

平成22年 5月24日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008年度～2009年度
 課題番号：20770075
 研究課題名（和文）SARS コロナウイルスのウイルス粒子形成に関わる蛋白質複合体の構造生物学的研究
 研究課題名（英文）The structural biological study of the macromolecular complex involved with formation of SARS-CoV virions
 研究代表者
 坂井 直樹（SAKAI NAOKI）
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教
 研究者番号：20422008

研究成果の概要（和文）：

重症急性呼吸器症候群(SARS)の原因ウイルスである SARS コロナウイルス(SARS-CoV)の感染宿主細胞における増殖に関わる蛋白質複合体の構造解析を目的として研究を行った。SARS-CoVを構成するN蛋白質とM蛋白質は感染した細胞内で相互作用し、これをきっかけに新たなウイルスが細胞から出芽してくる。その分子レベルでの仕組みを解明するためにX線結晶構造解析を行うこととした。本研究では解析に用いるN蛋白質の調製を行った。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is elucidating the molecular basis of budding of SARS coronavirus (SARS-CoV). In the initiation stage of a budding of virion from infected host cell, N protein and M protein are interacted. This interaction is considered as a trigger of budding of SARS-CoV. To obtain a detail of the molecular mechanism of this phenomenon, I tried to solve the crystal structure of the macromolecular complex of N and M proteins and established the preparation method of N protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：構造生物学, 蛋白質結晶学, SARS コロナウイルス,

1. 研究開始当初の背景

重症急性呼吸器症候群(SARS)は2002年11月に中国広東省で最初の症例が発見された。その後2003年2月に香港に端を發

した世界レベルでの集団発生(パンデミック)によって2003年7月までに世界29カ国・地域で8,000を超える症例と、約800名の死者を出した。SARSはウイルス性の

新興感染症であり、その高い死亡率と感染拡大の速さから世界中を恐怖に陥れたことは記憶に新しい。この集団発生期間に SARS の原因ウイルスが従来とは異なる新規なコロナウイルス (SARS コロナウイルス; SARS-CoV) であることが明らかになった。

SARS-CoV は4つの構造蛋白質と (+)鎖ゲノム RNA によって構成されるエンベロープウイルスである。ウイルスのエンベロープはスパイク (S), 膜 (M), エンベロープ (E) の各蛋白質および感染宿主由来の脂質より成る。ウイルスゲノム RNA にはヌクレオキャプシド (NP) 蛋白質が結合し、らせん状のヌクレオキャプシドを形成していると考えられている。

SARS-CoV の細胞内増殖は 1)ウイルスの細胞内侵入, 2)ウイルス蛋白質の合成およびウイルス RNA の複製, 3)ウイルス粒子形成・出芽 (budding) の過程に分けられる。私たちはこれらの段階の中でもウイルス粒子形成・出芽の分子メカニズムに注目して研究を行ってきた。本研究の開始までに、HEK293T 細胞を用いて SARS-CoV のウイルス様粒子 (VLPs) を形成するアッセイ系を用い、細胞内での N 蛋白質と M 蛋白質の相互作用とウイルス粒子形成の関連性を調べた。その結果、N 蛋白質と M 蛋白質の結合が、ウイルス粒子形成の効率維持に関わっていることを明らかにした。しかし、N-M 複合体の形成とウイルス粒子形成の関連の分子機構は謎のままであった。

2. 研究の目的

本研究では N-M 複合体の構造生物学的解析により、N-M 複合体を中心としたウイルス粒子形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。

研究期間に X 線結晶構造解析による N-M 複合体の立体構造解析を行う。解析された立体構造に基づき、N および M 蛋白質の変異体を作成し、ウイルス様粒子を用いたアッセイ系を用いて N-M 複合体の形成を中心としたウイルス粒子形成機構に関する知見を得る。本研究は SARS-CoV の感染細胞内における増殖機構について鍵となる分子の構造情報を包含した新規な学術的知見をもたらすことが期待された。また、本研究で明らかにされる分子構造情報は SARS 感染の拡大を防ぐための抗ウイルス物質を開発するための基盤情報としての応用も期待された。

また、本研究は感染宿主細胞内におけるウイルス粒子形成の分子機構に注目し、構造生物学的、分子生物学的側面から調べるものである。分子構造情報に基づいてウイルスの複製メカニズムを詳細に解析した例

は少数である。本研究はウイルスのライフサイクルの中でも宿主細胞の細胞内装置を利用して新たなウイルス粒子を形成するための鍵となる蛋白質間相互作用に関する研究である。ウイルスは感染により宿主の細胞内の機能を利用し、生物のように自己を複製し、自己の遺伝情報をパックした粒子を放出していく。ウイルスにとって「生命現象」は宿主の体内でのみ行われる。そのため、宿主細胞内におけるウイルス蛋白質の働きはウイルスにとって「生きること」である。本研究により、ウイルスが遺伝情報を伝えていくための新たな粒子形成の過程を、宿主細胞の装置（ここでは主に小胞体）とウイルス由来蛋白質複合体の関わりを中心として明らかにすることで、ウイルスの生命現象に関する新たな一面が提示できると考えられた。

3. 研究の方法

蛋白質の結晶構造解析を行うためには純度の高い蛋白質試料を調製する必要がある。本研究では N-M 複合体の結晶を作成するために、N 蛋白質と M 蛋白質を個別に調製し、それぞれを高純度に精製した後に複合体を形成することを計画した。N 蛋白質はその全長を大腸菌組換え発現系を用いて可溶性蛋白質として発現した。組換え N 蛋白質はイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。

M 蛋白質は3回膜貫通ヘリックスによって小胞体膜に埋め込まれており、その C 末端側の領域が細胞質側に露出している。N 蛋白質とはこの C 末端側領域を介して結合している。本研究では M 蛋白質の C 末端側領域を大腸菌組換え発現系を用いて調製した。この際、結晶化に最適な C 末端側領域を調製するため、開始部位の異なる複数のバリエーションで組換え蛋白質を作成した。このときの開始アミノ酸は SOSUI サーバーによる膜貫通ヘリックス予測の結果を利用した。

M 蛋白質は大腸菌組換え発現系を用いてポリヒスチジンタグ付きの封入体として発現させ、グアニジン塩酸塩を含んだ緩衝液で変性させた。変性状態で Ni アフィニティカラムにより精製した後、M 蛋白質を段階透析法によりリフォールディングした。

M 蛋白質は大腸菌組換え発現させた場合、不溶性顆粒を形成し易いという報告がある。この問題を解決するために、宿主大腸菌内に N 蛋白質と M 蛋白質を共発現させることで、N-M 複合体を菌体内で安定に形成させた後に精製する系の構築を行った。

4. 研究成果

従来、N-M 複合体は HEK293 細胞を用いた組換え発現系において共発現が認められて

いたが、構造解析用試料として使用するためには著しく発現量が不足していた。さらに大腸菌組換え発現系を用いた場合、M蛋白質は封入体を形成し、可溶性蛋白質として調製することは困難であったため、N-M複合体を巻き戻し法により調製することを試みた。N蛋白質は可溶性蛋白質として発現することから、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。M蛋白質は遺伝子組換え大腸菌より封入体として調製した。これらの蛋白質を6M グアニジン塩酸を含んだ Tris 緩衝液 (pH 8.0) に溶解した後に混合した。この変性 N-M 混合溶液のグアニジン濃度を段階透析法により下げることで巻き戻しを行った。その結果、N蛋白質の可溶化を認めたが、M蛋白質の可溶化は認められなかった。また M蛋白質に付加したポリヒスチジンタグを用いたアフィニティクロマトグラフィーによる精製を行ったが、N-M複合体の形成もこれを認めなかった。さらに小麦胚芽無細胞発現系を用いた共発現を実施したが、これも複合体を調製するには至らなかった。

HEK293細胞を用いた N-M複合体の調製は高コストかつ低効率であるが、今後はこの方法を用いて試料調製を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. 田中勲, 渡邊信久, 姚閔, 坂井直樹
特集 タンパク 3000 プロジェクトの産んだもの
第I部 成果とインパクト: 個別的解析拠点の研究成果
転写・翻訳 翻訳系蛋白質を中心に
蛋白質核酸酵素 **53(5)**, 608-611 (2008年4月号)
2. Naoki Sakai and Tokiyoshi Ayabe
Antimicrobial peptides in the gut innate immunity
International Journal of Probiotics and prebiotics. **3**, 123-126 (2008).
3. Begum Parvin, Naoki Sakai, Takeshi Hayashi, Gao Yung-gui, Tomohiro Tamura, Nobuhisa Watanabe, Min Yao and Isao Tanaka
Crystal structure of SCO6571 from *Streptomyces coelicolor* A3(2)
Protein Pept. Lett. **15(7)**, 709-712 (2008).

[学会発表] (計11件)

1. 坂井直樹, 北郷悠, 竹本研, 松田知己, 綾部時芳, 永井健治
活性酸素高拡散型蛍光蛋白質 KillerRed の

結晶構造解析

第27会 PF シンポジウム, 2010.3.9-10, つくば国際会議場 (つくば市)

2. 坂井直樹, 北郷悠, 竹本研, 松田知己, 綾部時芳, 永井健治
光増感蛍光蛋白質 KillerRed の結晶構造解析
2009年度日本生物物理学会北海道支部例会, 2010.3.8, 北海道大学理学部
3. 川口晶, 鈴木忠樹, 木村享史, 坂井直樹, 綾部時芳, 澤洋文, 長谷川秀樹
Identification of a novel antimicrobial peptide derived from mouse-beta-defensin-like protein
第32回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, パシフィコ横浜
4. 増田晃士, 坂井直樹, 綾部時芳
Regulation of the selective bactericidal activity of the mouse α -defensin, cryptdin-4
第32回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, パシフィコ横浜
5. 坂井直樹, 北郷悠, 竹本研, 松田知己, 永井健治
蛍光蛋白質 KillerRed の S-SAD 法による結晶構造解析
日本結晶学会 2009年度年会, 2009.12.5-6, 関西学院大学西宮上ヶ原キャンパス
6. 増田晃士, 坂井直樹, 綾部時芳
マウス α -defensin, cryptdin-4 のジスルフィド結合が殺菌活性に及ぼす影響
第9回日本蛋白質科学会年会, 2009.5.20, 熊本全日空ホテルニュースカイ
7. Rie Fukaya, Koji Masuda, Naoki Sakai and Tokiyoshi Ayabe
Regulated roles of Paneth cell α -defensin in mouse small intestine and its molecular mechanism of bactericidal activity
Hokkaido University Mahidol University Joint Symposium, 12-13 May, 2009 Hokkaido University, Japan
8. 増田晃士, 坂井直樹, 綾部時芳
マウス α デフェンシン, cryptdin4 の殺微生物作用の分子機構
日本生物物理学会第46回年会, 2008.12.3-5, 福岡国際会議場
9. Naoki Sakai
Regulated roles of Paneth cell α -defensin in mouse small intestine and its molecular mechanism of bactericidal activity

Regulation in Innate Immunity, from Recognition Molecules to Antimicrobial Peptides, 28-29 October, 2008 Hokkaido University, Japan

10. Koji Masuda, Naoki Sakai, Tokiyoshi Ayabe
The structural property in bactericidal activities of mouse α -defensin, cryptdin-4
第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム,
2008.9.7-11, 淡路夢舞台国際会議場

11. Naoki Sakai, Ayane Morita, Yukako Ushijima, Min Yao, Nobuhisa Watanabe and Isao Tanaka
Crystal structure analysis of the oligo-peptide binding protein OppA complexed with peptides
XXI Congress of the International Union of Crystallography, 23-31 August, 2008 Osaka, Japan

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 直樹 (SAKAI NAOKI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

研究者番号：20422008