

139. インフルエンザウイルス粒子形成スイッチの阻害剤開発

高橋 忠伸

Key words : インフルエンザウイルス, スルファチド,
抗ウイルス剤, 糖脂質, ウイルス増殖

静岡県立大学 大学院薬学研究院
生化学講座

緒言

インフルエンザ A 型ウイルス (IAV) における糖鎖結合研究の大部分が, ウイルス受容体であるシアル酸を含む糖鎖で行われている. 一方, 研究代表者は IAV の表面糖タンパク質であるヘマグルチニン (HA) がシアル酸を持たない硫酸化糖脂質であるスルファチドと結合することがウイルス増殖に極めて重要であることを見出した¹⁻⁴⁾. IAV 感染細胞の表面へ運ばれた新生 HA はスルファチドと結合すると, 感染細胞の核内で複製されたウイルスゲノムおよびウイルス核タンパク質複合体の核外輸送を促進し, 子ウイルス形成を顕著に亢進する. すなわち, 「HA とスルファチドの結合は子 IAV 形成の開始スイッチ」と言えることを示してきた⁵⁻⁷⁾. そこで, 本研究の目的は, この開始スイッチを阻害する「HA のスルファチド結合阻害剤」を開発し, 画期的 IAV 粒子形成阻害剤を創製することである. 本薬剤は, 現行の医薬品 (シアリダーゼ阻害剤) に耐性化した IAV や, 現行のワクチンによる対抗が困難な新型 IAV に対しても有効であるものと期待される. また, 本薬剤は感染細胞の子ウイルス産生そのものを抑制するため, 既存のシアリダーゼ阻害剤 (子ウイルス産生自体は阻害せずに細胞表面の子ウイルスの遊離を抑制するのみ) よりも高い治療効果が期待される.

方法および結果

1. 分泌型 HA の作製と X 線結晶構造解析をめざした HA のタンパク質結晶化

HA とスルファチド (またはスルファチドの糖部分) を共結晶化し, X 線結晶構造解析により HA 上のスルファチド結合部とその詳細な結合機構を原子レベルで解析することを目的とした. HA の生産は, 昆虫ウイルスのバキュロウイルスを利用したタンパク質発現システムを使用した. バキュロウイルス-タンパク質発現システムの利点は, 機能や抗原性を維持した膜糖タンパク質を分泌型タンパク質に改変して大量に生産できることである. 分泌型タンパク質への改変により, 細胞培養上清からの回収や精製操作が簡便になり, 精製後においても細胞に由来するタンパク質の夾雑物の混入を防ぐことができる. 分泌型 HA (secreted HA: sHA) には, タンパク質の精製や検出に使用するヒスチジンタグ (N 末側) と HA の細胞外ドメインの間に柔軟性の高いリンカーと呼ばれるペプチド鎖を導入した (図 1)⁸⁾. これにより, HA の細胞外ドメインがタグの抗原性に立体障害を及ぼすことを防いだ.

精製・濃縮操作から, 高濃度 (5~10 mg/ml) の sHA 溶液を得た. 結晶化剤液として, Hampton Research 社製の Crystal Screen I, II 計 98 条件のうち, pH 6 以下の 76 条件について, sitting drop 蒸気拡散法にて 20℃ で結晶化を行った. また同時に HA で結晶化が報告されている条件と類似した条件として, PEG3350 4~16% (w/v), 0.1 M HEPES-Na (pH 7.5), ethylene glycol 0~10% (v/v) の条件でも結晶化を試みた. 三日後に不定形の凝集物が再現性よく得られたが, 単結晶ではなく X 線解析には適さなかった. 約一ヶ月後, 板状の結晶が得られたが再現性は良くなく, X 線解析には至らなかった.

タンパク質中に導入した柔軟性の高いリンカーペプチドが結晶化を妨げていることが考えられるため, 次にリンカーペプチドをすべて欠失させた sHA を作製した. また, 6 個のヒスチジンが並ぶタグの柔軟性を減少させるため, HA の既に報告された立体構造から細胞外ドメインの N 末端側に比較して構造の柔軟性が少ないと思われる C 末端側にヒ

スチジン-タグを導入した (図1). HA の生産性や精製効率は前回のもので変わりはなかったため, この C 末端側にタグを付加した sHA を以降のすべての実験に使用した. なお, この sHA も結晶化には至らなかった.

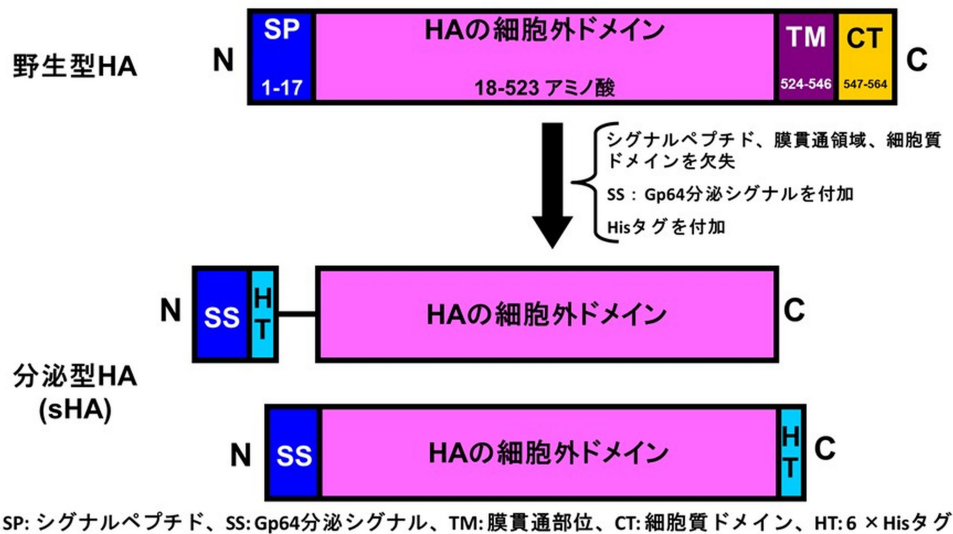


図1. バキュロウイルス-タンパク質発現システムによる分泌型 HA (sHA) の作製.

本研究の実験には, 図中の一番下の C 末端側にヒスチジン-タグを付加した sHA を使用した.

2. 計算化学による HA のスルファチド結合部位予測

本研究に使用している HA は, 強いスルファチド結合性を持つカモインフルエンザ A 型ウイルス A/duck/Hong Kong/313/4/1978 (H5N3 型) の H5 型 HA である. この株の HA の立体構造は X 線結晶構造解析されていないため, 既に報告されている A/duck/Singapore/3/1997 (H5N1 型) の H5 型 HA のホモ三量体構造 (PDB ID, 1JSM) を基に, 本研究で使用する H5 型 HA のホモ三量体構造を再構築した.

スルファチドのセラミドの疎水性部分 (長鎖脂肪酸) は, 計算化学によるドッキングシミュレーション時, 大きな計算時間を必要とするため問題となる. 計算化学に適したスルファチド構造モデルを作成するために, スルファチドの構造は糖部分と糖とセラミドの結合領域を残して, セラミドの疎水性部分を除去した (図 2A). 統合計算化学システム MOE により, HA のスルファチド結合部位が 111 ヶ所予測された. スルファチドは, HA のヘッドの部分 (HA 発現細胞と異なる細胞のスルファチドと結合する trans-結合仮説, 図 2B 参照) または膜貫通領域に近い下部 (HA 発現細胞と同一細胞のスルファチドと結合する cis-結合仮説, 図 2B 参照) に結合するものと仮説を立てた. さらに, スルファチドが持つ硫酸基はマイナス電荷であることから, プラス電荷の塩基性アミノ酸残基 (アルギニン Arg またはリジン Lys) がスルファチドの硫酸基と静電的相互作用を起こすものと予想した. 結果として, スルファチド結合部位と予測される HA の塩基性アミノ酸残基を 17 個選定した. cis-結合仮説では 5 個, trans-結合仮説は 12 個である (図 3).

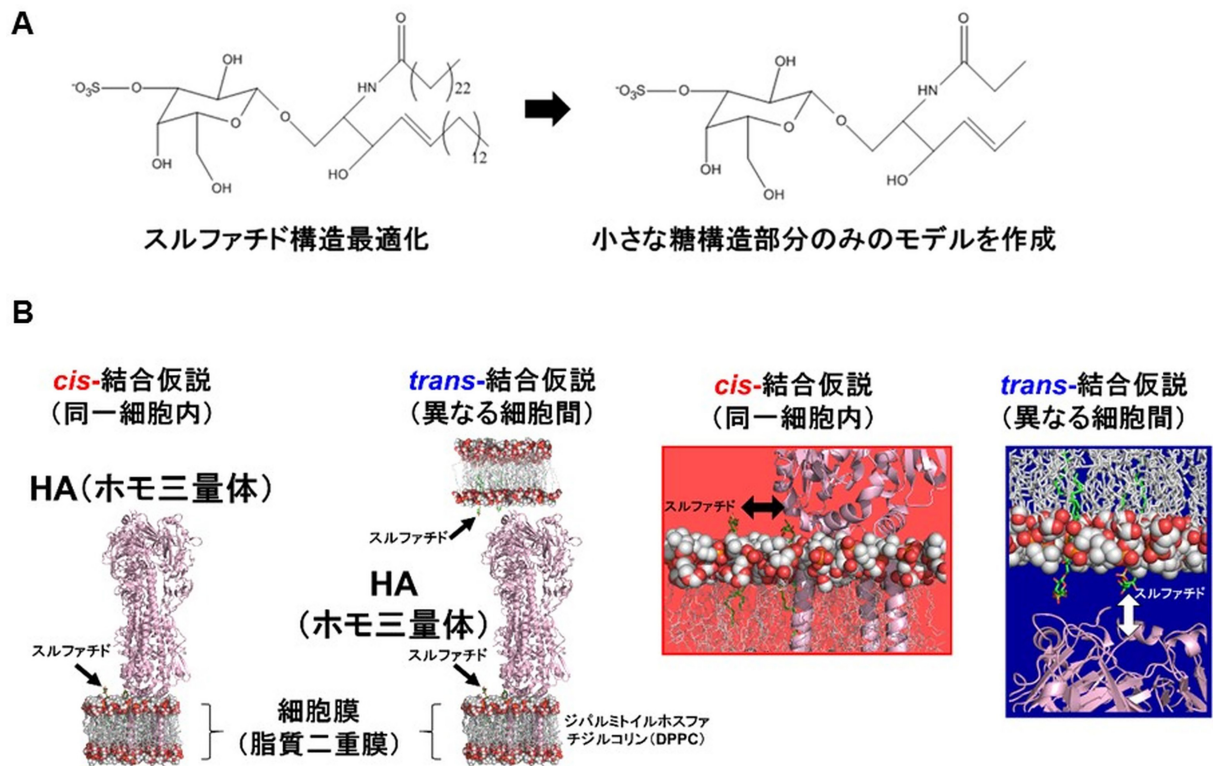


図2. 計算化学による HA のスルファチド結合部位の予測と結合部位候補の選定.

A) 計算化学に適したスルファチド構造モデルの作成. B) HA のスルファチド結合モデルは, cis-結合仮説と trans-結合仮説を立てた. 細胞膜上に発現した HA ホモ三量体構造とスルファチドの大きさの比は, 実際の大きさを反映させた.

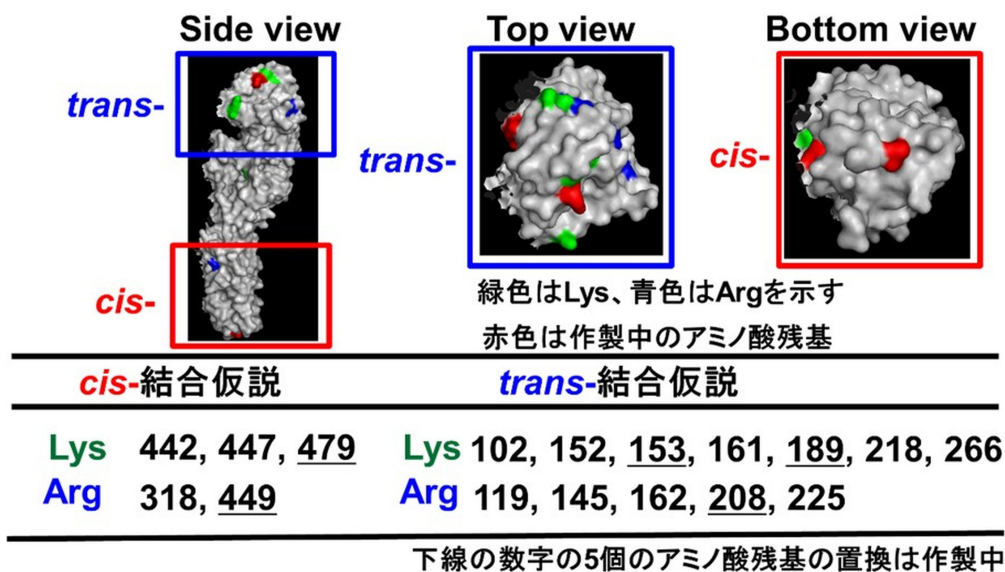


図3. HAのスルファチド結合部位候補の塩基性アミノ酸残基の選定.

HAの単量体構造を示した。テーブル中の数字は、本実験で使用したHAのアミノ酸番号である。スルファチド結合部位候補に選定した塩基性アミノ酸残基はLys残基を緑色で、Arg残基を青色で示した。現在、12個の塩基性アミノ酸残基をアラニンAlaに置換した。HA構造中の赤色の残基およびテーブル中の下線のアミノ酸番号は、Ala置換を作製中のものである。

3. スルファチド結合部位候補の塩基性アミノ酸残基をアラニンAlaに置換したHAのスルファチド結合性の解析

実際のスルファチド結合部位の塩基性アミノ酸(LysおよびArg)をアラニンAlaに置換することで、スルファチドの硫酸基との静電的相互作用が失われ、HAのスルファチド結合性は消失するか、または著しく低下するものと予想される。候補のLysおよびArgを遺伝子変異導入によりAlaに置換したsHAを作製し、スルファチド結合性が消失もしくは著しく低下した時、その置換したアミノ酸残基はスルファチド結合部位であるものと考えられる。そこで、図3に示したスルファチド結合部位候補に選定したLysおよびArgをAlaに置換した。現在、12個のAla置換sHAが作製できている。残り5個については、作製中である。

遺伝子変異を導入していない野生型由来する図1のsHAは、スルファチド固相化プレートのELISAによりスルファチド結合性が確認された(図4A)。本来のウイルス受容体であるシアル酸を含む糖脂質GD1aにも結合性が見られたが、シアル酸を持たない糖脂質GA1には顕著な結合性は見られなかった。具体的には、ELISAプレートに各糖脂質を固相化してブロッキング後、sHA(2¹赤血球凝集活性)を添加し、糖脂質に結合したsHAをhorseradish peroxidase標識抗ヒスチジン-タグ抗体で検出した。sHAはHAの本来の性質である、ウイルス受容体シアル酸への結合性も保持しており、シアル酸を豊富に含む赤血球を凝集することができた。スルファチド結合実験に6.25 ng/mlのsHAを使用した時、現在のところ、スルファチド結合部位候補のLysおよびArgを一つずつAlaへ置換したsHAはすべてスルファチド結合性を示し、野生型sHAと比較して結合性が著しく低下するものは見られなかった(図4B)。しかしながら、Arg145Ala, Lys218Ala, およびArg225Alaの置換は、赤血球凝集活性が見られず、シアル酸結合性が消失していた。これらのアミノ酸残基は、HAのヘッドの領域に存在するシアル酸結合部位またはその近傍に位置している。これらのアミノ酸置換はシアル酸結合部位の構造に影響を与え、シアル酸結合性を消失させたものと示唆される。シアル酸結合性が消失してもスルファチド結合性は維持されていたことから、シアル酸結合部位はスルファチド結合部位ではなく、シアル酸とスルファチドの結合はそれぞれ別の機構であることが分かった。

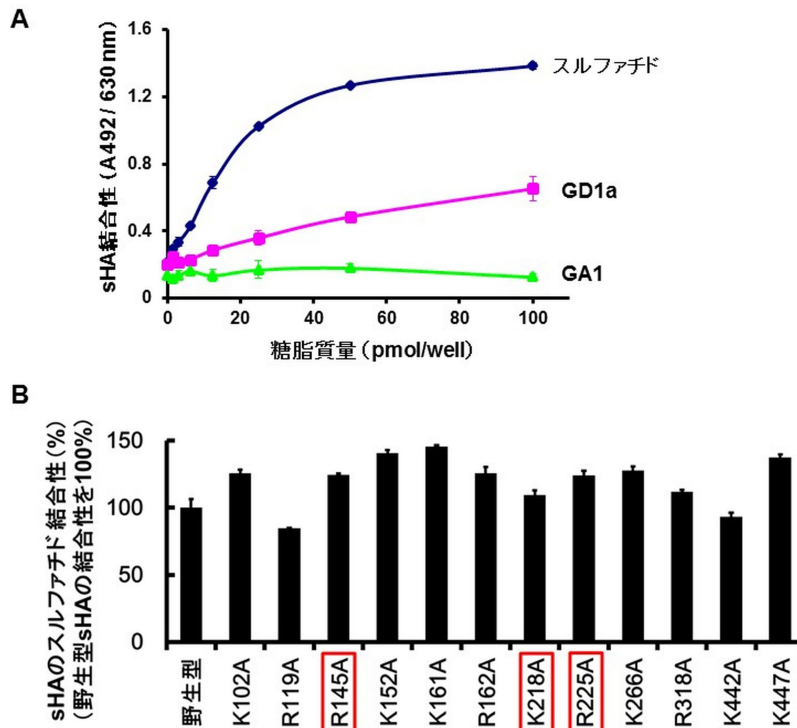


図4. スルファチド結合部位と予測された塩基性アミノ酸残基をアラニン置換した sHA のスルファチド結合性.

A) 野生型に由来する sHA の濃度依存的なスルファチド結合性. sHA がスルファチドに結合することを確認した. GD1a はシアル酸含有糖脂質, GA1 はシアル酸不含糖脂質である. B) スルファチド結合部位と予測された塩基性アミノ酸残基をアラニン置換した sHA のスルファチド結合性. スルファチド結合性 (%) は, 野生型に由来する sHA のスルファチド結合性を 100%にした時の, 各 sHA の相対的な結合性で示した. 各アミノ酸置換 sHA と野生型 sHA の間で *t*検定による有意差は見られなかった. 赤枠で囲まれたアミノ酸置換を持つ sHA は赤血球凝集活性を示さず, シアル酸結合性が失われていた.

4. 化合物ライブラリーから sHA のスルファチド結合阻害剤の探索

化合物ライブラリーの使用契約上, 化合物の構造は目的の物質が探索され, その作用機構が明らかにされた時点で提供されることになっている. そのため, 本研究報告には化合物構造は記載されていない. まず, 本学の創薬探索センターが所有している化合物ライブラリーの 960 化合物について, ELISA ベースで sHA のスルファチド結合阻害効果を調べた. 具体的には, スルファチド 40 pmol/well で固相化した 96 ウェルプレートブロッキング後, sHA (2³ 赤血球凝集活性) と各化合物 (10 μM) の 4℃, 2 時間反応液を添加し, スルファチドに結合した sHA を horseradish peroxidase 標識抗ヒスチジン-タグ抗体により検出した. ネガティブコントロールは DMSO を使用した. 10 μM 化合物でスルファチド結合阻害活性を 2 回測定した時, 阻害効果が平均で 25%以上または一方の阻害効果が 50%以上の 40 化合物を選定した. この 40 化合物について, 化合物濃度 10.0, 5.00, 2.50, 1.25 μM の阻害効果を調べた. sHA のスルファチド結合阻害活性に濃度依存性があり, 阻害活性が高い 4 化合物を選定した (図 5).

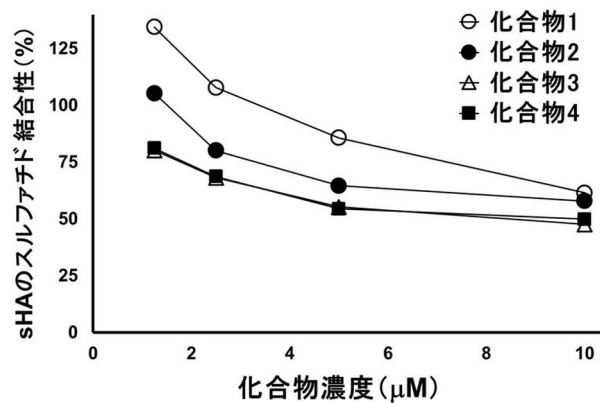


図5. 化合物ライブラリーを利用した HA のスルファチド結合阻害剤の探索.

960 化合物から sHA のスルファチド結合阻害活性に濃度依存性があり, 阻害活性が高い 4 化合物を選定した. 縦軸は, 各化合物と sHA の混合物をスルファチドへ添加した時の sHA のスルファチド結合性 (%) の二重測定の結果を示した.

5. 化合物のインフルエンザウイルス増殖抑制試験

選定された 4 化合物について, カモインフルエンザ A 型ウイルス A/duck/Hong Kong/313/4/1978 (H5N3 型) の増殖抑制試験を行った. イヌ腎臓由来 MDCK 細胞にウイルスを 37°C で 30 分間感染させた. 細胞からウイルスを洗浄後, 10 μM の各化合物を含む細胞培養培地 (ウイルス活性化のためにアセチル化トリプシン 2 μg/ml 含有) を添加した. 37°C で 24 時間培養後, 細胞をメタノールで固定化し, 当研究室で作製したインフルエンザ A 型ウイルスの核タンパク質 (NP) に対するモノクローナル抗体により感染細胞を染色した (図 6A). 感染細胞の集団 (ウイルス増殖により感染が拡大した細胞, フォーカスと呼ばれている) が明らかに小さくなり, ウイルス感染細胞数も減少している, つまりウイルス増殖性を抑制させた化合物の一つを見出だした. この化合物は, 濃度依存的にウイルスのフォーカスサイズを低下させた (図 6B).

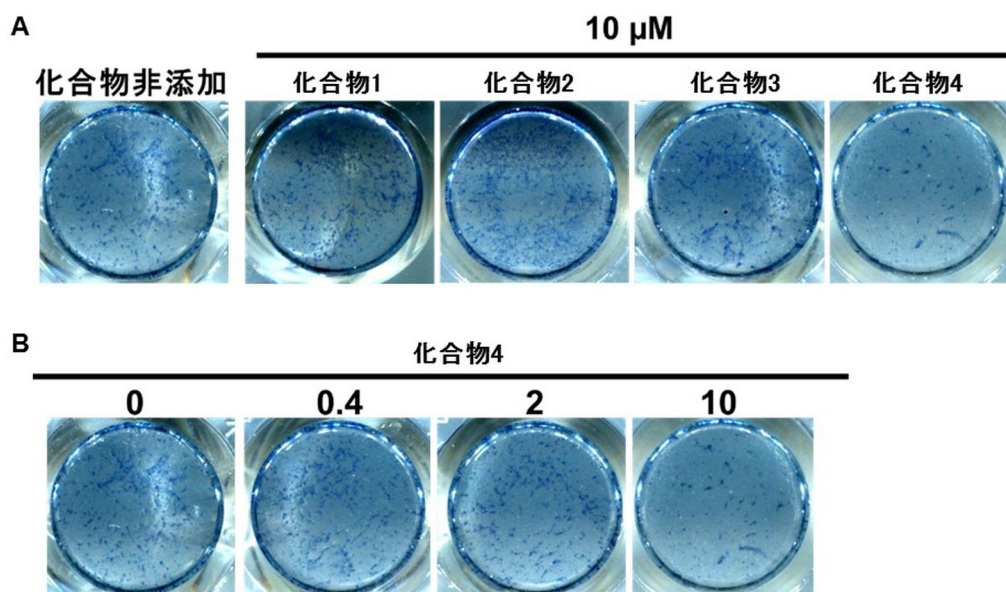


図6. HAのスルファチド結合阻害効果を示す化合物のウイルス増殖抑制効果.

A) 960化合物からHAのスルファチド結合阻害活性に濃度依存性があり、阻害活性が高い4化合物によるインフルエンザA型ウイルス増殖抑制試験. MDCK細胞にウイルスを37°Cで30分間感染させた. 細胞からウイルスを洗浄後、10 μ Mの各化合物を含む細胞培養培地（アセチル化トリプシン 2 μ g/ml含有）を添加した. 37°Cで24時間後、細胞をメタノールで固定化し、抗ウイルスNP抗体により感染細胞を染色した（青色）. B) ウイルス増殖抑制効果の見られた1化合物について、ウイルス感染後に0.0, 0.4, 2.0, 10.0 μ Mの化合物を含む細胞培養培地（アセチル化トリプシン 2 μ g/ml含有）を添加した. 0.0および10.0 μ Mの化合物の結果は、同実験条件のAのものを使用した. ウイルス感染細胞を免疫染色した.

6. 10 mix 化合物ライブラリーからsHAのスルファチド結合阻害剤の探索

HAのスルファチド結合阻害剤の探索効率を上げるため、10化合物の混合物（10 mix）を一つのサンプルとした. 960サンプル（9,600化合物に相当）について、ELISAベースでsHAのスルファチド結合阻害効果を調べた. 各化合物濃度10 μ Mの10 mixサンプルでスルファチド結合阻害活性を2回測定した時、阻害効果が平均で25%以上または一方の阻害効果が50%以上の10個の10 mixサンプルを選定した. この10個の10 mixサンプルについて、化合物濃度10.0, 5.00, 2.50, 1.25 μ Mの阻害効果を調べた. sHAのスルファチド結合阻害活性に濃度依存性があり、阻害活性が高い8個の10 mixサンプルを選定した. 次に、10 mixサンプル中の個々の化合物について、sHAのスルファチド結合阻害活性を2回測定した時、一方でも阻害効果が20%以上見られた14化合物を選定した. この中で一つを除く、13化合物についてスルファチド結合阻害活性を3回測定した. 化合物無添加（DMSO）のsHAのスルファチド結合活性に対して有意差のある4化合物を選定した（図7）.



図7. 化合物ライブラリー 10 mix を利用した HA のスルファチド結合阻害剤の探索.

sHA のスルファチド結合阻害活性に濃度依存性がある 13 化合物について、スルファチド結合阻害活性を 3 回測定した。化合物無添加 (DMSO のみ, Con と表示) の sHA のスルファチド結合活性に対して *t* 検定で有意差のある 4 化合物を選定した。

考 察

現在のところ、X 線結晶構造解析を実施できる HA の結晶は得られてない。sHA の精製度や濃度は、専門家からの指導により結晶化に問題ないと認識している。HA はウイルス膜上や感染細胞膜上でホモ三量体を形成する。しかしながら、バキュロウイルスタンパク質システムで産生後にヒスチジーンタグで精製した sHA は、単量体と三量体がほぼ同量存在していた。この不均一性はタンパク質結晶化に適さないものと考えられる。そこで、T4 バクテリオファージのフィブリチンの三量体化シグナルを sHA に導入し、効率的にホモ三量体化 sHA を形成させる (このシグナルを利用した HA の効率的なホモ三量体形成の報告がある)。タンパク質結晶化に適したタンパク質構造の均一化を図る。また、HA は糖タンパク質であるため、N 型糖鎖の不均一性も結晶化を妨げている可能性がある。PNGase F で HA 上の N 型糖鎖を解離させることで、糖鎖の不均一性の問題を解消できるかもしれない。

スルファチド結合部位と予測・選定した HA の塩基性アミノ酸残基を Ala 置換した時に、スルファチド結合性の消失や著しい低下が見られる場合、その置換部位がスルファチド結合部位であるものと考えられる。選定した 17 個の塩基性アミノ酸残基の中で 12 個の Ala 置換は、スルファチド結合性の消失や著しい低下は見られなかった。この中で 3 個の置換において、sHA のシアル酸結合性が消失していた。この結果は、スルファチド結合機構がシアル酸結合機構と全く異なることを示している。今のところ、スルファチド結合部位は特定できていない。今後、残り 5 個の塩基性アミノ酸残基について Ala 置換した sHA のスルファチド結合性を調べる。

本研究で化合物ライブラリーの 960 化合物から、インフルエンザウイルス増殖阻害活性および感染細胞の子ウイルス産生阻害活性を示す 1 化合物が見出された。この化合物の作用機構が、HA のスルファチド結合阻害効果によるものか確認する。今後、この化合物をウイルスに直接作用させる、または感染前に細胞へ作用させることで、ウイルス感染阻害効果を検討する。スルファチド結合阻害効果の場合は、ウイルスに直接作用させた時や感染前に細胞へ作用させた時はウイルス感染を阻害しないものと予想される。

960 の 10 mix サンプル (9,600 化合物に相当) から、sHA のスルファチド結合性を有意に阻害する 4 化合物が見出された。その他 1 化合物については今後、スルファチド結合阻害効果を測定する。今後、これらの化合物のウイルス増殖阻害試験を実施する。また、スルファチド阻害効果やウイルス増殖抑制効果の見られた化合物の類似構造体を有する化合物ライブラリーで、さらに高い阻害活性を示す化合物を探索する。

スルファチドはインフルエンザウイルス以外にもエイズウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルスの感染にも関与することが報告されている⁹⁾。また、スルファチドは極めて多機能な糖脂質で神経、免疫、糖尿病、がん、細菌感染症などに関係することが報告されている¹⁰⁾。本研究成果は、インフルエンザウイルス以外のウイルス感染症や他の疾患の機構解明、治療法開発にも貢献するかもしれない。

共同研究者

本研究の共同研究者は、立教大学理学部化学科理論創薬・分子設計研究室の常盤広明、静岡県立大学薬学部生命物理化学分野の横山英志、静岡県立大学薬学部創薬探索センターの浅井章良および小郷尚久である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Suzuki, T., Sometani, A., Yamazaki, Y., Horiike, G., Mizutani, Y., Masuda, H., Yamada, M., Tahara, H., Xu, G., Miyamoto, D., Oku, N., Okada, S., Kiso, M., Hasegawa, A., Ito, T., Kawaoka, Y. & Suzuki, Y. : Sulphatide binds to human and animal influenza A viruses, and inhibits the viral infection. *Biochem. J.*, **318** : 389-393, 1996.
- 2) Suzuki, T., Takahashi, T., Nishinaka, D., Murakami, M., Fujii, S., Hidari, K. I., Miyamoto, D., Li, Y. T. & Suzuki, Y. : Inhibition of influenza A virus sialidase activity by sulfatide. *FEBS Lett.*, **553** : 355-359, 2003.
- 3) Takahashi, T., Murakami, K., Nagakura, M., Kishita, H., Watanabe, S., Honke, K., Ogura, K., Tai, T., Kawasaki, K., Miyamoto, D., Hidari, K. I., Guo, C. T., Suzuki, Y. & Suzuki, T. : Sulfatide is required for efficient replication of influenza A virus. *J. Virol.*, **82** : 5940-5950, 2008.
- 4) Takahashi, T. & Suzuki, T. : Role of sulfatide in virus infection and replication. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **21** : 255-265, 2009.
- 5) Takahashi, T., Satoh, H., Takaguchi, M., Takafuji, S., Yokoyama, H., Fujii, S. & Suzuki, T. : Binding of sulphatide to recombinant haemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system. *J. Biochem.*, **147** : 459-462, 2010.
- 6) Takahashi, T., Takaguchi, M., Kawakami, T. & Suzuki, T. : Sulfatide regulates caspase-3-independent apoptosis of influenza A virus through viral PB1-F2 protein. *PLoS One*, **8** : e61092, 2013.
- 7) Takahashi, T. : Function of glycochains in virus infection. *Yakugaku Zasshi*, **134** : 889-899, 2014.
- 8) Takahashi, T., Kawagishi, S., Masuda, M. & Suzuki, T. : Binding kinetics of sulfatide with influenza A virus hemagglutinin. *Glycoconj. J.*, **30** : 709-716, 2013.
- 9) Takahashi, T., Ito, K., Fukushima, K., Takaguchi, M., Hayakawa, T., Suzuki, Y. & Suzuki, T. : Sulfatide negatively regulates the fusion process of human parainfluenza virus type 3. *J. Biochem.*, **152** : 373-380, 2012.
- 10) Takahashi, T. & Suzuki, T. : Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *J. Lipid Res.*, **53** : 1437-1450, 2012.