

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590167

研究課題名(和文) 広範な抗ウイルス薬ターゲットとなる新規シグナル伝達分子の検索とその機構解析

研究課題名(英文) Analysis and search of novel signal transduction-related molecules targeting a broad spectrum of antiviral drugs

研究代表者

森本 金次郎 (Morimoto, Kinjiro)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：80183664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： インフルエンザウイルス感染において、感染初期の細胞内遺伝子の発現変動を解析した。さらに、ウイルス粒子表面のHAタンパク質に結合し、ウイルスの細胞内への侵入を阻害する細菌 *Pseudomonas fluorescens* 由来レクチンPFLの細胞への影響を調べるため、PFL添加後の遺伝子発現の変動も解析した。PFLと遺伝子配列相同性を持つ *P. mandelii* 由来レクチン(PML)と *P. taiwanensis* 由来レクチン(PTL)を大腸菌で発現させ、精製し、これらレクチンの抗インフルエンザ活性を持つことを示した。また、PFLはネコ免疫不全ウイルスに対しても感染阻害効果を示すことも分かった。

研究成果の概要(英文)： In early stages (4hpi and 8hpi) of infection with influenza virus, changes in expression of the cellular genes were analyzed using human lung cell lines (A549 cells and NCI-H292 cells). Mannose-binding lectin PFL (derived from *Pseudomonas fluorescens* Pf01 strain), which inhibited virus-invasion into the host cells due to its binding with HA protein on the envelope of influenza virus particle, was examined for effect of the cellular gene expression. PML gene (lectin derived from *Pseudomonas mandelii*) and PTL gene (lectin derived from *Pseudomonas taiwanensis*) were cloned, expressed in *E. coli*, and the gene products were purified. These lectins were examined for the inhibition of influenza virus infection. PFL was also found to have an activity for the invasion inhibition of feline immunodeficient virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス感染 レクチン 抗ウイルス活性 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染における宿主細胞の防御機構は、まず自然免疫の応答が惹起されることにより始まる。感染初期に起こる自然免疫反応は、Toll 様受容体や RIG-I 様受容体等によるウイルスの侵入を感知することから始まり、細胞内各種シグナル伝達分子の活性化により、I 型インターフェロン (IFN) の産生による近隣細胞の“抗ウイルス状態”の誘導及び炎症性サイトカインの産生が起こり、その後の獲得免疫への橋渡しをすることが大きな役割である。近年、このような自然免疫系の理解は著しい進展を遂げ、感染初期の自然免疫の働きは、その後の獲得免疫への橋渡しをすること以上に症状の進行や重篤化に重要な要因となることが明らかとなっている。感染の始まりはウイルスと宿主細胞の 1 対 1 の対応から開始される。まずはこの初期応答を明確に理解することが、ウイルス感染の進行、病態の進行を抑える重要なポイントとなり、広範な抗ウイルス薬の開発への手掛りとなると考える。

本申請者は、以前より細菌、藍藻および海藻等の下等生物に存在する高マンノース型糖鎖結合性レクチンファミリーの抗ウイルス活性を解析してきた。その結果、これらレクチンはウイルス粒子表面にある糖タンパク質糖鎖に直接結合することにより、ウイルスの細胞内への侵入を阻止することを示し、新規の抗ウイルス薬としての有用性を示した [Sato et al, JBC, 286, 19446- (2011)]

ウイルスや細菌などの病原性微生物には高マンノース型糖鎖を表面構造に有するものが多い反面、ヒト細胞では高マンノース型糖鎖構造は極めて稀な存在であることから、これらレクチンは病原体を特異に認識する分子として医薬品への応用化が期待されている。しかしながら、これらレクチンがウイルスの表面糖タンパク質分子に結合する以外に、宿主細胞にどのような影響を与えるか

の詳細は研究されていない現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ウイルス感染初期に誘導される宿主のシグナル伝達機構に関わる新規の機能性蛋白質を探索のターゲットとし、広範なウイルスに有効な抗ウイルス薬の開発を目指した基盤的研究を行う事である。これまでに新規の高マンノース型糖鎖結合性レクチンファミリーがウイルスの侵入を強力に阻止することを示している。しかしながら、これらレクチンを医薬品への応用化に資するためには、これらレクチンが生体にどのような影響を及ぼすか(宿主細胞表面の糖タンパク質にも結合し、様々な作用を惹起することが考えられる)を明確にしておかなければならない。

そこで、本研究では、ウイルス感染初期における細胞応答を詳細に調べると同時に、レクチンそのものの生体への作用、たとえばサイトカインなどの遺伝子変動を明らかにすること、すなわち、ウイルス感染初期の宿主細胞応答の解析とレクチンによる細胞応答の解析を同時並行的に行うことにより、予防および治療の両側面に立脚した抗ウイルス薬の創生を目指した。本研究においては、*Pseudomonas fluorescens* 由来レクチン (PFL) を中心に研究を進める。

さらには、PFL の有用性を高めるための遺伝子組換え改変、PFL と相同性のあるレクチンの探索、インフルエンザウイルス以外のウイルスでの抗ウイルス活性を調べた。

## 3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス感染初期の宿主細胞遺伝子の発現変動の解析

インフルエンザウイルス (A/Udorn/H2N2 株) 感染 4 時間後と 8 時間後の細胞 (A549 細胞と

NCI-H292 細胞を使用)より RNA を抽出し、各種遺伝子の発現変動をマイクロアレイ法により解析した。

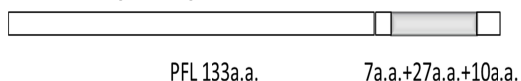
(2)*Pseudomonas fluorescens* 由来レクチン (PFL) による細胞遺伝子の発現変動の解析  
培地に PFL 最終濃度 200nM, 2 μM 添加した細胞において、4 時間後に細胞 RNA を抽出、各種遺伝子の発現変動をマイクロアレイ法により解析した。

(3)PFL と相同性を持つレクチンの抗ウイルス活性の解析

*Pseudomonas mandelii* 由来レクチン (PML; PFL とのアミノ酸配列相同性 96%) と *P. taiwanensis* 由来レクチン (PTL; PFL とのアミノ酸配列相同性 72%) の遺伝子領域を DNA 合成し、大腸菌発現ベクターに挿入し、大腸菌にて発現させ、遺伝子産物を精製した。それらレクチンの抗ウイルス活性を調べた。

(4)PFL の応用を目指した組換えタンパク質の産生 (PFL-TM の作製)

PFL 遺伝子 (133 アミノ酸長) に脂質二重膜貫通部位 (インフルエンザウイルス HA タンパク質のトランスメンブレン領域のアミノ酸配列) を付加した組換え遺伝子 (PFL-TM) を構築した。その遺伝子をクローニングし、PFL-TM タンパク質 (177 アミノ酸長) を産生させた。(下図)



(5)ネコ免疫不全ウイルス (FIV) の感染阻効果

ネコリンパ腫由来 3201 細胞-FIV 感染系において、培地中に PFL を添加し、感染阻害効果を調べた。また、FIV の co-receptor である CXCR4 リセプター (CXCR4) の細胞外領域 ECL(extracellular loop)-1, ECL-2, ECL-3

に相当するペプチド ECL-1:DAVANWYFGKFLCK (14a.a.); ECL-2: ADGRYICDRFYPSDSLWLVVF (20a.a.); ECL-3; DSFILLEIKQGCEFEFSTV (19a.a.)の合成を行い、それらペプチド添加時の感染阻効果調べた。

#### 4. 研究成果

(1)インフルエンザウイルス感染初期の宿主細胞遺伝子の発現変動

ヒト肺がん由来 A549 細胞と NCI-H292 細胞 (以後 H292 細胞) を用いてインフルエンザウイルス (A/Udorn/H3N2 株) 感染初期の宿主細胞遺伝子の発現変動を調べた。A549 細胞はウイルス感染後の細胞変性は顕著に現れない (ウイルスの増殖は起こっている)。一方、同じくヒト肺がん由来である H292 細胞はウイルス感染後著しい細胞変性を呈し、24 時間後には細胞が死滅する。この様に細胞により、著しく異なる様相を呈することは以前より示されていることである。当然、個体においては様々な細胞種が混在していることから、様々な細胞においてウイルス感染初期の遺伝子変動を解析する必要がある。

まずは、A549 細胞において、ウイルス感染後 4 時間あるいは 8 時間において 4 倍以上の発現変動がある遺伝子に関して調べた。発現変動遺伝子の数は以下の様になった。感染進行とともに発現増加の遺伝子の数が著しく増えている。

	4hpi	8hpi	4hpi or 8hpi	4hpi and 8hpi
変動数	158	311	427	42
発現増加	114	251	348	18
発現減少	44	60	79	24

ウイルス感染の初期段階に關与する遺伝子群として、ウイルスの認識、侵入の感知に關与するパターン認識受容体の遺伝子に變動が見られていた。TLR2, TLR3, MyD88, RIG-I, MDA5, LGP2, TRIM25, NOD1, NOD2 の発現増加、

これらに引き続くインターフェロン調節因子 IRF-7 の発現増加が見られた。IRF-1, -2, -7, -9 の発現増加により誘導される Ⅱ型インターフェロン (IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ )、インターフェロン (IL-28A, IL-28B, IL-29) と多数のサイトカイン (TNF superfamily の多数の遺伝子群, IL-1B, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12A)、ケモカイン (CCL3, CCL5, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13) の遺伝子発現の増加が見られた。さらには、Ⅱ型インターフェロンの発現誘導は JAK/STAT から IRF 経路を経て、多くのインターフェロン応答遺伝子の誘導を導いていることも認められた。逆に、サイトカインシグナル抑制因子 (SOCS1, SOCS3) 遺伝子の発現も増加していることも示された。一方、IL-9 は顕著な発現減少を示した。

次に、H292 細胞において、同様に感染 4 時間、8 時間での発現変動を解析した。発現変動遺伝子の数は以下の様になった。A549 細胞の場合と異なり、発現増加より減少する遺伝子の方が多く、感染進行に伴い発現減少の遺伝子が多くなっている。

	4hpi	8hpi	4hpi or 8hpi	4hpi and 8hpi
変動数	99	131	181	49
発現増加	44	28	68	4
発現減少	55	103	113	45

A549 細胞で見られた様な、ウイルス粒子の感知機構、インターフェロン誘導に関与する遺伝子群、さらにインターフェロンより誘導される遺伝子等の変動は顕著でなかった。明らかに抗ウイルス作用の発動がみられていないことが示された。僅かのサイトカイン (TNF superfamily の幾つか遺伝子, IL-1B, CCL4, CXCL10) の遺伝子発現の増加が見られたに過ぎない。

両細胞に共通して発現変動がみられる遺伝子は IL-1B, TNF superfamily (TNFSF6, TNFSF10), CXCL10, OAS2, SOCS1 が増加して

いた。A549 細胞はインフルエンザウイルスを認識し、インターフェロン遺伝子の発現増加がみられるとともに、多くの抗ウイルス遺伝子の発動が見られる。しかしながら、ウイルスの産生は起こっている。H292 細胞はインフルエンザウイルスの認識、インターフェロン等の抗ウイルス遺伝子群の発現増加が見られず、細胞は著しい細胞変性を呈する。感染に用いる細胞種において、様々な遺伝子の応答があり、それらは細胞種に応じて非常に異なることが示された。このことより、*in vitro* において抗ウイルス薬ターゲットを解析することの困難が浮き彫りとなった。

#### (2) *Pseudomonas fluorescens* 由来レクチン (PFL) による細胞遺伝子の発現変動

PFL 添加により 4 倍以上の発現変動を呈した遺伝子の数は以下の様であった。

	変動遺伝子	増加遺伝子	減少遺伝子
200nM PFL	364	294	70
2 $\mu$ M PFL	224	128	96
200nM PFL ウイルス感染	321	273	48
PFL 添加共通	43	22	21

その中で注目すべき遺伝子として、ウイルス感染あるなしに関わらず、SOCS3 遺伝子の発現増加、転写因子である JUNB (= AP1), ATF3, CEBPB の発現増加がみられた。細胞外マトリクス、細胞接着に関与する遺伝子としては、ICAM1, コラーゲン 1, Claudin 4, Claudin 14 の発現増加がみられた。血管新生関連の遺伝子として、アンジオポイエチン-4, VEGF の発現促進とエンドセリン-2, cysteine-rich angiogenic inducer, アンジオモーチン-2 遺伝子の発現抑制がみられた。ウイルス感染時に PFL 添加を添加した場合、PFL のウイルス感染阻止 (細胞への吸着、侵入の阻止) により、ウイルス認識に関与する遺伝子の変動やインターフェロン誘導遺伝子の変動は見ら

れなかった。PFL の添加において、血管新生関連遺伝子群、細胞接着因子等に発現変動が見られた。これらの作用は PFL が *in vitro* で腫瘍組織由来培養細胞における増殖阻害活性を示すことから、PFL が生体内で血管新生に与える影響を探るうえでも、その詳細なメカニズムの解析が必要であると思われる。

### (3)PFL と相同性を持つレクチンの抗ウイルス活性の解析

PFL 遺伝子相同性をもつ遺伝子を検索した結果、同じ *Pseudomonas* 科の中から 2 つの遺伝子が見つかった。*P. mandelii* 由来レクチン(PML)と *P. taiwanensis* 由来レクチン(PTL)である。それぞれの遺伝子領域を DNA 合成し、大腸菌発現ベクターに挿入し、大腸菌にて発現させ、それらの抗ウイルス活性を調べた。抗インフルエンザ活性は 50%感染阻害濃度として、PTL  $ED_{50}=45\text{nM}$ , PML  $ED_{50}=20\text{nM}$ , PFL  $ED_{50}=11.7\text{nM}$  の値を得た。

### (4)PFL の応用を目指した組換えタンパク質の産生 (PFL-TM の作製)

PFL を利用した抗ウイルス薬の開発として、PFL の高マンノース糖鎖特異的結合性を利用し、細胞内への抗ウイルス薬運搬ベクターとしての有用性を考えた研究も行った。PFL 遺伝子に脂質二重膜貫通部位を付加する組換え遺伝子 (PFL-TM) を構築し、その遺伝子のクローニングを行い、PFL-TM タンパク質を産生させた。この PFL-TM 産物をリボソーム膜に組込むことで、そのリボソーム中に内包された何らかの抗ウイルス薬を有効に細胞内へ運搬することができるかと考える。レクチン PFL の抗ウイルス薬そのものとしての働きと、別な抗ウイルス薬運搬ベクターとしての働きを併せ持つものとしての開発を考えている。

(5)ネコ免疫不全ウイルス (FIV) の感染阻止  
インフルエンザウイルスに限らず、その他のウイルスに関する PFL の抗ウイルス薬活性を調べるため、ネコ免疫不全ウイルス (FIV) の研究も行った。PFL は FIV の感染も阻害することを示した。ネコリンパ腫由来 3201 細胞-FIV 感染系において、培地中に 50nM 添加で 50%、200nM 添加で完全に感染を阻止することが示された。

FIV の co-receptor である CXCR4 リセプター (CXCR4) は 7 回膜貫通型のレセプターである。3 つの細胞外領域 ECL-1, ECL-2, ECL-3 に相当する 20 残基ほどのペプチドを合成し、それらの抗ウイルス効果を調べた。ECL-1, ECL-2 を  $10\ \mu\text{M}$ ,  $1\ \mu\text{M}$  の濃度で培地に添加し感染阻害効果を観察したが、阻害効果は見られなかった。残念ながら、最も期待を持っていた ECL-3 ペプチドが合成不能であったため、調べることができなかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. T. Mori, K. Morimoto: Rabies virus glycoprotein variants display different patterns in rabies monosynaptic tracing. *Frontiers in Neuroanatomy*, 7, 47 (1-8), (2014) doi: 10.3389/fnana.2013.00047 査読有
2. T. S. Tochikura, K. Morimoto: Sequence analysis of the *CXCR4* gene derived from cells surviving feline lentivirus infection. *Arch Virol.* 159 (6), 1511-13 (2014) doi: 10.1007/s00705-013-1960-8 査読有
3. 森本 金次郎, 佐藤 雄一郎: ウイルス吸着・侵入あるいはレクチン結合による細胞遺伝子の発現変動 安田女子大学紀要 42, 329-336 (2014)
4. Y. Sato et al, 5 人の 2 番目: High Mannose-binding antiviral lectin PFL

from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 promotes cell death of gastric cancer cell MKN28 via interaction with  $\alpha$ 2-integrin. PLOS ONE, 7 (9) e45922 (2012) 査読有

5. P. Virojanapirom et al, 8人の7番目: Molecular analysis of the mutational effects of Thai street rabies virus with increased virulence in mice after passages in the BHK cell line. Arch Virol, 157 (11), 2201-2205 (2012) 査読有
6. K. Yamada et al, 12人の10番目: Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in reduced pathogenicity of street rabies virus. Virus Res, 165 (1), 34-45 (2012) 査読有

[学会発表](計 9件)

1. 八田一、鯉ヘルペスウイルスの感染抗原に対する鶏卵抗体(IgY)の調製、日本農芸化学会 2015年度大会、2015年3月26日~29日、岡山
2. 伊藤(高山)睦代、非増殖型組換え狂犬病ウイルスを用いたアレナウイルスに対するワクチンの開発、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日~11月12日、横浜
3. 佐藤雄一郎、高マンノース糖鎖を標的とする抗ウイルス、抗がん性多機能蛋白質に関する研究、第53回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 日本薬学会奨励賞受賞講演、2014年11月8日~9日、広島
4. 佐藤雄一郎、細菌レクチン PFL の誘導するインテグリン/EGFR の内在化とオートファジー性がん細胞死、87回日本生化学会、

2014年10月16日、京都

5. 西條政幸、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症に対する非増殖型組換え狂犬病ワクチンの開発、第19回日本神経感染症学会学術集会、2014年9月4日~9月6日、金沢
6. H. Hatta: Preparation of anti-Koi Herpes Virus IgY and its prophylactic effect. EGG BANFF FORUM CONFERENCE, June 25-27, 2014, Wroclow, Poland
7. 伊藤(高山)睦代、ラッサウイルスなどのアレナウイルスに対する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの開発、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日~11月12日、神戸
8. 佐藤雄一郎、細菌レクチン(PFL)により誘導されるアノイキス様がん細胞死とオートファジーの関係、第52回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2013年10月26日~27日、松山
9. 佐藤雄一郎、細菌 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 由来レクチン(PFL)の抗ウイルス、抗がん作用の分子機構、85回日本生化学会大会、2012年12月14日~12月16日、福岡

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森本 金次郎 (Kinjiro Morimoto)  
安田女子大学・薬学部・薬学科 教授  
研究者番号: 80183664

### (2)研究分担者

佐藤 雄一郎 (Yuichiro Sato)  
安田女子大学・薬学部・薬学科 講師  
研究者番号: 60416427