

## 新型コロナウイルスのアクセサリータンパク質 ORF8 大量合成に成功

新型コロナウイルスの ORF8 タンパク質について、タバコ培養細胞を用いた植物ウイルス大量合成システムにより、均一な ORF8 タンパク質を大量に合成することに成功しました。

石川県立大学 森 正之准教授、今村 智弘特任講師、東村 泰希准教授が中心となり北陸先端科学技術大学院大学 生命機能工学領域の大木 進野教授と共同で、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のアクセサリータンパク質 ORF8 について、独自に開発したタンパク質大量合成システムを用いて均一に大量合成することに成功しました。

SARS-CoV-2 が引き起こす新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、現在世界で猛威を振るっております。COVID-19 の克服には、SARS-CoV-2 のもつタンパク質の機能解明が必須であります。SARS-CoV-2 のゲノム配列の解読により、SARS-CoV-2 は、少なくとも16種類の非構造タンパク質、4種類の構造タンパク質、少なくとも6または7種類のアクセサリータンパク質を感染細胞で合成することが明らかとなっております。

この中で、アクセサリータンパク質の1つである ORF8 タンパク質は、近縁ウイルスの ORF8 タンパク質と比べ相同性が低く、SARS-CoV-2 において特徴的なタンパク質であります。ORF8 は、免疫や炎症に関わるタンパク質に結合する可能性が報告されております。さらに、ORF8 遺伝子領域が欠失した SARS-CoV-2 株は、重症化しにくいことが報告されております。このことから、ORF8 タンパク質は、COVID-19 の重症化に関与していることが示唆されてきております。しかし、ORF8 タンパク質の機能は解明されておられません。

ORF8 タンパク質の機能解明には、均一な ORF8 タンパク質を大量に合成することが必要です。しかし、ORF8 タンパク質は分子内に3か所のジスルフィド結合(S-S結合)を持ち、さらにS-S結合で2量体になる複雑なタンパク質です。そのため大腸菌での均一な ORF8 の合成は極めて困難であります。そこで、これまでにタバコ培養細胞(タバコ BY-2 細胞)を宿主として独自に構築した大量タンパク質合成システムを用いて ORF8 タンパク質の大量合成を試みました。この合成システムの特徴は、薬剤(エスト

ラジオール)の添加によって、S-S 結合をもつ複雑な目的タンパク質を同調的に大量合成することができます(図1)。この生産システムを用いて ORF8 タンパク質の合成を試みたところ、培養液 1 L あたり ORF8 タンパク質を約 10 mg 合成することに成功しました(図2)。合成した ORF8 タンパク質を核磁気共鳴(NMR)装置により解析を行ったところ、均一な構造を持つ ORF8 タンパク質が生産されていることが明らかとなりました(図3)。

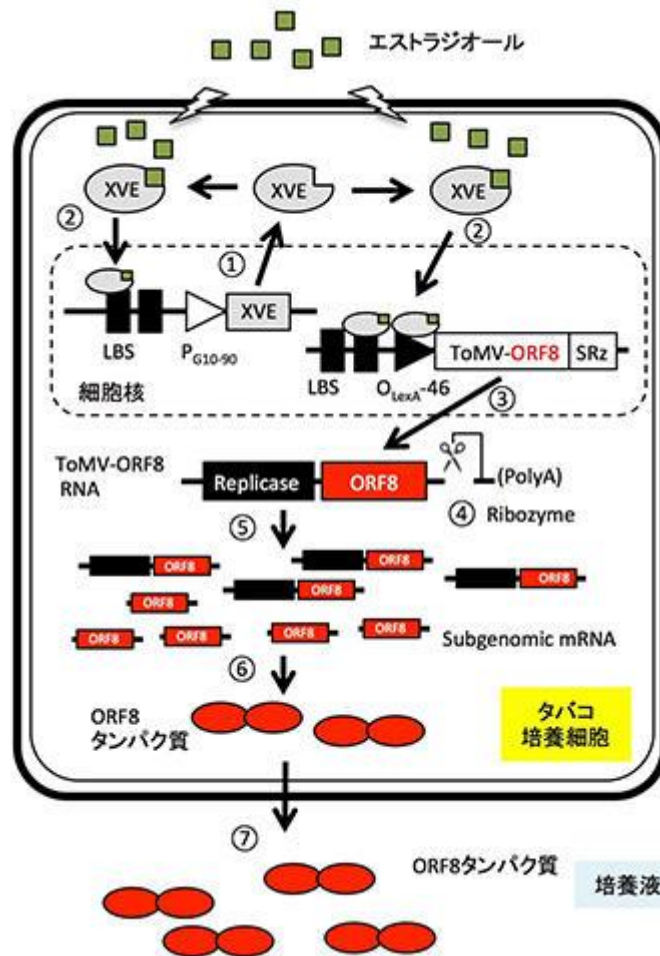


図1: 植物ウイルスを利用した薬剤誘導型 ORF8 タンパク質合成システムの概略図

①薬剤活性型転写因子(XVE)の発現。②薬剤(エストラジオール)添加によるXVEの活性化。③XVEによるトバモウイルス-ORF8融合遺伝子の発現。④リボザイムによるmRNA3'末端の切断。⑤サブゲノムRNAのmRNAの増幅。⑥ORF8タンパク質の翻訳。⑦ORF8タンパク質の細胞外への移行。ORF8タンパク質は、二量体を形成する。

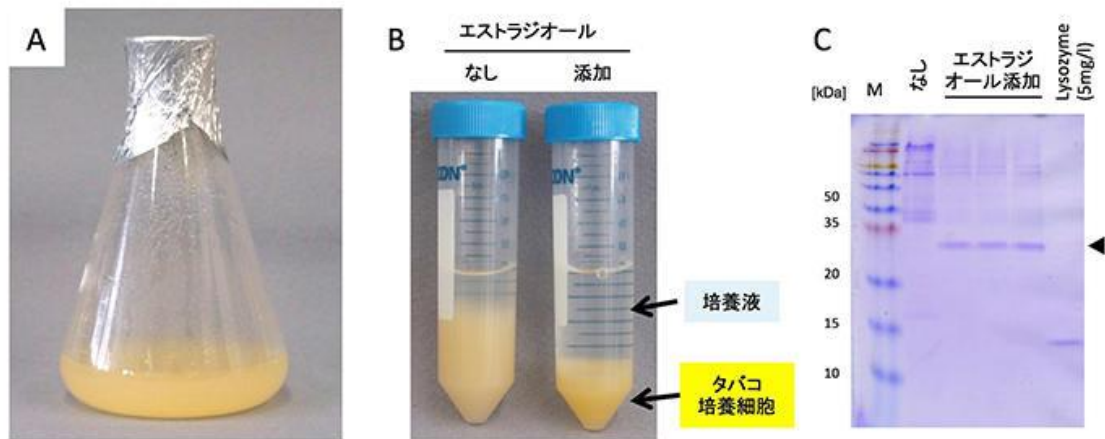


図2: タバコ培養細胞を用いた ORF8 タンパク質の合成

(A) ORF8 タンパク質を合成するタバコ BY-2 細胞 (B) 薬剤誘導処理を行ったタバコ BY-2 細胞 (C) 培養液中に放出された ORF8 タンパク質。矢じり: ORF8 タンパク質、M: 分子量マーカー

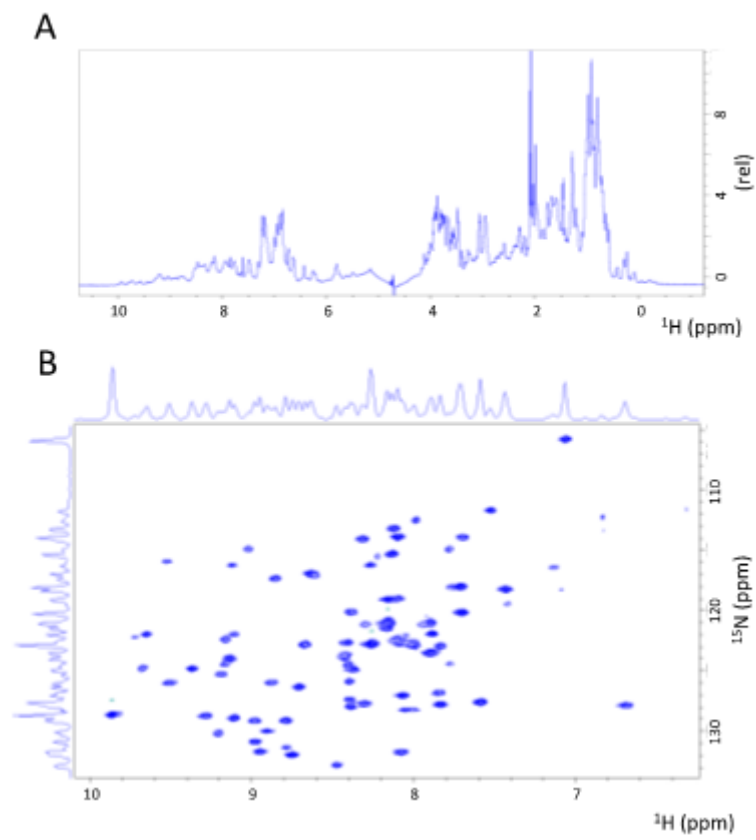


図3: ORF8 タンパク質の NMR スペクトル

(A) ORF8 タンパク質の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (B)  $^{15}\text{N}$  ラベルをした ORF8 タンパク質の  
二次元 NMR スペクトル( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC)

本研究成果によって、タバコ BY-2 細胞を用いて、均一な ORF8 タンパク質の大量合成に成功しました。今後、本システムで合成した ORF8 を用いて、ORF8 をターゲットにした治療薬の開発が期待できます。

## 【論文情報】

**タイトル** Production of ORF8 protein from SARS-CoV-2 using an inducible virus-mediated expression system in suspension-cultured tobacco BY-2 cells

**雑誌** Plant Cell Reports

**DOI** <https://doi.org/10.1101/2020.10.07.325910>

日本語原文

<https://www.jaist.ac.jp/whatsnew/press/2021/01/07-1.html>