



抗ウイルス薬開発を目指した蛋白質結晶構造解析

三城 明¹, 赤路 健一²

1 プロテインウエーブ株式会社, 2 京都薬科大学

キーワード：抗 SARS 薬, 創薬ターゲット蛋白質, 立体構造, ドラッグデザイン

1. 測定実施日

2020 年 7 月 28 日 BL2S1 (第 1, 第 2 シフト)

2020 年 12 月 8 日 BL2S1 (第 1, 第 2 シフト)

2. 概要

現在, 世界的な感染症を引き起こしている SARS-CoV2 のメインプロテアーゼは, 細胞核内でウイルス蛋白質のプロセッシングを行なうことからウイルスの増殖に必要な不可欠な役割を担っている。このため抗 SARS 薬の創薬ターゲットとして期待されている。本実験では, メインプロテアーゼの結晶構造解析を行ない, 有効な抗ウイルス薬を開発することを目的としている。

今回は新型コロナウイルス (SARS-CoV2) のメインプロテアーゼについて阻害剤を含まない Apo 体結晶の X 線回折データの収集を行い, 高分解能の回折データを得ることができた。

3. 背景と研究目的

疾病に関わる蛋白質の立体構造情報を得ることは, 薬剤設計を行なう上で非常に有効である。現在, 蛋白質の立体構造を決定する実験方法は, X 線結晶構造解析法, 核磁気共鳴分光法, クライオ電子顕微鏡, X 線小角散乱法, など様々確立されている。それらの中で X 線結晶構造解析法は, 最も簡便な手法で, 加えて精密な構造情報を得ることが可能な手法である。

本研究は新型コロナウイルスの大流行に対処するための新規な治療薬の実現を目指して, SARS-CoV2 のメインプロテアーゼ—阻害剤複合体の結晶構造解析に関する知見から阻害能の高い化合物のデザインを進めることを目的としている。

4. 実験内容

精製された SARS-CoV2 のメインプロテアーゼについて阻害剤を含まない蛋白質溶液 (濃度は 10mg/mL) を 20°C の条件下で sitting drop 蒸気拡散法により結晶化スクリーニングと最適化を試みた。その結果, 2 種類の結晶化条件で外観の良好な Apo 体結晶を得た。その後, 上記の結晶を抗凍結溶液に移した後, フラッシュクーリングによって凍結し, 約 100 K の低温条件下で波長 1.12 Å の X 線を用いて回折データを収集した。またデータ収集の条件は, 検出器距離 240 mm, 露光時間 10 秒, 振動角 1 度で 180 枚の回折像を測定した。

5. 結果および考察

結晶化で得られた Apo 体結晶は, いずれの結晶化条件でも形状が柱状あるいは板状で, 複数の結晶の一端がつながった集合体となって成長する (写真 1)。そのためデータ収集用の結晶をマウントする際には, ループで集合体の結晶を壊して分離してから単結晶をループにマウントした。

次に単結晶が得られた 2 種類の結晶化条件は,

- ・ 結晶化条件 A : Bis-Tris pH6.5, PEG3350 系

・結晶化条件 B : Tris-HCl pH8.5, PEG20000, エタノール系

であったが、結晶化条件 B で得られた結晶の方が分解能が良好であったため、今回はこの条件で得られた結晶についてデータ収集を行った。写真 2, 3 にマウントされた結晶とその回折像の写真をそれぞれ示す。



写真 1 成長した集合体結晶の例

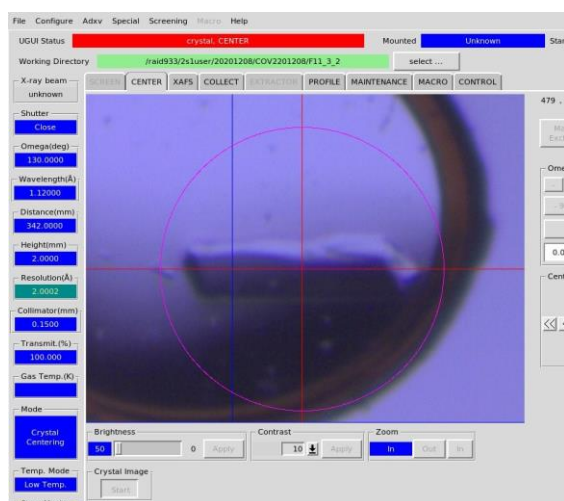


写真 2 マウントされた結晶

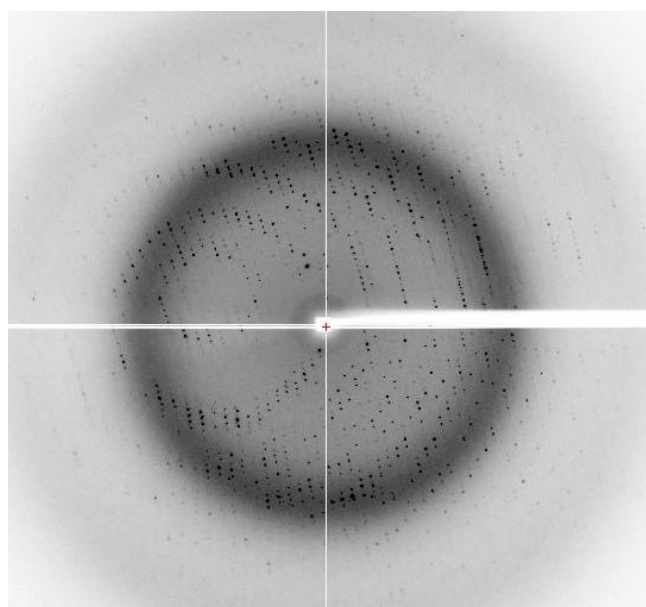


写真 3 X 線回折像

上記の結晶についてデータ処理の結果、空間群は $P2_1$, 格子定数は $a = 55.66 \text{ \AA}$, $b = 98.57 \text{ \AA}$, $c = 58.21 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 107.52^\circ$, モザイク性は 0.27° であった. $I/\sigma(I) = 2$ を基準にし、最終的に $1.94 \text{ \AA}$ 分解能の回折データを得た (Table 1).

Table 1. 回折データの統計値

分解能 ($\text{\AA}$)	48.37-1.94 (1.99-1.94)
Completeness (%)	99.6 (99.4)
Multiplicity	3.7 (3.7)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13.4 (2.4)
Rmerge	0.067 (0.565)
CC(1/2)	0.998 (0.823)

6. 今後の課題

- 1) SARS-CoV2 のメインプロテアーゼにはアミノ酸の変異が複数個所存在する。このため最初に阻害剤を含まない蛋白質 (Apo 体) 結晶の構造解析を行い、変異が導入されたことによる立体構造への影響等を確認する。なお Apo 体の結晶化条件が得られれば阻害剤との複合体の結晶化にも同一の結晶化条件を適用できる。
- 2) Apo 体の結晶構造を確認した後に複数の阻害剤との複合体結晶を調製し、X 線回折データ収集と構造解析を行う。これにより、より阻害能の高い化合物のデザインや化学結合様式に関する知見を得ることが可能になる。

7. 参考文献

1. Zhang *et al.*, *Science* 10.1126/science. abb 3405 (2020).