

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06144

研究課題名(和文) ウイルスのプロテアーゼの基質認識機構

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

研究代表者

村松 知成 (Muramatsu, Tomonari)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：70212256

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)：SARSコロナウイルス(SARS-CoV)について、大腸菌無細胞タンパク質合成系でポリタンパク中のプロ配列の一部を含むプロ体モデルを発現すると、自己プロセシングが起き、成熟型となることを確認した。そのプロセシング部位に変異を入れN末端側にプロ配列を残したプロ体、C末端側にプロ配列を残したプロ体、両端にプロ配列を残したプロ体を作成することができた。その活性と基質特異性を調べ、成熟過程のシミュレーションを行った。基質特異性については成熟過程で変化がないが、プロセシング部位での認識ではP3'の認識に差異があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスに対する治療薬の開発には、ウイルス自体の増殖複製のメカニズムの解明が必要である。対象としているプロテアーゼはコロナウイルスの増殖過程において初期に用いられるものであるから、創薬のターゲットとなっている。しかし、それはプロテアーゼ活性の抑制をめざしているものであり、プロテアーゼ自体の成熟化を阻害することをめざしているものはない。この過程を明らかにすれば、より効率的な阻害剤を開発することができると考えている。

研究成果の概要(英文)：The model protein for the SARS-CoV3CL protease proform was expressed in an E. coli cell-free system. This model protein had a pro sequence of 10 amino acids at both ends of the mature protease region of the polyprotein, but was processed at both ends to become a mature form. By introducing mutations into the recognition site, we were able to generate N-terminal, C-terminal, and both-terminal proforms. The activity and substrate specificity of each enzyme were measured and the maturation process was simulated. There was no change in substrate specificity during maturation, but there was a difference in the recognition of P3' site in the N-terminal and C-terminal processing sites.

研究分野：生化学

キーワード：SARS コロナウイルス ポリタンパク質 プロテアーゼ 3CLプロテアーゼ メインプロテアーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多くの RNA ウイルスでは宿主細胞への感染後、ポリタンパク質と呼ばれる巨大なタンパク質が合成される。SARS コロナウイルス(SARS-CoV)が感染した宿主細胞内では、ウイルスに特異的な RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ、RNA ヘリカーゼ、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ等の酵素群は巨大な 2 種のポリペプチド(ポリタンパク質、486 kDa, 790 kDa ; フレームシフトサプレッションの有無により生ずる)の一部の領域として合成され、特異的なプロテアーゼにより切り出されて機能を持つようになる。この切り出しに関与する特異的なプロテアーゼは 2 種類存在し、ともにポリタンパク質に含まれる。より多くの箇所での切断に関与する主要なプロテアーゼは 3CL プロテアーゼ(またはメインプロテアーゼ)と呼ばれる分子で、これによる切断でウイルスの複製に必須な酵素群が活性分子として形成されることから、このプロテアーゼは SARS-CoV や新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の特異的な阻害剤開発のターゲットともなっている。この 3CL プロテアーゼも自己プロセッシング(切断)により、その N 末端と C 末端が形成され、それが二量体化(ホモ二量体)して機能を持つ。SARS-CoV は(+)鎖の RNA をゲノムとして有する RNA ウイルスであり、宿主細胞に感染後、宿主細胞に導入された RNA からポリタンパク質が合成された後、最初に必要とされる分子が 3CL プロテアーゼであり、その自己プロセッシングが最初に必要な反応ということができる。

### 2. 研究の目的

SARS-CoV 3CL プロテアーゼの自己プロセッシングのメカニズムを明らかにする。それがコロナウイルスに一般的なメカニズムならば、効果的な治療薬の開発につながる知見となる。

### 3. 研究の方法

3CL プロテアーゼは巨大なポリタンパク質中に含まれているが、その自己プロセッシングのモデル系として、3CL プロテアーゼ領域(306 アミノ酸残基)にポリタンパク質内における前後のプロ配列 10 アミノ酸残基そして、N 末端には S-tag, C 末端には His-tag を付加して発現させることのできるプラスミドを作成する。これを大腸菌無細胞タンパク質合成系で発現させ、プロ体モデルを得る(S-3CL[-10~316]-His)。

また、これよりプロテアーゼ活性残基 Cys145 の変異体、N 末端側プロセッシング部位、C 末端側プロセッシング部位の変異体を作成し、自己プロセッシングの解析に用いる。

さらに、外部基質として、活性を失った Cys145 変異株(C145A) (S-3CL[-10~316]C145A-His)だけでなく、中央部分(11~296)を GFP に置き換えたプロテアーゼ活性もなく二量体化もできない基質を作成し、外部基質として利用した。

### 4. 研究成果

(1) SARS-CoV 3CL プロテアーゼの自己プロセッシング反応の確認。

大腸菌無細胞タンパク質合成系で発現した 3CL プロテアーゼが自己プロセッシングを起こしていることを確認した(図 1)。活性残基である Cys145 をアラニンに置換すると全くプロセッシングが起きなくなることから、この反応が発現したタンパク質のみで行われている自己プロセッシング反応であることがわかる。このプロテアーゼによる反応では切断個所の N 末端側(P1 部位)のグルタミンが最もよく認識されていることが報告されているので、N 末端側、C 末端側プロセッシング部位の P1 部位をアスパラギンに変換すると、N 末端側プロセッシング部位変異(QN-3CL)により N 末端側のプロセッシングは起きなくなるが、C 末端側のプロセッシングは起きていた。同様に C 末端側プロセッシング部位変異(3CL-QN)により C 末端側のプロセッシングは起きなくなるが、N 末端側のプロセッシングは起きていた。双方のプロセッシング部位に変異を入れると(QN-3CL-QN)、全く自己プロセッシングが起きなくなった。この系で作成した 3CL を成熟型 3CL プロテアーゼ、QN-3CL、3CL-QN、QN-3CL-QN をそれぞれ N 末端側プロ体、C 末端側プロ体、両端プロ体として、成熟型との活性の比較に用いた。

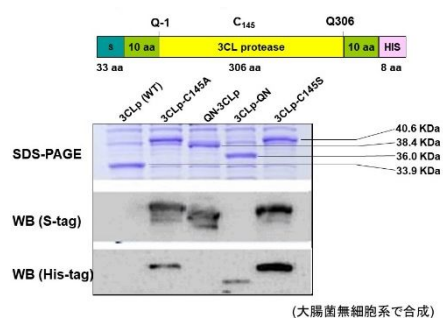


図 1. SARS-CoV 3CL プロテアーゼの自己プロセッシング

(2) 自己プロセッシングに必要とされる残基の特定。

N末端側、C末端側プロセッシング部位のいくつかのアミノ酸残基についての変異を作成し、自己プロセッシング活性を調べた(図2)。C末端側についてはP3'のフェニルアラニン(F)が認識されていることがわかったが、N末端側についてはP3'変異体(F3A, F3N)では全く自己プロセッシングが起きていない。(1)の結果から認識としてはN末端側の反応とC末端側の反応は独立であると考えられるので、C末端側も切断されないのは、プロテアーゼ分子としての活性が失われているものと判断される。

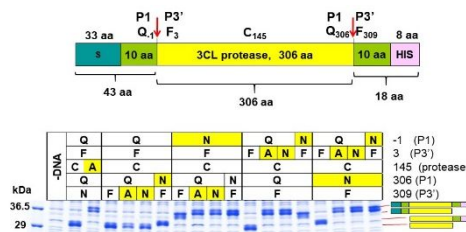


図2. 自己プロセッシングにおける認識部位

(3) 外部基質によるP3'部位特異性の解析

外部基質として中央部分(11~296)をGFPに置き換えた分子を作成し、その切断活性の速度論定数  $k_{cat}/K_M$  を簡易的に求める方法を開発した(図3)。また、3CLプロテアーゼの活性残基に

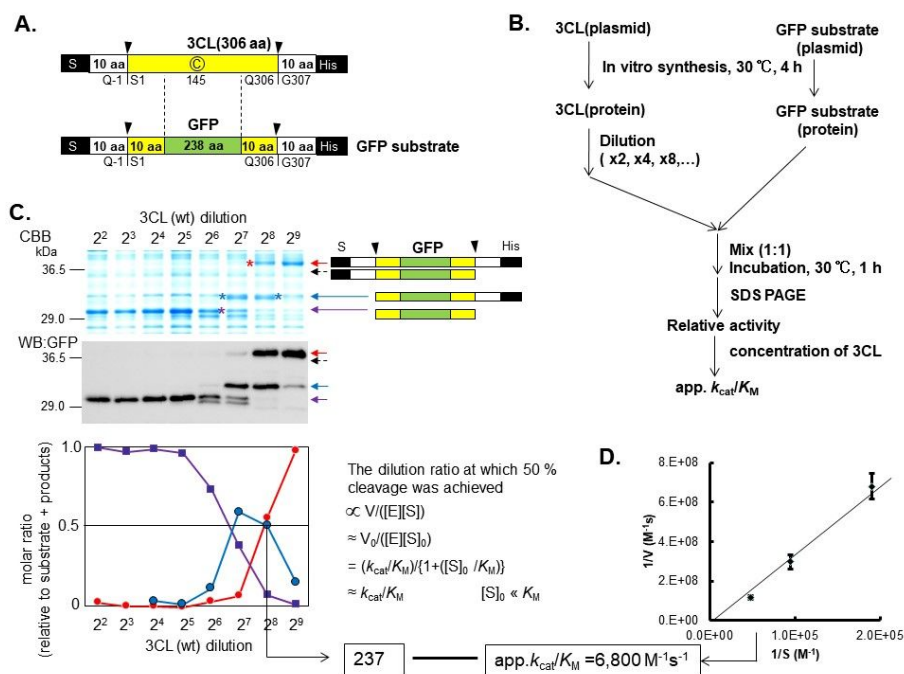


図3. 外部基質を用いた活性測定

異を導入し活性を失ったもの(C145A)も基質として用いた。GFP基質は活性のある酵素分子と二量体を形成しないが、C145A基質の差異は活性のある酵素と二量体を形成する。(1)で作成した成熟型、N末端プロ体、C末端プロ体、双方プロ体のN末端側、C末端側プロセッシング部位におけるP3'部位の認識を調べた(図4)。その結果、プロ体にも活性が存在し、成熟の過程で、N末端プロセッシングで活性が約5倍、C末端プロセッシングで約4倍、その両方のプロセッシングで約20倍上昇することがわかった。また、基質としてはC末端側の切断については、P3'部位のフェニルアラニンが認識されているが、N末端側切断では認識されていないこと、この特異性は、酵素の成熟過程により変化しないことも明らかとなった。

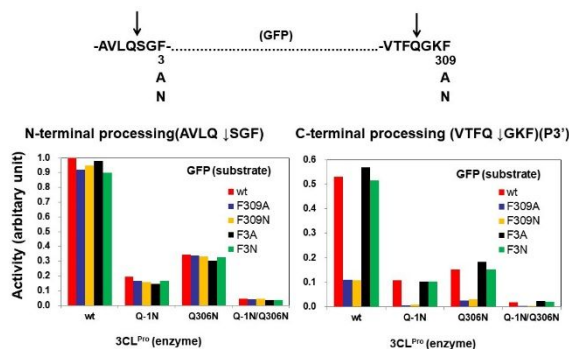


図4. 成熟型並びに各プロ体のN末端、C末端側プロセッシング部位におけるP3'部位の認識

(4) SARS-CoV 3CL プロテアーゼの成熟化経路のシミュレーション  
 成熟型酵素および各種プロ体の、GFP 基質並びに C145A 基質の N 末端プロセシング部位、C 末端プロセシング部位に対する酵素活性測定値を用いてプロ体二量体(dimer 1)から成熟型二量体(dimer 10)に至るまでの 10 種の間体の酵素活性を見積もり(詳細省略)、酵素の成熟過程のシミュレーションを行った(図5)。

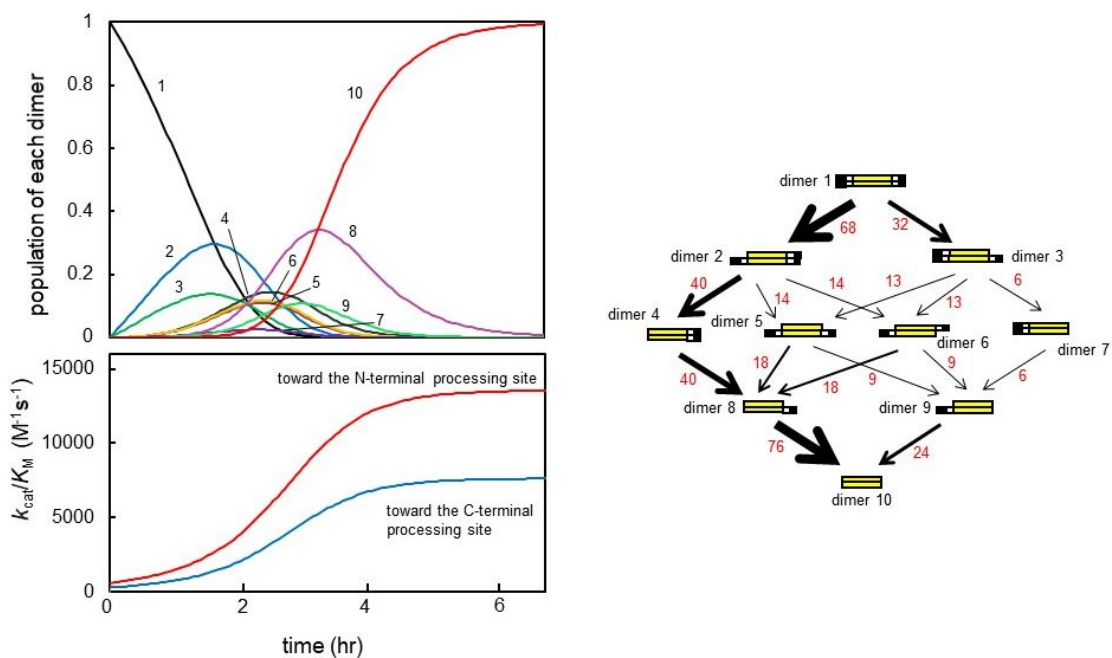


図 5. SARS-CoV 3CL プロテアーゼ成熟過程のシミュレーション (dimer 1 = 100 nM から開始, 室温)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shoraku Ryu 1, Tomonari Muramatsu, Kazuo Furihata, Feifei Wei, Masanori Koda, Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura	4. 巻 9
2. 論文標題 NMR-based metabolic profiling and comparison of Japanese persimmon cultivars	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51489-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morita Yuki, Wang Rong, Li Xuyang, Muramatsu Tomonari, Ueda Masumi, Hachimura Satoshi, Takahashi Sachiko, Miyakawa Takuya, Tanokura Masaru	4. 巻 175
2. 論文標題 Improved preparation of group-specific component (Gc) protein to derive macrophage activating factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 105714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2020.105714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------