

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590555

研究課題名(和文) インターフェロン調節因子のトリプシノーゲン遺伝子等を介したウイルス感染防御機構

研究課題名(英文) Defensive mechanism of interferon-regulatory factors (IRFs) via trypsinogens against virus infection.

研究代表者

林 日出喜 (HAYASHI, Hideki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：10218589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膵臓から分泌されたトリプシノーゲンを活性化する消化酵素として知られるエンテロキナーゼが十二指腸上皮のみならず、いろいろなヒトの培養細胞で発現していることを示し、トリプシノーゲンを切断、活性化することにより、IAV感染を顕著に促進することを明らかにした。この新たなエンテロキナーゼを介したトリプシノーゲンの活性化経路が抗インフルエンザ薬の標的になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have shown the expressions of enterokinase in many human cells other than duodenal cells where it activates trypsinogens secreted from the pancreas. In addition, some types of trypsinogens are reported to exist in many cells as well as pancreatic cells. Our data indicated that the enterokinase significantly enhanced the influenza A virus infection by activating the trypsinogens. The enterokinase-mediated activation of trypsinogens could be a target for the development of new anti-viral reagents against influenza A virus.

研究分野：医歯薬学

キーワード：インフルエンザウイルス トリプシノーゲン エンテロキナーゼ インターフェロン調節因子(IRFs)
インターフェロン誘導遺伝子(ISGs)

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染防御反応における IRFs を介した IFN 誘導の重要性は明らかであるが、IRFs は IFN 誘導以外に細胞増殖、細胞死、発癌過程にも影響を与える。我々が解析した IRF2-KO マウスでは、通常の膵臓では発現していない Tryp5 遺伝子の顕著な活性化がみられた。蛋白質として発現可能なマウスのトリプシノーゲン遺伝子は 12 種類あるが、この Tryp5 は内在性のトリプシン阻害蛋白質である Spink3 等の作用を受けないという特徴を持ち、合成 2 本鎖 RNA、poly(I:C) (ウイルス感染類似) 刺激による急性膵炎の発症に不可欠であった。この予想外のマウス Tryp5 遺伝子の IRFs による転写活性調節の発見と、ヒトのトリプシノーゲン遺伝子上流にもマウス Tryp5 遺伝子のように IRFs が結合可能な ISREs (Interferon stimulatory response elements) 配列が存在することから、ヒト・トリプシノーゲン遺伝子の転写活性調節にも IRFs が関与し、それを介した抗ウイルス作用もあるのではないかとの発想を得た。

一方、IAV の感染成立にはウイルスのエンベロープ蛋白質である HA (Hemagglutinin) の前駆体が宿主細胞のプロテアーゼにより切断を受け、活性化型に変換される必要がある。この切断部位には塩基性アミノ酸があり、いくつかのトリプシン類似のセリンプロテアーゼがこの部位の切断に関わっている。この切断部位のアミノ酸変異とウイルスの高病原性化との密接な関係も示され、この部位を切断する酵素の活性化、不活性化のメカニズム、特異的阻害剤の開発は、感染予防、治療において重要と考えられている。したがって、ヒト・トリプシノーゲン遺伝子の転写活性調節に IRFs がどのように関与しているか解明することは、IAV の新しい感染予防、治療法の開発に寄与すると期待される。また、HIV (Human immunodeficiency virus)、HTLV-1 (human T cell leukemia virus 1) 等多くのウイルスは感染、増殖、輸送、出芽の過程でいくつかのプロテアーゼによる切断を必要とするが、その過程におけるトリプシノーゲン、Ca²⁺-結合蛋白質の関与が明らかになれば、IRFs の新たな抗ウイルス作用の機構として注目されると思われる。

2. 研究の目的

ウイルス感染に対する宿主細胞の防御反応の中で、最も早期に起こる反応の一つに I 型インターフェロン (IFN) 遺伝子発現の誘導がある。この IFN 誘導にインターフェロン調節因子 IRFs (Interferon regulatory factors) が重要な役割を果たしている。最近、我々は IRF2 ノックアウト (KO) マウスにおいて、通常の膵臓では発現していないタイプのトリプシノーゲン 5 (Trp5) 遺伝子の顕著な活性化を認め、これが合成 2 本鎖 RNA、poly(I:C) (ウイルス感染類似) 刺激による急性膵炎の発症に不可欠であることを証明した。一方、徳島大学の木戸博士らは A 型インフルエンザウイルス (IAV) の感染・重症化にトリプシノーゲン遺伝子の発現・活性の上昇が相関していることを報告している。インフルエンザの流行は世界的な脅威であり、このウイルスの絶え間ない変異による高病原性化を考えると感染の予防・治療を多角的にとらえる必要がある。我々は、IRFs の IFN 誘導作用とは別の経路として、トリプシノーゲン遺伝子活性化のメカニズムを解明し、IAV 感染に対する新たな予防・治療法の開発につながること、及びトリプシノーゲン、Ca²⁺-結合蛋白質 (IRF2-KO により Anxa10 等の発現が顕著に上昇し、膵臓分泌顆粒の異常をきたす) を介した他のウイルス感染防御への関与を解明することが当該研究の目的である。

3. 研究の方法

1) ヒト・トリプシノーゲン、Ca²⁺-結合蛋白質 (Anxa10、S100-G 等)、IRFs (Interferon regulatory factors)、及びインターフェロン誘導遺伝子群 (ISGs) cDNAs のクローニング及び Real-time PCR による特異的 mRNA 定量法の確立

ヒトの培養細胞から mRNA を調整、cDNA に変換し、I^{IV} 型トリプシノーゲン (PRSS1, PRSS2, PRSS3-v2, hPRSS3-v1)、及びその活性化する酵素として知られるエンテロキナーゼ (EK)、Anxa10、S100-G 等の Ca²⁺-結合蛋白質、IRF1~9、IFIT1、ISGs、及びインターフェロンシグナル伝達関連分子約 100 種類の cDNAs をクローニングし、これらの特異的な遺伝子配列を認識するプライマーのセット

を作成し、Real-time PCR を用い発現量の定量ができるようにした。

2) トリプシノーゲンを含むセリンプロテアーゼの酵素学的解析

I^{IV} 型トリプシノーゲン (PRSS1, PRSS2, PRSS3-v2, hPRSS3-v1) に加え、その活性化する酵素として知られるエンテロキナーゼ (EK)、さらに、細胞膜上に発現しこれまでに IAV-HA (Hemagglutinin) を切断、活性化することが知られている HAT、TMPRSS2、及び TMPRSS4 を 293T 細胞で強制発現させ、その細胞抽出液 (ライセート) を使い、GPK-pNA を基質としてトリプシン活性を測定した。EK に関しては従来から報告のあった 25 エクソンからなる EK 遺伝子 (EK-v1) に加え、26 エクソンからなる新たな EK 遺伝子アイソフォーム (EK-v2) の cDNAs もクローニングした。この *in vitro* の系で EK-v1、EK-v2 は PRSS3-v2 トリプシノーゲンを活性化したが、TMPRSS2、TMPRSS4、HAT は PRSS3 を活性化できなかつた。

3) A 型インフルエンザウイルス (IAV) 感染実験

ヒト肺癌由来の培養細胞 (感染感受性細胞 A549 と感染抵抗性細胞 H292) に IAV として WSN 株を感染させ、上記トリプシノーゲン、Ca²⁺-結合蛋白質、IRFs、及び ISGs の遺伝子発現の変化を調べた。感染感受性、抵抗性のいずれの細胞においても IAV 感染により IRF1、IRF7、及び多くの ISGs の発現上昇がみられた。一方、上記ヒト・トリプシノーゲン遺伝子群、Ca²⁺-結合蛋白質群の IAV 感染による顕著な変化はみられなかつた。

一方、293T 細胞に、EK-v1、EK-v2 を強制発現させた、安定細胞株 (293T-EK-v1 5-1, 5-18, 293T-EK-v2 7-6, 7-21) を作成した。EK 特異的な抗体を用いたウエスタンブロットで 170, 140, 120kDa の EK-v1、及びそれらより数 kDa 大きい EK-v2 のバンドが確認された。

IAV を感染させ、72 時間後に細胞内の IAV 量を IAV-HA に対する特異的抗体を用いて測定したところ、293T 細胞に比べ、293T-EK-v1, v2 細胞において、IAV の顕著な増殖と IAV-HA プロセッシングの亢進により 25-kDa の IAV-HA₂ のバンドが出現したと考えられた。それを確認するため、IAV を多く含

むライセートを *in vitro* において TPCK トリプシンで室温 30 分処理すると、65-kDa の IAV-HA₀ が消失、代わりに 25-kDa の IAV-HA₂ が出現し、IAV-HA のプロセッシングが確認された。PRSS3-v2、EK-v1、EK-v2 を強制発現させたライセートのみでは IAV-HA のプロセッシングは起こらなかつたが、PRSS3-v2 に EK-v1 あるいは EK-v2 を加えると、TPCK トリプシン処理した場合同様に 65-kDa の IAV-HA₀ が消失、25-kDa の IAV-HA₂ が出現し、EK-v1 あるいは EK-v2 により活性化された PRSS3-v2 が IAV-HA のプロセッシングを促進させることが確認された。さらに、調べたほとんどのヒト培養細胞で EK mRNA の発現が観察されたが、HAT、TMPRSS2 及び TMPRSS4 の発現はある程度限られていた。また、PRSS1 及び PRSS3 も多くの細胞に発現がみられた。

これらのことから、従来から報告されていた TMPRSS2、TMPRSS4、HAT による直接的な IAV-HA の活性化経路に加え、PRSS (トリプシノーゲン) の EK (エンテロキナーゼ) による活性化が、IAV-HA のプロセッシングを促進する新たな IAV の感染経路の存在が示唆された。

4) 分子創薬的観点からの検討

エンテロキナーゼ (EK) が IAV 感染の成立、重症化に関わる新たなトリプシン様タンパク質分解酵素の一つと考えられた。EK は基質特異性が非常に高いこと (トリプシノーゲンの DDDDK 配列を認識し切断する)、及びその触媒ドメインが細胞外に露出していることから、副作用の少ない新たな抗インフルエンザ薬の標的になり得ることが示唆された。

また、*in vitro* においては EK-v1、EK-v2 とともに PRSS を活性化する酵素活性、および IAV のプロセッシング能は同程度有していたが、予備的な実験では細胞外に放出される IAV の量が、EK-v1 に比べ EK-v2 がより多かつたことから、新たに発見した EK-v2 が、IAV 感染の成立、重症化に強く関わっている可能性も考えられた。EK-v2 と EK-v1 の違いは 30 アミノ酸の挿入の有無だけで、その部位は細胞の外からアクセスできるため、この 30 アミノ酸部位も抗インフルエンザ薬の標的の候補になり得るか、さらなる検討が必要である。

5) HIV (Human immunodeficiency virus) 感染モデル系、HTLV-1 HTLV-1 (human T cell

leukemia virus-1)感染細胞株での実験

現在、HIV(Human immunodeficiency virus)の感染、増殖、輸送、出芽等を検討できる *in vitro* の感染モデル、及び当研究室で解析を続けてきた複数の HTLV-1 感染細胞株(HUT102、ST1、KK1 等)を使い、これらの感染においても、このエンテロキナーゼを介したトリプシノーゲンの活性化の影響を検討中である。

4. 研究成果

1) ヒト培養細胞から、従来から報告のあった 25 エクソンからなる EK 遺伝子(EK-v1)に加え、26 エクソンからなる新たな EK 遺伝子アイソフォーム(EK-v2)の cDNAs をクローニングした。

2)EK の十二指腸上皮以外での発現や役割については不明な点が多かったが、調べたほとんどのヒト培養細胞でEK 及び PRSS1、PRSS3 の発現がみられた。

3) EK-v1、EK-v2 は PRSS3-v2 トリプシノーゲンを活性化したが、TMPRSS2、TMPRSS4、HAT は PRSS3 を活性化できなかったこと、及び EK-v1、EK-v2、hPRSS3-v2 を強制発現させた、安定細胞株において、293T 細胞に比べ IAV の顕著な増殖と IAV-HA プロセッシングの亢進が見られたことから、これまで報告されていた TMPRSS2、TMPRSS4、HAT を介した IAV-HA の直接的な活性化経路に加え、PRSS (トリプシノーゲン) の EK (エンテロキナーゼ) による活性化が、IAV-HA のプロセッシングを促進する新たな IAV の感染経路の存在が示唆された。この新たな EK→PRSS→IAV-HA プロセッシングの経路を標的とした新たな IAV 感染治療薬の開発につながる事が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Kakoki K, Kamiyama H, Izumida M, Yashima Y, Hayashi H, Yamamoto N, Matsuyama T, Igawa T, Sakai H, Kubo Y. Androgen-independent proliferation of LNCaP prostate cancer cells infected by xenotropic murine leukemia virus-related virus. *Biochem*

Biophys Res Commun. 447, 216-22 (2014) (査読:有).

2. Shigematsu S, Hayashi H, Yasui K, Matsuyama T. SAM domain-containing N-terminal region of SAMHD1 plays a crucial role in its stabilization and restriction of HIV-1 infection. *Acta Med Nagasaki*, 58, 103-111 (2014) (査読:有).
3. Kakoki K, Shinohara A, Izumida M, Koizumi Y, Honda E, Kato G, Igawa T, Sakai H, Hayashi H, Matsuyama T, Morita T, Koshimoto C, Kubo Y. Susceptibility of murine cell lines to ecotropic murine leukemia virus and the cationic amino acid transporter 1 viral receptor sequences: implications for evolution of the viral receptor. *Virus Genes*. 48, 448-56 (2014) (査読:有).
4. Chua KJ, Kubo Y, Ma Y, Yasui K, Matsuyama T, and Hayashi H. A short variant BTBD2 as a novel negative regulator of IRF-associated signalling. *Int J Integrative Biol.* 14: 31-38 (2013) (査読:有).
5. Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y. CXCR4-Tropic, But Not CCR5-Tropic, Human Immunodeficiency Virus Infection Is Inhibited by the Lipid Raft-Associated Factors, Acyclic Retinoid Analogs, and Cholera Toxin B Subunit. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 29(2):279-88 (2013) (査読:有).
6. Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N. Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. *Adv Virol.* 2012:640894. (Epub 2012 Dec 6) (査読:有).
7. Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T, Hayashi H. Serum Starvation Activates NF- κ B Through G Protein β 2 Subunit-Mediated Signal. *DNA Cell Biol.* 31(11):1636-44 (2012) (査読:有).

[学会発表] (計 5 件)

1. インターフェロン・によるレトロウイルス感染抑制に関する新規細胞性因子の同定、久保嘉直、泉田真生、安井潔、林日出喜、松山俊文、第62回日本ウイルス学会学術総会、平成26年11月10~12日 (パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市))
2. インターフェロンG誘導遺伝子GILTによるHIV粒子産物抑制機構の解明、久保嘉直、神山陽香、泉田真生、田中勇悦、安井潔、佐藤祐徳、山本直樹、松山俊文、林日出喜、第61回日本ウイルス学会学術総会、平成25年11月10~12日 (神戸国際会議場(兵庫県・神戸市))
3. Identification of poly(I:C)-induced pancreatitis-related genes in IRF2-deficient mice, Hayashi H, 3rd International conference on "Current advances in Microbiology and Immunology", 平成24年6月21-22 (ULAANBAATAR (MONGOLIA))
4. ATL細胞株の細胞死をTRAIL-依存性に促進させる生物活性物質のスクリーニング、林日出喜、長谷川寛雄、河野友子、中尾一彦、松山俊文、第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月19~21日 (ロイトン札幌(北海道・札幌市))
5. 血清枯渴はG Protein $\beta 2$ を介したNF- κ B経路を活性化する、安井 潔、河野友子、久保嘉直、原口恵、重松小百合、蔡君柔、松山俊文、林日出喜、第 35 回日本分子生物学会、平成 24 年 12 月 13 日 (マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市))

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

長崎大学医歯薬学総合研究科

感染防御因子解析学分野

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cs/>のホームページに本教室の紹介や研究の内容を掲載している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 日出喜 (HAYASHI, Hideki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：10218589

(2) 研究分担者

久保 嘉直 (KUBO, Yoshinao)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：30273527

(3) 連携研究者

松山 俊文 (MATSUYAMA, Toshifumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：30165922