

所属長	所属科長	事務(局/部)長
		

令和4年 4月 5日 

理 事 長 殿  
学 長 殿

### 令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

標記の件に関しまして、別紙のとおり報告いたします。

また、本研究報告の内容は、近畿大学学術情報リポジトリ（KURepo）に公開する旨、承諾いたします。

1. カテゴリー	<input checked="" type="checkbox"/> 研究 <input type="checkbox"/> 開発・提案 / カテゴリーNo23
2. 企画題目	変異型 SARS-CoV-2 の感染力迅速評価のためのハイスループット RBD 発現系の構築

研究代表者

所 属： 農学部・生物資源科学科

職・氏名： 教授・大沼貴之 



# 令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

企画題目	変異型 SARS-CoV-2 の感染力迅速評価のためのハイスループット RBD 発現系の構築
研究者所属・氏名	研究代表者：農学部・生物資源科学科 大沼貴之 共同研究者：農学部・生物資源科学科 武田 徹、谷 哲弥

## 1. 研究、開発・提案 目的及び内容

SARS-CoV-2 の感染は、ウイルス表面に存在するスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン(RBD)がヒト細胞表面のアンジオテンシン変換酵素 2(ACE2)と結合することによって開始される。本研究では、センザンコウ由来コロナウイルス Pangolin-CoV-MP789 の同タンパク質を用いて、感染力迅速評価のためのハイスループット RBD 発現系の構築を試みた。

## 2. 研究、開発・提案 経過及び成果

### 組換え型 RBD の発現系の構築

Pangolin-CoV-MP789 スパイクタンパク質の受容体結合ドメインをコードする遺伝子の合成：

人工遺伝子合成により RBD 遺伝子領域 (Accession no. A0A6M3G9R1) を合成した。その際、大腸菌でのタンパク質発現量を最大化させる目的で、コドンプリファレンスを考慮しつつアミノ酸配列は変更せずに遺伝子配列の最適化を行った。

大腸菌による組換え型 RBD の発現：

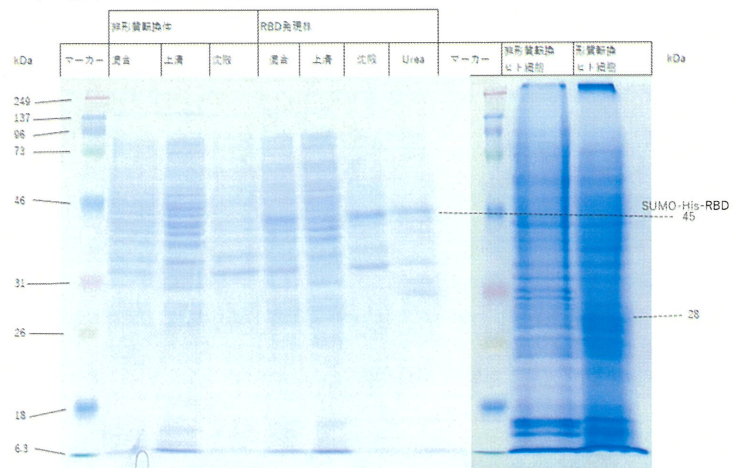
大腸菌 10G 株 (Lucigen 社) およびラムノース誘導型発現ベクター pRam-NHis (同社) を用いて、組換え型 RBD の発現系構築を行った。しかし目的のタンパク質の発現を確認することは出来なかったことから、同タンパク質の SUMO (Small Ubiquitin Modifying Protein) との融合タンパク質としての発現を試みるため、pRam-NHis SUMO に連結し、誘導発現を行った。その結果 SDS-PAGE により SUMO-HisTag-RBD タンパク質 (約 45kDa) が発現されたことを確認した (図 1)。

哺乳動物細胞による組み換え型 RBD の発現：

大腸菌発現用に最適化した RBD 配列を用いて哺乳動物発現ベクターにサブクローニングを行った後、ヒト由来 293T 細胞で組み換え型 RBD 発現させた。

### 組換え型 RBD の検出

大腸菌および哺乳動物細胞を用いて組換え型 RBD を発現後、超音波処理により菌体もしくは細胞液の破碎により抽出液を得、可溶性画分と不溶性画分を調製した。抗 SARS-CoV-2 (COVID-19) spike 抗体 Rabbit-Poly (ジーンテックス社) を用いたウェスタンブロッティングによる組換え型 RBD の検出を行ったところ、大腸菌破碎液の可溶性画分に SUMO-HisTag-RBD タンパク質 (約 45kDa) が検出されたものの、哺乳動物細胞抽出液の両画分に発現タンパク質のバンドは確認されなかった (図 1)。また、抗 HisTag 抗体を用いたウェスタンブロッティングによっても組換え型 RBD を検出することができなかったことから、同タンパク質は哺乳動物細胞によってウェスタンブロッティングによって検出されるほど発現されなかったか、発現後細胞内プロテアーゼによる分解を受けていることが示唆された。



(図 1 組換え型 RBD の SDS-PAGE)

3. 本研究と関連した今後の研究、開発・提案 計画

本研究の遂行により、少なくとも大腸菌を用いた組換え型 RBD の発現および抗 SARS-CoV-2 (COVID-19) spike 抗体による検出の実験系を構築することができた。今後は同タンパク質の変異体を用いて、変異導入と抗原抗体反応の相関関係を調べたいと考えている。また、スパイクタンパク質は本来糖タンパク質であり、タンパク質に付加している糖鎖が RBD の構造変化に関与し、感染性成立に重要な役割を果たしていることが報告されている。今後の計画として、遺伝子配列を最適化させない配列での発現や、タンパク質の翻訳後修飾である糖鎖付加を行うことができる哺乳動物細胞を用いた、組換え型 RBD の発現系構築を計画している。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)

5. 研究、開発・提案 課題の成果発表等

--