

X-206 は SARS-CoV-2 変異株および薬剤耐性株
を含む広範なベータコロナウイルスに対して
強力な抗ウイルス活性を示す

2024

佐々木慈英

目次

要約.....	3
第一章：コロナウイルス総論.....	5
第二章：ベータコロナウイルスに対して広範な膜融合阻害活性を示す化合物の 同定.....	9
方法・材料.....	11
結果.....	15
第三章：汎ベータコロナウイルス膜融合阻害活性を示す化合物と類似構造を 有する化合物の感染阻害能評価.....	18
方法・材料.....	20
結果.....	22
第四章：X-206 が阻害するウイルス生活環の同定.....	27
方法・材料.....	29
結果.....	32
結論.....	37
考察.....	38
謝辞.....	40
論文目録.....	41
引用文献.....	42

要約

過去二十年の間に、重症急性呼吸器症候群ウイルス (SARS-CoV)、中東呼吸器症候群ウイルス (MERS-CoV)、重症急性呼吸器症候群ウイルス2 (SARS-CoV-2)の3種類のベータコロナウイルス属に属するウイルスがヒトの間でアウトブレイク/パンデミックを引き起こしてきた (1, 2)(<https://covid19.who.int>)。コロナウイルスの粒子を構成するタンパク質の内、スパイク (S) タンパク質は細胞侵入において重要な役割を担っており、受容体結合能と膜融合能を有する。

三種類の高病原性ヒトコロナウイルスの内、SARS-CoV-2に対しては承認された治療薬およびワクチンは存在するものの、SARS-CoVおよびMERS-CoVに対する承認された治療薬等は存在しない。そこで本研究では、これら三種類の高病原性ヒトコロナウイルス全てに対して広域な感染阻害活性を示す化合物の同定を目指した。

初期スクリーニングの結果、MERS-CoVの細胞侵入を阻害する候補化合物を50種類同定した。また、MERS-CoVのSタンパク質を発現させた細胞を用いて膜融合阻害実験を行った結果、13/50の化合物は膜融合を阻害した。さらに、同化合物を用いてSARS-CoVとSARS-CoV-2に対する膜融合阻害も検証したところ、3/50の化合物はSARS-CoVおよびSARS-CoV-2に対しても感染阻害能を示した。そこで、これら3種類の化合物の構造情報を基に、類似構造を持つ309の化合物を選抜し、三種類の高病原性ヒトコロナウイルスに対する感染阻害実験を行った。その結果、ThapsigarginとX-206が三種のコロナウイルス全てに対して感染阻害能を示した。さらに、ThapsigarginとX-206はSARS-CoV-2の代表的な変異株であるDelta, BA.5, XBB.1のいずれに対しても感染阻害能を示した。

ThapsigarginとX-206の内、阻害活性が強かったX-206の作用機序を理解するため、COVID-19治療薬であるレムデシビル (RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害薬) およびニルマトレルビル (3CLプロテアーゼ阻害薬) の耐性株に対する感染阻害能を評価した。その結果、X-206は耐性ウイルスに対しても抗ウイルス活性を保つことが分かった。更に、低濃度では複製関連のウイルスRNAとタンパク質の量が大幅に低下することで複製が阻害され、高濃度ではウイルスの細胞侵入も阻害することが明らかとなった。従って、X-206は既存の承認薬とは異なる作用機序であることが示唆された。

最後に、既存の承認薬であるレムデシビルまたはニルマトレルビルとX-206の併用可能性の検証のため薬剤のコンビネーション試験を実施した。その結果、X-206とレムデシビル、及び、X-206とニルマトレルビルの両組み合わせで相加的な効果が確認できた。従って、*in vitro*実験結果からはX-206と既存承認薬との併用可能性が期待された。

以上、本研究では、SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2（変異株や薬剤耐性株含む）に対して強力かつ広域な阻害活性を示すX-206を同定した。また、その作用機序として、濃度帯によって2つの感染阻害作用があることが明らかとなった。

第一章：コロナウイルス総論

コロナウイルス科に属するウイルスは、レトウイルス亜科 (*Letovirinae*)、ピトウイルス亜科 (*Pitovirinae*)、オルソコロナウイルス亜科 (*orthocoronavirinae*) の三つの亜科に分類される (<https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae>)。この内、オルソコロナウイルス亜科は、アルファコロナウイルス属, ベータコロナウイルス属, ガンマコロナウイルス属, デルタコロナウイルス属の四つの属で構成される。ヒトに対して病原性を示すことが確認されているウイルスはオルソコロナウイルス亜科のアルファコロナウイルス属, ベータコロナウイルス属に属している。風邪の原因ウイルスの一部として知られている 4 種類のヒトコロナウイルスであるヒトコロナウイルス 229E (HCoV-229E) 及び HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1 の内、アルファコロナウイルス属にはヒトコロナウイルス 229E (HCoV-229E) と HCoV-NL63 が属している。ベータコロナウイルス属には、HCoV-HKU1 と HCoV-OC43 が属している。ベータコロナウイルス属には、ヒト間でのアウトブレイク/パンデミックを引き起こした三種類の高病原性ベータコロナウイルス (SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2) も属しており、本研究ではこれら 3 種類のウイルスに焦点を当てている。SARS-CoV はアウトブレイクの終息後、新たな感染報告はない。一方で、MERS-CoV と SARS-CoV-2 は最初の患者報告から現在まで新規感染の報告が続いている。

2003—2004 年の間に流行した SARS-CoV は、重症急性呼吸器症候群 (SARS) の病因ウイルスである。2003 年にアジアで最初の感染報告が確認されて以来、北米、南米、ヨーロッパ、アジアの 20 か国以上に広がった。感染者は 8098 人で死者は 774 人だった (<https://www.emro.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome/>)。その後、2012 年には、中東呼吸器症候群(MERS)の病因ウイルスである MERS-CoV が報告された。MERS-CoV は現在まで中東地域を中心に発生しており、2015 年には韓国で大規模な感染拡大が生じた (<http://www.who.int/mediacentre/news/mers/briefing-notes/2-june-2015-republic-of-korea/en/>)。2024 年までに、2613 件の感染報告がされており、死者は 943 人で、致死率は約 36 % である (<https://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>)。保有宿主はヒトコブラクダで、ラクダとの接触による感染リスクがあると考えられている(3)。そして、2019 年 12 月

には、Coronavirus-disease 19 (COVID-19) の病因ウイルスである SARS-CoV-2 が発生した。SARS-CoV-2 もコウモリコロナウイルスに由来する人獣共通感染症であると考えられる。2024 年 11 月時点で約 7 億 7690 万件の感染が報告されており、死者は約 708 万人である。

コロナウイルス科のウイルス性状としては、エンベロープを持つ直径 50～200 nm の楕円形のウイルスであること、ゲノムの大きさは 27～32 kb であること等が挙げられる。形態が王冠“crown”に似ていることからギリシャ語で王冠を意味する“corona”という名前が付けられた(4)。

SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 を含めたコロナウイルスはプラス鎖一本鎖 RNA ゲノムを保有している。粒子構造は Spike (S) タンパク質、envelope (E) タンパク質、membrane (M) タンパク質、nucleocapsid (N) タンパク質の 4 つの構造タンパク質から構成されている。ゲノム上には、これら 4 種類の構造タンパク質の他に Open Reading Frame (ORF) がコードされている(5)。ORF は複製酵素複合体またはアクセサリタンパク質として機能する。

コロナウイルスの増殖サイクルは次の通りである。初めに、S タンパク質を介して宿主の受容体と結合後、ウイルスのエンベロープと宿主の細胞膜間で膜融合が生じる。これによりゲノム RNA が細胞内に放出される。脱殻後すぐに、二つの大きな ORF である、ORF1a と ORF1b の翻訳により二つのポリタンパク質 pp1a と pp1ab が生成される。このポリタンパク質は pp1a および pp1ab に存在するメインプロテアーゼ (Main protease: Mpro) または、パパイン様プロテアーゼ (PLpro) によって切断される。上記の切断処理により、複数の非構造タンパク質 (nsp) が放出される。nsp は、Double membrane vesicles (DMVs) や convoluted membrane (CM)、そして small open double-membrane spherules (DMSs) で構成されるウイルス複製器官の作製に関わることも知られている(6-8)。コロナウイルスの RNA 合成は、nsp12 である RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase: RdRp) と、その補因子 nsp7 と nsp8 によって行われる(9)。RdRp はゲノム複製の役割を担っており、細胞質に放出されたプラス鎖 RNA ゲノムを鋳型にマイナス鎖 RNA ゲノムを合成する。更に、合成されたマイナス鎖 RNA ゲノムを鋳型にプラス鎖 RNA ゲノムと異なる長さのウイルス mRNA が合成される。翻訳されたウイルスタンパク質とゲノムは小胞体に集合する。出芽後、ゴルジ装置を経てエキソサイトーシスにより細胞外に放出される(図 1)。

ベータコロナウイルスが細胞に侵入するためには、受容体に S タンパク質が結合し、エンベロープと細胞膜との間で膜融合が生じなければならない(5)。MERS-CoV の受容体としては、dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) が報告されている(10)。SARS-CoV 及び SARS-CoV-2 の受容体としては Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) が報告されている(11, 12)。S タンパク質は受容体結合能と膜融合能の両方を備えている。S タンパク質はエンベロープ上で三量体として存在している。受容体への結合に重要なドメインである受容体結合ドメイン (Receptor binding domain : RBD) が “up (open)” と “down (closed)” の二つのコンフォメーションをとることが報告されている(13)。RBD が up コンフォメーションの時、受容体結合モチーフ (receptor-binding motif: RBM) が外側に露出し、受容体に結合することが出来る。S タンパク質は、出芽時に宿主プロテアーゼである Furin による開裂を受ける部位 (S1 サブユニットと S2 サブユニットの境界 : S1/S2) と細胞侵入時に膜貫通プロテアーゼセリン 2 (TMPRSS2) や Cathepsin によって開裂をうける部位 (S2 サブユニット中の fusion loop の上流 : S2') がある。S2'部位の開裂は S タンパク質を介した膜融合の重要な活性化要因である。受容体結合により、S タンパク質は構造変化を起こし、S2 サブユニットが prefusion 構造から postfusion 構造へと変化することで fusion peptide が細胞膜に挿入され、エンベロープと細胞膜との間で膜融合が生じる(14-16)。生体内におけるコロナウイルスの病原性発現機構として、一つは、ウイルス感染自体による細胞障害性が挙げられる。一般に、培養細胞での SARS-CoV-2 感染では、細胞変性効果による細胞死が確認される。この性質を利用して、抗ウイルスやワクチンの活性評価が行われることが多い。また、SARS-CoV-2 感染患者の剖検により、滲出性肺胞損傷と組織化性びまん性肺胞損傷 (diffuse alveolar damage: DAD) の両方の特徴が肺で観察されている(17)。その他、上皮細胞の脱落や扁平上皮化生、そして肺胞隔壁に顕著な形質細胞を伴う炎症性細胞浸潤が見られる。更に、肺胞上皮で同定された合胞体の細胞質で SARS-CoV-2 抗原が観察されている。以上から、個体レベルでも SARS-CoV-2 による組織障害が生じると考えられている。二つ目に、サイトカインストームが挙げられる。細胞に侵入後、コロナウイルスのゲノムにコードされているいくつかのウイルスタンパク質はサイトカインの一種である I 型インターフェロン (IFN) の産生を抑制する。例えば SARS-CoV-2 の場合は、IFN 発現抑制に NSP1、NSP3、NSP6、NSP13、ORF3a、ORF6 等が関与する(18-20)。インタ

ーフェロン放出の遅延は、急速なサイトカインやケモカインの増加を誘導し、炎症細胞が多量に産生される。このような、サイトカインの調節不全はサイトカインストームと呼ばれる。その結果、炎症細胞が全身組織に損傷を与え、多臓器不全が生じる。実際、COVID-19 患者における疾患の重症度と血清中の IL-2R および IL-6 のレベルに正の相関関係があることが知られている(21)

COVID-19 パンデミックによって、SARS-CoV-2 に対するワクチンや治療薬の開発が急速に進んだ。現在、mRNA ワクチン、ウイルスベクターワクチン、不活化ワクチン、組換えタンパクワクチンが WHO に承認されている(22-25)。治療薬としては、モノクローナル抗体であるバムラニビマブ-エテセビマブ、チキサゲビマブ-シルガビマブ、REGN-COV2、ペミビバート、シパビバルトがこれまでに承認された(26-30)。また、RdRp を標的とした抗ウイルス薬であるレムデシビルやモヌルピラビルが承認された(31, 32)。更に、Mpro を標的とした抗ウイルス薬であるニルマトレルビル、エンシトレルビルが承認された(33, 34)。本邦でも、ワクチンおよび治療薬が緊急承認/承認されている。本邦で承認されているものについては、第二章：要約の表 1 にまとめている。一方で、HR1 に結合し膜融合を阻害する peptide (35) や MERS から回復した患者の B 細胞由来のモノクローナル抗体 (36) が論文で報告されているものの、MERS-CoV に対して承認されたワクチンや治療薬は存在していない。SARS でも同様に承認された治療薬やワクチンは存在していない。

本研究では、SARS-CoV、MERS-CoV そして SARS-CoV-2 に対して広範な抗ウイルス活性と膜融合阻害活性を示す化合物として Thapsigargin と X-206 を報告する。同定した 2 化合物は MERS-CoV および SARS-CoV、そして SARS-CoV-2 の variants of concern (VOC) に対しても抗ウイルス活性を示した。最後に、最も抗ウイルス活性の強かった X-206 を用いて、SARS-CoV-2 の薬剤耐性株に対する抗ウイルス活性の検証を行った結果、緊急承認された低分子薬とは異なる作用機序を保有する可能性が示唆された。

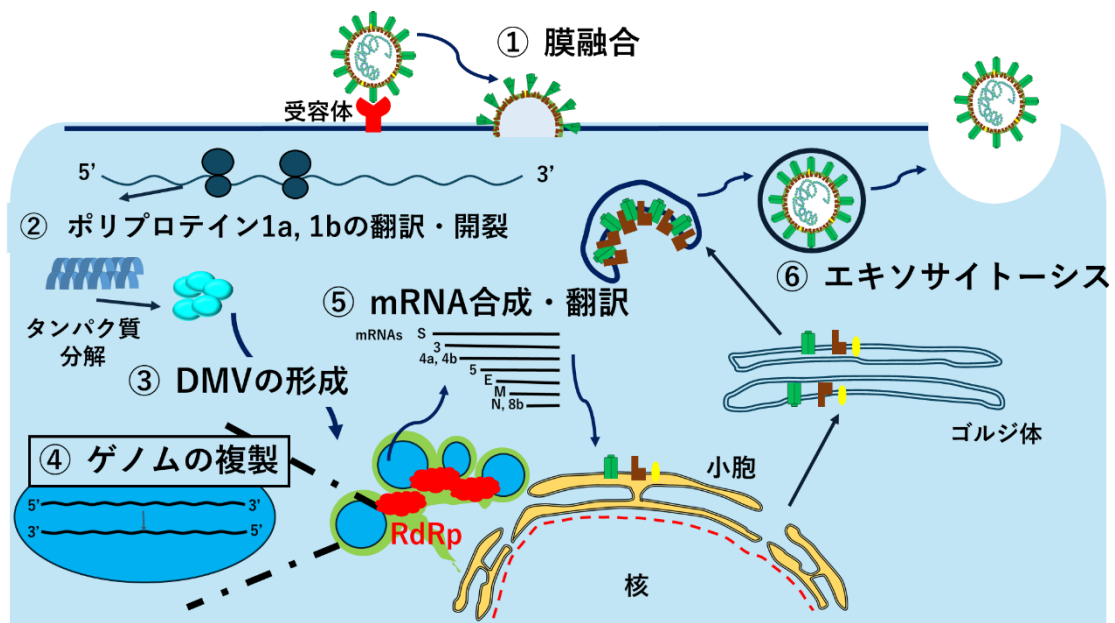


図 1. コロナウイルスの生活環

コロナウイルスは、受容体と結合後に膜融合またはエンドサイトーシスにより細胞内に侵入する(step①)。細胞侵入にはSタンパク質が関与しており、受容体結合能と膜融合能の両方の機能が備わっている。細胞内にウイルスゲノムが放出された後、ゲノムからポリタンパク質1aと1b(図中ポリプロテイン1a, 1b)が翻訳される。このポリタンパク質はプロテアーゼによる開裂を受け、RdRpといった複製に関与するタンパク質が合成される(step②)。Step2で合成されたタンパク質の中には、ゲノム複製の場である小胞体由来の二重膜小胞(Double membrane vesicles: DMV)を形成に関与するタンパク質も存在する(step③)。RdRpにより、ウイルスのゲノムRNAを鋳型にしてマイナス鎖ゲノムRNAが合成される(step④)。マイナス鎖ゲノムRNAを鋳型に種々のウイルスタンパク質のmRNAが合成、翻訳される(step⑤)。これらのタンパク質は小胞・ゴルジ体にて修飾を受け、粒子形成に用いられる。子孫粒子はエキソサイトーシスにより、細胞外へ放出される(step⑥)。

第二章：ベータコロナウイルスに対して広範な膜融合阻害活性を示す化合物の同定

要約

ヒトでのアウトブレイクまたはパンデミックを引き起こした代表的なベータコロナウイルスとして、SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2の三種類が挙げられる。これらのウイルスの内、SARS-CoVはアウトブレイクの収束と共に感染の報告は無い。一方で、MERS-CoVは最初の報告から現在に至るまで感染報告が続いており、2023年は6件の感染が報告され、内3例は死亡している。また、SARS-CoV-2は現在までエンデミックが続いており、2024年までに累計約7億7690万人の感染が報告されている。SARS-CoV-2に対しては承認されたワクチン・抗ウイルス薬が存在しており、本邦において承認されたものを表1に示す(37)。MERS-CoVやSARS-CoVに対して活性を示すことが報告されたモダリティとしては、第一章：コロナウイルス総論に記述されたものの他にPLproに対する阻害剤(38)やMproに対する阻害剤(39)の報告があるものの、承認されたワクチンや治療薬は存在しない。そこで第一章では、これら2種類のウイルスの内、現在に至るまで散発的な感染報告があり、致死率がヒトコロナウイルスの中で最も高いMERS-CoVに対する感染阻害剤の同定を目指した。

標的タンパク質および化合物の構造情報とコンピュータ計算を利用してタンパク質—化合物間の結合ポテンシャルを評価する手法は近年一般化してきており、こうした手法は *in silico* 創薬などと呼ばれる。*in silico* 創薬の利点として、大規模な化合物ライブラリーを用いたとしてもコンピュータシミュレーションによって短期間に薬剤の種類を絞り込むことができることが挙げられる。一例として、SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス薬として本邦で承認されたエンシトレビル（一般名：ゾコーバ）もスクリーニングの段階でドッキングシミュレーションが実施されている(40)。本研究では、標的タンパク質を MERS-CoV S タンパク質の RBD とし、RBD の構造情報と東京大学創薬機構が保有する 23 万化合物の構造情報を基にしたドッキングシミュレーションを実施した。その後、ドッキングスコアの上位約 1000 種類の化合物を対象として、VSV シュードタイプウイルス系を用いた MERS-CoV の感染阻害実験を行った。最後に、感染阻害実験にて有意に感染を抑制したヒット化合物を対象に、MERS-CoV S タン

パク質を介した膜融合の阻害能を評価した。最後に、膜融合阻害能評価にて有意に感染を抑制したヒット化合物を用いて、SARS-CoV または SARS-CoV-2 Sタンパク質を介した膜融合の阻害能までを検証した。その結果、MERS-CoV・SARS-CoV・SARS-CoV-2 全ての膜融合を阻害する化合物として、3種類の化合物を同定した。

表 1：本邦において緊急承認/承認されたワクチン・治療薬

ワクチン 製品名		モダリティ
スパイクバックス (moderna)	mRNA ワクチン	
コミナティ (Pfizer)	mRNA ワクチン	
コスタイベ (明治製菓ファルマ)	mRNA ワクチン	
ダイチロナ (第一三共)	mRNA ワクチン	
ヌバキソビッド (Novavax)	組み換えタンパクワクチン	
コブコーズ (塩野義製薬)	組み換えタンパクワクチン	
バキスゼブリア (Astrazeneca)	ウイルスベクターワクチン	
ジェコビデン (janssen)	ウイルスベクターワクチン	

抗ウイルス薬 製品名		標的部位	モダリティ
ベルクリー (Gilead)	RdRp		低分子化合物
ラブゲリオ (MSD)	RdRp		低分子化合物
ゼビュディ (GlaxoSmithKline)	S タンパク質		抗体
ロナプリーブ (Regeneron Pharmaceuticals)	S タンパク質		抗体
エバシエルド (Astrazeneca)	S タンパク質		抗体
パキロビッド (Pfizer)	Mpro		低分子化合物
ゾコーバ (塩野義製薬)	Mpro		低分子化合物

方法・材料

ドッキングシミュレーション

MERS-CoV S タンパク質と低分子化合物のドッキングアルゴリズムには、産総研の福西らが開発した myPresto (http://presto.protein.osaka-u.ac.jp/myPresto4/index_e.html) の sievgene29 を *in silico* スクリーニングに使用した(41)。まず、化合物ライブラリーの準備として、LigPrep (Schrödinger, LLC, NY, USA) を使用して、東京大学創薬機構から提供を受けた約 23 万個の化合物データベースについて、ドッキングに供するために 2 次元から立体構造の生成、不要な構造の排除、互変異性体の生成、荷電基の中和、5 - 9 の範囲の pH に対する配位子構造付加、最適化等を行った。次に、標的とするウイルスタンパク質側の準備として、POCASA 1.1 を用いて Cavity 検出を行った(42)。この結果、MERS-CoV S タンパク質 RBD 上に Cavity を設定した。抽出された Cavity を、sievgene にてサーチポケットに設定して、modeFRONTIER (ESTECO CO., Trieste, Italy) を用いて Linux ベースのコンピュータクラスター上の sievgene にジョブを投入し、並列化計算を実施した。設定したそれぞれの化合物ライブラリーについて Cavity にドッキングを行い、ドッキングスコアを計算した。仮想スクリーニングは、北海道大学情報基盤センター (<http://www.iic.hokudai.ac.jp/>) の XL サーバの 4 プロセッサ Linux ワークステーション (合計 40 コア) を用いて行った。化合物の選択には、Multiple Target Screening (MTS) 法を用いて行った(43-45)。Cavity のそれぞれのエネルギースコア上位 10000 個を抽出して、MTS 法での Target protein rank によって順位付けを行った。解析結果に基づき、それぞれ上位 1000 化合物を統合して重複する化合物は集約を行った。その結果残った 5790 化合物について、エネルギースコアによって再度順位付けを行い、上位約 1000 化合物について生物学的活性を評価するために東大創薬機構から実化合物の提供を受けた。

MERS-CoV の S タンパク質を外套させた VSV シュードタイプウイルス(VSV-ΔG-MERS-CoV-S)の作製

コラーゲンコートされた 6 well プレートに 293T 細胞を 3.0×10^5 cells/mL の濃度で 1well あたり 3 mL 播種し、一晚 5% CO₂ 37 °C の条件下でインキュベートした。この細胞に、ポリエチレンイミン(PEI)-MAX (Polysciences) を用い

て、MERS-CoV の S タンパク質をコードするプラスミドを 3 μ g トランスフェクションした。24 時間後に上清を除去後、G タンパク質の遺伝子を GFP 遺伝子に置換した VSV-G タンパク質を外套させた組換え型水疱性口内炎ウイルス (VSV) シュードウイルスを 15 分毎に細胞表面のウイルス液を振盪させながら 37°C で 1 時間感染させた (MOI 1)。次に、ウイルスを含んだ上清を除去後、2% Fetal bovine serum (FBS) を含む高グルコース Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 1 mL を用いて 2 回細胞を洗浄した。その後、2% FBS を含む高グルコース DMEM 1 mL を加え、5% CO₂, 37°C でインキュベートした。24 時間後に、細胞培養上清を 400g, 20°C で 5 分間遠心し、250 μ L ずつクライオチューブに分注して -80°C で保存した。

VSV- Δ G-MERS-S を用いた感染阻害実験

VSV- Δ G-MERS-CoV-S (MOI 0.02) と 10 μ M の化合物を、2% FBS を含む高グルコース DMEM 中で 25°C 20 分間インキュベートした。96well プレートに 1well あたり 3.0×10^4 cells で播種した Vero 細胞に VSV- Δ G-MERS-CoV-S と化合物の混合液を添加し、37°C でインキュベートした。24 時間後に蛍光顕微鏡 (BZX-710、Keyence) を用いて GFP 陽性細胞を測定した。

ベータコロナウイルスの S タンパク質を介した膜融合阻害実験

Human Embryonic Kidney (HEK) 293T 細胞をコラーゲンコートした 24 ウェルプレートに 1well あたり 1.5×10^5 cells 播種した。一晩インキュベーション後、全長の MERS-CoV S タンパク質をコードするプラスミド (0.4 μ g) と Enhanced GFP (EGFP) (0.4 μ g) を、PEI-MAX を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に、HEK 293T 細胞を PBS で 1 回 wash し、0.1% トリプシン 0.02% EDTA を含む PBS で剥がした。この細胞を 10% FBS 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む高グルコースの DMEM で懸濁した。1 $\times 10^4$ cells 分の細胞懸濁液と 10 μ M の化合物と 15 分間インキュベートした。次に、DPP4 を内在的に発現する Huh7 細胞と 37°C で 24 時間共培養した。cell-to-cell fusion は、S タンパク質と受容体がトランスで相互作用することによって起こるため、cell-to-cell fusion の程度は、蛍光顕微鏡 (BZX-710、キーエンス) を用いて、1well あたり 5 視野における EGFP 陽性領域の面積の平均値として測定した。SARS-CoV または SARS-CoV-2 の S タンパク質を介した膜融合阻害実

験は、SARS-CoV または SARS-CoV-2 の S タンパク質をコードするプラスミドと EGFP を HEK293T 細胞にトランスフェクトし、ACE2 受容体を内在的に発現する Vero/TMPRSS2 細胞と共培養した。その他の手順は MERS-CoV の場合と同じである。統計解析は Graphpad prism 10.0.2 (GraphPad Software) を用いて行った。

化合物

MERS-CoV の受容体結合部位を標的とした新規感染阻害剤のスクリーニングには、東京大学創薬機構が所有する約 23 万種の化合物の構造情報を用いた。 *in silico* スクリーニングの結果、上位に挙げられた約 1000 種類の化合物を実際に東京大学創薬機構からご分与頂き、実験に用いた。 VSV-ΔG-MERS-S を用いた感染阻害実験に化合物を用いる際には構造情報は伏せられた状態でスクリーニングを行った。二次スクリーニングのヒット化合物についてのみ化合物の構造情報を取得した。

細胞

HEK293T 細胞は HEK293 細胞由来の細胞株で SV40 large T 抗原を発現する。 Huh7 細胞は高分化ヒト肝細胞癌細胞株である(46)。 Vero/TMPRSS2 細胞は、Vero 細胞の表面に TMPRSS2 を発現させた安定発現細胞株である(47)。 Vero 細胞はアフリカミドリザルの正常腎由来細胞株である(48)。 HEK293 細胞、HEK293T 細胞、Vero/TMPRSS2 細胞、Vero 細胞は 10% の FBS (Sigma cat#172012)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco cat#15070-063) を添加した高グルコース Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Wako cat#043-30085) を用いて 37°C、5% CO₂環境下で培養した。 Huh7 細胞は 10% FBS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、2% NaHCO₃ を添加した低グルコース DMEM (Wako cat#043-30085) を用いて 37°C、5% CO₂環境下で培養した。

プラスミド

VSV-ΔG-MERS-S の作製に使用した MERS-CoV S タンパク質を発現させるプラスミドはベクターとして pKS336 を用いた(49)。また、MERS-CoV EMC/2012 株の S タンパク質全長(1354 アミノ酸)をコードしている。

膜融合阻害実験では、EGFP タンパク質の発現プラスミドを用いた。目的タンパク質を発現させるプラスミドベクターとしてヒト培養細胞発現用ベクターである pCA7 を用いた(50)。MERS-CoV の膜融合阻害実験では、VSV- Δ G-MERS-S の作製に使用したプラスミドを用いた。目的タンパク質を発現させるプラスミドベクターとして pKS336 を用いた。SARS-CoV の膜融合阻害実験では、SARS-CoV HKU39849 株の S タンパク質全長(1256 アミノ酸)のプラスミドを用いた。目的タンパク質を発現させるプラスミドベクターとして pCA7 を用いた。SARS-CoV-2 の膜融合阻害実験では、SARS-CoV-2 S タンパク質の C 末端側の 19 アミノ酸を欠失させた(1256 アミノ酸)プラスミドを用いた。

結果

MERS-CoV に対して膜融合阻害活性を保有する化合物の同定

最初に、MERS-CoV の RBD の構造情報を基に、受容体結合部位に対して化合物の *in silico* スクリーニングを行った。化合物ライブラリーには東京大学創薬機構が保有する約 23 万化合物を用いた。次に、*in silico* スクリーニングにより絞り込んだ上位 1000 位に該当する 1046 種類の化合物を用いてウイルス感染阻害実験を行った。ウイルスは、MERS-CoV S タンパク質を外套させた Vesicular Stomatitis Virus (VSV) シュードタイプウイルスを使用した。VSV はラブドウイルス科ベシキュロウイルス属の一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスで、自身のエンベロープ遺伝子が欠損している場合でもウイルス粒子を構成できる性質を持つ(51)。この性質を利用して、VSV- Δ G-MERS-CoV-S を作製した。VSV- Δ G-MERS-CoV-S はエンベロープ遺伝子を持たない一回感染性のウイルスであるため、GFP 陽性細胞数を測定することで化合物の感染阻害能を評価することが可能となる。本研究では、ウイルス感染率が DMSO のみを加えた時と比較して 50% 以下であることを感染抑制（ヒット）と定義した。その結果、50 化合物について VSV- Δ G-MERS-CoV-S 感染阻害を確認した(図 2A)。

同定した 50 化合物の中から MERS-CoV S タンパク質の機能阻害効果を示す化合物をさらに絞り込むために、膜融合阻害実験を行った。膜融合阻害実験には、MERS-CoV S タンパク質が発現した 293T 細胞と受容体 DPP4 が恒常的に発現している細胞である Huh7 細胞を共培養する方式を採用した。その結果、50 化合物の内 13 化合物は DMSO のみと比較した時の膜融合の相対的な比率が 50% 以下だった(図 2A, 2B)。13 化合物の内 6 化合物はステロイド骨格を持つ化合物という共通点が確認された。

MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2 に対する膜融合阻害の広域性の検証

次に、MERS-CoV S タンパク質を介した膜融合を阻害した 13 化合物による他のベータコロナウイルスへの膜融合阻害の広域性を検証することを目的として、SARS-CoV 及び SARS-CoV-2 S タンパク質を用いた膜融合阻害実験を行った。SARS-CoV または SARS-CoV-2 S タンパク質を一過性に発現させた 293T 細胞と SARS-CoV および SARS-CoV-2 の受容体 ACE2 が恒常的に発現している細胞である Vero/TMPRSS2 細胞を用いた。その結果、13 化合物の内 3 化合物

は MERS-CoV、SARS-CoV 及び SARS-CoV-2 S タンパク質を介した膜融合を全て阻害した (図 3A, 3B)。10 化合物は MERS-CoV と SARS-CoV の膜融合のみ阻害した。3 化合物の内 2 化合物はステロイド骨格を持つ化合物、残り 1 化合物はポリエタノールイオノフォア的一种である X-206 だった (図 3C)。

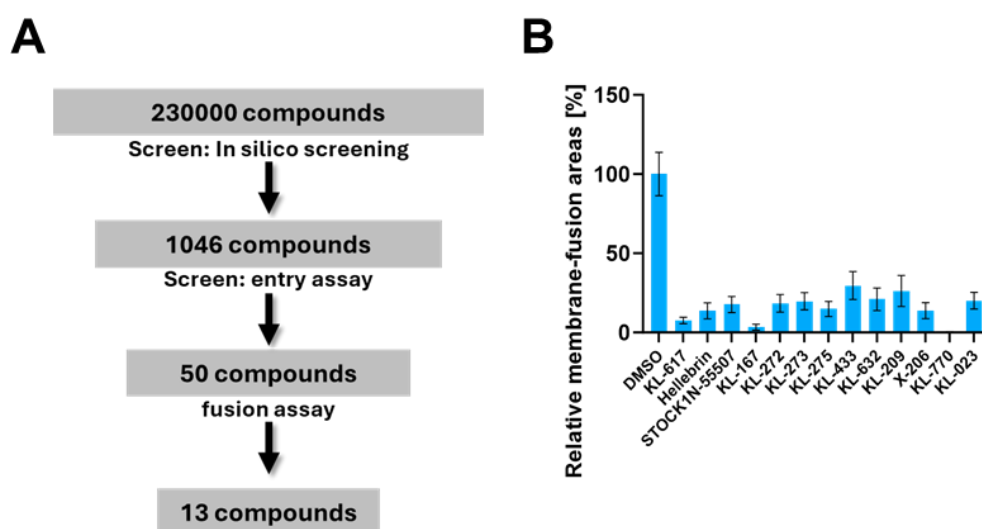


図 2. MERS-CoV-S タンパク質を介した膜融合に対する阻害化合物 (A) MERS-CoV-S タンパク質に対する膜融合阻害剤を同定するためのスクリーニングフローチャート。まず、インシリコスクリーニングにより 230000 化合物から選択された 1046 化合物を用いて VSV- Δ G-MERS-CoV-S の感染阻害実験を行った。Vero 細胞に GFP 組換え VSV- Δ G-MERS-CoV-S を各化合物の存在下で 24 時間感染させ、その後蛍光顕微鏡下で GFP 陽性細胞数をカウントした。次に、ウイルスの侵入を 50% 以上阻害する 50 種類の化合物を対象として、MERS-CoV-S タンパク質を用いた膜融合阻害実験を行った。MERS-CoV-S タンパク質を発現する 293T 細胞と DPP4 を発現する Huh7 細胞を共培養する手法を用いている。その結果、13 種類の化合物が MERS-CoV-S タンパク質に対する膜融合阻害剤として同定された。**(B)** 13 種類のヒット化合物による MERS-CoV-S タンパク質を介した膜融合阻害能を定量した。膜融合の面積 [μm^2] は、蛍光顕微鏡で撮影した 1 ウェルあたり 5 枚の画像を用いて、DMSO の群に対する膜融合の相対比率を算出した。膜融合の相対比率は平均値 $\pm$ SD で示した。

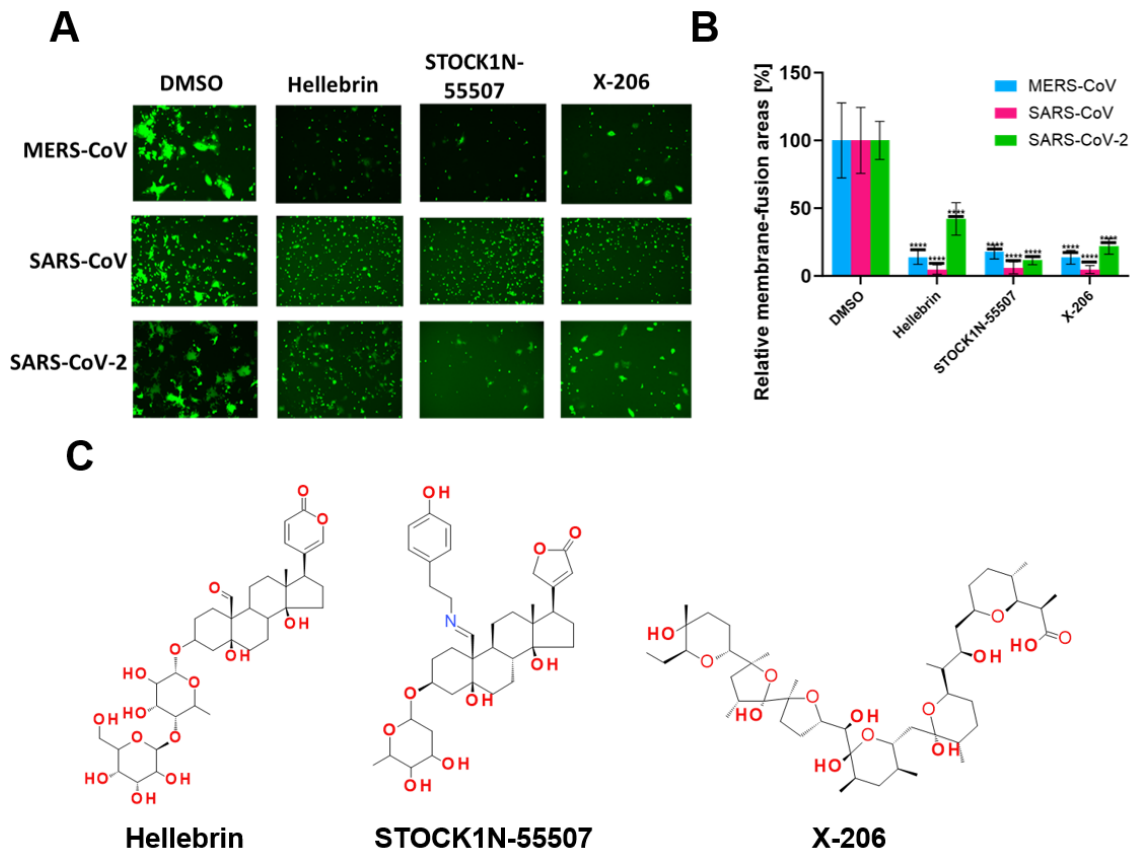


図 3. MERS-CoV、SARS-CoV および SARS-CoV-2 による膜融合に対して広域性を示す阻害剤 (A) MERS-CoV の S タンパク質に対する 3 種類の膜融合阻害剤は、SARS-CoV および SARS-CoV-2 のそれに対する合胞体形成を阻害した。EGFP と SARS-CoV または SARS-CoV-2 の S タンパク質をコードするプラスミドを共導入した 293T 細胞を、各化合物の存在下で Vero/TMPRSS2 細胞と共培養した。24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した代表的な画像を示す。(B) MERS-CoV、SARS-CoV、または SARS-CoV-2 の S タンパク質による細胞間融合の面積を、各 well 5 枚の画像を撮影して定量した。相対的な膜融合の面積を平均値 $\pm$ SD で示した。DMSO 処理細胞に対する統計学的に有意な差は、two-way ANOVA 検定と Dunnett 多重比較検定によって決定した。(C) SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 の S タンパク質による細胞間融合を阻害した 3 種類の化合物の構造。

第三章：汎ベータコロナウイルス膜融合阻害活性を示す化合物と類似構造を保有する化合物の感染阻害能評価

要約

第二章での実験の結果として、我々は SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 に対する広域な膜融合阻害活性を示す 3 種類の化合物 Hellebrin、STOCK1N-55507、X-206 を同定した。一方で、これらの化合物の VSV- Δ G-MERS-CoV-S に対する IC₅₀ 値とドッキングシミュレーションのスコアの高さに乖離があったことから、ドッキングシミュレーションの評価で活性を有しないと判定された化合物中にも SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 に対する広域な膜融合阻害活性を示すものがある可能性が想定された。そこで我々は、東京大学創薬機構が保有する約 23 万種類の化合物から Hellebrin、STOCK1N-55507、X-206 と類似構造を持つ化合物を抽出し、それらを対象としたシュードウイルスおよび臨床分離株のウイルスを用いた感染阻害実験を実施した。

化合物の構造の類似度の評価には谷本係数と呼ばれる指標がよく用いられている。本研究では、谷本係数が 0.6 以上のものを構造類似性の高い化合物と定義し、Hellebrin、STOCK1N-55507、X-206 の類縁体として 309 種類の化合物を選択した。次に、VSV- Δ G-MERS-CoV-S および、SARS-CoV または SARS-CoV-2 の S タンパク質を外套させた VSV シュードタイプウイルス(VSV- Δ G-SARS-S または VSV- Δ G-SARS-CoV-2-S) を用いた感染阻害実験を実施した。最後に、VSV- Δ G-SARS-CoV-2-S を用いた感染阻害実験によるヒット化合物とリード化合物を用いて、実際の SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 を対象とした感染阻害能評価を実施した。その結果、Thapsigargin と X-206 に二種類の化合物が SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 の臨床分離株に対する広域な抗ウイルス活性を示した。従って、Thapsigargin もまた、SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 に対する広域な膜融合阻害能を保有することを解明した。

方法・材料

SARS-CoV (VSV- Δ G-SARS-S) または SARS-CoV-2 (VSV- Δ G-SARS-2-S) の S タンパク質を外套させた VSV シュードタイプウイルスの作製

コラーゲンコートされた 6 well プレートに 293T 細胞を 3.0×10^5 cells/mL の濃度で 1well あたり 3 mL 播種し、一晩 5% CO₂ 37°C の条件下でインキュベートした。この細胞に、PEI-MAX を用いて、SARS-CoV または SARS-CoV-2 の S タンパク質をコードするプラスミドを 3 μ g トランスフェクションした。以降の手順は第 1 章 方法・材料項目の” MERS-CoV の S タンパク質を外套させた VSV シュードタイプウイルス(VSV- Δ G-MERS-S)の作製”と同様である。

VSV- Δ G-MERS-S・VSV- Δ G-SARS-S・VSV-SARS-CoV-2-S を用いた感染阻害実験

96well プレートに 1well あたり 3.0×10^4 cells で播種した Vero/TMPRSS2 細胞にウイルスを感染させた。詳細な手順は、第 1 章 方法・材料項目の” VSV- Δ G-MERS-S を用いた感染阻害実験”に従う。

MTT 試験

MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) 試験は、代謝活性の高い生細胞中での還元作用により、MTT から産生されるホルマザンの量を測定することにより、細胞の生存率と増殖の程度を決定する。Vero/TMPRSS2 細胞に MERS-CoV および SARS-CoV、SARS-CoV-2 祖先株 (WK-521)、Delta、BA.5 または XBB.1 (4–10 median Tissue Culture Infective Dose (TCID₅₀)) を感染させ、候補化合物および 1 μ M の P-gp 阻害剤 CP-100356 と 2% FBS を含む MEM (Gibco) 中で 2-3 日間培養した。MTT 試薬 (5mg/mL; ナカライテスク社製) をウイルス感染細胞に添加した 4 時間後に上清を除去し、細胞溶解液 (10% Triton-X100 および 0.31% HCl を含む 2-プロパノール) を添加した。マイクロプレートリーダー (Multiskan microplate reader, Thermo Fisher Scientific) を用いて、細胞溶解サンプルの 570 nm および reference 波長 630 nm の吸光度を測定し、細胞の生存率と増殖を評価した。50% 阻害濃度 (IC₅₀) は、GraphPad Prism 10.0.2 (GraphPad Software) で算出した。

SARS-CoV・MERS-CoV・SARS-CoV-2 の S タンパク質を介した膜融合阻害実験

第二章のベータコロナウイルスの S タンパク質を介した膜融合阻害実験と同様の手順で行った。本章では、Thapsigargin を 3, 1, 0.1 μM の 3 濃度で評価し、X-206 を 1, 0.1, 0.01 μM の 3 濃度で評価した。

化合物

谷本係数は、化合物の分子構造をフィンガープリントに直し、フィンガープリント同士の類似度を計算した指標である。化合物の分子構造をバイナリビット (0 または 1) や数値の形式で表示し、それら部分構造の一致率を算出する。その一例を以下に示す。

fp_x (x=1,2,...5) はある部分構造を定義していて、fp_x が構造中に存在する場合は、1。存在しない場合は 0 とフィンガープリントを定義する。

	fp1	fp2	fp3	fp4	fp5
化合物 A	1	0	1	1	1
化合物 B	0	1	1	0	1

谷本係数は、(化合物 A と B 両方に存在する部分構造の数)/(化合物 A または B に存在する部分構造の数)と定義される。したがって、上記のテーブルの数値に従うと、化合物 A と B の間の谷本係数は、 $2/5=0.4$ となる。

第一章の” MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2 に対する膜融合阻害の広域性の検証” のパートにて、3 種のベータコロナウイルス全てに対して膜融合阻害能を示した化合物 3 種類と東大創薬機構が保有する約 23 万化合物の構造を比較した。それにより、3 種類の化合物それぞれに対して谷本係数が 0.6 以上の化合物を 309 種類選定した。VSV シュードタイプウイルスによる評価および実際の SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 を用いた感染阻害能評価を行い、効果が確認できた化合物についてのみ化合物の構造情報を取得した。

プラスミド

VSV- Δ G-SARS-S または VSV- Δ G-SARS-2-S の作製に使用したプラスミドは

膜融合阻害実験に使用した SARS-CoV または SARS-CoV-2 のプラスミドと同様のものである。SARS-CoV・MERS-CoV・SARS-CoV-2 の S タンパク質を介した膜融合阻害実験で用いたプラスミドは、第二章と同様のプラスミドコンストラクトである。

ウイルス

SARS-CoV ハノイ株は長崎大学から提供された (52)。MERS-CoV EMC2012 株は、Erasmus University Medical Center (10)から提供された。SARS-CoV-2 株 WK-521 (Ancestral、Pango 系統 : A、GISAID : EPI_ISL_408667)、TY11-927 (Delta、Pango 系統 : B.1.617.2, GISAID: EPI_ISL_2158617) , TY41-702 (オミクロン, パンゴ系統 : BA.5, GISAID: EPI_ISL_13241867) , TY41-795 (オミクロン, パンゴ系統 : XBB.1、GISAID:EPI_ISL_15669344)の臨床分離株は国立感染症研究所 (NIID)から提供された。ワーキングストックを調製するために、ウイルスを Vero 細胞または Vero/TMPRSS2 細胞で増殖させ、ウイルス力価の測定には TCID₅₀ 値を採用した。

結果

VSV シュードタイプウイルスを用いた汎ベータコロナウイルス膜融合阻害活性を示す化合物の類似構造を保有する化合物の感染阻害能評価

MERS-CoV、SARS-CoV 及び SARS-CoV-2 S タンパク質を介した膜融合全てを阻害した化合物の構造情報に基づき、東京大学創薬機構の保有する化合物ライブラリーから類似の構造を示す 309 化合物を抽出し、類縁体スクリーニングを行った。VSV- Δ G-MERS-CoV-S、VSV- Δ G-SARS-CoV-S および VSV- Δ G-SARS-CoV-2-S 感染感受性細胞の Vero-TMPRSS2 細胞を用いて感染阻害実験（1次スクリーニングと2次スクリーニング）を行い、それぞれ37種類、52種類、41種類の化合物で感染阻害能の再現性が確認できた(図 4A, 4B)。この内、23 種の化合物は VSV- Δ G-MERS-CoV-S、VSV- Δ G-SARS-CoV-S、VSV- Δ G-SARS-CoV-2-S の全ての感染を阻害した。3 種の化合物は、VSV- Δ G-MERS-CoV-S の感染のみを阻害した。13 種類の化合物は、VSV- Δ G-SARS-CoV-S の感染のみを阻害した。1 種類の化合物は、VSV- Δ G-SARS-CoV-2-S の感染のみを阻害した (図 4B)。

臨床分離株の SARS-CoV・MERS-CoV・SARS-CoV-2 に対する類縁体の感染阻害効果の評価

VSV- Δ G-SARS-CoV-2-S を用いた類縁体スクリーニングで感染阻害能を示した化合物 41 種の臨床分離株のウイルスに対する感染阻害能を評価するために、我々は SARS-CoV-2 と Vero/TMPRSS2 細胞を用いた MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) 試験を行った。類縁体スクリーニングのヒット化合物 41 種類（リード化合物 1 種を含む）とリード化合物 2 種を合わせた 43 種類の化合物の内、Thapsigargin と X-206 は SARS-CoV-2 感染阻害能を示した。Thapsigargin は IC_{50} 値が 19.7 nM、X-206 は IC_{50} 値が 6.6 nM だった (図 5A)。

更に、MERS-CoV および SARS-CoV に対する交差反応性も臨床分離株のウイルスを用いて検証した。その結果、Thapsigargin と X-206 は、SARS-CoV および MERS-CoV 両方に対しても抗ウイルス活性を示した。SARS-CoV および MERS-CoV に対する Thapsigargin の IC_{50} 値は、それぞれ 15.3 nM、38.7 nM だった。SARS-CoV、MERS-CoV に対する X-206 の IC_{50} 値は、それぞれ 11.5 nM、

8.9 nM だった。モルヌピラビルの活性体である β -D-N4-ヒドロキシシチジン (NHC) (53, 54) 存在下での上清中のウイルス量を、Thapsigargin および X-206 存在下での上清中のウイルス量と比較したところ、X-206 は 3 つのベータコロナウイルスすべてに対して最も高いウイルス力価低下効果を示した (図 5C)。一方、Thapsigargin は SARS-CoV と MERS-CoV に対しては NHC よりも高いウイルス力価低下効果を示したが、SARS-CoV-2 に対しては同程度であった (図 5C)。Thapsigargin は狭い濃度変化で急激なウイルス力価低下を示した。しかし、X-206 は Thapsigargin よりも比較的緩やかな用量依存的なウイルス力価低下を示した。

これらの結果より、Thapsigargin と X-206 は 3 種の臨床分離株のコロナウイルス全てに対して抗ウイルス活性を保有しており、更に感染細胞上清中のウイルス量の減少も示した。また、抗ウイルス活性は X-206 の方がより強い活性を示した。

X-206 のベータコロナウイルスに対する膜融合阻害効果は、この研究で確認した (図 2B)。しかし、低濃度での膜融合の阻害作用は不明である。そこで、1, 0.1, 0.01 μ M で X-206 を添加した際の膜融合阻害効果を検証した。その結果、1 μ M では MERS-CoV, SARS-CoV および SARS-CoV-2 の S タンパク質を介した膜融合すべてを阻害した。一方、0.1 μ M では MERS-CoV および SARS-CoV-2 のみ阻害した (図 5D)。Thapsigargin は SARS-CoV-2 の膜融合阻害効果が報告されているが、他のベータコロナウイルスに対する広域性は不明だった(55)。そこで、同様に膜融合阻害実験を行った。その結果、Thapsigargin は、MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2 全ての膜融合を阻害した (図 5D)。従って、SARS-CoV-2 の感染を阻害した 2 種類の化合物は SARS-CoV-2 細胞侵入時の膜融合に作用し、かつ、ベータコロナウイルスの膜融合を広範に阻害する可能性がある。

SARS-CoV-2 懸念すべき変異株(variants of concern: VOC)に対する Thapsigargin と X-206 の抗ウイルス活性の評価

Thapsigargin と X-206 による SARS-CoV-2 VOC への抗ウイルス活性を検証するため、我々は delta、omicron BA.5、omicron XBB.1 の臨床分離株を用いた MTT 試験を実施した。その結果、Delta、BA.5、XBB.1 それぞれに対する Thapsigargin の IC₅₀ 値は、227.3 nM, 81.8 nM, 73.6 nM だった (表 2)。更に、

delta、omicron BA.5、omicron XBB.1 それぞれに対する X-206 の IC₅₀ 値は、52.5 nM, 9.4 nM, 30.2 nM だった (表 2)。祖先株に対する Thapsigargin の IC₅₀ 値は 19.7 nM であるため、Thapsigargin は祖先株と比較すると VOC に対してわずかに減弱した抗ウイルス活性を示すことが示唆された。また、X-206 の祖先株に対する IC₅₀ 値は 6.6 nM である。X-206 は祖先株と同程度の活性を BA.5 でも示しており、delta および omicron XBB.1 に対する活性はやや減弱するものの十数 nM 程度の活性を有していた。これらの結果は、Thapsigargin および X-206 が祖先株だけでなく VOC に対しても広範な阻害活性を示すことを示唆している。

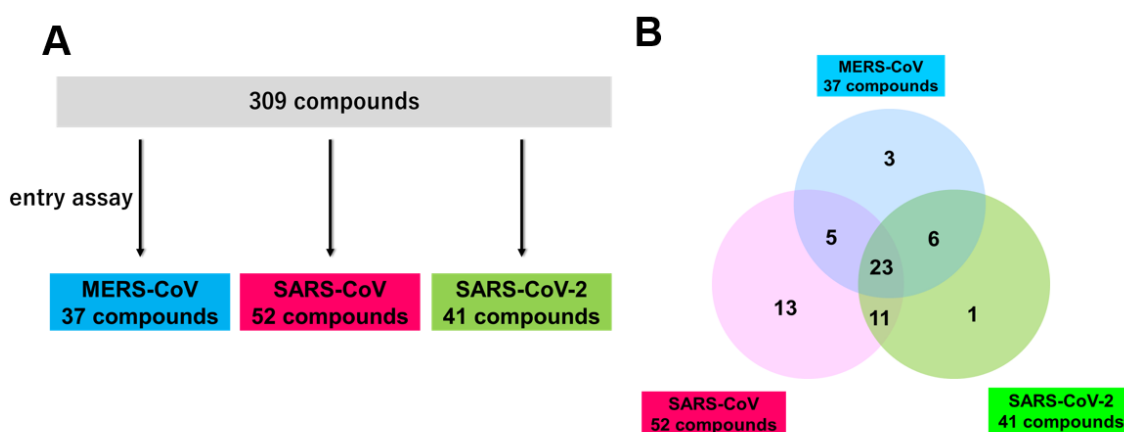


図 4. MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2 に対する広域膜融合阻害剤の誘導体スクリーニング。(A) MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2 の侵入を阻害する誘導体のスクリーニングフローチャート。感染阻害試験は、図 1A に記載したものと同一手順で行った。GFP 組換え VSV-ΔG-MERS-CoV-S、VSV-ΔG-SARS-CoV-S、VSV-ΔG-SARS-CoV-2-S を用いて行った。(B) 各シェードタイプウイルスの感染を阻害したヒット化合物の数を、2 つまたは 3 つのベータコロナウイルスの重複を含めて、ベン図に示した。

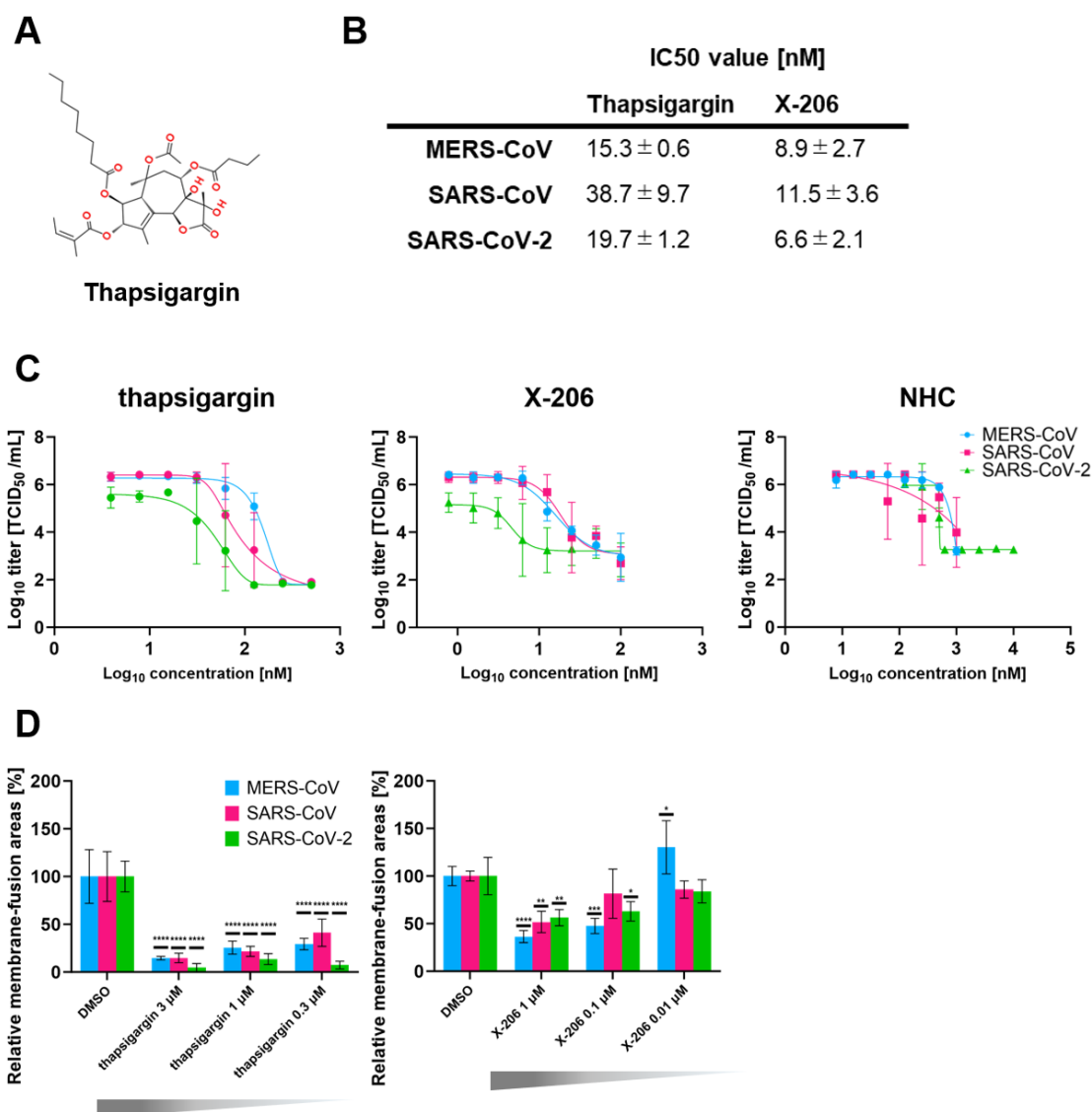


図 5. MERS-CoV、SARS-CoV および SARS-CoV-2 感染に対する広域抗ウイルス活性。(A) Thapsigargin の構造。(B) 臨床分離株の MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2 に対する Thapsigargin と X-206 の IC₅₀ 値。値は平均値 ± SD で示した。Vero/TMPRSS2 細胞を、Thapsigargin または X-206 の存在下で、実際の MERS-CoV、SARS-CoV、または SARS-CoV-2 に感染させた。IC₅₀ 値は、MTT 試験での同一ウイルス量の 3 つの異なる実験の平均値として算出した。(C) 図 5B で行った実験の細胞培養上清中のウイルス力価を各濃度でプロットした。(D) Thapsigargin (左) または X-206 (右) 存在下での膜融合阻害実験は、図 2B と同じ手順に従い、Vero/TMPRSS2 細胞を用いて、三重条件の実験として行った。相対的な膜融合の面積 (relative membrane-fusion area [%]) は平

均±SD で示した。DMSO 処理細胞に対する統計的に有意な差は、two-way ANOVA 検定と Dunnet 多重比較検定によって決定した。**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$.

	IC ₅₀ 値 [nM]	
	Thapsigargin	X-206
Delta	227.3 ± 9.2	52.5 ± 10.7
BA.5	81.8 ± 3.8	9.4 ± 1.9
XBB.1	73.6 ± 5.1	30.2 ± 1.3

表2 SARS-CoV-2 VOC に対する Thapsigargin と X-206 の抗ウイルス活性

SARS-CoV-2 変異株である delta、BA.5、XBB.1 に対する Thapsigargin と X-206 の IC₅₀ 値。値は平均値±SD で示した。

第四章：X-206 が阻害するウイルス生活環のステップの同定

要約

抗ウイルス薬は、様々な阻害機序によって活性を示すことが知られている。一例として、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の場合は、HIV が細胞内で増殖する際に必須の酵素である逆転写酵素に対する阻害剤が承認されている。複製に必須の酵素である逆転写酵素や RdRp を阻害する化合物は、核酸アナログ (Nucleoside reverse transcriptase inhibitor: NRTI) と非核酸系の化合物 (Non-Nucleoside reverse transcriptase inhibitor: NNRTI) の二種類に大別される。また、ウイルスのプロテアーゼに対する阻害剤も HIV 等で承認されている。そして、ウイルスの細胞侵入を阻害する抗 HIV 薬として、マラビクロ (CCR5 阻害剤) が本邦で承認されている。第一章で記述したように、COVID-19 パンデミックに伴い、SARS-CoV-2 に対しても多くの抗ウイルス薬開発が行われた。実際に承認に至った化合物は、RdRp に対する核酸系阻害剤と Mpro に対する阻害剤、そして細胞侵入を阻害する S タンパク質に対する中和抗体の三種類に分類される。

抗ウイルス薬における課題は、薬剤耐性変異の出現である。特に、HIV のように抗ウイルス薬の長期服用が必要となるウイルスの場合、薬剤耐性ウイルスの出現を防ぐために、作用機序の異なる化合物を組み合わせる使用が多い。本邦では、NRTI 2 剤とインテグラーゼ阻害剤 (Integrase inhibitor: INSTI) 1 剤、NRTI 1 剤と INSTI 1 剤、NRTI 2 剤とプロテアーゼ阻害剤 (Protease inhibitor: PI) 1 剤、NRTI 2 剤と NNRTI 1 剤のいずれかの組み合わせの選択が推奨されている(56)。従って、同定化合物の作用機序の解明や既存の承認薬との併用可能性の検討は効果的な治療法の創出において重要な点である。

第三章では、実際の SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 に対する感染阻害効果を示した化合物として、X-206 と Thapsigargin の二種類を同定した。また、これらの化合物は、数十 nM~1 μ M の濃度で三種類のベータコロナウイルスによる膜融合の阻害活性を有することを解明した。一方で、これらの化合物の内、特に X-206 は数十 nM の IC₅₀ 値を三種類のベータコロナウイルスおよび SARS-CoV-2 変異株である Delta、BA.5、XBB.1 に対して示すことから、より

低濃度での感染阻害メカニズムの検証が必要である。そこで我々は最初に、既存の承認薬であるレムデシビルやニルマトレルビルに耐性を示す株に対する X-206 の抗ウイルス活性を評価した。X-206 と同様に polyether ionophore に属し、コクシジウムに対する抗菌薬として用いられているサリノマイシンも試験を行った。次に、X-206 を細胞へ添加するタイミングを変えた感染阻害実験と X-206 を添加した感染細胞におけるウイルス RNA 量とウイルスタンパク質の量の解析を行った。その結果、X-206 は、ウイルス RNA の合成またはウイルスタンパク質の翻訳の阻害活性に加え、高濃度では膜融合阻害による細胞侵入の阻害活性を保有していた。最後に、X-206 とレムデシビル、または X-206 とニルマトレルビルを併用した場合のシナジー効果を培養細胞レベルで評価した。その結果、いずれの組み合わせにおいても相加的な効果を示していた。

方法・材料

薬剤耐性ウイルスを用いた X-206 の感染阻害評価

感染細胞として、293T-ACE2 細胞を使用した。また、SARS-CoV-2 ガンマ、nsp5 遺伝子の Mpro に L167F 変異を保有するニルマトレルビル耐性型のガンマ (57)、SARS-CoV-2 祖先株、および nsp12 遺伝子の RdRp に C799W 変異を保有するレムデシビル耐性型の祖先株を感染阻害実験に使用した。感染時のウイルス力価は 2-5 TCID₅₀ とし、実験手順は、第三章 方法・材料項目の ”MTT 試験“ に従った。

X-206 を細胞へ添加するタイミング依存的な感染阻害能の評価

・ タイミング条件 1 の感染阻害実験

X-206 : 800 nM・5 μ M、サリノマイシン : 800 nM、ニルマトレルビル : 500 nM、レムデシビル : 200 nM、REGN10933 : 0.2 μ g/mL と、20 TCID₅₀ のウイルス力価に調製したウイルスとの混合液を、2% FBS (gibco) を含む MEM (gibco) を用いて作製し、Vero/TMPRSS2 細胞に 37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間感染させた。PBS で 3 回洗浄した後、化合物 (X-206 : 5 μ M, 800 nM、サリノマイシン : 800 nM、ニルマトレルビル : 500 nM、レムデシビル : 200 nM、REGN10933 : 0.2 μ g/mL) と 2% FBS を含む MEM の存在下で 12 時間培養し、RT-qPCR で上清中のウイルス量を定量した。

・ タイミング条件 2 の感染阻害実験

PBS での wash 作業より以前は、タイミング条件 1 の感染阻害実験と同様である。PBS での Wash 後は、化合物を含まない培地で 12 時間培養し、RT-qPCR で上清中のウイルス量を定量した。

・ タイミング条件 3 の感染阻害実験

化合物の非存在下で細胞をウイルスに 1 時間感染させ、その後培地を交換し、化合物 (X-206 およびサリノマイシン : 800 nM、ニルマトレルビル : 500 nM、レムデシビル : 200 nM、REGN10933 : 0.2 μ g/mL) の存在下で細胞を培養した。細胞は 1 μ M の P-gp 阻害剤 CP-100356 存在下で培養した。培養から 12 時

間後に、RT-qPCR で上清中のウイルス量を定量した。

RT-qPCR

異なる濃度の化合物存在下で細胞内のウイルス RNA レベルを測定するために、Vero/TMPRSS2 細胞に SARS-CoV-2 祖先株 (MOI 0.1) を感染させ、サリノマイシンまたは X-206 の存在下で 24 時間培養した。感染細胞から PureLink Pro 96 Viral RNA/DNA Kit (Invitrogen 社製) を用いて全 RNA を抽出し、QuantStudio 7 Flex Real-time PCR system (Applied Biosystems 社製) で EXPRESS One-Step Superscript qRT-PCR Kit (Invitrogen 社製) を用いて qRT-PCR で解析した。霊長類以外の Actb 遺伝子および SARS-CoV-2 N 遺伝子を標的とするプローブおよびプライマーは、以前に記載されている(58, 59)。ウイルス RNA 量は Actb mRNA 量に対して正規化し、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。

ウェスタンブロッティング

免疫ブロットのために、感染細胞を溶解バッファー (1% NP-40, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, cOmplete ULTRA protease inhibitor cocktail [Roche Diagnostics]) で溶解した。ライセートサンプルを SDS-PAGE を行い、抗 SARS-CoV-2 N 抗体 (GTX635679; GeneTex) または抗 β -アクチン抗体 (PM053-7; MBL) を用いてイムノ ブロッティングを行った。免疫複合体は Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Merck) を用いて Amersham ImageQuant 800 (Cytiva) 上で検出した。

X-206 と SARS-CoV-2 に対する既存薬による感染阻害の相乗効果の検証

Vero/TMPRSS2 細胞と、96 ウェルプレートで連続希釈した X-206 とレムデシビルまたはニルマトルビルを含んだ SARS-CoV-2 祖先株の混合液を共培養した。感染から 3 日後、細胞を MTT で染色し、10% Triton X と 0.28% HCl を含む 2-プロパノールで溶解した。各 well の細胞生存率は、570 nm の吸光度と 630 nm の吸光度に基づいて計算した。化合物による処理がされていない感染細胞および非感染細胞の吸光度を、それぞれ 0% と 100% の細胞生存率のベースラインとした。組み合わせ指数 (CI) 値は以下の式で計算した: $CI = (D_{A/A+B}) / D_A + (D_{B/A+B}) / D_B + (D_{A/A+B} \times D_{B/A+B}) / (D_A \times D_B)$ 。 D_A は、X-206 の IC_{50} 値、 D_B は、レムデシビルまたはニルマトレルビルの IC_{50} 値、 $D_{A/A+B}$

D_B は、レムデシビルまたはニルマトレルビルと組み合わせた際の X-206 の IC_{50} 値、 $D_{B/A+B}$ は、X-206 と組み合わせた際のレムデシビルまたはニルマトレルビルの IC_{50} 値である(60, 61)。アイソボログラムプロットでは、 $(D_{A/A+B}) / D_A$ を x 軸にプロットし、 $(D_{B/A+B}) / D_B$ を y 軸にプロットした。併用効果は以下の基準で判定した： $CI \leq 0.8$ 、相乗作用； $0.8 < CI < 1.2$ 、相加作用； $CI \geq 1.2$ 拮抗作用。

化合物

ニルマトレルビルおよびサリノマイシンは塩野義製薬株式会社で合成された。Remdesivir は MedChemExpress から入手した。REGN10933 は Cell Sciences 社から入手した。P-gp 阻害剤 CP-100356 は Santa Cruz Biotechnology 社から入手した。X-206 は東京大学創薬機構から取得した。

細胞

ヒト ACE2 を安定的に発現する 293T-ACE2 細胞は、以前に記載されたように樹立され(62)、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液を含む DMEM 中で維持された。

ウイルス

COVID-19 患者からの臨床分離株である TY7-501(Gamma, Pango Lineage: P.1, GISAID: EPI_ISL_833366)は国立感染症研究所(NIID)から提供された。

結果

SARS-CoV-2 のレムデシビル耐性株およびニルマトレルビル耐性株に対する X-206 の抗ウイルス活性評価

複数の SARS-CoV-2 変異株に対して強力な感染阻害活性を示した X-206 の作用機序を解明するために、我々は X-206 および X-206 と同じ polyether ionophore であるサリノマイシンを用いた COVID-19 既存薬に対する耐性株の感染阻害実験を行った(図 6A)。本研究では、RdRp に作用するレムデシビルの耐性株および Mpro に作用するニルマトレルビルの耐性株を使用している。レムデシビル耐性株は祖先株、ニルマトレルビルはガンマ由来の株である。X-206 のレムデシビル耐性株に対する IC₅₀ 値は 9.3 nM だった。さらに、祖先株に対する IC₅₀ 値は 10.3 nM だった(図 6B)。同様の結果はサリノマイシンでも得られた。サリノマイシンのレムデシビル耐性株に対する IC₅₀ 値は 18.4 nM だった。祖先株に対する IC₅₀ 値は 18.6 nM であった。一方で、レムデシビルの祖先型に対する IC₅₀ 値は 5.0 nM であるのに対し、レムデシビル耐性株に対する IC₅₀ 値は 28.8 nM だった。従って、X-206 はレムデシビル耐性変異による抗ウイルス活性の減弱を示さないことが分かった。同様の実験をニルマトレルビル耐性株で実施した。その結果、X-206 のニルマトレルビル耐性株に対する IC₅₀ 値は 7.3 nM だった(図 6C)。ガンマに対する IC₅₀ 値は、10.2 nM だった。サリノマイシンも同様の結果であり、ニルマトレルビル耐性株に対する IC₅₀ 値は 19.8 nM だった。ガンマに対する IC₅₀ 値は、23.9 nM だった。一方で、ニルマトレルビルのガンマに対する IC₅₀ 値は 32.4 nM であるのに対し、ニルマトレルビル耐性株に対する IC₅₀ 値は 68.7 nM だった。これらの結果は、polyether ionophore が既存の治療薬と異なる経路で感染を阻害することで、高い抗ウイルス活性と広域性を実現していることを示唆している。

X-206 の添加タイミング依存的な SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス活性評価

X-206 がウイルスの生活環のどの過程に作用して強力な抗ウイルス活性を発揮しているのかを解明するため、様々な化合物添加タイミングの条件で実際の SARS-CoV-2 を用いた感染阻害実験を実施した。培養上清中のウイルス RNA 量をもとに、3 パターンの添加タイミングにおける感染阻害率を算出した。3 つの添加タイミングの条件は次の通りである(図 6D)。条件 1：細胞への感染前に

X-206 とウイルスを常温で 15 分間静置後に、ウイルスを 1 時間細胞に感染させる。その後、X-206 の含まれていない培地に交換する。条件 2：細胞への感染前に X-206 とウイルスを常温で 15 分間静置後に、ウイルスを 1 時間細胞に感染させる。その後、X-206 が含まれた培地に交換する。条件 3：感染前の X-206 とウイルスの反応処理は行わずウイルスを 1 時間細胞に感染させる。その後、X-206 が含まれた培地に交換する。条件 1 から条件 3 全てで、培養上清中のウイルス RNA 量の測定は感染から 12 時間後とする。細胞侵入の段階を阻害する化合物の場合は、条件 1 で強い感染阻害能が見られる。一方で、複製ステップを阻害する化合物の場合は、条件 2 または 3 の条件で強い感染阻害能が見られる。本研究では、細胞侵入阻害剤のコントロールとして中和抗体 REGN10933 を用いた。また、複製以降のステップを阻害する化合物のコントロールとして、レムデシビルおよびニルマトレルビルを用いた。添加時の化合物の濃度は、それぞれ次の通りである。X-206 は 5 μ M または 800 nM で添加した。サリノマイシンは 800 nM で添加した。ニルマトレルビルは 500 nM で添加した。レムデシビルは 200 nM で添加した。中和抗体 REGN10933 は 0.2 μ g/mL の濃度で添加した。X-206 (800 nM) とサリノマイシンは条件 1 では感染阻害を示さなかった(図 6E)。一方で、条件 2 および 3 では感染阻害を示した。このような阻害傾向は、複製以降のステップを阻害するレムデシビルやニルマトレルビルと同様であった。また、X-206 を 5 μ M 添加した場合、X-206 は条件 1 でも感染阻害を示した。この結果は、X-206 が高濃度では膜融合阻害活性を示す結果と一致している。一方で、低濃度ではむしろ複製以降のステップを阻害していた。我々は、複製以降のステップのどの過程が阻害されているのかを評価するために、化合物処理された感染細胞を用いて細胞内のウイルス RNA およびウイルスタンパク質の量を測定した(図 6F)。その結果、ウイルス RNA とウイルスタンパク質の両方が減少していた。従って、X-206 はウイルス RNA の転写またはタンパク質の翻訳、あるいはその両者の過程を阻害することで抗ウイルス活性を発揮している可能性が示唆された。

ニルマトレルビルまたはレムデシビルと X-206 の併用による相乗効果の検証

最後に我々は X-206 と承認された SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス薬との併用可能性を検討するために、これらを組み合わせた場合の感染阻害実験を実施した(図 7)。感染細胞として Vero/TMPRSS2 細胞、ウイルスには SARS-CoV-2

祖先株を使用した。

その結果、X-206 とレムデシビル、X-206 とニルマトレルビルいずれの場合でも相加的な効果を *in vitro* レベルで確認した。従って、X-206 は他の承認薬との併用可能性が示唆された。

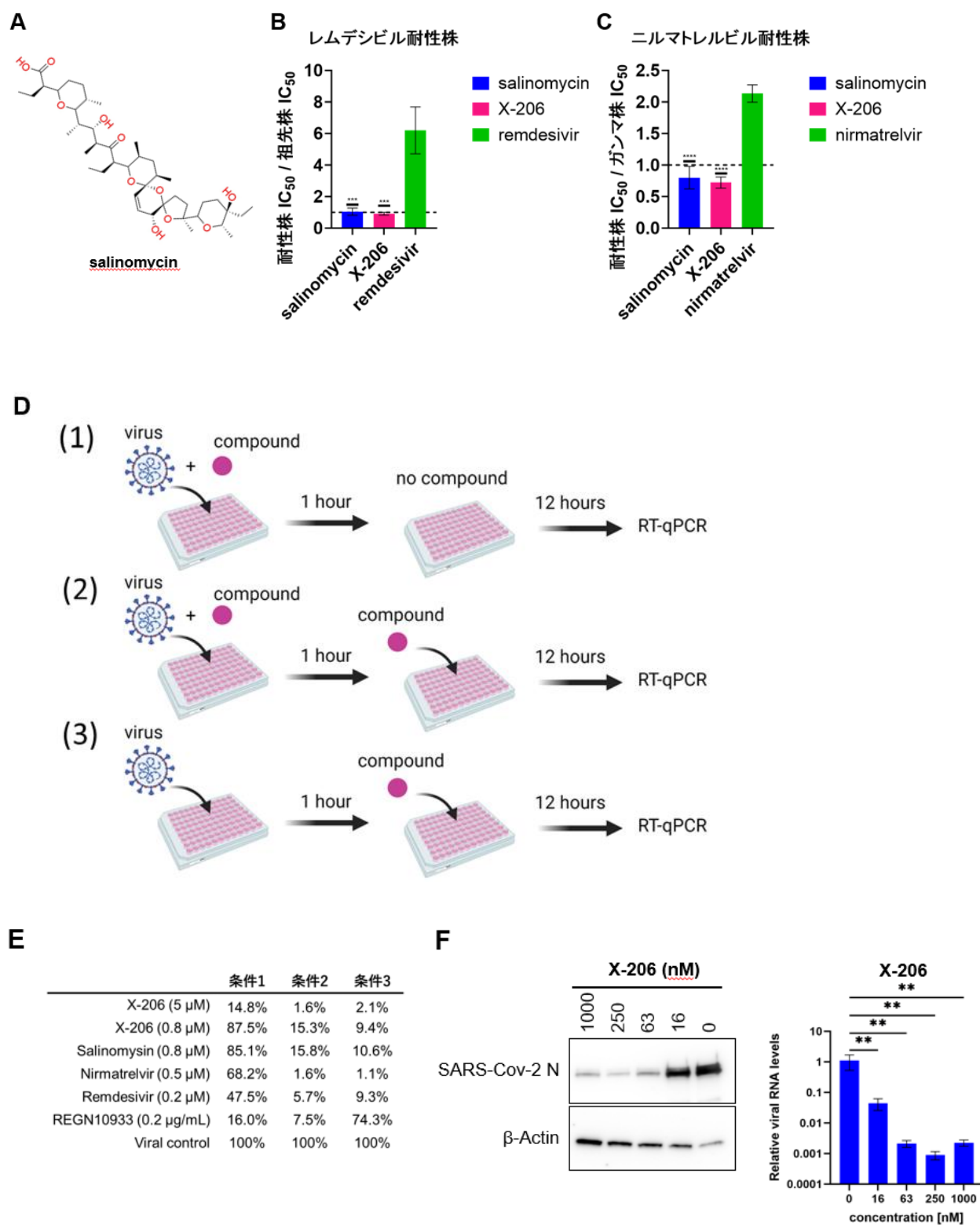
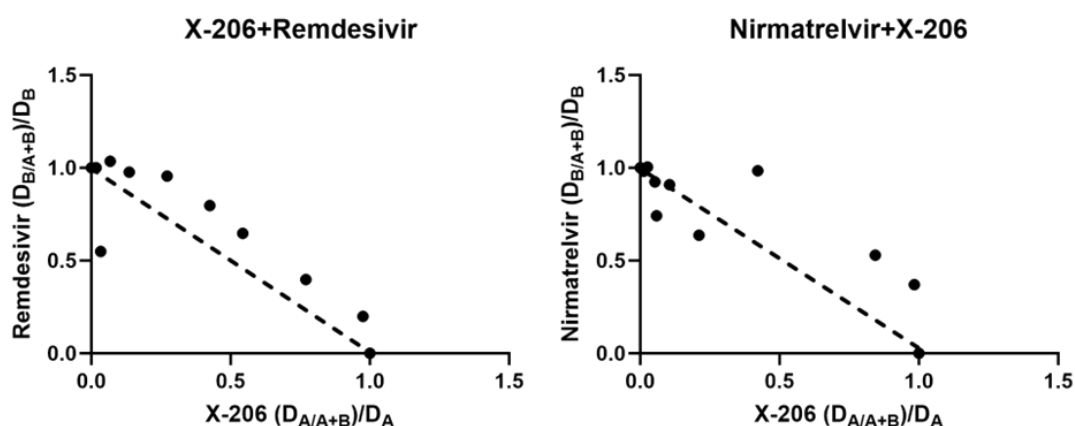


図 6. SARS-CoV-2 に対して承認されている抗ウイルス化合物とは異なる X-206

の作用機序。(A) サリノマイシンの構造。(B、C) レムデシビル (B) とニルマトルビル (C) の薬剤耐性分離株を用いた MTT アッセイ。X-206 またはサリノマイシンの存在下で 293T-ACE2 細胞に薬剤耐性分離株を感染させた。薬剤耐性分離株の IC_{50} 値は、プロトタイプの IC_{50} 値と比較した相対値で示した。承認された薬剤で処理した細胞に対する統計学的に有意な差は、one-way ANOVA 検定と Dunnet 多重比較検定によって決定した。***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$. (D) Vero/TMPRSS2 細胞を用いた感染阻害アッセイの模式図であり、3 つの異なる条件で行われた：(1); 細胞を化合物の存在下で SARS-CoV-2 に感染させ、1 時間後に上清を除去し、その後培地のみでインキュベートした。(2); 最初の部分は(1)と同じであるが、ウイルスを除去した後、同じ濃度の化合物を含む培地で培養した。(3) 化合物非存在下で細胞に SARS-CoV-2 を感染させ、1 時間後に上清を除去した後、化合物を含む培地とインキュベートした。ウイルス感染から 13 時間後に上清中のウイルス力価を測定した。(E) 図 6D の実験結果は、条件を重複させた 3 つの異なる実験として行った各化合物の阻害率としてまとめた。化合物非存在下でのウイルス感染（ウイルス対照）は 100% を示



す。(F) 感染細胞における SARS-CoV-2 N 遺伝子のタンパク質および RNA の発現レベル。N タンパク質はウェスタンブロットにより解析し、ウイルス RNA は RT-qPCR を用いて定量した。DMSO 処理細胞に対する統計的に有意な差は、one-way anova 検定と Dunnet 多重比較検定により決定した。

図 7. X-206 とレムデシビル (左) またはニルマトルビル (右) の併用試験。 D_A および D_B は、それぞれ X-206 とレムデシビルまたはニルマトルビル単独の IC_{50} 値である。 $D_{A/A+B}$ は、レムデシビルまたはニルマトルビル存在下での X-206 の

IC₅₀ 値であり、D_{B/A+B} は、X-206 と組み合わせたレムデシビルまたはニルマトルビルの IC₅₀ 値である。破線は相加効果の基準線を示す。データは 2 回の独立した実験の代表値である。

結論

X-206 は、膜融合とウイルス侵入後の2つの段階において別々の阻害作用を示し、野生型と同様にニルマトルビルまたはレムデシビル耐性の SARS-CoV-2 変異株にも有効であることから、承認薬とは異なる作用機序で感染を阻害することが示唆された。従って、X-206 と SARS-CoV-2 感染症治療薬を併用することで、薬剤耐性ウイルスを抑制できる可能性がある。今回の知見より X-206 は、宿主因子を標的とする可能性があるため、今後の新規コロナウイルスにも有効性の期待できる、ベータコロナウイルスに対する広域抗ウイルス薬の開発に資するものと考えられる。

考察

本研究では当初、MERS-CoV の細胞侵入阻害剤の同定を試みた。まず、MERS-CoV S タンパク質 RBD の構造情報を基にした *in silico* スクリーニングにより化合物を絞り込み、続いて培養細胞とシュードタイプウイルス系を用いた細胞侵入阻害能解析、そして膜融合阻害実験を行った。その結果、MERS-CoV に対する膜融合阻害活性を保有する化合物 13 種類を同定した。さらに、13 種類の化合物の中から、SARS-CoV および SARS-CoV-2 の膜融合阻害の交差反応性を保有する化合物を 3 種類同定した。この 3 種類の化合物の類縁体スクリーニングによって得られたベータコロナウイルスの膜融合を阻害する化合物中から、臨床分離株の MERS-CoV・SARS-CoV・SARS-CoV-2 の感染に対して培養細胞上で高い抗ウイルス活性を示す化合物として、Thapsigargin と X-206 を同定した。

Thapsigargin は ER ストレスを誘導することで、コロナウイルス属のウイルスの細胞内複製を広範に阻害することが知られている (63)。Thapsigargin が 3 種類のベータコロナウイルス (MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2) 全ての cell-to-cell fusion を阻害したことから、ベータコロナウイルス属感染に対する Thapsigargin の新たな阻害機序として膜融合の阻害を提案する。実際、SARS-CoV-2 では既に Thapsigargin の合胞体形成阻害能が報告されている (55)。

Thapsigargin が添加された細胞では、細胞内膜の構成要素を制御する因子の発現が亢進していることが報告されている。更に、Thapsigargin は、ニューキャッスル病ウイルス (Newcastle disease virus: NDV) の細胞侵入を阻害し、受容体への付着は阻害しないことが知られている (64)。従って、Thapsigargin は、 Ca^{2+} 振動を消失させることによって細胞膜成分の再編成に影響を与えることにより、ウイルス非特異的な膜融合の阻害を示す可能性がある。

X-206 は、以前 SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス活性が報告されていたが、その作用機序は不明であった (65)。高濃度での作用機序として我々は膜融合の阻害を提案する。実際、X-206 と同じ polyether ionophore に属するサリノマイシンは合胞体形成を阻害することで SARS-CoV-2 の感染を阻害することが報告されている。一方で、X-206 とサリノマイシンは細胞侵入後に低濃度で添加した場合にも、ベータコロナウイルス感染に対して強い阻害活性を示した。このことは、侵入後のウイルス複製段階も効果的に阻害できることを示唆している。

呼吸器合胞体（RS）ウイルスに対するサリノマイシンの抗ウイルス活性は、X-206 が細胞侵入後に作用するメカニズムを示唆している。サリノマイシンは細胞からのカリウムイオンの流出を引き起こし、RS ウイルスの細胞内への侵入には影響しないが、侵入後の過程を阻害する(66)。

(67)(68, 69)(68)コロナウイルス科のウイルスはウイルスタンパク質をコードする mRNA の鋳型を DMVs 内で合成している。複製の場である DMVs を細胞内で形成する際、オートファジーに必要な構成要素を利用していることが知られている(67)。実際、MERS-CoV および SARS-CoV-2 のいくつかのウイルスタンパク質はオートファジー経路の阻害活性を保有していることが明らかとなっている(68, 69)。オートファジーが誘導されてから実際にタンパク質が分解される一連の過程であるオートファジーフラックスをサリノマイシンは増大させることが報告されている(68)。したがって、同じ polyether ionophore である X-206 も同様の活性を保有している可能性がある。すなわち、X-206 やサリノマイシンは自身の保有するオートファジー促進活性により MERS-CoV や SARS-CoV-2 のオートファジー阻害活性を間接的に抑制し、ウイルスゲノム複製の場である DMVs 形成を妨害していると考えられる。

Thapsigargin と X-206/サリノマイシンは、作用様式は異なるものの、細胞内のイオン振動に影響を与えることにより、ベータコロナウイルス感染に対する阻害効果を発揮する可能性がある。

我々の発見は、宿主因子を標的とした汎ベータコロナウイルス治療薬の発見と開発、およびベータコロナウイルスのウイルス学的特性の理解に役立つと考えられる。

謝辞

本研究の遂行に際し、熱心なご指導を頂いた京都大学医生物学研究所ウイルス制御分野 橋口隆生教授および九州大学 柳雄介名誉教授に心より感謝申し上げます。

また、本研究での Bio Safety Level (BSL3) 施設でのウイルス感染実験にあたり、北海道人獣共通感染症国際共同研究所の佐藤彰彦先生、佐々木道仁先生、前田悠様、林悦子様および大場靖子先生のご協力に大変感謝申し上げます。

更に、本研究でのドッキングシミュレーションを担当いただきました星薬科大学児玉耕太先生、北海道大学薬学研究院生体分子機能学研究室 乙黒聡子様、前仲勝実先生に厚く御礼申し上げます。

加えて、本研究で使用した化合物ライブラリーを分与いただいた東京大学創薬機構安田公助先生、児玉宏建先生に感謝申し上げます。

更に、Calu-3 細胞を分与いただいた京都大学医生物学研究所微細構造ウイルス学分野の野田岳教授、SARS-CoV Hanoi 株および MERS-CoV EMC2012 株を分与いただいた長崎大学およびエラスムス大学に深く感謝いたします。

3 年間の研究生活を過ごすにあたり、藤多仁生奨学金の給付により経済的支援をして下さった故藤多哲朗名誉教授、ご遺族並びにご関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

そして、日々の研究において、適切なご助言を数多くいただきました医生物学研究所ウイルス制御学分野の皆様感謝申し上げます。

最後に、博士課程に至るまでの私の人生設計を支えていただいた家族と友人たちに心より感謝申し上げます。

論文目録

○Sasaki J, Sato A, Sasaki M, Okabe I, Kodama K, Otsuguro S, Yasuda K, Kojima H, Orba Y, Sawa H, Maenaka K, Yanagi Y, Hashiguchi T. X-206 exhibits broad-spectrum anti- β -coronavirus activity, covering SARS-CoV-2 variants and drug-resistant isolates. Antiviral Res. 2024 Nov 19;232:106039. doi: 10.1016/j.antiviral.2024.106039.

引用文献

1. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 367:1814–20.
2. Schlagenhauf P, Ashraf H. 2003. Severe acute respiratory syndrome spreads worldwide. *Lancet* 361:1017.
3. Reusken CBEM, Farag EABA, Haagmans BL, Mohran KA, Godeke GJ, Raj VS, Alhajri F, Al-Marri SA, Al-Romaihi HE, Al-Thani M, Bosch BJ, van der Eijk AA, El-Sayed AM, Ibrahim AK, Al-Molawi N, Müller MA, Pasha SK, Drosten C, Alhajri MM, Koopmans MPG. 2015. Occupational Exposure to Dromedaries and Risk for MERS-CoV Infection, Qatar, 2013-2014. *Emerg Infect Dis* 21:1422–1425.
4. Makoto T, Shutoku M. 2015. コロナウイルス科, p. 629–629. *In* Shinichi, Y, Yusuke Y, Yasunobu Y (eds.), 戸田新細菌学, 34th ed.
5. Stanley Periman, Paul S. Masters. 2021. Coronaviridae: The viruses and Their Replication, p. 414–417. *In* Peter M. Howley, David M. Knipe (eds.), *Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th ed.
6. Knoops K, Kikkert M, Van Den Worm SHE, Zevenhoven-Dobbe JC, Van Der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ. 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* 6:1957–1974.
7. Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ. 2013. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio* 4.
8. Oudshoorn D, Rijs K, Limpens RWAL, Groen K, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Bárcena M. 2017. Expression and Cleavage of Middle East Respiratory Syndrome

Coronavirus nsp3-4 Polyprotein Induce the Formation of Double-Membrane Vesicles That Mimic Those Associated with Coronaviral RNA Replication. *mBio* 8.

9. Stanley Perlman, Paul SM. 2021. Coronaviridae: The Viruses and Their Replication, p. 421–421. *In* Peter M. Howley and David M. Knipe (ed.), *Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th ed.
10. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DHW, Müller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JAA, Zaki A, Fouchier RAM, Thiel V, Drosten C, Rottier PJM, Osterhaus ADME, Bosch BJ, Haagmans BL. 2013. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495:251–4.
11. Li W, Moore MJ, Vasllieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greeneugh TC, Choe H, Farzan M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:450–454.
12. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R Di, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579:270–273.
13. Yuan Y, Cao D, Zhang Y, Ma J, Qi J, Wang Q, Lu G, Wu Y, Yan J, Shi Y, Zhang X, Gao GF. 2017. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun* 8.
14. Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, Steffen I, Tsegaye TS, He Y, Gnirss K, Niemeyer D, Schneider H, Drosten C, Pöhlmann S. 2011. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol* 85:4122–34.
15. Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F. 2005. Protease-mediated

enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12543–7.

16. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. 2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11876–81.
17. Adachi T, Chong JM, Nakajima N, Sano M, Yamazaki J, Miyamoto I, Nishioka H, Akita H, Sato Y, Kataoka M, Katano H, Tobiume M, Sekizuka T, Itokawa K, Kuroda M, Suzuki T. 2020. Clinicopathologic and Immunohistochemical Findings from Autopsy of Patient with COVID-19, Japan. *Emerg Infect Dis* 26:2157–2161.
18. Yuen CK, Lam JY, Wong WM, Mak LF, Wang X, Chu H, Cai JP, Jin DY, To KKW, Chan JFW, Yuen KY, Kok KH. 2020. SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerg Microbes Infect* 9:1418–1428.
19. Thoms M, Buschauer R, Ameismeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, Kratzat H, Hayn M, MacKens-Kiani T, Cheng J, Straub JH, Stürzel CM, Fröhlich T, Berninghausen O, Becker T, Kirchhoff F, Sparrer KMJ, Beckmann R. 2020. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science* 369:1249–1256.
20. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. 2022. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci* 23.
21. Chen L, Liu H, Liu W, Liu J, Liu K, Shang J, Deng Y, Wei S. 2020. [Analysis of clinical features of 29 patients with 2019 novel coronavirus pneumonia]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 43:203–208.
22. Knoll MD, Wonodi C. 2021. Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *Lancet* 397:72–74.
23. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez JL, Pérez

- Marc G, Moreira ED, Zerbini C, Bailey R, Swanson KA, Roychoudhury S, Koury K, Li P, Kalina W V, Cooper D, Frenck RW, Hammitt LL, Türeci Ö, Nell H, Schaefer A, Ünal S, Tresnan DB, Mather S, Dormitzer PR, Şahin U, Jansen KU, Gruber WC, C4591001 Clinical Trial Group. 2020. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 383:2603–2615.
24. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, Goepfert PA, Truyers C, Fennema H, Spiessens B, Offergeld K, Scheper G, Taylor KL, Robb ML, Treanor J, Barouch DH, Stoddard J, Ryser MF, Marovich MA, Neuzil KM, Corey L, Cauwenberghs N, Tanner T, Hardt K, Ruiz-Guiñazú J, Le Gars M, Schuitemaker H, Van Hoof J, Struyf F, Douoguih M, ENSEMBLE Study Group. 2021. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med* 384:2187–2201.
 25. Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, Chadwick DR, Clark R, Cosgrove C, Galloway J, Goodman AL, Heer A, Higham A, Iyengar S, Jamal A, Jeanes C, Kalra PA, Kyriakidou C, McAuley DF, Meyrick A, Minassian AM, Minton J, Moore P, Munsoor I, Nicholls H, Osanlou O, Packham J, Pretswell CH, San Francisco Ramos A, Saralaya D, Sheridan RP, Smith R, Soiza RL, Swift PA, Thomson EC, Turner J, Viljoen ME, Albert G, Cho I, Dubovsky F, Glenn G, Rivers J, Robertson A, Smith K, Toback S. 2021. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 385:1172–1183.
 26. Dougan M, Nirula A, Azizad M, Mocherla B, Gottlieb RL, Chen P, Hebert C, Perry R, Boscia J, Heller B, Morris J, Crystal C, Igbinadolor A, Huhn G, Cardona J, Shawa I, Kumar P, Adams AC, Van Naarden J, Custer KL, Durante M, Oakley G, Schade AE, Holzer TR, Ebert PJ, Higgs RE, Kallewaard NL, Sabo J, Patel DR, Dabora MC, Klekotka P, Shen L, Skovronsky DM, BLAZE-1 Investigators. 2021. Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med* 385:1382–1392.
 27. Montgomery H, Hobbs FDR, Padilla F, Arbetter D, Templeton A, Seegobin S, Kim K, Campos JAS, Arends RH, Brodek BH, Brooks D, Garbes P, Jimenez J, Koh GCKW, Padilla KW, Streicher K, Viani RM, Alagappan V, Pangalos MN, Esser MT, TACKLE

- study group. 2022. Efficacy and safety of intramuscular administration of tixagevimab-cilgavimab for early outpatient treatment of COVID-19 (TACKLE): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med* 10:985–996.
28. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, Musser BJ, Soo Y, Rofail D, Im J, Perry C, Pan C, Hosain R, Mahmood A, Davis JD, Turner KC, Hooper AT, Hamilton JD, Baum A, Kyratsous CA, Kim Y, Cook A, Kampman W, Kohli A, Sachdeva Y, Graber X, Kowal B, DiCioccio T, Stahl N, Lipsich L, Braunstein N, Herman G, Yancopoulos GD, Trial Investigators. 2021. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med* 384:238–251.
 29. Bhimraj A, Falck-Ytter Y, Kim AY, Li JZ, Baden LR, Johnson S, Shafer RW, Shoham S, Tebas P, Bedimo R, Cheng VC-C, Chew KW, Chiotos K, Daar ES, Dzierba AL, Glidden D V, Hardy EJ, Martin GS, MacBrayne C, Nadig N, Nakamura MM, Shumaker AH, Tien P, Loveless J, Morgan RL, Gandhi RT. 2024. 2024 Clinical Practice Guideline Update by the Infectious Diseases Society of America on the Management of COVID-19: Anti-SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Pemivibart for Pre-exposure Prophylaxis. *Clin Infect Dis* <https://doi.org/10.1093/CID/CIAE435>.
 30. Cai Y, Diallo S, Rosenthal K, Ren K, Flores DJ, Dippel A, Oganessian V, van Dyk N, Chen X, Cantu E, Choudhary R, Sulikowski M, Adissu H, Chawla B, Kar S, Liu C, Dijokaite-Guraliuc A, Mongkolsapaya J, Rajan S, Loo YM, Beavon R, Webber C, Chang LJ, Thomas S, Clegg L, Zhang H, Screaton GR, Philbin N, Harre M, Selim A, Martinez-Alier N, Uriel A, Cohen TS, Perez JL, Esser MT, Blair W, Francica JR. 2024. AZD3152 neutralizes SARS-CoV-2 historical and contemporary variants and is protective in hamsters and well tolerated in adults. *Sci Transl Med* 16.
 31. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, Mera J, Webb BJ, Perez G, Oguchi G, Ryan P, Nielsen BU, Brown M, Hidalgo A, Sachdeva Y, Mittal S, Osiyemi O, Skarbinski J, Juneja K, Hyland RH, Osinusi A, Chen S, Camus G, Abdelghany M, Davies S, Behenna-Renton N, Duff F, Marty FM, Katz MJ, Ginde AA, Brown SM, Schiffer JT, Hill JA, GS-US-540-9012 (PINETREE) Investigators. 2022. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *N Engl J Med* 386:305–315.

32. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, Martín-Quirós A, Caraco Y, Williams-Diaz A, Brown ML, Du J, Pedley A, Assaid C, Strizki J, Grobler JA, Shamsuddin HH, Tipping R, Wan H, Paschke A, Butterson JR, Johnson MG, De Anda C, MOVE-OUT Study Group. 2022. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med* 386:509–520.
33. Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, Boras B, Cardin RD, Carlo A, Coffman KJ, Dantonio A, Di L, Eng H, Ferre R, Gajiwala KS, Gibson SA, Greasley SE, Hurst BL, Kadar EP, Kalgutkar AS, Lee JC, Lee J, Liu W, Mason SW, Noell S, Novak JJ, Obach RS, Ogilvie K, Patel NC, Pettersson M, Rai DK, Reese MR, Sammons MF, Sathish JG, Singh RSP, Stepan CM, Stewart AE, Tuttle JB, Updyke L, Verhoest PR, Wei L, Yang Q, Zhu Y. 2021. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science* 374:1586–1593.
34. Yotsuyanagi H, Ohmagari N, Doi Y, Imamura T, Sonoyama T, Ichihashi G, Sanaki T, Tsuge Y, Uehara T, Mukae H. 2023. A phase 2/3 study of S-217622 in participants with SARS-CoV-2 infection (Phase 3 part). *Medicine* 102:E33024.
35. Xia S, Yan L, Xu W, Agrawal AS, Algaissi A, Tseng C-TK, Wang Q, Du L, Tan W, Wilson IA, Jiang S, Yang B, Lu L. 2019. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv* 5:eaav4580.
36. Corti D, Zhao J, Pedotti M, Simonelli L, Agnihothram S, Fett C, Fernandez-Rodriguez B, Foglierini M, Agatic G, Vanzetta F, Gopal R, Langrish CJ, Barrett NA, Sallusto F, Baric RS, Varani L, Zambon M, Perlman S, Lanzavecchia A. 2015. Prophylactic and postexposure efficacy of a potent human monoclonal antibody against MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:10473–8.
37. 厚生労働省. 2023. 承認済の新型コロナウイルス治療薬.
38. Lee H, Ren J, Pesavento RP, Ojeda I, Rice AJ, Lv H, Kwon Y, Johnson ME. 2019.

Identification and design of novel small molecule inhibitors against MERS-CoV papain-like protease via high-throughput screening and molecular modeling. *Bioorg Med Chem* 27:1981–1989.

39. Galasiti Kankanamalage AC, Kim Y, Damalanka VC, Rathnayake AD, Fehr AR, Mehzabeen N, Battaile KP, Lovell S, Lushington GH, Perlman S, Chang KO, Groutas WC. 2018. Structure-guided design of potent and permeable inhibitors of MERS coronavirus 3CL protease that utilize a piperidine moiety as a novel design element. *Eur J Med Chem* 150:334–346.
40. Unoh Y, Uehara S, Nakahara K, Nobori H, Yamatsu Y, Yamamoto S, Maruyama Y, Taoda Y, Kasamatsu K, Suto T, Kouki K, Nakahashi A, Kawashima S, Sanaki T, Toba S, Uemura K, Mizutare T, Ando S, Sasaki M, Orba Y, Sawa H, Sato A, Sato T, Kato T, Tachibana Y. 2022. Discovery of S-217622, a Noncovalent Oral SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitor Clinical Candidate for Treating COVID-19. *J Med Chem* 65:6499–6512.
41. Fukunishi Y, Mikami Y, Nakamura H. 2005. Similarities among receptor pockets and among compounds: analysis and application to in silico ligand screening. *J Mol Graph Model* 24:34–45.
42. Yu J, Zhou Y, Tanaka I, Yao M. 2010. Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. *Bioinformatics* 26:46–52.
43. Fukunishi Y, Mikami Y, Kubota S, Nakamura H. 2006. Multiple target screening method for robust and accurate in silico ligand screening. *J Mol Graph Model* 25:61–70.
44. Fukunishi Y, Kubota S, Nakamura H. 2006. Noise reduction method for molecular interaction energy: application to in silico drug screening and in silico target protein screening. *J Chem Inf Model* 46:2071–2084.
45. Fukunishi Y, Nakamura H. 2008. Improvement of protein-compound docking scores

- by using amino-acid sequence similarities of proteins. *J Chem Inf Model* 48:148–156.
46. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6286115/>. Retrieved 11 December 2024.
 47. Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, Yanagi Y. 2008. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol* 82:8942–8946.
 48. Naoki O, Arihiro K, Toshiyuki Y, Noriko H, Fumio K, Suyoshi S, Makoto K, Kentaro H, Hattori M. 2014. The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Res* 21:673–683.
 49. Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Sakai K, Prehaud C, Kurane I, Morikawa S. 2002. Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 40:372–375.
 50. Takeda M, Ohno S, Seki F, Nakatsu Y, Tahara M, Yanagi Y. 2005. Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol* 79:14346–54.
 51. Walker PJ, Blasdel KR, Calisher CH, Dietzgen RG, Kondo H, Kurath G, Longdon B, Stone DM, Tesh RB, Tordo N, Vasilakis N, Whitfield AE. 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae. *J Gen Virol* 99:447–448.
 52. Thai HTC, Le MQ, Vuong CD, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. 2004. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol* 42:1956–1961.
 53. Agostini ML, Pruijssers AJ, Chappell JD, Gribble J, Lu X, Andres EL, Bluemling GR,

- Lockwood MA, Sheahan TP, Sims AC, Natchus MG, Saindane M, Kolykhalov AA, Painter GR, Baric RS, Denison MR. 2019. Small-Molecule Antiviral β -d- N4-Hydroxycytidine Inhibits a Proofreading-Intact Coronavirus with a High Genetic Barrier to Resistance. *J Virol* 93.
54. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, Graham RL, Pruijssers AJ, Agostini ML, Leist SR, Schafer A, Dinno KH, Stevens LJ, Chappell JD, Lu X, Hughes TM, George AS, Hill CS, Montgomery SA, Brown AJ, Bluemling GR, Natchus MG, Saindane M, Kolykhalov AA, Painter G, Harcourt J, Tamin A, Thornburg NJ, Swanstrom R, Denison MR, Baric RS. 2020. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med* 12.
 55. Braga L, Ali H, Secco I, Chiavacci E, Neves G, Goldhill D, Penn R, Jimenez-Guardeño JM, Ortega-Prieto AM, Bussani R, Cannatà A, Rizzari G, Collesi C, Schneider E, Arosio D, Shah AM, Barclay WS, Malim MH, Burrone J, Giacca M. 2021. Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia. *Nature* 594:88–93.
 56. 2024. 抗HIV治療ガイドライン.
 57. Lee J, Worrall LJ, Vuckovic M, Rosell FI, Gentile F, Ton A-T, Caveney NA, Ban F, Cherkasov A, Paetzel M, Strynadka NCJ. 2020. Crystallographic structure of wild-type SARS-CoV-2 main protease acyl-enzyme intermediate with physiological C-terminal autoprocessing site. *Nat Commun* 11:5877.
 58. Overbergh L, Kyama CM, Valckx D, Debrock S, Mwenda JM, Mathieu C, D’Hooghe T. 2005. Validation of real-time RT-PCR assays for mRNA quantification in baboons. *Cytokine* 31:454–458.
 59. Shirato K, Nao N, Katano H, Takayama I, Saito S, Kato F, Katoh H, Sakata M, Nakatsu Y, Mori Y, Kageyama T, Matsuyama S, Takeda M. 2020. Development of Genetic Diagnostic Methods for Detection for Novel Coronavirus 2019(nCoV-2019) in Japan.

Jpn J Infect Dis 73:304–307.

60. Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27–55.
61. Fukao K, Noshi T, Yamamoto A, Kitano M, Ando Y, Noda T, Baba K, Matsumoto K, Higuchi N, Ikeda M, Shishido T, Naito A. 2019. Combination treatment with the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection. *J Antimicrob Chemother* 74:654–662.
62. Sasaki M, Kishimoto M, Itakura Y, Tabata K, Intaruck K, Uemura K, Toba S, Sanaki T, Sato A, Hall WW, Orba Y, Sawa H. 2021. Air-liquid interphase culture confers SARS-CoV-2 susceptibility to A549 alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 577:146–151.
63. Shaban MS, Müller C, Mayr-Buro C, Weiser H, Meier-Soelch J, Albert BV, Weber A, Linne U, Hain T, Babayev I, Karl N, Hofmann N, Becker S, Herold S, Schmitz ML, Ziebuhr J, Kracht M. 2021. Multi-level inhibition of coronavirus replication by chemical ER stress. *Nat Commun* 12.
64. Kumar N, Khandelwal N, Kumar R, Chander Y, Rawat KD, Chaubey KK, Sharma S, Singh SV, Riyesh T, Tripathi BN, Barua S. 2019. Inhibitor of Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase Impairs Multiple Steps of Paramyxovirus Replication. *Front Microbiol* 10.
65. Svenningsen EB, Thyrted J, Blay-Cadanet J, Liu H, Lin S, Moyano-Villameriel J, Olagnier D, Idorn M, Paludan SR, Holm CK, Poulsen TB. 2021. Ionophore antibiotic X-206 is a potent inhibitor of SARS-CoV-2 infection in vitro. *Antiviral Res* 185.
66. Norris MJ, Malhi M, Duan W, Ouyang H, Granados A, Cen Y, Tseng YC, Gubbay J, Maynes J, Moraes TJ. 2018. Targeting Intracellular Ion Homeostasis for the Control of Respiratory Syncytial Virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 59:733–744.

67. Prentice E, Jerome WG, Yoshimori T, Mizushima N, Denison MR. 2004. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem* 279:10136–10141.
68. Gassen NC, Niemeyer D, Muth D, Corman VM, Martinelli S, Gassen A, Hafner K, Papies J, Mösbauer K, Zellner A, Zannas AS, Herrmann A, Holsboer F, Brack-Werner R, Boshart M, Müller-Myhsok B, Drosten C, Müller MA, Rein T. 2019. SKP2 attenuates autophagy through Beclin1-ubiquitination and its inhibition reduces MERS-Coronavirus infection. *Nat Commun* 10.
69. Zhang C, Jiang Q, Liu Z, Li N, Hao Z, Song G, Li D, Chen M, Lin L, Liu Y, Li X, Shang C, Li Y. 2024. SARS-CoV-2 NSP6 reduces autophagosome size and affects viral replication via sigma-1 receptor. *J Virol* 98.