

コロナウイルス由来疎水性機能ペプチドの解析

東京大学大学院医学系研究科微生物学

竹田 誠

1. コロナウイルスゲノムの特徴と疎水性アルファヘリックスペプチド (HAHP) について

メッセンジャーRNAの連続する3塩基をコドンと呼び、それぞれに対応するアミノ酸がタンパク質へ翻訳されます。コドンの読み枠を1塩基または2塩基ずらすことで、同一の遺伝子領域から理論上3種類のタンパク質（またはペプチド）をコードすることが可能です。

我々は、すべてのコロナウイルスが約30 kbに及ぶゲノム全長にわたり、主要タンパク質をコードする遺伝子領域の異なる読み枠 (Out-of-Frame) に、他のウイルス科では見られないほど多数の短いORFを有し、その多くが疎水性アルファヘリックス構造を主体とする新規機能性ペプチド

(Hydrophobic Alpha-Helical Peptide : HAHP) をコードし得ることを発見しました (図1、論文1)。

この現象は、主要タンパク質のコドン3番目の塩基にウラシル (U) が優先的に使用されているため、主要タンパク質の読み枠を+1とした場合に+2の読み枠において、極めて高頻度で疎水性アミノ酸 (特にロイシン) がコードされることに起因します。

他研究者による報告 (Weingarten-Gabbay et al., 2021 Cell ; Firth et al., 2020 J Gen Virol) でも、これらHAHPの一部 (ORF1b.iORF1, ORF3c) が感染細胞内で実際に発現し、HLAを介してリンパ球に抗原提示されることが示されています。このことから、コロナウイルス感染症におけるOut-of-Frameペプチドの重要性が認識されつつあります。

2. SARS-CoV-2 および MERS コロナウイルスの HAHP 解析

我々は、SARS-CoV-2のS遺伝子にコードされる一連のHAHPを細胞に発現させることにより、その一部がSARS-CoV-2のRNA合成および膜融合を特異的に阻害することを見出しました (論文1)。

さらに、中東呼吸器症候群 (MERS) コロナウイルスのS遺伝子由来HAHPについても同様の解析を行い、SARS-CoV-2と同様に膜融合を特異的に阻害する活性を有することを確認しました (論文1)。

本助成金の支援により、SARS-CoV-2のORF1ab領域においてもHAHPの機能解

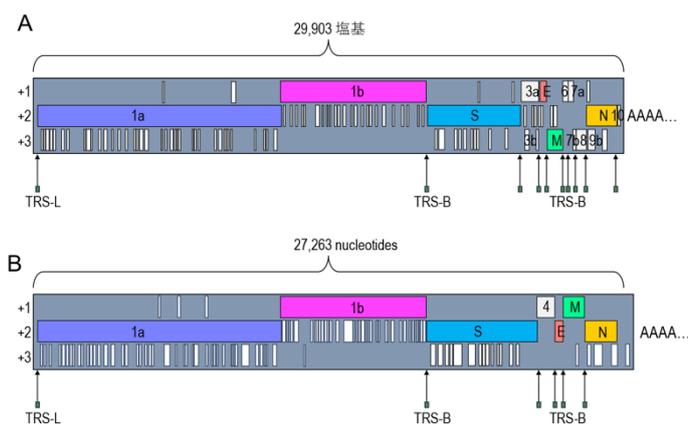


図1：コロナウイルスゲノム内の(20アミノ酸以上をコード可能な)ORF。A: SARS-CoV-2 (GenBank accession number MN908947.3)。B: HCoV-229E (This study)。TRS: 転写制御配列 Transcription Regulatory Sequence

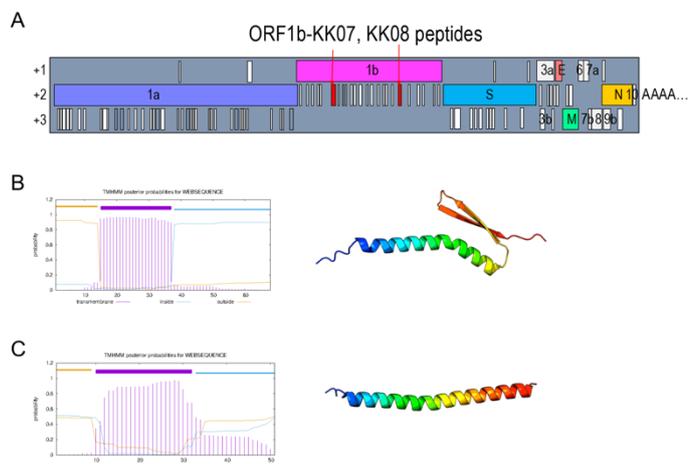


図2：HAHPをコードしうるSARS-CoV-2 ORF1b内のORF (KK07とKK08)。B: KK07の構造予測。C: KK08の構造予測。Prediction of transmembrane helices by TMHMM 2.0。Structures were predicted by AlphaFold3。

析を実施しました。その結果、ORF1ab 領域から膜融合阻害活性を示す HAHP (KK07 および KK08) を同定しました (図 2、未発表データ)。

主要 ORF 内部の Out-of-Frame にコードされるペプチド (ORFS.iORF1、ORF3c) の翻訳機構については、リボソームの leaky scanning の関与が提唱されています (Weingartern-Gabbay *et al.* 2021 Cell; Firth *et al.* 2020 J Gen Virol)。また近年、コロナウイルスが合成する大量の非正規サブゲノム RNA を介して翻訳される可能性も示唆されています。そこで我々は、HAHP の発現機構を理解するためには非正規サブゲノム RNA の解析が重要であると考えました。

3. ヒトコロナウイルス 229E (HCoV-229E) を用いた解析

ヒトに感染するコロナウイルスには、SARS-CoV-2 や MERS-CoV のように重症肺炎を引き起こすものに加え、小児の季節性上気道炎 (時に下気道炎) を引き起こす 4 種 (HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-HKU1、HCoV-NL63) が存在します。これらのウイルスも同様に、Out-of-Frame に多数の HAHP をコードし得るゲノム構造を有します (図 1)。

これらの風邪コロナウイルスは、BSL3 環境を必要とする SARS-CoV-2 等と異なり BSL2 で実験可能であり、詳細なウイルス学的・細胞生物学的解析を行う上で有利です。そこで、ヒト季節性コロナウイルス HCoV-229E を対象とした解析を行いました。

臨床分離株 1121 株および 1948 株を用いた解析の結果、感染細胞内で多様な非正規サブゲノム RNA が発現していることを確認しました (未発表データ)。また、主要 ORF の一つである ORF4 は、汎用株化細胞での培養過程において点変異や欠失変異を受け、発現が消失することが明らかとなりました (論文 2)。

すなわち、ウイルスゲノム構造やサブゲノム RNA の構成は用いる細胞種に大きく影響され、生理条件に近い培養環境での解析の重要性が示されました。

4. ヒト気道オルガノイドを用いた解析

これまで SARS-CoV-2 の解析は主として VeroE6/TMPRSS2 細胞および Calu-3 細胞を用いて実施してきました。しかし、HAHP 発現機構および非正規サブゲノム RNA の真の発現状態を把握するためには、生理的条件を模した系での解析が必要です。そのため、iPS 細胞由来ヒト気道オルガノイドを用いた解析を開始しました。

ヒト気道オルガノイドにおける SARS-CoV-2 増殖を解析した結果、マウス気道や一般的な株化細胞とは異なる増殖機構が示されました (図 4: Kakizaki *et al.*, *J Virol.* 2025 より改変引用 © American Society for Microbiology) (論文 3、4)。具体的には、エンドソームを介した侵入経路の寄与がより大きいことが明らかとなりました (論文 3)。現在、ヒト気道オルガノイドを用いた HAHP 発現解析を進めています。

5. HCoV-229E リバースジェネティクス系の確立

HAHP の発現意義および ORF4 機能を詳細に解析するため、HCoV-229E のリバースジェネティクス系を構築しました。HCoV-229E の全長ゲノム (約 27 kb) を 7 本の cDNA 断片として増幅し、OriCiro システムにより全長 cDNA へ連結しました。

さらに、解析効率化のため ORF4 直上に EGFP 遺伝子を挿入した全長ゲノム cDNA を作製し、EGFP を発現する組換え HCoV-229E (HCoV-229E/1121-EGFP) の作製に成功しました (国際学会発表 1)。HCoV-229E の人工合成系は世界的にも成功例が極めて限られており、ORF4 領域を保持した系としては初の成功例となります。

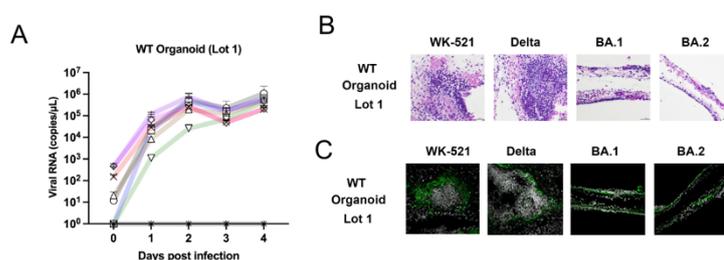


図4: SARS-CoV-2 (武漢株ならびに変異株)の呼吸器オルガノイドにおける増殖。iPS細胞から分化誘導した呼吸器オルガノイドに各種SARS-CoV-2分離株を感染させた。A: 増殖曲線。B: 病理組織学的解析(HE染色)。C: 免疫組織学的解析(SARS-CoV-2 N抗原を検出)

本系を用いてコドン3番目塩基の影響を検討するため、EGFP 遺伝子の3番目塩基をグアニン (G) 優先となるよう設計し、分化型気道上皮細胞での変異発生を解析しました。その結果、Gを多く含むEGFP 遺伝子では早期に大規模欠失変異が生じることが確認されました(未発表データ)。この結果は、コドン選択がゲノムRNAの安定性に重要な役割を持つ可能性を示唆します。

6. 展望

これまでの研究により、一部のHAHPがHLAを介して抗原提示され、免疫応答活性化に寄与することが示されています。したがって、非正規サブゲノムRNAおよびそれにコードされるHAHP多様性の解析は、コロナウイルス感染症の病態理解において重要です。

しかし、HAHPはゲノム全体では多数存在すると考えられる一方、個々の発現量は低く、さらに多くが膜埋在型と予想されるため検出が困難です。実際に感染細胞を用いた質量分析を行いました。HAHPの検出には至りませんでした。現在、より高感度な解析手法の導入を検討しています。

論文

1. Okura T, Shirato K, Kakizaki M, Sugimoto S, Matsuyama S, Tanaka T, Kume Y, Chishiki M, Ono T, Moriishi K, Sonoyama M, Hosoya M, Hashimoto K, Maenaka K, Takeda M. Hydrophobic Alpha-Helical Short Peptides in Overlapping Reading Frames of the Coronavirus Genome. *Pathogens*. 2022 Aug 3;11(8):877. doi: 10.3390/pathogens11080877. PMID: 36014999; PMCID: PMC9415614
2. Kitai Y, Kojima S, Aishajiang A, Kawase M, Watanabe O, Yabukami H, Hashimoto R, Akahori Y, Katoh H, Takayama K, Nishimura H, Shirato K, Takeda M. Changes in ORF4 of HCoV-229E under different culture conditions. *J Gen Virol*. 2025 Jul;106(7):002131. doi: 10.1099/jgv.0.002131. PMID: 40638224; PMCID: PMC12282251.
3. Kakizaki M, Hashimoto R, Nagata N, Yamamoto T, Okura T, Katoh H, Kitai Y, Akahori Y, Shirato K, Ryo A, Takayama K, Takeda M. The respective roles of TMPRSS2 and cathepsins for SARS-CoV-2 infection in human respiratory organoids. *J Virol*. 2025 Jan 31;99(1):e0185324. doi: 10.1128/jvi.01853-24. Epub 2024 Nov 27. PMID: 39601592; PMCID: PMC11784140.
4. Iwata-Yoshikawa N, Kakizaki M, Shiwa-Sudo N, Okura T, Tahara M, Fukushi S, Maeda K, Kawase M, Asanuma H, Tomita Y, Takayama I, Matsuyama S, Shirato K, Suzuki T, Nagata N, Takeda M. Essential role of TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways. *Nat Commun*. 2022 Oct 15;13(1):6100. doi: 10.1038/s41467-022-33911-8. PMID: 36243815; PMCID: PMC9568946.

国際会議発表

1. Makoto Takeda, Yuki Kitai, Shohei Kojima, Kazuya Shirato, Miyuki Kawase, Hideko Watabe, Sota Takahashi, Yukiko Akahori, Hiroshi Katoh, Hidekazu Nishimura: Adaptation of HCoV-229E to cultured cells and changes in ORF4. Cold Spring Harbor Asia Conference, Preparing for the Next Pandemic: Evolution, Pathogenesis and the Virology of Coronaviruses. 2024年12月2-5日