

宿主細胞への吸着阻害による

インフルエンザウイルス感染抑制法の開発

所属：北海道大学 大学院医学研究院・医学院 細胞生理学教室

助成対象者：大場 雄介

共同研究者：尾瀬 農之、藤岡容一朗、加藤いづみ

概要

医学が大幅に進歩した現在でも、ウイルス感染症は多くの課題が残された研究分野である。我々は、インフルエンザウイルスが細胞に侵入する際に生じるカルシウム濃度上昇が、ウイルス粒子取込に重要であることを報告した。また、このカルシウム上昇を担う膜タンパク質同定を試み、インフルエンザのヘマグルチニン（HA）結合分子を同定した。この分子の阻害薬は現行治療薬より強力に感染を抑制したことから、インフルエンザ感染において重要な役割を担うことが示唆された。本研究では、膜タンパク質-HA 結合様式の解析を通じてウイルス-宿主相互作用を標的とした新しい治療・予防法確立を目指す。

abstract

Despite recent advances in medical science and managements, there remain many issues in research areas for viral infectious diseases. We previously reported that an increase in intracellular calcium concentration upon influenza virus infection is critical for viral particle internalization. We subsequently aimed at identifying membrane proteins responsible for this calcium elevation and identified an influenza hemagglutinin (HA) binding molecule. Because the inhibitors for this molecule displayed more potent inhibitory effect on influenza virus infection than current available anti-influenza agents, it is likely to play an important role in influenza infection. In this study, we aim at the establishment a novel therapeutic/preventive strategy targeting viral-host interaction through the analysis of the binding mode of the membrane protein and HA.

研究内容

緒言

医学が大幅に進歩した現在においても、ウイルス感染症は未だなお多くの課題が残された研究分野であり、実際多大な研究開発費が新興・再興感染症に支出されている。インフルエンザパンデミック等保健医療問題のみならず社会経済的にも対策を要する事例も多い。しかし、これら対策の多くは感染症が成立した後の治療法開発、あるいは感染拡大を防ぐための二次的対策に限定されているのが現状である。例えば変異の早い RNA ウイルスの場合、耐性株出現という治療上の問題を常に抱えている。ワクチンや現行の抗インフルエンザ薬もその影響を受けるため、WHO により数百を超えるオセルタミビル（タミフル[®]）耐性株感染例が報告されている¹。ウイルスの宿主侵入機構を標的とした治療は亜型によらない効果が期待される理想的方法論であり、実際、インフルエンザ感染関連宿主因子同定を目指すゲノムワイドスクリーニングの報告が一流誌をにぎわしている²。一方、直接結合する膜タンパク質については、これまでにいくつか報告があるものの、どの因子を阻害した場合にも効率的な感染抑制効果は認められておらず、インフルエンザ感染において鍵となる受容体は未だ特定されていないのが現状である。最近我々は、インフルエンザウイルスが細胞に侵入・感染する際に、一過性の細胞内カルシウムイオン濃度上昇が生じること、このカルシウム濃度の上昇がインフルエンザウイルス粒子の取込に重要であることを報告した³。特に、細胞内のカルシウムをキレートすることでインフルエンザウイルスの侵入はほぼ完全に抑制され、その感染抑制効果は現行治療薬オセルタミビル（タミフル）の約 10 倍であった。したがって、インフルエンザウイルスがカルシウム上昇を引き起こすメカニズムを解明することができれば、その有効な感染対策法の確立に資する基礎的成果が得られると期待できる。

その後、インフルエンザウイルスによるカルシウム上昇を担う膜タンパク質同定を試みたところ、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン (hemagglutinin, HA) タンパク質と結合する分子として、電位依存性カルシウムチャネル voltage-dependent calcium channel (VDCC, Cav1.2) を同定した（論文投稿中）。この分子は細胞表面側にシアル化されるアミノ酸残基を有するため、ウイルス受容体としての必要条件を満たす。Cav1.2 のノックダウンによる発現抑制やカルシウムチャネル阻害薬を用いた機能抑制により、インフルエンザウイルス依存的なカルシウム上昇とウイルス粒子の取込、その後の感染が抑制された。その抑制効果は上述の細胞内カルシウムのキレートと同程度であったことから、Cav1.2 がインフルエンザ感染で重要な役割を果たしていること、治療標的として魅力的な対象であることが示唆された。

本研究は、Cav1.2 とインフルエンザ HA の結合様式の解明を目的に研究を行った。その結果、1436 番目および 1487 番目のアスパラギン残基に結合する糖鎖を介して結合することが明らかとなった。本研究成果は、HA と Cav1.2 の結合インターフェースを標的とした化合物スクリーニング系の構築と、ウイルス-宿主相互作用を標的とした新しい治療への発展が期待される。また、インフルエンザ感染に特異的で、かつウイルス側の変異などの影響を受けない安全かつ有効な治療法・予防法開発の基礎を築くことも期待できる。

結果

Cav1.2 とインフルエンザウイルス粒子が直接結合するか否かを検討するために、完全長 Cav1.2 またはその断片のいずれかを発現する細胞から調製した膜画分を用いて membrane binding assay⁴を行った (図 1a および b)。インフルエンザウイルス粒子は完全長 Cav1.2 に結合し、この結合はシアリダーゼ処理によって部分的に阻害されるが、Ca²⁺キレート剤である EGTA では阻害されなかった (図 1c)。したがって、インフルエンザウイルス粒子との結合には Cav1.2 のシアリ化が必要であるが、Ca²⁺は必要ないことが示唆された。Cav1.2 のトランケーション変異体を発現する細胞の膜画分を用いた実験により、インフルエンザウイルス粒子が Cav1.2 のフラグメント IV に優先的に結合することを明らかになった (図 1d)。

最近、フラグメント IV にはシアリ化される 2 つのアスパラギン残基 (N1436 および N1487) が存在することが報告され⁵、HA がインフルエンザウイルス粒子と Cav1.2 のフラグメント IV への結合を担う可能性が示唆された (図 1b)。この可能性をより直接的に検証するために、HA および Cav1.2 の共免疫沈降を行った。HA はその C 端の膜貫通領域を介して細胞膜またはウイルス表面に保持され⁶、HA による三量体形成は分泌のための輸送速度を決定する⁷。そこで、我々は、膜貫通領域が 6×ヒスチジンタグ (6×His) および T4 バクテリオファージフィブリチン由来の自己三量体化ドメインである foldon ドメイン⁸で置換された HA の発現ベクターを構築した (図 2a)。この変異型 HA タンパク質 (HA-His) は、三量体として細胞から分泌され、Cav1.2 の細胞表面領域と接触すると予想される。HA-His は完全長 Cav1.2 または III-IV 断片の免疫沈降物中に検出されたが、フラグメント I-II のものでは検出されず、HA が Cav1.2 のフラグメント IV に結合することが確認された (図 2b および 2c)。この結合はシアリダーゼ処理によって部分的に阻害されたことから、Cav1.2 のシアリ化に依存することが示唆された (図 2d)。

Cav1.2 のシアリ化が HA-Cav1.2 相互作用に必要なかどうかをさらに調べるために、フラグメント IV の潜在的シアリ化アスパラギン残基の 1 つまたは両方をグルタミンに置換した変異体を作製した (N1436Q、N1487Q および N1436Q + N1487Q)。293T 細胞にこれらの変異体を発現させてイ

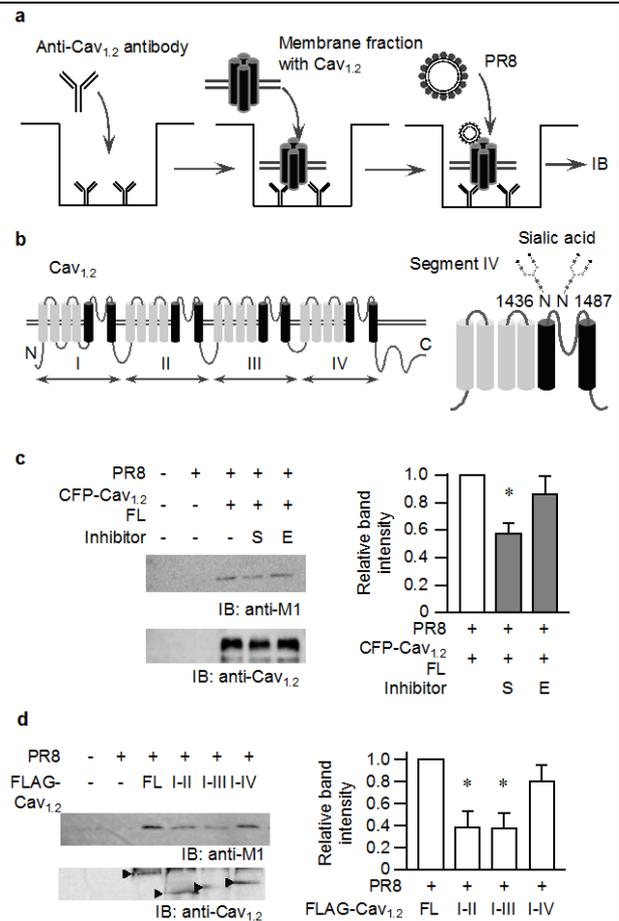


図 1 インフルエンザウイルスは Cav1.2 のフラグメント IV に結合する。(a) membrane binding assay の模式図。IB, immunoblotting。(b) フラグメント IV における Cav1.2 およびシアリル化アスパラギン残基の構造。(c) および d) シアリダーゼ (S) または EGTA (E) 非存在下または存在下での全長 (FL) Cav1.2 とインフルエンザウイルス PR8 との結合 (c)、または各 Cav1.2 のフラグメントと PR8 との結合 (d) を membrane binding assay で評価した。典型的なイムノプロット (IB) および定量的データ (平均±標準誤差、右) を示す。有意差検定には一元配置 ANOVA と Dunnett post hoc テストを用いた。**p* < 0.05。矢頭は Cav1.2 断片の予想されるサイズに対応するバンドを示す。

ムノブロッキングしたところ、野生型は 2 つの泳動度の異なるバンドからなり、変異体を発現する細胞ではより速い泳動度を示すバンドのみが検出された (図 3a)。この結果は、泳動度が遅いバンドは N1436、N1487、または両方の残基で糖鎖修飾されたものに対応することを示唆している。実際、糖鎖修飾を阻害する peptide: N-グリコシダーゼ F (PNGase F) ⁹ による処理を行ったところ、野生型断片の上部バンドが消失したのに対し、変異体のバンドパターンは変化しなかった。(図 3b)。Cav1.2 変異体への HA の結合は、野生型断片で見られるものと比較して弱まった (図 3c)。この減弱の程度はシアリダーゼ処理 (図 1c および図 2d) によって誘導された減少と同程度であり、HA と Cav1.2 のシアリ酸依存性結合がこれらのアスパラギン残基によって決定されることを示唆している。

これを証明するために、siRNA でのトランスフェクションによって内在性 Cav1.2 を欠失した A549 細胞に、野生型 Cav1.2 またはそのグリコシル化欠損 N1436Q + N1487Q 変異体を導入するレスキュー実験を行った。野生型 Cav1.2 の発現は Cav1.2 ノックダウン細胞でのインフルエンザウイルス感染を回復したが、突然変異体を発現させてもウイルス感染は回復できなかった (図 3d)。以上の結果から、Cav1.2 の N1436 と N1487 での糖鎖修飾と HA の結合が、ウイルス感染そのものおよびウイルス感染における Ca²⁺調節に重要であることが証明された。

今 後

これまで報告されたインフルエンザ結合膜タンパク質は、いずれの因子を阻害した場合も感染抑制効果は認められず、インフルエンザ感染において鍵となる膜タンパク質は未だ特定されていない。一方、Cav1.2 は機能阻害による感染阻害効果が強く、インフルエンザ感染において重要な受容体であると考えられる。本研究によりウイルス-受容体結合様式を明らかにすることができたため、インフルエンザの宿主侵入機構の完全解明に向けた飛躍的な前進が見込まれる。また、この相互作用を標的とした創薬により、高い効果と少ない副作用を両立する治療法開発につながると期待される。

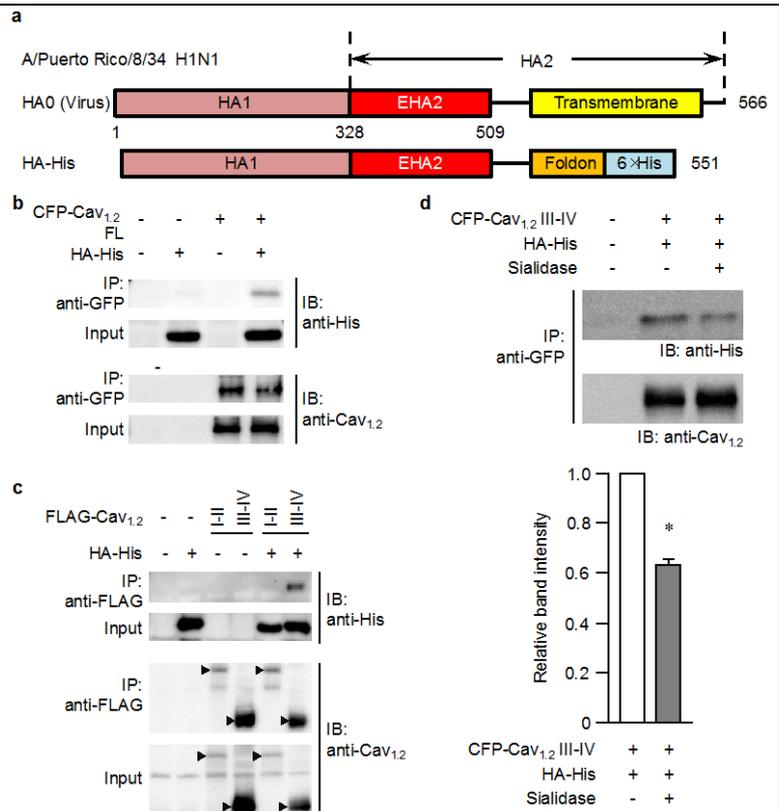


図 2 インフルエンザ HA は Cav1.2 に結合する。(a) PR8 の野生型 HA および共免疫沈降に用いた 6×His タグ HA (HA-His) のドメイン構造の模式図。(b) および (c) Cav1.2 の全長 (b) または各フラグメント (c) と HA (HA-His) の結合を共免疫沈降で解析した。代表的なイムノブロットを示す。分析および同時免疫沈降した HA-His (平均 ± s.e.m., n = 3) の定量データを示す。矢頭は Cav1.2 断片の予想されるサイズに対応するバンドを示す。(d) HA-His および CFP タグ付き Cav1.2 フラグメント III-IV を発現する 293T 細胞をシアリダーゼに 30 分間曝露した (または反応させなかった) 後、免疫沈降およびイムノブロットをおこなった。典型的イムノブロットを左に、定量的データ (平均 ± 標準誤差) を右に示す。スチューデント *t* 検定で平均の差を検定した。**p* < 0.05。

引用文献

- Poland, G. *et al.* Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use. *Clin Infect Dis* 48, 1254–1256 (2009).
- Karlas, A. *et al.* Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463, 818–822 (2010).
- Fujioka, Y. *et al.* A Ca(2+)-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. *Nat Commun* 4, 2763 (2013).
- Côté, M. *et al.* Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* 477, 344–348 (2011).
- Lazniewska, J. & Weiss, N. Glycosylation of voltage-gated calcium channels in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1859, 662–668 (2017).
- Mair, C. M. *et al.* Receptor binding and pH stability - how influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochim Biophys Acta* 1838, 1153–1168 (2014).
- Cerioti, A. & Colman, A. Trimer formation determines the rate of influenza virus haemagglutinin transport in the early stages of secretion in *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* 111, 409–420 (1990).
- Meier, S. *et al.* Foldon, the natural trimerization domain of T4 fibrin, dissociates into a monomeric A-state form containing a stable beta-hairpin: atomic details of trimer dissociation and local beta-hairpin stability from residual dipolar couplings. *J Mol Biol* 344, 1051–1069 (2004).
- Chu, V. C. & Whittaker, G. R. Influenza virus entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 18153–18158 (2004).

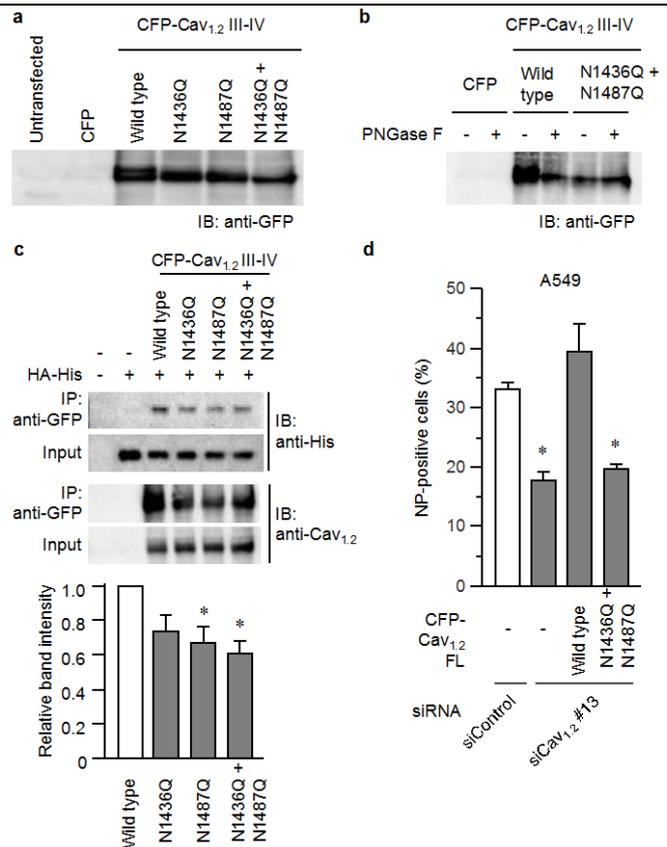


図3 N1436またはN1487でのCav1.2のグリコシル化はIAV感染にとって重要である。(aおよびb) Cav1.2のフラグメント III-IV およびグリコシル化欠損変異体のイムノブロット。(b) では細胞可溶化液調製直前の30分間、細胞をPNGase F (25 U/μl) で処置した。(c) Cav1.2のフラグメント III-IV およびグリコシル化欠損変異体とHA-Hisとの結合を共免疫沈降で解析した。典型的イムノブロット(上)および定量的データ(平均±標準誤差、下)を示す。(d) コントロールまたはCav1.2に対するsiRNAを導入したA549細胞に、野生型あるいはグリコシル化欠損変異型Cav1.2の発現ベクターをさらにトランスフェクションし、インフルエンザ感染効率を免疫蛍光法で定量した。一元配置ANOVAとDunnnett post hoc testを用いた。**p* < 0.05。

本助成に関わる成果物

[論文発表]

1. Fujioka Y, Nishide S, Ose T, Kato I, Fukuhara H, Fujioka M, Horiuchi K, Satoh AO, Nepal P, Kashiwagi S, Wang J, Horiguchi M, Paudel S, Nanbo A, Miyazaki T, Maenaka K, Ohba Y. Influenza A virus entry into mammalian cells requires a voltage-dependent Ca²⁺ channel. Cell Host Microbe, under review
2. Ohba Y and Fujioka Y. Fluorescence bioimaging of intracellular signaling and its clinical application. J Oral Biosciences 58, 113–119, 2016

[口頭発表]

1. 藤岡容一郎、西出真也、佐藤絢、堀内浩水、ネパール プラバ、堀口美香、王セイ、南保明日香、大場雄介. インフルエンザウイルス宿主細胞侵入を制御する宿主側因子の同定. 第 68 回日本細胞生物学会大会, 京都, 2016
2. 藤岡容一郎、西出真也、藤岡真理、堀内浩水、佐藤絢、ネパール プラバ、柏木彩花、王セイ、堀口美香、パウデル サラド、南保明日香、大場雄介. Identification of host cell proteins critical for influenza virus entry. 第 69 回日本細胞生物学会大会, 仙台, 2017

[ポスター発表]

1. Fujioka Y, Nishide S, Ose T, Kato I, Fukuhara H, Fujioka M, Horiuchi K, Satoh A, Nepal P, Kashiwagi S, Wang J, Horiguchi M, Paudel S, Nanbo A, Miyazaki T, Maenaka K, Ohba Y. Influenza viruses are internalized into host cells via calcium signaling-mediated endocytosis. 3rd International symposium on cell competition, Sapporo, 2017

[その他]

(著書)

1. 大場雄介 少数の侵入—インフルエンザはウイルス何個で感染するか (第 3 章) 「少数性生物学」永井健治、富樫祐一編 192 ページ 日本評論社 2017 年 3 月