

発光ペプチドタグを付加した高感度かつ迅速定量型

ウイルスベクターシステムの開発および

COVID-19 研究への応用

山梨大学大学院

医工農学総合教育部

博士課程学位論文

2022年 3月

大園 誠也

## 目次

### 序章 緒論

|                |   |
|----------------|---|
| 1. HIV-1 について  | 1 |
| 2. HIV-1 の構造   | 1 |
| 3. HIV-1 の複製機序 | 2 |
| 4. レンチウイルスベクター | 3 |
| 5. レポーターウイルス   | 3 |
| 参考文献           | 4 |

### 第 1 章 HiBiT ペプチドタグを利用した超迅速 HIV-1 定量系の樹立

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| 1-1. 序論                           | 6 |
| 1-2. 材料と方法                        |   |
| 1-2-1. DNA 構築                     | 7 |
| 1-2-2. 細胞                         | 8 |
| 1-2-3. ウイルス粒子産生およびウエスタンブロットティング   | 8 |
| 1-2-4. infectivity assay          | 8 |
| 1-2-5. Drug susceptibility assays | 9 |
| 1-2-6. 初代細胞培養                     | 9 |
| 1-2-7. virus replication assays   | 9 |

|   |    |
|---|----|
| 1-2-8. HiBiT luciferase assays                              | 9  |
| 1-2-9. 統計分析   | 9  |
| 1-3. 結果   |    |
| 1-3-1. HiBiT タグを付加した HIV-1 プロウイルスベクターの影響                    | 10 |
| 1-3-2. vif 領域に HiBiT タグを付加したことにより失活した抗 APOBEC3G を持つ Vif の改善 | 12 |
| 1-3-3. HiBiT 付加ウイルス上清の相関関係                                  | 14 |
| 1-4. 考察   | 18 |
| 1-5. 要約   | 20 |
| 参考文献  | 21 |
| 第 2 章 HiBiT ペプチドタグを有するレンチウイルスベクター系を用いた COVID-19 研究への応用      |    |
| 2-1. 序論   | 23 |
| 2-2. 材料と方法  |    |
| 2-2-1. DNA 構築   | 24 |
| 2-2-2. 細胞   | 24 |
| 2-2-3. シュードタイプウイルスの調製と cell entry assays                    | 24 |
| 2-2-4. ウェスタンブロッティング解析                                       | 25 |
| 2-2-5. Spike incorporation assays                           | 25 |

|   |    |
|---|----|
| 2-2-6. Neutralization assays                        | 25 |
| 2-2-7. 統計分析   | 26 |
| 2-3. 結果   |    |
| 2-3-1. SARS2-S を介した細胞侵入は、TMPRSS2 の発現に強く依存する         | 27 |
| 2-3-2. SARS2-S D614G は、天然の S variant の中で最も高い侵入効率を示す | 28 |
| 2-3-3. D614G 変異体は、原型ウイルスに対する患者血清による中和感受性を維持する       | 29 |
| 2-4. 考察   | 36 |
| 2-5. 要約   | 38 |
| 参考文献  | 39 |
| 総括  | 44 |
| 謝辞  | 46 |

## 序章 緒論

### 1. HIV-1 について

HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) は後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) の原因となる病原体であり、適切な治療が行われないと免疫不全により日和見感染症や悪性腫瘍を引き起こす<sup>1-3)</sup>。近年では治療薬の開発によりウイルス酵素タンパク質に対する機能阻害剤である抗レトロウイルス剤を服用することで、免疫力を維持し日常生活を送ることが可能となってきた。しかし、HIV-1 は潜伏感染するため、抗レトロウイルス剤を生涯服用する必要があるだけでなく、薬剤耐性ウイルスが出現する懸念がある。したがって、エイズの根治に向けた治療法を開発することが求められており、現在でも細胞培養レベルを含めた基礎研究が必要不可欠である。

### 2. HIV-1 の構造

HIV-1 は直径約 100 nm の球状のウイルス粒子で、細胞形質膜に由来する脂質二重膜に覆われたエンベロープウイルスである。ウイルス粒子表面に存在するエンベロープ糖タンパク質 (Env) は表面糖タンパク質 gp120 と膜貫通糖タンパク質 gp41 の三量体からなる<sup>4,5)</sup>。脂質二重膜は Gag タンパク質の一つであるマトリクスタンパク質 (MA ; p17) によって裏打ちされ、粒子内には同じく Gag のカプシドタンパク質 (CA ; p24) から組み立てられる円錐形のカプシドが存在する<sup>6)</sup>。カプシド内部には、2 コピーのウイルスゲノム RNA があり、逆転写酵素 (RT) とインテグラーゼ (IN) が核酸に結合している<sup>7)</sup>。HIV-1 遺伝子は、両端に存在する LTR (long terminal repeat) と呼ばれる反復配列領域と、*gag*、*pol*、*env* の 3 つの主要な構造遺伝子、*tat*、*rev* の 2 つの調節遺伝子、*nef*、*vif*、*vpr*、*vpu* の 4 つのアクセサリー遺伝子から構成される<sup>8)</sup>。

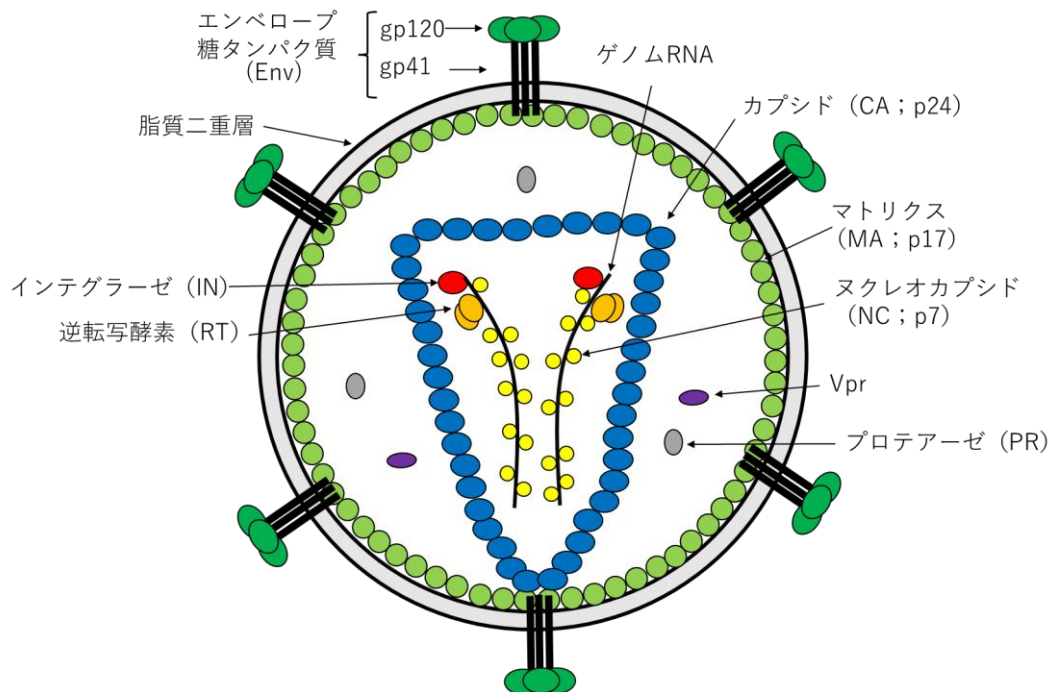


図 1. HIV-1 粒子の構造<sup>9)</sup>

HIV-1 粒子における遺伝子産物を模式的に示す。Gag MA タンパク質に裏打ちされた細胞形質膜由来の脂

質二重膜の表面に、CD4 および CCR5/CXCR4 補助受容体と結合する Env を有している。ウイルス粒子内に Gag CA タンパク質で構成される円錐状のコア構造を持ち、その内部に約 9,500 塩基からなる 2 コピーの(+)鎖 RNA ゲノム、ウイルス酵素タンパク質である逆転写酵素やインテグラーゼを含む。

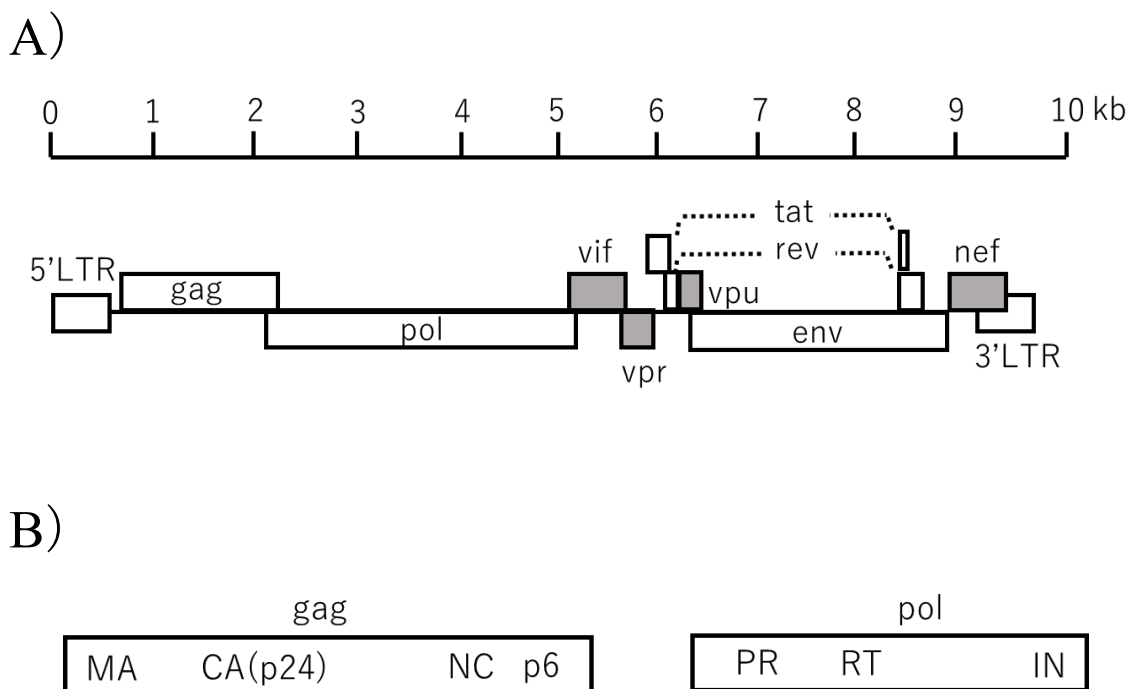


図2. HIV-1 遺伝子の構造<sup>9)</sup>

- A) HIV-1 遺伝子は、両端に存在する LTR (long terminal repeat)、*gag*、*pol*、*env* の 3 個の主要な構造遺伝子、*tat*、*rev* の 2 個の調節遺伝子、*nef*、*vif*、*vpr*、*vpu* の 4 個のアクセサリー遺伝子から構成される。
- B) *gag* 遺伝子はマトリクス (MA)、カプシド (CA ; p24)、ヌクレオカプシド (NC ; p7)、p6 を遺伝子産物とし、*pol* 遺伝子は PR (プロテアーゼ)、RT (逆転写酵素)、IN (インテグラーゼ) を遺伝子産物とする。

### 3. HIV-1 の複製機序<sup>9-11)</sup>

HIV-1 の複製サイクルは以下の通りである。①Env の gp120 が細胞表面に発現している CD4 と補助受容体である CCR5 または CXCR4 を介して<sup>12,13)</sup>、ウイルス膜と細胞膜が融合<sup>14-16)</sup> した後、標的細胞内に侵入する；②核へ移行する過程で、ウイルスゲノム RNA が RT により DNA に逆転写される<sup>17)</sup>；③核に移行した後、逆転写産物であるウイルス DNA が宿主細胞のゲノムに挿入される (プロウイルス DNA)；④宿主の転写活性を利用して、プロウイルス DNA からまず 2 回スプライシングを経た初期遺伝子 *tat*、*rev*、*nef* の mRNA が発現される；⑤mRNA が核外へ移行して合成された初期タンパク質のうち、Tat タンパク質が転写活性を増強する；⑥続いて Rev の働きにより後期遺伝子発現へのスイッチングが起こる。すなわち全長または 1 回スプライシング後の RNA が核外へ輸送される；⑦その結果、全ての構造タンパク質およびアクセサリータンパク質が作られる；⑧Gag および Gag-Pol タンパク質は細胞質を移動して細胞膜の内側に結合し、Env は小胞輸送経路を通過して細胞表面に運ばれる；⑨細胞膜に集合したウイ

ルスタンパク質が、出芽によって細胞外に放出された後、最終的に成熟したウイルス粒子となる。

上記の HIV-1 の複製サイクルにおいて、感染を抑制する抗ウイルス宿主因子とそれに拮抗するウイルスタンパク質に関する知見が多数報告されている<sup>18)</sup>。後述する抗ウイルス宿主因子 APOBEC3G (A3G) は逆転写過程において感染抑制因子として働く<sup>19)</sup>。それに対し、HIV-1 アクセサリー遺伝子産物の一つである Vif が、ウイルス産生細胞で APOBEC3G をプロテアソーム分解するウイルスアンタゴニストとして機能する<sup>20)</sup>。

#### 4. レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは HIV-1 をもとにデザインされている。旧来のレトロウイルスベクターでは、3'LTR のプロモーター活性が及ぼす挿入部位における下流遺伝子の予期せぬ発現増強が問題となっているが、レンチウイルスベクターでは、3'LTR のプロモーター/エンハンサー活性を失活させた自己不活性化 (SIN) 型となっているため、そうした問題を回避できる。またウイルスエンベロープ糖タンパク質として、標的が CD4 陽性細胞に限定される HIV-1 Env は用いず、VSV-G (vesicular stomatitis virus glycoprotein ; 水泡性口炎ウイルス糖タンパク質) を用いている。なぜなら VSV-G は、様々な細胞でユビキタスに発現している低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体を認識するため<sup>21,22)</sup>、広範囲の細胞にレンチウイルスベクターを導入することができるからである<sup>23)</sup>。レンチウイルスベクターは、一般的な遺伝子導入だけでなく CRISPR-Cas9 システムのガイド RNA など遺伝子編集の構成要素の導入にも使用されている。

#### 5. レポーターウイルス

レポーターウイルスとは、ウイルスゲノムに GFP やルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を挿入したウイルスであり、ウイルスのライフサイクルや細胞および動物モデルにおける感染性や病原性の理解において、非常に有用な研究ツールである。レポーターウイルスの使用により、細胞への侵入や複製を定量化することが容易になり、動物個体への感染を長期にわたって追跡することが可能である。HIV-1 の場合は、*nef* 遺伝子領域付近にホタルルシフェラーゼ<sup>24)</sup> や GFP<sup>25)</sup> を挿入することで、これまでに培養細胞における感染性の定量やヒト化マウス個体での感染細胞を追跡などにおいて膨大な研究成果が得られてきた。

また近年、プロメガ社はホタルルシフェラーゼ (60 kDa) やウミシイタケルシフェラーゼ (36 kDa) より分子量が小さく、両者より約 150 倍明るいトゲオキヒオドシエビ由来新規ルシフェラーゼ NanoLuc (19 kDa) を開発した<sup>26)</sup>。更に、本稿において後述する通り、NanoLuc が 11 アミノ酸の HiBiT と 156 アミノ酸の LgBiT に分割されたことにより、前者を目的タンパク質のペプチド Tag として使用することが可能となった。つまり後者の LgBiT を発光基質と混ぜて検体に添加するだけで、目的とする HiBiT タグ付加タンパク質の正確な定量ができる。それにより、旧来のレポーター遺伝子をウイルスタンパク質に直接付加した場合に、複製能に影響する問題が一挙に克服されたのである。

## 参考文献

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1984; 220 (4599): 868-71.
2. Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., et al.: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984;224(4648):500-503.
3. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., Hahn, B. H.: Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 1999; 397(6718):436-41.
4. Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A., Roux, K. H.: Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 2006;441(7095): 847-52.
5. Zanetti, G., Briggs, J. A., Grunewald, K., Sattentau, Q. J., Fuller, S. D.: Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. *PLoS Pathog* 2006;2(8): e83.
6. Niedrig, M., Gelderblom, H. R., Pauli, G., Marz, J., Bickhard, H., Wolf, H., Modrow, S.: Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 particle formation by Gag protein-derived peptides. *J Gen Virol* 1994;75(Pt 6): 1469-74.
7. Briggs, J. A., Grunewald, K., Glass, B., Forster, F., Krausslich, H. G., Fuller, S. D.: The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure* 2006;14(1): 15-20.
8. German Advisory Committee Blood, Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood: Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother* 2016;43(3):203-22.
9. 徳永研三、古田里佳、川村名子、足立昭夫: ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の制御遺伝子の機能. *蛋白質 核酸 酵素*; 40 (9) : 1079-1091. (1995)
10. Engelman, A., Cherepanov, P.: The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights *Nat Rev Microbiol* 2012;10(4): 279-90.
11. Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A., Buchbinder, S.: HIV infection. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1: 15035.
12. Dean M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., O'Brien, S. J.: Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996;273(5283):1856-62.
13. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P.E., Berger, E. A.: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272(5263): 872-7.
14. Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., Kim, P. S.: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997;89(2): 263-73.
15. Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., Wiley, D. C.: Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 1997;387(6631): 426-30.
16. Buzon, V., Natrajan, G., Schibli, D., Campelo, F., Kozlov, M. M., Weissenhorn, W.: Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathog*



2010;6(5): e1000880.

17. Sousa, R., Chung, Y. J., Rose, J. P., Wang, B. C.: Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution.: *Nature* 1993;364(6438): 593-9.
18. Colomer-Lluch, M., Ruiz, A., Moris, A., Prado, J. G.: Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front Immunol* 2018;9: 2876.
19. Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., Malim, M.H.: Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002;418(6898):646–50.
20. Brenchley, J. M., Price, D. A., Douek, D. C.: HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 2006;7(3): 235–9.
21. Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., Rubinstein, M.: LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(18): 7306-11.
22. Amirache, F., Levy, C., Costa, C., Mangeot, P. E., Torbett, B. E., Wang, C. X., Negre, D., Cosset, F. L., Verhoeven, E.: Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* 2014;123(9): 1422-4.
23. Burns, J. M., Jr., Shreffler, W. G., Benson, D. R., Ghalib, H. W., Badaro, R., Reed, S. G.: Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(2): 775-9.
24. Chen, B. K., Saksela, K., Andino, R., Baltimore, D.: Distinct modes of human immunodeficiency virus type 1 proviral latency revealed by superinfection of nonproductively infected cell lines with recombinant luciferase-encoding viruses. *J Virol* 1994;68(2): 654-60.
25. Aso H., Nagaoka, S., Kawakami, E., Ito, J., Islam, S., Tan, B. J. Y., Nakaoka, S., Ashizaki, K., Shiroguchi, K., Suzuki, Y., Satou, Y., Koyanagi, Y., Sato, K.: Multiomics Investigation Revealing the Characteristics of HIV-1-Infected Cells In Vivo. *Cell Rep* 2020;32(2): 107887.
26. England, C. G., Ehlerding, E. B., Cai, W.: NanoLuc: A Small Luciferase is Brightening up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug Chem* 2016;27(5): 1175–1187.

## 第1章 HiBiT ペプチドタグを利用した超迅速 HIV-1 定量系の樹立

### 1-1 序論

HIV-1 プロウイルス DNA クローン pNL4-3<sup>1)</sup> は、過去 35 年間、世界中で HIV-1 の *in vitro* 研究に頻繁に使用されてきた。そのため、NL4-3 ウイルスは膨大な数のウイルス学的研究によって非常によく特徴づけられており、データの取得や実験データの解釈を行う上での確かな知識基盤となっている。pNL4-3 を含むプロウイルス DNA クローンをトランスフェクションした細胞からのウイルス上清の定量は、一般的かつ日常的に、標準的な逆転写酵素 (RT) アッセイ<sup>2)</sup> または p24 抗原捕捉 ELISA<sup>3)</sup> を実施することによって行われるが、これらはいずれも時間がかかり、最大で 4 時間または 5 時間以上を要する。特に、市販の HIV-1 検出用 ELISA キットの場合、アッセイのコストが高いことと、広範囲の希釈を必要とする線形範囲の狭さが大きな欠点となっている。そこで本研究では Promega の開発技術である HiBiT system に着目した。

2015 年、大小 2 つの NanoLuc 断片の相補性を利用した NanoBiT System をタンパク質間相互作用の解析ツールとして開発している。この技術により、これまで難しかった生細胞でのタンパク質間相互作用を高感度に定量できるようになった。開発の過程で大きな断片である LgBiT (Large BiT) (約 18kDa) と相補性を持つ小さなペプチド断片 (11 アミノ酸 ; 1.3kDa) をスクリーニングし、最も高い親和性を有するペプチド (Kd=700 pM) を HiBiT と名づけた。この 11 アミノ酸のペプチドタグが LgBiT と呼ばれる大きな対のタンパク質と結合すると、NanoLuc と呼ばれる最小のルシフェラーゼタンパク質の構造が形成される<sup>4)</sup> (図 1A、上段)。HiBiT はサイズが小さいため、目的のタンパク質の N または C 末端に容易に融合させることができる。HiBiT タグ付きタンパク質を発現させた後、LgBiT を含む溶解性検出試薬を基質に加えるだけでアッセイを行うことができ、HiBiT タグ付きタンパク質の発光レベルをルミノメーターで素早く測定することができる (図 1A、下段)。HiBiT system は発現タンパク質を高感度に検出するための発光タグとして様々なアプリケーションについて検討が行われている。大きなレポーター遺伝子 (ホタルルシフェラーゼなど) をゲノムに挿入すると、ウイルスプロセスに不具合をきたすことがよくある。しかし、HiBiT タグはサイズが小さいため、ウイルスの本来のバイオロジーを維持してウイルスゲノムに挿入することが可能となる。これまで HiBiT タグをウイルスゲノムに挿入した例はフラビウイルス科のデングウイルス (DENV)、日本脳炎ウイルス (JEV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、豚熱ウイルス (CSFV) に導入し、レポーターウイルスとして代用できると報告している<sup>5,6)</sup>。

本研究は、従来の細胞からのウイルス上清の定量に使用するアッセイに代わる系の樹立を目的として HiBiT タグを持つ pNL4-3 ベースの新しい完全長プロウイルス HIV-1 DNA クローンと、レンチウイルスベクターの構築を試みた。

## 1-2 材料と方法

### 1-2-1. DNA 構築

VSV-G 発現ベクター-pC-VSVg、HIV-1 Env 発現ベクター-pC-NLenv、HIV-1 プロウイルスベクター pNL4-3、そのレポーターベクターである pNL-Luc2-E(-)R(+) (以下、pNL-Luc2-E(-)と略す)、pNL-Luc-F(-)E(-)、A3G 発現プラスミド pC-hA3G-HA はこれまでに記載されている<sup>7,8)</sup>。HiBiT タグを有するルシフェラーゼレポーター-HIV-1 プロウイルス DNA を作製するために、pNL-Luc2-E(-)の SbfI/EcoRI 断片を PstI/EcoRI 制限酵素処理した pUC19 (pUNL-PE と名付けた) にサブクローニングし、以下の特異的オリゴヌクレオチド (制限酵素部位に下線を付した) を用いて BamHI 部位を QuikChange mutagenesis (Stratagene 社) により pUNL-PE に導入した (5'-GAC AGG ATG AGG ATC CAC ACA TGG AAA AG-3'およびそのアンチセンス)。得られたプラスミドを BamHI 制限酵素処理し、HiBiT タグに対応するオリゴヌクレオチドリンカー (5'-GAT CTT GTC AGT GGC TGG AGG CTC TTC AAG AAG ATT AGC TAG-3'および 5'-GAT CCT AGC TAA TCT TCT TGA AGA GCC TCC AGC CAC TGA CAA-3') の挿入に使用した。得られたベクター-pUNL-PE-IN/HiBiT の PstI/EcoRI フラグメントを SbfI/EcoRI 制限酵素処理した pNL-Luc2-E(-)へクローニングし、生成したプラスミドを pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)とした。修正した Vif の IN/HiBiT ウイルスコンストラクトは以下のようにして作製した。vif 遺伝子の開始コドンを変異させ、以下の特異的オリゴヌクレオチドを用いて、pUNL-PE-IN/HiBiT において QuikChange mutagenesis により IN の C 末端をコドン最適化した (5'-CAT CAG GGA TTA CGG TAA ACA AAT GGC TGG AGA CGA TTG TGT TGC TAG CAG ACA AGA CGA GGA TCT-3'とそのアンチセンス)。結果として得られたコンストラクトは pUNL-PE-IN/HiBiT-ΔF と名付けた。BlnI サイトは、以下の特定のオリゴヌクレオチド (制限酵素サイトに下線を付した) を用いて、pUNL-PE-IN/HiBiT-DF に QuikChange 変異導入法により導入した (5'-GAA AAG ATT AGC TAA GCA CCA TAT G-3'とそのアンチセンス)。得られたプラスミドを BamHI/BlnI 制限酵素処理し、N-末端の Vif 配列をコードするオリゴヌクレオチドリンカー (5'-GAT CAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT GAT TGT GTG GCA AGT AGA CCG CAT GCG GAT TAA CAC ATG GAA AAG ATT AGT-3'および 5'-TTA ACT AAT CTT TTC CAT GTG TTA ATC CGC ATG CGG TCT ACT TGC CAC ACA ATC ACC TGC CAT CTG TTT TCC AT-3') を HiBiT タグ配列の下流に挿入した。得られたベクター-pUNL-PE-IN/HiBiT-Fin の PstI/EcoRI フラグメントを SbfI/EcoRI 制限酵素処理した pNL-Luc2-E(-)または pNL4-3 にクローニングし、生成したプラスミドをそれぞれ pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)Fin または pNL-IN/HiBiT-Fin と名付けた。

HiBiT タグを有するレンチウイルスパッケージングベクターを作製するために、psPAX2<sup>9)</sup> の SbfI/SacI 断片を PstI/SacI 制限酵素処理した pBluescript II SK(+) (pBSPAX-PS と名付けた) にサブクローニングし、以下の特異的オリゴヌクレオチド (制限酵素部位に下線を付した) を用いて、BamHI 部位を QuikChange 変異導入法により pBSPAX-PS に導入した (5'-GGA TGA GGA TCC ACA CAT G-3'とそのアンチセンス)。得られたプラスミドを BamHI 制限酵素処理し、HiBiT タグに対応するオリゴヌクレオチドリンカー (5'-GAT CTC GTC AGC GGC TGG CGG CTC TTC AAG AAG ATT AGC TAG-3'および 5'-GAT CCT AGC TAA TCT TCT TGA AGA GCC GCC AGC CGC TGA CGA-3'; 前述の HiBiT の配列とは若干異なる) の挿入に使用した。得られたベクター-pBSPAX-IN/HiBiT の PstI/SacI フラグメントを、SbfI/SacI 制限酵素処理した psPAX2 に戻し、生成したプラスミドを psPAX2-IN/HiBiT と名付けた。ホタルルシフェラーゼを発現するレンチウイルストランスファーベクターを作製するために、pWPI<sup>9)</sup> の SalI/SalI フラグメントを SalI 制限酵素処理した pcDNA3.1 (Invitrogen) にサブクローニングした。得られたプラスミドを EcoRI 制限酵素処理して internal ribosome entry site (IRES) 部位と EGFP を除去し、さらに PmeI 制限酵素処理して PCR で増幅した PmeI 制限酵素処理コドン最適化ルシフェラーゼ

(Luc2) 断片を挿入した。その後、プラスミドの Sall/Sall 断片を Sall 制限酵素処理した pWPI に戻し、生成したプラスミドを pWPI-Luc2 と名付けた。すべてのコンストラクトは DNA シークエンスで確認した。

#### 1-2-2. 細胞

細胞は 25 cm<sup>2</sup> フラスコ (IWAKI 3100-025) で細胞継代を行った。293T、HeLa、MAGIC5 (HeLa-CD4 導入細胞<sup>7)</sup>)、H9 細胞および M8166 細胞は標準的な条件で維持培養した。

#### 1-2-3. ウイルス粒子産生およびウエスタンブロッティング

293T 細胞 ( $1.1 \times 10^5$ ) を 24 well plate に播き、FuGENE6 (Promega) と 1  $\mu$ g の pNL-Luc2-E(-)、pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)あるいは pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)Fin を用いてトランスフェクションを行った。レンチウイルス産生は FuGENE6 と 500 ng の psPAX2 あるいは psPAX2-IN/HiBiT と 500 ng の pWPI-Luc2 を用いてコトランスフェクションを行った。16 時間後に、細胞上清を捨て、新しい 10%DMEM 培地 1 mL を加えた。さらに 24 時間後、上清を回収し HIV-1 p24-antigen capture ELISA (ELIZA; XpressBio) キットを使用しウイルス産生量を決定した。細胞は 1 mL の DPBS で洗いをした後、PLB バッファー (Promega) 500  $\mu$ L または RIPA バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, cComplete Protease Inhibitor Mixture (Roche Applied Science )) 75  $\mu$ L を加え細胞を溶解した。PLB バッファー細胞溶解液は Centro LB960 ルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定してウイルス産生効率の正規化を行った。RIPA バッファー細胞溶解液は、抗 p24 モノクローナル抗体 (1:1000 ; Nu24)、抗 Vif ポリクローナル抗体 (1:200 ; 自家抗体 ; NL ウイルスにのみ使用)、抗インテグラーゼポリクローナル抗体 (1:1000 ; 自家抗体)、抗  $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体 (1:5000 ; Sigma-Aldrich, A5316) を用いたウエスタンブロット分析に供した。psPAX2 または psPAX2-IN/HiBiT 由来のレンチウイルス粒子を含む上清を 20% (w/v) スクロークッションに重ね、以下の処理を行った。Optima TLX Ultracentrifuge (Beckman Coulter) を用いて超遠心 (90,000rpm、10 分間) を行った。ペレット化したビリオンを SDS サンプルバッファーに再懸濁し、抗 p24 モノクローナル抗体 (1:1000 ; Nu24) および抗インテグラーゼポリクローナル抗体 (1:1000 ; 自家抗体) を用いてウエスタンブロット分析を行った。反応したタンパク質は、Clarity Western ECL substrate (BIORAD) を用いて化学発光で可視化し、画像解析装置 LAS-3000 (Fujifilm) で解析した。

#### 1-2-4. infectivity assay

NL4-3 ベースのウイルス調製には、293T 細胞 ( $1.1 \times 10^5$ ) に、pNL-Luc2-E(-)、pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)、pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)Fin のいずれかを 500 ng、pC-VSVg または pC-NLenv のいずれかを 20 ng、pC-hA3G-HA を 10 ng、空のベクターを合計 1  $\mu$ g まで加えて、FuGENE6 を用いてコトランスフェクションした。レンチウイルスの調製には、FuGENE6 を用いて 293T 細胞に psPAX2 または psPAX2-IN/HiBiT のいずれかを 475 ng、pWPI-Luc2 を 475 ng、pC-VSVg を 50 ng コトランスフェクションした。16 時間後、1 mL の新鮮な完全培地を加えた。24 時間後、37.5 units/mL の DNase I (Roche) で 37°C、30 分間処理し、上清を回収した。ウイルス上清を HIV-1 p24 ELISA に供し、p24 抗原を測定した。感染力を調べるために、HeLa 細胞または MAGIC5 細胞 ( $1 \times 10^4$ ) に各ウイルス上清の p24 抗原 (1 ng) を加え培養した。48 時間後、100  $\mu$ L の One-Glo Luciferase Assay Reagent (Promega) で細胞を溶解し、ホタルのルシフェラーゼ活

性を上述の方法で測定した。

#### 1-2-5. Drug susceptibility assays

インテグラーゼ阻害剤ドルテグラビル (Abcam, ab231511) の 10 倍段階希釈を作製し、等量の VSV-G シュードウイルス Luc2-WT または IN/HiBiT ウイルス p24 1 ng を混合した。混合液は HeLa 細胞 ( $1 \times 10^4$ ) へ加えた。48 時間後、細胞上清 100  $\mu$ L になるように上清を捨て、One-Glo Luciferase Assay Reagent (Promega) 100  $\mu$ L を加えてホタルルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。

#### 1-2-6. 初代細胞培養

ヒトのサンプルを使用した実験は、国立感染症研究所の医学研究倫理委員会によって承認され (承認番号 887)、ヘルシンキ宣言の原則に従って承認された研究が行われた。末梢血単核細胞 (PBMC) は、インフォームドコンセントに署名した健康なボランティアドナーから入手した。PBMC は Ficoll-Hypaque 勾配遠心分離によって分離された。Dynabeads CD4 陽性分離キット (Invitrogen) を使用して CD4 陽性 T リンパ球を精製し、CD4 陽性 T 細胞を取得し、精製した細胞を 3  $\mu$ g/mL PHA (Sigma-Aldrich) および 10 units/mL IL-2 (Peprotech) の存在下で 72 時間培養した。

#### 1-2-7. virus replication assays

CD-4 陽性 T 細胞 ( $2.5 \times 10^5$ ) に NL4-3 または NL-IN/HiBiT-Fin ウイルス 25 ng (p24 抗原) を加えた。3 時間後に細胞を洗い、IL-2 (10 units/mL) 添加 10% FBS 添加 RPMI 培地で 37 度 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて培養した。上清は 3 日ごとに回収し、p24 抗原の定量は ELISA で計測した。

#### 1-2-8. HiBiT luciferase assays

スタンダードとして用いる高 NL-IN/HiBiT-Fin ウイルス上清液は M8166 細胞に感染させた後、上清を回収し ELISA により p24 抗原を測定した。測定後、凍結融解を繰り返さないように上清をアシストチューブに分注し、使用時まで  $-80$  度保存した。スタンダードカーブ作製時、p24 抗原量が既知である NL-IN/HiBiT-Fin ウイルス上清液を段階希釈した。スタンダード上清あるいはサンプルウイルス上清液 25  $\mu$ L に HiBiT lytic buffer 25  $\mu$ L を 96 well plate に混合し、室温で 10 分間静置後、Centro LB960 ルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した。

#### 1-2-9. 統計分析

各グラフは、GraphPad Prism version 8.04 で作製し、相関係数 ( $R^2$ ) および回帰式は GraphPad Prism で算出した。

### 1-3 結果

#### 1-3-1 HiBiT タグを付加した HIV-1 プロウイルスベクターの影響

HiBiT タグ付き HIV-1 プロウイルスクローンを作製するために、まず HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルス発現ベクター pNL-Luc2-E(-)R(-) のインテグラーゼ (IN) ORF の C 末端に BamHI の制限酵素サイトを導入し、これに HiBiT タグを挿入するためのカセットとして使用した (図 1B)。次に、得られた構築物 pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-) または親株である pNL-Luc2-E(-) を 293T 細胞にトランスフェクションし、細胞溶解物をウエスタンブロット解析したところ、HiBiT タグ配列は HIV-1 の Gag、Vif、IN タンパク質の発現に影響を与えないことがわかった (図 1C および図 S1A)。このプロウイルスクローンを、水胞性口内炎ウイルスの G 糖タンパク質 (VSV-G) 発現プラスミドとともに 293T 細胞にコトランスフェクションし、ウイルス上清中の p24 抗原レベルを ELISA で測定した (図 1D)。トランスフェクション効率を正規化するために、トランスフェクションした細胞を溶解し、ホタルルシフェラーゼ活性のアッセイに供した。HiBiT タグ付きの IN を搭載したルシフェラーゼレポーターウイルス (Luc2-IN/HiBiT ウイルス) は、WT レベルのウイルス粒子産生を示した (図 1E)。VSV-G シュードタイプの Luc2-WT ウイルスと IN/HiBiT ウイルスを等量ずつ HeLa 細胞に接種し、ルシフェラーゼ活性を測定してウイルスの感染性を調べた (図 1D)。Luc2-IN/HiBiT ウイルスは、WT ウイルスと同等の感染力があることがわかった (図 1F)。また、HIV-1 Env-シュードウイルスの場合 (図 S2A)、Luc2-IN/HiBiT ウイルスは、WT レベルのウイルス粒子産生量 (図 S2B) と感染力 (図 S2C) を示した。さらに、IN の阻害剤に対する感受性が、HiBiT による C 末端のタグ付けによって影響を受けるかどうかを評価した。これを調べるために、IN の阻害剤であるドルテグラビルを用いて薬剤感受性アッセイを行った。その結果、WT ウイルスと Luc2-IN/HiBiT ウイルスは、ドルテグラビルに対して同等の感受性を示した (図 1G)。以上のことから、IN ORF の C 末端に HiBiT 配列をタグ付けしても、HIV-1 の生産性、感染性、IN 阻害剤への感受性には影響を与えなかった。

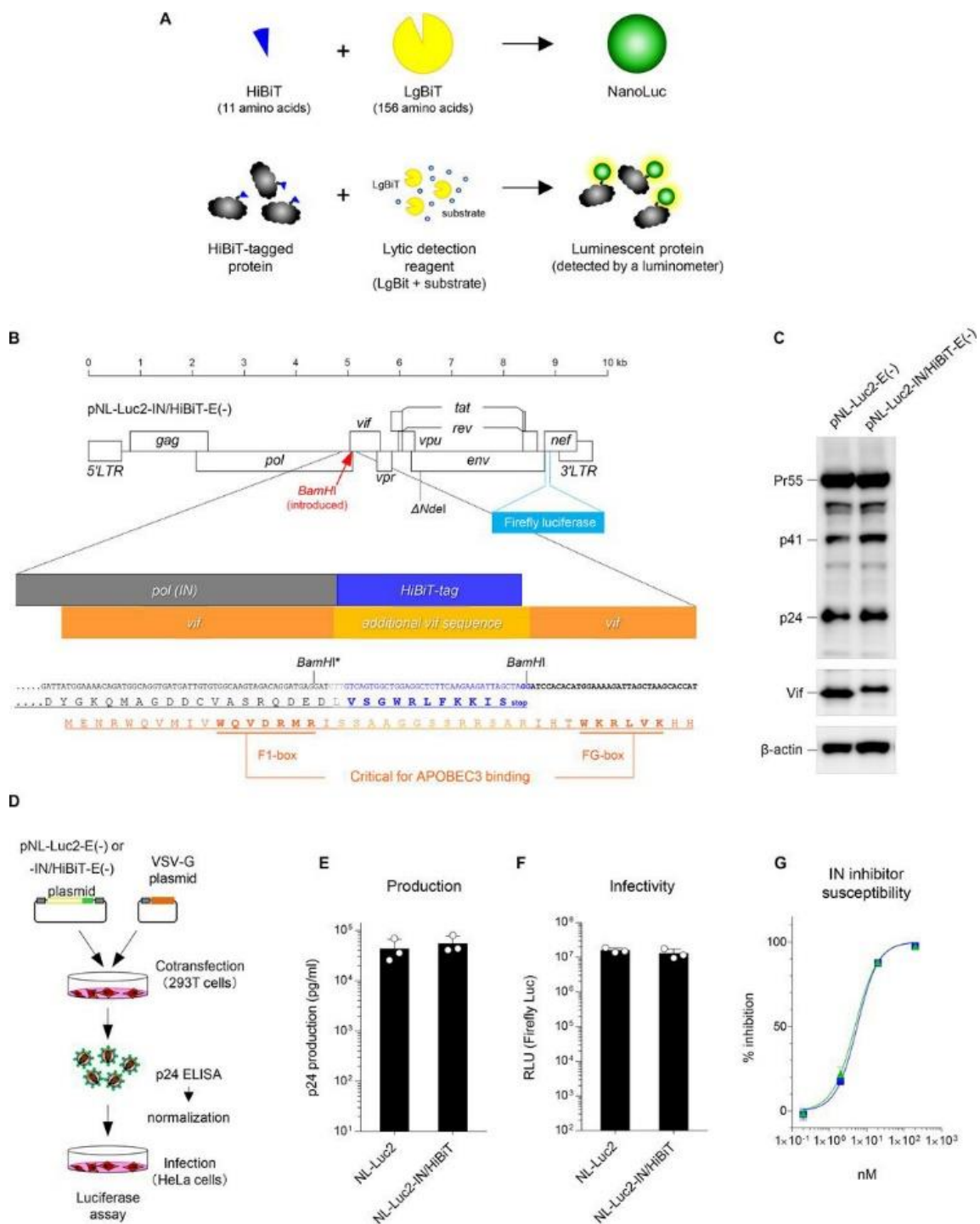


図 1. HiBiT タグを付加したルシフェラーゼレポーター-HIV-1 プロウイルス DNA は、予想されるレベルのウイルス産生、感染性、およびインテグラーゼ阻害剤に対する感受性を維持する

A, HiBiT ルシフェラーゼアッセイシステムの概略図。 B, HiBiT タグ付加 HIV-1 プロウイルス DNA、pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)の構築。 HiBiT タグ (青色で示す 11 アミノ酸配列) を、BamHI が新たに導入された pNL-Luc2-E(-)のインテグラーゼの C 末端に挿入した (HiBiT を挿入することにより、アスタリスクの付いた上流の BamHI 部位を失わせた)。黄色で示されているアミノ酸配列は、HiBiT タグの挿入によって作製された無関係の配列を持つ vif 遺伝子を表し

ている。C, pNL-Luc2-E(-)または pNL-Luc2-IN / HiBiT-E(-)のいずれかでトランスフェクションした 293T 細胞からの細胞溶解液を使用したウエスタンブロット解析。p24 (上)、Vif (中)、および  $\beta$ -actin (下) に特異的な抗体を使用した。D, HIV-1 ビリオン産生および感染性アッセイの実験手順の概略フローチャート。293T 細胞に pNL-Luc2-E(-)または pNL-Luc2-IN / HiBiT-E(-)のいずれかを pC-VSVg と一緒にトランスフェクションし、48 時間後、ウイルス上清を回収して HIV-1 p24 ELISA し、ウイルス粒子産生の定量を行った。トランスフェクション効率は、ホタルルシフェラーゼの活性に対して正規化した。同じ p24 量の VSV-G シュードウイルスを HeLa 細胞へ感染させた。48 時間後、細胞を溶解し、ホタルルシフェラーゼ活性を測定してウイルス感染力を測定した。E および F, NL-Luc2 および NL-Luc2-IN / HiBiT ウイルスのウイルス産生 (E) とウイルス感染力 (F) の比較 (3 回の独立した実験からの平均値  $\pm$  S.D.)。RLU、相対光単位。G, NL-Luc2 (青い四角) および NL-Luc2-IN / HiBiT (緑の三角形) ウイルスのインテグラーゼ阻害剤ドルテグラビルに対する感受性。2 つの独立した実験からのデータは、阻害率として示されている (平均値  $\pm$  S.D., n = 3)。

### 1-3-2 vif 領域に HiBiT タグを付加したことにより失活した抗 APOBEC3G を持つ Vif の改善

抗ウイルス宿主因子 APOBEC3G (A3G) を発現する初代細胞で複製アッセイを行うためには、Luc2-IN/HiBiT ウイルスにおける Vif の機能が損なわれていないことを確認する必要がある。これは、IN ORF の C 末端と重なる Vif の N 末端配列に、HiBiT タグ由来の無関係なアミノ酸配列が挿入されていたためである (ただし、APOBEC3 結合に重要な Vif のドメイン<sup>11-14</sup>) は変化していない) (図 1A)。Luc2-IN/HiBiT ウイルスの Vif タンパク質に抗 A3G 活性が残っているかどうかを調べるために、293T 細胞に VSV-G 発現プラスミドと、親株である pNL-Luc2、Vif 欠損の pNL-Luc2-F(-)E(-)、pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)のいずれかのコンストラクトを、コントロールプラスミドまたは A3G をコードするプラスミドとともにコトランスフェクションし、トランスフェクションした細胞から得られたウイルスを用いて感染させた。A3G を発現させると、Luc2-IN/HiBiT ウイルスの感染力は NL-Luc2- F(-)ウイルスのレベルまで著しく低下した (図 2C)。これは、Luc2-IN/HiBiT ウイルスの Vif タンパク質が抗 A3G 活性を欠いていることを示している。HiBiT タグによって塩基配列が切断された Vif の失われた機能を改善するために、まず IN ORF の C 末端と重なる Vif の開始コドンを変異させた。BspI サイトを導入した後、HiBiT タグの停止コドンのすぐ下流に、Vif の N 末端配列に対応するオリゴ DNA リンカーを挿入し、IN の C 末端をコドン最適化した (逆転写時の相同組換えを避けるため) (図 2A)。この pNL-Luc2-IN/ HiBiT-E(-)Fin と名付けたベクターをトランスフェクションした 293T 細胞から細胞溶解物を調製し、ウエスタンブロット分析を行い、Vif の発現 (図 2B) だけでなく、IN の発現 (図 S1B) も期待されたサイズであることを確認した。

上記のようにトランスフェクションした細胞から産生された VSV-G シュードタイプの Luc2-IN/ HiBiT-Fin ウイルスの感染性を調べたところ、A3G に対して完全な耐性を示し (図 2C)、結果として得られたウイルスが期待された Vif 活性を獲得したことが示された。この構築したベクターでは vif 配列が完全に保存されているため、A3G だけでなく細胞の PPP2R5 を分解して細胞周期停止を引き起こす<sup>15</sup>) という機能には影響がないものと考えられる。Env-intact の完全長バージョンのウイルスが CD4 陽性 T 細胞へ感染させるために、pNL4-3 ベースの IN/HiBiT-Fin プロウイルスクローン (pNL-IN/ HiBiT-Fin) を作製した。PHA-IL-2 で刺激した初代 CD4 陽性 T 細胞に、WT または IN/HiBiT-Fin のウイルスを感染させた後、上清中の p24 産生レベルを測定することでウイルスの複製を比較したところ、IN/HiBiT-Fin ウイルスの複製動態は親ウイ





れるかどうか、また HiBiT を介したルシフェラーゼ活性と p24 濃度の間に相関関係が見られるかどうかを評価した。M8166 細胞で作製した IN/HiBiT-Fin ウイルスを増殖させて高力価のウイルスストックを調製し、市販の ELISA キットで p24 を測定した。次に、スタンダードウイルスとして 2 倍に希釈した試料を HiBiT ルシフェラーゼアッセイに供した。試料と試薬を等量ずつ加えてよく混合し、10 分間インキュベートした後、ルミノメーターを用いて 1 ウェルあたり 1 ~10 秒の測定を行った (図 3A)。HiBiT ルシフェラーゼ活性は、ng オーダーで希釈されたウイルス上清 (図 3B) および pg オーダーで高希釈されたサンプル (図 3C) の p24 値と強く相関し、p24 値と HiBiT ルシフェラーゼ活性の間には優れた相関関係が見られた (それぞれ  $R^2 = 1$  および  $R^2 = 0.9994$ )。これは、HiBiT 活性がこの迅速かつ容易な方法によって、p24 抗原レベルに直接変換できることを示している。つまり、p24 抗原量が既知のウイルス上清を用意し、それを連続的に希釈して、HiBiT ルシフェラーゼ活性の標準曲線を作製し、このアッセイで活性を測定すれば、目的のサンプルの p24 量を容易に決定することができた。以上のことから、IN の C 末端に HiBiT タグと Vif リンカーを挿入した IN/HiBiT-Fin ウイルスは、親株である HIV-1 と完全に類似しており、今後の HIV-1 研究において利便性の高い研究ツールになると結論づけた。

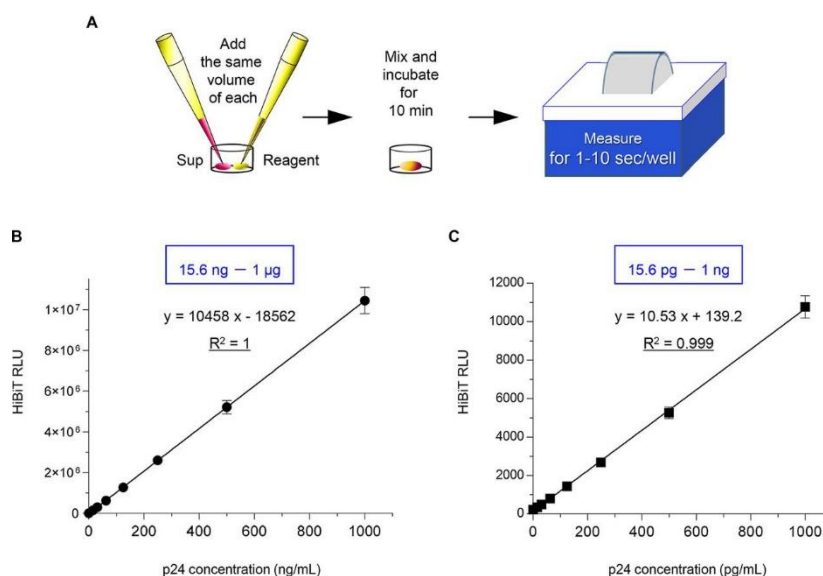
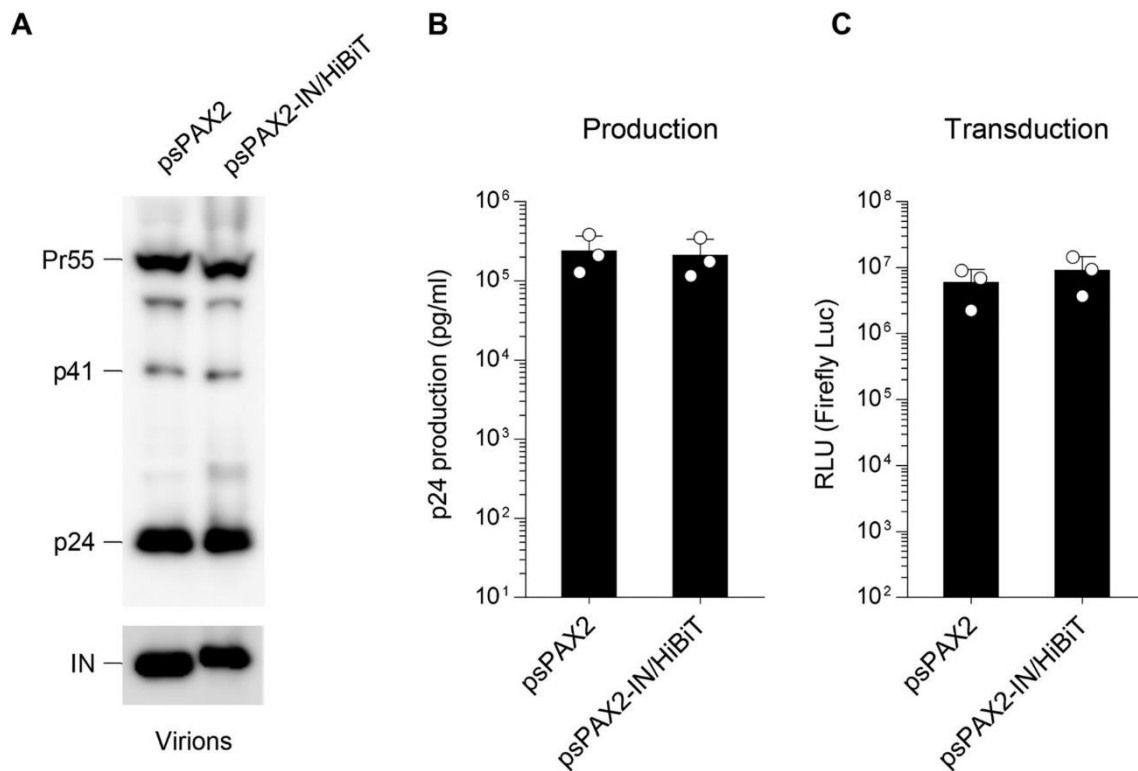


図 3. HiBiT ベースのルシフェラーゼアッセイは、ウイルス上清の p24 値と強い相関関係を示している

A, HiBiT ベースの HIV-1 ウイルス産生アッセイの実験手順の概略フローチャート。 B および C, ヒト CD4 陽性 T 細胞株から調製されたコンピテント NL-IN / HiBiT-Fin 複製ウイルス上清を使用した p24 抗原 ELISA で測定された既知レベルの p24 抗原 (B, high doses, 15.6 ng ~ 1 µg; C, low doses, 15.6 pg ~ 1 ng) と、HiBiT アッセイで測定された HiBiT 由来ルシフェラーゼ活性との相関。 方程式と決定係数 ( $R^2$ ) は図中のように示される。(少なくとも 3 回の独立した実験からの平均値 ± S.D.)。 RLU、相対光単位。



**図 4. HiBiT タグを付加したレンチウイルスパッケージングベクターを使用するレンチウイルスシステムは、WT レベルのウイルス産生および形質導入を示す**

A, 親株 psPAX2 または psPAX2-IN / HiBiT レンチウイルスパッケージングベクターのいずれかに由来するウイルス粒子ペレットを使用したウェスタンブロット。p24 (上) およびインテグラーゼ (下) に特異的な抗体を使用した。示されているデータは、2つの独立した実験の代表。

B および C, ホタルルシフェラーゼ発現トランスファーベクター pWPI-Luc2 および VSV-G 発現プラスミドを psPAX2 または psPAX2-IN / HiBiT レンチウイルスパッケージングベクターと一緒にトランスフェクションした細胞から生じるレンチウイルス産生 (B) および形質導入 (C) の比較 (平均値±S.D., n=3)。RLU、相対光単位。

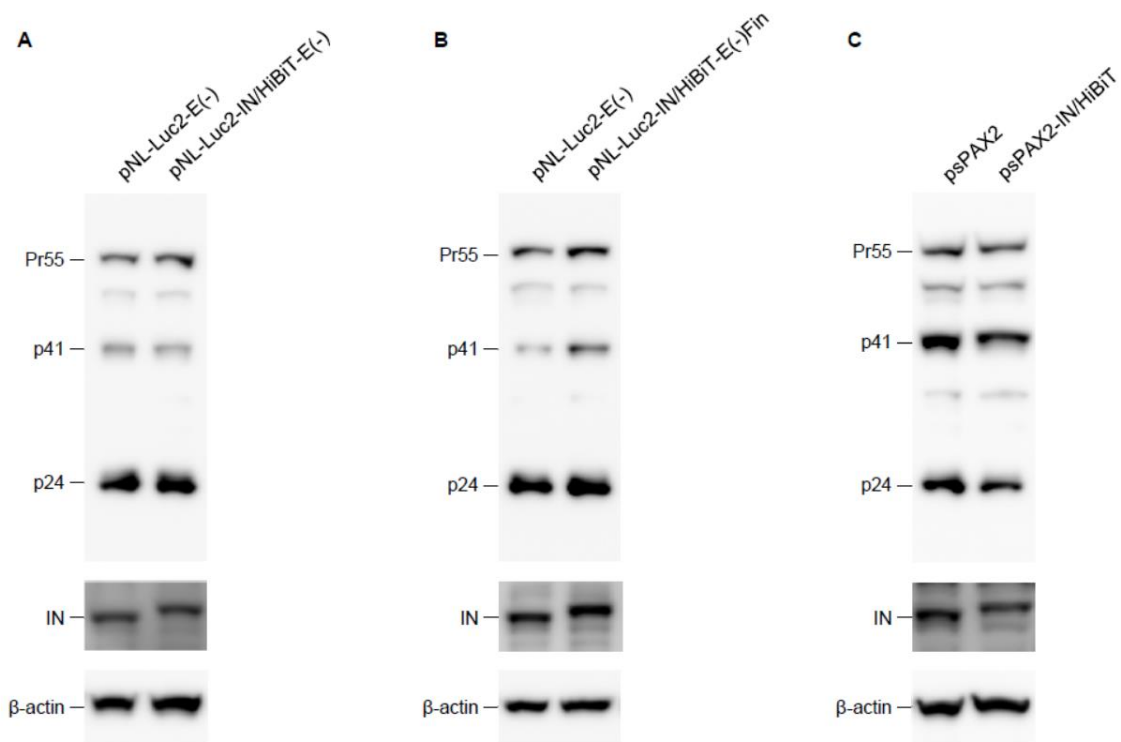
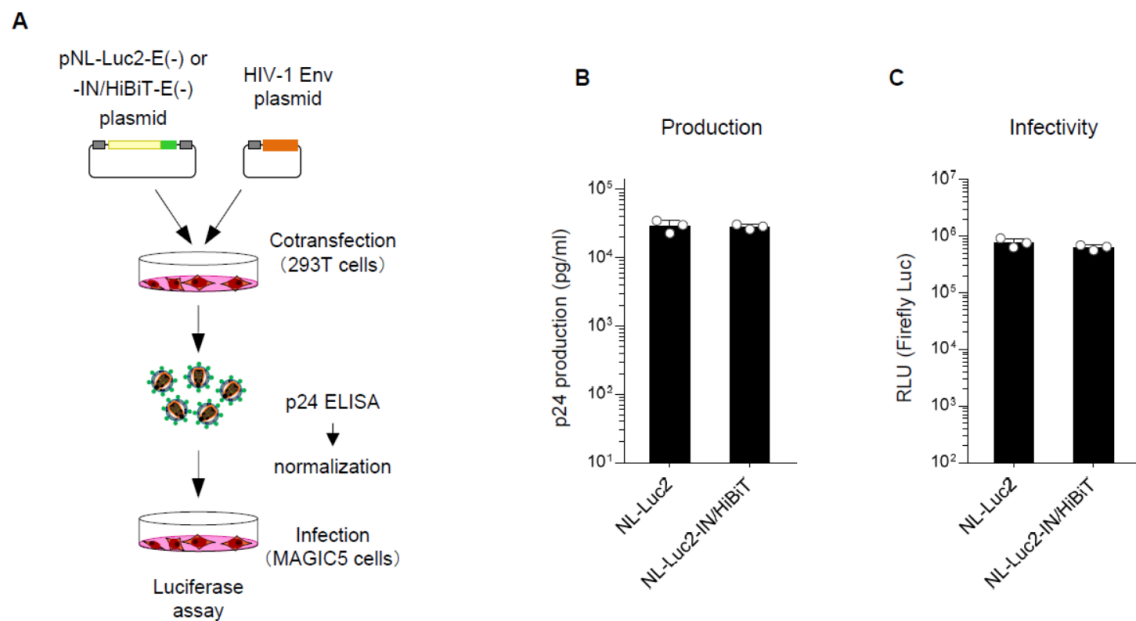


図 S1. HiBiT タグ付きの IN の発現

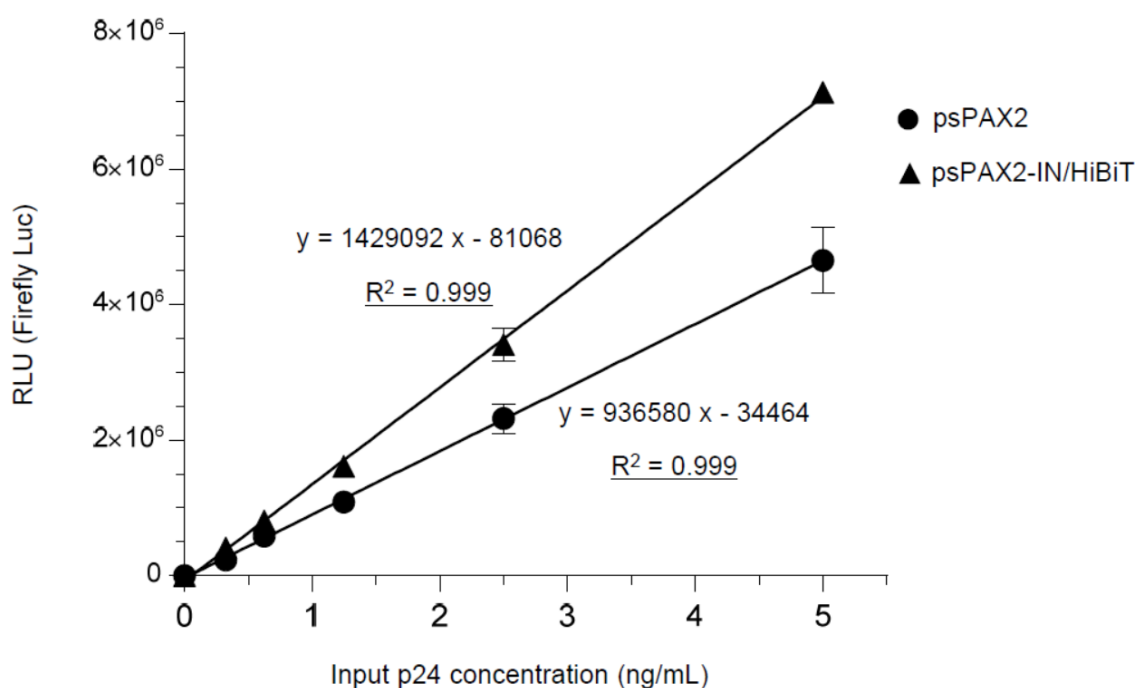
(A) pNL-Luc2-E(-)または pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)、(B) pNL-Luc2-E(-)または pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)Fin、(C) psPAX2 または psPAX2-IN/HiBiT をトランスフェクトした 293T 細胞からの抽出液を用いて行ったウェスタンブロット解析。p24 (上)、IN (中)、 $\beta$ -actin (下) に特異的な抗体を用いた。



## 図 S2. HIV-1 Env-シュードウイルスにおけるウイルス粒子産生量と感染力

(A) HIV-1 ビリオンの産生および感染性アッセイの実験手順を示す概略フローチャート。293T 細胞に pNL-Luc2-E(-) または pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-) と HIV-1 Env 発現ベクター pC-NLenv をトランスフェクションし、48 時間後にウイルス上清を採取して HIV-1 p24 ELISA を行い、ビリオン産生のレベルを測定した。トランスフェクション効率は、ホタルルシフェラーゼの活性で正規化した。同等量の HIV-1 Env-シュードタイプウイルスの p24 抗原を、HeLa-CD4 導入の MAGIC5 細胞への感染に用いた。48 時間後に細胞を溶解し、ホタルルシフェラーゼ活性を測定してウイルスの感染力を判定した。

(B, C) HIV-1 Env シュードタイプの NL-Luc2 および NL-Luc2-IN/HiBiT ウイルスのビリオン産生量 (B) およびウイルス感染力 (C) の比較 (平均値±S.D.、n=3)。



## 図 S3. ホタルルシフェラーゼ活性/p24 比

p24 抗原 ELISA で測定した p24 抗原 (0~5 ng/mL) と、ルシフェラーゼアッセイで測定した導入効率 (ホタルルシフェラーゼ活性で表す) の相関関係。2 回の独立した実験からのデータを示す (平均値±S.D.、n=3)。RLU は、相対光単位。

#### 1-4 考察

本研究では、発光ペプチドタグ付き IN を持つ HIV-1 株 pNL4-3 を、高精度、簡便、超高速で定量する新しいシステムを確立した。この方法は、完全長の感染性 HIV-1 のウイルス生産量を定量化するための効率的な操作を提供する。いくつかの研究グループは、様々な HIV-1 ウイルスゲノム<sup>16)</sup> やトランスジーン mRNA<sup>17)</sup> を標的とした、レンチウイルスベクターや全 HIV-1 ウイルスのビリオン定量のための異なるリアルタイム RT-PCR 法を開発した。これらの方法では、RNA の抽出と DNase 処理、およびリアルタイム RT-PCR の手順が必要で、合計 4~5 時間以上かかる。

最近では、Vermeire ら<sup>18)</sup> が、SG-PERT (SYBR Green I-based PCR-enhanced reverse transcriptase) と名付けた、ウイルス上清中の RT 活性を直接測定する、リアルタイム PCR に基づく正確かつ迅速で比較的安価なレトロウイルス定量法を報告している。その報告によると、SG-PERT 法は、市販の ELISA キットを用いて p24 抗原量を測定する場合と比較して、レトロウイルスの定量にかかる試薬コストが 10 分の 1 程度で済み、測定にかかる時間も 2 時間以内で済む。我々の研究では、ウイルス上清を定量するための HiBiT ベースのアッセイ試薬の 1 ウェルあたりのコストは、SG-PERT アッセイのコストとほぼ同等である。さらに、検出可能な HiBiT 活性の範囲が広いこと、このアッセイでは、SG-PERT アッセイのようなサンプルの希釈が必要ない。一方、p24 ELISA では、頻繁に 3 段階の希釈が必要となり、アッセイに時間を要する。特筆すべきは、ELISA 法では通常 4~5 時間かかる (サンプルの準備、インキュベーション、洗浄を含む) のに対し、HiBiT を用いたアッセイ (1 ステップ) では最大 15 分しかかからないことであり、これは前述の SG-PERT 法の時間よりもさらに速い。

私たちの論文が修正されている間に、別のグループから異なるタイプの HIV-1 レポーターベクターが報告された<sup>19)</sup>。彼らの論文では、NanoLuc ルシフェラーゼ自体を用いて、ウイルス産生量の測定を容易にする HIV-1 生物発光レポーターウイルスを開発した。得られたウイルスは、確かにウイルスの放出量を高感度で定量することができたが、ウイルスの感染力には欠陥があり、したがって WT レベルの感染力を得るためには WT Gag との共発現が必要であった。これはおそらく、Gag の p17 と p24 の間に NanoLuc が挿入されているため、19kDa のルシフェラーゼタンパク質がウイルスに取り込まれ、Gag のコンフォメーションやプロセッシングに影響を与えたのではないかと考えられる。一方で、HiBiT タグの挿入によるウイルスの形態については、得られた IN/HiBiT-Fin ウイルスまたは親ウイルスである NL4-3 ウイルスを感染させた M8166 細胞を用いて、透過型 EM 解析を行っている<sup>20)</sup>。電子顕微鏡像を見ると、IN/HiBiT-Fin ウイルスの成熟粒子は形態的に正常であり、親ウイルスである NL4-3 ウイルスのそれと区別がつかないことから、HiBiT タグの挿入はウイルスの形態形成に影響を与えないことがわかった。この意味で、我々の複製能力のある IN/HiBiT-Fin ウイルスは、複数の複製サイクルに基づいて実施する必要のある実験に適したツールと期待される。例えば、変異ウイルスのウイルス学的特性評価、宿主とウイルスの相互作用の分析、抗ウイルス剤のハイスループットスクリーニングなどが挙げられる。

今回の研究の明確な限界を 1 つ述べておく必要がある。すなわち、患者から直接採取した大量のウイルス試料は、分子的にクローニングし、HiBiT を付加したプロウイルス DNA を再構築しない限り、本システムを適用することはできない。IN の C 末端ドメインは DNA 結合に関与しているため<sup>21)</sup>、C 末端に HiBiT タグを付けることで、典型的な HIV-1 の統合プロファイルが変化することを考慮しなければならないかもしれない。加えて、我々のプロウイルス DNA を生体内での研究 (例: ヒト化マウス) に使用した場合、HiBiT の挿入が免疫反応に影響を与える可能性も否定できない。

したがって、この方法は、分子クローニングを用いたウイルス研究に特化したものであると考えられる。また、この手法を利用して、インテグラーゼ遺伝子の C 末端にも融合した HiBiT タグ

配列を持つレンチウイルスパッケージングベクターを構築したが、これはレンチウイルス作業をより便利にする可能性があるからである。プロウイルス DNA を用いた前述の観察結果と一致して、そのウイルスタンパク質の発現 (図 4A および図 S1C)、ビリオンの産生 (図 4B)、およびホタルルシフェラーゼ活性/p24 比 (図 S3) を含むトランスダクション (図 4C) は、WT のレンチウイルスベクターと同等であった。後述の第二章ではこのレンチウイルスパッケージングベクターの系を用いてスパイクシェードウイルスとして実験を行っている。

このように、HiBiT を用いたアッセイには以下のような利点がある。1) 超高速 (15 分)、2) 安価 (1 サンプルあたり 0.5 米ドル)、3) 実用的で便利 (希釈の必要なし)、4) 極めて簡単 (1 ステップの手順)、5) 高精度 (p24 抗原 10 pg から 1 µg までの 6 桁のリニアスケール)。以上のことから、HiBiT タグ付きプロウイルス HIV-1 DNA およびレンチウイルスベクターは、親ベクターに代わって使用することができ、今後のウイルス学研究において強力で信頼性の高い分子ツールとなると結論づけられた。

## 1-5. 要約

HIV-1 の研究では、通常、逆転写酵素法または p24 抗原捕捉 ELISA 法のいずれかによってウイルスの産生をモニターしている。しかし、これらのアッセイは、多数の HIV-1 サンプルを日常的に取り扱うにはコストと時間を要する。例えば、ELISA 法では検出可能な濃度の範囲が非常に狭いため、p24 タンパク質レベルを測定するためには常にサンプルの希釈が必要となる。ここでは、HiBiT と呼ばれる最近開発された小さなペプチドタグを使用することで、前述の問題を解決する新しい HIV-1 生産アッセイシステムを確立した。このペプチドは、NanoLuc ルシフェラーゼの断片であり、残りのサブユニットと相補的に結合すると強い発光シグナルを発生する。この技術を採用するために、新規の完全長プロウイルス HIV-1 DNA クローンと、インテグラーゼの C 末端に HiBiT タグを付加したレンチウイルスパッケージングベクターを構築した。インテグラーゼに HiBiT タグを付加しても、ウイルスの産生、感染性、インテグラーゼ阻害剤への感受性に影響はなかった。次に、制限因子 APOBEC3G (A3G) を発現する初代細胞で複製アッセイを行うためには、Luc2-IN/HiBiT ウイルスにおける Vif の機能が損なわれていないことを確認する必要がある。これは、IN ORF の C 末端と重なる Vif の N 末端配列に、HiBiT タグ由来の無関係なアミノ酸配列が挿入されていたためである。A3G を発現させると、Luc2-IN/HiBiT ウイルスの感染力は NL-Luc2- F(-)ウイルスのレベルまで著しく低下した。これは、Luc2-IN/HiBiT ウイルスの Vif タンパク質が抗 A3G 活性を欠いていることを示している。HiBiT タグによって塩基配列が切断された Vif の失われた機能を救済し、この pNL-Luc2-IN/ HiBiT-E(-)Fin と名付けた構築物をトランスフェクションした細胞から産生された VSV-G シュードタイプの Luc2-IN/ HiBiT-Fin ウイルスの感染性を調べたところ、A3G に対して完全な耐性を示し、結果として得られたウイルスが期待された Vif 活性を獲得したことが示された。Env-intact の完全長バージョンのウイルスが CD4 陽性 T 細胞へ感染させるために、pNL4-3 ベースの IN/HiBiT-Fin プロウイルスクローン (pNL-IN/ HiBiT-Fin) を作製した。PHA-IL-2 で刺激した初代 CD4 陽性 T 細胞に、WT または IN/HiBiT-Fin のウイルスを感染させた後、上清中の p24 産生レベルを測定することでウイルスの複製を比較したところ、IN/HiBiT-Fin ウイルスの複製は親ウイルスに比べて遅れただけであり、IN/HiBiT-Fin ウイルスが複製能力を持つことが確認された。以上の結果から、IN の C 末端に N 末端の vif 配列を加えることで、抗 A3G 活性が付与され、初代 CD4 陽性 T 細胞において効率的にウイルスが複製されることが示された。

最も重要なことは、ELISA と HiBiT ルシフェラーゼアッセイを比較することで、p24 濃度と HiBiT ベースのルシフェラーゼ活性の間に優れた線形相関を得ることに成功したことである。以上のことから、HiBiT タグ付きウイルスは、親ウイルスである HIV-1 とレンチウイルスベクターを置き換えることができ、HIV-1/レンチウイルス生産のための、超高速、安価、簡便、高精度な定量的アッセイを行うことができると結論づけた。このシステムは、将来の抗ウイルス剤の候補をスクリーニングするとともに、様々なウイルス学的研究に広く応用することができる。



## 参考文献

1. Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., and Martin, M. A.: Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 1986;59(2): 284–91.
2. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220(4599): 868–71.
3. Goudsmit, J., Lange, J. M., Paul, D. A., and Dawson, G. J.: Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS-related complex, and subclinical human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 1987;155(3): 558–60.
4. Dixon, A. S., Schwinn, M. K., Hall, M. P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T. H., Butler, B. L., Binkowski, B. F., Machleidt, T., Kirkland, T. A., Wood, M. G., Eggers, C. T., Encell, L. P., and Wood, K. V.: NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *ACS Chem. Biol.* 2016;11(2): 400–8.
5. Tamura, T., Fukuhara, T., Uchida, T., Ono, C., Mori, H., Sato, A., Fauzyah, Y., Okamoto, T., Kurosu, T., Setoh, Y. X., Imamura, M., Tautz, N., Sakoda, Y., Khromykh, A. A., Chayama, K., Matsuura, Y.: Characterization of Recombinant Flaviviridae Viruses Possessing a Small Reporter Tag. *J Virol* 2018;92(2).
6. Tamura, T., Igarashi, M., Enkhbold, B., Suzuki, T., Okamatsu, M., Ono, C., Mori, H., Izumi, T., Sato, A., Fauzyah, Y., Okamoto, T., Sakoda, Y., Fukuhara, T., Matsuura, Y.: In Vivo Dynamics of Reporter Flaviviridae Viruses. *J Virol* 2019;93(22).
7. Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., Fujita, H., Tokunaga, K.: MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat Med* 2015;21(12): 1502–7.
8. Kinomoto, M., Kanno, T., Shimura, M., Ishizaka, Y., Kojima, A., Kurata, T., Sata, T., and Tokunaga, K.: All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(9): 2955–64.
9. Wiznerowicz, M., Trono, D.: Conditional suppression of cellular genes: Lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 2003; 77(16): 8957–61.
10. Tsunetsugu-Yokota, Y., Akagawa, K., Kimoto, H., Suzuki, K., Iwasaki, M., Yasuda, S., Häusser, G., Hultgren, C., Meyerhans, A., Takemori, T.: Monocyte-derived cultured dendritic cells are susceptible to human immunodeficiency virus infection and transmit virus to resting T cells in the process of nominal antigen presentation. *J Virol* 1995;69(7), 4544–7.
11. Dang, Y., Wang, X., Zhou, T., York, I. A., Zheng, Y.H.: Identification of a novel WxSLVK motif in the N terminus of human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus Vif that is critical for APOBEC3G and APOBEC3F neutralization. *J Virol* 2009;83(17), 8544–52.
12. Yamashita, T., Kamada, K., Hachio, K., Adachi, A., Nomaguchi, M.: Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F. *Microbes Infect* 2008 10(10-11): 1142–9.
13. Russell, R. A., Pathak, V. K.: Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol* 2007;81(15): 8201–10.
14. Tian, C., Yu, X., Zhang, W., Wang, T., Xu, R., Yu, X. F.: Differential requirement for conserved

- tryptophans in human immunodeficiency virus type 1 Vif for the selective suppression of APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol* 2006;80(6): 3112–5.
15. Salamango, D. J., Ikeda, T., Moghadasi, S. A., Wang, J., McCann, J. L., Serebrenik, A. A., Ebrahimi, D., Jarvis, M. C., Brown, W. L., Harris, R. S.: HIV-1 Vif triggers cell cycle arrest by degrading cellular PPP2R5 phospho-regulators. *Cell Rep* 2019;29(5): 1057–65.
  16. Delenda, C., Gaillard, C.: Real-time quantitative PCR for the design of lentiviral vector analytical assays. *Gene Ther* 2005;12 Suppl. 1: S36–50.
  17. Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z., Gijssbers, R.: Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol* 2006;6: 34.
  18. Vermeire, J., Naessens, E., Vanderstraeten, H., Landi, A., Iannucci, V., Van Nuffel, A., Taghon, T., Pizzato, M., Verhasselt, B.: Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti- and retroviral vectors. *PLoS One* 2012;7(12): e50859.
  19. Kirui, J., Freed, E. O.: Generation and validation of a highly sensitive bioluminescent HIV-1 reporter vector that simplifies measurement of virus release. *Retrovirology* 2020;17(1): 12.
  20. Ozono, S., Zhang, Y., Tobiume, M., Kishigami, S., Tokunaga, K.: Super-rapid quantitation of the production of HIV-1 harboring a luminescent peptide tag. *J Biol Chem* 2020;295(37): 13023-30.
  21. Hen, J. C., Krucinski, J., Miercke, L. J. W., Finer-Moore, J. S., Tang, A. H., Leavitt, A. D., Stroud, R. M.: Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: A model for viral DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(15): 8233–8.

## 第2章 HiBiT ペプチドタグを有するレンチウイルスベクター系を

### 用いた COVID-19 研究への応用

#### 2-1 序論

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2)<sup>1-4)</sup> によるコロナウイルス感染症 2019 (COVID-19) の大流行は、急速に世界に広がり、180 カ国以上に影響を与えている。SARS-CoV-2 はプラス鎖の 1 本鎖 RNA をゲノムとしてもつエンベロープウイルスで、ゲノム全長が約 30kb と RNA ウイルスとしては極めて長い<sup>5,6)</sup>。ゲノムの 2/3 程を 16 の非構造タンパク質群 (nsp1-16) をコードする ORF1a、ORF1b が占め、構造タンパク質 S (spike)、E (envelope)、M (membrane)、N (nucleocapsid) や他の非構造タンパク質がコードされている。ヒトに感染するコロナウイルスは今まで 6 種類が知られていた。ヒトが宿主である 229E、OC43、NL63、HKU-1 のヒトコロナウイルス (HCoV) は、一般的な風邪の症例の約 20% を占めている<sup>7-12)</sup>。残り 2 種類は 2002~2003 年に中国で出現した重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) と 2012 年に中東で確認された中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) であり、ヒトコロナウイルスと異なり重症肺炎を引き起こしている<sup>13-18)</sup>。SARS-CoV ではキクガシラコウモリ<sup>19)</sup>、MERS-CoV ではヒトコブラクダ<sup>20,21)</sup> が本来の宿主であり、種を超えて感染すると重症化するとされている。COVID-19 のパンデミックの間、SARS-CoV-2 は、ORF1a、ORF1b、ORF3、ORF8、N、S タンパク質などをコードするウイルス遺伝子全体に変異を蓄積しており、そのうちのいくつかはクレードを定義している (Nextstrain, <http://nextstrain.org/ncov>, GISAID data, [www.gisaid.org](http://www.gisaid.org))。

S タンパク質は、ウイルス粒子表面に三量体のスパイクを形成している。このタンパク質は高度にグリコシル化されており、宿主または外因性プロテアーゼによって S1 ドメインと S2 ドメインに切断される<sup>22-24)</sup>。S1 ドメインは宿主細胞の受容体との結合ドメインを含み、S2 ドメインはウイルスの侵入と細胞融合を担っている。S2 ドメインはさらに、エクドメイン、単一の TM (transmembrane) ドメイン、CT (cytoplasmic tail) ドメインに分けられる。CT ドメインは、細胞内保持シグナルを含んでおり、ウイルス粒子表面への S タンパク質の組み込みにも重要である。

SARS-CoV-2 S タンパク質は、ウイルス感染の最初のステップ、すなわち、アンジオテンシン変換酵素 2 (Angiotensin-converting enzyme 2; ACE2) 受容体<sup>1)</sup> に結合して細胞内に侵入し、続いて II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ (Transmembrane protease, serine 2; TMPRSS2)<sup>25,26)</sup> で切断される際に重要な役割を果たしているため、S タンパク質の変異は特に重要である。しかし、S の変異が SARS-CoV-2 の細胞侵入に影響を与えるかどうかはまだ不明であった。

本研究では、SARS-CoV S とパンデミック当初における自然に生じた SARS-CoV-2 S (以下、SARS-S、SARS2-S と表記する) 変異が、ACE2 と TMPRSS2 を介した細胞侵入への影響を明らかにすることを目的とし、シュードタイプウイルスの細胞侵入を定量化するために最近開発した新しい侵入アッセイシステム<sup>27)</sup> を用いて細胞侵入の比較を検討した。このシステムでは、アッセイ中の HiBiT ルシフェラーゼシグナルによって生成された高精度の標準曲線に基づいてウイルス投入量を正確に正規化することができるため、細胞侵入レベルを実験的に正確に決定することができる。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1. DNA 構築

HiBiT タグ付きレンチウイルスパッケージングプラスミド psPAX2-IN/HiBiT、ホタルルシフェラーゼ発現レンチウイルストランスファープラスミド pWPI-Luc2、CMV/R-SARS-S、および ACE2 発現プラスミドについては、すでに構築<sup>27-30)</sup>している。ACE2 発現プラスミド pC-ACE2 は、PCR で増幅された Acc65I/XhoI 制限酵素処理のヒト ACE2 断片を、哺乳類発現プラスミド pCAGGS の対応する部位に挿入することで作製した<sup>31)</sup>。TMPRSS2 発現プラスミド pC-TMPRSS2 は、HepG2 細胞から単離した total RNA を特定のオリゴヌクレオチドを用いて TMPRSS2 遺伝子の RT-PCR 増幅を行い、BsiWI/XhoI 制限酵素処理した増幅断片を、Acc65I/XhoI 制限酵素処理した pCAGGS にクローニングした (RT-PCR エラーや SNP の可能性がある場合は PCR による変異導入で修正した)。SARS-CoV S 発現プラスミド pC-SARS-S は、CMV/R-SARS-S の BsiWI/XhoI 制限酵素処理 PCR 増幅 SARS-CoV S フラグメントを pCAGGS の対応する部位に挿入することにより作製された。SARS-CoV-2 S 発現プラスミド pC-SARS2-S は、pCMV3-2019-nCoV-Spike (S1+S2) -long (Sino Biological; VG40589-UT) の PCR で増幅された SARS-CoV-2 S 断片を、pCAGGS の対応するサイトに挿入することにより作製した。SARS-CoV-2 S 変異体 (pC-SARS2-S-H49Y、pC-SARS2-S-V367F、pC-SARS2-S-G476S、pC-SARS2-S-V483A、pC-SARS2-S-D614G、または pC-SARS2-SC1247A) は、S タンパク質の 49 番目、367 番目、476 番目、483 番目、614 番目、1247 番目アミノ酸がそれぞれヒスチジン-チロシン、バリン-フェニルアラニン、グリシン-セリン、バリン-アラニン、アスパラギン酸-グリシン、システイン-アラニンに置換したプラスミドを Acc65I/NotI 制限酵素処理した pCAGGS にオーバーラップした PCR 断片を挿入して作製した。SARS-S の TM/CT ドメインを持つキメラ型 SARS2-S タンパク質を発現するプラスミド (pC-SARS2-S-TM/CT1) は、オーバーラップする PCR 断片 (SARS-S の TM/CT ドメインと SARS2-S の他のすべてのドメインから増幅されたもの) を、Acc65I/NotI 制限酵素処理した pCAGGS に挿入することで作製した。pCa-hA3G-T7e40 の APOBEC3G 遺伝子を PCR で増幅した S 断片で置き換えることにより、C 末端 T7 エピトープ (T7e) タグ付き S 発現プラスミド、pC-SARS-S-T7e、pC-SARS2-S-T7e、pC-SARS2-S-C1247A-T7e、pC-SARS2-S-TM/CT1-T7e を作製した。すべてのコンストラクトは、DNA シークエンス (FASMAC) によって確認した。

図 S2 a に示した配列アライメントは、Genetyx (v.13.1.2) を用いて行った。本研究で使用したすべてのプライマーのリストは、表 1 に記載した。

### 2-2-2. 細胞

各細胞は 25 cm<sup>2</sup> フラスコ (IWAKI) あるいは 75 cm<sup>2</sup> フラスコ (IWAKI) で細胞継代を行った。293T 細胞と HepG2 細胞は標準の通りに維持培養をした。初代ヒト小気道上皮細胞 (Human small airway epithelial cells) は ScienCell 社 (#3230) を poly-L-lysine (ScienCell, #0413) コーティング フラスコに Small airway epithelial cell medium (ScienCell, #3231)、1% Small Airway Epithelial Cell Growth Supplement (ScienCell, #3272) および 1% penicillin/streptomycin solution (ScienCell, #0503) を使用して培養した。

### 2-2-3. シュードタイプウイルスの調製と cell entry assays

293T 細胞 ( $1.1 \times 10^5$ ) に 200 ng S タンパク発現プラスミド、400 ng psPAX2-IN/HiBiT および 400 ng pWPI-Luc2 と FuGENE6 (Promega) を使用しトランスフェクションを行った。16 時間後

に培地交換を行い、24 時間後に DNase I 処理を 37°C、30 分間行ったウイルス上清を回収した。レンチウイルス量は HiBiT assay により定量した。様々なスパイクタンパク質をシュードしたレンチウイルスシフエラーゼレポーターウイルスを調製するために、 $1.1 \times 10^5$  個の 293T 細胞に、S タンパク発現プラスミド (pC-SARS-S、pC-SARS2-S (-WT、-H49Y、-V367F、-G476S、-V483A、-D614G、または-C1247A)) 200ng、psPAX2-IN/HiBiT 400ng、および pWPI-Luc2 400 ng を、FuGENE 6 (Promega) を用いてコトランスフェクションした。16 時間後、1 mL の新鮮な完全培地に交換した。24 時間後、上清を採取し、37.5 U/mL の DNase I (Roche) で 37°C、30 分間処理した。ウイルス上清中のレンチウイルス量は、HiBiT アッセイで測定した。スタンダードウイルスは既知のレベルの p24 抗原を含むレンチウイルスストックを連続的に希釈した。LgBiT Protein (1:100) /HiBiT Lytic Substrate (1:50) を混合した Nano-Glo HiBiT Lytic Buffer (25  $\mu$ L) (Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System; Promega) とスタンダードウイルスまたはウイルス上清 (25  $\mu$ L) を混合し、室温で 10 分間インキュベートした。

ウイルス上清中の HiBiT ベースのルシフェラーゼ活性を Centro LB960 ルミノメーター (Berthold) で測定し、MicroWin (v.4.36.) を通して Microsoft Excel 2016 にエクスポートし、p24 抗原レベルに換算した。標的細胞を準備するために、293T 細胞 ( $2.2 \times 10^5$ ) に pC-ACE2、pC-TMPRSS2 と 700 ng pCAGGS プラスミドと FuGENE6 (Promega) を使用しトランスフェクションを行った。48 時間後、トランスフェクションを行った 293T 細胞 ( $2.2 \times 10^4$ ) を 96 well plate に播き、p24 抗原量 1 ng の種々のスパイクシュードウイルスを加え培養した。初代ヒト小気道上皮細胞をターゲット細胞に用いる場合は、 $2 \times 10^4$  を播き、p24 抗原量を変えた S シュードウイルスを加えて培養した。感染 48 時間後、ターゲット細胞に 100  $\mu$ L の One-Glo Luciferase Assay Reagent (Promega) を加えた。ホタルルシフェラーゼ活性は Centro LB960 ルミノメーターで測定した。なお、この手順では、細胞表面へのビリオンの非特異的な付着によるバックグラウンドのために、標的細胞溶解液を用いた HiBiT アッセイは、細胞侵入レベルを決定するためには採用しなかった。

#### 2-2-4. ウェスタンブロット解析

ビリオンとトランスフェクションした細胞を用いたウェスタンブロット分析では、サンプルをゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロース膜に転写した。膜は、抗 SARS-CoV-2 スパイク (S2 サブユニット) マウスモノクローナル抗体 (1:1000、GeneTex、GTX632604)、抗 p24 モノクローナル抗体 (1:1000、Nu24<sup>32</sup>)、および抗  $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体 (細胞溶解液用、1:5000、Sigma-Aldrich、A5316) で標識した。プロットはペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス IgG (1:10000、Jackson ImmunoResearch Laboratories、115-035-062) と Clarity Western ECL substrate (BIORAD) で可視化し、LAS-3000 (FujiFilm) を用いて分析した。

#### 2-2-5. Spike incorporation assays

SARS2-S シュードタイプのウイルスを含むウイルス上清は、T7e タグ付きの S 発現プラスミドを用いた以外は、上述の方法で調製した。その後、上清を 20% (wt/vol) スクロースクッションに重ね、Optima TLX Ultracentrifuge (Beckman Coulter) を用いて超遠心分離 ( $440,000 \times g$ 、10 分) を行った。ペレット化したビリオンを SDS サンプルバッファーに懸濁し、抗 T7 エピトープマウスモノクローナル抗体 (1:3000、Novagen 社製、69522-4) および抗 p24 モノクローナル抗体 (1:1000、Nu24) を用いてウェスタンブロット解析を行った。

#### 2-2-6. Neutralization assays

ヒト試料を用いた実験は、日本の国立感染症研究所の医学研究倫理委員会の承認を得た。インフォームドコンセントに署名した確定症例患者 (2020 年 2 月入手) から、症状発現後 15~30

日目に5つの血清サンプルを採取し、56°Cで30分間熱不活化した。2倍段階希釈した血清を、WTまたはD614G変異SARS2-Sシュードタイプウイルスのp24抗原1ngの等量と混合し、37°Cで1時間インキュベートした。この混合物を、ACE2とTMPRSS2を一過性に共発現させた293T細胞(96ウェルプレートに播種)に添加した。48時間後、細胞を溶解し、上述のようにルシフェラーゼアッセイを行い、中和のレベルを決定した。

#### 2-2-7. 統計分析

各値は、有効数を推定するためのパイロット実験に基づいて決定された3~7回の独立した実験の平均値±s.d.として示されている。データの統計分析は、GraphPad Prism version 8.04を用いて行った。統計比較は、two-tailed paired Student's t-test、unpaired Student's t-test または one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test を用いて行った。

## 2-3 結果

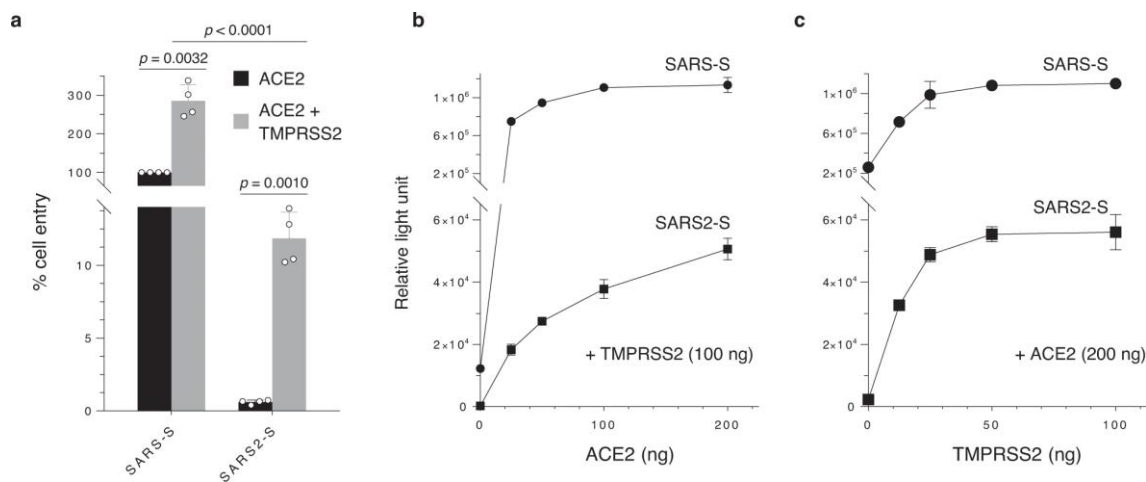
### 2-3-1 SARS2-S を介した細胞侵入は、TMPRSS2 の発現に強く依存する

S を介した細胞侵入を定量化するために、我々は細胞侵入の新しい定量システムを採用した。このシステムは、小さな発光ペプチドタグ HiBiT を組み込んだレンチウイルスベクターを作製することで確立したもので、ウイルス量を正確に定量することができる。このシステムにより、single-round replication assay<sup>27)</sup>での実験精度が向上した。このアッセイでは、直線スケールでの細胞侵入量のわずかな差が重要であり、そのような差は複数のウイルス複製サイクルで増幅される可能性がある。このシステムを用いて、まず、SARS-S の主要な受容体である ACE2 を発現している細胞において、SARS-CoV (Urbani 株) S または SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1 株) S をシュードタイプしたレンチウイルスの細胞侵入活性を調べた<sup>28)</sup>。SARS-S をシュードタイプしたレンチウイルスは、ACE2 を発現している 293T 細胞に効率よく侵入できたが、SARS2-S をシュードタイプ化したウイルスは、細胞への侵入効率が非常に低かった (図 S1)。この結果は、ACE2 の発現だけでは、SARS-CoV-2 の細胞侵入に寄与するには不十分であることを示唆している。

TMPRSS2 の発現が SARS-CoV と SARS-CoV-2 の両方の感染を促進するという報告が挙げられている<sup>25,26)</sup>ことから、次に、ACE2 と TMPRSS2 の共発現が SARS2-S シュードタイプのレンチウイルスの 293T 細胞への効率的な感染を仲介できるかどうかを検証した。その結果、ACE2 と TMPRSS2 を同時に発現させると、SARS2-S を介した細胞への感染が著しく促進される一方、SARS-S シュードウイルスの感染は適度に促進された (図 1a)。これらの結果は、SARS2-S の細胞侵入は、SARS-CoV よりも TMPRSS2 の共発現に強く依存していることを示しており、両者の細胞トロピズムがある程度異なっている可能性を示唆している。

それにもかかわらず、SARS-S と SARS2-S のシュードウイルスの間には、細胞への侵入性に約 25 倍の差が見られた (図 1a) ことから、SARS2-S はレンチウイルス粒子との適合性が低いのではないかという仮説が立てられた。様々なウイルスエンベロープのレンチウイルス適合性は、その細胞質尾部 (CT) ドメインによって決定されることが多くの文献で示されている<sup>33-35)</sup>。S タンパク質のこのドメイン (および膜貫通ドメイン) の配列を比較したところ、SARS2-S では、CT ドメインと TM ドメインに、それぞれ 1 つ (1247 番目のアラニン-システイン) と 2 つ (1216 番目のバリニン-イソロイシンと 1233 番目のロイシン-メチオニン) のアミノ酸の違いがあることがわかった (図 S2a)。そこで、SARS2-S C1247A 変異体と、SARS-S の TM/CT ドメインを保持したキメラ型 SARS2-S を作製した。すべての SARS2-S タンパク質は、同等のレベルの細胞侵入 (図 S2b) と実際のビリオンの取り込み (図 S2c) を示した。これらの結果から、SARS2-S シュードウイルスの細胞侵入率が著しく低かったのは、SARS2-S とレンチウイルスベクターとの間の不適合によるものではなく、むしろ SARS2-S タンパク質の本質的な性質によるものであることが示唆された。

SARS-S と SARS2-S タンパク質の違いをさらに評価するために、我々は次に、これらの S タンパク質が、細胞表面に存在する一定レベルの ACE2 や TMPRSS2 を利用する能力が異なるかどうかを調べた。一定量の ACE2 と様々なレベルの TMPRSS2 を発現する 293T 細胞にレンチウイルスを感染させたところ (図 1b,c)、SARS2-S による感染は、SARS-S よりも高いレベルの細胞表面 TMPRSS2 の発現を必要とし、最大レベルの細胞侵入を達成した。したがって、SARS2-S は本質的に十分なレベルの TMPRSS2 の発現を必要としていると考えられる。



**図.1 SARS2-S の細胞侵入は TMPRSS2 に強く依存している**

**a** HiBiT タグ付きレンチウイルスパッケージングプラスミド、ホタルルシフェラーゼレポーターレンチウイルストランスファープラスミド、および SARS-CoV S (SARS-S) または SARS-CoV-2 S (SARS2-S) 発現プラスミドのいずれかを 293T 細胞にトランスフェクションしてウイルスを調製した。ウイルス上清を HiBiT アッセイに供し、HiBiT 活性で定量した S シュードタイプのウイルスを用いて宿主受容体 ACE2 を単独で発現する 293T 細胞 (黒) または TMPRSS2 を共発現する 293T 細胞 (灰色) に感染させた。細胞侵入は、細胞溶解液中のホタルルシフェラーゼ活性によって決定した。4 回の実験から得られたデータを、ACE2 のみを発現する 293T 細胞への SARS-S シュードタイプのウイルスの細胞侵入率として示した (平均  $t$  値  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ )。p 値は、Student's  $t$ -test を用いて算出した。**b, c** ACE2 または TMPRSS2 の発現レベルが細胞侵入活性に及ぼす影響。293T 細胞に、ACE2 をコードする発現プラスミドを高レベルで一定に、TMPRSS2 発現プラスミドを高レベルと一緒にトランスフェクション (**b**)、またはその逆を行った (**c**)。トランスフェクションした細胞は、**a** で説明したように、SARS-S (丸) または SARS2-S (四角) のいずれかでシュードタイプしたレンチウイルスに感染させた。示されたデータは、3 つの独立した実験を代表するものである (平均値  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ )。

### 2-3-2. SARS2-S D614G は、S 自然変異の中で最も高い侵入効率を示す

次に、S タンパク質の自然発生的な変異が SARS-CoV-2 の細胞侵入に影響を与えるかどうかを、我々のアッセイシステムを用いて調べた。パンデミック当初の中国 (H49Y<sup>36</sup>)、欧州 (V367F<sup>37</sup>)、D614G<sup>38-40</sup>)、米国 (G476S、V483A<sup>37</sup>) で最初に同定された 5 種類の S 変異体を発現するプラスミドを作製し (図 2a)、S タンパク質の発現レベルとビリオンの組み込みを確認し (図 S3)、これらの変異が ACE2 と TMPRSS2 を発現する細胞への侵入に及ぼす影響を野生型 (WT) の S タンパク質と比較して調べた。これらの自然発生的な S 変異は、細胞への侵入が減少 (G476S)、同等 (V483A)、または促進 (D614G、V367F、H49Y) した。驚くべきことに、D614G 変異体は、今回調べた自然発生的な S タンパク質の中で最も高いレベルの侵入活性を示した (WT タンパク質の約 3.5 倍) (図 2b)。また、初代ヒト小気道上皮細胞においても、WT と D614G の S-シュードウイルスの間に同様の細胞侵入の違いが明確に観察された (図 S4)。これらの結果は、D614G 変異が世界的に急速に広まっているクレード A2a (G とも呼ばれる) を規定し、分離されたウイルスの大部分を占めていることから、特に重要であ



る 41-43)。

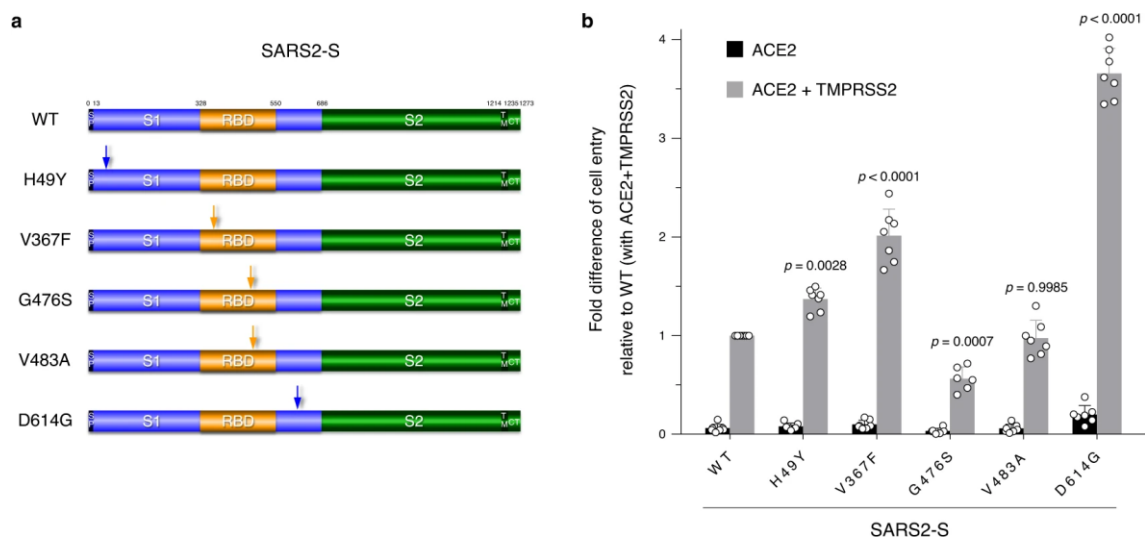
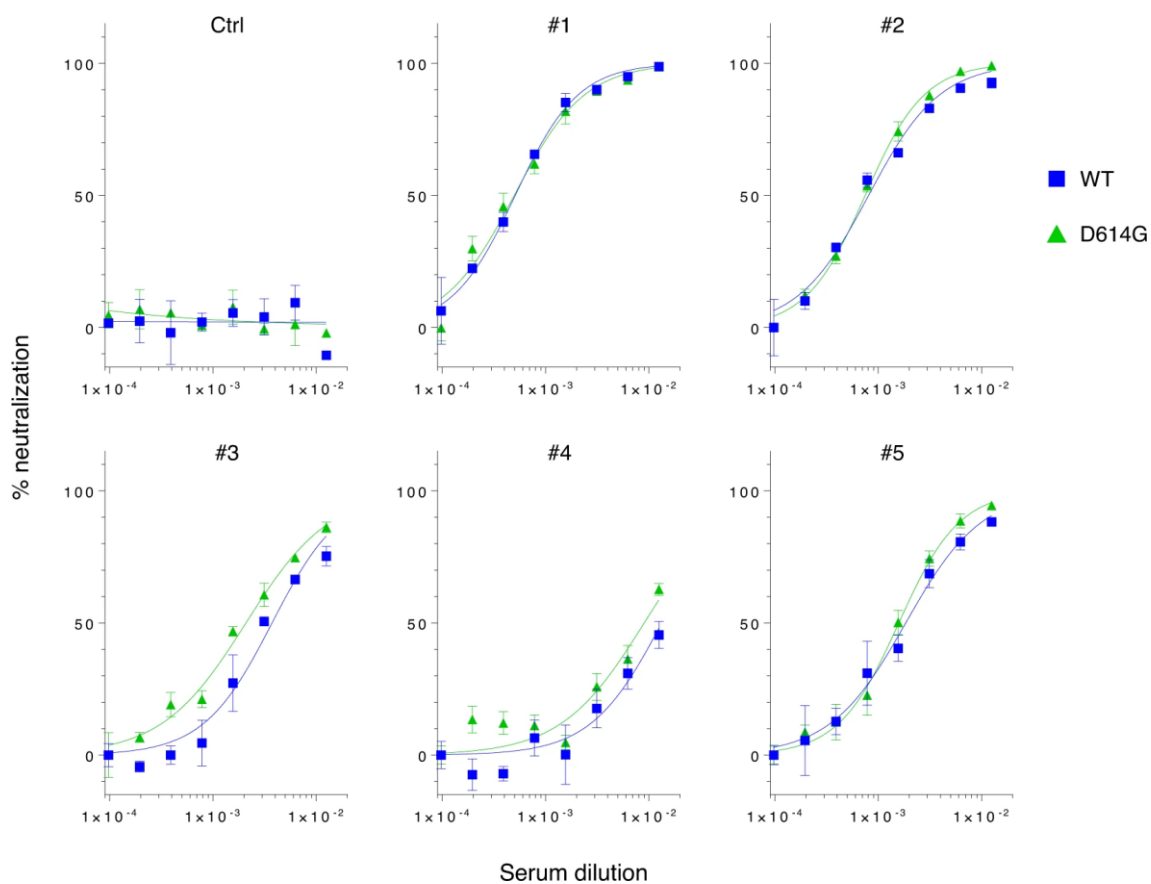


図 2. SARS2-S D614G タンパク質は、最も高いレベルのエントリー活性を示す

a 原型 (野生型、WT) とパンデミック当初の変異型 SARS2-S タンパク質の模式図。数字はアミノ酸の位置を示す。シグナルペプチド (Signal peptide ; SP)、膜貫通ドメイン (transmembrane domain ; TM)、細胞質尾部 (cytoplasmic tail ; CT)、S1 サブユニット (S1 subunit ; S1)、S2 サブユニット (S2 subunit ; S2)、受容体結合ドメイン (receptor binding domain ; RBD) を示す。  
b WT と変異型 SARS2-S タンパク質の侵入活性の機能比較。a に記載したように異なる S-シュードタイプのウイルスを調製し、宿主受容体 ACE2 を単独で発現している 293T 細胞 (黒) または TMPRSS2 を共発現している 293T 細胞 (灰色) への感染に使用した。細胞侵入は、細胞溶解液中のホタルルシフェラーゼ活性により決定した。データは、ACE2 と TMPRSS2 を共発現させた 293T 細胞への細胞侵入を WT と比較した場合の倍数の差で示した (7 回の独立した実験の平均値  $\pm$  S.D. (G476S の場合を除く、 $n=6$ ) ; one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test を用いて比較した。

### 2-3-3 D614G 変異体は、原型ウイルスに対する患者血清による中和感受性を維持する

D614G S タンパク質は WT タンパク質とは生物学的に異なることから、この突然変異が S タンパク質の抗原性に影響を与えているのではないかと考えた。この可能性を検討するために、中和試験を行い、抗 SARS-CoV-2 血清に対する WT および D614G S タンパク質の中和感受性を比較した。中和試験には、プロトタイプウイルスへの感染が確認された 5 人の患者と、健康なドナーから採取した対照血清を使用した。血清の濃度にかかわらず、抗 SARS-CoV-2 患者血清は、コントロール血清ではなく、SARS2-S の WT および D614G 変異タンパク質でシュードタイプ化された両ウイルスを効率よく中和した (図 3)。これらの結果から、SARS2-S タンパク質の D614G 変異は、抗 SARS2-S 抗体に対する中和感受性、すなわち抗原性そのものを維持していることが示された。



**図3. SARS-2 S の WT および D614G タンパク質は、患者の血清によって同様に中和される**  
 WT または D614G 変異体 SARS2-S のいずれかでシュードタイプ化したレンチウイルスを、健康なドナー (Ctrl) から得た、あるいは原型ウイルスに感染した確定症例患者 (#1~#5) から症状発現後 15~30 日目に採取した 2 倍段階希釈したヒト血清 (80 倍~10240 倍) で前培養した。この混合物を ACE2 と TMPRSS2 を共発現する 293T 細胞の感染に使用し、希釈した患者血清の存在下でのシュードウイルスの細胞侵入レベルをルシフェラーゼアッセイで測定した。独立した 2 つの実験の代表的なデータを中和率として示した (平均値±S.D.、n=3)。



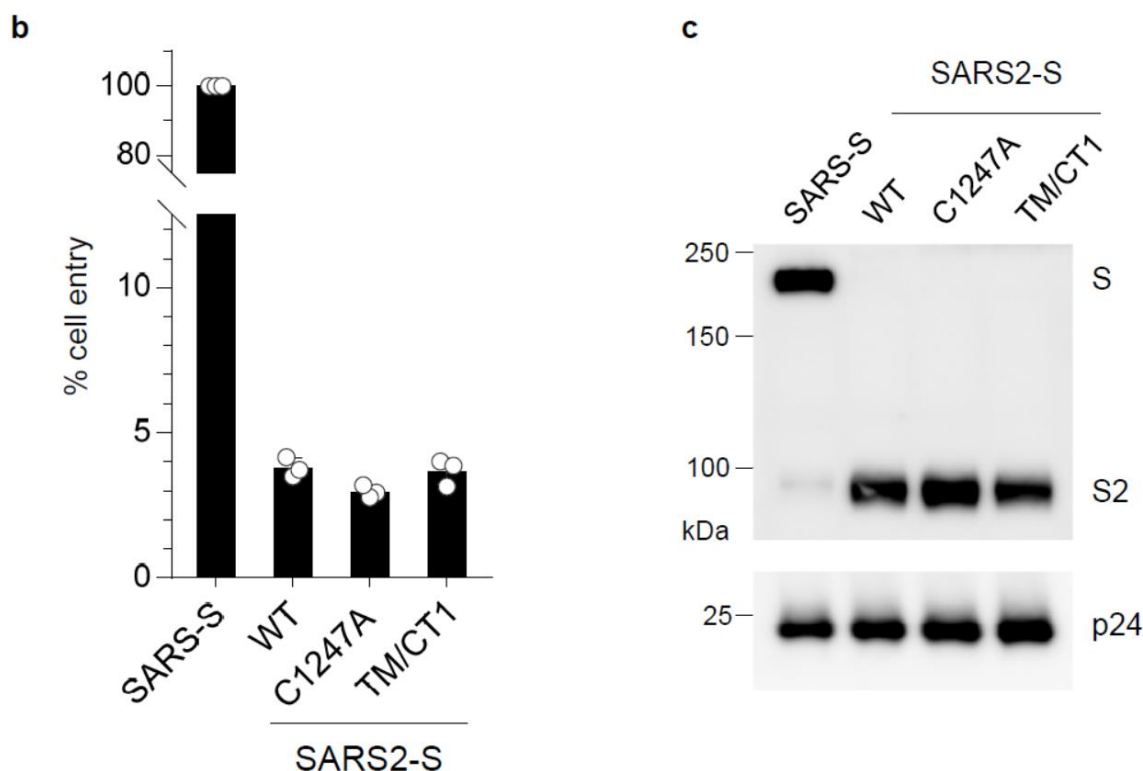


図 S2. SARS2-S を介した侵入が少ないのは、SARS2-S とレンチウイルスベクターの相性が悪い  
ためではない

(a) SARS-CoV (Urbani 株) および SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1 株) の S タンパク質の C 末端配列のアミノ酸配列アライメント。アミノ酸の違いをいくつかの色で囲んでいる (極性のある中性は緑、脂肪族・疎水性はオレンジ、芳香族・疎水性は紫、塩基性は赤、酸性は青)。EC ; 細胞外ドメイン、TM ; 膜貫通ドメイン、CT ; 細胞質尾部。SARS2-S-C1247A と SARS2-S TM/CT1 は、それぞれ CT のシステインをアラニンに変異させ (赤矢印で示す)、さらに TM のイソロイシンとメチオニンをバリンとロイシンに変異させた (青矢印で示す) ものである。

(b) SARS-S または SARS2-S (WT または変異体) でシュードタイプされたレンチウイルスの細胞侵入。293T 細胞に、HiBiT タグ付きレンチウイルスパッケージングプラスミド、ホタルルシフェラーゼレポーターレンチウイルストランスファープラスミド、および SARS2-S 野生型 (WT) タンパク質または 2 つの変異体 (SARS2-S-C1247A または SARS2-S-TM/CT1) のいずれかを発現するプラスミドをトランスフェクションした。産生されたウイルスを HiBiT アッセイで評価し、HiBiT 活性に基づいて正規化した S シュードタイプのウイルスを、ACE2 および TMPRSS2 を発現する 293T 細胞への感染に用いた。細胞侵入は、細胞溶解液中のホタルルシフェラーゼ活性によって決定した。3 回の実験から得られたデータを、SARS-S シュードタイプのウイルスの細胞侵入率として示した (平均値±S.D., n=3)。(c) SARS-S および SARS2-S タンパク質のウイルスへの取り込み。S-シュードタイプのレンチウイルスをペレット化し、p24 に対する抗体 (下) と、C 末端にタグ付けされた SARS-S または SARS2-S を検出する T7 エピトープタグ (上) を用いて、ウエスタンブロット解析を行った。示したデータは、2 つの独立した実験の代表である。なお、ビリオンに取り込まれた SARS2-S は宿主細胞のプロテアーゼによって完全に切断されるが、SARS-S は切断されずにバンドサイズが 2 倍になるため、これらの S タンパク質を直接比較することは困難である。

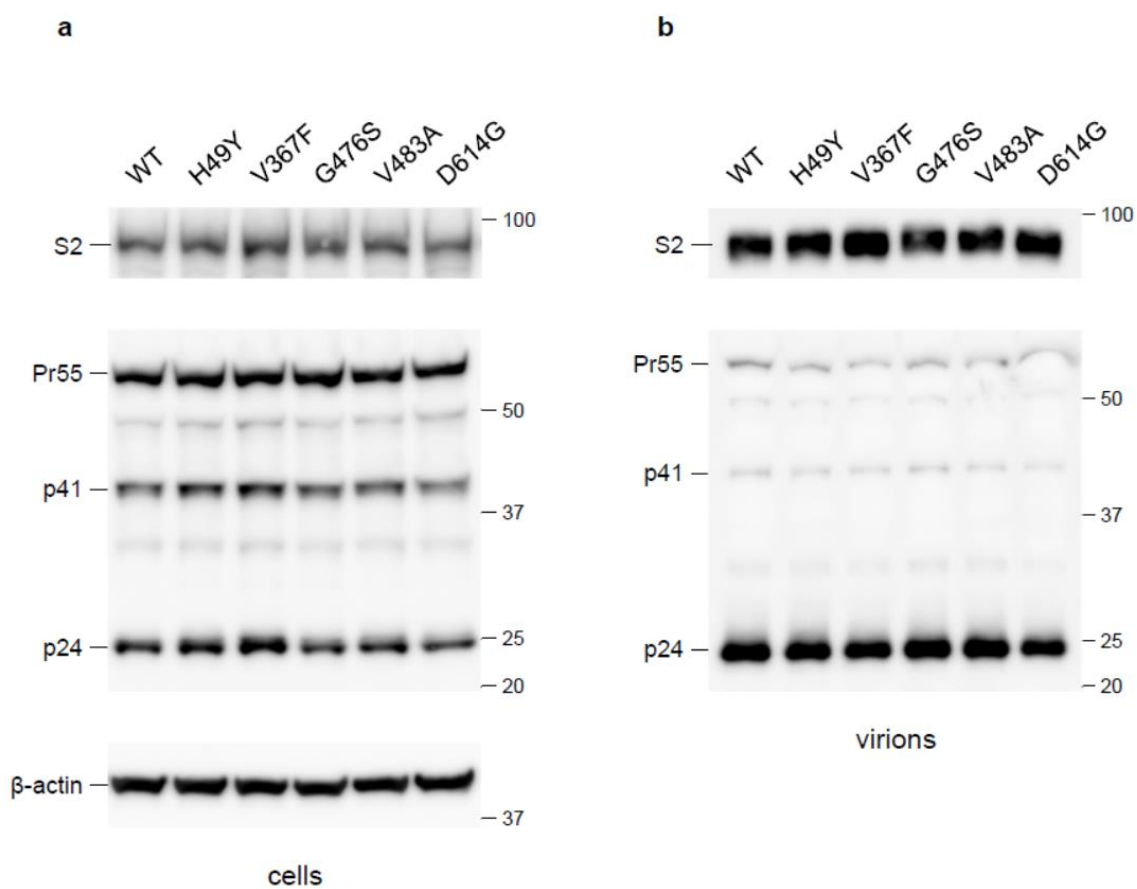
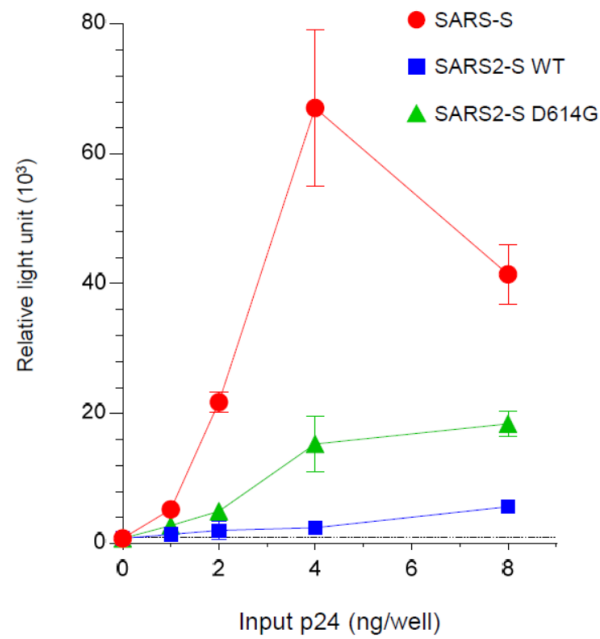


図 S3. SARS2-S の発現とビリオンへの取り込み

(a) トランスフェクションした 293T 細胞のライセート、または (b) 精製したレンチウイルス粒子を用いて行ったウエスタンブロット解析。S2 (上)、p24 (a の中央、b の下)、 $\beta$ -actin (a の下) に特異的な抗体を用いた。示したデータは 2 回の独立した実験の代表。



**図 S4. S シュードタイプのウイルスによるヒト小気道上皮細胞への感染**

初代ヒト小気道上皮細胞 ( $2 \times 10^4$ ) に、SARS-S (赤丸)、SARS2-S WT (青四角)、SARS2-S D614G 変異体 (緑三角) のいずれかでシュードタイプされたレンチウイルスの p24 抗原 (1、2、4、8 ng) を増量して感染させた。細胞侵入はルシフェラーゼアッセイによって決定した。2 回の独立した実験からの代表的なデータを、相対的な光量単位で示した (平均値  $\pm$  S.D.、 $n=2$ )。破線は、スパイクレスレンチウイルスによって生成されたネガティブコントロールバックグラウンドを示す。

表 1. DNA 構築で使したプライマー

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| ACE2-Acc-S                       | 5'-GGGGTACCATGTCAAGCTCTTCCTGGCTC-3'              |
| ACE2-Xho-A                       | 5'-CCGCTCGAGCTAAAAGGAGGTCTGAACATC-3'             |
| TMPRSS2-BsiW-S                   | 5'-ATCGTACGCCATGGCTTTGAACTCAGGGTCAC-3'           |
| TMPRSS2-Xho-A                    | 5'-CCGCTCGAGTTAGCCGTCTGCCCTCATTTG-3'             |
| SARS-S-BsiW-S                    | 5'-ATCGTACGCCATGTTTCATCTTCCTGCTGTTCCCT-3'        |
| SARS-S-Xho-A                     | 5'-CCGCTCGAGTTAGGTGTAGTGCAGTTTCACTCC-3'          |
| SARS2-S-Acc-S                    | 5'-GGGGTACCATGTTTGTGTTCCCTGGTGCT-3'              |
| SARS2-S-Not-A                    | 5'-ATTGGCGGCCGCTCTAGATCAGGTGTAGTGCAGTTTCCAC-3'   |
| SARS/SARS2-S-Xho-A for C-tagging | 5'-CCGCTCGAGGGTGTAGTGCAGTTTCACTC-3'              |
| SARS2-S-H49Y-S                   | 5'-GGTGTTCAAGTCTTCTGTGCTGTACAGCACCCAGG-3'        |
| SARS2-S-H49Y-A                   | 5'-CCTGGGTGCTGTACAGCACAGAAGACCTGAACACC-3'        |
| SARS2-S-V367F-S                  | 5'GGATTAGCAATTGTGTGGCTGACTACTCTTTCCTCTACAATC-3'  |
| SARS2-S-V367F-A                  | 5'GAGTTGTAGAGGAAAGAGTAGTCAGCCACACAATTGCTAATCC-3' |
| SARS2-S-G476S-S                  | 5'-GATTTACCAGGCTAGCAGCACACCGTGTAATGGAGTGG-3'     |
| SARS2-S-G476S-A                  | 5'-CCACTCCATTACACGGTGTGCTGCTAGCCTGGTAAATC-3'     |
| SARS2-S-V483A-S                  | 5'-TGTAATGGAGCGGAGGGCTTCAATTGTTACTTTC-3'         |
| SARS2-S-V483A-A                  | 5'-GAAAGTAACAATTGAAGCCCTCCGCTCCATTACA-3'         |
| SARS2-S-D614G-S                  | 5'-CTCTACCAGGGTGTGAACTGCACTGAGGTG-3'             |
| SARS2-S-D614G-A                  | 5'-CACCTCAGTGCAGTTCACACCCTGGTAGAG-3'             |
| SARS2-S-C1247A-S                 | 5'-GTCTGAAAGGCGCCTGTTCCTGTGG-3'                  |
| SARS2-S-C1247A-A                 | 5'-CCACAGGAACAGGCGCCTTTCAGAC-3'                  |
| SARS2-S-TM/CT1-S                 | 5'-CAAGTGGCCATGGTACGTATGGCTGGGCTTCATCG-3'        |
| SARS2-S-TM/CT1-A                 | 5'-CGATGAAGCCCAGCCATACGTACCATGGCCACTTG-3'        |

## 2-4 考察

本研究では、レンチウイルス擬似ウイルスの細胞侵入を定量化するために最近開発した新しい侵入アッセイシステム<sup>27)</sup>を採用した。このシステムでは、アッセイ中のHiBiTルシフェラーゼシグナルによって生成された高精度の標準曲線に基づいてウイルス投入量を正確に正規化することができるため、細胞侵入レベルを実験的に正確に決定することができる。我々はこのシステムを用いて、SARS2-Sによる細胞侵入はTMPRSS2の共発現に強く依存し、SARS-SではTMPRSS2がなくてもある程度は進行することを初めて示した。実際、SARS-CoV-2はACE2とTMPRSS2<sup>44)</sup>を共発現する呼吸器や腸管の細胞<sup>45,46)</sup>に効率的に感染するが、SARS-CoVはTMPRSS2がなくても、ACE2を発現する複数の臓器<sup>47)</sup>の様々な種類の細胞を標的とすることができると考えられる。また、SARS2-Sによる細胞侵入は、SARS-Sよりもかなり低いことがわかった(図1aおよび図S4)。これは、許容性の高いヒト腸管Caco2細胞において、SARS-CoVはSARS-CoV-2よりも1000倍以上効率的に複製するという最近の報告<sup>48)</sup>と一致する。なお、今回は代表的な1株から得られたSARS-Sを用いたが、これが今回の知見の限界である可能性もある。しかし、これらの知見は、SARS2-SがSARS-Sよりもヒト細胞への適応性が低い可能性を示唆しており、COVID-19の場合、無症候性感染が非常に高い理由の少なくとも一部を説明できるかもしれない。例えば、米国ワシントン州の介護施設での感染率は、56%

(56%; 48人中27人)<sup>49)</sup>、英国の医療従事者(57%; 30人中17人)<sup>50)</sup>では無症候性感染が非常に多く見られたのに対し、2003年に香港で発生したSARSでは非常に稀であった<sup>51)</sup>。

さらに重要なことに、D614G変異体は、今回比較したSARS2-Sタンパク質の中で最も高い侵入活性を示した(図2b)。1ラウンドのウイルス感染は、複数のウイルス複製サイクルの間に増幅されるため、このようなわずかに見える侵入活性の増加は、生体内でのウイルス感染性に大きな差をもたらす可能性がある。この結果は、D614G変異ウイルスがプロトタイプウイルスに比べてヒトからヒトへの感染力が高い可能性を示唆しているが、ウイルスの感染力とヒトへの感染力の相関関係については、さらなる調査が必要である。実際、D614G変異はクレードA2aを規定しており、ニューヨーク市でゲノム配列が確認された症例の87%(ある研究では84人中73人)、アイスランドでの症例の76%(577人中438人、ある研究ではA2a由来のハプロタイプを含む)、日本での最近の症例の大部分<sup>52)</sup>、イタリアでの症例のほぼすべて<sup>52)</sup>を占めるなど、圧倒的に世界的に広がっている。なお、A2aクレードが優勢であった欧州15カ国では、推定倍加時間が~3日以下と報告されており<sup>53)</sup>、中国の流行初期段階での初期推定値(6.4~7.4日)よりも大幅に短縮されている<sup>2,54)</sup>。

前述の結果から、D614G変異体はWT株とはウイルス学的な違いがあることが明らかとなった。これらの構造的な違いに関して、WT/変異体SARS2-SとSARS-Sの違いを解析するために、ACE2とこれらのSタンパク質との複合体モデルの構造予測を行っている<sup>55)</sup>。興味深いことに、SARS-Sの三量体はオープンコンフォメーションを示し、ACE2と特異的に相互作用する受容体結合ドメイン(RBD)の接触面積が大きくなっていた。このことは、SARS-SのRBDがSARS2-SよりもACE2に接近しやすいことにつながっていると考えられる。この結果は、SARS-CoV-2のSタンパク質がSARS-CoV S<sup>56)</sup>よりもACE2結合親和性が低いという最近の報告と一致する。また、SARS2-S変異体の構造は、細胞侵入の違いを反映している可能性が高く、WTタンパク質のS1サブユニットに位置する614位のアスパラギン酸残基(D614)をグリシン(G614)に変異させると、側鎖が短いために2つのプロトマー間に柔軟な空間ができる。そしてS1サブユニットがS2サブユニットからよりスムーズに分離できるようになり、さらにはS三量体の全体構造にコンフォメーションの柔軟性を与えることで、ACE2との親和性が向上する可能性があると考えられる。

また、バイオレイヤー干渉法を用いてACE2との結合親和性を変化させるかどうかを調べている<sup>55)</sup>。この実験ではD614Gタンパク質の三量体が、温度依存的にACE2タンパク質の二量体



との結合親和性を高めていることが明らかになった。この結果は、D614G 変異によって S タンパク質の空間的な柔軟性が誘導され、ACE2 との結合が強化されるという構造予測を反映していると考えられる。一方、表面プラズモン共鳴法を用いた実験では、D614G はむしろ ACE2<sup>57)</sup> との親和性を低下させることが示された。この違いは、異なるバージョンの S タンパク質（彼らの論文ではジプロリン、我々の研究ではヘキサプロリンの安定化変異を持つ）を用いたアッセイシステムの違いによるものと思われるので、この重要な問題を解決するにはさらなる調査が必要である。

いずれにしても、この変異が S タンパク質の抗原性を変化させているのではないかと考えられた。SARS2-S の WT と D614G 変異体は、シュードタイプウイルスを用いた中和試験の結果、確認されたすべての症例の原型ウイルスに対する血清に対して、同じように感受性を示した（図 3）。この結果は、S タンパク質に抗原性の変化がないため、抗 SARS-CoV-2 薬やワクチンの開発戦略に支障をきたさないという点で、特に重要である。ただし、細胞侵入アッセイを含むこれらの感染実験はすべて、レンチウイルスベクターを用いた S タンパク質シュードタイプのウイルスを使用して行われたため、今後の研究では SARS-CoV-2 生ウイルスを用いて感染実験を行うことで、得られた結果を再現する必要があることに留意する必要がある。さらに、我々が最初の論文を投稿した後、いくつかのグループが、同様に S タンパク質シュードタイプのウイルスを用いて感染実験を行い、D614G 変異ウイルスの感染力が増加していること<sup>52,57-60)</sup>、中和感受性が維持されていること<sup>57-59)</sup> を証明した。

このように、SARS が過去に流行したことがあるのに対し、COVID-19 が 100 年に一度のパンデミックとなった理由は、原因ウイルスである SARS-CoV-2 の、感染の最初のステップである重要なウイルスタンパク質である S タンパク質が、今回の研究で示されたように、細胞侵入活性が最適ではないレベルであることが少なくとも一因ではないかと推測される。したがって、この現象により、ヒトの間では時折、非効率的な複製が行われ、上述のように無症状の感染率が高くなると推測される。このような場合、知らずに感染した不顕性感染者は、最近報告されたように、他者に致死的な呼吸器疾患を引き起こす可能性のあるウイルス拡散者となる可能性がある<sup>49)</sup>。

その結果、プロトタイプは、ヒトからヒトへの継続的な感染の間に、D614G 変異を持つ A2a クレードに代表される、より広く普及した表現型を獲得し、おそらく世界的な感染速度が向上したのではないかと考えられる。このシナリオが正しいとすれば、我々が注意すべき致死性病原体は、明らかに致死性のウイルスではなく、このような特徴を持つ病原体であると考えられる。今回のケースでは、この突然変異は S タンパク質の抗原性に影響を与えていないと考えられるが、ヒト集団における SARS-CoV-2 のウイルス学的変化については、さらに世界中で監視する必要があるかもしれない。

## 2-5. 要約

COVID-19 パンデミックの原因となった SARS-CoV-2 は、ヒトの間で継続的に感染する間に着実に変異している。このような変異は、ACE2 受容体に結合し、TMPRSS2 によって切断されるスパイク (S) タンパク質に生じる可能性がある。しかし、S タンパク質の変異が SARS-CoV-2 の細胞侵入に影響を与えるかどうかはまだ不明であった。本研究では、シュードタイプレンチウイルスの細胞侵入を定量化するために最近開発した新しい侵入アッセイシステムを採用した。このシステムでは、アッセイ中の HiBiT ルシフェラーゼシグナルによって生成された高精度の標準曲線に基づいてウイルス量を正確に正規化することができるため、細胞侵入レベルを実験的に正確に決定することができる。自然に生じた S タンパク質の変異が、ACE2 と TMPRSS2 を介した細胞侵入を抑制または促進することを示した。SARS-CoV-2 S シュードタイプのレンチウイルスは、SARS-CoV S に比べて細胞侵入性が大幅に低かった。S 変異体の中では、D614G 変異体が最も高い細胞侵入性を示すことが明らかとなった。しかし、D614G 変異体は、原型ウイルスに対する抗血清による中和には影響しなかった。以上のことから、D614G 変異体は、中和感受性を維持したまま細胞侵入性を高めていると結論づけた。これらの知見に基づき、SARS-CoV-2 のヒトへの感染性を理解するためには、さらなる世界規模の調査が必要である。

## 参考文献

1. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., Zhang, Y. Z.: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020;579(7798):265-9.
2. Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K. S. M., Lau, E. H. Y., Wong, J. Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., Tu, W., Chen, C., Jin, L., Yang, R., Wang, Q., Zhou, S., Wang, R., Liu, H., Luo, Y., Liu, Y., Shao, G., Li, H., Tao, Z., Yang, Y., Deng, Z., Liu, B., Ma, Z., Zhang, Y., Shi, G., Lam, T. T. Y., Wu, J. T., Gao, G. F., Cowling, B. J., Yang, B., Leung, G. M., Feng, Z.: Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med* 2020;382(13): 1199–1207.
3. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., Cao, B.: Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395(10223): 497–506.
4. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X. S., Zhao, K., Chen, Q. J., Deng, F., Liu, L. L., Yan, B., Zhan, F. X., Wang, Y. Y., Xiao, G. F., Shi, Z. L.: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579(7798): 270–3.
5. Perlman, S., Netland, J.: Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(6): 439-50.
6. Brian, D. A., Baric, R. S.: Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;287: 1-30.
7. Hamre, D., Procknow, J. J.: A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;121(1): 190-3.
8. McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M.: Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967;57(4): 933-40.
9. Tyrrell, D. A., Bynoe, M. L.: Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. *Br Med J* 1965;1(5448): 1467-70.
10. van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B.: Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10(4): 368-73.
11. Woo, P. C., Lau, S. K., Tsoi, H. W., Huang, Y., Poon, R. W., Chu, C. M., Lee, R. A., Luk, W. K., Wong, G. K., Wong, B. H., Cheng, V. C., Tang, B. S., Wu, A. K., Yung, R. W., Chen, H., Guan, Y., Chan, K. H., Yuen, K. Y.: Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 2005; 192(11): 1898-907.
12. Pyrc, K., Berkhout, B., van der Hoek, L.: The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol* 2007; 81(7): 3051-7.
13. Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A. M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H., Doerr, H. W.: Identification of a novel

- coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348(20): 1967-76.
14. Fouchier, R. A., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G. J., van den Hoogen, B. G., Peiris, M., Lim, W., Stohr, K., Osterhaus, A. D.: Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 2003;423(6937): 240.
  15. Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M., LeDuc, J. W., Bellini, W. J., Anderson, L. J., Sars Working Group: A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348(20): 1953-66.
  16. Kuiken, T., Fouchier, R. A., Schutten, M., Rimmelzwaan, G. F., van Amerongen, G., van Riel, D., Laman, J. D., de Jong, T., van Doornum, G., Lim, W., Ling, A. E., Chan, P. K., Tam, J. S., Zambon, M. C., Gopal, R., Drosten, C., van der Werf, S., Escriou, N., Manuguerra, J. C., Stohr, K., Peiris, J. S., Osterhaus, A. D.: Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;362(9380): 263-70.
  17. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D., Fouchier, R. A.: Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012;367(19): 1814-20.
  18. World Health Organization.: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (Mers-cov)—Saudi Arabia. Available online: <http://www.who.int/csr/don/07-november-2014-mers/en/> (accessed on 1 December 2014).
  19. Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Cramer, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S., Wang, L. F.: Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 2005;310(5748): 676-9.
  20. Hemida, M. G., Perera, R. A., Wang, P., Alhammadi, M. A., Siu, L. Y., Li, M., Poon, L. L., Saif, L., Alnaeem, A., Peiris, M.: Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus seroprevalence in domestic livestock in Saudi Arabia, 2010 to 2013. *Euro Surveill* 2013;18(50): 20659.
  21. Azhar, E. I., El-Kafrawy, S. A., Farraj, S. A., Hassan, A. M., Al-Saeed, M. S., Hashem, A. M., Madani, T. A.: Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med* 2014;370(26): 2499-505.
  22. Heald-Sargent, T., Gallagher, T.: Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses* 2012; 4(4):557-80.
  23. Li, F.: Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antiviral Res* 2013;100(1):246-54.
  24. Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., Whittaker, G. R.: Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 2012;4(6): 1011-33.
  25. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Kruger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Muller, M. A., Drosten, C., Pohlmann, S.: SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020;181(2): 271–280.
  26. Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K., Kawase, M., Saito, S., Takayama, I., Nagata, N., Sekizuka, T., Katoh, H., Kato, F., Sakata, M., Tahara, M., Kutsuna, S., Ohmagari, N., Kuroda, M., Suzuki, T., Kageyama, T., Takeda, M.: Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2 expressing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117(13): 7001–7003.
  27. Ozono, S., Zhang, Y., Tobiume, M., Kishigami, S., Tokunaga, K.: Super-rapid quantitation of the

- production of HIV-1 harboring a luminescent peptide tag. *J Biol Chem* 2020;295(37), 13023–30.
28. Li, W. Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., Farzan, M.: Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003;426(6965): 450–54.
  29. Haga, S., Yamamoto, N., Nakai-Murakami, C., Osawa, Y., Tokunaga, K., Sata, T., Yamamoto, N., Sasazuki, T., Ishizaka, Y.: Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2008;105(22): 7809–14.
  30. Yang, Z. Y., Huang, Y., Ganesh, L., Leung, K., Kong, W. P., Schwartz, O., Subbarao, K., Nabel, G. J.: pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J Virol* 2004;78(11):5642–50.
  31. Niwa, H., Yamamura, K., Miyazaki, J.: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991;108(2):193–99.
  32. Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., Fujita, H., Tokunaga, K.: MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat Med* 2015;21(12):1502–07.
  33. Piller, S. C., Dubay, J. W., Derdeyn, C. A., Hunter, E.: Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity. *J Virol* 2000;74(24):11717–23.
  34. Witting, S. R., Vallanda, P. & Gamble, A. L. Characterization of a third generation lentiviral vector pseudotyped with Nipah virus envelope proteins for endothelial cell transduction. *Gene Ther* 2013; 20: 997–1005.
  35. Christodoulopoulos, I., Cannon, P. M.: Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J Virol* 2001;75(9), 4129–38.
  36. Wei, X., Li, X., Cui, J.: Evolutionary perspectives on novel coronaviruses identified in pneumonia cases in China. *Natl Sci Rev* 2020;7(2):239–42.
  37. Ou, J., Zhou, Z., Dai, R., Zhang, J., Zhao, S., Wu, X., Lan, W., Ren, Y., Cui, L., Lan, Q., Lu, L., Seto, D., Chodosh, J., Wu, J., Zhang, G., Zhang, Q.: V367F Mutation in SARS-CoV-2 Spike RBD Emerging during the Early Transmission Phase Enhances Viral Infectivity through Increased Human ACE2 Receptor Binding Affinity. *J Virol* 2021;95(16): e00617-21.
  38. Zehender, G., Lai, A., Bergna, A., Meroni, L., Riva, A., Balotta, C., Tarkowski, M., Gabrieli, A., Bernacchia, D., Rusconi, S., Rizzardini, G., Antinori, S., Galli, M.: Genomic characterization and phylogenetic analysis of SARS-COV-2 in Italy. *J Med Virol* 2020;92(9): 1637–40.
  39. Gambaro, F., Behillil, S., Baidaliuk, A., Donati, F., Albert, M., Alexandru, A., Vanpeene, M., Bizard, M., Brisebarre, A., Barbet, M., Derrar, F., van der Werf, S., Enouf, V., Simon-Loriere, E.: Introductions and early spread of SARS-CoV-2 in France, 24 January to 23 March 2020. *Euro Surveill* 2020;25(26)
  40. Diez-Fuertes, F., Iglesias-Caballero, M., Garcia-Perez, J., Monzon, S., Jimenez, P., Varona, S., Cuesta, I., Zaballos, A., Jimenez, M., Checa, L., Pozo, F., Perez-Olmeda, M., Thomson, M. M., Alami, J., Casas, I.: A Founder Effect Led Early SARS-CoV-2 Transmission in Spain. *J Virol* 2021;95(3): e01583-20.
  41. Gudbjartsson, D. F., Gudbjartsson, D. F., Helgason, A., Jonsson, H., Magnusson, O. T., Melsted, P., Norddahl, G. L., Saemundsdottir, J., Sigurdsson, A., Sulem, P., Agustsdottir, A. B., Eiriksdottir, B.,

- Fridriksdottir, R., Gardarsdottir, E. E., Georgsson, G., Gretarsdottir, O. S., Gudmundsson, K. R., Gunnarsdottir, T. R., Gylfason, A., Holm, H., Jensson, B. O., Jonasdottir, A., Jonsson, F., Josefsson, K. S., Kristjansson, T., Magnusdottir, D. N., le Roux, L., Sigmundsdottir, G., Sveinbjornsson, G., Sveinsdottir, K. E., Sveinsdottir, M., Thorarensen, E. A., Thorbjornsson, B., Love, A., Masson, G., Jonsdottir, I., Moller, A. D., Gudnason, T., Kristinsson, K. G., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K.: Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. *N Engl J Med* 2020;382(24): 2302–15.
42. Leary, S., Gaudieri, S., Parker, M. D., Chopra, A., James, I., Pakala, S., Alves, E., John, M., Lindsey, B. B., Keeley, A. J., Rowland-Jones, S. L., Swanson, M. S., Ostrov, D. A., Bubenik, J. L., Das, S., Sidney, J., Sette, A., Covid- Genomics UK consortium, de Silva, T. I., Phillips, E., Mallal, S.: Generation of a novel SARS-CoV-2 sub-genomic RNA due to the R203K/G204R variant in nucleocapsid: homologous recombination has potential to change SARS-CoV-2 at both protein and RNA level. Preprint at bioRxiv 2021; <https://doi.org/10.1101/2020.04.10.029454>
43. Gonzalez-Reiche, A. S., Hernandez, M. M., Sullivan, M. J., Ciferri, B., Alshammary, H., Obla, A., Fabre, S., Kleiner, G., Polanco, J., Khan, Z., Albuquerque, B., van de Guchte, A., Dutta, J., Francoeur, N., Melo, B. S., Oussenko, I., Deikus, G., Soto, J., Sridhar, S. H., Wang, Y. C., Twyman, K., Kasarskis, A., Altman, D. R., Smith, M., Sebra, R., Aberg, J., Krammer, F., Garcia-Sastre, A., Luksza, M., Patel, G., Paniz-Mondolfi, A., Gitman, M., Sordillo, E. M., Simon, V., van Bakel, H.: Introductions and early spread of SARS-CoV-2 in the New York City area. *Science* 2020;369(6501): 297–301.
44. Sungnak, W., Huang, N., Becavin, C., Berg, M., Queen, R., Litvinukova, M., Talavera-Lopez, C., Maatz, H., Reichart, D., Sampaziotis, F., Worlock, K. B., Yoshida, M., Barnes, J. L., H. C. A. Lung Biological Network.: SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med* 2020;26(5): 681–87.
45. Lamers, M. M., Beumer, J., van der Vaart, J., Knoops, K., Puschhof, J., Breugem, T. I., Ravelli, R. B. G., Paul van Schayck, J., Mykytyn, A. Z., Duimel, H. Q., van Donselaar, E., Riesebosch, S., Kuijpers, H. J. H., Schipper, D., van de Wetering, W. J., de Graaf, M., Koopmans, M., Cuppen, E., Peters, P. J., Haagmans, B. L., Clevers, H.: SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science* 2020;369(6499): 50–54.
46. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., China Novel Coronavirus Investigating Research, Team : A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020;382(8): 727–33.
47. Gu, J., Korteweg, C.: Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am J Pathol* 2007;170(4): 1136–47.
48. To, K. K., Tsang, O. T., Leung, W. S., Tam, A. R., Wu, T. C., Lung, D. C., Yip, C. C., Cai, J. P., Chan, J. M., Chik, T. S., Lau, D. P., Choi, C. Y., Chen, L. L., Chan, W. M., Chan, K. H., Ip, J. D., Ng, A. C., Poon, R. W., Luo, C. T., Cheng, V. C., Chan, J. F., Hung, I. F., Chen, Z., Chen, H., Yuen, K. Y.: Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2020;20(5): 565–74.
49. Arons, M. M., Hatfield, K. M., Reddy, S. C., Kimball, A., James, A., Jacobs, J. R., Taylor, J., Spicer, K., Bardossy, A. C., Oakley, L. P., Tanwar, S., Dyal, J. W., Harney, J., Chisty, Z., Bell, J. M., Methner, M., Paul, P., Carlson, C. M., McLaughlin, H. P., Thornburg, N., Tong, S., Tamin, A., Tao, Y., Uehara, A., Harcourt, J., Clark, S., Brostrom-Smith, C., Page, L. C., Kay, M., Lewis, J., Montgomery, P., Stone, N. D., Clark, T. A., Honein, M. A., Duchin, J. S., Jernigan, J. A., Public, Health-Seattle, King,

- County, Cdc Covid- Investigation Team.: Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med* 2020;382(22): 2081–90.
50. Rivett, L., Sridhar, S., Sparkes, D., Routledge, M., Jones, N. K., Forrest, S., Young, J., Pereira-Dias, J., Hamilton, W. L., Ferris, M., Torok, M. E., Meredith, L., Citiid-Nihr Covid- BioResource Collaboration, Curran, M. D., Fuller, S., Chaudhry, A., Shaw, A., Samworth, R. J., Bradley, J. R., Dougan, G., Smith, K. G., Lehner, P. J., Matheson, N. J., Wright, G., Goodfellow, I. G., Baker, S., Weekes, M. P.: Screening of healthcare workers for SARS-CoV-2 highlights the role of asymptomatic carriage in COVID-19 transmission. *Elife* 2020;9: e58728.
  51. Leung, G. M., Chung, P. H., Tsang, T., Lim, W., Chan, S. K., Chau, P., Donnelly, C. A., Ghani, A. C., Fraser, C., Riley, S., Ferguson, N. M., Anderson, R. M., Law, Y. L., Mok, T., Ng, T., Fu, A., Leung, P. Y., Peiris, J. S., Lam, T. H., Hedley, A. J.: SARS-CoV antibody prevalence in all Hong Kong patient contacts. *Emerg Infect Dis* 2004;10(9): 1653–56.
  52. Hu, J., He, C. L., Gao, Q. Z., Zhang, G. J., Cao, X. X., Long, Q. X., Deng, H. J., Huang, L. Y., Chen, J., Wang, K., Tang, N., Huang, A. L.: D614G mutation of SARS-CoV-2 spike protein enhances viral infectivity. Preprint at bioRxiv 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.06.20.161323>
  53. Pellis, L., Scarabel, F., Stage, H. B., Overton, C. E., Chappell, L. H. K., Fearon, E., Bennett, E., Lythgoe, K. A., House, T. A., Hall, I., University of Manchester, Covid-Modelling Group: Challenges in control of COVID-19: short doubling time and long delay to effect of interventions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2021;376 (1829): 20200264.
  54. Wu, J. T., Leung, K., Leung, G. M.: Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet* 2020;395(10225): 689–697.
  55. Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Sano, K., Tan, T. S., Imai, K., Miyoshi, K., Kishigami, S., Ueno, T., Iwatani, Y., Suzuki, T., Tokunaga, K.: SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nat Commun* 2021;12(1): 848.
  56. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., Li, F.: Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117(21): 11727–11734.
  57. Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, K. E., Tomkins-Tinch, C., Nyalile, T. P., Wang, Y., Baum, A., Diehl, W. E., Dauphin, A., Carbone, C., Veinotte, K., Egri, S. B., Schaffner, S. F., Lemieux, J. E., Munro, J. B., Rafique, A., Barve, A., Sabeti, P. C., Kyratsous, C. A., Dudkina, N. V., Shen, K., Luban, J.: Structural and functional analysis of the D614G SARSCoV- 2 spike protein variant. *Cell* 2020;183(3): 739–751.e738.
  58. Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., Ojha, A., Peng, H., Quinlan, B. D., Rangarajan, E. S., Pan, A., Vanderheiden, A., Suthar, M. S., Li, W., IZard, T., Rader, C., Farzan, M., Choe, H.: SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat Commun* 2020;11(1): 6013.
  59. Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., de Silva, T. I., Sheffield, Covid-Genomics Group, McDanal, C., Perez, L. G., Tang, H., Moon-Walker, A., Whelan, S. P., LaBranche, C. C., Saphire, E. O., Montefiori, D. C.: Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell* 2020;182(4): 812–827.e819.
  60. Daniloski, Z., Jordan, T. X., Ilmain, J. K., Guo, X., Bhabha, G., tenOever, B. R., Sanjana, N. E.: The Spike D614G mutation increases SARS-CoV-2 infection of multiple human cell types. *Elife* 2021;10.

## 総 括

### 第 1 章 HiBiT ペプチドタグを利用した超迅速 HIV-1 定量系の樹立

HIV-1 の研究では、通常、逆転写酵素法または p24 抗原捕捉 ELISA 法のいずれかによってウイルスの産生をモニターしている。しかし、これらのアッセイは、多数の HIV-1 サンプルを日常的に取り扱うにはコストと時間を要する。例えば、ELISA 法では検出可能な濃度の範囲が非常に狭いため、p24 タンパク質レベルを測定するためには常にサンプルの希釈が必要となる。ここでは、HiBiT と呼ばれる最近開発された小さなペプチドタグを使用することで、前述の問題を解決する新しい HIV-1 生産アッセイシステムを確立した。このペプチドは、NanoLuc ルシフェラーゼの断片であり、残りのサブユニットと相補的に結合すると強い発光シグナルを発生する。この技術を採用するために、新規の完全長プロウイルス HIV-1 DNA クローンと、インテグラーゼの C 末端に HiBiT タグを付加したレンチウイルスパッケージングベクターを構築した。インテグラーゼに HiBiT タグを付加しても、ウイルスの産生、感染性、インテグラーゼ阻害剤への感受性に影響はなかった。次に、抗ウイルス宿主因子 APOBEC3G (A3G) を発現する初代細胞で複製アッセイを行うためには、Luc2-IN/HiBiT ウイルスにおける Vif の機能が損なわれていないことを確認する必要がある。これは、IN ORF の C 末端と重なる Vif の N 末端配列に、HiBiT タグ由来の無関係なアミノ酸配列が挿入されていたためである。A3G を発現させると、Luc2-IN/HiBiT ウイルスの感染力は NL-Luc2- F(-)ウイルスのレベルまで著しく低下した。これは、Luc2-IN/HiBiT ウイルスの Vif タンパク質が抗 A3G 活性を欠いていることを示している。HiBiT タグによって塩基配列が切断された Vif の失われた機能を救済し、この pNL-Luc2-IN/HiBiT-E(-)Fin と名付けた構築物をトランスフェクションした細胞から産生された VSV-G シュードタイプの Luc2-IN/HiBiT-Fin ウイルスの感染性を調べたところ、A3G に対して完全な耐性を示し、結果として得られたウイルスが期待された Vif 活性を獲得したことが示された。Env-intact の完全長バージョンのウイルスが CD4 陽性 T 細胞へ感染させるために、pNL4-3 ベースの IN/HiBiT-Fin プロウイルスクローン (pNL-IN/HiBiT-Fin) を作製した。PHA-IL-2 で刺激した初代 CD4 陽性 T 細胞に、WT または IN/HiBiT-Fin のウイルスを感染させた後、上清中の p24 産生レベルを測定することでウイルスの複製を比較したところ、IN/HiBiT-Fin ウイルスの複製は親ウイルスに比べて遅れただけであり、IN/HiBiT-Fin ウイルスが複製能力を持つことが確認された。以上から、IN の C 末端に N 末端の vif 配列を加えることで、抗 A3G 活性が付与され、その結果、初代 CD4 陽性 T 細胞において効率的にウイルスが複製されることが示された。

最も重要なことは、ELISA と HiBiT ルシフェラーゼアッセイを比較することで、p24 濃度と HiBiT ベースのルシフェラーゼ活性の間に優れた線形相関を得ることに成功したことである。以上のことから、HiBiT タグ付きウイルスは、親ウイルスである HIV-1 とレンチウイルスベクターを置き換えることができ、HIV-1/レンチウイルス生産のための、超高速、安価、簡便、高精度な定量的アッセイを行うことができると結論づけた。このシステムは、将来の抗ウイルス剤の候補をスクリーニングするとともに、様々なウイルス学的研究に広く応用することができる。

### 第 2 章 HiBiT ペプチドタグを有するレンチウイルスベクター系を用いた COVID-19 研究への応用

コロナウイルス 2019 (COVID-19) パンデミックの原因ウイルスである重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は、ヒトの間で継続的に感染する間に着実に変異している。このような変異は、アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) 受容体に結合し、膜貫通型プロ



テアーゼセリン 2 (TMPRSS2) によって切断されるスパイク (S) タンパク質に生じる可能性がある。しかし、S の突然変異が SARS-CoV-2 の感染力に影響を与えるかどうかは、まだ不明であった。本研究では、シュードタイプレンチウイルスの細胞侵入を定量化するために最近開発した新しい侵入アッセイシステムを採用した。このシステムでは、アッセイ中の HiBiT ルシフェラーゼシグナルによって生成された高精度の標準曲線に基づいてウイルス量を正確に正規化することができるため、細胞侵入レベルを実験的に正確に決定することができる。このシステムを用いて、まず、SARS-S の主要な受容体である ACE2 を発現している細胞において、SARS-CoV (Urbani 株) S または SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1 株 S をシュードタイプしたレンチウイルスの細胞侵入活性を調べた。その結果、ACE2 の発現だけでは、SARS-CoV-2 の細胞侵入に寄与するには不十分であることを示唆した。

次に、ACE2 と TMPRSS2 の共発現が SARS2-S シュードタイプのレンチウイルスの 293T 細胞への効率的な感染を仲介できるかどうかを検証した。その結果、ACE2 と TMPRSS2 を同時に発現させると、SARS2-S を介した細胞への感染が著しく促進される一方、SARS-S シュードウイルスの感染は適度に促進された。それにもかかわらず、SARS-S と SARS2-S のシュードウイルスの間には、細胞への侵入性に約 25 倍の差が見られたことから、SARS2-S はレンチウイルス粒子との適合性が低いのではないかという仮説が立てられた。様々なウイルスエンベロープのレンチウイルス適合性は、その CT ドメインによって決定されることが多くの文献で示されている。S タンパク質のこのドメイン (および TM ドメイン) の配列を比較したところ、SARS2-S では、CT ドメインと TM ドメインに、それぞれ 1 つ (1247 番目のアラニン-システイン) と 2 つ (1216 番目のバリン-イソロイシンと 1233 番目のロイシン-メチオニン) のアミノ酸の違いがあることがわかった。そこで、SARS2-S C1247A 変異体と、SARS-S の TM/CT ドメインを保持したキメラ型 SARS2-S を作製した。すべての SARS2-S タンパク質は、同等のレベルの細胞侵入と実際のビリオンの取り込みを示した。これらの結果から、SARS2-S シュードウイルスの細胞侵入率が著しく低かったのは、SARS2-S とレンチウイルスベクターとの間の不適合によるものではなく、むしろ SARS2-S タンパク質の本質的な性質によるものであることが示唆された。SARS-S と SARS2-S タンパク質の違いをさらに評価するために、我々は次に、これらの S タンパク質が、細胞表面に存在する一定レベルの ACE2 や TMPRSS2 を利用する能力が異なるかどうかを調べた。一定量の ACE2 と様々なレベルの TMPRSS2 を発現する 293T 細胞にレンチウイルスを感染させたところ、SARS2-S による感染は、SARS-S よりも高いレベルの細胞表面 TMPRSS2 の発現を必要とし、最大レベルの細胞侵入を達成した。したがって、SARS2-S は本質的に十分なレベルの TMPRSS2 の発現を必要としていると考えられる。S 変異体の中では、D614G 変異体が最も高い細胞侵入性を示すことが示唆された。この変異が S タンパク質の抗原性を変化させているのではないかと考えられた。SARS2-S の WT と D614G 変異体は、シュードタイプウイルスを用いた中和試験の結果、確認されたすべての症例の原型ウイルスに対する血清に対して、同じように感受性を示した。この結果は、S タンパク質に抗原性の変化がないため、抗 SARS-CoV-2 薬やワクチンの開発戦略に支障をきたさないという点で、特に重要である。以上を含めた結果から、D614G 変異体は、中和感受性を維持したまま、ウイルスの感染力を高めていることが明らかになった。

## 謝 辞

本研究の遂行ならびに論文を取りまとめるにあたり、終始懇切丁寧なるご指導とご教示を賜りました国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官・山梨大学客員教授 徳永 研三先生に心から感謝の意を表します。

本研究の遂行ならびに論文の作製にあたり、終始ご指導いただき、有益な助言を賜りました山梨大学大学院 総合研究部 生命環境学域教授 岸上 哲士先生に心から御礼申し上げます。

学位審査にあたりご指導とご鞭撻を賜りました、山梨大学大学院 総合研究部 生命環境学域教授 若山 照彦先生、同教授 幸田 尚先生、同准教授 中川 洋史先生に深く感謝いたします。

研究環境を与えてくださった、国立感染症研究所 感染病理部 前部長 長谷川 秀樹先生（現インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター長）、現部長 鈴木 忠樹先生に厚く御礼申し上げます。

本研究において、ご協力を賜りました名古屋医療センター臨床研究センター 感染・免疫研究部長 岩谷 靖雅先生、同研究員 大出 裕高先生、熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター 教授 上野 貴将先生、同大学院生 Tan Toong seng 氏、自衛隊中央病院 今井 一男先生、三好 和康先生、国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官 飛梅 実先生、協力研究員 張 延昭先生、前研究官 佐野 芳先生（現マウントサイナイ医科大学 微生物学部門）に深く感謝いたします。

研究室において、様々な協力をしていただいた国立感染症研究所感染病理部の先生・研究生諸氏ならびに山梨大学生命環境学部生命工学科および同大学院医工農学総合教育部の卒業生・在校生諸氏に感謝いたします。