

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02449

研究課題名(和文) 新型コロナウイルスSARS-CoV-2のN蛋白質の構造解明による増殖機構解明

研究課題名(英文) Structure and functional analysis of the SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein

研究代表者

朴 三用 (Park, Sam-Yong)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20291932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：Nタンパク質はアミノ酸419残基を持つ分子量約50kDa.の分子量である。発現系で確認した結果、大腸菌で大量発現ができた。Nタンパク質は、8両体の複合体の分子量は約450kDa.になり、単粒子解析には最適な試料である。約1000条件程度の条件検討を行った結果、0.1M-クエン酸ナトリウム pH5.0, PEG20K条件で、ポリ微結晶が得られて、最適化を行なった結果平均30ミクロンの結晶を得ることができた。実験系のX線発生装置を使用し、反射点を確認した結果、約4Å程度の反射点を得た。今後、質の良い結晶化の条件検討と、大型放射光施設で回折実験を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人類は21世紀に入り、2002年の重症急性呼吸器症候群(SARS)であり、コウモリが原因であると報告されている。その後、2019年末には、SARS-CoV-2は中国の武漢で呼吸器疾患のアウトブレイクを引き起こした。コロナウイルスは一本鎖RNAウイルスで、ヒトへの感染が確認されているCoVは7種類が存在している。これらのCoVに感染すると様々な重症度の呼吸器症状を発症する。今後、生物学的な感染機構解明や合理的で有効な治療薬の開発を急務とされている。本研究はウイルスRNAアセンブリーの安定化に関わっているNタンパク質の構造解明によるウイルスの増殖機構解明を目指し、構造解明を行なった。

研究成果の概要(英文)：The N-protein has a molecular weight of about 50 kDa. with 419 amino acid residues. The N-protein was confirmed by an expression system and mass expression was achieved in E. coli. The N-protein has a molecular weight of about 450 kDa. in an 8-complex, making it an ideal sample for single particle analysis by cryo-EM. In addition, the conditions for crystallization of the complexed N protein were investigated using an automated crystallization robot dispensing system. As a result of about 1,000 conditions, poly crystals were obtained under 0.1M sodium citrate pH 5.0, 10%(w/v) PEG20K conditions, and after optimization, crystals averaging 30 microns in diameter were obtained. Using an experimental X-ray generator, we confirmed the reflection points and obtained reflection points of approximately 4Å. In the future, we plan to study the conditions for high quality crystallization and perform X-ray diffraction experiments at a large synchrotron radiation facility.

研究分野：構造生物学

キーワード：新型コロナウイルス Nタンパク質 構造生物学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人類は 21 世紀に入り、2002 年の重症急性呼吸器症候群 (SARS)、2012 年の中東呼吸器症候群 (MERS) を経験しており、何れもコウモリが原因であると報告されている。その後、2019 年末には、SARS-CoV-2 は中国の武漢で呼吸器疾患のアウトブレイクを引き起こした。当初は動物からヒトへの拡散が示唆されたが、のちにヒトからヒトへの伝播が発生していることが明らかになった。コロナウイルス (Corona virus: CoV) は一本鎖 RNA ウィルスで、ヒトへの感染が確認されている CoV は 7 種類 (229E, NL63, OC43, HKU1, SARS, MERS, COVID-19) 存在している。これらの CoV に感染すると様々な重症度の呼吸器症状を発症する。初期に発見された HCoV-OC43 と HCoV-229E は、風邪のような症状を引き起こし、その他の 5 つの CoV はより重度の呼吸器感染症を引き起こす。

### 2. 研究の目的

世界中で猛威をふるっている SARS-CoV-2 は、コウモリが持っている CoV が野生動物を通じて人間にうつったと考えられている。SARS-CoV-2 に感染すると、中等度-重症の呼吸器症状がみられ発熱、咳、呼吸苦を起こす。現在、SARS-CoV-2 感染症の流行により数万人の患者が死に至っているが、未だに有効な治療薬の開発は確立されておらず、世界中から強く望まれている。今後、SARS-CoV-2 の生物学的な感染機構解明や、合理的で有効な治療薬の開発を急務とされており、創薬研究を目指す。

### 3. 研究の方法

世界中で猛威を振っている SARS-CoV-2 感染症の流行により 100 万人の患者が死に至っているが、未だに有効なワクチンや治療薬の開発は確立されておらず、世界中から強く望まれている。SARS-CoV-2 の感染力は非常に強く、その感染者は爆発的に増加し、現在世界的な大流行 (パンデミック) を引き起こしている。SARS-CoV-2 は、4 つの構造体タンパク質 (S, E, M, N) から構成されている。細胞への進入は S タンパク質とヒト感染受容体であるアンジオテンシン変換酵素 (ACE2) と相互作用し、細胞への精巧な吸着・侵入から始まる。細胞内に侵入し、放出された RNA ゲノムは、N タンパク質によりリポ核酸タンパク質 (RNP) のゲノムパッケージ化を行う。そのため、N タンパク質は配列の保存性と強い免疫原性により、極めて有望な創薬ターゲットとなっている。今後、SARS-CoV-2 の生物学的な感染機構解明や合理的で有効な治療薬の開発を急務とされていることを着想し、SARS-CoV-2 の N タンパク質をターゲットとして構造解明する事でウイルスの構造生物学研究による増殖機構解明を目指す。N タンパク質はアミノ酸 419 残基を持つ分子量約 50kDa. の一つのペプチドとして、RNA 結合や二量体形成ドメインから成り、全長での大量発現系構築には難問とされている。その難問に対し、タンパク質の大量発現系構築のため、DNA 遺伝子コドンを実験室優勢コドンで最適化を行う予定である。その発現系は、大腸菌、酵母、無細胞タンパク質発現系、昆虫細胞 (sf9) など様々な発現ベクターで確認する。

### 4. 研究成果

N タンパク質を自動結晶化ロボット分注システムによる複合体での結晶化の条件検討を行った。約 1000 条件程度の条件検討を行った結果、0.1M-クエン酸ナトリウム pH5.0, 10%(w/v) PEG20K 条件で、ポリ微結晶が得られた。この結晶化条件の結晶のシード結晶を用いて、良好な結晶作製を行った。様々な条件化で、結晶の大きさは平均 30 ミクロンの結晶を得ること

ができた。実験系の X 線発生装置 (40kV, 30mA) を使用し、反射点を確認した結果、約 4 Å 程度の反射点を得た。反射点の積分とスケールリングを行い、大まかなマップを計算したところ、分解能が低く、位相の決定の改善は至ってない。今後、質の良い結晶化の条件検討と、大型放射光施設 SPring8 及び Photon Factory で X 線回折実験を行う予定である。さらに、複合体の試料により、Cryo-EM の単粒子解析にも試みる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishimoto Naito, Park Jae-Hyun, Kawakami Kouki, Tajiri Michiko, Mizutani Kenji, Akashi Satoko, Tame Jeremy R. H., Inoue Asuka, Park Sam-Yong	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural basis of CXC chemokine receptor 1 ligand binding and activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-39799-2	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 -
1. 著者名 Heo Y, Ishimoto N, Jeon YE, Yun JH, Ohki M, Anraku Y, Sasaki M, Kita S, Fukuhara H, Ikuta T, Kawakami K, Inoue A, Maenaka K, Tame JRH, Lee W, Park SY.	4. 巻 20(8)
2. 論文標題 Structure of the human galanin receptor 2 bound to galanin and Gq reveals the basis of ligand specificity and how binding affects the G-protein interface.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS Biol.	6. 最初と最後の頁 e3001714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3001714.	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 Park JH, Iwamoto M, Yun JH, Uchikubo-Kamo T, Son D, Jin Z, Yoshida H, Ohki M, Ishimoto N, Mizutani K, Oshima M, Muramatsu M, Wakita T, Shirouzu M, Liu K, Uemura T, Nomura N, Iwata S, Watashi K, Tame JRH, Nishizawa T, Lee W, Park SY.	4. 巻 606(7916)
2. 論文標題 Structural insights into the HBV receptor and bile acid transporter NTCP.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature.	6. 最初と最後の頁 1027-1031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-022-04857-0.	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 Kim S, Yoon I, Son J, Park J, Kim K, Lee JH, Park SY, Kang BS, Han JM, Hwang KY, Kim S.	4. 巻 35(4)
2. 論文標題 Leucine-sensing mechanism of leucyl-tRNA synthetase 1 for mTORC1 activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 109031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109031.	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 Yun JH, Li X, Yue J, Park JH, Jin Z, Li C, Hu H, Shi Y, Pandey S, Carbajo S, Boutet S, Hunter MS, Liang M, Sierra RG, Lane TJ, Zhou L, Weierstall U, Zatsepin NA, Ohki M, Tame JRH, Park SY, Spence JCH, Zhang W, Schmidt M, Lee W, Liu H.	4. 巻 118(13)
2. 論文標題 Early-stage dynamics of chloride ion-pumping rhodopsin revealed by a femtosecond X-ray laser.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2020486118.	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
研究分担者	渡士 幸一  (Watashi Koichi)  (40378948)	国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・総括研究官    (82603)	

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