

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	新型コロナウイルス M タンパク質とヒト PCNA との分子間相互作用の構造生物学的解明				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博
	研究分担者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	原 幸大
		所属・職名	薬学部・講師	氏名	菱木 麻美
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博

講演題目	SARS-CoV-2 M タンパク質とヒト PCNA との相互作用を検討するための組換えタンパク質の調製
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>【背景】2019年に端を発する新型コロナウイルスの感染拡大は、相次ぐ変異ウイルスの出現により、今後もパンデミックの脅威は続くであろう。これまでに、S タンパク質コードする RNA ワクチン、3CL プロテアーゼや RNA ポリメラーゼを標的とした経口治療薬などが開発され、様々な対策が講じられているが、新型コロナウイルスの構造と機能を原子レベルで理解し、様々な作用機序に基づくワクチンや治療薬の開発が求められる。最近のインタラクトーム解析により、新型コロナウイルスの粒子形成に関わる M タンパク質がヒト PCNA と相互作用する可能性が示唆された (Gordon <i>et al.</i>, <i>Nature</i>, 2020)。さらに、新型コロナウイルス感染細胞において、PCNA が核内から細胞質に移行し、M タンパク質と細胞質で相互作用することが示され、興味深いことに PCNA の細胞質移行を阻害すると、ウイルスの複製が減少した (Zambalde <i>et al.</i>, <i>Front. Cell. Infect. Microbiol.</i>, 2022)。通常、PCNA は増殖細胞の核内に存在し、DNA 複製・修復の足場となる重要なタンパク質として広く知られているが、近年では PCNA の細胞質移行及び細胞質における PCNA の機能が注目されている。M タンパク質-PCNA 相互作用の詳細は不明であり、相互作用のメカニズムを構造生物学的手法により原子レベルの解像度で解明することは、新たな機序に基づくワクチン及び治療薬開発の一助となり、静岡県発の研究成果が、地球規模での保健衛生に貢献すると期待される。【目的】本研究では、<i>in vitro</i> で新型コロナウイルス M タンパク質とヒト PCNA との物理的相互作用を検証するため、M タンパク質を大腸菌を用いた組換えタンパク質として調製することを目的とした。【結果】目的遺伝子の全長及び膜外領域を大腸菌を用いた組換えタンパク質として発現させるため、目的遺伝子のコドンで大腸菌のコドンへと変更し、GST タグあるいは His タグを融合した組換えタンパク質を発現させるベクターを作成した。ホスト大腸菌として、BL21 (DE3) 及びシャペロンを共発現させる BL21 (DE3)pG-KJE8、BL21 (DE3)pG-Tf2 を用いた。誘導方法は、0.2 mM IPTG と IPG を用いない自動誘導を検討し、誘導温度は 25 °C と 18 °C を比較した。その結果、全長に関しては何れの条件においても目的タンパク質の発現を確認できなかった。一方、膜外ドメインに関しては、何れの条件においても目的タンパク質は良好に発現した。BL21 (DE3) を用いた場合では、何れの条件においてもほとんど可溶化しなかったが、BL21 (DE3)pG-KJE8 あるいは BL21 (DE3)pG-Tf2 を用いた場合では、GST 融合タンパク質の可溶化が促進され、特に BL21 (DE3)pG-Tf2 を用いた自己誘導の条件で良好な結果が得られた。今後、M タンパク質の膜外領域の組換えタンパク質を調製し、PCNA との相互作用を検討していく予定である。</p>