

助成の種類： 研究助成

研究テーマ： ユビキチン化によるコロナウイルス感染制御機構の解明

氏名： 金子 雅幸

所属： 長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 創薬薬理学分野

研究の目的

現在、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）のウイルス SARS-Cov-2 が世界中で感染拡大し、人命と経済に甚大な被害をもたらされている。現在の対策としてファイザー社やモデルナ社が開発した SARS-CoV-2 のスパイク蛋白質のメッセンジャー RNA ワクチンを接種しているが、接種後数か月で発症予防効果が低下したり、変異株の発生したりすることによりワクチンを複数回接種した人でも感染が相次いでいる。一方、治療薬ではレムデシビル（一本鎖 RNA ポリメラーゼ阻害剤）、バリシチニブ（JAK 阻害剤）、カシリビマブ・イムデビマブ・ソトロビマブ（SARS-CoV-2 スパイク蛋白質中和抗体）が特例承認されているが、効果が限定的であるため、依然としてインフルエンザと同様に COVID-19 に特異的な抗ウイルス薬の開発が急務である。また、今世紀になって SARS (SARS-Cov) や MARS (MARS-Cov) に続いて COVID-19 が相次いで出現し、今後さらに強力なコロナウイルスが出現する可能性や、SARS-Cov や MARS-Cov の再流行の懸念もあることから、コロナウイルスに共通した作用機序の抗ウイルス薬の開発が必須である。

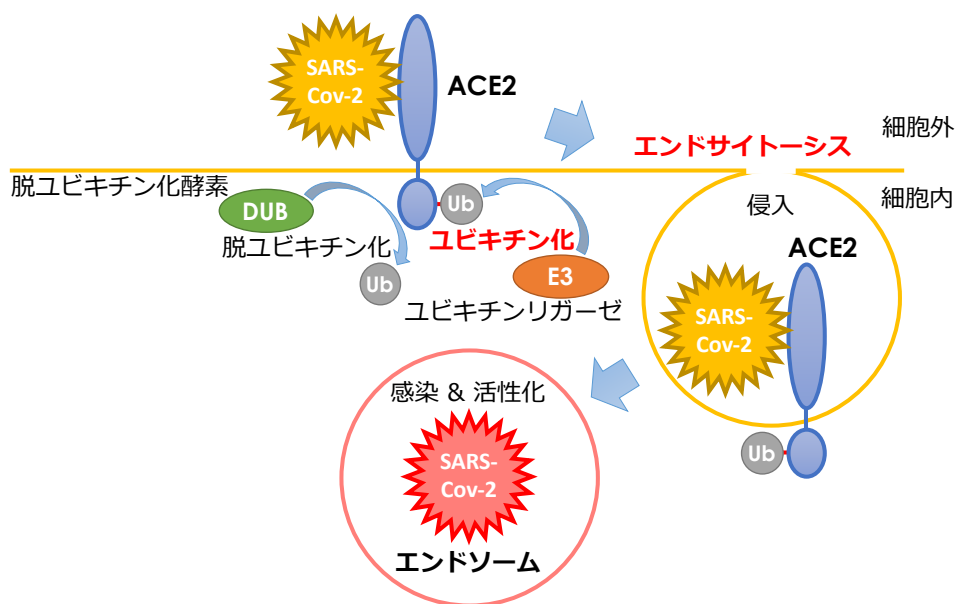


図 1. SARS-Cov-2 の感染と ACE2 のユビキチン化

我々はこれまでユビキチンリガーゼの研究に携わってきており、受容体などの細胞膜に局在する多くの膜蛋白質が、ユビキチン (Ub) の修飾 (ユビキチン化) によりエンドサイトーシスが誘導されることで細胞内に陥入し、エンドソームに輸送される点に注目した。SARS-Cov-2 や SARS-Cov は、細胞膜貫通型のアンギオテンシン変換酵素 2 (angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) を受容体として細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれ、酸性環境下のエンドソームへで活性化することで感染する機構が存在する (図 1)。多くのウイルスが受容体のエンドサイトーシスにより細胞内に侵入するが、そのうちカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスは、細胞膜にあるインテグリンを受容体として、ユビキチンリガーゼ c-Cbl によるユビキチン化を介してエンド

サイトーシスにより取り込まれる¹⁾。そのため、ACE2 もユビキチン化によりエンドサイトーシスが促進される可能性があり、ACE2 のユビキチン化を介した細胞内侵入機構を阻害することで、コロナウイルスの感染を抑制できる可能性が考えられる。しかしながら、ACE2 のユビキチン化機構、すなわち ACE2 にユビキチン化を付加するユビキチンリガーゼ (E3) と逆にユビキチンを切り離す脱ユビキチン化酵素 (DUB) は、まだいずれも発見されていない (図 1)。

そこで、我々は ACE2 に対してユビキチン化を促進するユビキチンリガーゼと抑制する脱ユビキチン化酵素を同定することにした。これらの酵素は従来の免疫沈降法では同定が困難なため、我々がこれまで取り組んできた近位ビオチン標識法によって、ACE2 の近傍蛋白質をビオチンリガーゼによってビオチン化し、ストレプトアビジンを用いて回収することで、質量分析により同定することにした (図 2)。これによって、コロナウイルスのスパイク蛋白質によって増加するユビキチンリガーゼや脱ユビキチン化酵素を同定し、ユビキチン化による ACE2 のエンドサイトーシスの制御機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

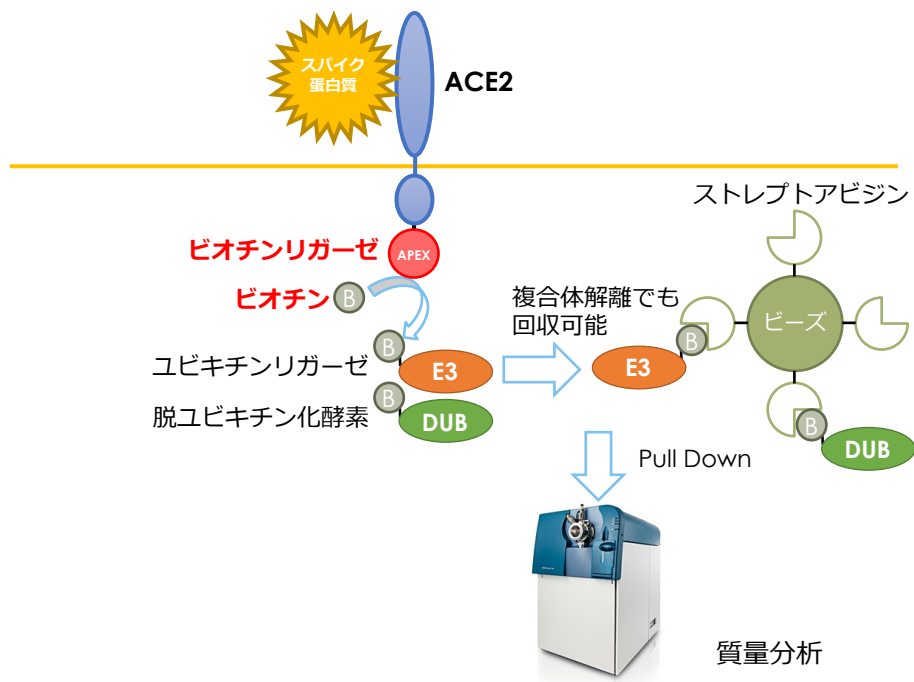


図 2. 近位ビオチン標識法による ACE2 に対する E3 と DUB の同定

結果

スパイク蛋白質の精製とACE2のエンドサイトーシス

ACE2のエンドサイトーシスはコロナウイルスのスパイク蛋白質によって促進されることから、SARS-Cov-2のスパイク蛋白質の精製蛋白質を用いてエンドサイトーシスを誘導することで、この時のACE2近傍蛋白質を同定することにした。スパイク蛋白質は、N末端にインフルエンザウイルスHAのシグナル配列を、C末端にProtein Gで分泌された蛋白質を回収するためのIgGのFc領域を融合したキメラ蛋白質を作成した。これをHEK293細胞に安定的に発現させ、培地上清中のスパイク蛋白質を精製・濃縮した。

まず、ACE2がSARS-Cov-2のスパイク蛋白質によってエンドサイトーシスされ、最終的にリソソームで分解されるか確認した。その結果、ACE2を発現するHEK293細胞にスパイク蛋白質を添加すると、ACE2が初期エンドソームに移行することが確認できた(図3)。また、ACE2はスパイク蛋白質により最終的に分解が誘導され、その蛋白質の分解はリソソームが関与していることから、スパイク蛋白質によってエンドサイトーシスされたACE2はリソソームで分解されることが判明した。

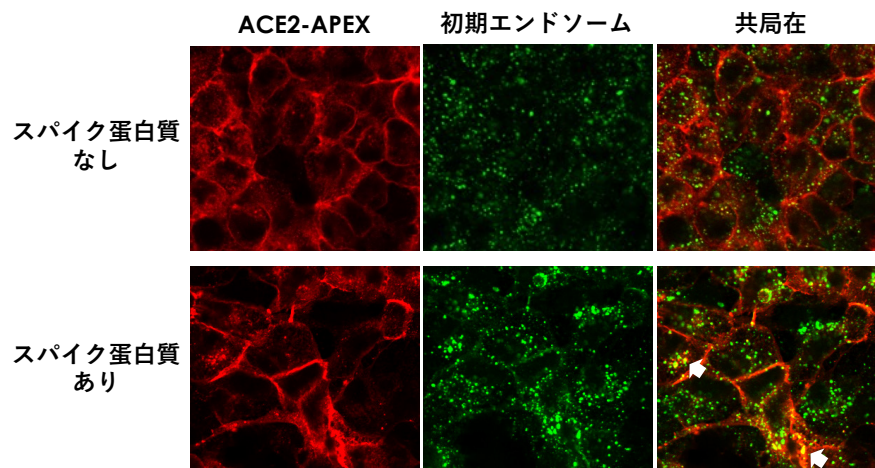


図3. スパイク蛋白質によるACE2のエンドサイトーシス誘導

スパイク蛋白質によるACE2のエンドサイトーシスとユビキチン化

次に、スパイク蛋白質によるACE2のエンドサイトーシスとリソソームによる分解にユビキチン化が関与するか否か検討した。ACE2の細胞質領域は比較的小さく、ユビキチンが付加されるためのリジン(Lys)残基が一つしか存在していない。そこで、そのリジン残基Lys788をユビキチン化修飾を受けないアルギニンに変異させたACE2(K788R-ACE2)を発現する細胞を作成した。その細胞にスパイク蛋白質を添加したところ、ACE2蛋白質の分解が抑制されたことから、ACE2のエンドサイトーシスと蛋白質の分解にはLys788のユビキチン化が関与している可能性が示唆された。

ビオチンリガーゼを用いたACE2に対するE3とDUBの同定

ユビキチンリガーゼや脱ユビキチン化酵素は基質との結合が一過性で弱いため、よ

く用いられる免疫沈降法では、基質の同定が非常に困難であった。我々は最近、ユビキチンリガーゼにビオチンリガーゼ (BirA) を融合することでユビキチンリガーゼの近傍蛋白質をビオチン化し、ストレプトアビジンビーズを用いて回収することで、基質となり得る近傍蛋白質を網羅的に同定できる近位ビオチン標識法が、E3の基質同定に有効であることを明らかにした²⁾。そこで本研究では、逆にACE2にビオチンリガーゼを融合することで、ACE2を基質とするユビキチンリガーゼや脱ユビキチン化酵素を同定し、ACE2を介したコロナウイルス取込をユビキチン化が調節する機構を解明することに挑戦した。

本研究では、ACE2の細胞内領域にAPEX2 (ビオチンリガーゼ) を融合した遺伝子を作成し、HEK293細胞に発現させた。そして、ビオチン化されたACE2の近傍蛋白質をストレプトアビジンビーズを用いて回収し、質量分析 (LC-MS/MS) により近傍蛋白質を網羅的に同定した。まずは、ACE2-APEX2を安定的に発現するHEK293細胞を樹立し、スパイク蛋白質を用いない予備的な実験を行ったところ、ユビキチンリガーゼを12種、脱ユビキチン化酵素を11種、同定することに成功した (蛋白質名は特許化のため非公表)。

さらに、スパイク蛋白質によるACE2の蛋白質分解において、同定したユビキチンリガーゼに関して、siRNAによるノックダウンの影響を検討した。その結果、3種のE3がノックダウンによってACE2の蛋白質分解が阻害されることが判明した (特許化のため非公表)。

まとめ

本研究により、ACE2にSARS-Cov-2のスパイク蛋白質が作用することでACE2のエンドサイトーシスが誘導され、エンドソームへの移行を介してリソソームで分解されることが判明した。さらに、このエンドサイトーシスには788番目のリジンが必要で、ユビキチンリガーゼによるユビキチン化によって促進されている可能性が示唆された。

今後は同定した3種のユビキチンリガーゼに関して、ACE2との結合やユビキチン化様式を明らかにし、SARS-Cov-2感染時にACE2ユビキチン化に関与するユビキチンリガーゼを明らかにしたい。また、脱ユビキチン化酵素も同様に同定し、ユビキチン化と脱ユビキチン化によるACE2のエンドサイトーシス調節機構についても取り組む必要がある。さらに、スパイク蛋白質のACE2への結合がどのようにユビキチンリガーゼのユビキチン化誘導に至るかについても解明していきたいと考えている。

引用文献

1. Kumar B, Roy A, Veettil MV, and Chandran B: Insight into the Roles of E3 Ubiquitin Ligase c-Cbl, ESCRT Machinery, and Host Cell Signaling in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Entry and Trafficking. *Journal of Virology*, 92: 2018.
2. Okamoto T, Wu Y, Matsuhisa K, Saito A, Sakaue F, Imaizumi K, and Kaneko M: Hypertonicity-responsive ubiquitin ligase RNF183 promotes Na, K-ATPase lysosomal degradation through ubiquitination of its beta1 subunit. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 521: 1030-1035, 2020.