

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03497

研究課題名（和文）膜融合異常によるパラミクソウイルスの新規感染動態の機構解明とその制御

研究課題名（英文）Understanding the mechanism of infection dynamics of paramyxoviruses caused by abnormal membrane fusion and its inhibition

研究代表者

橋口 隆生（Hashiguchi, Takao）

京都大学・医生物学研究所・教授

研究者番号：50632098

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：麻疹ウイルス・ムンプスウイルス等のパラミクソウイルスの膜融合能変化が細胞/組織指向性に与える影響を原子・分子・細胞レベルで解析した。その結果、麻疹ウイルスの膜融合能亢進に関わるアミノ酸変異箇所が膜融合蛋白質の特定の構造領域に局在することが明らかとなった。また、膜融合を制御・阻害する分子デザインを構造情報を活用して行い、感染阻害活性の高い新規分子を作製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パラミクソウイルス科は、麻疹（はしか）を起こす麻疹ウイルスや流行性耳下腺炎（おたふくかぜ）の原因であるムンプスウイルスといった臨床重要な病原体を含む。従って、パラミクソウイルスにおける膜融合変化を通じた病原性の理解とその感染制御に関する研究を行うことは、パラミクソウイルスへの学問的な理解だけに留まらず、予防・治療法への活用を含めた感染対策として医療や福祉にも貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the effects of changes in membrane fusion ability of paramyxoviruses such as measles virus and mumps virus on cellular/tissue tropism at the atomic, molecular, and cellular scales. The results revealed that the amino acid substitution sites responsible for the enhanced membrane fusion ability of measles virus are localized to specific structural regions of the membrane fusion protein. In addition, using the structural information to design molecules that control and inhibit membrane fusion, we successfully constructed new molecules with high infection-inhibitory activity.

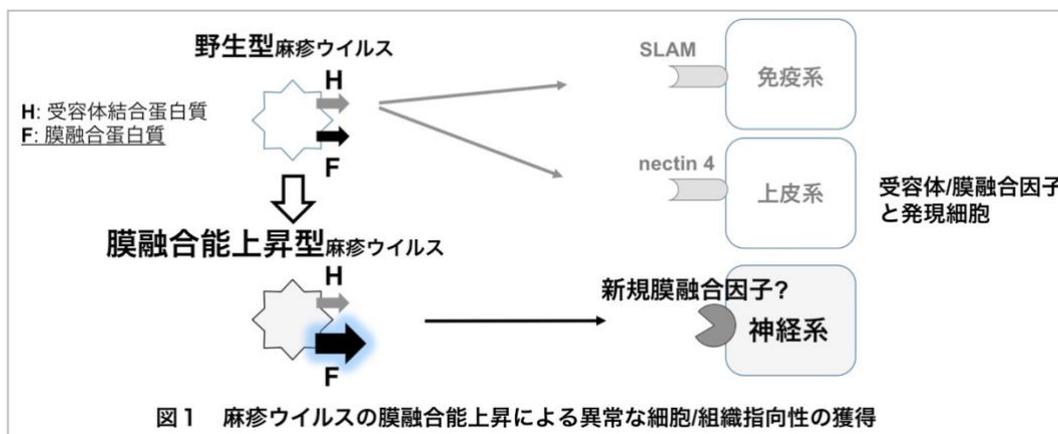
研究分野：ウイルス学

キーワード：膜融合 構造 エントリー

1. 研究開始当初の背景

膜融合は、ウイルス感染において必須の役割を果たす。細胞由来の脂質二重膜に覆われたウイルスは、そのウイルスエンベロープと標的細胞の細胞膜を融合させることで、細胞侵入を開始する。ウイルスによる一般的な細胞侵入機構として、まず初めにウイルス糖蛋白質が細胞表面の受容体を認識/結合することがウイルスの細胞/組織指向性において極めて重要な要素となる。我々は細胞侵入機構解明に向けて受容体結合の分子機構解明を精力的に進めてきた（Hashiguchi T et al. *PNAS*. 2007, *Nature Struct. Mol. Biol.* 2011, *Cell*. 2015, Kubota M et al. *PNAS*. 2016*, Kubota M et al. *J. Virol* 2019* *責任著者）。受容体結合以外に、ウイルス糖蛋白質を一部切断し“活性化状態”にするプロテアーゼの局在も同様に重要な要素である。最終的に、受容体結合に伴うウイルス糖蛋白質の連鎖的な構造変化が膜融合のタイミングを制御しており、膜融合という現象自体は細胞/組織指向性に影響しないと考えられてきた。

こうした状況下に我々は、麻疹（はしか）を起こす麻疹ウイルスにおいて、膜融合蛋白質 F にアミノ酸変異が生じることでウイルス膜融合能の上昇を引き起こし、神経細胞感染が成立することを見出した（Watanabe S et al. *J. Virol* 2013, 2015, Hashiguchi T et al. *PNAS* 2018*, Sato Y et al. *J. Virol* 2018, Watanabe S et al. *Trends Microbiol.* 2019）。米国コロンビア大学の研究グループからも同様の報告があり（Jurgens EM et al., *MBio* 2015）、このグループと共同研究を進めた（共同研究成果：Mathieu C et al. *J. Virol.* 2019, Angius F et al. *J. Virol.* 2019）。通常、麻疹ウイルスは免疫系と上皮系に細胞/組織指向性を示し全身感染を起こすが、異常な細胞/組織指向性の獲得が低頻度で生じる麻疹脳炎を引き起こしていると考えられる（図 1）。



これまでの我々の研究成果から、麻疹ウイルスにおいては、膜融合能が上昇した変異体でのみ相互作用/機能する宿主因子が存在することが示唆されている（Watanabe S et al. *Trends Microbiol.* 2019）。膜融合が細胞/組織指向性に影響している例は麻疹の例だけに留まらず、複数のパラミクソウイルスで報告がある。ウイルスは非常にヘテロな集団として複数の変異集団を形成することから、一部で膜融合能変化を伴う精巧な感染メカニズムが存在すると考えられる。

こうした背景に基づき、非典型的な症状発症機構の一部として、ウイルスの膜融合能変化に伴う異常な細胞/組織指向性の獲得という分子機構が存在すると考えられるが、その細胞侵入機構は多くが謎に包まれている。そこで、本研究課題では、パラミクソウイルスによる膜融合機構に焦点を当て、新たな細胞/組織指向性を生み出す膜融合機構の全体像の解明とその制御を目指して研究を実施した。

2. 研究の目的

麻疹ウイルスは空気感染で急速に感染拡大する。2019 年は世界的に麻疹の流行拡大が社会問題となり、2019 年の死者数は約 20 万人と推定された。国内でも輸入感染を起点として散発的な感染が毎年確認される状況にある。また、流行性耳下腺炎（おたふくかぜ）の原因であるムンプスウイルスは、本邦で年間数十万人から百万人を超える感染者が推計される。麻疹ウイルスとムンプスウイルスは、共にパラミクソウイルス科に属する RNA ウイルスで、中枢神経系感染を起こすことがある。我々を含む複数の研究により、ウイルス性脳炎がウイルス膜融合能の上昇に伴う、神経系組織への新規指向性獲得に起因することが明らかになりつつある。すなわち、膜融合能変化に伴う異常な細胞/組織指向性の獲得機構という分子メカニズムが存在すると考えられる。そこで、本研究では、“膜融合”をキーワードに、パラミクソウイルス感染症における膜融合機構の全体像を明らかにする、及び、その制御を目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 網羅的な膜融合能変異体の抽出・解析

構造上どの領域に変異が生じることが膜融合能亢進に重要か理解するため、我々が決定した麻疹ウイルス F 蛋白質の構造情報を活用しつつ実験的に膜融合能亢進変異体の網羅的な探索を行った。膜融合能の亢進度合いにより神経系細胞間伝播の速度が異なるので、神経症状の進行度の予測に役立つと期待される。

(2) 異常膜融合能を示す融合蛋白質の構造解析

膜融合能亢進変異体では、熱力学的な性質が異なるため、野生型とは異なる構造変化が起きていることが確実視された。従って、神経病原性の理解につなげるため、どういった構造変化が膜融合亢進を引き起こすのか構造解析を行った。

(3) パラミクソウイルスに対する感染阻害剤の評価

神経細胞親和性を示すパラミクソウイルスの感染制御を目的に、化合物ライブラリーや中和抗体、構造情報を活用して感染阻害分子を探索、デザインし、感染阻害能を評価した。

4. 研究成果

(1) 網羅的な膜融合能変異体の抽出・解析

アミノ酸配列と構造情報を基に複数のアミノ酸残基間の進化情報の相関を考慮し、膜融合能に関与するアミノ酸変異を統計的に算出した。さらに、実験的手法による膜融合能変異の責任箇所と同定として、F 蛋白質へ error-prone PCR を利用してランダム変異を導入し、変異ウイルスライブラリーを作製し、膜融合能亢進変異体を網羅的に同定した (図 2A) (Ikegame S et al. PNAS. 2021)。膜融合能亢進に関わるアミノ酸変異箇所をマッピングすると、構造的に 3 ヶ所に集約することができた (Sites I, II, III) (図 2AB)。“Site I”は膜融合ペプチド (fusion peptide: FP) 周辺、“Site II”はプロトマー同士の界面、そして、“site III”はヘッドドメインとストロクドメインの境界に位置していた。例外的に Site I, II, III から比較的離れた位置 (2 次配列上でマイクロドメインと呼ばれる領域) に存在していた少数の変異部位は、Site IV とした (図 2B)。すなわち、構造上の特定の位置 (Site I, II, III, 低頻度に IV) に変異が生じると、膜融合能が亢進し神経感染を起こす性質を獲得した変異ウイルスが生じる懸念があることが明らかとなった (Ikegame S et al. PNAS. 2021)。本研究項目では米国 Icahn School of Medicine at Mount Sinai の Lee 教授との共同研究を行った。

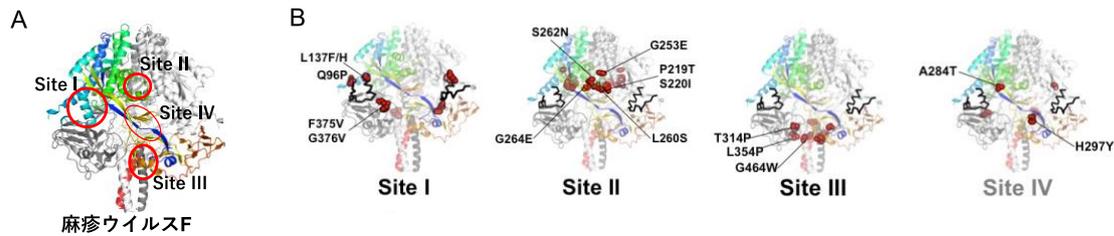


図2 麻疹ウイルスF蛋白質構造上の膜融合能亢進変異の局在

(2) 異常膜融合能を示す融合蛋白質の構造解析

膜融合能亢進変異体では、熱力学的な性質が異なるため、野生型とは異なる構造変化が起きていることが確実視される。従って、どういった構造変化が膜融合亢進を引き起こすのかを構造解析し、神経病原性の理解につなげる。膜融合能亢進変異体の構造解析用コンスタントを作製し、ヒト培養細胞を用いて蛋白質発現を行った。細胞培養上清から発現蛋白質を精製し、ケルろ過クロマトグラフィーによる性状解析を行った。膜融合能を亢進させる変異により蛋白質が不安定化しているとみられ、凝集しやすい傾向が確認された。X線結晶構造解析のために濃縮するとより顕著に凝集が確認され、高濃度への濃縮が難しい性状であった。そこで、負染色による電子顕微鏡構造解析を実施し、prefusion型を保っている変異体を絞り込んだ。

(3) 膜融合能亢進ウイルスに対する感染阻害機構の解析

麻疹ウイルスを標的とする中和抗体の物性や機能の改良およびその相関関係の解明を目指し、コンピュータ構造解析と設計を行なった。4種類いずれの抗体も立体構造が未知であるため、そのアミノ酸配列からの立体構造予測計算から行なった。予測構造に基づき、麻疹H蛋白質構造とのドッキング計算を実施し、抗体-抗原複合体のモデル構築を行なった。構築された複合体モデル構造に基づき、デザイン計算により抗体側のアミノ酸配列を改変した。コンピュータ設計した抗体を実際に実験的に評価することで、中和抗体の物性や機能に重要な役割を果たしている配列を同定した。

ムンプスウイルスに対する阻害薬開発研究として、ムンプスウイルス受容体結合蛋白質(HN蛋白質)と糖鎖受容体の複合体構造情報(Kubota M et al. PNAS. 2016)に基づき、細胞侵入阻害法を示す糖鎖受容体を模した化合物のデザイン・作製により、感染阻害化合物を開発することに成功した。糖鎖受容体のコア3糖構造部分をポリマーに多価化することで、その感染阻害活性を確認した。意外なことに、低密度に多価化した糖鎖ポリマーほど高い感染阻害活性を示した(単体の阻害活性の約10倍)(Matsuoka K et al. Bioorg Med Chem Lett. 2021)。また、ムンプスウイルスの細胞侵入メカニズムの最新知見をまとめて報告した(Kubota M, and Hashiguchi T. Viruses. 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ikegame Satoshi, Hashiguchi Takao, Hung Chuan-Tien, Dobrindt Kristina, Brennand Kristen J., Takeda Makoto, Lee Benhur	4. 巻 118
2. 論文標題 Fitness selection of hyperfusogenic measles virus F proteins associated with neuropathogenic phenotypes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2026027118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2026027118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kubota Marie, Hashiguchi Takao	4. 巻 13
2. 論文標題 Unique Tropism and Entry Mechanism of Mumps Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1746 ~ 1746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13091746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Tsukasa, Imamura Riyo M., Suzuki Tateki, Hashiguchi Takao, Nomura Takao, Otsuguro Satoko, Maenaka Katsumi, Sasaki Michihito, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Sato Akihiko, Okabe Takayoshi, Nagano Tetsuo, Kojima Hirotsu	4. 巻 70
2. 論文標題 Application of Acoustic Ejection MS System to High-Throughput Screening for SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 199 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-01003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 橋口隆生	4. 巻 72
2. 論文標題 構造生物学的手法による麻疹・ムンプスウイルスの細胞侵入及び侵入阻害機構の研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 335-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橋口隆生	4. 巻 71
2. 論文標題 ムンプスウイルス糖鎖受容体とその認識機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ウイルス	6. 最初と最後の頁 185-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Marie Kubota, Takao Hashiguchi	4. 巻 2132
2. 論文標題 Large-Scale Expression and Purification of Mumps Virus Hemagglutinin-Neuraminidase for Structural Analyses and Glycan-Binding Assays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 641-652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0430-4_55.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MAENAKA Katsumi, FUKUHARA Hideo, HASHIGUCHI Takao, CAAVEIRO Jose M. M., NAGATOISHI Satoshi, KURODA Daisuke, TSUMOTO Kouhei	4. 巻 61
2. 論文標題 Viral Biophysics: Contributions to Drug Modalities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 082 ~ 089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.082	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hashiguchi T
2. 発表標題 Structural biology of human pathogenic RNA viruses
3. 学会等名 UCLA-KU seminar series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hashiguchi T
2. 発表標題 Molecular mechanism of glycan receptor recognition by mumps virus
3. 学会等名 The 27th East Asia Joint Symposium (EAJS) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋口隆生
2. 発表標題 麻疹ウイルスによる神経感染症の分子メカニズム
3. 学会等名 第 25 回日本神経感染症学会総会・学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hashiguchi T
2. 発表標題 Glycan receptors for mumps virus and other paramyxoviruses
3. 学会等名 2020 Society for Glycobiology Virtual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Ikegame, Kasopefoluwa Oguntuyo, Takao Hashiguchi, Makoto Takeda, Benhur Lee
2. 発表標題 Identify and interrogating the functional constraints that contribute to the lack of antigenic drift in paramyxoviruses.
3. 学会等名 American Society for Virology (ASV) 39th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------