

## RNA 修飾酵素を標的とする 新型コロナウイルス感染症治療薬の基盤研究

### [1] 組織

代表者：鈴木 勉

(東京大学大学院工学系研究科)

対応者：魏 范研

(東北大学加齢医学研究所)

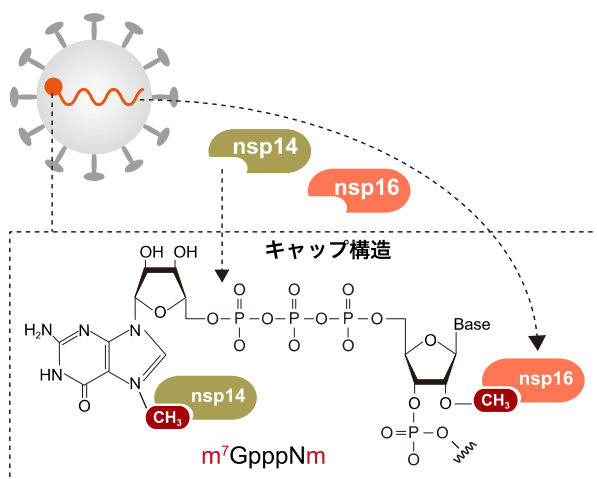
分担者：

穉近慎一郎 (東京大学大学院工学系研究科)

研究費：物品費 50 万

### [2] 研究経過

新型コロナウイルス(COVID-19)感染症による死者数が増大の一途を辿っており、ワクチンや治療薬の開発が急務である。新型コロナウイルスは、ゲノムとして一本鎖プラス鎖 RNA を有するウイルスである。ウイルスが宿主細胞に侵入した後、ゲノム RNA がテンプレートとなり、様々なウイルスタンパク質が翻訳され、ウイルスの増殖に用いられる。



コロナウイルスに由来するタンパク質のうち、nsp14 と nsp16 は、非構造タンパク質である nsp10 と結合し、自身の RNA にキャップ構造 (m<sup>7</sup>GpppNm) を加える酵素群である。このキャップ構造 (m<sup>7</sup>GpppNm) は、ウイルス RNA を宿主細胞での分解ならびに免疫応答から守る役割を有しており、ウイルスの生存と増殖に不可欠である。実際、新型コロナウイルスの近縁ウイルスである SARS を用いた研究

において、nsp14 と nsp16 の機能欠損ウイルスは増殖能が著しく低下することが示されている。また、キャップ構造を有する RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスについても、キャップ構造の形成に関与する酵素に対する阻害薬 (総称名：ゾフルーザ) が治療薬として各国で臨床応用されている。

新型コロナウイルスに由来する nsp14/nsp16 タンパク質は、新型コロナウイルス創薬において重要な標的であると考えられ、これらの酵素に対する阻害剤は有望な治療薬となることが期待される。そこで、本研究は、新型コロナウイルスに由来する RNA 修飾酵素である nsp14 と nsp16 に対する阻害剤の開発を目的とする。

本研究においては、鈴木と魏の間で、オンラインツールを用いたリモート研究打ち合わせを頻回に実施し、組み替えタンパク質精製ならびに酵素活性の検出法についてディスカッションを行なった。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

#### 1-組換えタンパク質の精製：

今年度では大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の作製を行い、それぞれのタンパク質を得ることができた。具体的には、nsp10、nsp14、nsp16 の cDNA はコドン最適化したうえ、His タグを末端に加えた人工遺伝子を合成した。次に、人工遺伝子を大腸菌 (BL21) に形質転換し、IPTG を加え、組換えタンパク質の発現を誘導した。大腸菌液を遠心分離で集菌した後、大腸菌を超音波装置を用いて破碎し、再び遠心分離装置で大腸菌粗抽出未破碎大腸菌を分離した後、上清を粗抽出液とした。粗抽出液をニッケルアフィニティカラムにアプライし、His タグを有する組換えタンパク質を得た。右の写真は精製した nsp16 の組換えタンパク質を SDS-PAGE で分離し、CBB



染色したゲルを示しており、精製した nsp16 組換えタンパク質はゲルの上段に位置する濃いバンドに相当する。また、nsp10 や nsp14 についても、極めて純度の高い組換えタンパク質の精製に成功した。

2—組換えタンパク質の酵素活性の測定：

nsp14 によるオリゴ RNA の 5'末端の m<sup>7</sup>G 修飾の活性を検討するため、in vitro の酵素反応系をセットアップした。具体的には、エッペンドルフチューブに 1 microM 組換え nsp14 タンパク質、S-Adenosyl methionine、in vitro で転写した m<sup>7</sup>G ギャップ構造を持たないオリゴ RNA を混合し、37 度、30 分間反応させた。その後、修飾 RNA を RNase で消化し、オリゴ RNA の断片を質量分析装置で解析した。その結果、nsp14 によるオリゴ RNA 5'末端の m<sup>7</sup>G 修飾が確認された。

一方、nsp16 については、エッペンドルフチューブに nsp16 と nsp10 を加え、さらに、S-Adenosyl methionine、in vitro で転写し m<sup>7</sup>G ギャップ構造を有するオリゴ RNA を加え、37 度、2 時間反応させた。その後、修飾 RNA を RNase で消化し、オリゴ RNA の断片を質量分析で解析した。その結果、オリゴ RNA の 2'-O-メチル化修飾が確認された。

上記の研究により、nsp14 と nsp16 の in vitro 酵素反応系の構築に成功した。nsp14 については極めて反応効率が高いため、今後はライブラリースクリーニングを行うことで、阻害剤の探索を進めていく予定である。一方、nsp16 の活性は nsp14 よりも低く、酵素濃度や反応溶液の組成などを最適化し、活性の向上を図った後、阻害剤のスクリーニングを行う予定である。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究によって、新型コロナウイルス感染症に対する薬剤候補の創出が期待される。現在、新型コロナウイルスに対するワクチンが開発され、世界各地でワクチンの投与が進んでおり、感染拡大を阻止する切り札として期待されている。一方、ワクチンの効果は 100% ではなく、感染症を完全に阻止することが理論的に困難であるため、感染した患者に対しては体内でウイルスの増殖を阻止できる薬剤の開発は依然として重要であり、世界各地で研究開発が進められている。本研究により、ウイルス由来のゲノム RNA のキャップ構造の形成を阻止できる薬剤の開発が期待され、ワクチンや他の薬剤と併用することにより、新型コロナウイルス感染症による重症率を抑制し、効果的な感染症対策に貢献することが可能である。さらに、新型コロナウイルスに由来する nsp14 や nsp16 は SARS や MERS といった他のコロナウイルスにも存在し、配列が極めてよく保存されている。このため、本研究結果

は、新型コロナウイルス以外のコロナウイルス感染症への応用も期待できる

### [4] 成果資料

本研究は薬剤スクリーニングによる阻害剤の開発を最終目的としており、2021 年 3 月の時点において論文発表やプレスリリースに至っていない。