

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07582

研究課題名(和文) ウイルス複製タンパク質の構造解明と複製阻害薬剤の開発

研究課題名(英文) Structural elucidation of viral replication proteins and development of replication inhibitors

研究代表者

加藤 悦子 (Kato, Etsuko)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：00355752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、トマトモザイクウイルス(ToMV)の複製タンパク質130K等を研究対象として、ウイルスの複製機構の解明および新規抗ウイルス薬候補の探索を目指して研究を進めた。その結果、130Kについて、クライオ電顕による構造を決定した。X線溶液散乱による外形構造の決定およびsiRNAとの結合活性を評価した。豚コロナウイルスのヘリカーゼ(Hel)について結晶構造を決定するとともに、ベネズエラ馬脳炎ウイルスのHelとRNAとの複合体について構造解析に成功した(精密化中)。ToMVのHelについて19F NMRによるフラグメントスクリーニングを行い、シード化合物を選抜した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラス鎖RNAウイルスが共通に持つヘリカーゼドメインとメチルトランスドメインを含むToMVの130Kの構造は、プラス鎖RNAウイルス全般の複製機構の解明に重要な知見を与えた。130KはRNAサイレンシングにも関与しており、ウイルス複製タンパク質のsiRNA認識機構を明らかにすることができた。また、本研究では19F NMRを用いたフラグメントスクリーニングによる抗ウイルス薬の探索を開始するとともに、他のプラス鎖RNAウイルスについても複製タンパク質の構造を解明した。本研究の成果は、抗ウイルス薬開発に重要な基盤であり、将来の抗ウイルス対策に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：In this project, we conducted research on Tomato mosaic virus (ToMV) replication protein 130K and other proteins to elucidate the virus replication mechanism and to search for new antiviral drug candidates. As a result, i) we determined the structure of 130K by cryo-EM, ii) the external structure of 130K was analyzed by solution X-ray scattering, and the binding activity of 130K to siRNA was evaluated, iii) the crystal structure of Hel of porcine coronavirus and of Hel complexed with RNA of Venezuelan equine encephalitis virus were successfully determined, and iv) fragment screening of ToMV Hel using by 19F NMR was conducted to select seed compounds.

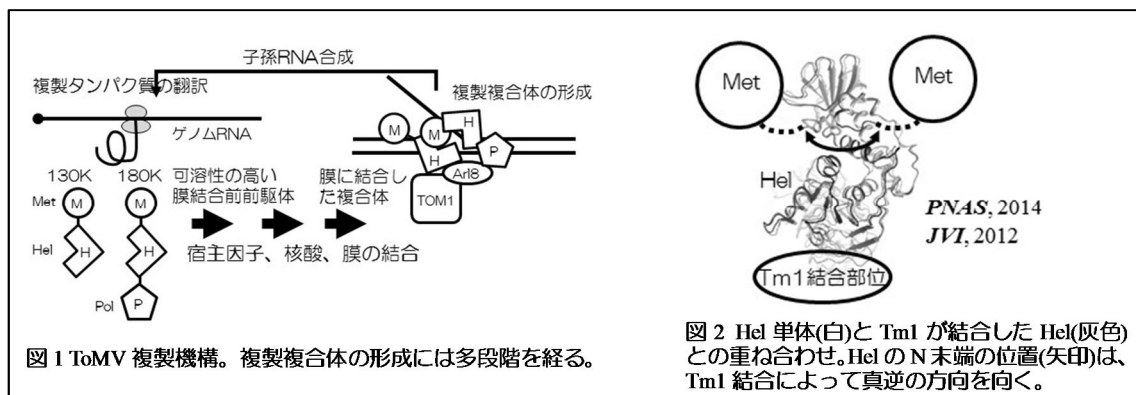
研究分野：タンパク質科学

キーワード：ウイルス複製タンパク質 立体構造 抗ウイルス薬

## 1. 研究開始当初の背景

プラス鎖 RNA ウイルスは、C 型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、SARS コロナウイルス、デングウイルスなど我々人類の脅威となる多くの動物ウイルスと、農作物に多大な影響を与える大多数の植物ウイルスを含む最大のウイルスグループである。しかし、ゲノム複製は生体膜が関与する多段階の複雑な過程を経て起こるため解析が困難で、その分子機構の理解は進んでいなかった。また、複製に関与するタンパク質(以後複製タンパク質)は構造を変化させ機能を獲得すると考えられており、実際に柔軟性が高く結晶化が難しい場合が多い。そのため三次元構造の解析も困難を極め、その解明は遅れていた。

プラス鎖 RNA ウイルスの複製タンパク質の多くには、メチルトランスフェラーゼ(Met)、ヘリカーゼ(Hel)、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(Pol)ドメインが共通に存在している。これらは協調して複製に関与していると考えられるが、それぞれのドメインがどのように複製に関与するかは



不明な点が多かった。多くの動物ウイルスがコードする複製タンパク質は、前駆体タンパク質として翻訳後プロセッシングされること、他のドメインも存在していることからより系が複雑である。一方、植物ウイルス、例えば古くからプラス鎖 RNA ウイルスのモデルとして研究されているタバコモザイクウイルスと近縁のトマトモザイクウイルス(ToMV)では、非構造タンパク質のうち複製タンパク質がこれら3種類のドメインのみにより構成されており、しかもそれらが1本鎖として機能している(図1: Met と Hel ドメインからなる 130K と翻訳リードスルー産物である Pol ドメインを含む 180K の2種類が存在)ことから、各ドメインの相互作用や構造変換に関する研究を進めるには良いモデルであった。我々は、ウイルスの複製機構を分子レベルで解明する目的で ToMV の複製タンパク質の構造機能研究を進め、当該タンパク質の Hel の構造を決定した(*J. Virol.* 2012; *Acta Cryst.* 2011)。これはウイルスがコードするスーパーファミリー 1Hel として世界で初めての構造決定となった。つづいて Hel ドメインと宿主であるトマトの阻害因子 Tm1 との複合体の X 線構造解析にも成功した(*PNAS*, 2014)。これらの研究から、Hel の宿主因子(TOM1, ARL8)との相互作用部位、Hel-Tm1 の共進化分子機構等を明らかにするなど、構造を基盤とした研究成果の蓄積を進めてきた。

また、ウイルスは人類にとって大きな脅威であり、抗ウイルス薬の開発は急務である。我々は、ToMV-Hel の構造をターゲットとし *in silico* スクリーニングを行い、ToMV 複製を阻害するシード化合物を見出すことに成功した。これらは類似の Hel 構造を持つと推測されるコロナウイルスや E 型肝炎ウイルスの複製も阻害した(特願 2014-122881)。この結果は、共通ドメインの構造をベースとして見出した薬剤の有効性を示すものである。

以上のように、ウイルスの複製機構を解明するためにも、新規抗ウイルス薬開発を進めるためにも、複製タンパク質の構造を解明することが重要であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的を以下に示す。

(1) トマトモザイクウイルス (ToMV) および他のプラス鎖 RNA ウイルスの複製タンパク質について種々の複合体構造を明らかにする。

(2) ToMV-HeI の構造を基盤情報として我々がすでに見出した複製阻害化合物と標的タンパク質との複合体構造から作用機構を明らかにする。また、これら薬剤との複合体構造と  $^{19}\text{F}$  NMR によるフラグメントスクリーニング手法による結果を併用し、より高活性な化合物を選抜する。

の構造情報を基に、新規標的部位を見出し選抜した化合物の最適化を進め、新たな抗ウイルス薬開発につなげる。

## 3. 研究の方法

### (1) ウイルス複製タンパク質の構造決定

ToMV 130K は、プラス鎖 RNA ウイルスに共通に保存されている HeI および Met ドメインをコードしている。カイコ発現系により発現・精製した ToMV 130K 全長および各種複合体 (核酸、ヌクレオチド、複製阻害化合物等) について結晶化を検討した。しかし、結晶が得られなかったため、予定を変更しクライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析を行った。豚コロナウイルスおよびベネズエラウマ脳炎ウイルスの HeI ドメインについては、定法により結晶構造解析を行った。

### (2) 複製阻害化合物の探索

ToMV の HeI ドメインを標的とした  $^{19}\text{F}$  NMR によるフラグメントスクリーニングを行った。 $^{19}\text{F}$  NMR によるフラグメントスクリーニングは、本研究期間において手法の確立と検証を行ってきた実績がある技術 (*Bioorg. Med. Chem.* 2018; *J. Med. Chem.* 2021) を、本研究に適用した。

## 4. 研究成果

(1) 130K について、クライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。130K 単体については、良好なデータが得られず (研究成果 (2) を参照) 130K/ATP $\gamma$ S および 130K/ATP $\gamma$ S/siRNA との複合体について解析を行った。解析の結果、130K は二量体を形成しており、siRNA は、130K のそれ

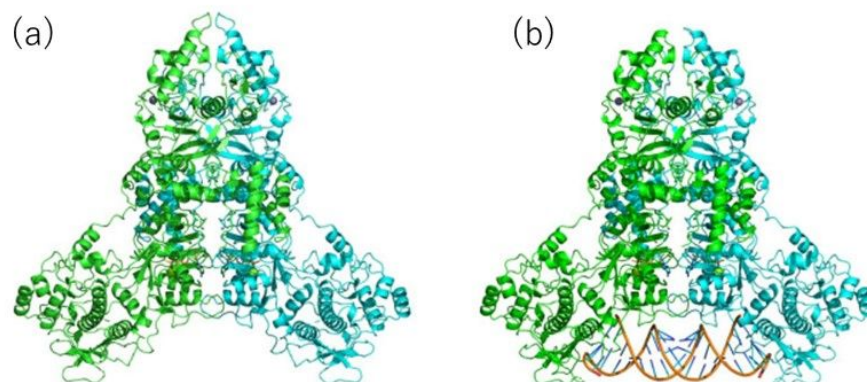


図3 130K/ATP $\gamma$ S (a)および130K/ATP $\gamma$ S/siRNA (b)のクライオ電顕構造

それぞれのヘリカーゼドメインにより認識されていることが分かった(図3)。

(2) 線溶液散乱(SAXS)による外形構造の決定およびsiRNAとの結合活性を評価した。SEC/SAXSの結果、単体の130Kは不安定であり会合しやすいことが分かった。実際に、電顕による観察で良好な分散を示さなかったため、クライオ電顕による解析ができなかった。130K/ATP $\gamma$ S および130K/ATP $\gamma$ S/siRNAは、SAXSの結果、単分散で存在していること、両者は二量体を形成していることが明らかとなった。この結果は構造解析の結果と一致していた。また、130KとsiRNAの結合活性の結果、20または21残基のsiRNAとの結合が強いことが分かった(図4)。

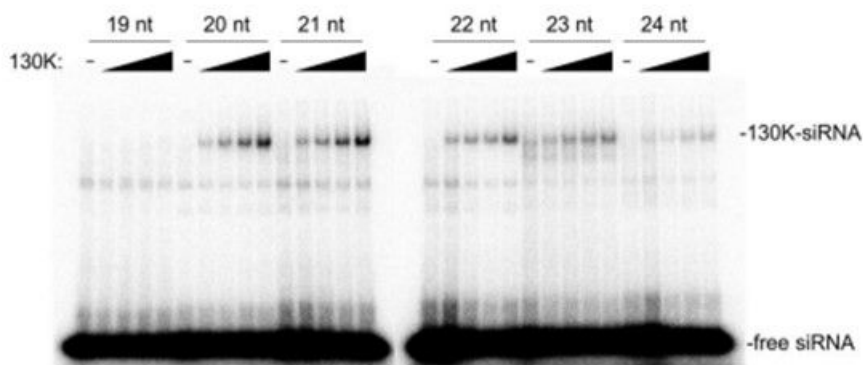


図4 130K/ATP $\gamma$ S と各種siRNA の結合活性

(3) 豚コロナウイルス HeI ドメインについて結晶構造を決定するとともに、ベネズエラウマ脳炎ウイルス HeI ドメインとRNAとの複合体(精密化中)について構造解析を行った。

(4) ToMV-HeI を対象として $^{19}\text{F}$  NMRによるフラグメントスクリーニングを行った(図5)。その結果、信号の減衰率が20%以上のフラグメント化合物を14個選抜することができた。今後、この化合物を基に構造展開を行う予定である。

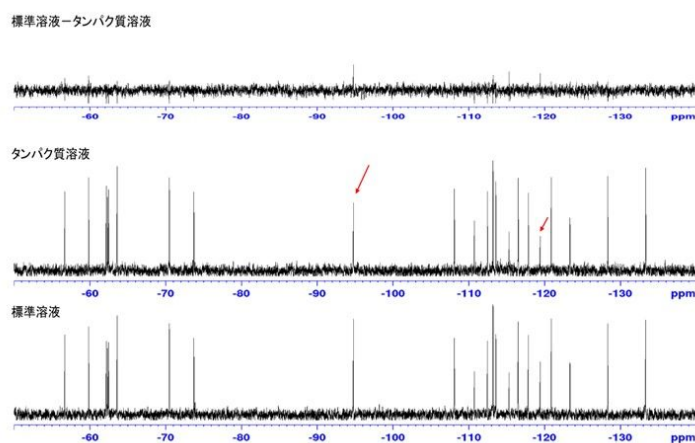


図5 ToMV-HeIを標的とした $^{19}\text{F}$  NMRによるフラグメントスクリーニングの結果(一例) 減衰率20%以上のヒットフラグメントを赤い矢印で示した。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松村 浩由  (Matsumura Hiroyoshi)  (30324809)	立命館大学・生命科学部・教授    (34315)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関