

令和 6 年 9 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15046

研究課題名（和文）ベータコロナウイルスの粒子形成機構の構造生物学的研究

研究課題名（英文）Structural study of beta-coronavirus particle formation mechanism

研究代表者

張 志寛 (ZHANG, ZHIKUAN)

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：60866937

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：COVID-19感染症は終息したとは言えず、依然として新規感染および感染後の後遺症が重大な公衆衛生危機となっている。SARS-CoV-2ウイルスに関する研究は世界中に盛んで行われていたが、ウイルス粒子の形成機構は不明だった。本研究は、クライオ電子顕微鏡解析を用いて、SARS-CoV-2の粒子形成に必要な構造タンパク質であるMタンパク質の高分解能構造および構造多型を可視化した。Mタンパク質はコンパクトな2量体を形成し、longとshortの2種類のコンフォメーションを形成している。本研究はMタンパク質の構造多型がMタンパク質によるSARS-CoV-2の粒子形成に重要であることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SARS-CoV-2は終息しておらず、今後も人類と共存する病原体の一種である。現在、プロテアーゼ阻害剤やSタンパク質を発現させたmRNAワクチンなどの治療・予防方法が主に開発が進められてきたが、その変異株が既存の治療法を迅速に無効化するという懸念がある。よって、より多面的な治療手法の開発が必要であり、ウイルスの粒子形成に重要な役割を果たすMタンパク質は可能性のある創薬標的である。本研究で可視化されたMタンパク質の3次元構造は、今後Mタンパク質を標的とする創薬の構造基盤を提供している。

研究成果の概要（英文）：The outbreak of COVID-19 since the end of 2019 has not ended, and new infections and post-infection long COVID remain a significant public health crisis. Although research on the SARS-CoV-2, the cause of COVID-19, has been active worldwide, the virus particle formation mechanism was still largely unknown. In this research, we used cryo-EM analysis to visualize the high-resolution three-dimensional structure and structural polymorphism of SARS-CoV-2 M protein, a structural protein required for the formation of SARS-CoV-2 virus particles. M proteins forms compact dimeric structures with two different conformations known as the long and short forms, respectively. These structures suggest that the structural polymorphism of M protein is important for the formation of SARS-CoV-2 particles mediated by M protein.

研究分野：構造生物学

キーワード：ベータコロナウイルス SARS-CoV-2 Membrane protein 粒子形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

COVID-19 パンデミックは 2019 年末に流行し始め、現在も long COVID を含め、世界中で重大な公衆衛生危機となっている。この感染症の原因となるウイルス、SARS-CoV-2 は、以前報告された SARS ウイルスや MERS ウイルスと同様に、ベータコロナウイルス(-CoV) 属に属している。-CoV は、脂質二重膜の外殻を有し、その表面にはスパイク(S)、メンブレン(M)、エンベロープ(E)の構造タンパク質が存在します。内部にはヌクレオカプシド(N)構造タンパク質によって包まれたゲノム RNA が含まれている。

M タンパク質は SARS-CoV-2 ウイルス粒子の中で豊富に存在し、ウイルス粒子の組み立てに必要な主要な因子である。このタンパク質は約 25 kDa の分子量を持ち、三回膜貫通ヘリックスとウイルス粒子の内部に局在するコンパクトなドメインから構成されており、ウイルス粒子の表面にはわずかに露出している部分がある。SARS-CoV-2 の S タンパク質が感染受容体 ACE2 との結合様式、N タンパク質が RNA との相互作用は広く研究されているが、M タンパク質の構造やそれがウイルス粒子の形成にどのように寄与するかについては当時白紙であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、SARS-CoV-2 の M タンパク質の三次元構造を高分解能で解析することで、SARS-CoV-2 を含む -CoV のウイルス粒子形成機構を解明することを目的としていた。SARS-CoV-2 がすでに人間社会に根付いており、今後も人類と共存する感染症の一種である。現在、3C 様プロテアーゼ阻害剤、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ阻害剤、S タンパク質をターゲットとする中和抗体、および S タンパク質を発現させた mRNA ワクチンが主な治療および予防の手段として開発が進められてきた。しかし、SARS-CoV-2 の変異株が頻繁に現れるため、既存の治療法が迅速に無効化されるという問題がある。このため、SARS-CoV-2 に対してより多角的な治療手法の開発が求められており、ウイルスの複製サイクルで重要な役割を果たす M タンパク質を標的とした創薬が大きな可能性を秘めている。よって、本研究は M タンパク質をターゲットとする治療方法の開発の構造基盤を提供することを目的としていた。

### 3. 研究の方法

(1) M タンパク質の発現と精製: 高分解能の構造解析に適した M タンパク質を得るため、哺乳類細胞発現系を用いて M タンパク質を発現させ、数種類の界面活性剤で脂質膜画分から M タンパク質を可溶性させ、M タンパク質の高純度精製を行った。また、精製された 2 量体型 M タンパク質から重合体型 M タンパク質の再構成方法についても検討した。

(2) M タンパク質のクライオ電子顕微鏡(電顕)構造解析: 2 量体型および重合体型 M タンパク質を単独、または M タンパク質と特異的に結合する抗体 Fab 分子(京都大学大学院医学研究科・野村紀通 准教授らが提供)の存在下でクライオ電顕解析を行った。一般的に、まずスクリーニング撮影を行った上、構造解析の見込みのある試料について東京大学の共用クライオ電子顕微鏡施設においてデータ収集を行った。

(3) M タンパク質と他の構造タンパク質との結合・構造解析: M タンパク質は N タンパク質および RNA との結合が報告されている。本研究は、可溶性精製された M タンパク質と N タンパク質および RNA との結合をゲルろ過クロマトグラフィーおよびプルダウンアッセイを用いて検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) 2 量体型 M タンパク質の構造決定および構造多型

本研究はクライオ電顕単粒子解析により、2 種類の M タンパク質/Fab 複合体 (M/Fab-E 複合体 [PDB: 7VGR] および M/Fab-B 複合体 [PDB: 7VGS]) をそれぞれ分解能 2.7 Å および 2.8 Å で構造解析に成功した(図 1)。M タンパク質はコンパクトな 2 量体を形成しており、広範囲な疎水性および親水性相互作用を介して 2 量体化をする。面白いことに、Fab-E および Fab-B と結合した M タンパク質は異なるコンフォメーションを形成しており、それぞれ long form および short form と名付けられた(図 1)。それらの構造は初めてベータコロナウイルス M タンパク質ファミリーの構造多型を高分解能で可視化できた結果である。

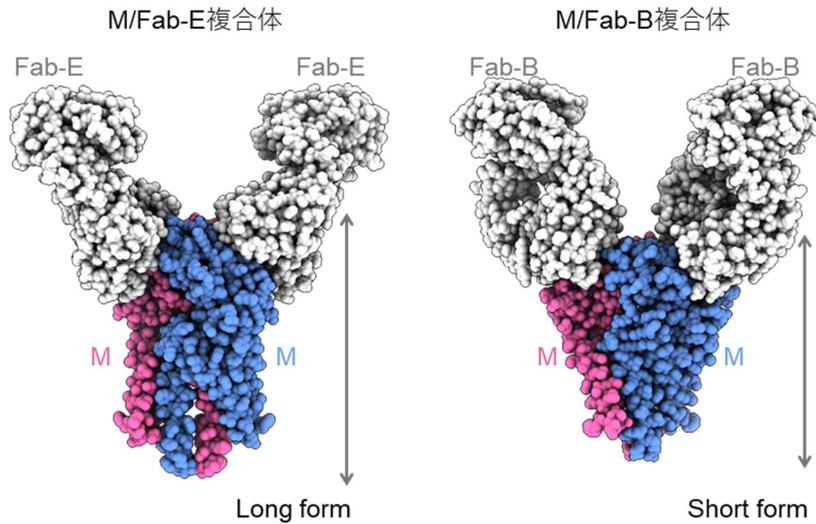


図1. Mタンパク質のクライオ電子顕微鏡構造

(2) Mタンパク質とNタンパク質およびRNAとの結合解析

ゲル濾過クロマトグラフィー分析の結果、可溶性精製されたMタンパク質はRNAと非常に弱い相互作用を示していた。Mタンパク質の正に帯電するシートドメイン (BD) がこの結合を仲介すると考えられる (図2)。また、プルダウンアッセイの結果では、Mタンパク質とNタンパク質との結合はRNAの存在下で増加されることが分かった。これらの結果は既報の研究と一致し、Mタンパク質によるNタンパク質/RNAのリクルートを検証した結果である。

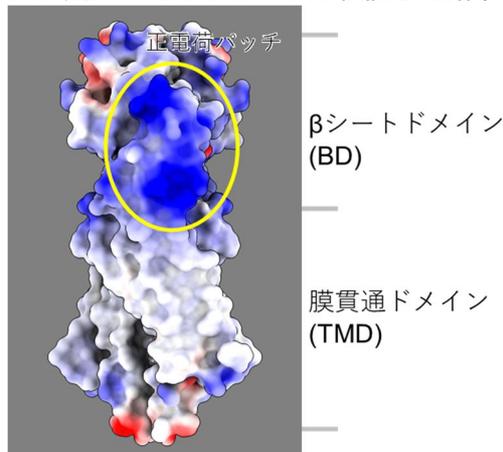


図2. 二量体型Mタンパク質 (long form) の表面図

(3) Mタンパク質の構造における druggable site の推定

Mタンパク質の高分解能での構造決定に成功したため、2量体型Mタンパク質の構造中における druggable site の推定をした (図3)。Long formおよびshort formのMタンパク質の構造中にはそれぞれシートドメイン (BD) の2量体界面にあるBD site、TMDの2量体界面に位置するTMD siteおよび膜近傍に位置するjuxtamenbrane siteがポケットのような空間となり、潜在的な創薬ポケットとなることが期待される。今後、Mタンパク質の構造ベース創薬および共同研究で開発されたMタンパク質の阻害剤との結合・構造解析を行う予定である。

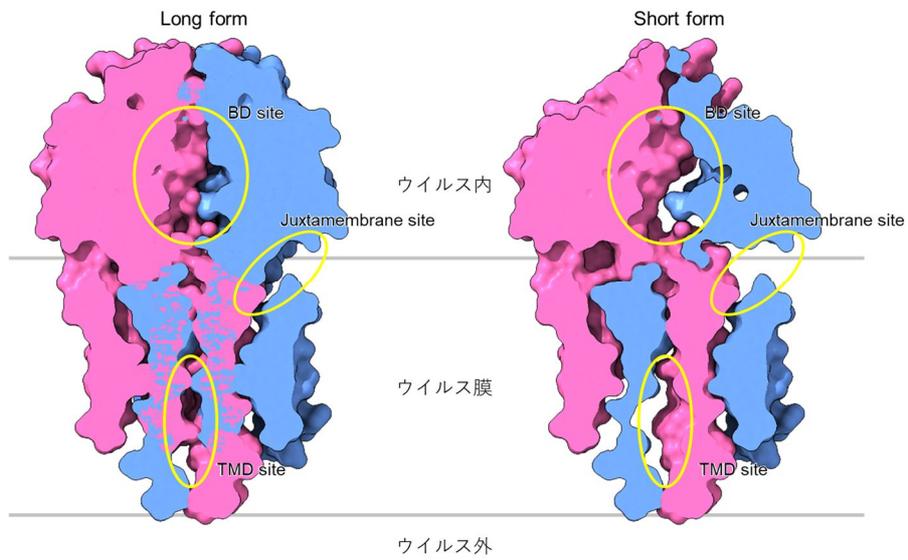


図 3. 二量体型 M タンパク質の構造における druggable site の推定

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 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhang Zhikuan, Nomura Norimichi, Muramoto Yukiko, Ekimoto Toru, Uemura Tomoko, Liu Kehong, Yui Moeko, Kono Nozomu, Aoki Junken, Ikeguchi Mitsunori, Noda Takeshi, Iwata So, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-32019-3	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 Asami Jinta, Kimura Kanako Terakado, Fujita-Fujiharu Yoko, Ishida Hanako, Zhang Zhikuan, Nomura Yayoi, Liu Kehong, Uemura Tomoko, Sato Yumi, Ono Masatsugu, Yamamoto Masaki, Noda Takeshi, Shigematsu Hideki, Drew David, Iwata So, Shimizu Toshiyuki, Nomura Norimichi, Ohto Umeharu	4. 巻 606
2. 論文標題 Structure of the bile acid transporter and HBV receptor Ntcp	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-022-04845-4	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 該当する

1. 著者名 Koutsogiannaki Sophia, Bu Weiming, Maisat Wiriya, Manzor Mariel, Zhang Zhikuan, Ohto Umeharu, Eckenhoff Roderic G., Yuki Koichi	4. 巻 36
2. 論文標題 Propofol directly binds to and inhibits TLR7	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202200312R	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 該当する

1. 著者名 Zhang Zhikuan, Shibata Takuma, Fujimura Akiko, Kitaura Jiro, Miyake Kensuke, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 622
2. 論文標題 Structural basis for thioredoxin-mediated suppression of NLRP1 inflammasome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 188 ~ 194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-023-06532-4	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 Asami Jinta, Park Jae-Hyun, Nomura Yayoi, Kobayashi Chisa, Mifune Junki, Ishimoto Naito, Uemura Tomoko, Liu Kehong, Sato Yumi, Zhang Zhikuan, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Drew David, Iwata So, Shimizu Toshiyuki, Watashi Koichi, Park Sam-Yong, Nomura Norimichi, Ohto Umeharu	4. 巻 31
2. 論文標題 Structural basis of hepatitis B virus receptor binding	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 447 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-023-01191-5	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Zhikuan Zhang, Umeharu Ohto, Toshiyuki Shimizu
2. 発表標題 Structural analysis of SARS-CoV-2 membrane protein
3. 学会等名 26th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>新型コロナウイルスのウイルス形成に必須の膜タンパク質の構造を解明  <a href="https://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=1&amp;key=1659694874">https://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=1&amp;key=1659694874</a>          新型コロナウイルスのウイルス形成に必須の膜タンパク質の構造を解明  <a href="https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0111_00052.html">https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0111_00052.html</a></p>
---

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

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
---------	---------