

平成 18 年度厚生労働省科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

課題番号 H16-新興-38

SARS ウイルス感染阻止化合物の探索に関する研究

総括・分担研究報告書

平成 19 年 3 月

主任研究者 菅村 和夫

(東北大学大学院医学系研究科・研究科長)

目 次

I. 総括研究報告書	1
II. 分担研究報告書	7
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31
V. 総合研究報告書	205

I. 総括研究報告書

SARS ウイルス感染阻止化合物の探索

主任研究者 菅村和夫 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：SARS ウイルス感染阻止化合物を発見し、有効な治療薬の開発につなげるために3つの研究プロジェクトを推進した。①SARS ウイルスの細胞内侵入にはACE2の発現のほか、クラスリン重鎖(CHC)の発現が相関すること、小胞輸送関連蛋白であるHRS依存性に侵入制御を強く受けることが判明した②桂皮エキスが感染を抑制しかつ標的細胞ACE2の細胞外ドメインが培養液中に遊離(シェディング)させそれには宿主因子であるTNF- α 変換酵素(TACE:TNF- α converting enzyme)が必要である事を明らかにした。③桂皮樹皮と丁子から抽出したエキスの画分を詳細に検討し桂皮樹皮エキスのBuOH画分に有望な因子が含まれることを明らかにした。

A. 研究目的

2002年の後半、重症急性呼吸器症候群(SARS)が中国で発生し、この病気の原因としては新しいコロナウイルスが同定された(SARSコロナウイルス)。

SARSウイルスがどのようにして細胞に入るのかは未だに明らかにされていない。

エンベロープを有するウイルスはすべてウイルスエンベロープ膜と細胞膜または細胞小器官の膜との融合によって侵入する。細胞内部へのウイルス取り込み経路にはいくつかの経路がある。クラスリン依存性経路、カベオラを含む脂質ラフトの関与する小胞輸送経路、その他の経路としてピノサイトーシスやファゴサイトーシスなどのダイナミン非依存の経路がある。クラスリンの関与する経路はまず始めにウイルス-

受容体複合体がクラスリン小胞により初期エンドソームへ運ばれ、後に後期エンドソームへ達する。これはウイルスの侵入にもっとも一般的な経路である。クラスリン依存経路では、細胞内に取り込まれたウイルス受容体は細胞膜へリサイクルされ再利用されるか、あるいはウイルス含有小胞(MVB)に取り込まれ、引き続きリソソーム内で分解される。

肝細胞成長因子に制御されるチロシンリン酸化蛋白であるHrsは細胞内のシグナリングと膜輸送に関与する重要な分子である。Hrsは細胞内のユビキチン化蛋白の輸送に関与しているとされる。HrsはSTAM1やSTAM2と結合し、ESCRT-0複合体を形成する。この複合体はエンドソームのクラスリンを含む小領域に局在し、ユビキチン化蛋白を認識し、初期エンドソーム

から MVB/後期エンドソームへのユビキチン化蛋白の輸送に関わる。

ACE2はSARS ウイルスの受容体として知られており、感染の成立に必須である。ACE2の結合を阻害する抗体は、マウスにおいて感染を阻止する。SARS ウイルスに感染する細胞株にはACE2が発現しているが、ACE2非発現細胞株にはSARS ウイルスの感染はみられない。

ACE2がSARS ウイルス感染に決定的な役割を果たしているという遺伝子的な証拠が *in vivo* での実験で示されている。ACE2ノックアウトマウスにおいては非常にSARS ウイルスに対して感受性が低く(肺組織 1gあたり 10^2TCID₅₀)、S蛋白質 mRNAの複製量も緩やかに減少を示した。野生型のマウスに対する *in vivo* のSARS ウイルス感染実験では肺において顕著なACE2の発現の減少を示し、ACE2の発現の減少がSARS ウイルスによって引き起こされる重篤な肺疾患を惹起している可能性を示唆するものであった。SARS ウイルスのS蛋白質はレニン-アンギオテンシン系の脱制御を通じて急性の肺疾患症状を増悪させる。さらにSARS ウイルスのスパイク蛋白質によって引き起こされる肺疾患増悪はAT1Rの抑制によって緩和可能である。

これらを踏まえ、我々はSARS ウイルスの感染および増殖機序を明らかにするための研究と、過程を阻害する物質の探索を並行して推進した。

菅村グループはSARS 偽ウイルスを用いて、様々な細胞株を検討し、感染における小胞輸送系蛋白の関わりの研究に最適の細胞株を選び、小胞輸送系蛋白をiRNAでノックダウンし、その関わりを明らかにすることを目的にした。

石坂グループの本年度の目的は、ウイルスのスパイク蛋白質(S-蛋白質)と標的細胞のアンギオテンシン転換酵素-2(angiotensin

converting enzyme-2以下ACE-2)の結合を阻害する化合物を様々な天然物からスクリーニングし、同定することおよびその機能を解析することであった。

服部グループは、SARS ウイルスの感染機序を明らかにすることと、そのプロセスを阻害する因子の探索を行うことを目的とした。

B. 研究方法

(1)細胞内小胞輸送関連分子を標的としたSARS ウイルス複製・成熟過程における阻害剤の開発(菅村)

前年度に引き続き、ウイルスの細胞内への取り込みの過程の解明を行う。小胞輸送関連蛋白質の発現を阻害したノックアウト細胞とSARS 偽ウイルスを作製して、感染実験を行いこれらの蛋白質の役割の解明を試みた。

(2)海洋微生物抽出エキスからの抗SARS 因子探索(石坂)

精製したS蛋白質をELISAプレートに結合させたのちに部分精製したACE-2を作用させた。これを蛍光標識した抗ACE-2抗体を作用させ、蛍光プレートリーダーを用いて結合性をモニターした。さらにSまたはACE-2蛋白質をセンサーチップに結合させ、ピアコア(Biacore J)を用いて候補化合物エキス中の結合性を解析した。

新たにレンチウイルスを用いた感染システムの立ちあげと(インビトロジェン社製)、ACE-2活性測定システムの導入も行った。

(3)漢方薬エキスの感染抑制効果の確認(服部)

昨年までに偽ウイルスを作成し、Vero E6(アフリカミドリザル腎上皮細胞由来)、HepG2(ヒト肝細胞癌由来)、Hela(ヒト子宮頸部上皮癌由来)の他多数の細胞株にHIV/SARS 偽ウ

ウイルスへの感受性スクリーニングし。これを用いて、桂皮と丁子の感染抑制効果を詳細に検討した。

C. 研究結果

(1)細胞内小胞輸送関連分子を標的とした SARS ウイルス複製・成熟過程における阻害剤の開発 (菅村)

小胞の酸性化に関与している Hrs の欠損した細胞ではウイルス感染が亢進すること、SARS ウイルスの細胞内侵入には ACE2 の発現のほか、クラスリン重鎖 (CHC) の発現が相関する事が明らかになった。

(2)漢方エキスからの抗 SARS 因子探索および病態制御機構の解析 (石坂)

漢方薬エキスをスクリーニングし、桂皮エキスに SARS ウイルス感染抑制効果のあることを確認した。さらに桂皮エキスは TNF- α 分泌誘導に対しても抑制的に作用することを認めた。

(3)漢方薬エキスの感染抑制効果の確認 (服部)

HIV/SARS 感染抑制実験によると桂皮樹皮エキス (CCE) と丁子エキスが細胞毒性を示さずに感染を抑制した。その選択的指標 (SI) は 6.67 と 12.93 であった。桂皮樹皮エキスは標的細胞を前処理することで感染を抑制したが、丁子エキスにはそのような効果はみられなかった。

桂皮樹皮エキスの 4ethanol-aqueous fractions を検討したところ、BuOH の分画と AcOE の分画は低濃度で明らかな抑制を示した。しかしながら、後者の分画は強い細胞毒性を示した。BuOH の分画の HIV/SARS に対する SI は 4 であった。293T-S と Hela-ACE2 を用いた細胞膜融合系を用いて桂皮樹皮エキスと丁子エキスおよびそれらの分画の感染抑制効果を検討した。その結果、桂皮樹皮エキスの BuOH 画分が強力な抑制効

果を示した。

感染性ウイルスに対する薬剤の抑制効果を観察した結果、桂皮樹皮エキス、丁子エキスに感染抑制効果を認めた。それらの精製画分についての検討も行った結果、桂皮樹皮エキスの Aq.EtOH 画分と BuOH 画分が感染を強力に抑制することが示された。

D. 考察

(1)細胞内小胞輸送関連分子を標的とした SARS ウイルス複製・成熟過程における阻害剤の開発 (菅村)

小胞輸送関連分子がウイルス増殖に影響していることがわかった。これは、小胞依存性のウイルス分解が抑制されるためであると考えられる。特に、小胞の酸性化に関与している Hrs の欠損した細胞ではウイルス感染が亢進した。これは Hrs 欠損により MVB 形成が肥大化したものと解釈している。

(2)漢方薬エキスからの抗 SARS 因子探索 (石坂)

桂皮エキスは、ウイルス感染阻害効果だけでなく、TNF- α 分泌誘導に対しても抑制的に作用することから、SARS 感染によって引き起こされる呼吸器症状の重症化に対しても阻害効果を示す可能性が示唆された。

(3)漢方薬エキスの感染抑制効果の確認 (服部)

偽ウイルス感染系と細胞膜融合系を用いて、桂皮樹皮エキスと丁子エキスが SARS ウイルスの感染を抑制することを明らかにした。

さらに、それらの精製画分についての検討を行い、桂皮樹皮エキスの BuOH 画分に感染を強力かつ有効に抑制する因子が含まれることを示した。

今後は動物モデルで SARS ウイルスの感染抑制効果の検証を行い、治療に有効な薬剤の開

発につなげるとともに、漢方薬エキスがどのようなメカニズムで SARS ウイルスの感染を抑制しているのかを解明し、ウイルス感染機序の解明に貢献することを目指す。

E. 結論

菅村グループにおいては、宿主細胞の機能を詳細に解析し、SARS ウイルスの感染と小胞輸送経路に関わる分子との関連を示し、SARS ウイルスの感染過程の一部を明らかにした。石坂グループにおいては、SARS ウイルスの感染を抑制する漢方薬エキスの作用機序を解析し、特に桂皮エキスが ACE2 のシェディングを促進することと TNF- α 分泌誘導を抑制することを示した。これは、SARS 患者にみられる呼吸器症状の重症化の過程を考える上で興味深い。服部グループでは、SARS ウイルスの感染を抑制するエキスの詳細な検討を行い、桂皮樹皮エキスの BuOH 画分に有望な因子を含むことを示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文

(菅村分)

1. Kyuuma, M, Kikuchi, K, Kojima, K, Sugawara, Y, Sato, M, Mano, N, Goto, J, Takeshita, T, Yamamoto, A, **Sugamura, K** and Tanaka, N.: AMSH, an ESCRT-III Associated Enzyme, Deubiquitinates Cargo on MVB/Late Endosomes. *Cell Struct Funct.* 31, 159-172, 2006.
2. Chen, S., Ishii, N., Ine, S., Ikeda, S., Fujimura, T., Ndhlovu, L. C., Soroosh, P., Tada, K., Harigae, H., Kameoka, J., Kasai, N., Sasaki, T. and **Sugamura, K.**: Regulatory T cell-like activity of Foxp3⁺ adult T cell leukemia cells. *Int. Immunol.*, 18, 269-277, 2006.
3. Ishikawa, Y., Tanaka, N., Murakami, K., Uchiyama, T., Kumaki, S., Tsuchiya, S., Kugoh, H., Oshimura, M., Calos, M. P. and **Sugamura, K.**: Phage fC31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines. *J. Gene Medicine*, 8: 646-53, 2006.
4. Satoh, K., Kagaya, Y., Nakano, M., Ito, Y., Ohta, J., Tada, H., Karibe, A., Minegishi, N., Suzuki, N., Yamamoto, M., Ono, M., Watanabe, J., Shirato, K., Ishii, N., **Sugamura, K.** and Shimokawa, H.: Important role of endogenous erythropoietin system to recruit endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circulation*, 113, 1442-1450, 2006.
5. Soroosh, P., Ine, S., **Sugamura, K.** and Ishii, N.: OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *J. Immunol.*, 176: 5975-5987, 2006.
6. Uchiyama, T., Kumaki, S., Ishikawa, T., Onodera, M., Sato, M., Du, W., Sasahara, Y., Tanaka, N., **Sugamura, K.** and Tsuchiya, S.: Application of HSVtk suicide gene to X-SCID gene therapy: Ganciclovir offsets gene corrected X-SCID B cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 341:391-8, 2006.
7. Nakashima, A., Tanaka, N., Tamai, K., Kyuuma, M., Ishikawa, Y., Sato, H., Yoshimori, T., Saito, S. and **Sugamura, K.**: Survival of parvovirus B19 infected cells by cellular autophagy. *Virology*, 349, 254-263, 2006.
8. Watanabe, R., Harada, Y., Takeda, K., Takahashi, J., Ohnuki, K., Ogawa, S., Kaibara, N., Koiwai, O., Tanabe, K., Toma, H., **Sugamura, K.** and Abe, R.: Grb2 and Gads exhibit different interactions with CD28 and play distinct roles in CD28-mediated costimulation. *J. Immunol.*, 177:1085-1091, 2006.
9. Satoh, T., Moroi, R., Aritake, K., Urabe, Y., Kanai, Y., Sumi, K., Yokozeki, H., Hirai, H., Nagata, K., Hara, T., Utsumi, M., Hirokawa, K., **Sugamura, K.**, Nishioka, K., Nakamura, M.: Prostablandin D2 plays an essential role

in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor. *J. Immunol.*, in press.

(石坂分)

1. Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya J, Terunuma H, Kano S and Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* In press.

2. Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto K, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, Yuo A and Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26, 477-486, 2007.

3. Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 66 627-631, 2006.

(服部分)

1. Xiao, P., Ling, H., Usami, O., Furuta, R. A., Shimizu, N., Hoshino, H., Zhuang, M., Hattori, T. Characterization of a CD4-independent primary HIV-1 isolate from Pneumocystis Pneumonia patient. 10th Anniversary Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, November 17-19, 2006, Hyatt Regency Baltimore, Baltimore, Maryland, U.S.A.
2. 庄敏, 蔣虹, 古田理佳, 肖鵬, 服部俊夫. The inhibitory effect of medical herbs on SARS-CoV entry in vitro. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 11月19日-21日, 2006, 名古屋国際会議場 イベントホール

口頭発表

(菅村分)

Tanaka, N. and Sugamura, K.

Degradation of IL-6 signal transducer gp130 is regulated by two distinct mechanisms: Role of Hrs in ligand dependent degradation pathway. 20th IUBMB: 2006年6月20日(京都)

第60回日本細菌学会東北支部総会

佐藤真理子, 田中伸幸, 小林秀行, 菅村和夫
HIV-gag蛋白の細胞内輸送機構の解析
2006年8月24、25日 福島市

第60回日本細菌学会東北支部総会

井上雄喜, 田中伸幸, 田中義乃, 菅村和夫
SARS-CoV偽ウイルスを用いた細胞内侵入機構の解析
2006年8月24、25日 福島市

第54回日本ウイルス学会学術集会

井上雄喜, 田中伸幸, 菅村和夫
SARS-CoV偽ウイルスを用いた細胞内侵入機構の解析
2006年11月19-21日 名古屋市

第54回日本ウイルス学会学術集会

佐藤真理子, 田中伸幸, 菅村和夫
小胞輸送蛋白HrsによるHIV-1 Gag蛋白の分解制御
2006年11月19-21日 名古屋市

(石坂分) 1. 芳賀しおり, 笹月健彦, 石坂幸人
SARS-CoV 感染による ACE2 の shedding は TACE 依存的に誘導される 日本分子生物学 2006 フォーラム, 2006年12月. 名古屋, 愛知県
2. 福士雅也, 秋山 徹, 石坂幸人, 切替照雄
SARS コロナウイルスの Spike タンパクは宿主細胞因子 Calnexin と結合する 第54回 日本ウイルス学会 2006年11月. 名古屋, 愛知県

(服部分)

1. Xiao, P., Ling, H., Usami, O., Furuta, R. A., Shimizu, N., Hoshino, H., Zhuang, M., Hattori, T. Characterization of a CD4-independent primary HIV-1 isolate from Pneumocystis Pneumonia patient. 10th Anniversary Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, November 17-19, 2006, Hyatt Regency Baltimore, Baltimore, Maryland, U.S.A.
2. 庄敏, 蔣虹, 古田理佳, 肖鵬, 服部俊夫. The inhibitory effect of medical herbs on SARS-CoV entry in vitro. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 11月19日-21日, 2006, 名古屋国際会議場 イベントホール

H. 知的財産の出願・登録情報

特許取得

(菅村分)

1. 特許取得
Protein AMSH and cDNA thereof
米国特許(United States Patent)
Kazuo Sugamura and Nobuyuki Tanaka
US6, 838, 551 B2
Date of Patent; Jan. 4, 2005.

PROTEIN AMSH AND cDNA THEREOF

Sugamura, K and Tanaka, N.

豪州特許

Austrian patent No.: 773, 717.

Date of Patent: Sept. 16, 2004.

特許庁特許

特許日:平成18年1月27日

タンパク質 AMSH とその DNA

特許第 3 7 6 4 2 8 6 号

菅村和夫、田中伸幸

実用新案登録 なし

その他 なし

II. 分担研究報告書

SARSウイルス感染系における細胞内小胞輸送の役割

主任研究者 菅村 和夫 東北大学大学院医学系研究科教授

研究要旨:(目的) Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)「重症急性呼吸器症候群」の原因ウイルスとしてコロナウイルス属に属する SARS-CoV が同定された。幸いにも日本では発生していないが、交通のスピードや交流範囲の拡大に伴い、将来の世界的な流行の可能性も否定できない。SARS-CoV 感染の感染成立機構、病態の解明を行うことで、その分子基盤に立脚した治療法開発が可能になると考えられる。最近、レトロウイルスやパラインフルエンザウイルスを含む複数のウイルス感染増殖において「ウイルスの吸着、細胞内侵入、増殖および出芽」からなるウイルスライフサイクルの調節に、宿主小胞輸送関連蛋白群が密接に関与することが示された。そこで本研究では我々が同定した小胞輸送蛋白に焦点を当て、SARS-CoV の感染、細胞内侵入への関与を検討した。(結果) SARS-CoV の Spike(S) 蛋白を発現する偽 SARS-CoV 感染系を用い、ウイルスの吸着および侵入を検討した。その結果、細胞内侵入には ACE2 の発現のほか、クラスリン重鎖(CHC)の発現が相関することが判明した。さらに小胞輸送関連蛋白である HRS 依存性に侵入制御を強く受けることが判明した。従って、SARS-CoV の感染成立において、ACE2、クラスリンおよび ESCRT 小胞輸送系蛋白群が密接に関与することが明らかとなった。

■ 研究協力者

田中伸幸 宮城県立がんセンター研究所

A. 研究目的

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)「重症急性呼吸器症候群」の原因ウイルスとしてコロナウイルス属に属する SARS-CoV が同定された。SARS-CoV 感染症は、幸いにも日本では発生していないが、世界における人的交流のスピードと交流範囲の拡大を考えると、その感染成立機構、病態の解明を早期に行い、その分子基盤に立脚した感染増殖制御活性物質の探索に基づく治療薬開発が必須である。SARS-CoV は全長約 29kb にもおよぶ + 鎖 RNA をゲノムにもつ RNA ウイルスである。コロナウイルスは一般的に 3 つのグループに分類されていたが、SARS-CoV がこれらのどのグループにも属さないことが分かれ他のコロナウイルスより複雑な複製戦略をとっていることが示唆されている。宿主細胞に対するウイルスの吸着には ACE2 が少なくとも関与すると報告されているが、感染後の細胞内侵入、増殖、出芽のライフサイクルには未だ不明の点が少ない。一方、レトロウイルス、パラインフルエンザウイルス等の RNA ウイルスの中には宿主への感染成立と増殖、出芽のいずれかの段階において宿主の小胞輸送系を巧妙に利用しているものが存在している。

宿主細胞には ESCRT (Endosomal sorting

complex required for transport) と呼ばれる、一連の蛋白群からなる小胞輸送系蛋白、および ESCRT 関連酵素分子等が存在する。最近になって、これら ESCRT 蛋白は宿主細胞蛋白の輸送のみならず、ウイルス蛋白の輸送にも密接に関与することが明らかとなってきた。一方、我々は細胞内シグナル伝達分子として STAM1, STAM2 (以下 STAMs と総称) および Hrs を同定したが、これらの蛋白は複合体を形成し ESCRT 蛋白 (ESCRT-0 複合体) に分類され細胞表面の受容体をはじめとする種々の蛋白の輸送制御に関わる。そこで本研究においては我々の同定した小胞輸送蛋白に焦点をあてることにより、SARS-CoV の細胞内吸着から細胞内侵入に至る過程およびウイルス成熟と出芽の詳細を明らかにすることを目的とする。昨年度の研究においてエンベロープウイルス (MCMV) の細胞内侵入からウイルス放出に至るステップに STAMs および Hrs が密接に関与していたことから、本年度は SARS-CoV 偽ウイルスを用いて吸着から細胞内侵入にいたる感染初期にまず焦点を当てその詳細を明らかにすることを目的とした。

一般に一部のコロナウイルスでは細胞内侵入にエンドサイトーシスを利用することが知られている。エンドサイトーシスは大別して、clathrin 依存性、caveolae を含む lipid raft 依存性、pinocytosis や phagocytosis 依存性に分類される。ウイルス侵入におけるエンドサイトーシス

関与の代表的な例としては、Semliki Forest VirusおよびVesicular Stomatitis Virus (VSV)がclathrinを利用して細胞内に侵入すること、およびSimian Virus 40 (SV40)がcaveolaeを利用して細胞内侵入すること、等が挙げられる。しかしながら、SARS-CoVが細胞内に侵入する経路については未だに不明な点が多い。本研究では、SARS-CoVの細胞内侵入機構を解析することにより、ウイルス感染制御の分子基盤を解明する。本研究の成果はSARS-CoV感染症の基礎的解析に留まらず、新規予防法の開発および革新的な治療を可能とする新薬開発の基盤形成に資することが期待される。

B. 研究方法

細胞株

HepG2(ヒト肝細胞癌由来); COS7(アフリカグリーンモンキー腎細胞)を用いた。

プラスミド

pCMV Δ IR8.2, pNL43-R-E-, pHR'CMV-Luc, pMDG, CMV/R-SARS-S, pcDNA3.1-SARS, pNGVL-MLV-Gag-Pol, pLZR-Luc以上のプラスミドはDr. DengとDr. Nabel G Jから得られた。CMV/R-SARS-Sはヒトコドンをもち、SARSコロナウイルスのUrbani株(Accession No. A Y27874)と同じタンパクを発現する。pcDNA3.1-ACE2-C9はACE2の発現に使用した。pcDNA3.1-ACE2 Δ tailはpcDNA3.1-ACE2の膜貫通領域直後にストップコドンを導入した変異体の発現ベクターである。pcDNA3.1-ACE2 TMはACE2 Δ tailの膜貫通領域をEGFRの相同領域と置換した変異体の発現に用いた。

SARS偽ウイルスの作成

10cmのプラスチックプレート上に 5×10^6 の293T細胞を培養し、24時間後にリン酸カルシウム法を用いて以下のプラスミドを細胞に遺伝子導入した。

pCMV Δ IR8.2(7ug), pHR'CMV-Luc(7ug)およびpCMV/R-SARS-S(0.8ug; SARS Spike発現用)、pMDG(7ug; VSV G発現用)あるいはpDJ1(7ug; A-MLV env発現用)。遺伝子導入の12時間後に細胞を洗浄し、さらに48時間培養した。培養上清は0.45umのフィルターでろ過したのちアッセイに用いた。

偽SARS-CoVウイルス感染とルシフェラーゼアッセイ

1×10^4 のHepG2細胞を96穴プレートで培養し、25ulの偽ウイルス培養液を加えた。16ないし18時間感染させた後、培養液を交換し、感染開始から48時間後、細胞をPBSで洗った後、50uLの細胞可溶化液(Mammalian cell lysis buffer; プロメガ社)を加えて細胞抽出液(cell lysate)を回収した。25uLのcell lysateのluciferase activity (RLU)をLuciferase assay reagentで処理したのちlumimeter (Berthold)で測定し、細胞内への偽ウイルスの侵入を定量した。

エンドサイトーシス阻害剤処理

clathrin形成阻害剤であるchlorpromazineをHepG2細胞に1時間前処理し、薬剤を含む各偽ウイルスを加えた。lipid raft形成阻害剤であるmethyl-beta-cyclodextrin (MBCD)も同様に1時間前処理した。ウイルスエンベロープへの影響を除くため、薬剤処理をしていない各偽ウイルスを感染実験に使用した。

酸性化阻害剤処理

エンドソーム酸性化阻害剤であるNH₄Clとchloroquineはchlorpromazineと同様に処理した。

ウエスタンブロット

ACE2、clathrin heavy chain (CHC)蛋白に対する単クローン抗体(R&D, santa cruz)を使用した。細胞をセルスクレーパーにて剥離回収し遠心後のペレットをCell Lysis Buffer (1%NP-40, 140mM NaCl, 10mMEDTA, 10mM TrisHCl, pH 7.4, 1% aprotitin, 1mM PMSF)にて溶解した。細胞溶解液は4°C, 14000 X gにて遠心しpost nuclear fractionを抽出した。蛋白定量はProtein Assay kit(BioRad)を用いて行い、20ugを10%ポリアクリルアミドゲル(和光純薬工業)電気泳動により分離した。分離された蛋白をImmobilonP(Millipore)に対してブロットした。上記単クローン抗体による特異的シグナルは、HRP-標識2次抗体を用いた反応を行い、ケミルミネセンスはSuper Signal West Pico Detection kit (Pierce)を用いLumiImagerF1 (Roche)を用いて検出した。

Clathrin Heavy Chain (CHC)のノックダウン

CHCに対するsiRNAはstealth siRNA (invitrogen)を用いた。5 pmolのCHC siRNAをLipofectamin RNAiMax (invitrogen)を用いてHepG2細胞にtransfectionした。48時間後、knockdown効率の測定と各偽ウイルスを細胞に加えた。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。

C. 研究結果

前年度までに我々は以下のことを明らかとしてきた。①SARS-CoV偽ウイルス感染系の確立、②HepG2細胞においてSARS-CoV受容体であるACE2が高発現していることの確認、③HepG2細胞にはCaveolae形成に必須であるcaveolin-1が欠失していること、④小胞輸送関連分子であるHrsがSARS-CoVの感染を負に制御していること、である。本年度はこれら結果に基づき、さらに詳細なSARS-CoV細胞内侵入機構を明らかとすること

を目指した。

1. SARS-CoV偽ウイルスのエンドサイトーシス阻害剤の影響

SARS-CoVの宿主細胞感染機構を明らかにするために、2種類のエンドサイトーシス阻害剤の影響を検討した。chlorpromazineはclathrin形成阻害剤であり、この薬剤をHepG2細胞に処理し、SARS-CoVの細胞侵入量をLuciferase活性で評価した(図1A)。コントロールとしてVSVをClathrin依存性(pH依存性)、A-MLVをClathrin非依存性(pH非依存性)のコントロールとして用いた。Chlorpromazine処理はA-MLV侵入量には影響がない状態でSARS-CoVとVSV偽ウイルスの侵入量を濃度依存的に阻害した。またLipid-raft形成阻害剤であるMBCD処理はA-MLVを濃度依存的に阻害する状態でもSARS-CoVとVSV偽ウイルス侵入量を部分的にしか阻害しなかった。これらの結果はSARS-CoV偽ウイルスがClathrin依存的に細胞に侵入することを示唆している。

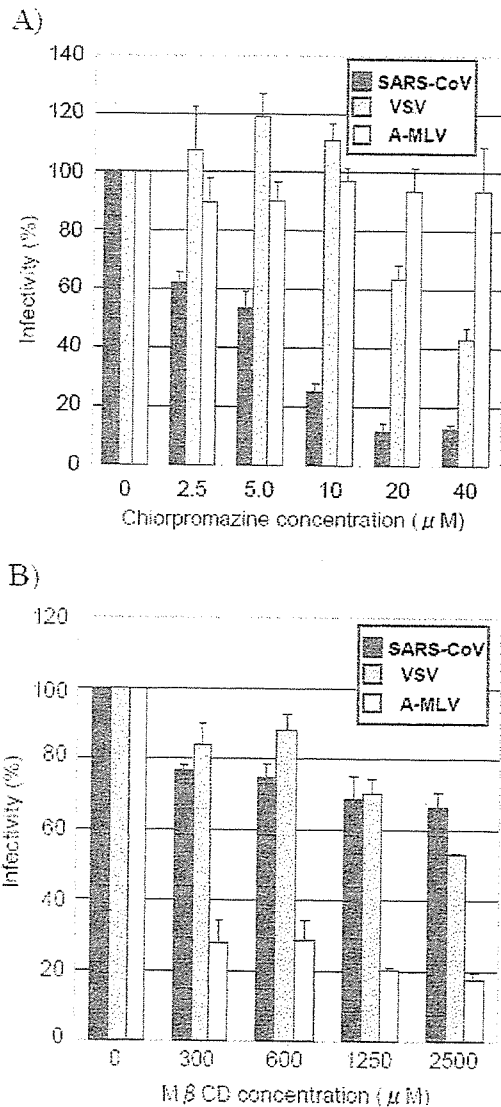
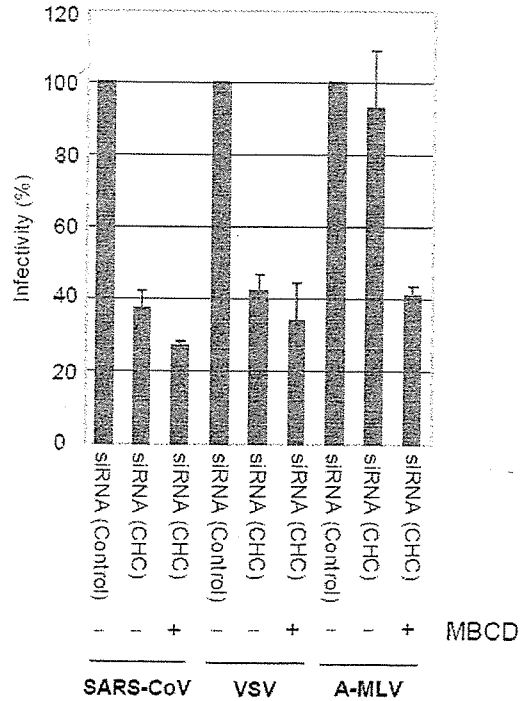


図1. 2種類のエンドサイトーシス阻害剤におけるSARS-CoV偽ウイルス侵入の影響。HepG2細胞に、A)chlorpromazineと、B)MBCDを処理し偽ウイルスの感染性を調べた。値は未処理を100%とした相対量として示している。

2. CHC knockdownが与えるSARS-CoV偽ウイルス侵入の影響

1. で得られた結果をさらに確かめるために、clathrin coated pit形成に必須であるCHCをsiRNAによりノックダウン(knockdown)させた状態でSARS-CoV偽ウイルスの侵入を検討した(図2A)。なおCHCのknockdownはウエスタンブロッティングにより確認した(図2B)。SARS-CoVとVSV偽ウイルス侵入量はCHC knockdownにより約40%にまで低下した。clathrin非依存性であるA-MLV侵入量には影響がみられなかった。さらにこのCHC knockdown細胞にMBCD処理することにより、SARS-CoV偽ウイルスの細胞内侵入が部分的にでもlipid raftに依存しているか調べたが、MBCDを処理してもほぼ影響が見られなかった。以上の結果よりSARS-CoV偽ウイルスはclathrin依存性エンドサイトーシスにより細胞に侵入することが明らかとなった。

A)



B)

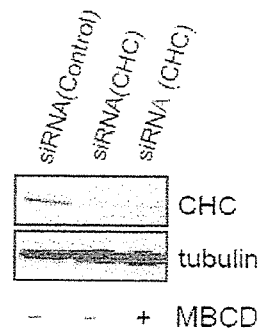


図2. CHCがSARS-CoV偽ウイルス侵入に与える影響。A) HepG2細胞にCHC siRNA導入後、偽ウイルス侵入量

を検討した。さらにknockdown細胞にMBCDを処理し同様に侵入量を調べた。B)ウエスタンブロッティングによるCHC knockdown効率の確認

3. SARS-CoV受容体ACE2の細胞膜上における局在の検討

次にSARS-CoV受容体ACE2がlipid raftに局在するかを検討した。HepG2細胞をTritonX100を用いて可溶化し、抽出液をスクロース密度勾配遠心した。各フラクション(fraction)を回収し、ACE2がlipid raftマーカーである糖脂質GM1ガングリオシドと共局在するか検討した(図3)。GM1ガングリオシドはfraction #8-11に局在するのに対し、ACE2はfraction #6と7に局在した。さらにCHCはACE2と共局在した。以上よりACE2はlipid raftの外に局在することがわかった。

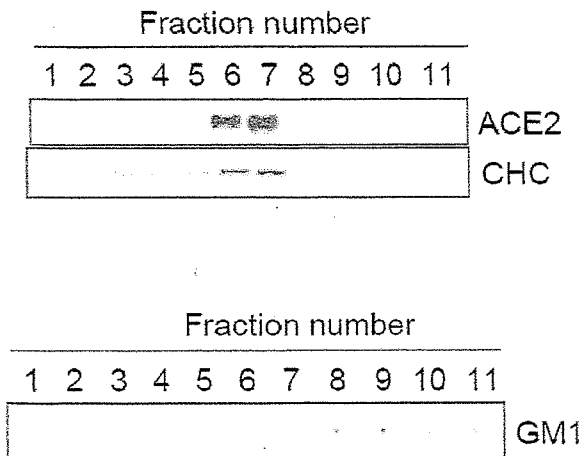


図3.

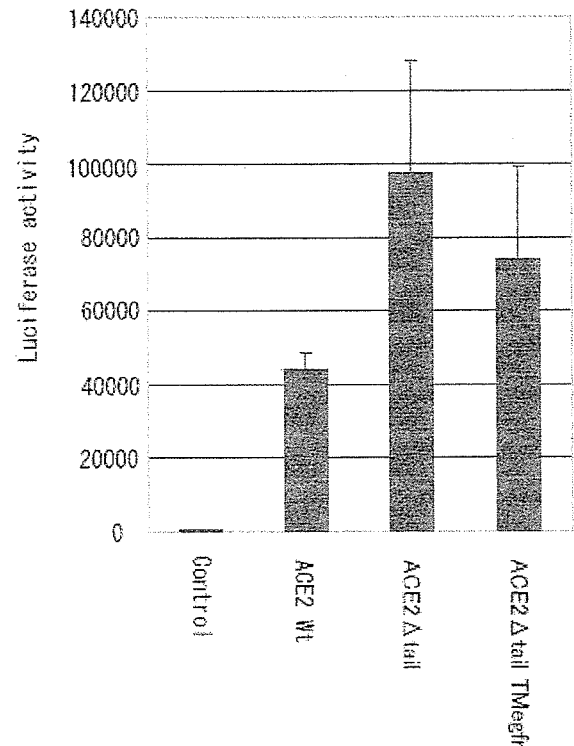
ACE2はlipid raft外に局在する。HepG2細胞をTritonX100で可溶化後、5-40%スクロース密度勾配遠心により分画した。ACE2とCHCはウエスタンブロット法を用い、またGM1はドットブロット法により検出した。

4. SARS-CoV偽ウイルス感染におけるACE2 細胞質内領域(cytoplasmic tail)の役割

SARS-CoV偽ウイルスがACE2に結合した後、lipid raft外においてclathrin依存的に細胞内に取り込まれることから、clathrinがACE2の細胞質内領域と相互作用しエンドサイトーシスが予想される。clathrinはclathrin coated pitを形成して受容体を細胞内に輸送するが、pitの形成には受容体のcytoplasmic tailに存在するYXXΦ(Φ:疎水性アミノ酸)にadaptor protein (AP2)が結合し、次いでAP2にclathrin heavy chain(CHC)が結合する。SARS-CoV偽ウイルス感染において、実際にACE2 cytoplasmic tailが機能しているのかを検討するため、ACE2を発現していないCOS7細胞に野生型ACE2 (ACE2 Wt)とcytoplasmic tailを欠失させたACE2 (ACE2 Δtail)を導入し、SARS-CoV偽ウイルスの侵入を検討した(図4)。SARS-CoV偽ウイルスの感染能力はコントロールと比較しACE2 Wtを導入することで上昇した。面白いことにACE2Δtailを導入したときもWtと同等に侵入量が増加した。さらにACE2Δtailの膜貫通領域をEGF受容体の同部位と置換した変異体(ACE2-Δtail-TMegfr)同様な検討を行

ったところ、ウイルス侵入量は増加した。これらの結果から、SARS-CoV偽ウイルス感染においてACE2 cytoplasmic tailだけではなく膜貫通領域も必要ではないことが判明した。

A)



B)

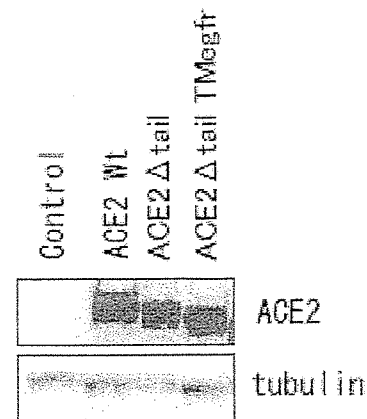


図.4

ACE2変異体におけるSARS-CoV偽ウイルス受容体活性。

6. ACE2-Δtailのエンドサイトーシスにおけるclathrinの役割

ACE2 ΔtailがSARS-CoV偽ウイルスの受容体として機能することが明らかとなったが、次にこのウイルス感染様式がClathrin依存性であることをchlorpromazine処理により調べた(図6)。COS7細胞にACE2 WtとACE2 Δtailを導入後、HepG2細胞と同様にchlorpromazineを処理しウイルス侵入量を検討した。chlorpromazine処理はACE2 WtあるいはΔtailの如何に関係なく濃度依存的にウイルス侵入を阻害した。したがって、cytoplasmic tailの欠失したACE2でも同様にclathrin依存的に細胞に取り込まれるこ

とがわかった。

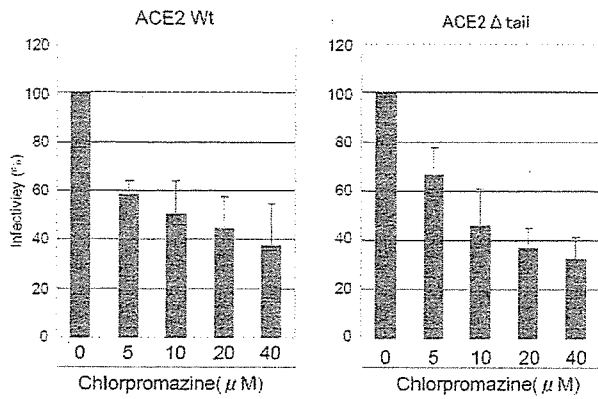


図6.

ACE2 cytoplasmic tail欠損変異体は野生型と同様にClathrin依存的のSARS-CoV偽ウイルス受容体活性を示す。

7. 細胞内に取り込まれたACE2の局在の検討

細胞表面でウイルスと結合したACE2が、エンドサイトーシスの後に、如何なる細胞内器官に輸送されるか検討した(図7A)。HepG2細胞を3時間飢餓状態にすることで細胞表面に発現させた後、濃縮した偽ウイルスを感染させた。感染後、10分で細胞表面に存在したACE2は初期エンドソームマーカであるEEA1と共局在した。さらにこれを確かめるために初期エンドソームの酸性化環境を2種の酸性化阻害剤(NH₄Clとchloroquine)によって阻害し、ウイルス感染の検討を行った(図7B)。その結果、両阻害剤はSARS-CoV偽ウイルスの侵入量を濃度依存的に阻害した。

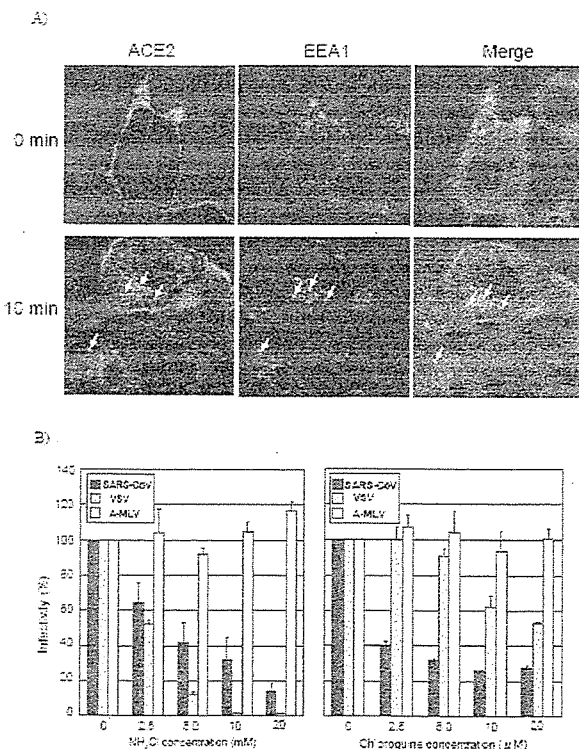


図7

ウイルス感染後、ACE2は初期エンドソームに輸送される。

D. 考察

多くのウイルスは細胞に感染する際、宿主細胞が備えるエンドサイトーシス機構を利用して感染を成立させる。本研究において我々は初めてSARS-CoV偽ウイルスを用いた実験により、clathrin依存性の経路が感染に重要であることを明らかにした。この結論はSARS-CoV偽ウイルス感染がclathrin形成阻害剤であるchlorpromazine処理により阻害されること、またCHC knockdownでも同様に感染が阻害されることから導き出された。しかしながら細胞表面のcholesterol除去によりlipid raftの形成を阻害するMBCD処理でも部分的にSARS-CoV偽ウイルスの感染阻害が確認された。この理由としてまずSARS-CoV偽ウイルスは部分的にlipid raft依存性エンドサイトーシスを利用している。しかしながら、これはCHC knockdown細胞にMBCD処理しても感染にはほぼ影響が見られないことから考えにくい。次にMBCD処理がclathrin依存性エンドサイトーシスを部分的に阻害していた。これまでにclathrin依存性エンドサイトーシスによって取り込まれるtransferrin receptor (TfR)やepidermal growth factor receptor (EGFR)がMBCD処理によりその取り込みが阻害されること。さらにclathrin依存性エンドサイトーシスにおいてもある程度cholesterolが必要であるという報告が存在することから、MBCDがclathrin依存性エンドサイトーシスに影響した可能性が高いと考えられる。またACE2がlipid raftの外に局在することからもACE2はlipid raft以外、つまりClathrin依存性の取り込み機構を利用している可能性が高い。

多くの細胞表面受容体は特異的なligandと結合後、cytoplasmic tailを介して細胞内にシグナルを伝達する。そこで我々はclathrin依存性エンドサイトーシスにおけるACE2 cytoplasmic tailの役割をACE2 cytoplasmic tail欠損変異体を用いて検討した。面白いことにSARS-CoV偽ウイルス感染にはACE2 cytoplasmic tailは必要ないことが明らかとなった。さらに我々はACE2膜貫通領域が何らかのメカニズムにおいてウイルス感染に寄与していると考え、ACE2の膜貫通領域をEGFRのものを置換した変異体を作成したが、これにおいても野生型ACE2と同様にSARS-CoV偽ウイルス感染を確認した。実際にACE2細胞外領域はSARS-CoV偽ウイルス感染を中和し、細胞外領域を発現させた細胞にウイルスを加えても感染は確認できなかった(未発表データ)。またACE2 cytoplasmic tail欠損変異体を介したSARS-CoV偽ウイルス感染においてもclathrin依存性エンドサイトーシスをウイルス感染に利用していることも明らかとなった。

これらの実験結果をまとめるとSARS-CoVのACE2を介した感染において、そのcytoplasmic tailは必須ではないこと、ACE2の膜貫通領域には特異性はないこと、一方でウイルス感染にはACE2細胞外領域が

細胞外に遊離した形ではなく、細胞膜上に存在することが効率的な感染に必須であることが分かった。現在、我々はACE2を細胞内に引き込む分子(co-factor)が存在し、そのcytoplasmic tailを介してclathrin coated pitを形成しているであろうと考え、さらに詳細な実験を行っている。

これまでSARS-CoV感染には細胞内の酸性pHが必要であることが報告されている。これはSARS-CoVのACE2との結合に必須なSpike(S)タンパク質が主に酸性化環境であるエンドソーム/ライソソームに存在するプロテアーゼ(カテプシンL)により開裂をうけることに起因している。従前、ACE2が直接エンドソームに輸送されることは確認されておらず、本研究はこの事実を初めて明らかとしたものである。さらにACE2 cytoplasmic tail欠損変異体を用いてもウイルス感染にpH依存性には変化がなかったことから、細胞質内領域はエンドソームへの輸送に必須ではないことが示唆された。エンドソームに存在する小胞輸送蛋白HrsもSARS-CoV偽ウイルス感染に負に作用していることから(未発表データ)、Hrsがエンドソームに存在することによりウイルス感染を抑制する可能性があることが考えられた。

E. 結論

本研究により、SARS-CoV偽ウイルスを用いてウイルスがclathrin依存的に細胞内にウイルスが取り込まれることを初めて明らかとした。そして、そのclathrin coated pit形成にはACE2 cytoplasmic tailは必要なく、別の共役分子(受容体)の存在の可能性を示唆した。また細胞表面にあるACE2とウイルスが結合後、ACE2は初期エンドソームに輸送され、そこでの酸性化環境が以後の感染に必須であることも明らかとした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)

1. Kyuuma, M, Kikuchi, K, Kojima, K, Sugawara, Y, Sato, M, Mano, N, Goto, J, Takeshita, T, Yamamoto, A, **Sugamura, K** and Tanaka, N.: AMSH, an ESCRT-III Associated Enzyme, Deubiquitinates Cargo on MVB/Late Endosomes. *Cell Struct Funct.* 31, 159-172, 2006.
2. Chen, S., Ishii, N., Ine, S., Ikeda, S., Fujimura, T., Ndhlovu, L. C., Soroosh, P., Tada, K., Harigae, H., Kameoka, J., Kasai,

N., Sasaki, T. and **Sugamura, K.**: Regulatory T cell-like activity of Foxp3⁺ adult T cell leukemia cells. *Int. Immunol.*, 18, 269-277, 2006.

3. Ishikawa, Y., Tanaka, N., Murakami, K., Uchiyama, T., Kumaki, S., Tsuchiya, S., Kugoh, H., Oshimura, M., Calos, M. P. and **Sugamura, K.**: Phage fC31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines. *J. Gene Medicine*, 8: 646-53, 2006.
4. Satoh, K., Kagaya, Y., Nakano, M., Ito, Y., Ohta, J., Tada, H., Karibe, A., Minegishi, N., Suzuki, N., Yamamoto, M., Ono, M., Watanabe, J., Shirato, K., Ishii, N., **Sugamura, K.** and Shimokawa, H.: Important role of endogenous erythropoietin system to recruit endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circulation*, 113, 1442-1450, 2006.
5. Soroosh, P., Ine, S., **Sugamura, K.** and Ishii, N.: OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *J. Immunol.*, 176: 5975-5987, 2006.
6. Uchiyama, T., Kumaki, S., Ishikawa, T., Onodera, M., Sato, M., Du, W., Sasahara, Y., Tanaka, N., **Sugamura, K.** and Tsuchiya, S.: Application of HSVtk suicide gene to X-SCID gene therapy: Ganciclovir offsets gene corrected X-SCID B cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 341:391-8, 2006.
7. Nakashima, A., Tanaka, N., Tamai, K., Kyuuma, M., Ishikawa, Y., Sato, H., Yoshimori, T., Saito, S. and **Sugamura, K.**: Survival of parvovirus B19 infected cells by cellular autophagy. *Virology*, 349, 254-263, 2006.
8. Watanabe, R., Harada, Y., Takeda, K., Takahashi, J., Ohnuki, K., Ogawa, S., Kaibara, N., Koiwai, O., Tanabe, K., Toma, H., **Sugamura, K.** and Abe, R.: Grb2 and Gads exhibit different interactions with CD28 and play distinct roles in CD28-mediated costimulation. *J. Immunol.*, 177:1085-1091, 2006.
9. Satoh, T., Moroi, R., Aritake, K., Urabe, Y., Kanai, Y., Sumi, K., Yokozeki, H., Hirai, H., Nagata, K., Hara, T., Utsumi,

M., Hirokawa, K., **Sugamura, K.**,
Nishioka, K., Nakamura, M.: Prostablandin
D2 plays an essential role in chronic
allergic inflammation of the skin via
CRTH2 receptor. *J. Immunol.*, in press.

第54回日本ウイルス学会学術集会
佐藤真理子、田中伸幸、菅村和夫
小胞輸送蛋白HrsによるHIV-1 Gag蛋白の分解制御
2006年11月19-21日 名古屋市

【 田中伸幸 研究協力者 】
なし

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)

【 菅村和夫 主任研究者 】

なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

【 菅村和夫 主任研究者 】

なし

1-4. 論文発表 (著書)

【 菅村和夫 主任研究者 】

なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)

【 菅村和夫 主任研究者 】

なし

【 田中伸幸 研究協力者 】

Tanaka, N. and Sugamura, K.

Degradation of IL-6 signal transducer gp130 is
regulated by two distinct mechanisms; Role of Hrs in
ligand dependent degradation pathway.

20th IUBMB: 2006年6月20日(京都)

2-2. 国内学会発表(口頭・ポスター発表)

【 菅村和夫 主任研究者 】

第60回日本細菌学会東北支部総会

佐藤真理子、田中伸幸、小林秀行、菅村和夫

HIV-gag蛋白の細胞内輸送機構の解析

2006年8月24、25日 福島市

第60回日本細菌学会東北支部総会

井上雄喜、田中伸幸、田中義乃、菅村和夫

SARS-CoV偽ウイルスを用いた細胞内侵入機構の解析

2006年8月24、25日 福島市

第54回日本ウイルス学会学術集会

井上雄喜、田中伸幸、菅村和夫

SARS-CoV偽ウイルスを用いた細胞内侵入機構の解析

2006年11月19-21日 名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

Protein AMSH and cDNA thereof

米国特許(United States Patent)

Kazuo Sugamura and Nobuyuki Tanaka

US6, 838, 551 B2

Date of Patent; Jan. 4, 2005.

2.

PROTEIN AMSH AND cDNA THEREOF

Sugamura, K and **Tanaka, N.**

豪州特許

Austrian patent No.: 773, 717.

Date of Patent: Sept. 16, 2004.

特許庁特許

特許日:平成18年1月27日

タンパク質 AMSH とその DNA

特許第3764286号

菅村和夫、田中伸幸

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 ウイルス吸着阻害薬開発

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部

研究要旨 SARS ウイルスの受容体として同定されたアンギオテンシン転換酵素 2(angiotensin converting enzyme 2 以下 ACE2)とリガンドであるスパイク (S) 蛋白質の結合阻害化合物として、生薬である桂皮抽出エキスを同定した。そして、同エキスは S 蛋白質に結合性を示すこと、さらにウイルス感染に伴って誘導される TNF- α 分泌誘導に対しても抑制的に作用することを認めた。桂皮エキスがウイルス感染阻害効果だけでなく、SARS 感染によって引き起こされる呼吸器症状の重症化に対しても阻害効果を示す可能性が示唆された。

A. 研究目的

SARS コロナウイルスが感染する際、ウイルスのスパイク蛋白質 (S 蛋白質) が標的細胞のレセプターとの結合に重要な役割を担っている。そして、S 蛋白質のレセプターとしてアンギオテンシン転換酵素 2(angiotensin converting enzyme-2 以下 ACE2)が同定された。本研究では、S 蛋白質と ACE2 との結合を検出するシステムを立ち上げ、この結合を阻害する化合物を同定することを目的とする。これまでの解析から S 蛋白質が ACE2 に結合するために必要な最小必要領域としてアミノ酸 318-510 が同定されている。本研究ではこの部分を含む S 蛋白質を用いた固相法を用いて、結合阻害因子を検索するとともに、ピアコアによる結合解析を行う。

一方、SARS コロナウイルスは重篤な呼吸器系機能障害を誘発し、罹患者に占める死亡率が約 10% という究めて予後不良の転帰をたどる感染症として特徴づけられている。そしてこの原因の一つとして、ウイルス感染に伴う ACE2 の発現低下が指摘された。即ち、レニンアンギオテンシンシステムの枠組みの中で、ACE と ACE2 が細胞内炎症シグナルのバランスを調節しており、感染に伴って生じる ACE2 の発現低下により、このバランスが ACE 側に傾くことで、重症化が生じる可能性が提唱された (Nat. Med. 11, 821, 2005)。しかし、感染に伴って誘導される ACE2 発現低下の機序や、その後の細胞内シグナルについては明らかにされていない。

2005 年、ACE2 がフォルボールエステルである PMA によりシェディングを受けることが報告された (J. Biol. Chem. 280, 30113, 2005)。シェディングは膜にアンカーされた蛋白質が細胞外ド

メインの膜近傍で切断され、分泌型蛋白質に変化する現象で、これまで様々な蛋白質について報告されている。そして、シェディングを誘導するプロテアーゼファミリーの一つである ADAM17 が ACE2 のシェディングに関与していることが指摘された。ADAM17 は TNF- α converting enzyme(以下 TACE)とも呼ばれ、亜鉛依存型のメタロプロテアーゼとして、プロテインキナーゼ C 等により活性化される。そして、特に重要な機能として、その名前からも示される様に TNF- α が分泌される際の必須遺伝子産物として作用する。

以上の背景のもとに本研究では、S/ACE2 の結合阻害因子の候補化合物として生薬のひとつである桂皮エキスを同定する一方、S 蛋白質により誘導される ACE2 シェディングの分子機構を明らかにしながら、同エキスがこの現象に引き続く TNF- α 産生を阻害する作用のあることを見いだした。

B. 研究方法

a. S 蛋白質及び ACE2 蛋白質の発現

ヒト型コドンに改変された S 蛋白質 12-672 アミノ酸をコードする cDNA クローンを米国 Choe 博士から供与を受けた。このうちアミノ酸約 280-540 のアミノ酸領域を PCR によりクローニングした。この DNA 断片をバクテリア発現用ベクターである pET32 に組み込んだ。

ACE2 全長 cDNA を pcDNA3.1 に組み込んだプラスミド DNA を 293FS システムに導入し、培養上清を調整した。これを透析後、DEAE カラムで展開し、部分精製した。

b. 固相化システム

バクテリアで発現させた S 蛋白質をニッケルカラムを用いて精製した。PBS で透析後、ELISA プレートに結合させた。部分精製した ACE2 を作用させた後、Alexa555 (Molecular Probe 社) で標識した ACE2 抗体を反応させ、洗浄後、蛍光プレートリーダーにて蛍光強度を測定した。コントロールとして、大腸菌で発現、精製したヒスタグ付き GAPDH を用いた。候補化合物の検定は、相対的な蛍光強度の変化をもって判定した。

c. ビアコアを用いた結合性試験

S または ACE2 蛋白質をビアコアセンサーチップに結合させ、各抽出エキスをアナライトとして使用することにより、結合性を検定した。

d. 桂皮の抽出

桂皮樹皮は、50% アルコールで 2 時間還流した。抽出物は減圧下で濃縮しこれを第 1 画分とした。これを純水で溶解しエチルアセテートおよび n-ブタノールで順次抽出した。エチルアセテート層、n-ブタノール層、アルコール層は濃縮を行い、それぞれ第 4 画分、第 2 画分、第 3 画分とした。

e. シュードタイプウイルスの調整

S 蛋白質全長をコードする cDNA 及び TACE ノックアウトマウス由来線維芽細胞 (以下 Tace KO MEF) は、それぞれ Nabel 博士及び Black 博士から供与を受けた。S 発現ウイルスは HIV-1 をベースとしたシュードタイプウイルスとして作成した。Tace KO MEF に TACE 及び ACE2 cDNA を導入した後、S 発現シュードタイプウイルスを感染させた。2 日後、ルシフェラーゼアッセイを行った。コントロールとして、ベクターのみを導入した Tace KO MEF に同様のウイルスを感染させ、ルシフェラーゼ活性を比較することで、感染効率を評価した。

C. 研究結果

a. 桂皮抽出エキスによる S/ACE2 結合阻害

桂皮抽出エキス中に S/ACE2 結合阻害効果を認めた。4 つの画分は 2>3>1>4 の順で結合阻害効果を示した。

b. 桂皮エキスの S 蛋白質への結合

ビアコア解析により、いずれの画分中にも S 蛋白質に対する結合性を認めた。一方、ACE2 に対する結合性は検出されなかった。

c. TACE 依存的なウイルス感染

ACE2 は外来性刺激に反応してシェディングを受け、ウイルス感染に伴って ACE2 がシェディングされる可能性を考え、リコンビ

ナント S 蛋白質を VeroE6 細胞に作用させた後、培養液中の ACE2 蛋白質についてウエスタン解析を行った。その結果、S 蛋白質作用 12 時間後の細胞全画分中の ACE2 (分子量約 120 kDa) 発現量が減少する一方、培養液中に分子量約 80 kDa の ACE2 蛋白質が検出された。そして、この蛋白質は ACE2 の C 末端領域に作成した抗体では検出されなかったことから、細胞外に放出された ACE2 はシェディング型であることが強く示唆された。

d. ウイルス感染に必須因子としての TACE

S 蛋白質による ACE2 シェディングの必要因子として TACE を考え、Tace KO MEF を用いて解析した。同細胞に ACE2 を発現させても S 蛋白質を発現するシュードタイプウイルスによる感染性は認められなかった。ところが同細胞に TACE cDNA を合わせて導入すると、同ウイルスの感染性が検出された。

e. S 蛋白質による TNF- α 産生と桂皮エキスによる抑制

S 蛋白質と ACE2 を介したウイルス感染に TACE が関与していることから、S 蛋白質により TACE が活性化されていることが示唆された。そこで、ウイルス感染に伴って TNF- α が分泌される可能性を強く疑い、リコンビナント S 蛋白質を ACE2 発現 293T 細胞に一晩作用した後、培養液中の TNF- α を ELISA で測定した。その結果、S 依存的に同サイトカイン分泌が検出されることを見いだした。コントロールとして使用した GAPDH 添加では、同サイトカイン産生は認められなかった。そして、このシステムに桂皮抽出エキスを投与すると、同サイトカイン産生が、著明に抑制されることが明らかとなった。

D. 考察

S 蛋白質と ACE2 の結合性を阻害する因子として桂皮抽出エキスを同定した。桂皮エキスは S 蛋白質に結合性を示す一方、ACE2 には結合性を示さなかった。S 選択的な阻害化合物が同エキス中に含まれることが示唆された。

ウイルス感染に TACE が関与すること、また、S 蛋白質の作用により TNF- α が分泌されることを見いだした。Kuba らの報告では、ウイルス感染後に ACE2 の発現低下が認められ、これが SARS ウイルスにおける呼吸器症状の重症化の一因となっている可能性が提唱された (Nat. Med. 11, 875, 2005)。本研究では、ACE2 の発現減少が同蛋白質のシェディングによること、さらにこの現象に

TACE が関与していることを突き止めた。Notch 蛋白質や CD44 では、シェディング後に細胞内シグナルが惹起されることが知られており、S 依存的な ACE2 のシェディングにおいても、細胞内シグナルが誘導される可能性が考えられる。現在、この点を明らかにするため、S 作用前後で炎症関連遺伝子発現プロファイリング解析を施行中である。

TACE がウイルス感染において必須因子であることを同遺伝子ノックアウトマウス由来 MEF を用いて明らかにした。即ち、TACE ノックアウトマウス由来 MEF に ACE2 を発現させても、S 発現型シェードタイプウイルスの感染効率は増加しないにも拘らず、同細胞に TACE と ACE2 cDNA を導入すると初めて S 依存的なウイルス感染効率の上昇が認められた。TACE 依存的な ACE2 のシェディングがウイルス感染にどのように関与しているのかについては不明である。S に結合性を示すが、シェディングを受けない ACE2 の変異体を使用できれば、この点について解析可能であるが、幾つか作成した ACE2 変異体では、この2つの機能を分離することはできなかった。ウイルス中に存在する p24 を ELISA にて測定すると、ウイルス粒子の細胞内エントリーが TACE 依存的に生じていることを見いだしている。ウイルス感染後、細胞内に取り込まれる際、ウイルス粒子と細胞膜の融合ステップが必須であり、これが pH 依存的であることが報告されている (J. Virol. 78, 5642, 2004)。TACE は、ウイルスが細胞膜に接着した後の過程で重要な役割を担っていることが示唆される。

本研究でウイルス感染と TNF- α 産生の関連性が明らかとなり、感染に伴う ACE2 の発現低下と重症化機構を関連付ける因子として TACE の重要性が示唆された。現在、同じコロナウイルスでも軽症の呼吸器症状を誘発することが報告されている hCoV-NL63 (以下 NL63) を用いて更なる解析を行っている。即ち NL63 の S 蛋白質は受容体として ACE2 に結合する。そこで、この NL63 を用いて感染後の TNF- α 分泌の有無を検定することにより SARS による呼吸器重症化機序がより明確に出来るものと期待される。また、TACE がウイルス感染に必須因子であることから、抗 SARS 化合物の新たな創薬ターゲットとしても期待される。TACE に対する阻害剤はアムジェン社をはじめ幾つかの企業が開発中であり、現在市販されている TACE 阻害剤について、抗ウイルス活性を検定中である。TACE 阻害剤が SARS 感染阻害剤として機能すれば、その臨床応用も比較的容易となり、SARS 感染症に関連する厚生行政に対して、大きなインパクトを与えるものと期待される。

E. 結論

S 蛋白質依存的に ACE2 がシェディングされ、これが TACE 依存的に誘導されることを見いだした。TACE はウイルス感染に必須で、S により誘導される TNF- α 産生が桂皮抽出エキスで阻害された。以上の知見は、桂皮エキスが SARS 感染阻害因子としてばかりでなく、同ウイルスによる重症化に対しても阻害効果を示す可能性が示唆する。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya J, Terunuma H, Kano S and Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* In press.

2. Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto K, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, Yuo A and Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26, 477-486, 2007.

3. Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 66 627-631, 2006.

2. 学会発表

1. 芳賀しおり、笹月健彦、石坂幸人 SARS-CoV 感染による ACE2 の shedding は TACE 依存的に誘導される日本分子生物学 2006 フォーラム. 2006 年 12 月. 名古屋、愛知県

2. 富士雅也、秋山 徹、石坂幸人、切替照雄 SARS コロナウイルスの Spike タンパクは宿主細胞因子 Calnexin と結合する 第 54 回 日本ウイルス学会 2006 年 11 月. 名古屋、愛知県

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|---|
| 1. 特許取得 | 無 |
| 2. 実用新案登録 | 無 |
| 3. その他 | 無 |