

インフルエンザの重症化とサイトカイン、特にインターフェロン産生の機序解明 に関する研究

研究分担者 林日出喜 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究要旨

A 型インフルエンザウイルス (IAV) 感染の成立、重症化の機序には、ウイルス側、宿主側双方の因子が複雑に関与し、多様性が示されている。宿主側の因子のひとつとしてトリプシン様タンパク質分解酵素が IAV 感染の成立、重症化に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。我々は消化酵素として十二指腸上皮で発現しトリプシノーゲンを活性化するエンテロキナーゼ (EK) が、一般のいろいろな培養細胞でも発現しており、トリプシノーゲンを切断、活性化することで、IAV-HA (ヘマグルチニン) のプロセッシングを促進するという、IAV 感染の新たな経路の存在を明らかにした。特に、EK の新しいアイソフォームとして発見した EK-v2 の IAV 感染における役割を明らかにし、その機構を標的とした抗ウイルス薬の開発につながる可能性が示唆された。

A . 研究目的

我々は消化酵素として十二指腸上皮で発現しトリプシノーゲンを活性化するエンテロキナーゼ (EK) が、一般のいろいろな培養細胞でも発現していることを明らかにした。この EK がトリプシノーゲンを切断、活性化することで、IAV-HA (ヘマグルチニン) のプロセッシングを促進するという、IAV 感染の新たな経路が存在する可能性を示してきた。その際、従来から報告のある EK (ここでは簡便性のため EK-v1 と呼ぶことにする) に加え、その酵素活性を有する細胞膜外ドメインに 30 アミノ酸の挿入がある新規アイソフォーム (EK-v2 と呼ぶことにする) をクローニングした。IAV 感染における EK-v1、EK-v2 の役割を明らかにし、その機構を標的とした抗ウイルス薬の開発につなげることが本研究の目的である。

B . 研究方法

1) 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)、さらに、細胞膜上に発現しこれまでに IAV-HA を切断、活性化することが知られている HAT、TMPRSS2、及び TMPRSS4 の役割を調べるため、それらの cDNAs をクローニングした。
2) ヒトのいろいろな培養細胞における I~IV 型トリプシノーゲン (PRSS1、PRSS2、PRSS3-v2、PRSS3-v1)、エンテロキナーゼ (EK-v1、v2)、及び細胞膜貫通型セリンプロテアーゼ (HAT、TMPRSS2、TMPRSS4) の発現量を Real-time PCR、及びウェスタンブロットで、調べた。
3) 293T 細胞に、EK-v1、EK-v2、hPRSS3-v2 を強制発現させた、安定細胞株 (293T-EK-v1、293T-EK-v2、

293T-PRSS3)を作成し、IAVを感染させ、一定時間後に細胞内、及び培養上清に放出されたIAVの量をIAVに対する特異的抗体を用いて測定した。

4) *in vitro*においてEK-v1、EK-v2がPRSS3-v2を切断し、そのトリプシン活性を上げるか、293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3細胞株のライセートを使い、GPR-pNAを基質としてトリプシン活性を測定した。

5) *in vitro*においてEK-v1、EK-v2により切断、活性化されたPRSS3が、TPCK処理トリプシン放出されたIAVの量をIAV-HAに対すトリプシンと同様のIAV-HAのプロセッシングを行うか、IAVを感染、増殖させたU937細胞ライセートと293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3細胞株のライセートを使って調べた。コントロールとしてTPCK処理トリプシン(TPCKT)、あるいはN末端-アセチル化トリプシン(NAT)で処理した後、IAV-HAに対する特異的抗体を使ったウェスタンで調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、長崎大学組み換えDNA実験安全委員会の承認を受け、その指針に従い実施した。

C. 研究結果

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(図1)。

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、Real-time PCR法で調べたほとんどの培養細胞で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(図

2)。また、PRSS1及びPRSS3も多くの細胞に発現がみられた(図3)。

3) EK-v1、EK-v2、PRSS3-v2を強制発現させた293T安定細胞株(図4)に、IAVを感染させ、80時間後に培養上清に放出されたIAVの量をIAV-HAに対する特異的抗体を用いて測定したところ、他の細胞に比べ、293T-EK-v2細胞内、及び上清に放出されたウイルスを調べたところ、IAVの顕著な増殖とIAV-HAプロセッシングの更新がみられた(図5)。

4) 293T-EK-v1、293T-EK-v2、293T-PRSS3細胞株、及びTMPRSS2、TMPRSS4、HATを一過性に強制発現させた293T細胞のライセートを使い、GPK-pNAを基質としてトリプシン活性を測定した。この*in vitro*の系でEK-v1、EK-v2はPRSS3-v2トリプシノーゼンを活性化したが、TMPRSS2、TMPRSS4、HATはPRSS3を活性化できなかった(図6、7)。

5) *in vitro*でU937細胞に由来するIAVライセートをTPCK処理トリプシン(TPCKT)、あるいはN末端-アセチル化トリプシン(NAT)で室温30分処理すると、65-kDaのIAV-HA₀が消失し、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(図8)。PRSS3-v2、EK-v1、EK-v2のみではIAV-HAのプロセッシングがみられなかったが、PRSS3-v2によりEK-v1あるいはEK-v2を活性化させると、トリプシン処理した場合同様に65-kDaのIAV-HA₀が消失し、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。これらのことから、従来から報告されていたTMPRSS2、TMPRSS4、HATを介したIAV-HAの活性化経路に加え、PRSS(トリプシノーゼン)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(図 9)。

D . 考察

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(図 9)。 *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、 *in vivo* では EK-v2 が顕著な IAV 感染促進作用を示した(図 5)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がある。 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、今後、この 30 アミノ酸部位を中心に EK 分子をターゲットとして、 IAV 感染の抑制ができるかどうか検討したい。

E . 結論

新たな EK-v2 PRSS HA プロセッシングの経路が、 IAV 感染の成立、重症化に関わる可能性が高いことが示唆された。この経路をターゲットとした新たな IAV 感染治療薬の開発につながることを期待される。

F . 健康危険情報

なし。

G . 研究発表 (平成 26 年度)

(ア) 論文発表

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).

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).
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 muridae 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).

(ア) 学会発表

1. インターフェロン γ 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)

H . 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

(ア) 特許取得
なし
(イ) 実用新案登録
なし
(ウ) その他
なし

図1. EK(エンテロキナーゼ)遺伝子の構造

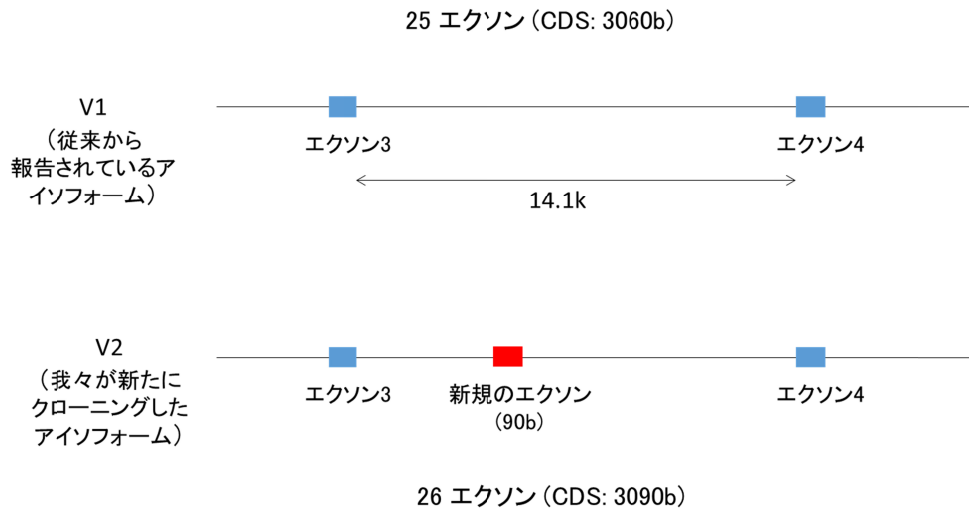


図2. 各種培養細胞における膜貫通型セリンプロテアーゼの発現
-mRNA (PCR)-

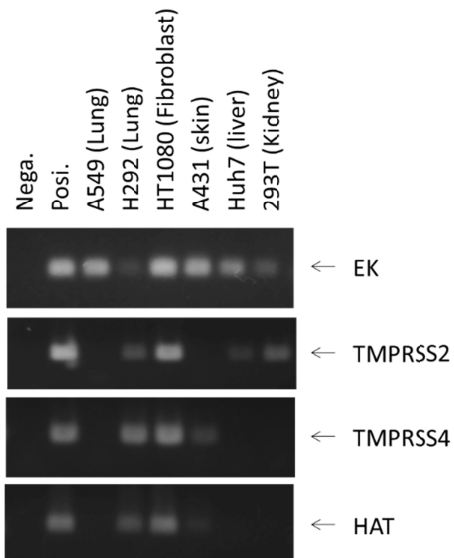


図3. 各種培養細胞におけるトリプシノーゲン遺伝子(PRSSs)の発現
-mRNA (PCR)-

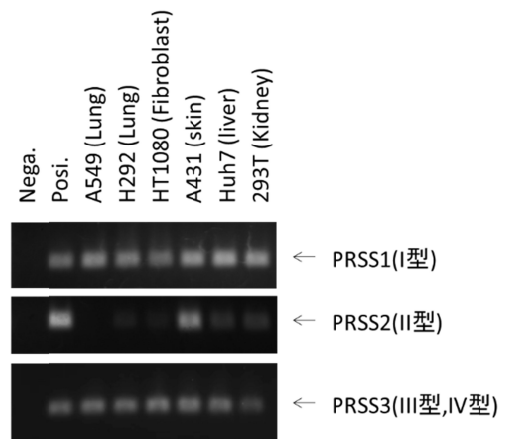


図4. EK-v1,v2を強制発現させた293T細胞

抗EK抗体

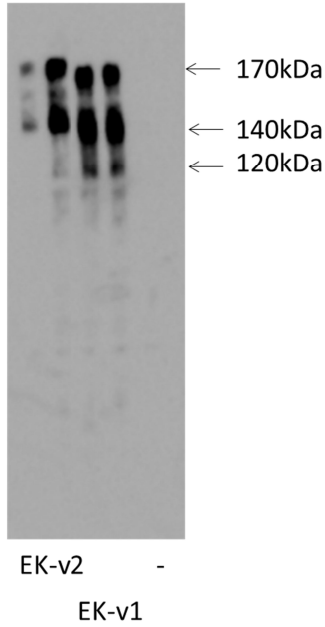


図5. EK-v1、EK-v2及びPRSS3を強制発現させた293T細胞におけるIAV-HAのプロセッシング

抗IAV-HA抗体

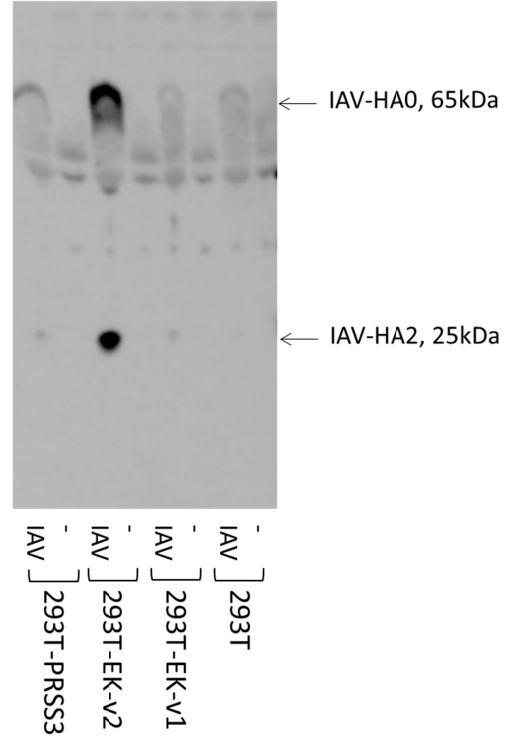


図6. EK-v1、TMPRSS2、TMPRSS4によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

GPR-pNAを基質としたトリプシン活性

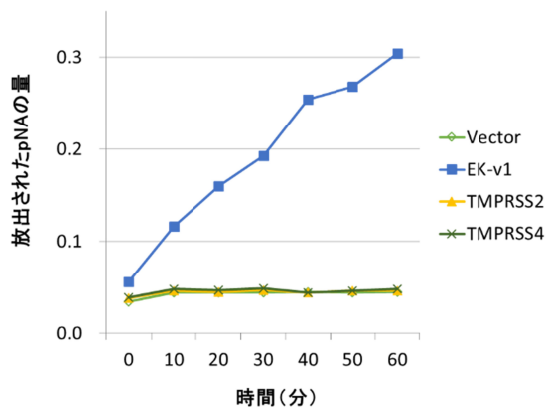


図7. EK-v1、EK-v2によるトリプシノーゲン (PRSS3) の活性化

GPR-pNAを基質としたトリプシン活性

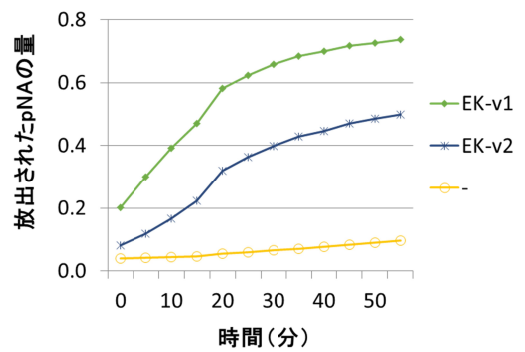


図8. *in vitro*でのIAV-HAプロセッシング

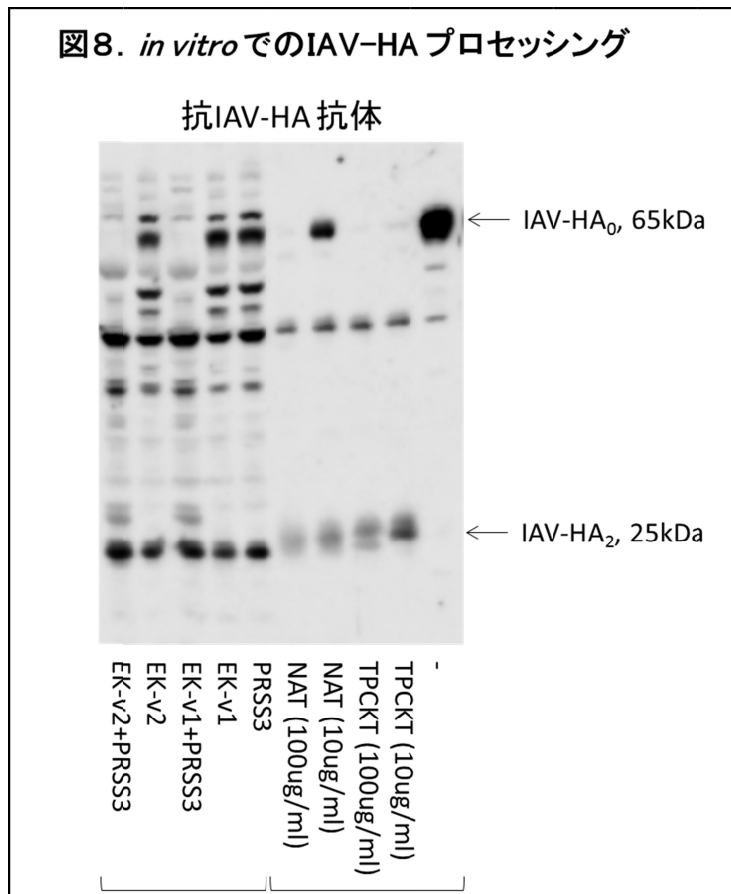


図9. トリプシノーゲン遺伝子 (PRSSs) 及び
エンテロキナーゼ遺伝子 (EK) を介したIAV感染促進の機序

