

平成 30 年 8 月 23 日現在

機関番号：32707

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09585

研究課題名(和文) ウイルス活性化酵素の構造を基盤とした新規治療薬の開発：高病原性感染症の新制御法

研究課題名(英文) The development of the new therapeutic drug which based on the structure of the virus activation enzyme: The new control method of the highly pathogenic infectious diseases.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000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、本酵素の構造解析に成功した。本研究ではまず、本酵素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。次に、本酵素を安定に発現する培養細胞にウイルスを感染させ、本酵素特異的阻害剤がウイルスの感染・増殖を抑制することを証明した。現在、in vivoでの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. In addition, we succeeded to reveal the crystal structure of MSPL/TMPRSS13. In this study, based on their structure, we first generated specific inhibitors for MSPL/TMPRSS13. 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 with or without their specific inhibitors. As a result, we concluded that these proteases specific inhibitors might be suppress HPAI virus multicycle replication and spreading. In vivo infectious experiments using their specific inhibitors are currently being investigated.

研究分野：生化学・分子生物学・ウイルス学

キーワード：高病原性ウイルス感染症 ウイルス活性化酵素 膜結合型プロテアーゼ 酵素阻害剤

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、その酵素学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。さらに昨年、MSPL/TMRSS13の構造解析に世界ではじめて成功した経緯から、具体的な酵素阻害剤の設計が可能となった。

以上の知見から、本研究では、MSPL/TMRSS13という膜結合型酵素の機能制御が、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、酵素の構造を基盤として開発した特異的阻害剤を用いた実験から明らかにする。これにより、選択的かつ効果的酵素阻害物質は、現段階で有効な手段が確立されていない高病原性感染症(鳥インフルエンザ、推測される新型ウイルス感染症のみならずHIVやエボラ出血熱などの新興感染症)の予防・治療にも応用されるものと信じる。

2. 研究の目的

申請者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、また本酵素の構造解析を成功させたことから、本研究では、ウイルス活性化酵素(MSPL/TMRSS13)の分子構造を基盤として合成した阻害剤による高病原性鳥インフルエンザ感染阻害効果の詳細を、1)特異的阻害剤を用いた酵素活性の阻害と培養細胞レベルでのウイルス感染増殖様式の変化、2)マウスを用いた個体レベルでのウイルス感染実験における酵素阻害剤の効果の評価、3)発現調節機構を応用した酵素活性の減弱と酵素阻害剤の併用がウイルス感染増殖様式に与える影響から明確にし、具体的な高病原性ウイルス感染症の予防・治療法を提案することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 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/TMRSS13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の測定は、まず、トリス緩衝液(0.1M Tris-HCl, pH 8.0)を用いて、表1に記載する各阻害剤(ペプチド化合物)の存在下または非存在下で、MSPLと各阻害剤を37°Cの条件下で5分間反応させた。次いで、反応後の反応液に蛍光標識人工ペプチド基質であるPyr-RTKR-MCAを添加し反応させ、その反応産物(AMC: 7-amino-4-methylcoumarin)の生成量を、蛍光分光光度計を用いて励起波長370nm、発光波長460nmで測定し、反応液中に残存するMSPLの酵素活性を評価した。なお、残存する酵素活性は、1分間あたり1µmolのAMCを生成する酵素量を1単位(unit)とした。反応液中に残存するMSPLの酵素活性から、各阻害剤のMSPLに対する阻害活性を、50%阻害濃度(IC₅₀)として算出した。

(2) 安定発現細胞株を用いた解析:

解析に先立ち申請者は、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。そこでまず、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。そこでまず、ECV304-WT細胞およびECV304-MSPL細胞(6well plate; 1x10⁵ cells/well)に対し各種H5N1ウイルスをmoi=1で感染させ、感染1時

間後に培地交換（この際の血清不含培地に終濃度 0-100 μM で酵素阻害剤を添加）し、さらに 24 時間培養した。回収した培地各々の希釈系列をつくり、別途用意した MDCK 細胞（96 well plate; 1×10^4 cells/well = 100 μl ）に感染させ 12 時間培養した後、ウイルスの感染増殖様式に及ぼす阻害効果を蛍光免疫染色法 (immunofluorescence focus assay) にて評価した。まず、再感染させた MDCK 細胞を 0.1% TritonX-100 を含む 4% パラホルムアルデヒド溶液にて室温で 30 分間固定した後、PBS(-) で 3 回洗浄し、ウイルス抗原を認識する一次抗体（ポリクローナル抗 H5N2 抗体：1000 倍希釈）にて室温で 40 分間反応させた。その後、PBS(-) で 3 回洗浄し、一次抗体を認識する蛍光標識二次抗体（Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体：500 倍希釈）にて室温で 40 分間反応させた。最後に PBS(-) で 3 回洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) 酵素特異的阻害剤の開発：

いずれの阻害剤も IC_{50} 値が 1-3 nM と、従来から Furin 阻害剤として知られている Dec-RVKR-cmk よりも MSPL に対して有意に強い阻害活性を示した。MSPL に対して非常に高い特異性を有することが明らかとなった (表 1)。今回合成した 4 種類の阻害剤は、MSPL に対して特異的且つ高い阻害活性を發揮するペプチド化合物であり、MSPL 特異的阻害剤として有用であることが確認された。

阻害剤	IC_{50} for MSPL
Dec-RVKR-cmk	10 nM
Ac-KQRR-cmk	2.1 nM
Ac-KKKR-cmk	2.8 nM
Ac-KKRR-cmk	1.1 nM
Ac-KRRR-cmk	1.7 nM

表 1. MSPL に対する阻害活性

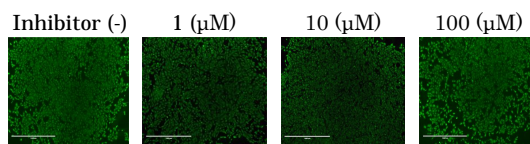
トリス緩衝液 (0.1M Tris-HCl, pH8.0) を用いて、各阻害剤の存在下または非存在下で、MSPL と 37、5 分間反応させた。反応後の反応液に蛍光標識人工ペプチド基質 (Pyr-RTKR-MCA) を添加し反応させ、反応産物 (AMC) の生成量を、蛍光分光光度計を用いて励起波長 370 nm、発光波長 460 nm で測定し、反応液中に残存する MSPL の酵素活性を評価した。各阻害剤の MSPL に対する阻害活性を、50% 阻害濃度 (IC_{50}) として算出した。

(2) 安定発現細胞株を用いた感染実験：

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 MDCK 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 (図 1、図 2)。

図 1 に示すように、H5N1-野生型 (-RKKR-type) ウイルスの方では、従来の furin inhibitor (Ac-RVKR-cmk)の方が、ウイルス感染をより阻害する傾向がみられた。一方で、図 2 に示すように、H5N1-変異型 (-KKKR-type) ウイルスの方では、従来の furin inhibitor (Ac-RVKR-cmk) よりも今回デザインした Ac-KRRR-cmk (MSPL 特異的阻害剤) が、ウイルス感染を強く阻害する傾向がみられた。

A. Inhibitor: Ac-RVKR-cmk (μM)



B. Inhibitor: Ac-KRRR-cmk (μM)

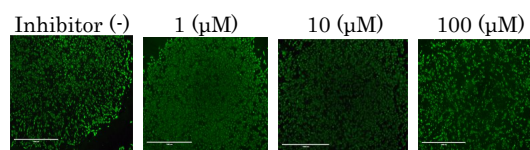
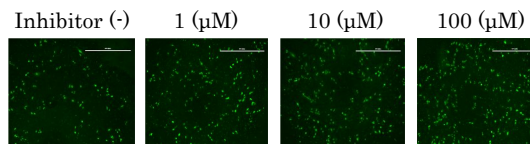


図 1. 培養細胞を用いた H5N1-W T(RKKR-type) ウイルス感染実験における各種 inhibitor の阻害効果の評価

MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株または親株 (WT) に、阻害剤存在下、または非存在下でウイルスを感染させた後、得られた培養上清を MDCK 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。

A. Inhibitor: Ac-RVKR-cmk (μM)



B. Inhibitor: Ac-KRRR-cmk (μM)

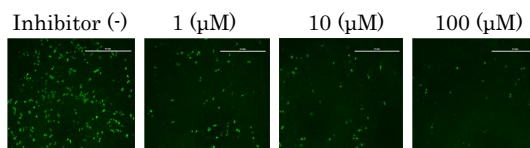


図 2. 培養細胞を用いた H5N1-M ut(KKKR-type) ウイルス感染実験における各種 inhibitor の阻害効果の評価

MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株または親株 (WT) に、阻害剤存在下、または非存在下でウイルスを感染させた後、得られた培養上清を MDCK 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、および MSPL/TMPRSS13 特異的阻害剤の有効性・有用性が証明された。

これらの結果を基に、*in vivo* においても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、特異的阻害剤の有用性を証明し、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5件)

1. Takeya M, Okumura Y, Nikawa T. Modulation of cutaneous extracellular collagen contraction by phosphorylation status of p130Cas. *J Physiol Sci.* 67(5):613-622 (2017) 査読有
2. Hirasaka K, Mills EM, Okumura Y, Nikawa T. 他 11 名 (14 番目) UCP3 is associated with Hax-1 in mitochondria in the presence of calcium ion. *Biochem Biophys Res Commun.* 25;472(1):108-13 (2016) 査読有
3. Ohno A, Hirasaka K, Abe T, Okumura Y, Nikawa T. 他 10 名 (11 番目) Structural analysis of the TKB domain of ubiquitin ligase Cbl-b complexed with its small inhibitory peptide, Cblin. *Arch Biochem Biophys.* 15;594:1-7. (2016) 査読有
4. Kikuchi M, Shimada M, Yamada N, Shimano H. 他 4 名 (2 番目) Crucial Role of Elovl6 in Chondrocyte Growth and Differentiation during Growth Plate Development in Mice. *PLoS One.* 28;11(7):e0159375. (2016) 査読有
5. Nagano H, Okumura Y, Mills EM, Nikawa T, Teshima-Kondo S. A novel myogenic function residing in the 5' non-coding region of Insulin receptor substrate-1 (Irs-1) transcript. 他 10 名 (11 番目) *BMC Cell Biol.* 11;16:8. (2015) 査読有

[学会発表](計7件)

- (1) 奥村 裕司 他、無重力ストレスによる筋萎縮における酸化ストレスの重要性、日本病態プロテアーゼ学会、2017. 8. 11-12、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- (2) 奥村 裕司 他、高病原性インフルエンザ感染に関わる宿主酵素 MSPL と阻害ペプチドとの複合体構造、日本栄養・食糧学会、2017. 5. 19-21、沖縄コンベンションセンター (沖縄県)
- (3) 奥村 裕司 他、型膜貫通型セリンプロテアーゼ MSPL とペプチド性阻害剤との複合体結晶構造解析、日本分子生物学会、2016. 11.30-12.2、パシフィコ横浜 (神奈川県)

- (4) 奥村 裕司 他、廃用性筋萎縮原因酵素 Cbl-b と阻害ペプチド Cblin との複合体結晶構造解析、日本病態プロテアーゼ学会、2016. 8. 5-6、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- (5) 奥村 裕司 他、高病原性インフルエンザ感染に関わる宿主酵素 MSPL と阻害ペプチドとの複合体構造、日本蛋白質科学会、2016. 6. 7-9、福岡国際会議場 (福岡県)
- (6) 奥村 裕司 他、UCP3 と Hax-1 の相互作用様式の解明、日本病態プロテアーゼ学会、2015. 8. 21-22、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- (7) 永野 ひかる 他、A novel myogenic function residing in the 5' non-coding region of Insulin receptor substrate-1 (Irs-1) transcript, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015. 5. 14-18、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

[その他]

なし

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

嶋田 昌子 (SHIMADA MASAKO)
相模女子大学・栄養科学部・
教授
研究者番号：30637369

永野 ひかる (NAGANO HIKARU)
大阪府立大学・研究員
研究者番号：10748924

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし