

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32707

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591481

研究課題名(和文) 高病原性インフルエンザ感染症の新たな制御法：標的分子、ウイルス活性化酵素の発見

研究課題名(英文) Identification of novel proteases involved in the regulation of highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses infection

研究代表者

奥村 裕司 (Yuushi, Okumura)

相模女子大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：70294725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスの感染性獲得には、宿主側のプロテアーゼによるウイルス外膜糖タンパク質(ヘマグルチニン：HA)の限定分解が必須である。高病原性鳥インフルエンザウイルスに特異的なHA切断部位配列を認識する新規ウイルス活性化酵素(MSPL/TMPRSS13)を発見した。本研究ではまず、培養細胞およびノックアウトマウスにウイルスを感染させ、本酵素がウイルスの感染・増殖に関与することを証明した。次に、本酵素の構造解析に取り組みこれに成功した。さらに、この構造を基盤に合成した酵素阻害剤についてin vitroでの特異性を明らかにした。現在、感染実験に対する阻害剤の効果を検討中である。

研究成果の概要(英文)：Cleavage of viral envelope glycoprotein, hemagglutinin (HA), by host cellular proteases is essential step for influenza virus to enter into the target cells. We identified that ubiquitous type II transmembrane serine proteases, MSPL and its splice variant TMPRSS13, were candidates of HA-processing proteases of diverse highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses. To confirm the involvement of these proteases in HPAI virus infection, highly virulent virus (A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1)) was infected into MSPL/TMPRSS13 stably expressed cells and MSPL/TMPRSS13-deficient mice (MSPL/TMPRSS13^{-/-}). As a result, we concluded that these proteases productions might be responsible for HPAI virus multicycle replication and spreading. We next succeeded to reveal the crystal structure of MSPL/TMPRSS13. Based on their structure, we generated specific inhibitors for MSPL/TMPRSS13. In vivo infectious experiments using their specific inhibitors are currently being investigated.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：高病原性鳥インフルエンザウイルス ウイルス活性化酵素 膜結合型プロテアーゼ プロテアーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

現在、高病原性鳥インフルエンザウイルスは、株によっては人にも感染する人畜共通感染症病原体との認識であり、また高病原性新型ウイルスを生み出す可能性のある病原体として考えられ、社会的にも大きな関心事となっている。このように感染力・伝播性が強い高病原性鳥インフルエンザウイルスではあるが、ウイルスが感染性を獲得するためには、弱毒株同様、宿主側のタンパク質分解酵素(トリプシン型セリンプロテアーゼ)によるウイルス外膜糖タンパク質(ヘマグルチニン:HA)の限定分解が必須である。高病原性のウイルス株は、このHAのプロテアーゼ切断部位が弱毒株に見られる単一の塩基性アミノ酸(QXR)ではなく、複数の連続した塩基性アミノ酸(RRRKKR、KKKRなど)から構成される特色を持つ。また、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染は全身性に広がることから、全身に発現し、特異的なHA切断部位配列を認識する宿主プロテアーゼの存在が示唆されていた。そこで、このような特色を有するウイルス活性化酵素の探索を進めた。画期的な結果として、ヒト気道に高発現し、さらに全身性にも発現が認められる膜結合型セリンプロテアーゼ(MSPL及びそのバリエーション TMRSS13)を同定し、その酵素的性状の解析に成功した。この酵素は、細胞膜上に局在し、高病原性鳥インフルエンザHAタンパクの切断部位に相当する連続した塩基性アミノ酸配列を最良の基質として加水分解することから、高病原性鳥インフルエンザウイルス活性化酵素である可能性が示唆された。加えて、HA遺伝子とMSPL/TMRSS13遺伝子との培養細胞を用いた共発現系から、合成されたHAタンパクが正しい位置で切断(プロセッシング)された際に見られる巨大細胞の出現頻度(膜融合活性)の増加を明らかにしており、ヒトにおける高病原性鳥インフルエンザウイルス感染を制御する標的分子としての可能性が極めて高くなった。以上の知見から、本研究では、細胞膜に局在する膜結合型セリンプロテアーゼ(MSPL/TMRSS13)の機能制御が、高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染能を制御するという点を、MSPL/TMRSS13安定発現細胞株やノックアウトマウスを用いた実験から明らかにする。これにより、MSPL/TMRSS13の選択的かつ効果的阻害物質は、現段階で有効な手段が確立されていない高病原性鳥インフルエンザウイルスおよび推測される新型ウイルス感染症の予防・治療に応用されるものと信じる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが見出した細胞膜局

在の膜結合型セリンプロテアーゼ(MSPL/TMRSS13)が、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の制御分子であることを世界で最初に明らかにすることである。具体的には、(1)MSPL/TMRSS13安定発現細胞株を用いた培養細胞レベルでの感染実験から、MSPL/TMRSS13発現量の変化がウイルスの活性化に及ぼす影響を検討する。(2)MSPL/TMRSS13ノックアウトマウスを用いたウイルス感染実験から、MSPL/TMRSS13欠損がウイルスの感染に及ぼす影響を検討する。(3)本酵素の構造解析を成功させ、その構造を基盤として開発した特異的阻害剤がウイルス感染能に与える影響を培養細胞系および動物実験系にて検討する。

3. 研究の方法

(1)安定発現細胞株を用いた解析:

解析に先立ち申請者らは、すでに様々な培養細胞株におけるMSPL/TMRSS13の遺伝子発現量をRT-PCR法で解析し、高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染標的細胞でもある血管内皮細胞の一つECV304細胞において、MSPL/TMRSS13の遺伝子発現が認められないことを見出した。そこで、本細胞におけるMSPL/TMRSS13安定発現細胞株の樹立に取り組み、これに成功した。また、HA遺伝子とMSPL/TMRSS13遺伝子との培養細胞を用いた共発現系から、合成されたHAタンパクのプロセッシングが、細胞間の膜融合で見られる巨大細胞の出現頻度で定量する系もすでに確立している。よって元株を比較対象とし、安定発現細胞株を用いたウイルス感染実験を行うことで、HAタンパクのプロセッシングを巨大細胞の出現頻度から定量するとともに、ウイルスの感染増殖様式が細胞によってどのような影響を受けるのかを、HA価、ウイルス感染価ならびに細胞変性効果により総合的に評価する。同時に、*in vitro*でのスクリーニングにおいて特異性が高かった酵素阻害剤の添加実験により、その抑制効果を同様の指標を用いて評価する。

(2)ノックアウトマウスの機能解析:

MSPL/TMRSS13遺伝子のノックアウトマウスを用い、酵素欠損がウイルス感染に与える影響からMSPL/TMRSS13の関与を明確にする。具体的には、ノックアウトマウスにウイルスを感染させた後、炎症の程度を示す炎症性サイトカインおよびケモカイン(IFN- γ 、IL-1 β 、MIP-1)量を測定する。同時に、組織学的な解析も行う(HE染色により炎症細胞の浸潤度を観察)。さらに、肺組織の懸濁液よりウイルスを調整し、培養細胞に感染させることで、活性化ウイルス量をウイルスタンパクに対する抗体を用いた蛍光免疫染色(immunofluorescence focus assay)にて定量

する。

(3) 酵素特異的阻害剤の開発：

本酵素の結晶構造解析を成功させ、その構造を基盤として開発した酵素特異的阻害剤がウイルス感染能に与える影響を培養細胞系および動物実験系にて検討する。酵素特異的阻害剤が培養細胞系および動物実験系におけるウイルス感染増殖様式にどのような変化をもたらすのかは、前述(1), (2)と同様の手法を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) 安定発現細胞株を用いた解析：

高病原性鳥インフルエンザウイルス活性化酵素は、ウイルス外膜糖タンパク質(ヘマグルチニン: HA)分子内の切断部位(RRRKKR、KKKR など)を特異的に認識できる酵素であることが必須である。HA 遺伝子(H5-HA)を MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株に発現させ、得られた培養上清をウエスタンブロッティング法で解析した結果、MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株において、HA 分子のプロセッシングを認めた(図1)。同時に、HA タンパクのプロセッシングを巨大細胞の出現頻度から定量した結果、親株(WT)に比べ MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株では、巨大細胞の出現頻度が有意に増加していた(図2)。

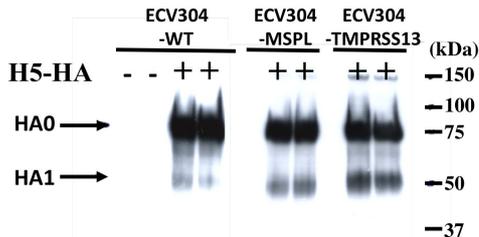


図1. MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株におけるウイルス外膜糖タンパク質(ヘマグルチニン: HA)分子のプロセッシング

MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株に高病原性鳥インフルエンザウイルス HA(H5-HA)を発現させ、HA 分子のプロセッシングを、抗 HA 抗体を用いた Western Blot 法で解析した。矢印()は、HA0; HA 前駆体, HA1; プロセッシング後活性体を示す。

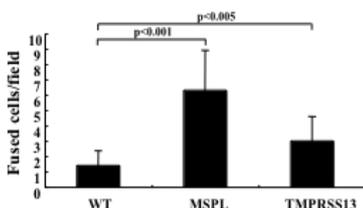


図2. MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株における HA 分子のプロセッシングを介した巨大細胞の出現頻度

MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株に高病原性鳥インフルエンザウイルス HA(H5-HA)を発現させ、巨大細胞の出現頻度を親株(WT)と比較検討した。

次に、MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株にウイルス(H5N1-KKKR)を感染させた後、得られた培養上清を再び細胞に感染させることで、活性化ウイルスの存在をウイルスタンパクに対する蛍光免疫染色法(immunofluorescence focus assay)にて検討した。結果、親株(WT)に比べ MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株では、活性化ウイルス量が有意に増加していた(図3)。

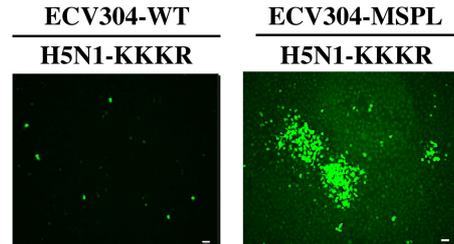


図3. 蛍光免疫染色による活性化ウイルス量の確認

MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株または親株(WT)にウイルスを感染させた後、得られた培養上清を再び細胞に感染させることで、活性化ウイルス量をウイルスタンパクに対する蛍光免疫染色法にて確認した。

以上の結果から、培養細胞レベルにおいて、膜結合型セリンプロテアーゼ MSPL/TMPRSS13 は、高病原性鳥インフルエンザウイルス HA 分子内の切断部位を正確に認識しプロセッシングすることによって、ウイルスの感染・増殖に関与することが証明された。

(2) ノックアウトマウスの機能解析

まず、MSPL/TMPRSS13 ノックアウトマウス(MSPL^{-/-})および野生型マウス(MSPL^{+/+})にウイルス(H5N1-KKKR)を感染させた後、6日後に炎症の程度を示す炎症性サイトカインおよびケモカイン(IFN- γ , IL-1 β , MIP-1)量を測定した(図4)。同時に、組織学的解析を行った(HE染色により炎症細胞の浸潤度合いを観察)(図5)。さらに、肺組織の懸濁液よりウイルスを調整し、培養細胞に再び感染させることで、活性化ウイルス量をウイルスタンパクに対する蛍光免疫染色にて定量した(図6)。結果、野生型マウスと比べて、組織学的変化、炎症性サイトカインおよびケモカイン量、活性化ウイルス量のいずれにおいてもノックアウトマウスにおいて軽減・減少傾向が見られた。現在、個体数を増やして再現性および有意差を確認している。

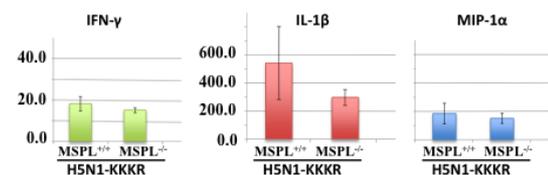


図 4. 高病原性鳥インフルエンザ感染肺中の炎症性サイトカイン量およびケモカイン量の比較

ウイルス感染 6 日後の肺ホモジネートに見られる炎症性サイトカインおよびケモカイン (IFN- γ , IL-1 β , MIP-1) 量を測定し、ノックアウトマウスと野生型マウスで比較検討した。

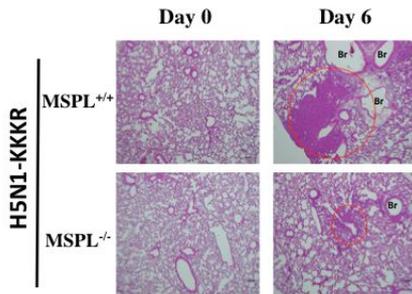


図 5. 高病原性鳥インフルエンザ感染肺の組織所見

ウイルス感染 6 日後の肺組織に見られる炎症所見をノックアウトマウスと野生型マウスで比較検討した。赤丸で囲んだ領域は、特に強い炎症反応が認められた部位を示す。

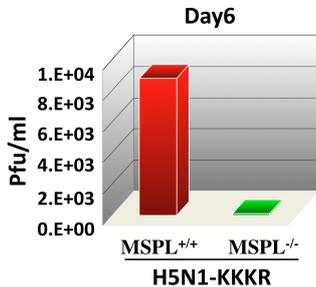


図 6. 高病原性鳥インフルエンザ感染肺中の活性化ウイルス量の比較

ウイルス感染 6 日後の肺組織の懸濁液よりウイルスを調整し、培養細胞に感染させた後、活性化ウイルス量をウイルスタンパクに対する蛍光免疫染色にて定量した。

(3) 酵素特異的阻害剤の開発 :

まず、リコンビナント酵素を大量調製し、結晶化の最適条件を見出し、大型放射光施設のビームラインで得たデータ集積から、結晶構造解析に取り組み、これに成功した。その構造を基盤として MSPL/TMPRSS13 特異的阻害剤 (候補 4 種類) を合成した。In vitro における、候補阻害剤の特性を検討した結果では、いずれの阻害剤も IC₅₀ 値が 1-10 nM と非常に高い特異性を有することが明らかとなった。現在は、特異的阻害剤が培養細胞系および動物実験系におけるウイルス感染増殖様式にどのような変化をもたらすのかを、前述と同様の手法を用いて解析中である。その結果を基に、in vivo における高病原性鳥インフルエンザウイルス活性化への MSPL/TMPRSS13 の関与を結論付け、特異的阻害剤を用いた新たな制御法を提案していきたい。

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 9 件)

- (1) Nagano H, Okumura Y, Mills EM, Nikawa T, Teshima-Kondo S. 他 8 名 (10 番目) A novel myogenic function residing in the 5' non-coding region of Insulin receptor substrate-1 (Irs-1) transcript. *BMC Cell Biol*, 査読有, 16(8), 2015, 1-10, doi: 10.1186/s12860-015-0054-8.
- (2) Hirasaka K. Molecular Nutritional Study on Prevention of Muscle Atrophy, *J Jpn Soc Nutr Food Sci.*, 査読有, 67, 2014, 291 - 297, <http://doi.org/10.4327/jnsnfs.67.291>
- (3) Endo H, Yano M, Okumura Y, Kido H. Ibuprofen enhances the anticancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. *Cell Death and Disease*. 査読有, 5, 2014, e1027(1-10) doi: 10.1038/cddis.2013.550.
- (4) Hirasaka K, Ikeda C, Kohno S, Okumura Y, Nikawa T. 他 9 名 (12 番目) Isoflavones derived from soy beans prevent MuRF1-mediated muscle atrophy in C2C12 myotubes through SIRT1 activation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 査読有, 59(4), 2013, 317-324, <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.59.317>
- (5) Abe T, Kohno S, Okumura Y, Terao J, Nikawa T. 他 9 名 (9 番目) Soy Glycinin Contains a Functional Inhibitory Sequence against Muscle-Atrophy-Associated Ubiquitin Ligase Cbl-b. *Int J Endocrinol*. 査読有, 2013:907565, 2013, 1-11, doi: 10.1155/2013/907565.
- (6) Abe T, Hirasaka K, Okumura Y, Mills EM, Nikawa T. 他 10 名 (10 番目) Cbl-b is a critical regulator of macrophage activation associated with obesity-induced insulin resistance in mice. *Diabetes*, 査読有, 62(6), 2013, 1957-1969, doi: 10.2337/db12-0677.
- (7) Utsunomiya K, Owaki K, Okumura Y, Nikawa T. 他 9 名 (3 番目) An Intracellular Fragment of Osteoactivin Formed by Ectodomain Shedding Translocated to the Nucleoplasm and Bound to RNA Binding Proteins. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, 76(12), 2012, 2225-2229, doi: 10.1271/bbb.120515.
- (8) Kohno S, Yamashita Y, Abe T, Okumura

Y, Nikawa T. 他 9 名 (11 番目)
Unloading stress disturbs muscle
regeneration through perturbed
recruitment and function of
macrophages. *J Appl Physiol*, 査読
有, 112(10), 2012, 1773-1782,
doi: 10.1152/japplphysiol.00103.

- (9) Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Yano
M. 他 5 名 (2 番目) Role of host
cellular proteases in the
pathogenesis of influenza and
influenza-induced multiple organ
failure. *Biochim Biophys Acta*, 査
読有, 1824(1), 2012, 186-194,
doi:10.1016/j.bbapap.2011.07.001.

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 二川 健、無重力環境での筋蛋白質代
謝と栄養、日本栄養改善学会、2014. 8.
20-22、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (2) 奥村 裕司 他、Myostatin 活性化を
標的としたプロテアーゼ阻害剤はス
テロイド性筋萎縮を抑制する、日本病
態プロテアーゼ学会、2014. 8. 8-9、
千里ライフサイエンスセンター (大
阪府)
- (3) 平坂 勝也、廃用性筋萎縮に関する分
子栄養学的研究、日本栄養・食糧学会、
2014. 5. 30-6.1、札幌市教育文化会
館 (北海道)
- (4) 奥村 裕司 他、Cbl-b と脂肪組織浸潤マクロファ
ージの活性化、日本病態プロテアーゼ学
会、2013. 8. 16-17、千里ライフサイ
エンスセンター (大阪府)
- (5) 平坂 勝也 他、サルコペニアにおけ
るミトコンドリア内カルシウム取り
込み、日本栄養・食糧学会、2013. 5.
24-26、名古屋大学 東山キャンパス
(愛知県)
- (6) 二川 健、廃用性筋萎縮改善ペプチド、
日本栄養・食糧学会、2013. 5. 24-26、
名古屋大学 東山キャンパス (愛知
県)
- (7) 平坂 勝也 他、UCP3 と Hax 1 の相
互作用によるミトコンドリアへのカ
ルシウムイオン流入の調節機構、日本
生化学会、2012. 12. 14-16、福岡国
際会議場 (福岡県)
- (8) 奥村 裕司 他、型膜結合型セリン
プロテアーゼの MSPL/TMPRSS13 のノ
ックアウトマウスは高病原性鳥イン
フルエンザウイルスの増殖を抑制す
る、日本生化学会、2012. 12. 14-16、
福岡国際会議場 (福岡県)
- (9) 二川 健 他、Cbl-b によるマクロフ
ァージ活性化調節機構、日本分子生物
学会、2012. 12. 11-14、福岡国際会
議場 (福岡県)
- (10) 奥村 裕司 他、型膜結合型セリ
ンプロテアーゼ、MSPL/TMPRSS13-KO

マウスにおける高病原性鳥インフル
エンザウイルス(H5N1)の感染病態解
析、日本病態プロテアーゼ学会、2012.
8. 10-11、オークラアクティビティホテ
ル 浜松 (静岡県)

[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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 裕司 (OKUMURA YUUSHI)
相模女子大学・栄養科学部
教授
研究者番号: 70294725

(2) 研究分担者

二川 健 (NIKAWA TAKESHI)
徳島大学・大学院ヘルス・イノベーション研究部・
教授
研究者番号: 20263824

平坂 勝也 (KATSUYA HIRASAKA)
長崎大学・水産学部・助教
研究者番号: 70432747

(3) 連携研究者

()

研究者番号: