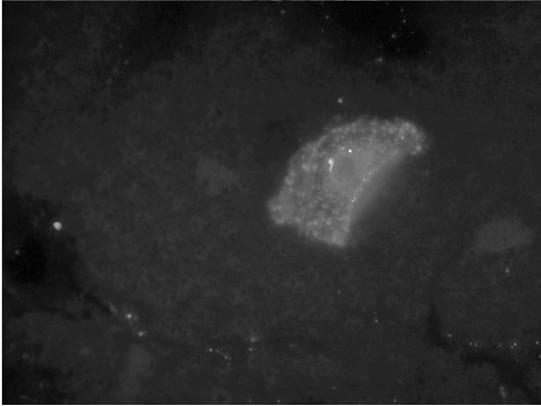
### (2) 精製タンパク質の細胞内への導入評価

精製したタンパク質をアミコンカラムで濃縮および溶液交換を行った後に、培養細胞

に添加して細胞内への導入効率の解析を行った。細胞固定後、FLAG に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、細胞内への導入が確認できた(図 2)。

(図 2)

Vero 細胞添加 4 時間後の抗 FLAG 抗体による免疫染色。



### (3) 精製タンパク質のウイルス増殖に与える影響

Luciferase を発現する組換え麻疹ウイルス (Luci-1C/H(481,546)) を 293T 細胞に  $moi=0.1$  で感染の 1 時間後に精製タンパク質  $5\mu\text{g/ml}$  で培養し、細胞内のウイルス増殖に与える影響を解析した。感染 2 日後に Luciferase 活性を測定したところ精製タンパク質の添加による変化が認められなかった。原因として、1) 細胞導入されたタンパク質が少量であった可能性、2) 付加した細胞膜透過配列が P336-507 に影響した可能性が考えられた。

付加した細胞膜透過配列が P336-507 に影響した可能性について検討を行った。293T 細胞を用いた細胞内発現系で解析を行ったところ、細胞内発現系においても細胞膜透過配列 (poly Arg) を付加した場合はウイルス増殖を抑制しなかった。P336-507 の N 末端側への細胞膜透過配列の付与は、本低分子と麻疹ウイルスポリメラーゼとの相互作用に影響することが明らかになった。

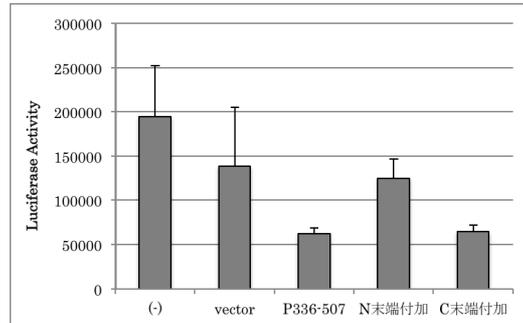
N 末端側に付加した細胞膜透過配列により P336-507 のウイルス増殖抑制効果が失われたため、本アミノ酸配列の C 末端側への配列付加を試みた。また、配列をつなぐリンカーについて、高い可動性を期待してプロリンへ変更した (Pro-pro-pro-pro)。

麻疹ウイルス P タンパク質においてはアミノ酸配列の C 末端側に重要な機能ドメインが存在するため、タグ等は通常 N 末端側に付加されることが多い。しかしながら、poly Arg を N 末端側または C 末端側に付加した

P336-507 のウイルス増殖抑制効果を細胞内発現系で測定したところ C 末端側に付加した場合はウイルス増殖を抑制する効果が認められた。このため、P336-507 の麻疹ウイルスポリメラーゼに対する阻害効果は麻疹ウイルス P タンパク質の C 末端側機能ドメインの働きには依存していないことが推測される。

(図 3)

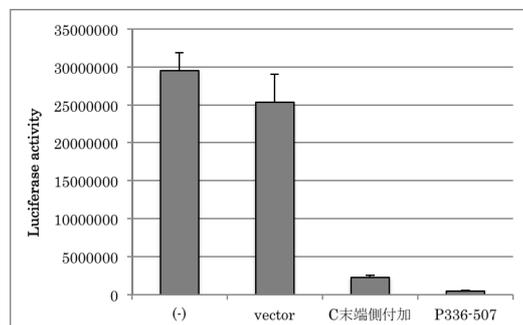
poly Arg の N 末端付加 P336-507 と C 末端付加 P336-507 発現による麻疹ウイルス増殖抑制効果の比較。



C 末端側に poly Arg を付加することで、細胞膜透過機能とウイルス増殖抑制機能をもつタンパク質が作製できたため、C 末端側 poly Arg 付加 P336-507 (P336-507-polyR) について培養細胞をもちいてさらに解析を行った。培養細胞へのウイルス感染量を変えて解析したところ、ウイルス感染後、ウイルス増殖が緩やかな場合は P336-507 と同様の効果が認められるが、ウイルス量が多く、感染拡大が速い場合は P336-507 よりその効果が低いことが明らかになった (図 4)。

(図 4)

Luciferase 発現麻疹ウイルスを  $moi=1$  で感染した場合の P336-507 と P336-507-polyR の比較。



次に本タンパク質 P336-507-polyR を大腸菌で発現させ、精製タンパク質を作製した。麻疹ウイルス感染細胞を精製タンパク質 5 μg/ml で培養したところ、明らかなウイ抑制効果が認められなかった。

以上の結果より P336-507 は C 末端側に Poly-Arg を付加することで細胞膜透過機能を付与でき、麻疹ウイルス増殖を抑制する効果を維持できた。精製タンパク質添加によるウイルス抑制効果は確認できなかったが、細胞内発現系ではウイルス抑制効果が認められているため、細胞内への導入効率の改良により抗ウイルス効果が期待できる。

#### 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 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

關 文緒 (SEKI, Fumio)

国立感染症研究所・ウイルス第三部第一室・主任研究官

研究者番号： 20443111

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：