インフルエンザウイルスー受容体結合様式の解明と感染抑制法の開発

大場雄介

北海道大学大学院医学研究院 細胞生理学教室

【研究の背景】

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る。例えば、イン フルエンザウイルスが細胞に侵入するプロセスについても、一定の理解が進みつつあるものの、未だ多くが謎のままである。 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 1。細胞内カルシウムのキレートに よりインフルエンザの侵入が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によってカルシウム上昇が生じるメカニズムの解明することにより、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。そこで、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 ク質の同定を試みたところ、電位依存性カルシウムチャネル(Cav)のあるクラスとインフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA)タンパク質が結合することが明らかとなった。Cav 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。また、ノックダウンによる発現抑制や阻害薬を用いた機能阻害により、インフルエンザウイ ルス依存的なカルシウム上昇、ウイルスの侵入および感染が抑制された。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、Cav がインフルエンザ感染において重要な役割を果たしていること、魅力的な治療標的であ ることが示唆された。

的】

本研究においては、上記のようなこれまでの研究成果に基づき、Cavとインフルエンザ HA の結合様式を解明する。Cav は インフルエンザウイルスの受容体として機能していることが示唆されるため、Cav-HA 間相互作用の詳細な解析は、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・予防法開発の基盤構築に 直結する。本研究の成果を基盤に実用的な薬剤を同定することが、将来の目標である。

【方 法】

発現ベクターの作製、細胞培養、遺伝子導入およびイムノブロットは常法に基づき実施した。インフルエンザウイルス粒子 と Cav の結合は membrane binding assay 2) で解析した。HA タンパク質と Cav の結合は特異的抗体を用いて免疫共沈法に より検討した。Cav のノックダウンはキアゲン社から購入した siRNA を HiPerfect で細胞に導入し、イムノブロットにより確認し た。

果】 【結

membrane binding assayを用いて Cav 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したところ、両者は結合 し、その結合はシアリダーゼ処理によって阻害された。したがって、インフルエンザウイルス粒子との結合には Cav のシアル 化が必要であることが示唆された。また、Cavのトランケーション変異体を用いることで、インフルエンザウイルス粒子が Cavの セグメントIVに優先的に結合することが明らかになった。

セグメントIV にはシアル化される 2 つのアスパラギン残基(N1436 および N1487)が存在することから³⁾、HA タンパク質がイ

ンフルエンザウイルス粒子と Cav のセグメント IV への結合を担う可能性が示唆された。そこで、HAと Cav の共免疫沈降を行ったところ、HA は完全長 Cav またはセグメント III-IV と結合するが、セグメント I-II とは結合しないことが解った。この結合はシアリダーゼ処理によって抑制されたことから、Cav の糖鎖修飾に依存することが示唆された。

Cav のシアル化が HA-Cav 相互作用に必要であるかどうかをさらに調べるため、上記アスパラギン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)。Cav とこれら HA 変異体との結合は、野生型にシアリダーゼ処理を行った際と同程度まで減少した。したがって、HA と Cav のシアル酸依存的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が示唆された。これを証明するために、siRNA によって内在性 Cav をノックダウンした A549 細胞に、野生型またはそのグリコシル化欠損変異体を再導入するレスキュー実験を行った。野生型 Cav の発現は Cav 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、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。以上の結果から、Cav 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。

【考 察】

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、Cav は機能阻害による感染抑制効果が強く、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ー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。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により HA-Cav の結合様式が明らかになったので、今後 Cav の機能を阻害せず、ウイルスとの結合のみを阻害する化合物を探索することで、高い効果と少ない副作用を両立する治療法の開発につながると期待される。さらに、感染過程における早期プロセスである吸着・取込過程を標的とするため、現行治療法が有する耐性株出現問題に対しても有効である可能性が高い。これらを合わせ、ウイルス感染防御法の基盤構築への発展と、国内だけでなく世界規模での健康保全に対して貢献が期待できる。

【参考・引用文献】

- 1. Fujioka, Y. *et al.* A Ca²⁺-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection.

 Nat Commun 4, 2763 (2013).
- 2. Côté, M. *et al.* Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection.

 Nature 477, 344-348 (2011).
- 3. Lazniewska, J. & Weiss, N. Glycosylation of voltage-gated calcium channels in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1859, 662-668 (2017).