

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20570115

研究課題名（和文）

SARSコロナウイルス3CLプロテアーゼの自己活性化機構の解明

研究課題名（英文） Autoprocessing mechanism of SARS-CoV 3CL protease

研究代表者

村松 知成 (MURAMATSU TOMONARI)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・上級研究員

研究者番号： 70212256

研究成果の概要（和文）：

SARSコロナウイルスの3CLプロテアーゼは巨大なポリタンパク質の一部として合成され、自身のプロテアーゼ活性により切り出されてくるが、一方、このN末端の正確な切断がプロテアーゼ活性に必須であるとされている。これに対し、無細胞タンパク質合成系を用い、プロ体にもプロテアーゼ活性が存在するが、その基質特異性は成熟型酵素のものとは異なることを明らかにした。X線構造解析により、この特殊な認識に関与する基質ポケットも見いだした。

研究成果の概要（英文）：

3C like protease (3CL^{Pro}) of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is synthesized as a part of polyprotein, and is excised by its own proteolytic activity. It has been previously reported that the precise processing of N-terminus of 3CL^{Pro} is required for efficient peptidase activity toward the fluorogenic peptide substrate. However, by the use of an *E. coli in vitro* protein synthesis system, we found that the C-terminal site of 3CL^{Pro} was efficiently cleaved even though N-terminal pro-sequence was not removed. Moreover, the substrate specificity of this autoprocessing activity was different from that of the mature enzyme. We also found the pocket for this special recognition by X-ray crystallography.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：SARS、プロテアーゼ、プロセシング、基質認識、基質特異性、立体構造

1. 研究開始当初の背景

SARS コロナウイルスや HIV などの RNA ウイルスでは、ウイルスの増殖に関与する酵素群が大きな前駆体タンパク質（ポリタンパク質）として合成された後、それぞれの酵素が切り出されてくることが知られている。この際、ポリタンパク質からの各酵素の切り出しを行う酵素は、それらのウイルスに特異的なプロテアーゼであり、これ自身もポリタンパク質の内部に組み込まれている。SARS コロナウイルスでは、合成される 790 kDa あるいは 486 kDa の巨大なポリタンパク質内に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(レプリカーゼ)、プロテアーゼ(2 種)、ヘリカーゼ、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、などの酵素群が含まれており、この中に含まれている 2 種のプロテアーゼ(PL2, 3CL)によって、それらは切り出された後、適切な立体構造形成(フォールディング)がなされ、それぞれの機能をもつ酵素タンパク質となると考えられている(790 kDa ポリタンパク質と 486 kDa ポリタンパク質は同一の領域にコードされているが、そのコード領域内に翻訳終止コドンが存在し、そこでタンパク質合成停止したものが 486 kDa のポリタンパク質、リボソームのフレームシフト反応によりその終止コドンが回避されたものが 790 kDa のタンパク質となる)。

ここで、ウイルスの感染・増殖の過程を考えると、1 つの論理的矛盾点が浮かび上がってくる。ウイルスの増殖(増幅)に必要な酵素群の機能発現にはウイルスのプロテアーゼ活性によるポリタンパク質のプロセシングが不可欠である。ところが、このプロテアーゼもウイルスのポリタンパク質に含まれているために、それが活性を持つ成熟体となるには、成熟型のプロテアーゼが必要となるが、ウイルス未感染細胞に初めてウイルスが感染したときには、この最初に必要な成熟型プロテアーゼは「存在しない」はずである。もちろん、最初の 1 つの成熟型のプロテアーゼ分子が生じれば、それがポリタンパク質に作用し、プロテアーゼの切り出しが行われ、それがさらに他のポリタンパク質に作用するという連鎖反応により、次々と成熟型のプロテアーゼが生産されることになるが、問題と

なるのは最初の 1 つめの切り出し反応である。

SARS コロナウイルスのポリタンパク質から各酵素群を切り出してくるプロテアーゼのうち主要な反応をするもの 3CL プロテアーゼであり、これについては、その N 末端のプロセシングがプロテアーゼ活性に重要であり、正確なプロセシングを受けてないものはほとんど活性がないとされていた。

2. 研究の目的

本研究は、ポリタンパク質中の SARS コロナウイルス 3CL プロテアーゼ前駆体が自分自身を切り出す(自己プロセシング)のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ポリタンパク質中の 3CL プロテアーゼ領域が自己プロセシングによって切り出されてくる反応のモデル系を作製する。これには大腸菌の無細胞タンパク質合成系を用い、3CL プロテアーゼ領域の前後 10 アミノ酸残基を伴う領域を、ベクター由来の S タンパク質と His タグがそれぞれ N 末端側上流、C 末端側下流に伴う形で合成し、これを前駆体(ポリタンパク質)モデル系とする(S タグ-N 末端プロ配列 10 残基-3CL プロテアーゼ-C 末端プロ配列 10 残基-His タグ)。これにより、自己プロセシングが生じることを確認する。3CL プロテアーゼの活性残基 Cys145 を Ala に変換した変異体を対照実験として用いる。

(2)(1)の方法を大容量化し、成熟型で活性残基が野生型の SARS コロナウイルス 3CL プロテアーゼを大量に得、精製、結晶化し、X 線結晶構造解析を行う。

また、活性残基 Cys145 を Ala に置換した不活性型の 3CL プロテアーゼについて 10 アミノ酸残基のプロ配列をとまなう形で大腸菌で発現させ、同様に精製、結晶化し、X 線結晶構造解析を行う。

(3)(1)の大腸菌無細胞タンパク質合成系での発現により自己プロセシング活性が観察されることを確認したのち、自己プロセシングにより切断される部位付近のアミノ酸置換体を作製する。その変異による活性の変化を調べ、自己プロセシング反応における基質特異性を明らかにする。

4. 研究成果

前駆体タンパク質における自己プロセッシング活性の存在

上記 3CL プロテアーゼ前駆体モデル系を大腸菌無細胞タンパク質合成系で発現したところ、合成とともに N 末端、C 末端両側において自己プロセッシングが起き、成熟型酵素が生じた。

この 3CL プロテアーゼでは基質として P1 部位に Gln のみが許容される(最近の研究では Met, His も許容される)。C 末端側の切断部位の P1 部位の Gln を Asn に変換すると、C 末端側の切断反応は起こらなくなったが、N 末端側の切断は起こった。

さらに、興味深いことに、N 末端側切断部位の P1 部位を Gln から Asn に変換し、N 末端プロセッシングが起こらなくても、C 末端のプロセッシングは効率よく起きた。従来 N 末端側の正確な形成がプロテアーゼ活性に必須であるとされており、われわれも N 末端に 4 アミノ酸残基のベクター由来の配列を付加するとペプチド基質に対する活性が 1/150 に低下することを確認している。ところが、この成熟型領域の N 末端上流に 10 アミノ酸残基のプロ配列、さらにその上流にベクター由来の S タンパク質 33 アミノ酸残基を伴う形で発現したものには、自己プロセッシング活性は十分に存在することを示している。

成熟型 3CL プロテアーゼの構造

上記方法を大容量化し、大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いて、「S タグ-N 末端プロ配列 10 残基-3CL プロテアーゼ C 末端プロ配列 10 残基-His タグ」を発現させると、N 末端側、C 末端側両方が自己プロセスされ、成熟型の 3CL プロテアーゼが得られた。これをカラムクロマトグラフィーで精製した。N 末端アミノ酸配列分析と質量分析により、得られたタンパク質の N 末端が正しくプロセスされた成熟型の酵素と全く同じであることを確認した。これを、結晶化し、X 線構造解析をおこなった。

我々の構造ではすべてのアミノ酸に対応する電子密度が見られた。SARS コロナウイルス 3CL プロテアーゼは同一サブユニットの二量体である。我々の構造では 2 つのプロトマーは結晶学的には同値ではなかったが、回転対称の位置にあり、ほぼ同じ構造をしていた。また、以前に報告された N 末端に 5 アミノ酸残基のベクター由来のアミノ酸残基が付加されたものの構造では、活性部位のオキシアニオンホールが保持されているものは 2 つのプロトマーのうち 1 つのみであったが、我々の構造では両プロトマーともにオキシアニオンホールは保持されており、したがって活性も保持されていると考えられた。

我々の構造において 2 つのプロトマーはほぼ同一の構造をしており、その差異は 2 カ

所のみで、1 つは C 末端 7 アミノ酸残基、2 つめはタンパク質内に存在する 7 アミノ酸残基の領域であった。これらの 2 つの領域はフレキシブルな構造をとっていると考えられる。

3CL プロテアーゼ前駆体の構造

次にオートプロセッシングのメカニズムを明らかにするために、プロ体の構造解析を試みた。

まず、プロテアーゼ活性残基 Cys145 を Ala に置換し、N 末端側に 10 アミノ酸残基のプロ配列を付加したもの、C 末端側に 10 残基のプロ配列を付加したもの、そして両方とも付加したものを大腸菌内で発現し、精製し、結晶化を試みた。このうち、C 末端に 10 アミノ酸残基のプロ配列を付加したものについて結晶を得ることに成功し、X 線結晶構造解析を行った。

C 末端プロ配列は隣りの非対称単位に存在するプロテアーゼ分子の基質認識部位に結合していた。成熟型の酵素については、C 末端ペプチドが、隣の非対称単位の子の活性部位に結合したのもすでに報告されており、product bound form であると考えられている。我々の構造は切断箇所よりもさらに下流のアミノ酸残基も含んでおり、substrate bound form としての初めてのものとなる。成熟型 3CL プロテアーゼでは基質特異性は P4、P3、P2、P1、P1' に存在することが報告されているが、これらの 5 カ所の認識が我々の構造から説明できる。とくに、P1' 部位の認識に関しては全く初めての知見となる。また、P2' 部位には特異性が存在しないことが報告されているが、その P2' 部位のアミノ酸残基の側鎖は酵素分子から外側に向いていることもわかった。

不思議なことに、P3' の側鎖に対する酵素側のポケット(S3'ポケット)が存在した。これまでのペプチド基質を用いた解析では 3CL プロテアーゼ(成熟型)では P3' 部位には全く特異性が認められなかったからである。さらにこのポケットの一部は上記のタンパク質内に存在する 7 アミノ酸残基からなるフレキシブルな領域であった。このことから、この構造は自己プロセッシング特異的なものである可能性が示唆された。

自己プロセッシング活性における基質特異性

無細胞タンパク質合成系を用いた活性測定において、P3' 部位の自己プロセッシングに対する影響を調べた。N 末端プロセス部位の P1 部位変異体(Gln→Asn)で N 末端がプロセスされなくなっているものについて、C 末端側の P3' 部位を変異させると(Phe→Ala,Asn)、C 末端側部位の切断活性が失われるが、N 末端側切断箇所が野生型のものについては同じ変異によって C 末端側切断箇所に対する切断活性は失われなかった。

N 末端側の正確なプロセッシングが通常のプロテアーゼ基質の切断活性に必要であることと、成熟型の C 末端ペプチドがフレキシブルであることから C 末端のプロセッシングは活性/特異性に影響しないであろうと考え、次のように推論した。

(i) N末端のプロセッシングを受けた3CLプロテアーゼは「通常のプロテアーゼ活性」、すなわち、成熟型の3CLプロテアーゼがポリタンパク質から各種非構造タンパク質(3CLプロテアーゼも含む)を切り出してくる活性を持つ。N末端がプロセッシングを受けないプロ体は通常のプロテアーゼ活性は持たないが、ポリタンパク質中の3CLプロテアーゼのN末端ならびにC末端のプロセッシングのみを行う(自己プロセッシング活性)

(ii) 「通常のプロテアーゼ活性」、「自己プロセッシング活性」とともにP1部位の特異性(Gln)は保持されているが、P3'部位に関しては「通常のプロテアーゼ活性」には特異性はなく、「自己プロセッシング活性」ではPheを要求する。

(iii) N末端側P1部位変異体ではN末端のプロセッシングがおこらず、「自己プロセッシング活性」のみがあらわれ、C末端切断反応に関してP3'特異性がみられるが、N末端側P1部位が野生型のものに関してはN末端側のプロセッシングが行われるために「通常のプロテアーゼ活性」があり、P3'部位の特異性はない。

本研究により、SARSコロナウイルスのポリタンパク質中に含まれる3CLプロテアーゼ領域は、プロセスされていない状態では、成熟型のもつ通常のプロテアーゼ活性は持たないが、自己のアミノ末端側およびカルボキシル末端側のプロセッシングにのみ特化した特殊な活性を持ち、その基質特異性は成熟型の酵素で見られる活性における特異性とは異なっていることが明らかとなった。

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)

① “The effect of Mutations in the Carboxyl-Terminal Region on the Catalytic Activity of Escherichia coli Signal Peptidase I”
Kim, Y.-T., Yoshida, H., Kojima, M., Kurita, R., Nishii, W., Muramatsu, T., Ito, H., Park S.-J., and Takahashi, K.

J. Biochem 143, 237-242, 2008 査読あり

[学会発表] (計0件)

[図書] (計1件)

①「レトロウイルスのがん遺伝子は細胞起源」

村松知成

ノーベル賞の生命科学入門 RNAが拓く新世界
菊池洋 編、講談社、第4章(pp.64-83), 2009

[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]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村松 知成 (MURAMATSU TOMONARI)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・上級研究員

70212256

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者