

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06872

研究課題名(和文) FRETシステムを用いた多検体解析系の構築とウイルス重合タンパク質阻害剤の探索

研究課題名(英文) Construction of Multiple Sample Analysis System Using FRET System and Search for Inhibitors of Virus Polymerization Proteins

研究代表者

上 大介 (Kami, Daisuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：80415588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：RNAウイルスSARS-CoV-2は世界中で流行し、治療薬の開発競争が激化している。このゲノムRNAはN proteinと結合、さらにN protein同士で重合することで細胞内で安定化する。本研究はFRETシステムを用いてこの重合を測定しようと試みたが、EGFPを活用したより安定した観察・測定できる系を構築し、アルカロイド系低分子化合物の評価系の構築に成功し、3種のN protein重合阻害剤の探索に成功した。N-proteinの重合阻害はウイルス合成阻害となりえるためこれらの結果と解析システムの構築はN proteinをもつ数多くのウイルスに対する新たな治療薬開発の先駆的な手法となりえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAウイルスSARS-CoV-2の流行は世の中に対して感染症の恐ろしさと一般社会生活の脆さを示し、世界に大きな変革を与えた。この研究は感染症に対する対抗策としてRNAワクチンとは異なる手法を模索する上で重要な役割を果たしており、今後、新たな感染症が発生した場合に対抗手段として検討に値する研究成果である。また、健康寿命の延長という意味でも感染症対策は今後も重要である。

研究成果の概要(英文)：The SARS-CoV-2 RNA virus has caused a global pandemic and competition to develop therapeutics has intensified. Most therapeutic drug targets are viral surface antigens or RNA polymerases, and there are no reports of therapeutic drug development aimed at eliminating increased viral genomic RNA in cells. Genomic RNA is stabilized intracellularly by binding to nucleocapsid protein (N-protein) and further polymerization between N-proteins. Polymerization of N-protein is inhibited by inhibition of viral synthesis, and inhibition of N-protein polymerization is also inhibited by inhibition of viral synthesis. These results and the construction of an analytical system may be a pioneering method for the development of new therapeutic agents against many viruses with N-proteins.

研究分野：RNA metabolism

キーワード：RNA metabolism FAPS ウイルス由来重合タンパク質 Cellular transition 多検体解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA ウイルス SARS-CoV-2 は世界中で大流行し、治療薬の開発競争が激化している。ウイルスゲノム RNA は N protein と結合、さらに N protein 同士で重合することで、細胞内で安定化する。本研究はウイルス N protein の重合を阻害する低分子化合物をハイスループットシステムにて探索し、重合阻害の有効性を *vitro* にて証明することを目的としている。そこで我々は FRET とイメージングサイトメータを用いたシステムを設計・構築した。このシステムを用いて、重合阻害を可能にする低分子化合物を探索・解析する。これらの結果はウイルスに対する新たな治療薬の開発の先駆的な手法となりえる。

2. 研究の目的

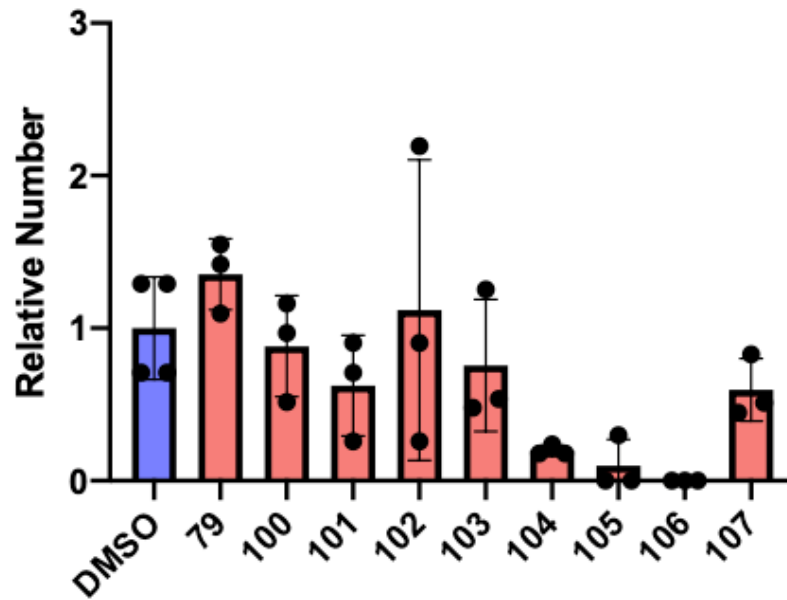
我々は N protein 重合を阻害する化合物を探索するハイスループットシステムを構築することを目的とし、FRET とイメージングによる評価を試みた。しかしながら、FRET よりも簡便で再現性の高いシステムを構築することが可能となったため、新たに精製した EGFP-N protein とイメージングによるハイスループットシステム評価系を構築することとした。

3. 研究の方法

SARS-CoV-2 の N protein の全長配列に HA タグと EGFP を融合したタンパク質を設計し、レトロウイルスベクターによる強制発現システムを構築した。次に HEK293FT 細胞に感染させ、シングルセルクローニングを用いて蛍光強度の高い細胞を株化した。この細胞を増殖させ、細胞内から HA 抗体を用いて EGFP-N protein を精製し、*in vitro* において、LLPS を形成し、蛍光塊が観察できる系の構築に成功した。この溶媒にアルカロイド系低分子化合物を加えることで LLPS 形成する蛍光塊の数の変化をカウントし、LLPS 形成阻害を示す化合物を探索した。また LLPS 形成阻害を示した化合物が細胞内の LLPS 形成阻害を示すかについても検討し、有効性評価を検討した。

4. 研究成果

構築した系において、LLPS 形成阻害率を 200 化合物において評価したところ、11 化合物において LLPS 形成が半減した。これらの化合物のうち、特に大きく変化したものを細胞に暴露し、In Cell Analyzer にて評価したところ、3 化合物において LLPS の形態率に変化があることが明らかとなった。



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	秋光 信佳 (Akimitsu Nobuyoshi) (40294962)	東京大学・アイソトープ総合センター・教授 (12601)	
研究分担者	五條 理志 (Satoshi Gojo) (90316745)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

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