

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007年度～2010年度

課題番号：19790346

研究課題名（和文）コロナウイルス細胞侵入機構の解明：ウイルス膜融合蛋白の活性化に伴う構造変化の検出

研究課題名（英文）Cell entry mechanisms of coronaviruses: To detect the conformational changes of viral fusion protein.

研究代表者

松山州徳（SHUTOKU MATSUYAMA）

国立感染症研究所・ウイルス第三部 第四室・室長

研究者番号：90373399

研究成果の概要（和文）：重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）のエンベロープ糖蛋白（S蛋白）は、宿主プロテアーゼ（トリプシン、エラスターゼ、カテプシン、TMPRSS2）に切られて活性化される。インフルエンザウイルス等多くのエンベロープウイルスもプロテアーゼを利用するが、プロテアーゼの作用する様式がSARS-CoVとは異なる。インフルエンザウイルスの場合は細胞でウイルスが作られるときエンベロープ糖蛋白（HA）がプロテアーゼに切れ「膜融合誘導可能な形」になるが、SARS-CoVの場合は「細胞侵入の瞬間」にS蛋白が切られて膜融合開始の引き金が引かれる。我々はSARS-CoVによく似たS蛋白を持つマウス肝炎ウイルス（MHV-2）を用いて、S蛋白は二段階の構造変化をすることを検出した。まずS蛋白はレセプターに結合すると安定した三量体を形成し、Fusion Peptideを露出させ、細胞膜に突き刺さる。続いてプロテアーゼにより開裂を受け、内部のヘリックス構造を引きつけることによりウイルスと細胞の膜を引き寄せ、融合させると考えられる。このメカニズムはウイルスにとって標的細胞で確実に膜融合を誘導できる効率の良い仕組みである。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have demonstrated that the SARS-CoV S protein requires proteolytic cleavage by elastase, cathepsin or TMPRSS2 for S-mediated cell-cell or virus-cell membrane fusion. Activation of viral glycoprotein (GP) by protease also has been reported for influenza virus. The most distinctive difference between influenza virus and SARS-CoV is the stage during virus replication in which viral glycoproteins are cleaved by proteases. In influenza virus, the protease makes a simple cut in the GP during maturation. In contrast, SARS-CoV S protein is cleaved by the protease following receptor-induced conformational changes. The protease cleavage site in S protein is thought to be exposed only after receptor binding. In support of this model, we reported that the S protein of mouse hepatitis virus type 2 (MHV-2), which is highly similar to the S protein of SARS-CoV, requires two-step conformational changes mediated by sequential receptor binding and proteolysis to be activated for membrane fusion. Such a mechanism allows for tight temporal control over fusion by protecting the activating cleavage site from premature proteolysis yet allowing efficient cleavage upon binding to the receptor on target cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,500,000	0	1,500,000
20年度	600,000	0	600,000
21年度	500,000	0	500,000
22年度	600,000	0	600,000
年度			
総計	3,200,000	0	3,200,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：

キーワード：S 蛋白, エンベロープ, 構造変化中間体, 感染, 膜融合, ウイルス, MHV

### 1. 研究開始当初の背景

SARS-CoV と MHV-2 は新しいメカニズム「プロテアーゼ依存的細胞侵入」をすることが明らかとなっていた。トリプシン、エラスターゼ、カテプシンにより S 蛋白が活性化されることが予想されていたが、実際に S 蛋白の構造変化として検出されていなかった。また、SARS-CoV の感染を誘導す肺特異的なプロテアーゼは不明であった。

### 2. 研究の目的

この研究の長期的な目的は、ウイルス膜融合蛋白(Viral Fusion Glycoprotein: vFGp)の活性化メカニズムの解明、及びこの研究から得られる情報を抗ウイルス薬のデザインに応用することであった。vFGp の機能はウイルスと細胞の膜を融合させることである。巨大な蛋白であり(SARSのS蛋白の場合600kD)、複数の動作を連続的に起こすことにより活性化すると考えられ、そのメカニズムは極めて複雑である。この研究の短期的な目的は(本研究期間内の目的は)、第一にレセプターがvFGpにどのように結合しているかを明らかにすること、第二にvFGpが膜融合を引き起こすための構造変化を検出すること、第三にカテプシンによるvFGpの活性化メカニズムを分子レベルで明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

「ウエスタンブロット法」により、プロテアーゼ依存的な S 蛋白の構造変化を検出した。さらに「リポソーム浮遊法」により構造変化した S 蛋白の脂質膜親和性を検出した。また S 蛋白の膜融合活性の検出には、リアルタイム PCR を利用した「エントリーアッセイ」、及び細胞-細胞融合法を行った。

### 4. 研究成果

本研究では SARS-CoV と MHV-2 の細胞侵入において、4つの新しい知見を明らかにし、報告している。これらウイルスの細胞侵入は「①細胞表面からとエンドソームからの2通りのルートを通ること」、「②S 蛋白はレセプターとプロテアーゼによる二段階の構造変化をすること」、「③エンドソーム経路を通るとき、最終的に膜融合の引き金を引くのはプロテアーゼではなく、エンドソーム内因子であること」、「④SARS-CoV の肺胞上皮への感染は膜型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を利用する可能性があること」である。我々が明らかにしたメカニズムは、SARS-CoV が肺のプ

ロテアーゼを利用して標的細胞に確実に感染するための効率良い仕組みである。現在プロテアーゼ阻害剤による、抗ウイルス効果を検討しているところである。

### 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 8 件)

1. Matsuyama S. Protease dependent cell entry mechanism of Coronaviruses. *Uirusu* (2011) in press, review
2. Kashiwazaki H, Nomura R, Matsuyama S, Taguchi F & Watanabe R. Spongiform degeneration induced by neuropathogenic murine coronavirus infection. *Pathology international* (2011) 61: 184-191
3. Kyuwa S, Takagaki S, Matsuyama S, Taguchi F, Saegusa J, Iwakura Y, Tagawa Y-I & Yoshikawa Y. Characterization of a variant virus from ascitic fluid of subacute granulomatous serositis in interferon-gamma-deficient C57BL/6 mice persistently infected with murine coronavirus strain JHM. *Viral immunology* (2010) 23: 437-442
4. Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M & Taguchi F. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *Journal of virology* (2010) 84: 12658-12664
5. Matsuyama S & Taguchi F. Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis. *Journal of virology* (2009) 83: 11133-11141
6. Taguchi F & Matsuyama S. Cell entry mechanisms of coronaviruses. *Uirusu* (2009) 59: 215-222, review
7. Kawase M, Shirato K, Matsuyama S & Taguchi F. Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *Journal of virology* (2008) 83: 712-721
8. Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, Maejima M, Fukushi S, Morikawa S & Taguchi F. Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *Journal of virology* (2008) 82: 11985-11991

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Matsuyama S, Taguchi F. Conformational Changes Mediated by Receptor Binding and Proteolysis of a Murine Coronavirus Spike protein. 28th ASV Meeting 11-15 July 2009 The University of British Columbia, Vancouver, Canada
2. 松山州徳、田口文広：マウスコロナウイルス S タンパクの 2 段階構造変化の解析 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月
3. 松山州徳、田口文広：コロナウイルス感染過程における膜融合について、第 61 回日本細胞生物学会大会 名古屋国際会議場 2009 年 6 月
4. 松山 州徳、永田 典代、竹田 誠、氏家 誠、白戸 憲也、田口 文広、膜貫通型プロテアーゼ (TMPRSS2) による SARS コロナウイルスの細胞侵入活性化機構、第 6 回日本細胞生物学会学術集会 (大阪)、ポスター、2010 年 5 月 19 日
5. Shutoku Matsuyama, Noriyo Nagata, Makoto Takeda, Fumihiro Taguchi, Activation of SARS-coronavirus spike protein by transmembrane protease, TMPRSS2. The American Society for Virology 29th Annual Meeting (Montana)、ポスター、2010 年 7 月 17 日
6. Shutoku Matsuyama, Noriyo Nagata, Kazuya Shirato, Miyuki Kawase, Makoto Takeda, Makoto Ujike, Fumihiro Taguchi, Proteolytic activation of SARS coronavirus spike protein by the transmembrane protease, TMPRSS2, The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity (淡路島)、ポスター、2010 年 9 月 8 日
7. 松山 州徳、 コロナウイルス細胞侵入機構の解明、第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (徳島) 杉浦奨励賞受賞講演、2010 年 11 月 7 日
8. 松山 州徳、 宿主プロテアーゼの関与する SARS コロナウイルスの組織指向性について、第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (徳島)、シンポジウム 9、2010 年 11 月 9 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松山州徳 ( )

国立感染症研究所・ウイルス第三部第四室・室長

研究者番号：90373399

### (2) 研究分担者

無し