

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：32707

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08453

研究課題名(和文) 宿主酵素を標的分子とした新規治療薬の開発：高病原性ウイルス感染症の新たな制御法

研究課題名(英文) The development of the new therapeutic drug by targeting host proteases: A novel regulatory method for 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) 3,400,000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ウイルス活性化酵素(MSPL)の発見と構造解析の成功を機に、本研究ではまず、MSPLの構造を基盤に合成した阻害剤についてその性状を明らかにした。次に、MSPL安定発現細胞株を用いた感染実験より、酵素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。さらに、類縁酵素TMPRSS2のホモロジーモデルの構築に成功した。これらにより、COVID-19にも有効な予防・治療薬の開発が進むと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高病原性ウイルスの感染メカニズムにおいて、感染時における宿主側のウイルス活性化酵素を同定できたこと、およびその酵素の立体構造を決定し、酵素特異的阻害剤を開発できたことは、ウイルスが、宿主側のどのような因子を利用して感染・増殖するのかを明らかにしたことを意味し、学術的意義は大きい。同時に、酵素特異的阻害剤が高病原性ウイルス感染症を制御し得ることを証明した事実は、高病原性ウイルス感染症に対する新たな制御法(予防・治療法)の獲得につながり、社会的意義は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：Infection of certain influenza viruses is triggered when its HA is cleaved by host cell proteases. We identified that ubiquitous type II transmembrane serine proteases, MSPL, were candidates of HA-processing proteases for highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses. In addition, we succeeded to solve the crystal structure of MSPL. In this study, based on the structure of MSPL, we first generated specific inhibitors for MSPL. To confirm the involvement of these proteases in HPAI virus infection, highly virulent virus (A/Crow/Kyoto/53/2004 (H5N1)) was infected into MSPL 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. Furthermore, based on the structure of MSPL, we also constructed a homology model of TMPRSS2. The model may provide the structural insight for the drug development for COVID-19.

研究分野：酵素学、ウイルス学

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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及びそのパリアントTMPRSS13)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/TMPRSS13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/TMPRSS13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/TMPRSS13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/TMPRSS13)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/TMPRSS13)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)今回開発した特異的阻害剤の構造をもとに、さらに低分子化が可能であるか否かを解析・スクリーニングし、候補となる低分子化合物の効果を培養細胞系および動物実験系にて検討する。以上のアプローチにより、膜結合型プロテアーゼ(MSPL/TMPRSS13)の特異的阻害剤をもって、高病原性ウイルス感染症の新たな制御法を確立し、治療薬として提案する。

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(図1)。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(表1)。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。なお、残存する酵素活性は、1分間あたり1 µmol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らは、すでに様々な培養細胞株におけるMSPL/TMPRSS13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/TMPRSS13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/TMPRSS13 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 (6 well plate; 1×10^5 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 μ M 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 μ l) 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性状解析:

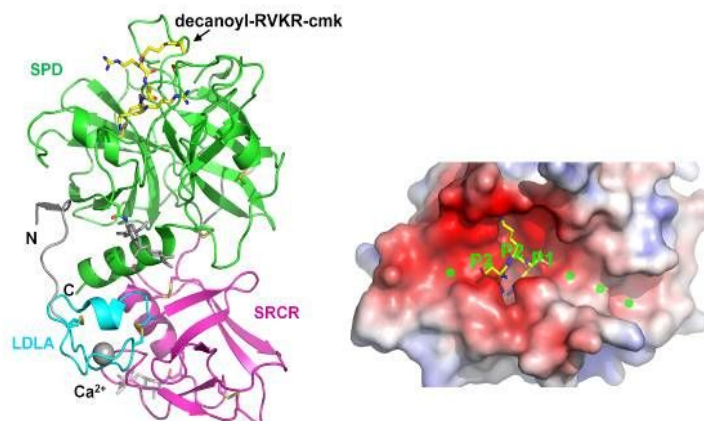


図 1. (左) ヒト MSPL 細胞外領域の全体構造。3つのドメインをそれぞれ水色 (LDLA)、紫 (SRCR)、黄緑 (SPD) で表す。ペプチド様阻害剤 (decanoyl-RVKR-cmk) をスティックモデルで表す。(右) ヒト MSPL の活性部位表面電荷図。赤は負電荷、青は正電荷を表す。切断ペプチドのアルギニン(P1)-リジン(P2)-バリン(P3)をスティックモデルで、残りの想定される残基の位置を緑の点で表す。

図 1 に示す MSPL の構造を基盤に、表 1 に示す 4 種類の阻害剤を合成した (Ac-KQRR-cmk, Ac-KKKR-cmk, Ac-KKRR-cmk, Ac-KRRR-cmk)。いずれの阻害剤も IC₅₀ 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発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 (IC₅₀) 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 2、図 3)。図 2 に示すように、H5N1-野生型 (-RKRR-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 3 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。

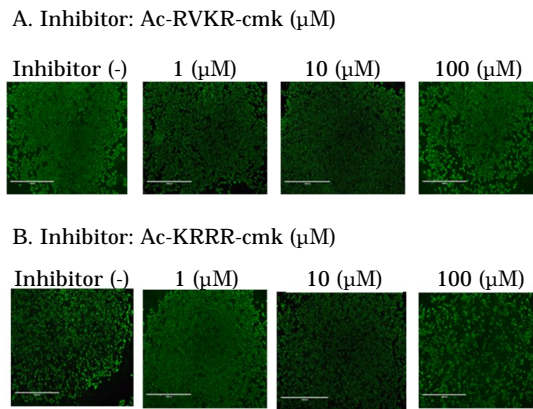


図2 . 培養細胞を用いたH5N1-WT(-RKKR- type)ウイルス感染実験における各種inhibitorの阻害効果の評価
MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株または親株(WT)に、阻害剤存在下、または非存在下でウイルスを感染させた後、得られた培養上清を MDCK 細胞に感染させることで、活性化ウイルス量をウイルスタンパクに対する蛍光免疫染色法にて確認した。

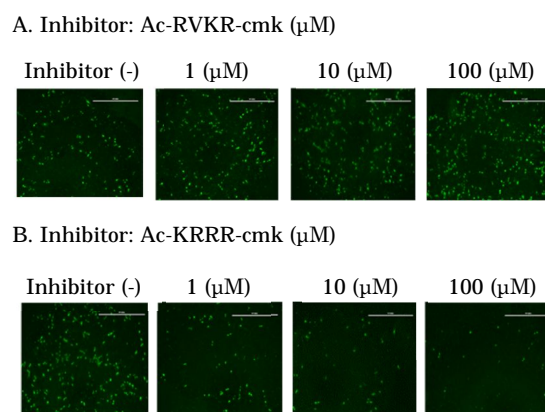


図3 . 培養細胞を用いたH5N1-Mut(-KKKR- type)ウイルス感染実験における各種inhibitorの阻害効果の評価
MSPL/TMPRSS13 安定発現細胞株または親株(WT)に、阻害剤存在下、または非存在下でウイルスを感染させた後、得られた培養上清を MDCK 細胞に感染させることで、活性化ウイルス量をウイルスタンパクに対する蛍光免疫染色法にて確認した。

図2 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3 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。

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ていきたい。さらに今回の研究成果の発展として MSPL/TMPRSS13 の類縁酵素である TMPRSS2 の構造のモデリングにも成功した(図4)。

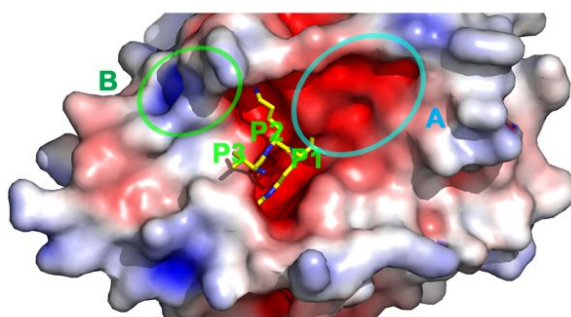


図4. ヒトTMPRSS2の活性部位のモデル構造の表面電荷図
アルギニン(P1)の下流が結合する領域(楕円A)がMSPLよりも広がっている。

TMPRSS2 は MSPL/TMPRSS13 とともに、昨年から今年にかけて相次いで SARS-CoV-2 の活性化酵素であることが論文上で報告されており、これらの酵素特異的阻害剤は、新型コロナウイルス感染症に対する有効な予防・治療薬の開発が進むと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuushi Okumura et al.	4. 巻 314
2. 論文標題 Reactive oxygen species upregulate expression of muscle atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b in rat L6 skeletal muscle cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 C721-C731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00184.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuushi Okumura et al.	4. 巻 4
2. 論文標題 Crystal structure of inhibitor-bound human MSPL that can activate high pathogenic avian influenza.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000849	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥村 裕司 他
2. 発表標題 高病原性インフルエンザ感染に関わる宿主酵素MSPLと阻害剤との複合体構造
3. 学会等名 日本病態プロテアーゼ学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 高病原性インフルエンザウイルス感染に関わる宿主酵素MSPL特異的な阻害ペプチドの開発	発明者 奥村 裕司 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-126822	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	嶋田 昌子 (Shimada Masako) (30637369)	相模女子大学・栄養科学部・教授 (32707)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関