

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07519

研究課題名(和文) コロナウイルス膜融合蛋白の活性化機構の解析

研究課題名(英文) Activation mechanism of coronavirus membrane fusion protein

研究代表者

松山 州徳 (Matsuyama, Shutoku)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・室長

研究者番号：90373399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エンベロープウイルス感染の瞬間、ウイルス膜と細胞膜が融合するが、その分子機構は十分に解明されていない。本研究では、コロナウイルスの膜融合タンパク質であるスパイクタンパクを可溶性レセプターおよびトリプシンとインキュベートすることで、その構造変化を実験的に誘導した。プロテアーゼ分解産物の大きさは、ウェスタンブロット分析によって推定した。これらの生化学的知見から、S蛋白の3量体は、中間状態において、典型的なホモ三量体のプレヘアピン構造ではなく、非対称の未集合構造をとり、その後最終的な構造が形成されると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、ウイルス学分野の未解明問題「膜融合蛋白の活性化機構」を、生化学的手法を用いて解明することである。最近のCryoEMを用いたタンパク質の構造解析により、新しい知見が次々に報告されているが、基本的には安定した構造を解析するための手法であり、ウイルス膜融合蛋白の活性化のような、瞬間的に現れる不安定な構造こそが大きな意味をもつ現象については、肝心なところは何も解析できていないというのが実状である。本研究で用いる、生化学的データから不安定な構造を推測する手法により、より矛盾の少ない構造変化中間体モデルの構築を目指す。

研究成果の概要(英文)：In envelope virus infections, the molecular mechanism of membrane fusion between viral and cellular membranes is not fully understood. In this study, we experimentally induced the conformational changes of coronavirus fusion protein, spike protein, by incubating the virus with soluble receptor and trypsin. The size of protease digestion products was estimated by Western blot analysis. Based on these biochemical findings, we concluded that the trimer of spike protein adopts an asymmetric-unassembled conformation in the intermediate state, instead of the typical homotrimeric pre-hairpin conformation, followed by the formation of postfusion structure.

研究分野：ウイルス学

キーワード：coronavirus

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エンベロープウイルスはその表面に搭載されたホモ三量体の膜融合蛋白を用いて、ウイルス膜と細胞膜を融合させ、ウイルス遺伝子を細胞の中に送り込む。膜融合蛋白がどのようにウイルス膜と細胞膜を引き寄せて融合させているのか、その分子機構はほとんど解っていない。最近のクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析により、新しい知見が次々に報告されているが、基本的には安定した構造の部分だけが検出されており、ウイルス膜融合蛋白の活性化のような、瞬間的に現れる不安定な構造こそが大きな意味をもつ現象については、肝心な部分は何も解析できていないというのが実状である。

2. 研究の目的

ウイルス学分野の未解明問題「膜融合蛋白の活性化機構」を、生化学的手法を用いて解明する。本研究で用いる、生化学的データから不安定な構造を推測する手法により、より矛盾の少ない構造変化中間体モデルの構築を目指す。

3. 研究の方法

マウスのコロナウイルス (MHV-2 株) の膜融合蛋白「スパイク (S) 蛋白」は、活性化にレセプターとプロテアーゼによる 2 段階の構造変化を必要とする。まずレセプター結合により S 蛋白に一段階目の構造変化が起こり細胞の膜に突き刺さる。つづいてプロテアーゼによる解裂を受け、再度構造変化が起こり、細胞膜とウイルス膜が融合する。この特徴を利用して、プロテアーゼやそのインヒビターの添加により、または反応温度の調整により、構造変化を中間段階で止めて解析する。さらに、プロテアーゼは Spike の中間体構造そのものの形を認識して分解するので、分解産物の大きさをウエスタンブロット法で解析することにより、中間体構造を推測する。

4. 研究成果

レセプター結合後、S 蛋白内のヘプタッドリピートモチーフ (HR1/HR2) がウイルス膜と細胞膜を架橋し、その後 HR1/HR2 が折り返すことで膜が融合すると考えられる。本研究では、ウイルスをレセプターとトリプシンと共にインキュベートすることにより、S 蛋白の構造変化を実験的に誘導した。構造変化の各段階で S 蛋白からコア構造を切り出すために、反応液をプロテイナーゼ K で処理した。プロテアーゼ分解産物をウエスタンブロット分析で検出し、得られたバンドの大きさの違いから、構造変化の各段階における S 蛋白の構造を推定した。

レセプター結合とトリプシン処理の後に、それぞれ 46kDa と 53kDa のプロテイナーゼ-K 耐性バンドが観察された。46kDa と 53kDa を脱糖鎖処理すると、それぞれ 24kDa と 34kDa になったことから、HR1 モチーフはコアに含まれておらず、おそらく中間状態では中央に集合して密な構造をとっていないと推定された。HR2 ペプチド (HR1 に相互作用して HR1/HR2 モチーフが閉じるのを抑制する) を反応に加える実験により、中間状態で「開いた構造」と「閉じた構造」の両方の HR1/HR2 モチーフが存在することがわかった。AlphaFold2 ソフトウェアを用いて、膜融合ペプチド (FP) と複合体を形成する「閉じた」HR1/HR2 モチーフの構造が予測された。また、構造変化の温度依存性と時間依存性を調べる実験から、トリプシン処理後、HR1/HR2 モチーフが閉じる動作と 3 つの HR1 モチーフが集合する動作が同時に起こることが明らかになった。これらの生化学的知見に基づき、三量体の S 蛋白は中間体として、既知のホモ三量体プレヘアピン構造ではなく、非対称非集合構造をとり、その後、直接集合して最終的な構造に収束すると結論した。

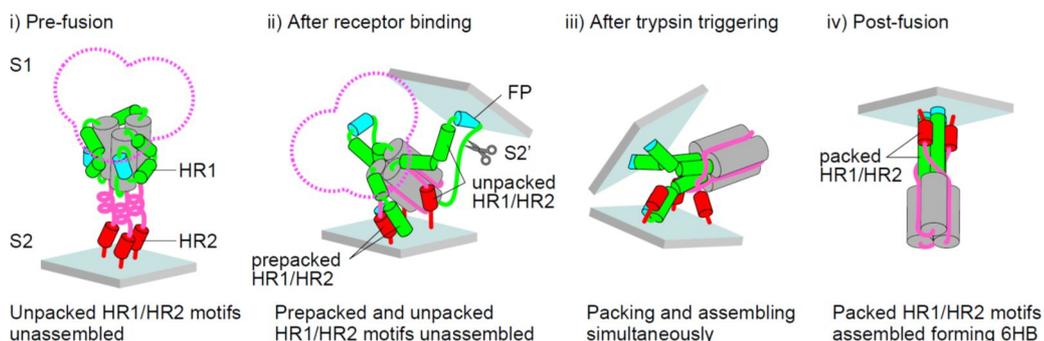


図 コロナウイルス S 蛋白の構造変化モデル

また、上記の研究の課程で、新型コロナウイルスに関する副産物的な研究成果も報告することができたので、発表論文の欄に記載する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕計7件 / 受理済6件(査読付論文6件 / オープンアクセス3件 / *責任著者3件)

- 1) Kobayashi J, Fukushi S, *Matsuyama S, Proteinase K-resistant S2 core provides insights into the intermediate conformation of coronavirus spike glycoprotein during activation. *投稿準備中*
- 2) Kobayashi J, Matsuyama S, Shirakura M, Arita T, Suzuki Y, Asanuma H, Watanabe S, Hasegawa H, Nakamura K. Use of the particle agglutination/particle agglutination inhibition test for antigenic analysis of SARS-CoV-2. *Influenza Other Respir Viruses*. 2023 Feb 6;17(2):e13093. doi: 10.1111/irv.13093. PMID:36824396; PMCID: PMC9942275.
- 3) Doi A, Tomita Y, Okura H, *Matsuyama S. Frequent occurrence of mutations in nsp3 and nsp4 of SARS-CoV-2, presumably caused by the inhaled asthma drug ciclesonide. *PNAS Nexus*. 2022 Sep 20;1(4):pgac197. doi:10.1093/pnasnexus/pgac197. PMID: 36714870; PMCID: PMC9802299.
- 4) Iwata-Yoshikawa N, Kakizaki M, Shiwa-Sudo N, Okura T, Tahara M, Fukushi S, Maeda K, Kawase M, Asanuma H, Tomita Y, Takayama I, Matsuyama S, Shirato K, Suzuki T, Nagata N, Takeda M. Essential role of Tmprss2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways. *Nat Commun*. 2022 Oct 15;13(1):6100. doi:10.1038/s41467-022-33911-8. PMID: 36243815; PMCID: PMC9568946.
- 5) Li Y, Watanabe E, Kawashima Y, Plichta DR, Wang Z, Ujike M, Ang QY, Wu R, Furuichi M, Takeshita K, Yoshida K, Nishiyama K, Kearney SM, Suda W, Hattori M, Sasajima S, Matsunaga T, Zhang X, Watanabe K, Fujishiro J, Norman JM, Olle B, Matsuyama S, Namkoong H, Uwamino Y, Ishii M, Fukunaga K, Hasegawa N, Ohara O, Xavier RJ, Atarashi K, Honda K. Identification of trypsin-degrading commensals in the large intestine. *Nature*. 2022 Sep;609(7927):582-589. doi:10.1038/s41586-022-05181-3. Epub 2022 Sep 7. PMID: 36071157; PMCID: PMC9477747.
- 6) Tomita Y, Matsuyama S, Fukuhara H, Maenaka K, Kataoka H, Hashiguchi T, Takeda M. The Physiological Tmprss2 Inhibitor HAI-2 Alleviates SARS-CoV-2 Infection. *J Virol*. 2021 May 24;95(12):e00434-21. doi: 10.1128/JVI.00434-21. PMID: 33789993; PMCID: PMC8315915.
- 7) Tomita Y, Takeda M, *Matsuyama S. The anti-influenza virus drug favipiravir has little effect on replication of SARS-CoV-2 in cultured cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021 May 1;65(5):e00020-21. doi: 10.1128/AAC.00020-21. Epub 2021 Mar 1. PMID: 33649117; PMCID: PMC8092917.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tomita Yuriko, Takeda Makoto, Matsuyama Shutoku	4. 巻 65
2. 論文標題 The Anti-Influenza Virus Drug Favipiravir Has Little Effect on Replication of SARS-CoV-2 in Cultured Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 20-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.00020-21	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 Tomita Yuriko, Matsuyama Shutoku, Fukuhara Hideo, Maenaka Katsumi, Kataoka Hiroaki, Hashiguchi Takao, Takeda Makoto	4. 巻 95
2. 論文標題 The physiological TMPRSS2 inhibitor HAI-2 alleviates SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00434-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00434-21	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 Tomita Yuriko, Takeda Makoto, Matsuyama Shutoku	4. 巻 65
2. 論文標題 The Anti-Influenza Virus Drug Favipiravir Has Little Effect on Replication of SARS-CoV-2 in Cultured Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e00020-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.00020-21	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 Matsuyama Shutoku, Kawase Miyuki, Nao Naganori, Shirato Kazuya, Ujike Makoto, Kamitani Wataru, Shimojima Masayuki, Fukushi Shuetsu	4. 巻 95
2. 論文標題 The Inhaled Steroid Ciclesonide Blocks SARS-CoV-2 RNA Replication by Targeting the Viral Replication-Transcription Complex in Cultured Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01648-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01648-20	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------