

大阪科学・大学記者クラブ 御中

(同時資料提供先：文部科学記者会、科学記者会)

2022年7月6日

大阪公立大学

唾液中のタンパク質が感染を阻止！

COVID-19 から身を守る鍵が「唾液」にもあることを解明！

ウイルスとの結合を阻害する唾液中のタンパク質を同定

<本研究のポイント>

- ◇ 唾液および口腔細胞が新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の重要な感染経路である。
- ◇ 健常者の唾液に存在する好中球関連カチオン性^{*1}タンパク質などが新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染を阻害することを明らかにした。
- ◇ COVID-19 の重症化には年齢依存性が見られ、かつ高齢者の唾液分泌量は顕著に減少するというに着目し、研究を進めた。
- ◇ COVID-19 のみならず、未知のウイルス感染を自然免疫レベルで予防する方法の開発に期待。

<着目点>

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、ウイルスエンベロープ^{*2}上のスパイクタンパク質^{*3}S1 がヒト細胞の細胞膜に存在するアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) 受容体へと結合することで感染が成立します。本研究グループは、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の発症と重症化には年齢依存性が見られ、かつ高齢者の唾液分泌量は顕著に減少することから、本来体に備わっている自然免疫機構が SARS-CoV-2 の感染予防に貢献しているのではないかと考えました。

<概要>

大阪公立大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻の松原 三佐子准教授、医学研究科 肝胆膵病態内科学・合成生物学寄附講座の吉里 勝利特任教授らの研究グループは、S1 と ACE2 の結合実験を行い、SARS-CoV-2 非感染 (健常者) の唾液が濃度依存的に S1 と ACE2 の結合を妨げることが明らかにしました。また、生化学的手法により唾液中のタンパク質として ACE2 に結合する 4 種のタンパク質を特定し、その中でも、好中球関連のカチオン性の性質を持つエラストアーゼとヒストン H2A が、S1 と ACE2 の結合を顕著に阻害することを明らかにしました。

これらの結果から健常者の唾液中の好中球関連カチオン性タンパク質が、ACE2 の負に帯電した分子表面を覆うことにより、SARS-CoV-2 の侵入に対する障壁となることが示されました。さらにヒストン H2A と同様な結合阻害効果が牛のヒストンでも見られることから、ヒストンの効果は種を超えたものであることや、細菌の発酵産物であるカチオン性 ϵ -ポリ-L-リジンが S1 と ACE2 の結合を強力に阻害することも明らかにしました。

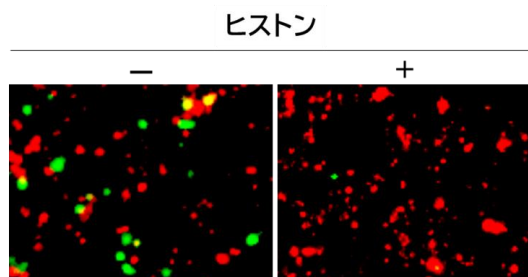
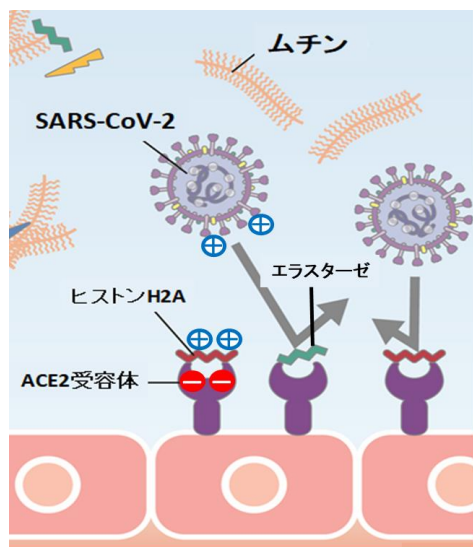
本研究は、大阪公立大学大学院 医学研究科、獣医学研究科、コスモ・バイオ株式会社による共同研究成果で、2022年7月6日 (水) に『The Journal of Biochemistry』(IF=3.387) にオン

ライン掲載されました。

ウイルスの感染経路の入口である口腔/唾液の中に、COVID-19の侵入を防ぐ仕組みがある可能性が出てきました。本研究成果を基盤とし SARS-CoV-2 による感染予防薬および治療薬の開発に貢献していきたいと考えています。



吉里 勝利 特任教授



唾液関連タンパク質によるS1-ACE2結合阻害：
唾液中に存在する正電荷タンパク質、ヒストンH2A
やエラスターゼは宿主細胞の受容体であるACE2
(負に電荷)を覆い、SARS-CoV-2のスパイクタンパク
質S1による感染から保護する(左図)。
ヒストンによるACE2発現細胞(赤色)への疑似
SARS-CoV-2感染(緑色)の阻害を示す(右図)。

■掲載誌情報

雑誌名： The Journal of Biochemistry (IF=3.387)

論文名： Cloaking the ACE2 receptor with salivary cationic proteins inhibits SARS-CoV-2 entry

著者： Katsutoshi Yoshizato, Toshio Taira, Misako Sato-Matsubara, Shizuko Sekiguchi, Yoriko Yabunaka, Yukimi Kira, Tetsu Ohashi, Atsuko Daikoku, Ken Ofusa, Chiho Kadono, Daisuke Oikawa, Tsutomu Matsubara, Yu Nakagama, Yasutoshi Kido, Fuminori Tokunaga, Kazuo Ikeda, Akira Kaneko & Norifumi Kawada

掲載 URL： <https://academic.oup.com/jb/advance-article/doi/10.1093/jb/mvac054/6632457>

<研究の背景>

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、クラスター対策による封じ込めを掻い潜り、未曾有の勢いで世界中に拡大しました。世界中で例外なく感染爆発が起こり、既存の健康問題やロックダウン政策に伴う経済的問題が事態をより複雑にしています。一方、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) による人口当たりの死亡者数には、地理的な差異があることも指摘される反面、ワクチンによる恩恵を享受できる格差が厳然と存在します。

SARS-CoV-2 が生体の防衛システムをうまく回避する機構を理解することは、このウイルスの感染を弱体化させるために不可欠です。COVID-19の発症と重症化には明確な年齢依存性があり、高齢者の重症化率と死亡率は、若年者・小児のそれよりも極めて高いことが分かっています。しかし、ここまで顕著な差がありながら、この年齢依存性を十分に説明できる科学的根拠は分かっていません。一方で、生体の自然免疫防疫機能を担う「唾液の分泌量の減少」は高齢者で顕著であり、唾液の量と質は時間と共に変化することが報告されています。これらの事象から本研究が

ループは、“唾液は、SARS-CoV-2 の体内への侵入を防ぐ仕組みを持っている”と仮説を立てました。

<研究の内容>

SARS-CoV-2 はウイルスエンベロープ上のスパイクタンパク質 S1 がヒト細胞の細胞膜に存在するアンジオテンシン変換酵素 2

(ACE2) 受容体へ結合することで感染が成立します。そこで、本研究グループはコスモ・バイオ株式会社との共同研究により SARS-CoV-2-S1 と ACE2 の結合を定量的に測定する実験系 (S1-ACE2 結合アッセイ系) を作成し、S1-ACE2 結合に対する健常者唾液の効果を調べたところ、全ての唾液検体 (N=7) が濃度依存的に阻害活性を示しました (図 1)。

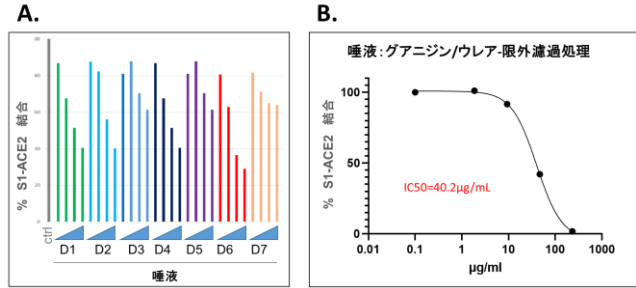


図1. 唾液によるS1-ACE2結合の濃度依存的阻害:
A) 元の唾液(100%)に対する「希釈列」(各100µL)を100 ng / mLのS1と反応させた。
B) 唾液を6 M グアニジン塩酸/8 M 尿素処理、限外濾過 (100 kDa以下10 kDa以上) サンプルを用いてS1-ACE2結合実験を行った。

さらに、唾液から ACE2 結合能をもったタンパク質を 4 種 (ディフェンシン-1、リゾチーム C、ヒストン H2A、好中球エラスターゼ) を特定し、その中でも、好中球関連ヒストン H2A とエラスターゼが、S1-ACE2 結合を顕著に阻害することを明らかにしました (図 2 A&B)。これらの結果から本研究グループは、健常者の唾液中の好中球関連カチオン性タンパク質が、負に帯電した ACE2 の分子表面を覆うことにより、SARS-CoV-2 の侵入に対する障壁になり得ると結論付けました。

ヒストン H2A はアルギニン残基 (11%) およびリジン残基 (10%) に富み等電点が 11.06、好中球エラスターゼはアルギニン残基 (9%) が豊富で等電点が 9.71 であることから両方とも非常に塩基性 [カチオン性 (陽イオンに帯電している状態のこと)] の性質をもつタンパク質であることがわかりました。そこで、カチオン性を示す α および ϵ ポリ-L-リジンとポリ-L-アルギニンを使って S1-ACE2 結合阻害実験を行った結果、これらすべての塩基性ペプチドが S1-ACE2 結合を強力に阻害することがわかりました。この中でも、細菌の発酵産物である ϵ -ポリ-L-リジンは α ポリ-L-リジンに比べ阻害効果が 10 倍も高いことからカチオン性天然物質の有用性が示されました (図 2 C)。

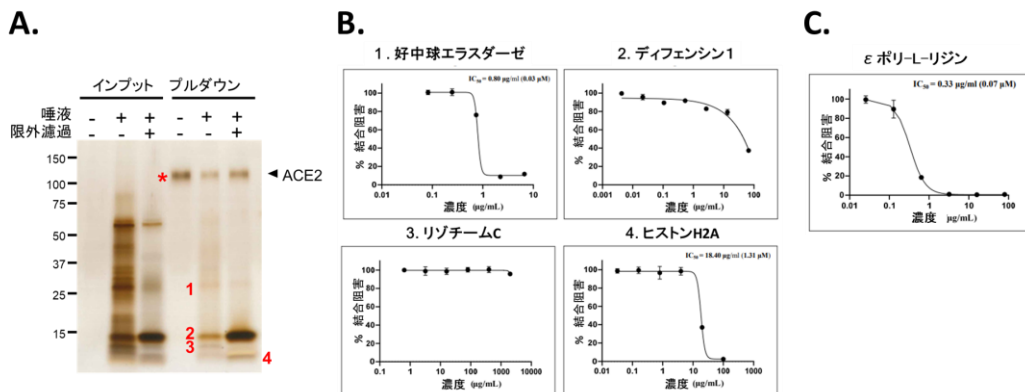


図2 ACE2結合唾液蛋白質のS1-ACE2結合阻害活性:
A) グアニジン/尿素処理サンプルをHis-ACE2結合Ni-Beadsと反応させプロダウン実験を行い、ACE2結合蛋白質として1. 好中球エラスターゼ、2. ディフェンシン1、3. リゾチームC、4. ヒストンH2Aを同定した。
B) それらACE2結合蛋白質を用いてS1-ACE2結合の阻害活性を調べた。
C) カチオン性ペプチド、 ϵ -ポリ-L-リジンも S1-ACE2結合阻害活性を有することが分かった。

<今後の展開>

本研究成果は、COVID-19 の感染予防法や治療法の開発に貢献するばかりでなく、将来的に人類を襲うであろう未知のウイルス感染を自然免疫レベルで予防する方法の開発に繋がると考えております。本研究は、唾液の好中球が、常在する微生物によって適度に活性化され、ディフェンシン-1、ヒストン H2A、エラスターゼなどのタンパク質を持続的に放出し、その中でもカチオン性のエラスターゼとヒストン H2A が宿主細胞の ACE2 受容体をマスクングすることで、SARS-CoV-2 感染に対する自己防衛に寄与している可能性が高いことを明らかにしました。

本研究グループは、粘性タンパク質であるムチンがこれらのタンパク質を保持するために好中球を主体とした自然免疫機構を制御すると考え、年齢依存的なムチンの糖鎖修飾の違いについて調査しています。さらに、ACE2 マスクングペプチドとして ε-ポリ-L-リジン（細菌発酵産物および既知の食品保存剤）などの産業化されているカチオン性ペプチドやスパイクタンパク質と ACE2 の結合を阻害する新たな合成ペプチドを利用することにより、SARS-CoV-2 侵入から保護するための新しい薬品開発に繋げることで長期化する世界的パンデミック COVID-19 の終息に貢献したいと考えています。

また、大阪公立大学、ロート製薬株式会社、コスモ・バイオ株式会社、株式会社バイオインテグレンスは本研究成果を基盤とした共同研究の契約を締結しました。

<資金情報>

本研究は、令和 2 年大阪市立大学 重点研究「新型コロナウイルス感染に対する診断・予防・治療開発へ向けた統合的研究」(OCU-SRG2021_TPR01、研究代表者：金子 明) の対象研究で、コスモ・バイオ株式会社札幌事業部と共同で行われました。

なお、本研究の科学的知見に基づく新型コロナウイルスの感染防御方法に関して特許出願されています（特願 2021-77301）。

<用語解説>

- ※1 カチオン性：電氣的に正に荷電している性質。
- ※2 エンベロープ：ウイルスを覆う膜状構造で、被膜とも呼ばれる。
- ※3 スパイクタンパク質：エンベロープから突き出ている王冠（コロナ）状の構造体を形成しているタンパク質。

【研究内容に関する問合せ先】

大阪公立大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻

准教授 松原 三佐子

TEL：072-463-5297 E-mail：mmatsubara@omu.ac.jp

大阪公立大学大学院 医学研究科 肝胆膵病態内科学・合成生物学寄附講座

特任教授 吉里 勝利

TEL：06-6646-2630 E-mail：yoshizatok@omu.ac.jp

【ご取材に関する問合せ先】

大阪公立大学 広報課

担当：上嶋 ^{かみしま} 健太

TEL：06-6605-3411 E-mail：koho-list@ml.omu.ac.jp