

桑山さち子、金丸典子、田中高生、村木裕美子、高井寛子、岡田知佳、坂口弥生、古川いつみ、山田恭子、和泉谷美和、奥野良信、加瀬哲男、吉田栄人、坂谷光則、岡田全司； SARSウイルスに対するDNAワクチンの開発研究。第45回日本呼吸器学会。2005（4/14-4/16）.幕張

2. 実用新案登録  
なし

3.その他

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし

## 抗 SARS-CoV 剤の開発に関する研究

分担研究者 山本典生（東京医科歯科大学）

**研究要旨** 我々は抗 SARS-CoV 剤の開発を目標として研究を行ってきた。これまで抗 SARS-CoV 活性を持つ薬剤として我々が同定したものには、HIV プロテアーゼインヒビターのひとつであるネルフィナビル、*in silico* screening によって見出したプロテアーゼインヒビター、スタキフリン誘導体、ポリオキソメタレートがある。これらの中から実用的な抗 SARS-CoV 剤が開発される可能性がある。

### A. 研究目的

本研究の目的は抗 SARS-CoV 活性を持つ薬剤を同定することである。現在 SARS 患者は存在しないが、動物の中に SARS-CoV を持つものがあり、SARS 流行の脅威は依然としてあり、SARS-CoV に対する抗ウイルス剤開発は、大きな意義を持つものと思われる。

### B. 材料と方法

様々な観点から抗ウイルス剤の候補物質を収集し、それらの抗ウイルス活性を SARS-CoV の感染系において評価した。

収集した化合物セットは、(1)すでに市販されヒトに用いられている抗ウイルス剤、(2) *in silico* screening によって選択された化合物、(3)スタキフリン誘導体、(4)ポリオキソメタレート群の 4 セットを用いた。それらの抗ウイルス活性の評価は、FFM-1 株を Vero E6 cell に感染させる系に MTT assay, リアルタイム RT-PCR 等を適用して行った。In vivo アッセイは BALB/c マウスに FFM-1 を感染させる系を使用した。感染後 3 日目で材料を採取し、リアルタイム RT-PCR 等によってウイルスの定量を行った。

### C. 研究結果

(1)すでにヒトで広く使われている抗ウイルス薬から抗 SARS-CoV 活性を持つ薬剤のスクリーニングを MTT assay によって行ったところ、HIV プロテアーゼ 阻害剤のひとつであるネルフィナビルが抗 SARS-CoV 活性を持っていることが明らかとなった。リアルタイム PCR によってウイルス RNA の定量を行ったところ、ネルフィナビル処理をした Vero E6 cell では RNA 量がコントロールと比較して約 1%まで減少していた。Time-of-addition assay の結果から、ネルフィナビルの作用点は post-entry step であることが推測された。

(2)我々は *in silico* screening により約 100 万種類の化合物の中から SARS-CoV の 3CL プロテアーゼ阻害剤の候補物質を約 100 種類に絞り込み、実際の抗ウイルス活性を測定したところ、強い抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物の同定に成功した(RIKEN00046)。リアルタイム PCR によってウイルス RNA の定量を行ったところ、同定された化合物により処理された Vero E6 cell ではウイルス量がコントロールと比較して 1%未満

まで減少した。この物質は recombinant proteinase を用いた実験においても阻害活性を示した。

さらに、同定された化合物の類縁体を作成して抗ウイルス活性を調べたところ、さらに強い抗ウイルス活性を持つ化合物を同定できた。マウス感染モデルでこれらの薬剤の評価を行ったところ、ウイルスの増殖が抑制されていることが明らかとなった。

(3)インフルエンザウイルス侵入阻害剤であるスタキフリンの誘導体について、抗 SARS-CoV 活性の評価を行った。リアルタイム PCR によってウイルス RNA の定量を行ったところ、同定された化合物により処理された Vero E6 cell ではウイルス量がコントロールと比較して 1%未満まで減少した。Time-of-addition assay を行ったところ、感染後 3 時間で薬剤を加えると抗ウイルス活性が大幅に低下した。また、SARS-CoV spike でシュードタイプされた HIV(SARS-S-NL-luc)を 293-ACE2 細胞に感染させる系にスタキフリン誘導体を加え、luciferase 活性を測定したところ、luciferase 活性の低下が観察された。luciferase 活性の低下は VSV-G でシュードタイプされた HIV(VSV-G-NL-luc)では見られなかった。このことはスタキフリン誘導体の標的が spike を介した entry の段階であることを示唆している。

(4)ポリオキシメタレート群について MTT assay により抗 SARS-CoV 活性を評価した。PM-1002、PM-1213 が強い抗 SARS-CoV 活性を示した。これらは TGEV に対しても強い抗ウイルス活性を示した。

#### D. 考察

我々は抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物として HIV プロテアーゼインヒビターのひとつであるネルフィナビル、in silico screening によって見出したプロテアーゼインヒビター、スタキフリン誘導体、ポリオキシメタレートを同定した。これらの薬剤はそれぞれ異なる分子を標的とし

てウイルスの複製を抑制していると推測される。例えばネルフィナビルの作用点は post-entry step、スタキフリン誘導体の作用点は entry step であると考えられている。作用点の異なるこれらの薬剤を組み合わせることで、より効果的な抗 SARS-CoV 薬となることが期待される。今後はそれぞれの薬剤の抗ウイルス活性発現の詳細なメカニズム解析、in vivo での安全性や体内動態の解析を行いたいと考えている。

#### E. 結論

本研究により複数の抗 SARS-CoV 活性を持つ化合物が同定された。これらの中から実用的な抗 SARS-CoV 剤が開発される可能性がある。またこれらの薬剤を組み合わせることで用いることにより、さらに高い抗ウイルス効果が期待できる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Yamamoto N, Yamamoto N

RNAi and SARS

RNAi Therapeutics. 2006: 79-99

(2) Shigeta S, Mori S, Yamase T, Yamamoto N, Yamamoto N.

Anti-RNA virus activity of polyoxometalates.

Biomed Pharmacother. 2006 Jun;60(5):211-9.

(3) Yamamoto N, Yang R, Yoshinaka Y, Amari S, Nakano T, Cinatl J, Rabenau H, Doerr HW, Hunsmann G, Otaka A, Tamamura H, Fujii N, Yamamoto N.

HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits replication of SARS-associated coronavirus.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004 Jun 4;318(3):719-25.

##### 2. 学会発表

- (1) 山本典生、小林雅典、佐藤彰彦、山本直樹  
スタキフリンによる SARS コロナウイルス複製の抑制  
日本ウイルス学会第 54 回学術集会 2006 年 11 月
- (2) 氏家 誠，西川裕輝，大高 章，山本直樹，山本典生，松岡雅雄，児玉栄一，藤井信孝，田口文広  
SARS コロナウイルス スパイク (S) 蛋白質の Heptad Repeat 由来 Peptide (HR-p) は細胞表面からのウイルス侵入を効果的に抑制する  
日本ウイルス学会第 54 回学術集会 2006 年 11 月
- (3) 山本典生、山本直樹  
In silico screening による SARS コロナウイルス増殖抑制薬剤の同定  
日本ウイルス学会第 53 回学術集会 2005 年 11 月
- (4) 吉仲 由之、山本典生、山本直樹  
プロテアーゼ阻害剤(Leupeptin, E64)による SARS-CoV の増殖抑制  
日本ウイルス学会第 53 回学術集会 2005 年 11 月
- (5) 吉仲 由之、山本典生、山本直樹  
抗スパイク IgY 抗体による SARS-CoV 持続感染細胞のウイルス消去  
日本ウイルス学会第 53 回学術集会 2005 年 11 月
- (6) 山本典生、山本直樹  
SARS-CoV の増殖を抑制する化合物の同定  
日本ウイルス学会第 52 回学術集会 2004 年 11 月
- (7) 山本典生、山本直樹  
HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルによる SARS コロナウイルス複製の抑制  
第 14 回抗ウイルス化学療法研究会、2004
- (1) 特願 2006-215485、抗ウイルス材及び環境反応型抗ウイルス材、2006 年 8 月 8 日
- (2) PCT/JP2006/303905、プロテアーゼインヒビター、2006 年 3 月 1 日
- (3) PCT/JP2005/016151、抗 SARS ウイルス剤、2005 年 9 月 2 日
- (4) 特願 2005-064664、プロテアーゼインヒビター、2005 年 3 月 8 日
- (5) 特願 2004-255819、抗 SARS ウイルス剤、2004 年 9 月 2 日

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

SARS-S タンパク質に対するモノクローナル抗体の単離

分担研究者： 黒澤良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所  
研究協力者： 伊庭善孝 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究要旨

分担研究者らのグループでは、数 10 名のドナーから採取した B リンパ球を用いて約 1000 億個のクローンからなるヒト抗体ファージライブラリー（AIMS ライブラリー）を作製して様々な疾患に対する治療用抗体の単離調製を実施している。一方、対象とする疾病に罹患した経験を有し、治癒した結果ウイルスや病原菌毒素に対して中和抗体を有する人がボランティアとして献血に協力する状況下では、その人の成分血（リンパ球画分）を用いて巨大抗体ライブラリーを作製して、その中から対象とする抗原に結合する抗体を単離する研究体制も築いている。ボランティアの献血によりライブラリーを作製した例としては、3 人の医師（A, N, Y）から成分採血して得たリンパ球から、それぞれヒト抗体ファージライブラリー（A, N, Y ライブラリー）を作製し、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、CMV、に対する抗体を単離した例がある。それ以外にも、ハブに 5 回咬まれた経験を持つヒトの成分血由来のライブラリー、ボツリヌストキソイドで免疫されたヒトの成分血由来のライブラリーがあり、それぞれハブ毒、ボツリヌス毒素を中和する抗体が得られている。また、献血以外の材料としては、肝癌患者から摘出した脾臓を用いてファージ抗体ライブラリー（AOCK）を作製した例があり、このライブラリーからは癌細胞に対する特異的抗体が単離された。本研究室では、こうしたヒト抗体ファージライブラリーを数種類作製し、様々な抗原に対する抗体を単離してきた。

SARS-CoV の場合、我が国には患者がいないため、上述のように疾病に罹患したのち治癒したヒト由来のファージ抗体ライブラリーを作製することができない。そこで、本研究では、AIMS およびその他の抗体ライブラリーを、抗体のソースとして用いて、SARS-CoV 特異的モノクローナル抗体を単離することにした。SARS-CoV 粒子を構成する膜タンパク質の中でも、特に Spike タンパク質（SARS-S）が主要な中和エピトープを有することが判明しているため、多数の抗 SARS-S 抗体を単離し、ウイルス中和活性を示す抗体の詳細なエピトープマッピングを行うことが本研究の目的である。そのためには、SARS-S タンパク質の ectodomain を分泌発現させるか、SARS-S タンパク質を細胞膜上に大量

に強制発現させるかして、抗体ライブラリーをスクリーニングする際の抗原として用いる必要がある。最初、動物細胞の発現系を用いた抗原調製を試みたが、抗体単離に充分量の抗原を得ることができなかった。次に、バキュロウイルスの発現系を用いた抗原調製を試みたところ、SARS-S タンパク質は、組換えバキュロウイルスに感染した昆虫細胞の培養上清中に発現し、Ni カラムを用いて精製された。そこで、この精製 SARS-S タンパク質を用いてヒト抗体ファージライブラリーをスクリーニングを行った。その結果、7種類の SARS-S タンパク質特異的モノクローナル抗体が得られた。しかし、それらの抗体の SARS-CoV 中和活性を測定した結果、中和活性を有しないことがわかった。一方、これと並行して、2匹のマウスを精製 SARS-S タンパク質で免疫した。得られた抗血清は、SARS-S タンパク質に対して ELISA 陽性を示した。更に、これらの抗血清は、SARS-CoV 中和活性を有することが明らかになった。

#### A. 研究目的

本研究班は、SARS-CoV に対するワクチン開発を目標に設置されているが、ウイルス粒子構成成分の中で、どの分子の、更にどの部位が中和エピトープとなるかに関する情報が重要な位置を占める。そこで、SARS-S タンパク質に対すモノクローナル抗体を多数単離して、その中からウイルス中和活性を示す抗体を選び出し、中和エピトープを解析する。

#### B. 研究方法

ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングして中和抗体を得るために、まず標的抗原である SARS-S タンパク質が必要となる。スクリーニングに用いる SARS-S タンパク質は、なるべくナチュラルに近い構造を取っていることが望ましい。この目的に最も合致する抗原としては、不活化した SARS-CoV ワクチンが考えられるが、現在ワクチンは開発中で入手が困難であり、また入手できたとしても、本研究者の所属する研究施設で取り扱うことは難しい。そ

こで、スクリーニングに用いる抗原を得るための他の方法として、SARS-S タンパク質の ectodomain を動物細胞あるいは昆虫細胞を用いて分泌発現させたのち精製する方法、SARS-S タンパク質を細胞膜上に大量に強制発現させた動物細胞あるいは昆虫細胞を用いる方法が考えられる。これらの方法で抗原が得られれば、これを用いてファージ抗体ライブラリーをスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離する。本研究においては、ファージ抗体ライブラリーとして、AIMS5 および ANYmix (A, N, Y ライブラリーを混合したもの) を用いることにした。

(倫理への配慮)

用いる抗体ライブラリーの作製等、幾つかヒト臨床材料を使用した。それは全て過去に於いて倫理委員会の承認の下に行われた研究である。

#### C. 研究結果

まず、SARS-S タンパク質の遺伝子を動物細胞発現ベクターに組み込んだものを

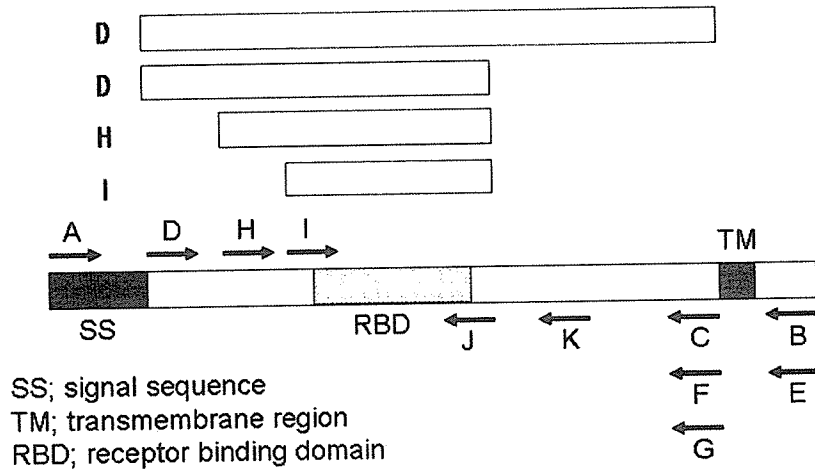
293T 細胞上または培養上清中に発現させることを試みた。すなわち、下記の全長あるいはフラグメント (AC, DF, DJ, IJ, IL) を、それぞれ下記の動物細胞発現ベクター (pKS336, pcDNA3.1, pSecTag2, pDisplay) に組み込んで発現実験を行った。その結果、抗体単離に用いるのに十分な発現量が得られなかった (下表)。次に、

SARS-S のアミノ酸残基 199 - 543 に相当する NX フラグメントを pET ベクターに組み込み、大腸菌の系で発現させた。その結果、NX フラグメントは発現したが、発現量が少なく、SDS-PAGE で単一バンドを得られる程度まで精製することはできなかった。

Construct	Vector	SARS-S gene	Leader	Tag	Expression
pKS336-SARS-S	pKS336	Full length	SARS-S	None	Not enough
pcDNA-SARS-S	pcDNA3.1	Full length	SARS-S	None	Not enough
pcDNA-SSABMH	pcDNA3.1	Full length	SARS-S	myc, (His) <sub>6</sub>	Not enough
pcDNA-SSACMH	pcDNA3.1	Full ECD	SARS-S	myc, (His) <sub>6</sub>	Not enough
pSect-SSDEMh	pSecTag2	Full length	Igk	myc, (His) <sub>6</sub>	Not enough
pSect-SSDFMH	pSecTag2	A part of ECD	Igk	myc, (His) <sub>6</sub>	Not enough
pDisp-SSDJ	pDisplay	A part of ECD	Igk	HA, myc	Not enough
pDisp-SSIJ	pDisplay	A part of ECD	Igk	HA, myc	Not enough
pSect-SSILMH	pSecTag2	A part of ECD	Igk	myc, (His) <sub>6</sub>	Not enough

\* ECD; ectodomain, HA; HA epitope tag of influenza virus

Construction of plasmids for expression of SARS-S protein in mammalian cells



5'-primer

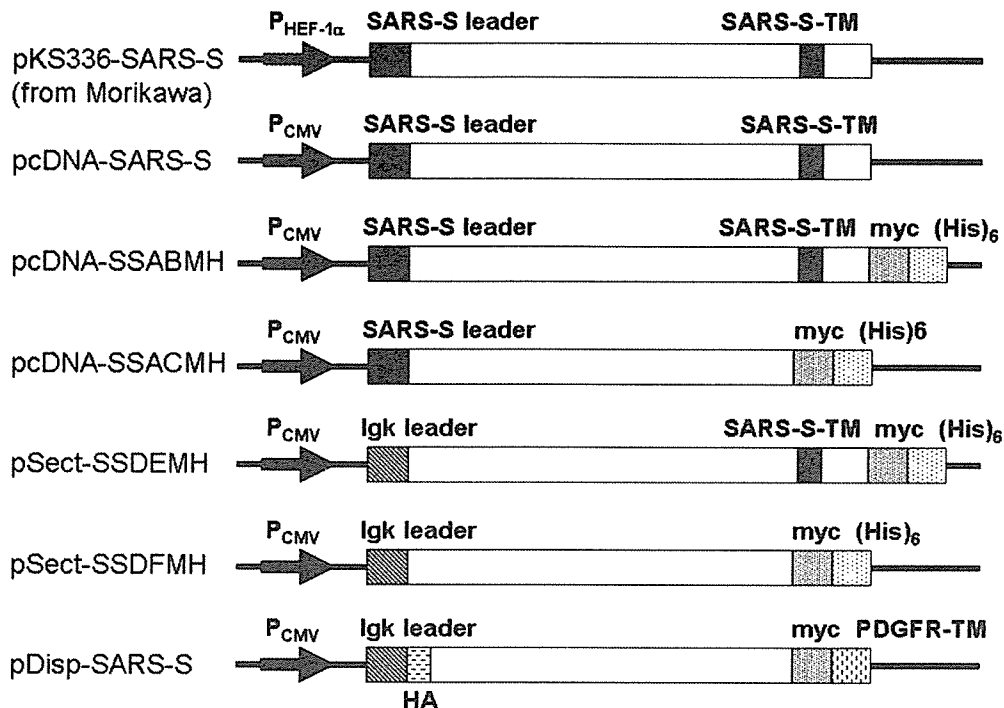
- A: Met1- (for pcDNA3.1)
- D: Asp17- (for pSecTag2 and pDisplay)
- H: Gly199- (for pSecTag2 and pDisplay)
- I: Tyr266- (for pSecTag2 and pDisplay)

3'-primer

- B: -Thr1255 (for pcDNA3.1)
- C: -Ser1178 (for pcDNA3.1)
- E: -Thr1255 (for pSecTag2)
- F: -Ser1178 (for pSecTag2)
- G: -Ser1178 (for pDisplay)
- J: -Lys543 (for pDisplay)
- K: -Arg758 (for pDisplay)



## Plasmids for expression of SARS-S protein in mammalian cells



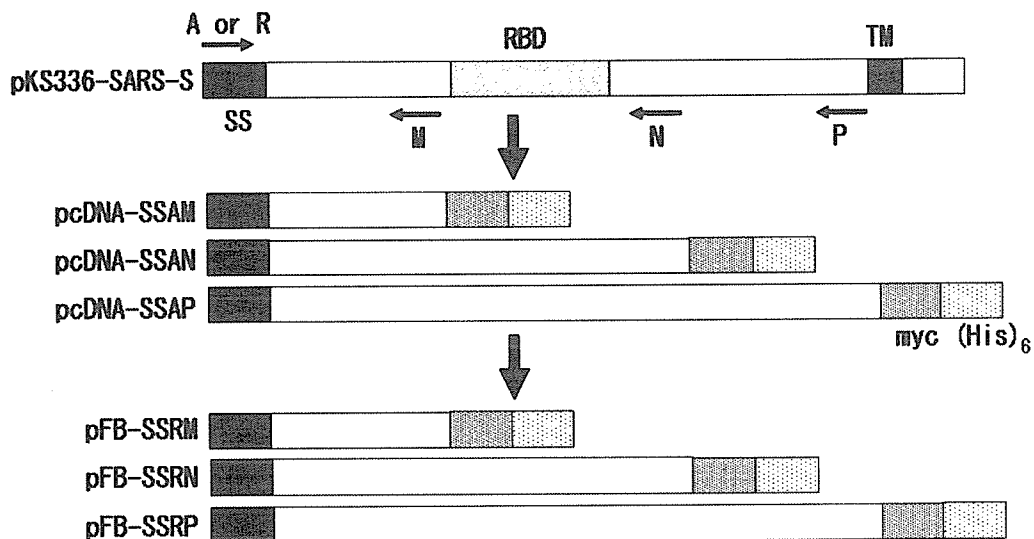
そこで、さらにバキュロウイルスの発現系での発現を試みた。SARS-S 遺伝子を組み込んだ組換えバキュロウイルスは、**Bac-to-Bac Baculovirus Expression System** を用いて作製した。まず、下記のように、SARS-S タンパク質のアミノ酸残基 1-276, 1-762, 1-1189 に相当する、SARS-S 遺伝子のフラグメント（それぞれ順に **SSRM**, **SSRN**, **SSRP**）をドナーベクター **pFastBac1** に組み込んだ。次に、それらの組換えプラスミドを **DH10Bac E. coli** に導入して、大腸菌内での相当組換えにより組換えバクミド DNA を得た。それらの組換えバクミド DNA を昆虫細胞 **Sf9** にトランスフェクションし、培養上清中に出てきた組換えバキュロウイルスを回収した。得られた組換えバキュロウイルスを更に **Sf9** にトランスフェクションし、培養上清を回収

し、**SARS-S** タンパク質の発現を調べた。その結果、**SSRM**, **SSRN**, **SSRP** フラグメントは、いずれも培養上清中に分泌されることが確認された。更に、その培養上清から、それらのフラグメントを、**Ni** カラムを用いて **SDS-PAGE** で単一バンドが得られる程度まで精製することができた。

抗体単離に用いる抗原としては、3種類のフラグメントのうち、**ectodomain** 全体に相当する **SSRP** フラグメントを用いるのが望ましいと考えられたが、このフラグメントは、100 ml の培養上清から 100 ng ~ 3 µg しか精製できず、抗体単離に十分な抗原量は得られなかった。一方、**SSRN** フラグメントは、100 ml の培養上清から 10~60 µg 精製され、抗体単離に十分な抗原量が得られた。そこで、以後の抗体単離には、**SSRN** フラグメントを用いることにした。

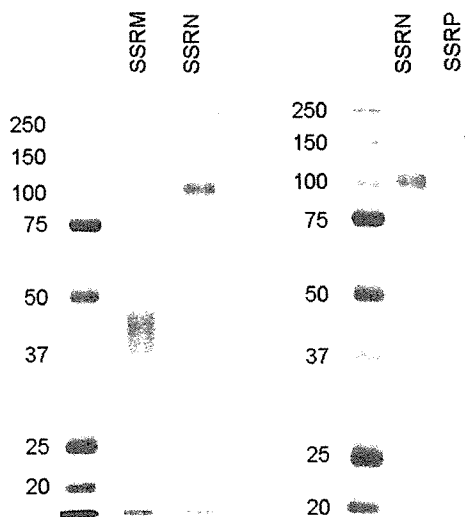
Construct	Vector	SARS-S fragment	Leader	Tag	Expression
pFB-SSRMMH	pFastBac1	1 - 276 a. a.	SARS-S	myc, (His) <sub>6</sub>	Yes
pFB-SSRNMH	pFastBac1	1 - 762 a. a.	SARS-S	myc, (His) <sub>6</sub>	Yes
pFB-SSRPMH	pFastBac1	1 - 1189 a. a.	SARS-S	myc, (His) <sub>6</sub>	Yes

### Construction of 3 kinds of plasmid for baculovirus expression system



SS; SARS-S signal sequence, RBD; receptor binding domain, TM; transmembrane region  
 5'-primer 3'-primer  
 A; Met1- (for pcDNA3.1) M; -Val276 (for pcDNA3.1)  
 R; Met1- (for pFastBac1) N; -Glu762 (for pcDNA3.1)  
 P; -Glu1189 (for pcDNA3.1)

### SARS-Sタンパク質の精製



精製 SSRN フラグメントに対して、AIMS5 ライブラリーをスクリーニングし、ELISA 活性を測定したのち、ポジティブクローンをシーケンスして分類した結果、ELISA 活性の高いクローンは 1 種類 (#38) 得られた (下表)。また、ANYmix ライブラリーをスクリーニングし、ELISA 活性を測定したのち、ポジティブクローンをシーケンスして分類した結果、ELISA 活性の

高いクローンは 6 種類 (#82, #89, #111, #156, #190, #191) 得られた (下表)。#38, #82, #89, #111 は、同一クローンが複数単離された。下表に、これら 7 種類のクローンのアミノ酸配列を、Germline VH および VL の配列と比較した結果を示した。identity は予想通り、92~100% と高い値を示した。これは、免疫されていないため、somatic mutation が入っていないことを示している。

Clone #	Library	The same clone #	Germline VH	Germline VL
38	AIMS5	40, 44, 48, 50, 51, 56, 60	1-02 (94%)	O2 (85%)
82	ANYmix	153, 163, 164, 182	3-23 (97%)	3H (91%)
89	ANYmix	100, 110, 132, 135, 178	1-18 (100%)	3L (92%)
111	ANYmix	112, 188	4-61 (100%)	O2 (94%)
156	ANYmix		4-61 (94%)	O2 (98%)
190	ANYmix		1-08 (100%)	O2 (97%)
191	ANYmix		4-30-1 (97%)	1A (98%)

\* ( ) 内は Germline VH, VL とのアミノ酸配列レベルの identity (%)

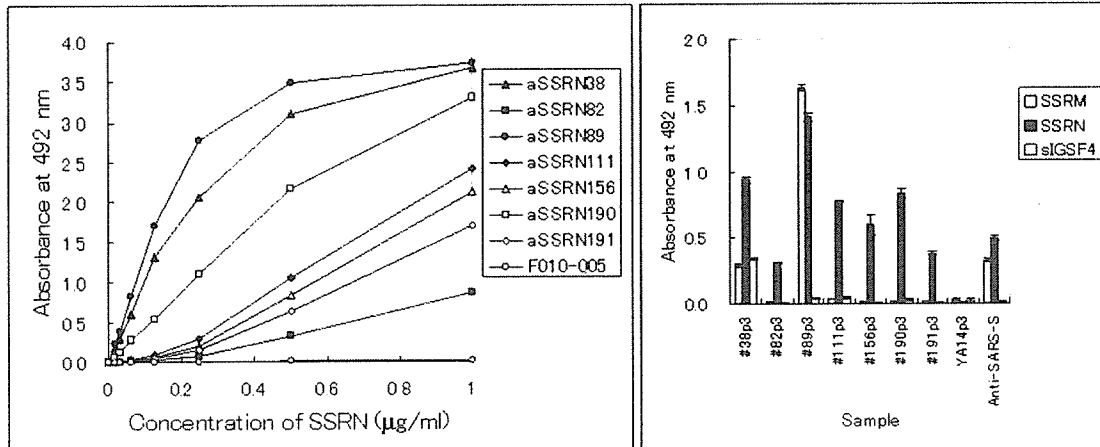
これらの 7 種類のモノクローナル抗体を精製し、抗体濃度を揃えて ELISA を行った (次ページ)。その結果、#89 の ELISA 活性が最も高かった。しかし、#89 は、SSRM フラグメントにも反応するため、SSRM の領域を認識する抗体であることがわかった。SSRM は receptor binding domain (RBD) を含まないフラグメントなので、この領域に対する抗体は、SARS-S を中和しない可能性がある。一方、他のクローンは SSRM に反応しなかった。これらの抗体の SARS-CoV 中和抗体価を、森川研究室で測定した結果、いずれも中和活性が認められなかった (次々ページ)。

次に、精製 SSRN フラグメントで 2 匹のマウスを免疫した。5 回の免疫後、マウス血清と脾臓を採取した。脾臓からは、ファージ抗体ライブラリーの作製を目的とし

て、RNA を抽出し、-80°C で保存した。血清の ELISA 活性を調べた結果、いずれのマウス血清も SSRN に対する高い ELISA 活性を持っていた。これらの抗血清の SARS-CoV 中和抗体価を、森川研究室で測定した結果、いずれも中和活性が認められた (次々ページ)。中和抗体価は、マウス #1 よりマウス #2 の方が高かったため、マウス #2 の脾臓由来 RNA から、ファージ抗体ライブラリーを作製することにした。すなわち、脾臓由来 RNA から cDNA を合成し、これをテンプレートとして PCR を行って抗体遺伝子を増幅した。増幅された抗体遺伝子断片を、ファージ抗体発現ベクターに挿入し、ファージ抗体ライブラリーを作製した。今後、このファージ抗体ライブラリーから SSRN フラグメントに対するモノクローナル抗体を単離し、中和活性

を調べる予定であった。

## ELISA of purified 7 mAbs isolated from phage antibody libraries AIMS5 and ANYmix



sIGSF4; extracellular domain of human IGSF4 with myc and (His)<sub>6</sub> tag (negative control)

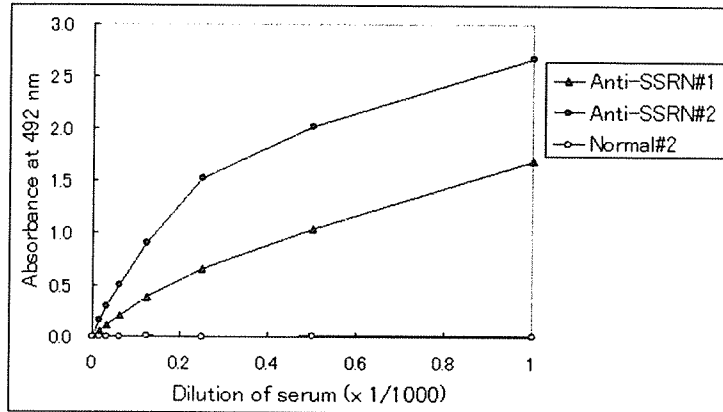
F010-005; anti-influenza virus HA (negative control)

YA14p3; anti-influenza virus HA (negative control)

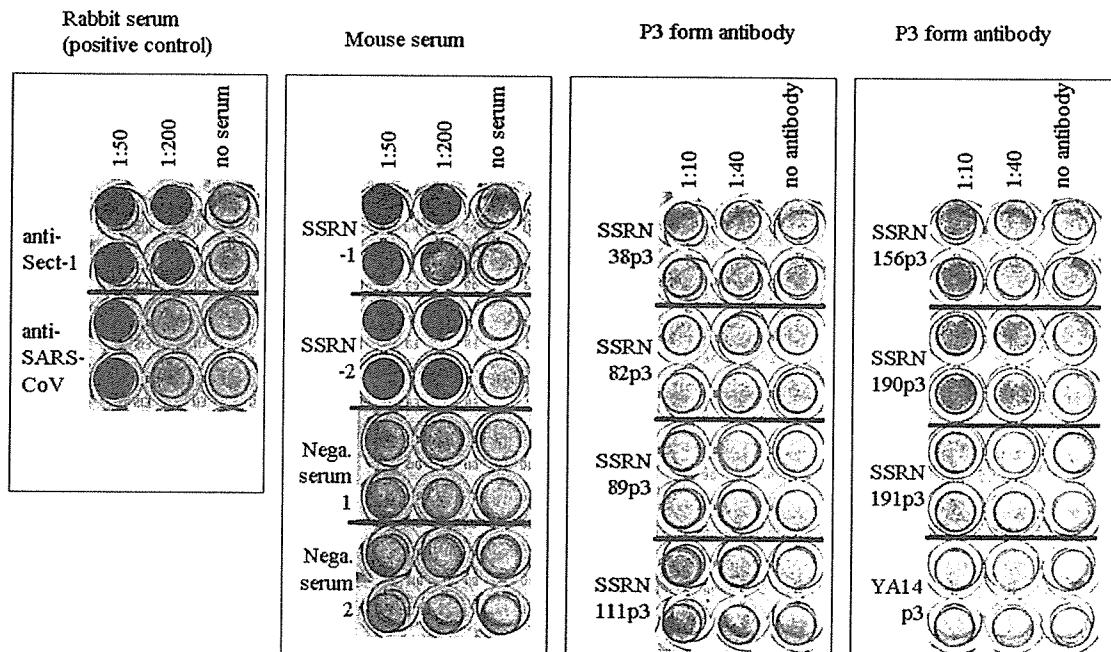
Anti-SARS-S; mouse anti-SARS-S (a.a. 19-35) monoclonal Ab (ab22056-100 produced by Abcam )

## Immunization of mice with SARS-S protein

Immunization	Volume ( $\mu$ l)	Amount ( $\mu$ g)
1st	100	10.6
2nd	200	10
3rd	200	10
4th	200	8.9
5th	250	25



## Neutralization of SARS-CoV by the mouse antiserums and 7 mAbs from the phage antibody libraries



#### D. 考察

最初、SARS-S タンパク質を動物細胞の発現系で発現させることを試みたが、期待通りにはいかなかった。大腸菌の発現系での発現も、発現量が少ないために、精製度が非常に悪く、抗体単離に使用できる精製抗原を得ることができなかった。そこで、次にバキュロウイルスの発現系を試した結果、精製量が少ないながらも、抗体単離に使用できる抗原を得ることができた。バキュロウイルスの発現系は、一般的には非常に発現が高く、mg オーダーから g オーダーの精製タンパク質を得られる方法だが、SARS-S タンパク質の場合はどうにか数十  $\mu$ g 得られた程度であった。大量に発現しない理由については不明であるが、SARS-S タンパク質内にシステイン残基が非常に多く含まれることが原因しているのかもしれない (1255 アミノ酸残基中 39 残基 (3.1%) がシステイン)。

バキュロウイルスの発現系を用いて得た精製抗原で、ヒト抗体ファージライブラリーをスクリーニングした結果、7種類のモノクローナル抗体が得られたが、これらは SARS-CoV 中和活性を有しなかった。その原因としては、抗原との結合活性が十分強くない可能性が考えられる。また、7種類しかモノクローナル抗体が取れていないので、仮にヒト抗体ファージライブラリーの中に中和抗体が含まれていても、それらを単離できていない可能性もある。しかし、単純にスクリーニングしただけでは、これら7種類の抗体が重複して取れてくるので、更に別の種類の抗体を単離するには、それら7種類以外の抗体を単離するための工夫が必要と考えられる。

一方、精製 SSRN フラグメントでマウスを免疫した結果、得られた抗血清は SARS-CoV を中和した。SSRN フラグメントは、S1 ドメインに相当するフラグメントである。従って、今回のマウス抗血清による中和試験の結果から、S1 ドメインに対する抗体だけで SARS-CoV を中和し得ることがわかった。実際に SSRN フラグメントをワクチンとして使用できるのか、SARS-S タンパク質全長の方がより有効なワクチンとなり得るのかを調べるには、今後更に研究を積み重ねていく必要がある。

#### E. 結論

SARS-S タンパク質を、バキュロウイルスの発現系を用いて発現させ、精製することができた。精製した SARS-S タンパク質を用いて、ヒト抗体ファージライブラリーをスクリーニングした結果、7種類のモノクローナル抗体が単離された。しかし、これらはいずれも SARS-CoV を中和できなかった。一方、精製 SARS-S タンパク質で免疫したマウスの抗血清は、SARS-CoV を中和した。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

1. M.Sato, R.Iwaya, K.Ogihara, R.Sawahata, H. Kitani, J. Chiba, Y. Kurosawa, K. Sekikawa, Intrabodies against EVH1 domain of wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor

signaling in transgenic mice T cells.

FEBS J. (2005) 272, 6131-6144.

2. 血液代謝物としての治療用ヒト抗体の開発、黒澤良和、人工血液、13、13-21(2005)
3. M. Kakita, T. Takahashi, T. Komiya, Y. Iba, T. Tsuji, Y. Kurosawa, M. Takahashi, Isolation of a Human Monoclonal Antibody with Strong Neutralizing Activity against Diphtheria Toxin. INFECTION AND IMMUNITY, 74 (6), 3682-3683, 2006.

## II. 学会発表

1. 黒澤良和 「感染症および癌治療薬としてのヒト抗体の開発状況」 人工血液を作る(6)、 於：日本科学未来館、平成 18 年 2 月 11 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
抗 IGSF4 抗体及びその利用  
特願 2005-54624、  
平成 17 年 2 月 28 日出願

## 動物 ACE2 の SARS コロナウイルス 受容体活性に関する研究

分担研究者 山田靖子（国立感染症研究所）

協力研究者 座本 綾（国立感染症研究所）

研究要旨 SARS-CoV を実験的に動物に接種した場合、マウス等では臨床症状を示さないが、フェレットとネコでは発症し、特にフェレットは致死的であると報告されている。一方、SARS-CoV のレセプターはアンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）であることが判明している。本研究ではフェレット、ネコ、サル、などの動物 ACE2 遺伝子の塩基配列を決定し、ACE2 発現細胞クローンを作成して、SARS-CoV のレセプターとして機能及び SARS-CoV S 蛋白質との結合能を解析した。その結果、フェレット、ネコの ACE2 のレセプターとしての機能はヒトと同等で、マウスより高いことが判明した。

### A. 研究目的

SARS 関連コロナウイルス（SARS-CoV）は SARS（重症急性呼吸器症候群）患者から分離された病因ウイルスである。野外では広東省のハクビシン、イタチアナグマ、タヌキから SARS-CoV ゲノムまたはこれに対する抗体が検出されている。一方実験的には、Osterhaus らが、フェレットやネコに SARS-CoV を経気道接種した場合、2日目から8日目に咽頭からウイルスが分離され、特にフェレットでは致死的であることを報告した。SARS-CoV に対する感受性が高いフェレットは、ワクチン開発、病態解析、治療法の研究に感染モデルとして使用されている。一方、アンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）はレニンアンギオテンシン系カスケードに含まれる ACE のホモログであり、心機能や高血圧との関連が認められているが、SARS-CoV のレセプターが ACE2 であることが明らかとなり、SARS-CoV が細胞へ侵入する過程で重要な役割を果たすことが確認された。マウスでは SARS-CoV の感染は成立するが発症することは

なく、これはマウス ACE2 の SARS-CoV 結合部位がウイルスに低親和性であることに起因すると考えられている。また、カニクイザルを使用した感染実験では SARS-CoV の感染は成立するものの、症状は非常に軽度であることが本研究班で示されている。

我々は SARS-CoV の感染実験で最も有用性が高いとされるフェレットとネコの ACE2 を同定し、SARS-CoV レセプターとしての機能を解析した。また、サル、野外でリザーバーとなる可能性のあるハクビシン、アライグマ、今後の感染実験への可能性を模索するためにスナネズミ、ハムスターの ACE2 について遺伝子解析を行い、ヒトの ACE2 とのホモロジーを解析した。

現在、自然宿主の可能性があると推測があるコウモリの ACE2 について解析中である。

### B. 材料と方法

#### 1. ACE2 塩基配列の決定と進化系統解析

ネコ、フェレット、ハムスター、スナネズミ、ハクビシン、アライグマの腎臓およびアフリカ



ミドリザル腎由来である VeroE6 から抽出した mRNA を鋳型に RT-PCR にて増幅し、ダイレクトシーケンスにより、ACE2 塩基配列を決定した。既に報告されているヒト、ハクビシン、マウス、ラットの配列と併せて、予測される ACE2 アミノ酸配列全長のアライメント (表 1) および進化系統解析 (図 1) を CLUSTAL W および近隣結合法 (NJ 法) により行った。

## 2. ACE2-pDisplay の作製

ヒト、ネコ、フェレット、マウスの ACE2 cDNA の全長から signal sequence 領域 (1-17aa) を除き、Igκ Leader sequence 及び hemagglutinin A (HA) エピトープ下流に in frame に挿入した (ACE2-pDisplay)。

## 3. ACE2 発現 HeLa 細胞の作製と SARS-CoV 接種

各動物の ACE2-pDisplay を HeLa229 細胞にトランスフェクトし、恒常的発現細胞を作製した (ACE2-HeLa)。Rat anti-HA MoAb (3F10) を用いて、IF および WB を行い、ACE2 発現を確認した (図 2)。ACE2 の発現量を FACS で解析し、ヒト ACE2-HeLa を 100 としてグラフに示した (図 3A)。各動物の ACE2-HeLa に SARS-CoV Frankfrut1 株を  $\text{moi}=0.1$  で接種し、48 時間後の培養中のウイルス力価を、VeroE6 を用いたプラークアッセイで求めた (図 3B)。

## 4. ACE2 発現 293T 細胞の作製と VSV-SARS-S 接種

各動物の ACE2-pDisplay ( $0.8 \mu\text{g}$ ) を 293T 細胞にトランスフェクトし (ACE2-293T)、24 時間後に 3F10 を用いて、ACE2 発現を FACS で解析し、ヒト ACE2-HeLa を 100 としてグラフに示した (図 4A)。

SARS-CoV の S 蛋白質を導入したシュードタイプウイルス (VSV-SARS-S) (J. Gen. Virol. 2005 (86) Fukushi et. al) を感染し、24 時間後の GFP 発現を FACS で解析して、感染効率を定量的に解析した (図 4B)。

## C. 研究結果

### 1. ACE2 アミノ酸配列の比較と進化系統解析

ネコ、フェレット、ハムスター、スナネズミ、アライグマおよびサル の ACE2 の DNA 配列から予想されるアミノ酸配列の長さはすべて 805 アミノ酸残基で、既に報告されているヒト、ハクビシンと同様で、機能的ドメイン (酵素活性部位、膜貫通領域、シグナル配列) も良く保存されていた。進化系統解析では、今回調べた各動物は、大きく 4 つのクラスターに分かれた (表 1、図 1)。

### 2. SARS-CoV の増殖

ヒト、ネコ、フェレット、マウスの ACE2-HeLa における SARS-CoV の増殖は、ヒト ACE2-HeLa で最も効率が良く、次いで、ネコ、フェレット、マウスの順であった。感染 48 時間後のウイルス力価は、ヒト;  $6.8 \times 10^5$ 、ネコ;  $4.8 \times 10^5$ 、フェレット;  $3.0 \times 10^5$ 、マウス;  $7.3 \times 10^4$  pfu/50  $\mu\text{l}$  であった (図 3)。

### 3. VSV-SARS-S の感染効率

各動物の ACE2-293T への VSV-SARS-S の感染効率を比較すると、ヒト ACE2-293T が最も高く、次いで、ネコ、フェレット、マウスの順で ACE2-HeLa における SARS-CoV の増殖と同様の傾向を示した。ヒト ACE2-293T への感染効率を 100% とした場合、ネコ; 94%、フェレット; 73%、マウス; 52% であった (図 4)。

## D. 考察

Martina (Nature 2003 (425) 915) らは、ネコやフェレットが SARS-CoV に感受性が高いことを示している。本研究においても、ネコおよびフェレットの ACE2 発現細胞における SARS-CoV の増殖や VSV-SARS-S 感染効率が、ヒトに近いことが示された。各動物の ACE2 のアミノ酸配列の違いが、SARS-CoV の S 蛋白質との親和性や SARS-CoV の増殖に関連するとと思われるが、ネコやフェレットではヒトと比較して ACE2 の S 蛋白質結合部位に多数のアミノ酸

置換が認められた(表2)。これらの動物種のACE2のキメラや変異導入により、結合に関与するアミノ酸がより詳細に明らかに出来ると考えられる。

#### E. 結論

フェレット、ネコのACE2はSARS-CoVのレセプターとしての親和性が高く、SARS-CoV感染に関して、ヒトと同様の機能を持つことが強く示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 総説

1. 山田靖子(2004): 動物のコロナウイルス感染症。Medical Corner, 114(3), 3-6.
2. 山田靖子(2004): 実験動物とウイルス。日本実験動物学会ニュース、5-7.
3. 山田靖子(2004): 実験動物における人獣共通感染症。Medical Corner, 115(2), 19-22.
4. 山田靖子(2004): 人と動物の共通感染症 -実験動物-。Pharma Medica, 22(11), 55-58.

##### 講演

1. 山田靖子: コロナウイルスについて。SARSに関する技術講習会、平成15年5月6日、国立感染症研究所。
2. 山田靖子: コロナウイルスについて。第2回日本医薬品等ウイルス安全性研究会シンポジウム、平成15年5月23日、東京。
3. 山田靖子: 動物のコロナウイルス感染症。ラジオ短波メディカル・コーナー、平成15年12月14日放送。
4. 山田靖子: 実験動物の微生物汚染検査法につい

て。第29回日本実験動物技術者協会関東支部懇話会、平成16年2月14日、さいたま市。

5. 山田靖子: 実験動物における人獣共通感染症。ラジオ短波メディカル・コーナー、平成16年5月9日放送。
6. 山田靖子: 動物・人の健康と獣医師 - 実験動物の立場から -。日本獣医師会学会年次大会、平成17年2月、新潟。
7. 山田靖子: 動物感染実験におけるバイオセーフティ。日本実験動物技術者協会九州支部第28回総会、平成17年4月9日、佐賀市。
8. 山田靖子: 感染実験を含む動物実験施設のありかた。第52回日本実験動物学会、平成17年5月、東京。

##### 学会発表

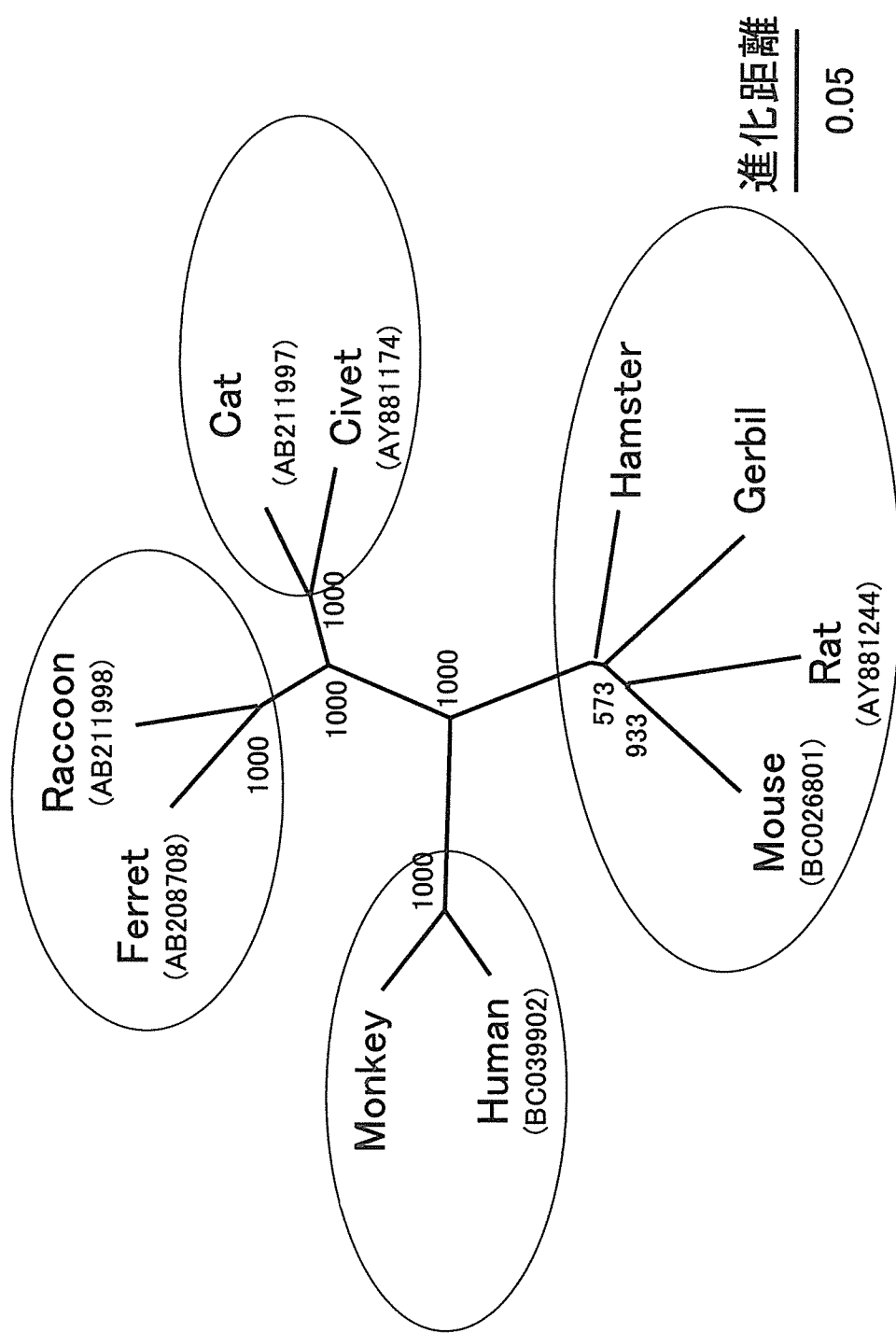
1. Aya Zamoto, Fumihiro Taguchi, Shuetsu Fukushi, Shigeru Morikawa and Yasuko K Yamada. Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. Xth International Nidovirus Symposium. (June 2005, Colorado, USA)
2. 山田靖子、水谷哲也、高橋一朗、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎、森川 茂: SARS-CoVの継代感染による変異ウイルスの出現。第52回日本ウイルス学会、平成16年11月、横浜。
3. 座本 綾、田口文広、福士秀悦、森川茂、杉山広、田原口元子、山田靖子: フェレットACE2の同定とSARS-CoVレセプターとしての機能。第139回日本獣医学会学術集会、平成17年3月、和光市。
4. 座本 綾、福士秀悦、田口文広、森川茂、山田靖子: フェレットACE2とSARS-CoV S蛋白質の親和性の解析。第54回日本ウイルス学会、平成18年11月、名古屋。
5. 山田靖子、田原口元子、座本 綾、平井明香、滝本一広: マウス肝炎ウイルスの流行株分離の実例。第32回日本実験動物技術者協会関東支部懇話会、平成19年2月、東京。

表1. 各動物間におけるACE2 アミノ酸配列の相同性

		% of Similarity										
	Human	Monkey	Cat	Civet	Ferret	Raccoon	Hamster	Gerbil	Mouse	Rat		
Human	-	99.5	97.1	97.0	96.5	97.3	97.8	98.3	97.3	96.8		
Monkey	94.7	-	97.3	96.9	96.3	97.1	97.9	98.3	97.3	96.9		
Cat	85.2	84.2	-	99.8	98.5	98.5	97.5	98.1	98.1	97.5		
Civet	83.5	96.9	93.3	-	98.1	98.1	97.0	97.3	97.4	97.0		
Ferret	82.6	82.0	89.7	88.3	-	98.5	96.8	97.1	97.0	96.0		
Raccoon	83.7	83.5	89.7	88.0	92.5	-	96.9	97.0	97.0	96.3		
Hamster	84.5	84.5	82.9	81.9	82.2	83.1	-	98.6	98.0	98.5		
Gerbil	83.0	82.2	82.5	82.2	82.2	81.9	89.4	-	98.6	97.9		
Mouse	82.1	82.1	81.7	81.6	81.5	81.5	89.8	89.3	-	98.4		
Rat	82.5	82.0	81.6	81.1	80.1	80.6	89.7	88.2	90.4	-		

% of Identity

図1. ACE2アミノ酸配列にもとづく進化系統樹



分枝部分の数字は1000回のブーティストラップの計算値を示す。括弧内はデータベースの登録番号を示す。