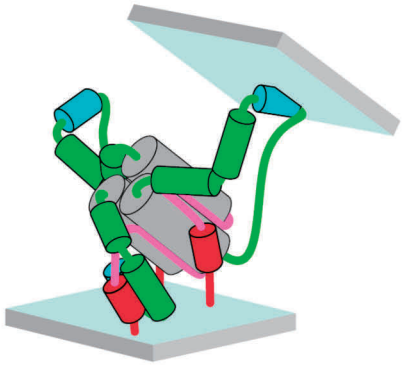
43　コロナウイルス感染の瞬間に起こる膜融合の解明	松山　州徳

【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析する。生化学的実験データから不安定な構造を推定し、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。

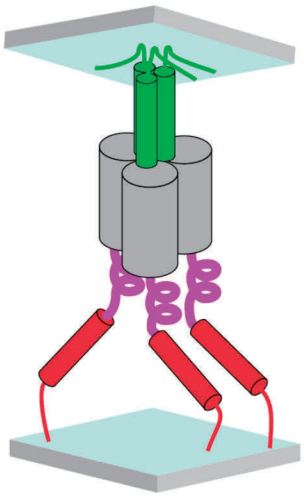
【方法】マウスのコロナウイルスである mouse hepatitis virus 2（MHV-2）は非解裂の膜融合蛋白 Spike を持つが、レセプター結合の後に宿主のプロテアーゼが存在しなければ構造変化を起こさないため、中間体の解析に適している。Spike のプロテアーゼ解裂部位は、構造変化に伴って位置が代わることが知られているが、プロテアーゼが Spike 表面の微妙な違いを認識して切断する性質を逆に利用して、Spike の構造の推定を行った。レセプターとトリプシンによって Spike の二段階構造変化を誘導し、さらにプロテイナーゼ K で処理することにより、Spike の中のコア構造を切り出した。プロテアーゼ分解産物はウェスタンブロット法で検出した。

【結果】コロナウイルスの Spike の構造変化中間体について、一般的なモデルである「ホモ三量体プレヘアピン」に代わり得る「 非対称未集合三量体 」モデルを提案する。対象的な構造をもつ Spike は、レセプター結合がきっかけとなって非対称で未集合の三量体を形成し、それに伴いホモ三量体の回転対称性が崩れ、その後、プロテアーゼによる解裂が引き金となって、内部のヘリックス構造が集合し、強固な三量体が形成されると考えられる。この Spike 内部で引き合う力がウイルス膜と細胞膜を融合させると考えられる。

コロナウイルス Spike の構造変化中間体



非対称未集合三量体
（本研究のモデル）



ホモ三量体プレヘアピン
（既存のモデル）

43. コロナウイルス感染の瞬間に起こる膜融合の解明

松山　州徳

国立感染症研究所 インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター第２室

Key words：コロナウイルス，感染，スパイク蛋白，膜融合

緒　言

エンベロープウイルスの感染において、ウイルスの膜融合タンパク質がウイルス膜と細胞膜の融合を仲介し、ウイルスゲノムを宿主細胞質内に送り込む［1］。クライオ電子顕微鏡（cryoEM）を用いた研究により、ウイルス膜融合タンパク質の詳細な構造が明らかになっている。新型コロナウイルスの出現以来、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質（Spike）は、特にその膜融合前、膜融合後、およびレセプター結合段階において盛んに解析されている［2〜5］。これまで解析不可能であったSpikeのストーク領域も、分子動力学（MD）シミュレーションとcryoEMトモグラフィーを用いて解析された［6］。しかし、Spikeが膜融合を起こしている瞬間の中間体については、不安定な構造を形成しているため解析が難しく、膜融合メカニズムは未だ解明されていない。レセプター結合後、Spikeの内部にあるヘプタッドリピート（HR1/HR2）モチーフがウイルス膜と細胞膜を架橋し、続いてHR1/HR2が折り返すことで膜が融合すると考えられている［7〜9］。本研究では、Spikeの中間体を検出するために、プロテアーゼ分解産物に着目し、生化学的な方法で解析を行った。Spikeのプロテアーゼ解裂部位は、構造変化に伴って位置が変わることが知られているが、プロテアーゼがSpike表面の微妙な違いを認識して切断する性質を逆に利用して、Spikeの構造の推定を行った。プロテアーゼ分解産物をウェスタンブロット法で検出し、バンドサイズの変化から中間体構造を推定した。最後に中間体について、一般的なモデルである「ホモ三量体プレヘアピン」に代わり得る、「非対称未集合モデル」を提案する。

方　法

1. ウイルス、細胞、レセプター、HR2ペプチド、抗体

マウスのコロナウイルスであるmouse hepatitis virus 2（MHV-2）は非解裂のSpikeを持つが、受容体結合の後に何らかのプロテアーゼに切断されなければ構造変化は途中で止まったままであるため、中間体の解析に適している。実験に使用したMHV-2はDBT細胞に感染させ、21時間後に回収し、−80℃で保存した。可溶性MHVレセプター（soluble CEACAM1a）は、組換えバキュロウイルスを用いて作製し、6×Hisタグ精製した。HR2ペプチドはBJ. Bosch（ユトレヒト大学）から提供された。抗MHV Spike抗体（MAb10G）はSG Siddell（ブリストール大学）から提供された。

2. Spikeの構造変化の誘導

レセプターとプロテアーゼによるSpikeの二段階の構造変化を*in vitro*で誘導した。第一段階目の構造変化を誘導するために、10 μlのMHV-2溶液（10^6 PFU/10 μl）を1.1 μlの可溶性レセプター（10 μM）と混合し、37℃で30分間インキュベートした。第二段階目の構造変化を誘導するために、1.2 μlのトリプシン（100 μg/ml ; T8802、Sigma）を加え、次いで37℃で30分間インキュベートした。Spike中のコア構造形成を検出するために、上記の混合物を氷上で10分間冷やし、1.4 μlのプロテイナーゼK（1 mg/ml ; 166-21051、Wako）を添加し、その後氷上で30分間静置した。サンプルバッファー（30%グリセロール、250 mM Tris（pH 6.8）、2.5%SDS、少量のブロモフェノールブルー、

100 mM DTT、および 1 mM Pefabloc SC（11429868001、Roche）3.4 μl を反応液に加え 100℃で 10 分間煮沸した。SDS-PAGE（e-PAGEL、ATTO）を行い、PVDF 膜（Immun-Blot、Bio-Rad）に転写し、ImmunoBlock（CTKN001、DS Pharma Biomedical）に 30 分間浸した。ウェスタンブロット法には、上記抗 S2 抗体とペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体（32430、ThermoFisher Scientific）を用いた。化学発光キット（34095、ThermoFisher Scientific）と LAS-3000 装置（Fuji film）を用いてバンドを可視化した。スパイクの脱糖鎖には、Protein deglycosylation mix II（P6044S、NEB、UK）を用いた。ウェスタンブロットを検出するために、サンプルバッファー添加後にボイルしないで SDS-PAGE に用いたが、PVDF 膜に転写した後にストリッピングバッファー（46430、ThermoFisher Scientific）に室温で 10 分間浸し、PVDF 膜上で Spike を変性させ、ウェスタンブロット法に用いた。

結果および考察

1. Spike の構造変化誘導

180 kDa の Spike（図 1A、レーン 1）を、レセプター非存在下でトリプシン処理すると 90 kDa（レーン 2）になるが、レセプター存在下では、2 つの異なる S2 断片（67 kDa と 69 kDa）が出現した（レーン 4）。続いてプロテイナーゼ K で処理すると、レセプターとトリプシンの両方で処理したサンプルでは、53 kDa（レーン 8）のバンド（最終的な構造 6-ヘリックスバンドル（6HB）を形成していると考えられる）が出現した。興味深いことに、レセプター結合後の 180 kDa の Spike（レーン 3）は、プロテイナーゼ K で処理すると 46 kDa（レーン 7）が作られた。これはレセプター結合後の中間体にコア構造が形成されていることを意味する。

2. Spike の中のコア構造

脱糖鎖後の Spike 分解産物のサイズから（図 1B）、受容体結合後に出現するプロテイナーゼ K 耐性 46 kDa は HR1 モチーフを含まないが、トリプシン処理後に出現するプロテイナーゼ K 耐性 53 kDa は含むと推定された（図 1C）。このことは、受容体結合ステップの後には HR1 モチーフがまだ中央に集合していないことを示唆している。しかし、トリプシン処理後には HR1 モチーフが集合し、プロテイナーゼ K 切断部位は HR1 の N 末端側に移ると考えられる。プロテイナーゼ K 切断部位は、Spike の既知の構造（protein data bank：6VSJ）をもとに、らせん構造や埋もれたドメインは切断不可能であることを前提に推定された。

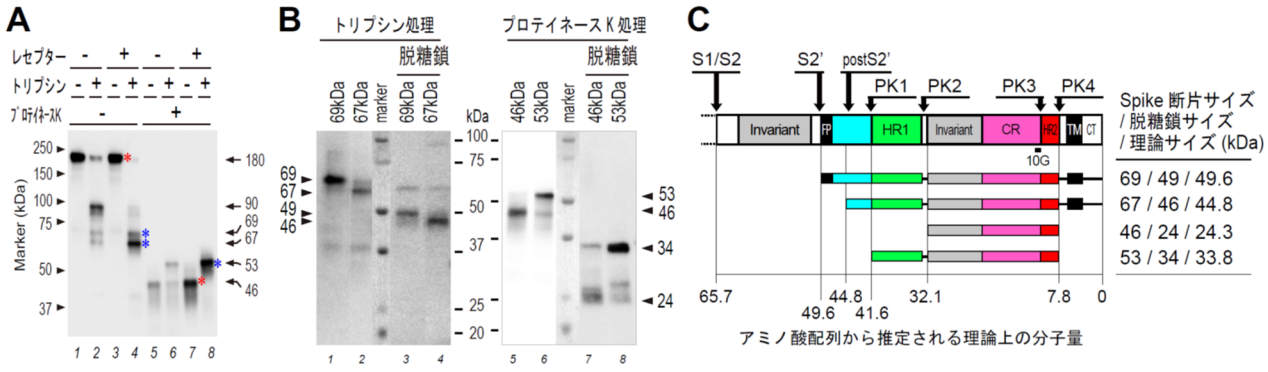


図 1. Spike への構造変化誘導とプロテイネース K 耐性コアの構成要素の解析

A）レセプターとトリプシンによる Spike の構造変化をウェスタンブロット法で検出した。図中の赤のアスタリスクはレセプターに誘導された構造変化産物、青いアスタリクスはレセプターの後にトリプシンで誘導された構造変化産物を示す。

B）構造変化産物の糖鎖を取り除いた分子サイズを調べた。

C）ウェスタンブロット法で得られる Spike のプロテアーゼ分解産物のサイズを、アミノ酸配列から推定される理論上のサイズと比較した。

3. 閉じた構造と開いた構造

レセプター結合後の Spike は、トリプシン処理により 69 kDa になるが（図 2、レーン 9）、飽和濃度の HR2 ペプチド（HR1 と反応して構造変化を阻止する HR2 モチーフと同じ配列をもつペプチド）存在下では、その半分が 67 kDa に移動した（レーン 16）。HR2 ペプチドによりトリプシン切断部位が変化したと考えられるが、これはレセプター結合の後に、閉じた HR1/HR2 と開いた HR1/HR2 が存在することを示唆している。この 2 つのバンドのパターンは、HR1 が外来性の HR2 ペプチドではなく、Spike 内部の HR2 モチーフに結合した場合でも同じであると考えられることから（レーン 1）、Spike のレセプター結合段階では、閉じた HR1/HR2 と開いた HR1/HR2 が共存し、それらの未集合モチーフが三量体を形成していると推定された。

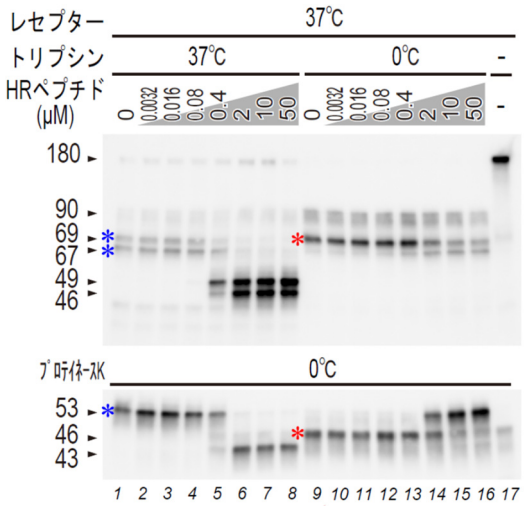


図 2. HR2 ペプチドによる Spike の構造変化中間体の解析

レセプター結合後のウイルスに、様々な濃度の HR2 ペプチドを加え、Spike のプロテアーゼ分解産物のサイズの変化を調べた。図中の赤のアスタリスクはレセプターに誘導された構造変化産物、青いアスタリクスはレセプターの後にトリプシンで誘導された構造変化産物を示す。

4. HR1/HR2 モチーフの閉鎖と集合

もし中間体が既知の「ホモ三量体プレヘアピン」を形成するのであれば、ストーク領域が立体障害を超えて構造変化を可能にするためには、非常に柔軟な構造をもっていなければならない。しかし我々の結果は、プロテイナーゼ K 耐性の 46 kDa のバンドが示すように、ストーク領域は中間状態において安定で硬い構造をとることを示している。さらに、図 3 の結果は、トリプシン処理後に HR2 ペプチドが反応しなくなるタイミングと安定な三量体が形成するタイミングが同期していることを示しており、HR1/HR2 モチーフの閉鎖と集合は同時に起こっていることを示唆している。少なくともこの研究では、典型的なホモ三量体プレヘアピンを形成している証拠は観察されなかった。

5. 非対称未集合三量体モデル

我々の構造変化モデルでは、レセプター結合後の中間体は閉じた HR1/HR2 と開いた HR1/HR2 を含んでおり、これらのモチーフは三量体の中心に集合していない。おそらく、レセプター結合の段階で、非対称な未集合の S2 三量体が生じ、ホモ三量体の回転対称性が崩れ、その後トリプシンなどのプロテアーゼが引き金となって、内部のバネ仕掛けが解放され、3 つの HR1/HR2 モチーフが集合し、続いて 6 ヘリックスバンドル（6HB）構造が形成されると考えられる（図 4）。この研究は、ウイルス学分野でよく知られた膜融合モデルである 「ホモ三量体プレヘアピン」[1，10] に代わる「非対称未集合三量体モデル」を提案するものである。

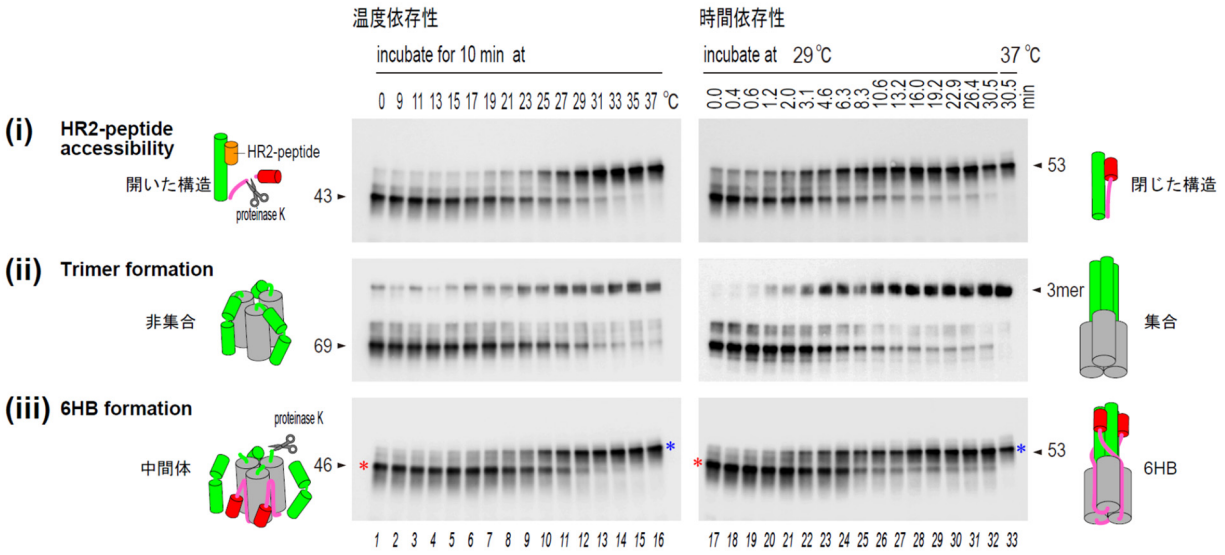


図 3. Spike の構造変化に伴うそれぞれの HR1/HR2 の閉鎖と集合

Spike の動作を 2 つの要素、それぞれの HR1/HR2 の開閉（i）と 3 つの HR1 の集合(ii)、に分けて解析した。さらにそれらの 6HB の形成(iii)も確認した。

i) HR1/HR2 モチーフの開閉を HR2 ペプチドの反応によって変化するプロテイネース K 耐性バンドのサイズの違い（43 か 53 kDa か）で調べた。

ii) 3 つの HR1/HR2 モチーフが集合しているか否かを 85℃でそれぞれが乖離するか否か（69 kDa か三量体サイズか）で調べた。

iii) Spike が中間体構造をとるか 6HB 構造をとっているかを、プロテイネース K 耐性バンドのサイズ（46 か 53 kDa か）で調べた。図中の赤のアスタリスクはレセプターに誘導された構造変化産物、青いアスタリクスはレセプターの後にトリプシンで誘導された構造変化産物を示す。

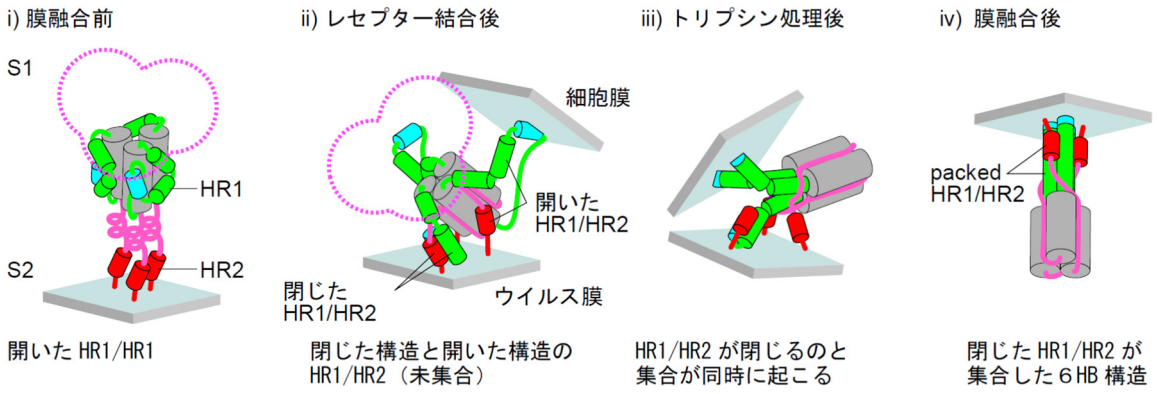


図4. 非対称未集合三量体モデル

本実験の結果から推定した、コロナウイルスが膜融合を起こす時の Spike の構造変化。

共同研究者・謝辞

本研究で用いたウイルス MHV-2 と抗体 MAb10G は、日本獣医生命科学大学の田口文広教授から譲渡されたものであり、ご厚意に感謝します。

文　献

1) White JM, Whittaker GR. Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes. Traffic. 2016 Jun 7;17(6):593–614. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tra.12389 PMID: 26935856

2) Ke Z, Oton J, Qu K, Cortese M, Zila V, McKeane L, Nakane T, Zivanov J, Neufeldt CJ, Cerikan B, Lu JM, Peukes J, Xiong X, Kräusslich HG, Scheres SHW, Bartenschlager R, Briggs JAG. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. Nature . Springer US; 2020;588(7838):498–502. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2 PMID: 32805734

3) Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. Nature . Springer US; 2020;581(7807):215–220. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5 PMID: 32225176

4) Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. Nature . Springer US; 2020;581(7807):221–224. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y PMID: 32225175

5) Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science . 2020 Mar 13;367(6483):1260–1263. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32075877 PMID: 32075877

6) Marcink TC, Kicmal T, Armbruster E, Zhang Z, Zipursky G, Golub KL, Idris M, Khao J, Drew-Bear J, McGill G, Gallagher T, Porotto M, des Georges A, Moscona A. Intermediates in SARS-CoV-2 spike–mediated cell entry. Sci Adv . 2022 Aug 19;8(33):2–10. Available from: https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abo3153 PMID: 35984891

7) Outlaw VK, Bovier FT, Mears MC, Cajimat MN, Zhu Y, Lin MJ, Addetia A, Lieberman NAP, Peddu V, Xie X, Shi PY, Greninger AL, Gellman SH, Bente DA, Moscona A, Porotto M. Inhibition of coronavirus entry in vitro and ex vivo by a lipid-conjugated peptide derived from the sars-cov-2 spike glycoprotein hrc domain. MBio . American Society for Microbiology; 2020 Sep 1 [cited 2021 Jul 1];11(5):1–14. Available from: https://doi.org/10.1128/mBio.01935-20. PMID: 33082259

8) Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. J Virol . 2003;77(16):8801–8811. Available from: http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003 PMID: 12885899

9) Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. Annu Rev Virol . 2016 Sep 29;3(1):237–261. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578435 PMID: 27578435