

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：H19～H22

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 mechanism of coronavirus : Detection of conformational changes of viral fusion protein.

研究代表者：松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室 主任研究官

研究者番号：90373399

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：ウイルス感染

1. 研究計画の概要

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る。vFGp の機能を詳細に調べることは、そのウイルスを理解する上で重要である。なぜならば vFGp はそのウイルスの宿主特異性、組織親和性、増殖速度、免疫原性を決めている場合が多く、病原性への関与が極めて大きいからである。それゆえ vFGp の研究から得られる情報は、ワクチン開発や抗ウイルス薬のデザインに直接繋がる知見となる。

申請者は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) を用いて vFGp の活性化メカニズムを明らかにしたい。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。現在までにこの蛋白の動きを矛盾なく説明できるメカニズムは報告されていない。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。これらの目的達成の為に以下の点に着目して研究を行う。

(1) vFGp のホモ三量体に何個のレセプター一分子が結合できるのかを調べる。

(2) vFGp の構造変化中間体を検出する。

(3) vFGp が構造変化を開始する条件を調べる。

2. 研究の進捗状況

SARS コロナウイルスのモデルウイルスである、マウスのコロナウイルス (mouse hepatitis virus strain 2 : MHV-2) を用い、スパイク (S) 蛋白の動作メカニズムの解析を行い、て S 蛋白が膜融合活性を発揮するためには、二段階の構造変化を必要とすることを示した。この構造変化は細胞への感染実験から予想された機構であったが、研究代表者は電気泳動法やリボソーム浮遊法を行い、二段階構造変化の検出に成功した。二段階とは、1)レセプターに S 蛋白質が結合すると一段階目の構造変化が起こり、2) 続いてプロテアーゼにより S 蛋白が 2 つに切断されて二段階目の構造変化が起こることである。特に一段階目の構造変化産物は、膜融合ペプチドを露出した状態で安定した構造変化中間体をとることが解った。この中間体はプロテアーゼ切断が行われない限り構造変化を停止しているため、非常に安定していると考えられる。様々なウイルスで、S 蛋白の構造変化中間体を安定した状態で検出できることは稀である。またプロテアーゼ感受性を調べることにより、この「安定構造」は非対称構造をとる可能性があること、また構造変化最終段階である 6 ヘルックスバンドル (6HB) 構造を誘導できることが解った。この二段階構造変化は SARS-CoV S 蛋白でも同様であると考えられ、現在検出を試みている。感染初期にもっとも重要な働きをする S タンパク質の機能や構造変化、機能発揮に重要な領域を明らかにすることによって、効果的なワクチン開発

や抗ウイルス剤開発への道が開けると考えている。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。
研究代表者は上記結果を論文としてまとめ、**Journal of Virology** に投稿し、2009年11月号に掲載されており、目標を概ね達成しているといえる。しかしSARSウイルスを用いた研究では目標に達していないことが、最高の自己評価には至らない理由である。

4. 今後の研究の推進方策

申請者は、残りの研究期間をこれまでのMHV-2のプロテアーゼ活性化の研究を応用に費やす。「肺に存在するプロテアーゼがウイルスの増殖を促進させることで肺炎を重症化させている」と考え、SARSウイルスのプロテアーゼ感受性の違いを比較する。申請者はSARSウイルスはTMPRSS2やエラスターゼをとこのプロテアーゼを利用することを予想しており、まずこれらがSARSウイルスを活性化するかどうかを調べたい。さらに、肺に発現している他のプロテアーゼ、特にTMPRSS2と同様の形態をもつ膜貫通型プロテアーゼ(TMPRSS)ファミリーが、SARSウイルスに与える影響の違いも調べたい。また、それらのプロテアーゼの発現量や分布が年齢により、あるいは症状の変化によりどの様に変化するのかも調べたい。どんなタイミングで、どんな条件下で、どのプロテアーゼがウイルスに関わるのかを明らかにすることで、ウイルス増殖とプロテアーゼの関係を明確にし、ウイルス肺炎の重症化モデルを構築したい。この研究から得られる技術と情報は他の呼吸器ウイルスに即応用可能であり、感染の予防法、抗ウイルス薬の開発に必要な知見となることを期待できる。

5. 代表的な研究成果

(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 件)

Taguchi F, Matsuyama S. Cell entry mechanisms of coronaviruses. *Uirusu*. 2009 Dec;59(2):215-22. Review. 査読無

Matsuyama S, Taguchi F. Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis. *J Virol*. 2009 Nov;83(21):11133-41. 査読有

Kawase M, Shirato K, Matsuyama S, Taguchi F. Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *J*

Virol. 2009 Jan;83(2):712-21. 査読有

Watanabe R, Matsuyama S, et al. Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J Virol*. 2008 Dec;82(23):11985-91. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

松山州徳、Conformational Changes Mediated by Receptor Binding and Proteolysis of a Coronaviral Envelope Glycoprotein、あわじしま感染症免疫フォーラム、平成21年9月8日、淡路夢舞台国際会議場

Shutoku Matsuyama, 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

松山州徳、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、平成21年6月2日、名古屋国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
[その他]