

研究題目 新型コロナウイルスやインフルエンザウイルス蛋白質のエピジェネティクス

研究組織

研究代表者：葛原 隆（徳島文理大学・薬学部）

研究分担者：畠山 大（徳島文理大学・薬学部）

共同研究者：篠原康雄（徳島大学・先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

新型コロナウイルスやインフルエンザウイルスは重大な感染症の原因ウイルスであり、それらの抗ウイルス化合物の探索は重要な課題である。その標的として、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼや新型コロナウイルスタンパク質に着目し、さらにそのアセチル化修飾とそれによる活性の制御を解析し、新規メカニズムの抗ウイルス化合物の発見を目指すことを目的とする。

[1-2] 研究の方法・経過

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼの PA サブユニットや新型コロナウイルスのタンパク質のアセチル化修飾はイメージングプレートとイメージングアナライザーを用いて解析する。徳島文理大学において、PA サブユニットの各種変異体は大腸菌発現と作成し、精製、試験管内において、複数のヒストンアセチル化酵素によりアセチル化反応を行う。新型コロナウイルスのタンパク質は購入する。イメージングプレートにアセチル化のイメージを転写し、徳島大学・先端酵素学研究所・篠原康雄研究室において、イメージングアナライザーを用いて、その画像データを解析する。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

本研究は、ともに vRNA と相互作用するインフルエンザウイルス NP および新型コロナウイルスの N タンパク質に対するアセチル化修飾の生物学的意義を、宿主細胞側因子との相互作用

の観点から理解することを目的とするものである。実験遂行のためには適切なリジン残基がアセチル化された組換えタンパク質が十分量必要となる。しかし、これまでの研究によりインフルエンザウイルス NP を大腸菌で作成すると発現過程で菌体内において先にランダムにアセチル化されてしまった。また、新型コロナウイルス N タンパク質はバイセーフティーレベルの問題から、そもそも大腸菌での発現を行うことができない。そこで、我々は試験管内でタンパク質を発現させることができる無細胞系タンパク質合成系を用いることにした。

インフルエンザウイルス NP について

インフルエンザウイルス NP は、PUREflex というキットを用いて、FLAG-tag もしくは Strep-TagII を付加した組換えタンパク質の発現を試みた。CBB 染色と抗 NP 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、NP の発現に成功したことは分かった。しかし、抗アセチルリジン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、非アセチル化 NP でもシグナルが検出された。これは、PUREflex においても発現過程でアセチル化されている可能性が考えられる。

次に、Strap-TagII を付加させた NP 組換えタンパク質を合成した。抗 NP 抗体、抗 Strep-Tag 抗体によるウェスタンブロッティングにより、NP の発現を確認することができた。そして、抗アセチルリジン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、アセチル化酵素 PCAF を混合すると NP が特異的にアセチル化されていることが分かった。しかし、発現量が十分ではなかったため、それを向上させる必要がある。ま

た、アセチル化酵素 GCN5 では NP 以外のタンパク質にもアセチル化のシグナルが見られたことから、非特異的にアセチル化されているものと考えられた。

最後に、タンパク質合成の際に、キットの溶液由来のアセチル化修飾を阻害する目的で、アセチル化酵素阻害剤であるアナカルジン酸を添加する実験を行った。すると、NP 組換えタンパク質は合成されなかったことから、PUREflex に含まれるタンパク質にはアセチル化酵素活性があり、それがタンパク質合成に重要であると同時に、発現させた NP もアセチル化させていることが示唆された。

新型コロナウイルス N タンパク質について

新型コロナウイルス N タンパク質をコードするプラスミドを購入し、これを鋳型とした PCR により N タンパク質のコーディング領域の増幅を行った。その際、N 末端もしくは C 末端に Strep-TagII の塩基配列を付加させた。この PCR 産物を鋳型としてタンパク質合成を試みた。まず、インフルエンザウイルス NP と同様、PUREflex での発現を試みたが、十分量のタンパク質を得られなかった。次に、小麦胚芽抽出液を用いた組換えタンパク質合成キットを使用したところ、C 末端に Strep-TagII を付加させた組換えタンパク質の若干量の発現を確認することができた。しかし、アセチル化依存的な相互作用因子のスクリーニングを行うには十分ではなかった。今後は、付加するタグの種類や長さ、N タンパク質の長さなどを調節し、十分量の組換えタンパク質が得られるようにしたいと考えている。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

インフルエンザウイルスおよび新型コロナウイルスは現在でも人類にとって大きな健康問題上の大きな課題である。これらのウイルスのタンパク質は多種多様な宿主側因子と相互作用することが知られており、その中にはウイルスタンパク質のアセチル化修飾に依存して親和性が変わり、ウイルスの増殖効率に深く関与するものがあると考えられる。本研究により、アセチル化修飾によって相互作用効率が変化する宿主側因子を同定することができれば、これらのウイルスの増殖機構の全貌解明に大きく近づくだけでなく、まったく新しい作用機序をもつ抗ウイルス薬の発見・開発に繋がることが期待される。

[3] 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

1. Hatakeyama D, Tanii H, Nishikawa E, Takahira M, Honjo T, Ebisuda N, Abe N, Shinohara Y, Mitomo S, Tsutsui A, Fujita T, Kuzuhara T. Anacardic Acid Derivatives Isolated from Fungal Species *Tyromyces fissilis* as New Histone Acetyltransferase Inhibitors. *Biol Pharm Bull.*, **47**(12), 2076-2082 (2024).
2. Shoji M, Esumi T, Masuda T, Tanaka N, Okamoto R, Sato H, Watanabe M, Takahashi E, Kido H, Ohtsuki S, Kuzuhara T. Bakuchiol targets mitochondrial proteins, prohibitins and voltage-dependent anion channels: New insights into developing antiviral agents. *J. Biol. Chem.*, **300**(2), 105632 (2024).
3. Shoji M, Ohashi T, Nagase S, Yuri H, Ichihashi K, Takagishi T, Nagata Y, Nomura Y, Fukunaka A, Kenjou S, Miyake H, Hara T, Yoshigai E, Fujitani Y, Sakurai H, Dos Santos HG, Fukada T, Kuzuhara T. Possible involvement of zinc transporter ZIP13 in myogenic differentiation. *Sci. Rep.*, **14**(1), 8052 (2024).

[3-2] 学会発表

1. 橋本 侑里香、畠山 大、葛原 隆「無細胞系で発現させたインフルエンザウイルス NP 組換えタンパク質に対するアセチル化修飾の検討」ポスターNo. 29P-088S、日本薬学会 第 145 年会、2025 年 3 月 29 日、福岡市
2. 吉田晴菜、畠山 大、三木悠輔、庄司正樹、橋本里菜、高山和雄、葛原 隆「新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の S タンパク質と相互作用する糖および糖鎖の探索研究」ポスターNo. 27P-am326S、日本薬学会 第 145 年会、2025 年 3 月 27 日、福岡市
3. 山西 麗、畠山 大、植木正二、山口健太郎、橋本里菜、高山和雄、葛原 隆「新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の S タンパク質と相互作用するアミノグリコシド系抗生物質の発見」ポスターNo. 27P-am327S、日本薬学会 第 145 年会、2025 年 3 月 27 日、福岡市

[3-3] 成果資料等

なし。

【4】今後の課題等

インフルエンザウイルス NP に関しては、Strep-TagII を付加させた組換えタンパク質の発現に成功し、PCAF によって特異的なアセチル化修飾を検出することができたが、その発現量はこの後の相互作用因子のスクリーニングを行うには不十分であった。新型コロナウイルス N タンパク質に関しても同様に、発現量が非常に少ないことが分かった。今後は、インフルエンザウイルス NP、新型コロナウイルス N タンパク質ともに、発現量を向上させるための改善が必要である。