

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011-2012年度

課題番号：23790509

研究課題名（和文）エンベロープウイルスに対する抗ウイルスペプチド薬の新戦略

研究課題名（英文）Development of endosome targeted peptide inhibitors against enveloped viruses via endosomal pathway.

研究代表者

氏家 誠 (UJIKE MAKOTO)

日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 獣医感染症学教室・助教

研究者番号：50415478

研究成果の概要（和文）：エンベロープウイルスの膜融合蛋白質の heptad-repeat (HR) 領域を標的とした抗ウイルスペプチド薬 (HRP) は、ウイルスの膜融合活性を阻害する事で、ウイルス感染を抑制する。しかしながら、HRP は、細胞表面から直接侵入するウイルス<sup>※</sup>には高い抗ウイルス活性を示すが、エンドソームには取り込まれにくいいため、エンドサイトーシスで細胞に侵入するエンベロープウイルスにはほとんど効果がない。本研究では、HRP にコレステロール (Chol) を結合することでエンドソーム指向性に改変した HRP を作製し、細胞表面経路又はエンドサイトーシス経路で細胞侵入する各種コロナウイルス (CoV) を用いて抗ウイルス活性を評価した。この結果、HRP-chol は、CoV の細胞表面経路だけでなくエンドサイトーシス経路も効率良く阻止する事を明らかにした。これらの結果から、エンドサイトーシス経路を主な細胞侵入経路とするその他のエンベロープウイルス (インフルエンザウイルス・エボラウイルス等) にも、HRP-chol が応用可能であることが示唆された。

※最近の研究では、これまで細胞表面で膜融合を起こし細胞表面から侵入すると考えられてきた HIV や RSV など、エンドサイトーシスを利用して感染する事が報告されている。ここでは、従来の「エンドサイトーシス侵入経路」と区別するためこれらの細胞侵入方法を「細胞表面侵入経路」とした。

研究成果の概要（英文）：Short peptides (HRP), derived from the heptad repeat region of spike proteins on enveloped viruses using cell surface entry pathway, have been shown to block fusion activity, resulting in viral infection inhibition. However, HRP have a limited ability to transfer into endosomes, therefore they show low or insignificant antiviral activity for enveloped viruses using the endosomal entry pathway. In this study, we have designed cholesterol conjugated HRP (HRP-chol) which can be targeted to endosomes and evaluated their antiviral activities of cell surface or endosomal entry pathways of several coronaviruses (CoV). Our results indicated that HRP-chol showed potent antiviral activities against not only surface but endosomal entry pathways of several CoVs. These results suggested that HRP-chol antiviral strategy may be applied to broad-ranged enveloped viruses using the endosomal pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・ウイルス学

キーワード： コロナウイルス、S 蛋白質、膜融合、抗ウイルス薬、HRP、細胞侵入

### 1. 研究開始当初の背景

重症呼吸器症候群 (SARS)、高病原性トリインフルエンザ、エボラ出血熱はここ数十年で新たに発生した新興感染症で、激的な症状と高い致死率を示し世界に大きな脅威を与えた。これらの感染症はウイルスが原因で起こるが、インフルエンザを除いては有効な治療薬が無く、抗ウイルス薬の開発が急務となっている。

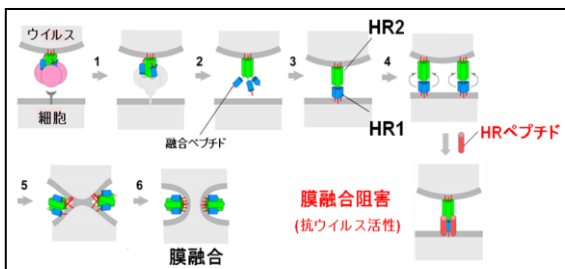


図 1

ウイルスは、粒子表面の脂質二重膜 (エンベロープ) の有無により大別され、冒頭のウイルスは全てエンベロープを有する。エンベロープウイルスが細胞に感染するためにはエンベロープ膜と細胞膜との膜融合が必要であり、この膜融合はウイルスの粒子表面にあるスパイク (S) 蛋白質によって誘導される。膜融合の際には、S 蛋白質に存在する 2 つの  $\alpha$  ヘリックス領域 (この領域を Heptad Repeat (HR1 及び HR2) と呼ぶ) が相互作用を起こし、エンベロープ膜と細胞膜を引き寄せることで膜融合を誘導する (図 1)。この時、HR 領域由来の短い合成 HR ペプチド (HRP) を加えると、この相互作用が阻害されウイルスの侵入が抑えられる (図 1)

HRP による抗ウイルス活性はウイルス種によ

って著しく効果が異なることが知られており、HIV や、麻疹ウイルスに対しては、極めて高い抗ウイルス活性 (nM レンジ) を示すのに比べ、エボラウイルスや SARS コロナウイルス (SCoV) ではその効果が千分の一程度 ( $\mu$ M レンジ) 低く、HRP が、『よく効く』ウイルスとあまり『効かない』ウイルスが存在する。この理由は長らく不明であったが、報告者は、SCoV のユニークな感染様式を利用してこの原因を解明した (氏家ら J.Virology 2008)。SCoV は、宿主プロテアーゼの有無により、細胞表面から侵入する経路とエンドサ

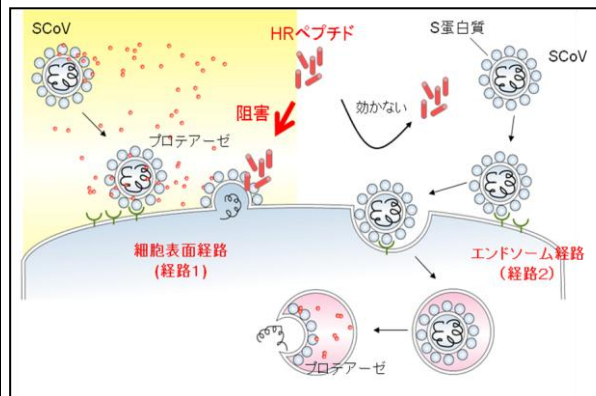


図 2

イトーシスを介した経路を使い分けるのだが (図 2) HRP の抗ウイルス活性をこの 2 つの感染経路で比較したところ、SCoV が細胞表面から侵入する際には、HR ペプチドが『よく効く』のに対し、エンドサイトーシスを介した侵入経路ではほとんど『効かない』ことがわかった。このことは「エンベロープウイルスはエンドソームを通ることで HRP の攻撃を回避できる」事を示し、実際、これまで報告されている『効かない』ウイルスは全てエンドサイトーシスで細胞に侵入する。この回避の

原因は、HRP がエンドソームに効率よく取り込まれないためエンドソーム内で十分な濃度を維持できず、この結果、抗ウイルス活性を発揮できないためと考えられる。従って、HRP をエンドソームに効率よくターゲティングすれば、これまで HRP が『効かない』と考えられていたウイルスに対しても、強力な抗ウイルス活性を持つと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、エンドソームに指向性のある HRP をデザインすることで、エンドサイトーシスで侵入するエンベロープウイルスの感染を効率良く阻止する抗ウイルスペプチド薬の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) エンドソーム指向性 HRP の作製

コレステロール(Chol)を結合した HRP (HRP-chol)は細胞膜に結合し細胞表面から侵入する HIV の感染を効率よく阻害する事が報告されている (Ingallinella P et al., PNAS 2009)。HRP-chol は、宿主細胞膜やウイルス膜に親和性を持つ事が考えられるため、フリーの HRP と異なり、ウイルス膜と一緒に又は宿主細胞膜からそのまま宿主のエンドソーム内に取り込まれる可能性が高く、エンドソームに指向性を持つと考えられる。従って、細胞表面から侵入するエンベロープウイルスだけでなく、エンドサイトーシス経路で侵入するエンベロープウイルスにも応用可能と考えられる。本研究では、SCoV の S 蛋白質の HR2 領域を元に HRP-chol を作製した(表 1)。

EK13 は HR2 領域の  $\alpha$ -helix 性を高めた HRP (表 1 下線部)。EK1 は、配列特異性のないコントロール HRP。Chol は Cholesterol。

表 1

Peptide	Sequence
HR2region	ISGINASVVN <u>IQKEIDRLNEVAKNLNE</u> SLIDLQEL
EK13	ISGINASVVN <u>IQEEIKKLNEEAKKLNE</u> SLIDLQEL
EK13-chol	ISGINASVVN <u>IQEEIKKLNEEAKKLNE</u> SLIDLQEL-Chol
EK1	IEEINKKVEE <u>IQKKIEELNKKAEELNK</u> KLEELQKK
EK1-chol	IEEINKKVEE <u>IQKKIEELNKKAEELNK</u> KLEELQKK-chol

### (2) 各種 CoV のシュードタイプウイルス

(CoVpp) の作製

CoVpp は、水泡性口内炎ウイルス (VSV) の粒子表面に、SARS-CoV、229E、NL63 由来のヒト CoV の S 蛋白質を持ち、VSV の複製に必須な G 蛋白遺伝子を GFP 遺伝子に置換して作製したシュードタイプウイルスである。CoVpp の細胞侵入様式は各種 CoV と全く同じであるが、複製能力がないため一度限りの感染しかできず、細胞侵入アッセイに適している。感染細胞は GFP を発現するため蛍光顕微鏡下で容易に観察・定量が可能である。

### (3) HRP-chol の抗ウイルス活性の評価

HRP-chol の抗ウイルス活性は、(2)で作製した CoVpp を用いてエンドサイトーシス経路と細胞表面経路の 2 つの経路で評価した。CoVpp は、宿主プロテアーゼの有無により、2 つの感染経路を使い分けるため、以下の細胞を使用して各経路の抗ウイルス活性を評価した。  
 ①HeLa- ACE2 細胞 (エンドサイトーシス経路) : 細胞外にプロテアーゼが存在しないため CoVpp はエンドサイトーシスで細胞に取り込まれ、エンドソーム内のプロテアーゼを利用して細胞に侵入する。  
 ②HeLa-ACE2 -TMPRSS2 (細胞表面経路) : TMPRSS2 は膜結合型のセリンプロテアーゼであり、このプロテアーゼ存在下では、CoV は細胞表面から選択的に侵入する。これらの細胞に段階希釈した HRP と一定の感染価の CoVpp を加え、GFP

を発現した感染細胞をカウントし抗ウイルス活性を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) HRP-chol の SCoVpp の細胞表面経路及びエンドサイトーシス経路に対する抗ウイルス活性の評価

EK13 及び EK13-chol の SCoVpp の細胞表面経路及びエンドサイトーシス経路に対する抗ウイルス活性を2つの細胞を用いて評価した。この結果、EK13 は、SCoVpp の細胞表面経路 (TMPRSS2-cell) に対しては濃度依存的に抗ウイルス活性を示したが、エンドサイトーシス経路 (Regular-cell) では殆ど活性を示さなかった (図3左)。一方、EK13-chol は、SCoVpp の細胞表面経路だけでなく、エンドサイトーシス経路に対しても、濃度依存的に高い抗ウイルス活性 (IC90% < 1  $\mu$ M) を示した (図3右)。また、コントロールペプチドの EK1 及び EK1-chol (10  $\mu$ M) 存在下では、どちらの侵入経路においても抗ウイルス活性は見られなかった。これらの事から、EK13 にコレステ

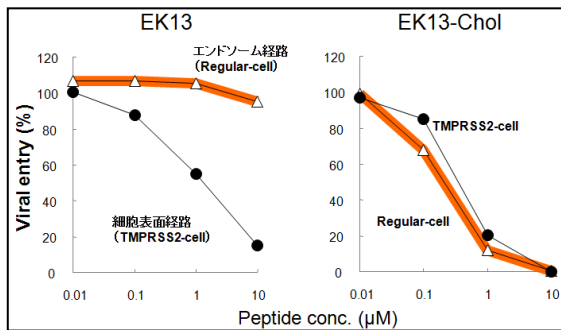


図3

ロールを付加した EK13-chol は、SCoVpp のエンドサイトーシス経路においても高い抗ウイルス活性を示す事が明らかとなった。

(2) ヒト CoVpp (229E、NL63) に対する HRP-chol の抗ウイルス活性の評価

EK13-chol は、SCoV の HR2 領域を元にデザインされたが、この EK13-chol が SCoV と異なる種のヒト CoV (229E、NL63) にも効果がある

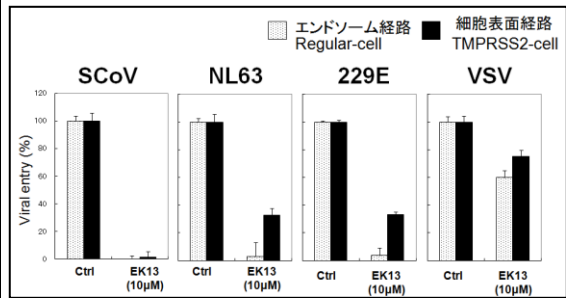


図4

か評価を行った。この結果、10  $\mu$ M の EK13-chol 存在下、ヒト CoVpp (229E、NL63) に対しても細胞表面経路及びエンドサイトーシス経路の両侵入経路において高い抗ウイルス活性を示した (図4)。これらの事から、EK13-chol は、ヒト CoVpp (229E、NL63) の両経路においても高い抗ウイルス活性を示す事が明らかとなった。

(3) HRP-chol の time-of-addition 実験

HRP-chol は、宿主細胞膜やウイルス膜に親和性を持つ事が考えられる。このため、ウイルス膜に親和性を持つならウイルス感染時に同時に加えると効果を発揮し、宿主細胞膜に親和性を持つなら、ウイルス感染前に加えると高い効果が得られると考えられる。そこで、

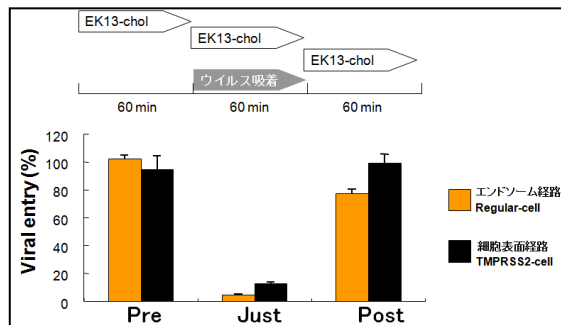


図5

EK13-chol をどのタイミングで細胞に加えると抗ウイルス活性が見られるか EK13-chol の time-of-addition 実験を行った。この結果、ウイルスと EK13-chol を混ぜて細胞に接種した時は高い抗ウイルス活性が認められたが、EK13-chol を感染前後に加えた際には、全く抗ウイルス活性が見られなかった (図5)。この事から、EK13-chol はウイルス膜に結合し、ウイルスと共にエンドソームに取り込まれ

て効果を発揮する事が示唆された。

本研究期間中に類似の戦略で行われた2つ研究が発表されている。1つは、エボラウイルスのGP蛋白質のHRPにHIV蛋白質由来のTat配列（エンドソーム内に蓄積することが知られている）を結合したHRP-tatを用いた研究で、HRP-tatはエンドソームに指向性を持ち、エンドサイトーシスで侵入するエボラウイルスの感染を抑制する(Miller EM et al., JBC 2011)。もう一つは、本研究と全く同じ戦略で、インフルエンザウイルスのHA蛋白質のHRPにコレステロールを付加したHRP-cho1に関する研究で、HRP-cho1はインフルエンザウイルスのエンドサイトーシスを介した細胞侵入を抑制する(Lee KK et al., JBC 2011)。上記の報告及び今回の研究成果により、コレステロールやtat配列を付加したHRPは、エンドソームに指向性を持ち、エンドサイトーシス経路を主な細胞侵入経路とする様々なウイルスに対しても応用可能である事が強く示唆された。

この一方で、先行する論文と本研究結果において大きく異なる点として、本研究ではHRP-cho1をウイルスと同時に加えなければ効果を発揮できない事から、HRP-cho1はウイルス膜に突き刺さり、ウイルスと共にエンドソームに取り込まれて効果を発揮する事が示唆された。しかしながら、先行する論文では、このような現象は観察されず、むしろウイルス接種前にHRP-cho1を加えたほうが強力な抗ウイルス活性が見られる事から、ウイルス膜に突き刺さって効果を発揮するのではなく、宿主細胞膜に突き刺さって効果を発揮すると考えられている。このため、類似のHRP-cho1にも関わらずその抗ウイルスメカニズムは大きく異なる事が考えられる。今後は、本研究で用いたHRP-cho1のさらに

詳細な解析を行い、抗ウイルス活性の発現メカニズムが何故先行論文と異なるのか、その原因を明らかにしたい。

#### 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7件)

1. Ujike M, Huang C, Shirato K, Matsuyama S, Makino S, Taguchi F. (2012) Two palmitylated cysteine residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike (S) protein are critical for S incorporation into virus-like particles, but not for M-S co-localization. J Gen Virol. 93:823-8.
2. Shirato K, Ujike M, Kawase M, Matsuyama S. (2012) Increased replication of respiratory syncytial virus in the presence of cytokeratin 8 and 18. J Med Virol. 84:365-70.
3. Shirato K, Maejima M, Matsuyama S, Ujike M, Miyazaki A, Takeyama N, Ikeda H, Taguchi F. (2012) Mutation in the cytoplasmic retrieval signal of porcine epidemic diarrhea virus spike (S) protein is responsible for enhanced fusion activity. Virus Res. 161:188-93.
4. Shirato K, Matsuyama S, Ujike M, Taguchi F. (2012) Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. J Virol. 85:7872-80.
5. Nakauchi M, Ujike M, 他 10 名. (2011) Rapid discrimination of oseltamivir-resistant

275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay.

J Med Virol. 83:1121-7.

6. Sriwilaijaroen N, Kadowaki A, Onishi Y, Gato N, Ujike M, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y (2011) Mumefural and related HMF derivatives from Japanese apricot fruit juice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A (H1N1) virus. Food Chemistry, 127:1-9

7. Ujike M, Ejima M, Anraku A, 他 13 名. (2011) Monitoring and characterization of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009-2010. Emerg Infect Dis. 17:470-9.

[学会発表] (計 3 件)

1. 氏家誠、白戸憲也、松山州徳、田口文広  
SARS-CoV の粒子形成における ERretrieval signal の役割について  
第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪  
国際会議場 大阪 2012 年 11 月 13 日～  
15 日
2. Sriwilaijaroen N, Kadowaki A, Onishi Y, Gato N, Ujike M, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y  
Japanese apricot fruit juice concentrate contains anti-influenza compound, mumefural  
The 9th Japan-China International  
Conference of Virology June 12-13, 2012  
Sapporo Japan
3. Shirato K, Matsuyama S, Ujike M,  
Taguchi F.  
Role of proteases in porcine epidemic  
diarrhea virus infection in cultured cells

XIIth International Nidovirus symposium.

June 4-9, 2011 Michigan, USA

[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

氏家 誠 (UJIKE MAKOTO)

研究者番号 : 50415478

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :