

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590517

研究課題名（和文）SARS コロナウイルス感染増殖制御の解析

研究課題名（英文）Mechanism of SARS coronavirus infection and proliferation

研究代表者

田中 伸幸（TANAKA NOBUYUKI）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん先進治療開発研究部・部長  
研究者番号：60280872

研究成果の概要（和文）：SARS-CoV の感染成立にはウイルスエンベロープの Spike(S) 蛋白と標的細胞上の ACE2 との結合が必要である。一方、感染が ACE2 単独で惹起されるか否かは明らかではない。本研究では、分泌型 Spike、Spike をエンベロープとする偽ウイルス、を用いて細胞への吸着、取り込み、感染について検討した。分泌型 Spike を用いた化学架橋によって、ACE2 とともに DC-SIGN および L-SIGN が共沈した。ACE2 と DC-SIGN, ACE2 と L-SIGN の会合は、Spike 非存在下でも確認された。しかし、ウイルス吸着における DC-SIGN および L-SIGN の役割はほとんどなかった。細胞内へのウイルス取り込みにおいては、ACE2 の細胞質内領域は不要であったが、DC-SIGN および L-SIGN の細胞内領域は必要であった。これらの結果から、SARS-CoV 感染においては DC-SIGN/L-SIGN の細胞内領域が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：SARS-CoV attaches to the cell surface ACE2, however, requirement of additional cell surface proteins need to be clarified. In this study, we investigated the nature of co-receptors of SARS-CoV. By utilizing soluble SARS-CoV spike protein and a chemical crosslinker reagent, we identified two L-type lectins, DC-SIGN and L-SIGN, in the Spike-ACE2 complex. ACE2 forms complex with these proteins prior to the addition of the Spike. Although neither DC-SIGN nor L-SIGN increased SARS-CoV pseudovirus adsorption to the cell surface, these lectins facilitated incorporation of SARS-CoV in to the cells. Intracytoplasmic region of DC-SIGN and L-SIGN, but not that of ACE2, was required for the incorporation. These results suggest that the intracytoplasmic regions of DC-SIGN and L-SIGN play roles on SARS-CoV infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯科薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、実験病理学

キーワード：SARS、ウイルス、共受容体、細胞内侵入

### 1. 研究開始当初の背景

SARS は 2002 年に中国広東省で始まり、またたく間に中国大陸・台湾・東南アジア・北米へとその流行地域を広げた。SARS 感染者は世界中で 8,000 名以上(死亡者数 800 名超)に及び、致死率の高い新興感染症として社会的関心を集めている。原因ウイルスとして同定された SARS-CoV は 2 型コロナウイルスに属し、+鎖 RNA (約 29kb) を有することが明らかとなり、感染成立にはウイルスエンベロープの Spike(S) 蛋白と標的細胞上の ACE2 との結合が必要であることが判明した。しかしながら SARS-CoV 感染が ACE2 単独で惹起されるか否かは明らかではなく、吸着したウイルスの細胞内侵入および病原性発現の詳細についてはこれまで十分に解析されていない。申請者は SARS-CoV (偽ウイルス)の細胞内侵入過程を解析する過程で、感染が ACE2 の細胞質内領域に依存しないことを見出した。興味深いことに、S 蛋白/ACE2 複合体の細胞内取り込みはクラスリン依存性であった。この事実は、ACE2 取り込みはクラスリン非依存性である、とする従前の知見と明らかな乖離を示した。一方、細胞膜に結合しない遊離型 ACE2 変異体は SARS-CoV 感染を媒介できず、ACE2 細胞膜外領域が物理的に細胞膜外側にアンカーすることが必要であった。以上の知見は、ACE2 に加えて新規の SARS-CoV 補助受容体が存在し、この共受容体がクラスリン依存性の細胞内侵入を誘導していることを強く示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究では SARS-CoV 偽ウイルス実験系を用いて SARS-CoV の共受容体を蛋白同定する。ACE2 と共受容体が形成する新規複合体の性状を明らかにすることで、これまで機能未知であった補助受容体分子がウイルス感染を規定している可能性を検証する。本研究の第 2 の目的は、新規共受容体によるウイルス侵入機構の解析である。

### 3. 研究の方法

SARS-CoV の吸着・侵入機構および病原性発現の機構を明らかにするために、SARS-CoV 偽ウイルス実験系を用いる。この実験系は、1) ウイルスの侵入を Luciferase 活性として定量的に解析すること、2) GFP によって偽ウイルスの吸着から侵入に至る時空間的移動をリアルタイムで捕捉することが可能である。SARS-CoV

感染実験系として偽 SARS ウイルスおよび ACE2 を安定発現する感染標的細胞を調整する。これらを用いて、①SARS-CoV 共受容体の同定、②同受容体の機能解析、③単クローン抗体による共受容体発現解析、を展開し SARS-CoV 感染機構を解析する。

(1) SARS-CoV 共受容体の同定：SARS-CoV のスパイク (S) 蛋白と ACE2 からなる複合体を精製し SARS-CoV 共受容体を蛋白同定する。SARS-CoV 感受性細胞株 (ACE2 遺伝子導入 COS7 細胞 (COS7Ace2+) ならびに HeLa 細胞 (HeLaAce2+) の細胞表面をビオチンで標識する。これらビオチン標識細胞に偽 SARS-CoV(SARS-CoV の S 蛋白 (エンベロープ) を有したヒトレトロウイルス)あるいはリコンビナント S 蛋白 (Myc-Tag 付) を吸着させた後、化学架橋剤 (DTSSP) で処理し、細胞を可溶化したのちに抗 ACE2 抗体、抗 Myc タグ抗体で免疫沈降する。免疫沈降物を SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ACE2 と共沈する分子を同定する。

(2) SARS-CoV 共受容体の機能解析・受容体複合体の解析：共受容体の発現系、siRNA 実験系を構築し偽ウイルスの吸着と侵入を検証する。共受容体候補蛋白の配列情報を基に cDNA をクローニングし、発現プラスミドを構築する。変異体を作成し、ACE2 遺伝子と共に感受性細胞株あるいは 3T3 細胞に導入後に、偽 SARS-CoV を感染させる。感染阻害効果を示す変異体について共受容体遺伝子候補として解析する。発現プラスミドを ACE2 遺伝子と共に種々の細胞に導入し、偽 SARS-CoV の感染増強効果を調べる。さらに、共受容体蛋白質の細胞質内にある各種モチーフ欠失変異体、細胞内領域欠失変異体を作製して同様の感染実験を行い、これら変異共受容体の役割を検討する。一方、S 蛋白の種々変異体を作成し共受容体との結合に与える影響について免疫共沈試験を用いて調べる。

(3) 共受容体による SARS-CoV 侵入・輸送制御の解析：共受容体による SARS-CoV 細胞内輸送を解析し感染成立における複合体の役割を検証する。

ACE2/共受容体/S 蛋白質はクラスリン依存性にエンドサイトーシスされ、エンドソームに輸送されるはずである。共受容体細胞質内領域に存在するクラスリン結合配列を中心に種々の変異を加え、偽 SARS-CoV の感染動態に与える影響を調べる。さらに GFP 標識偽

ウイルスを感染させ細胞への吸着、侵入動態を共焦点顕微鏡で観察する。さらに、エンドソームに存在する小胞輸送系 (ESCRT) の欠損細胞株を用いて同輸送系によって感染が制御されるか検討する。

#### 4. 研究成果

(1) SARS-CoV 共受容体の同定 : SARS-CoV のスパイク (S) 蛋白存在下で ACE2 と複合体を形成する膜タンパク質を精製した。化学架橋剤存在下で共沈する SARS-CoV 共受容体を蛋白解析したところ、C タイプレクチンである DC-SIGN および L-SIGN (DC-SIGNR) であることが判明した。これらについては、既存の報告と一致した。一方、新規タンパク質が共受容体として複合体に含まれか解析した。クマシーブルー染色および銀染色レベルでの解析では、DC-SIGN および L-SIGN 以外の新規タンパク質は同定できなかった。

(2) Ace2 と DC-SIGN, L-SIGN の会合は SARS-CoV Spike に依存しない : COS7, 293T 細胞に上記分子を共発現すると、ACE2 と DC-SIGN, ACE2 と L-SIGN は Spike の有無に係らず会合した。一方、Spike は ACE2 とのみ会合し、Spike と共受容体の会合には ACE2 の存在が必要であることが明らかになった。

(3) 共受容体は SARS-CoV の感染を増強する : 共受容体は ACE2 単独発現に比し、偽 SARS-CoV の吸着能力を増加させなかった。また、共受容体単独でのウイルス結合は軽度であった。一方、Luciferase アッセイを用いた感染性の検討では、共受容体存在下で有意に感染性の増強を認めた。したがって、DC-SIGN, L-SIGN は SARS-CoV の吸着ではなく、取り込みに機能していることが明らかとなった。

(4) SARS-CoV の感染は ACE2 の細胞質内領域に非依存性であるが、DC-SIGN/L-SIGN の細胞質領域を必要とする : SARS-CoV の感染には ACE2 の細胞質内領域を必要としない (Inoue et al)。一方、DC-SIGN/L-SIGN の細胞質領域欠損変異体は偽 SARS-CoV の細胞内への取り込みに必要であった。したがって、SARS-CoV の細胞内取り込みにおいて、DC-SIGN, L-SIGN の細胞質内領域が重要な働きを担うことが明らかとなった。この部位に関する機能について鋭意解析を行う必要がある。

#### 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 10 件)

①Juliana FM, Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Jin L, Fujii H, Tanaka N, Hoshino T, Asao H. Apurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) is essential for IL-21-induced signal transduction through ERK1/2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Mar 17. [Epub ahead of print]

②Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, Kakazu E, Inoue J, Fukushima K, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology*. 2012 Jan 20;422(2):377-85. Epub 2011 Dec 3.

③Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K, Arai H, Mori F, Wakabayashi K, Aoki M, Itoyama Y, Takeda A. The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of  $\alpha$ -synuclein. *PLoS One*. 2011;6(12):e29460. Epub 2011 Dec 22.

④ Suzuki S, Tamai K, Sugamura K, Tanaka N. 他 (7 人中 7 番目) : AMSH is required to degrade ubiquitinated proteins in the central nervous system *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 May 20;408(4):582-8. Epub 2011 Apr 21

⑤Nara H, Onoda T, Tanaka N, 他 (7 人中 6 番目) : WSB-1, a novel IL-21 receptor binding molecule, enhances the maturation of IL-21 receptor. *Cell Immunol*. 2011;269(1):54-9. Epub 2011 Mar 17.

⑥Amano Y, Yamashita Y, Tanaka N, Sugamura K. 他 (7 人中 5 番目) : Angiotensin II type 1 receptor expression and microvessel density in human bladder cancer. *J Biol Chem*. 2011 Apr 29;286(17):15458-72. Epub 2011 Mar 1.

⑦ Kondo Y, Ueno Y, Kakazu E, Kobayashi K, Shiina M, Tamai K, Machida K, Inoue J, Wakui Y, Fukushima K, Obara N, Kimura O,

Shimosegawa T.: Lymphotropic HCV strain can infect human primary naïve CD4+ cells and affect their proliferation and IFN- $\gamma$  secretion activity. J Gastroenterol. 2011 Feb;46(2):232-41.

⑧ **Tamai K, Tanaka N, Sugamura K** 他 (13人中2番目): Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Aug 27;399(3):384-90. Epub 2010 Jul 29.

⑨ Fuma S, Ishii N, **Tanaka N**, 他 (8人中7番目): Effects of acute gamma-irradiation on community structure of the aquatic microbial microcosm. J Environ Radioact. 2010 Nov;101(11):915-22. Epub 2010 Jul 7.

⑩ Yamada K, Tsukahara T, Yoshino K, Kojima K, Agawa H, Yamashita Y, Amano Y, Hatta M, Matsuzaki Y, Kurotori N, Wakui K, Fukushima Y, Osada R, Shiozawa T, Sakashita K, Koike K, Kumaki S, **Tanaka N**, Takeshita T. Identification of a high incidence region for retroviral vector integration near exon 1 of the LMO2 locus. *Retrovirology*. 6, 79. 2009. (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 玉井恵一、田中伸幸、上野義之、下瀬川徹、菅村和夫: HCV 感染における小胞輸送タンパク Hrs の役割. 第64回日本細菌学会東北地方会, 仙台, 2010. 8. 18
- ② 須賀淳子、菅村和夫、田中伸幸: C-terminal region of ErbB3 controls ErbB2/ErbB3 heterodimer signaling through ubiquitin-dependent receptor degradation 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010. 9. 23
- ③ 玉井恵一、田中伸幸、上野義之、下瀬川徹、菅村和夫: Possible regulation of hepatitis C virus secretion by Hrs-dependent exosomal pathway 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010. 9. 23

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 伸幸 (TANAKA NOBUYUKI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長

研究者番号: 60280872

### (2) 研究分担者

菅村 和夫 (SUGAMURA KAZUO) (2009)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・発がん制御研究部・特任部長

研究者番号: 20117360