

2. RNA 依存性自然免疫タンパク質の構造解析による新型コロナウイルス治療薬の開発

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 主任研究員 竹下 大二郎

概要

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は2020年から世界的に流行し、複数の変異を獲得してオミクロン株等の亜種を派生し、複数回の流行期を繰り返してきた。以前より重症化割合は低減したが、依然として高齢者や基礎疾患のある人は重症化リスクがあり、確実性が高い治療法の確立が望まれる。本研究では我々が体内で備えている自然免疫機構に着目して、自然免疫の高機能化による抗 SARS-CoV-2 薬を創出することを目指す。ヒト PKR（Protein Kinase RNA-activated）は、ウイルスに対抗する自然免疫タンパク質であり、ウイルス感染時に細胞内で生産される長鎖の RNA 分子を特異的に認識して活性化し、翻訳開始因子を介して、タンパク質合成を抑制して、ウイルス増殖から生体を防御する機能を担う。PKR がウイルス RNA を認識する仕組みはわかっておらず、構造生物学的手法を用いて研究を推進する。構造学的な知見を得て、PKR の活性を利用したウイルス治療薬を開発することを目指す。

背景および目的

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）が世界的に流行し、広範で多大な影響を及ぼしてきたが、現在までに確実に改善が見込まれる治療薬は開発されていない。本研究では、我々が体内で備えている自然免疫機構に着目して、自然免疫の高機能化による抗 SARS-CoV-2 薬を創出することを目指す。ヒト PKR（Protein Kinase RNA-activated）は、ウイルスに対抗する自然免疫タンパク質であり、ウイルス感染時に細胞内で生産される長鎖の RNA 分子を特異的に認識して活性化し、翻訳開始因子 eIF2 α をリン酸化してタンパク質合成を抑制する (1, 2)。この仕組みを利用して、ウイルス感染と増殖に対抗して、ウイルスから生体を防御する機能を担っている。コロナウイルス感染時にも、PKR 活性化は確認されている (3, 4)。コロナウイルスが細胞内に侵入した際に、PKR はウイルスがコードするタンパク質発現とウイルス増殖を阻害する。また、PKR はコロナウイルス感染時にアポトーシスを誘導してウイルス増殖を妨げる。このように、PKR はリン酸化を介して宿主免疫機能を調節している。PKR はコロナウイルスが感染時に生産する RNA を特異的に分子認識することで活性化して免疫機能を発揮しており、宿主免疫において重要な抗ウイルス機能を担うことが推測される。

PKR が有するウイルスに対抗する分子機能の解明は、新規の抗 SARS-CoV-2 薬の開発に繋がることが期待されるが、これまで、PKR が細胞内のウイルス RNA を認識し、免疫機能を発現する仕組みは明らかとなっていない。本研究では、PKR とウイルス RNA 複合体の構造機能解析を実施して、PKR による RNA 認識機構と活性化機構を解明し、抗ウイルス剤の分子設計を進展させる。また、PKR が宿主の免疫機能を担っている一方で、ウイルス側では、PKR を阻害する因子を有していることが知られている (5, 6)。ウイルスによる PKR 阻害機構を明らかにするため、PKR 阻害性ウイルス因子の構造学的解析も進める。PKR 阻害性のウイルス因子の構造学的知見は、阻害メカニズムを明らかにするだけでなく、PKR の作用機構の理解にも貢献することが期待される。

方法

【PKR とウイルス RNA 複合体の調製と構造解析】

PKR について、生体高分子の構造解析技術（X 線結晶構造解析、およびクライオ電子顕微鏡解析）を用いた構造学的研究を進める。X 線結晶構造解析は、生体高分子を結晶化して、X 線回折データを得て高分解能で立体構造を決定する手法であり、クライオ電子顕微鏡は、近年性能が向上した構造決定技術で、結晶化せずに原子分解能での構造決定が可能となっている。本課題では、X 線結晶構造解析、およびクライオ電子顕微鏡解析の両手法で構造決定を試み、高分解能での構造決定を目指している。複数のヒト PKR タンパク質、dsRNA（二本鎖 RNA）複合体の高純度精製方法を確立しており、現在、構造学的な解析を進めている。

【PKR 阻害性ウイルス因子の構造解析】

PKR がヒトの免疫機能を担っている一方で、ウイルスによる免疫阻害の標的ともなっている。PKR 阻害性ウイルス因子のひとつである PK2 のタンパク質発現と精製を行い、構造解析と生化学的解析も実施した。PK2 の X 線結晶構造を決定して、構造情報に基づいたリン酸化の阻害活性の解析を進めた。生化学実験で、eIF2 α への転移活性を比較することで、PK2 の阻害能を詳細に解析した。リン酸化酵素との複合体構造解析を目的とした結晶化スクリーニングを実施して、結晶構造解析を実施した。

結果および考察

【PKR とウイルス RNA 複合体の構造解析】

多種類の RNA と PKR 複合体を高純度で調製することが可能となった。立体構造を決定するため、結晶化スクリーニングおよびクライオ電子顕微鏡による解析を実施中である。PKR は、複数のドメインからなるマルチドメインタンパク質であり、各ドメイン間の構造的な揺らぎが大きいと予測される。構造解析が可能な良質な結晶の取得、およびクライオ電顕による構造学的データ取得のため、ドメイン間のリンカー領域の検討、変異導入を行って、PKR 内にさまざまな変異導入を試み、構造学的解析を進めている。多種類の RNA を利用して、PKR-RNA 複合体は調製可能となっており、結晶化またはクライオ電顕解析に適したサンプルスクリーニングを今後も進めていく予定である。

【PKR 阻害性ウイルス因子の構造解析】

PKR 阻害性ウイルス因子は複数報告されているが、本課題では、阻害因子の一つである PK2 の構造決定に成功している（図 1）。PK2 は、全長では四量体形成しており、N 末端が重要な役割を担っていることが明らかとなった。PK2 の大腸菌による組換えタンパク質発現と精製および結晶化、リン酸化酵素との複合体形成をまとめた学術論文を発表した（発表論文 1）。

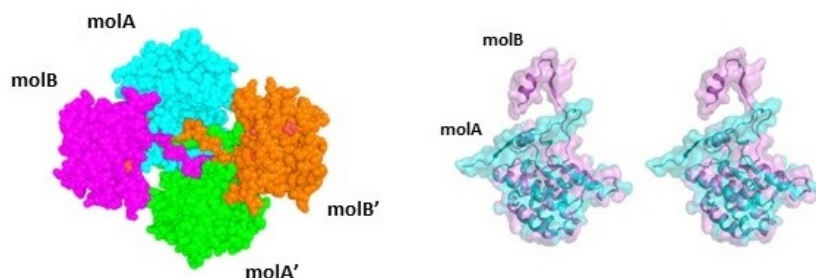


図 1. PK2 の立体構造

PK2 は 2 つの異なるコンフォメーション(A, B)を形成し、ホモテトラマーを構築する（左）。

プロトマー A と B のステレオ図。PK2 の四量体形成に関わる N 末端領域は異なる構造をとる（右）。

阻害メカニズムの解明のため、リン酸化酵素と PK2 複合体の構造決定に向けた結晶化を進め、タンパク質領域の検討も含めて結晶化条件の最適化を行った。その結果、リン酸化酵素と PK2 複合体の構造決定に成功して、キナーゼの subdomain III-IV 領域が PK2 による認識に必須であり、さらに活性阻害にも重要であることが明らかとなった（図 2、発表論文 2）。本成果は、宿主 eIF2 α リン酸化酵素とウイルス阻害因子複合体の初めての構造解析である。PK2 はバキュロウイルスが有するものであり、コロナウイルスでは別の分子が PKR 阻害を担っていると予測される。コロナウイルスにおける宿主 PKR との分子間攻防の解明のため、今後、ヒト PKR とコロナウイルス阻害因子複合体の構造解析も進めることを計画している。

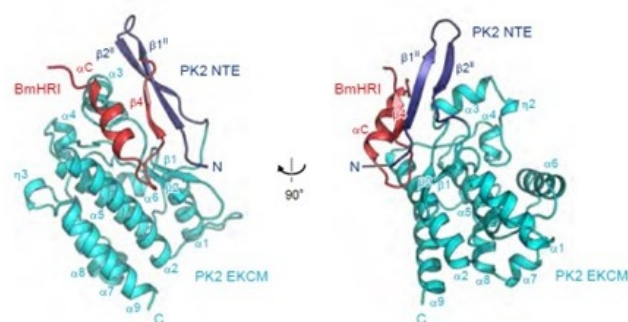


図 2. PK2-リン酸化酵素複合体の立体構造

PK2 は NTE 領域と ECKM ドメインを利用して、リン酸化酵素 BmHRI の subdomain III-IV 領域を認識し、阻害することが示唆された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました三菱財団、ならびに関係の皆様にご心より感謝申し上げます。
(完)

発表論文

- 1) Protein expression and purification, molecular interaction, and X-ray crystallographic analysis of baculovirus protein PK2
Daijiro Takeshita, *Protein Expr Purif.* (2023) 202, 1-7.
- 2) Mechanism of counterattack against eIF2 α kinase immune signalling by viral pseudo-kinase PK2
Daijiro Takeshita, Yuko Takagi, *bioRxiv* (2025) 10.1101/2025.02.05.636571
- 3) Mechanism of counterattack against host eIF2 α kinase signaling by viral pseudo-kinase PK2
Daijiro Takeshita, Yuko Takagi, *In submission.*
- 4) Periplasmic chitoooligosaccharide-binding protein requires a three-domain organization for substrate translocation
Takayuki Ohnuma, Jun Tsujii, Chikara Kataoka, Teruki Yoshimoto, Daijiro Takeshita, Outi Lampela, André H Juffer, Wipa Suginta, Tamo Fukamizo, *Sci Rep.* (2023) 13, 1-18.

引用文献

- 1) Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets
Nahum Sonenberg, Alan G. Hinnebusch, *Cell* (2009) 136, 731-745.

- 2) Regulation of innate immunity through RNA structure and the protein kinase PKR
Subba Rao Nallagatla, Rebecca Toroney, Philip C Bevilacqua, *Curr Opin Struct Biol* (2011) 21, 119-127.
- 3) SARS-CoV-2 variant-specific differences in inhibiting the effects of the PKR-activated integrated stress response
Wanda Christ, Jonas Klingström, Janne Tynell, *Virus Res* (2024) 339, 199271.
- 4) SARS-CoV-2 N protein recruits G3BP to double membrane vesicles to promote translation of viral mRNAs
Siwen Long, Mykhailo Guzyk, Laura Perez Vidakovics, Xiao Han, Renhua Sun, Megan Wang, Marc D. Panas, Egon Urgard, Jonathan M. Coquet, Andres Merits, Adnane Achour & Gerald M. McInerney, *Nat Commun* (2024) 15, 10607.
- 5) Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses
Jeffrey O Langland, Jason M Cameron, Michael C Heck, James K Jancovich, Bertram L Jacobs, *Virus Res* (2006) 119, 100-110.
- 6) Activation of the Antiviral Kinase PKR and Viral Countermeasures
Bianca Dauber, Thorsten Wolff, *Viruses* (2009) 1, 523-544.