

# 博士学位論文

---

## インフルエンザ感染を制御する 液胞状オルガネラの発見とその性状解明

---

分子生命化学研究室

指導教員 西川喜代孝 教授

同志社大学大学院 生命医科学研究科 医生命システム専攻

2016年度 2003番 近江 純平

## 目次

第1章	序論	P3
第2章	HA を標的とする新規抗 IAV 薬の開発	
	2-1 概要	P8
	2-2 実験方法	P8
	2-3 結果	P14
	2-4 考察	P16
	2-5 図表	P18
第3章	PVF-tet の抗 IAV メカニズムの解明	
	3-1 概要	P27
	3-2 実験方法	P27
	3-3 結果	P32
	3-4 考察	P34
	3-5 図表	P36
第4章	HA を隔離する液胞状オルガネラの性状解析	
	4-1 概要	P45
	4-2 実験方法	P45
	4-3 結果	P50
	4-4 考察	P53
	4-5 図表	P54
第5章	液胞状オルガネラの形成を担う必須分子の同定	
	5-1 概要	P65
	5-2 実験方法	P65
	5-3 結果	P68

5-4 考察	P71
5-5 図表	P73
<b>第6章 個体致死感染に対する(D)PVF-tet の抗 IAV 活性の解析</b>	
6-1 概要	P83
6-2 実験方法	P83
6-3 結果	P87
6-4 考察	P89
6-5 図表	P91
<b>第7章 結論</b>	P99
<b>引用文献</b>	P101
<b>謝辞</b>	P108

## 第 1 章 序論

### インフルエンザウイルスのウイルス学的性状

インフルエンザは毎年世界的な大流行を繰り返す急性呼吸器感染症であり、インフルエンザウイルスの感染により発症する。その感染者数は全世界で毎年 300 万人以上に達し、過去には致死的なパンデミックを引き起こしていることから、インフルエンザウイルスの感染制御は人類にとって重要な課題である<sup>1</sup>。インフルエンザウイルスはウイルス粒子内部の構造タンパク質（NP ならびに M1）の抗原性に基づいて A 型・B 型・C 型の 3 タイプに分類され、特に A 型インフルエンザウイルス（IAV）が季節性インフルエンザの主要な原因ウイルスである。IAV は 8 つの分節 RNA をゲノムとして有するエンベロープウイルスであり、そのエンベロープ上には hemagglutinin (HA)、neuraminidase (NA) ならびに matrix protein 2 (M2) が存在する<sup>2</sup>。この内、HA と NA は抗原性の違いに基づいてそれぞれ H1 から H18、N1 から N11 のサブタイプに分類され、これらの組み合わせによって IAV の亜型が決定されている。現在、日本国内においては H1N1 亜型ならびに H3N2 亜型が主な季節性 IAV として蔓延している。

IAV は経鼻あるいは経口的に宿主体内へと侵入し、気道上皮細胞を標的細胞として感染する。IAV は標的細胞上のシアル酸を受容体として、HA のシアル酸結合活性により標的細胞に吸着し、その後エンドサイトーシスによってエンドソーム内へと取り込まれる（図 1）<sup>3</sup>。次いで、エンドソーム内腔の酸性化に伴って HA が不可逆的な構造変化を起こし、IAV 膜とエンドソーム膜を融合させる。この膜融合と並行して M2 が IAV 粒子内を酸性化することにより、IAV 粒子内腔から細胞質へとウイルスゲノム RNA (vRNA) が放出される。その後、核内に移行した vRNA を鋳型として、IAV の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) により vRNA の複製ならびに mRNA の合成が行われ、IAV タンパク質が新生される。新生された vRNA ならびに IAV タンパク質は細胞膜へと集積し、子孫 IAV 粒子を新たに形成する。形成された IAV 粒子は NA の持つシアル酸切断活性により細胞膜表面から放出され、次の標的細胞へと感染する。IAV はこのようなサイクルを繰り返すことにより極めて効率よく増殖する。

### 抗インフルエンザ薬の現状

IAV の感染を制御する抗 IAV 薬として、これまでに 4 つのタイプの薬剤が開発されている。M2 阻害剤であるアマンタジン（商品名：シンメトレル）は最初期の抗 IAV 薬であり、IAV の細胞内侵入を強く阻害する。しかしながら、アマンタジンの使用は極めて高頻度にその耐性 IAV の出現を惹起すること、また現在蔓延している IAV のほぼ 100%が耐性変異を



獲得していることから、現在では臨床的には使用されていない<sup>4</sup>。M2 阻害剤に次いで開発された NA 阻害剤は、IAV の細胞外放出を阻害する抗 IAV 薬であり、2001 年以降、現在まで第一選択薬として臨床的に使用されている<sup>5,6</sup>。特に、最も新しい NA 阻害剤であるラニナミビル（商品名：イナビル）は単回の服用でも十分な治療効果を示す優れた抗 IAV 薬である<sup>7</sup>。しかしながら、2008 年以前に日本国内で蔓延していた季節性 IAV では、90%以上の頻度で NA 阻害剤に対する耐性変異が検出された過去があり、さらに現在でも毎年 1%程度の頻度で本耐性変異を持つ IAV が検出されている<sup>8</sup>。このような背景をふまえると、1 種類の抗 IAV 薬のみに依存したインフルエンザ治療が極めて不安定であることは明らかである。近年、IAV の RdRp を標的として、IAV の vRNA 複製を阻害するファビピラビル（商品名：アビガン）、ならびに mRNA 合成を阻害するバロキサビル（商品名：ゾフルーザ）が開発されている。ファビピラビルについては副作用として妊婦における催奇形性のリスクが確認されたことから臨床薬としては普及していないものの、バロキサビルは 2018 年シーズンから臨床薬として使用され、NA 阻害剤に対する耐性 IAV に対しても対しても十分な抗 IAV 活性を示すことが報告されている<sup>9</sup>。高い頻度で薬剤耐性を獲得する IAV の感染制御においては、このように異なる作用機序を有する様々なタイプの抗 IAV 薬が存在していることが重要である。

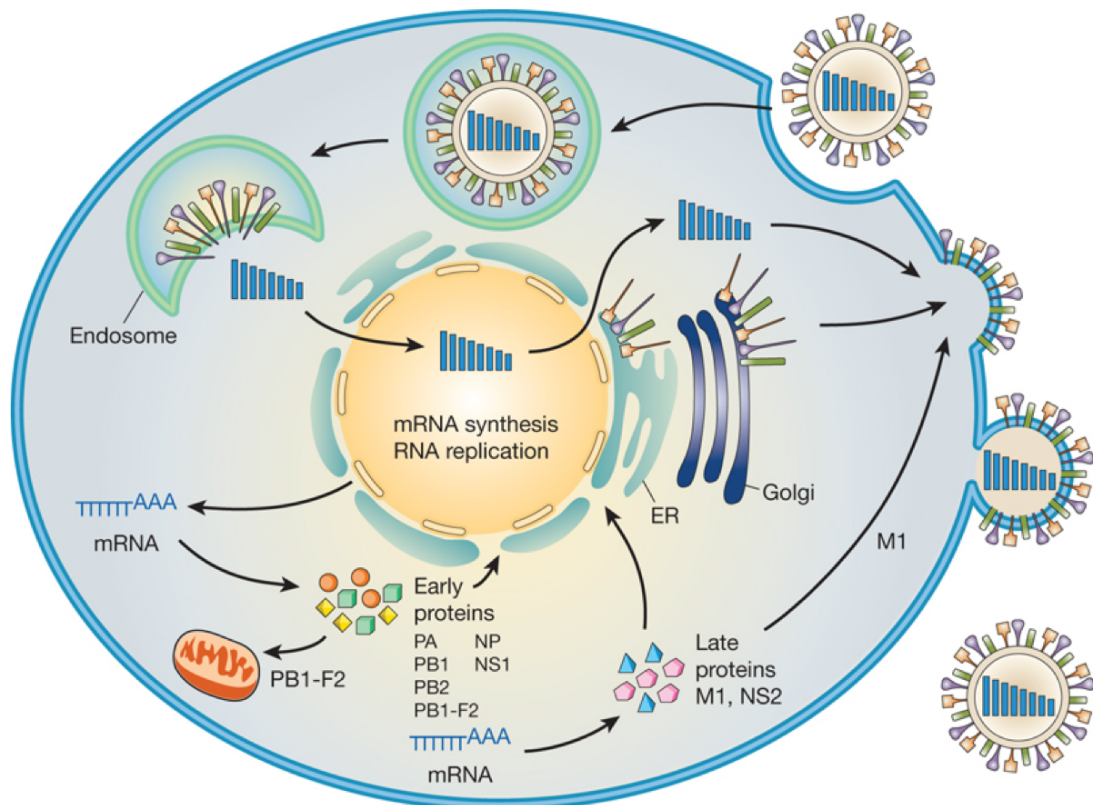
### **新規創薬標的分子としての HA**

そこで本研究では、新たな標的分子として HA に着目した。HA は受容体結合部位を含むヘッドドメインと膜貫通部位を含むストークドメインから成る 1 回膜貫通タンパク質であり、ストークドメインを介してホモ 3 量体を形成する（図 2）<sup>10</sup>。前述の通り、HA は標的細胞膜上の種々の糖タンパク質・糖脂質の糖鎖末端シアル酸を受容体として結合することで IAV の細胞への吸着を担う。近年、これらの受容体の例として Epithelial growth factor receptor (EGFR)や電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルが報告されており、HA はこれら受容体の細胞内シグナルを惹起することにより、IAV の細胞内への取り込みを促進することが明らかとなっている<sup>11,12</sup>。また、ストークドメインにはプロテアーゼ感受性部位が存在し、気道から分泌される種々のトリプシン様プロテアーゼにより切断を受けることで、ジスルフィド結合により連結した HA1 と HA2 へと開裂する<sup>13,14</sup>。この際に生じる HA2 の N 末端側の疎水性領域は膜融合ペプチドと呼ばれ、エンドソーム内腔の酸性環境において HA の構造変化に伴って露出し、IAV 膜とエンドソーム膜の融合を引き起こす。HA が担うこれらの機能は IAV の増幅サイクルにおいて不可欠であり、したがってその創薬標的としての重要性は十分に確立されている。しかしながら、これまでに HA を標的として、臨床応用に耐えうる HA 結合能力と阻害能力を持った薬剤の開発例はほとんど存在していない。

## **本研究の創薬アプローチならびに目的**

その最大の理由として、本研究では HA とシアル酸との間で形成される強力な相互作用に着目した。三量体構造をとる HA は一度に 3 分子のシアル酸と結合するが<sup>15</sup>、その際に形成される多価型の結合は一価の結合と比較して親和性が数千倍亢進する<sup>16,17</sup>。この現象はクラスター効果と呼ばれ、従来の低分子化合物ライブラリーやファージディスプレイライブラリーを用いたスクリーニングでは、このようなクラスター効果に基づく強力な相互作用を阻害する分子の同定は原理的に困難であることが予想された。

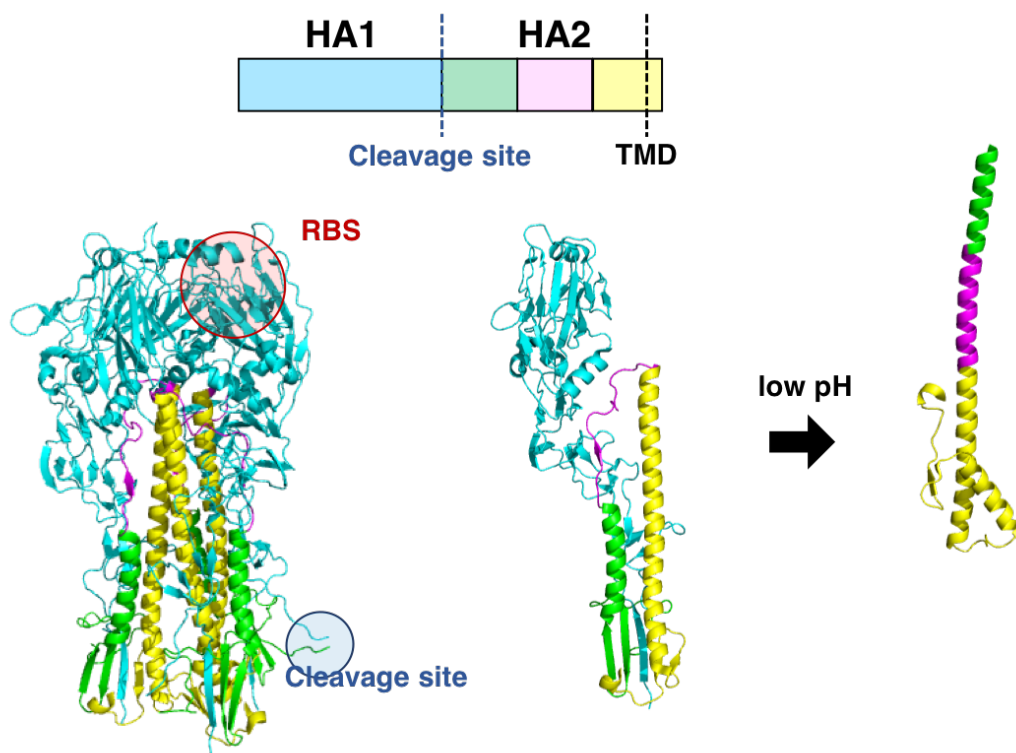
本研究室ではこれまでに、クラスター効果に基づく強力な相互作用を阻害する分子を同定する技術として、多価型ペプチドライブラリー法を開発しており、クラスター効果を發揮して機能する分子に対する様々な阻害ペプチドの創製に成功している<sup>18-22</sup>。そこで本研究では、本法を用いた HA 特異的かつ高親和性結合能を有するペプチド性 HA 阻害薬の開発を目的として研究を行った。



*Nature*, 459, p931-939 (2009)<sup>3</sup>より引用

### 図 1. IAV の増殖サイクル

IAV は HA のシアル酸結合活性により標的細胞へと結合したのち、エンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれる。エンドソーム内腔が酸性化されると共に HA は不可逆的な構造変化により IAV 膜とエンドソーム膜の融合を引き起こす。この際、プロトンチャネル活性を持つ M2 が IAV 粒子内を酸性化することにより IAV のゲノム RNA が細胞質へと放出される。次いで、核内へと移行したゲノム RNA を鋳型として新たなゲノム RNA の複製ならびに IAV タンパク質の mRNA の合成が開始される。新生 IAV タンパク質ならびにゲノム RNA は細胞膜へと集積し、新たな IAV 粒子を形成する。その後、形成された IAV 粒子は NA のシアル酸切断活性により細胞から放出され、新たな標的細胞へと感染する。



## 図 2. HA の構造

HA は受容体結合部位 (RBS) を含む HA1 (Cyan) とストークドメインならびに膜貫通領域 (TMD) を含む HA2 (Green, Magenta, Yellow) から構成されるタンパク質であり、三量体構造を形成している<sup>23</sup> (左)。中性環境においては、プロテアーゼによる開裂の有無を問わず、HA2 は 2 本の  $\alpha$ -helix 構造 (Green, Yellow) がループ構造 (Magenta) により接続され、折りたたまれた構造をとる (中央)。一方、開裂を受けている場合にエンドソーム内腔のような酸性環境に曝されるとループ構造がヘリックス構造へと変化することにより、長い  $\alpha$ -helix が形成され (右)、IAV 膜とエンドソーム膜の融合を引き起こす<sup>24</sup>。図は分子構造描画ソフト Pymol を用いて PDB に登録されている構造データ (PDB: 1HTM ならびに 4WE4) を元に作成した。

## 第2章 HA を標的とする新規抗 IAV 薬の開発

### 2-1 本章の概要

多価型ペプチドライブラリーは3つのLysで構成される分岐核構造に4本のランダムペプチドが等価に結合した構造をとり、それ自体がクラスター効果を発揮して標的分子と強力に結合する。したがって本ライブラリーからHA結合画分を分取し、そのアミノ酸シークエンス解析を行うことにより、クラスター効果を発揮してHAと結合するペプチドモチーフ情報を得ることが可能である。また、HAのシアル酸結合に必須であるLeu194<sup>25</sup>をAlaに置換したL194A変異型HAについても同様の操作を行った。得られた野生型HAのモチーフ情報から変異型HAのモチーフ情報をサブトラクションすることで、HAのシアル酸結合部位を標的として結合するペプチドモチーフの同定を試みた。

多価型ペプチドライブラリー法に加えて、本研究室はセルロース膜上に最大384種の多価型ペプチド合成した多価型ペプチドアレイを作製する技術を有している。前述の多価型ペプチドライブラリー法から得られたHA結合ペプチドモチーフをベースとする誘導体ペプチドアレイを作製した。本アレイを野生型HA及び変異型HAによりプロットし、各ペプチドモチーフのHA結合力ならびに野生型HAに対する特異性の2点を指標としてスクリーニングを行うことにより、特異的かつ高親和性HA結合ペプチドモチーフの同定を試みた。本スクリーニングにおいて優れた結合力ならびに特異性を示した上位5種のモチーフについて、多価型ペプチドライブラリーと同じ4価の核構造に組み込んだペプチドを合成し、HA阻害薬としての活性評価を行った。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 実験試薬

- 細胞培養、IAV感染実験

TNM-FH insect cell medium	(Sigma-Aldrich)
Modified Eagle's Medium (MEM)	(Nacalai Tesque)
Fetal Bovine Serum (FBS)	(biosera)
Penicillin/Streptomycin Solution	(Nacalai Tesque)
MEM with HEPES	(GIBCO)
35% ウシ血清アルブミン (培養用)	(Wako)
200 mM L-Glutamine	(GIBCO)
Dulbecco's modified Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	(Nacalai Tesque)
2x MEM	(GIBCO)

DEAE-デキストラン	(Sigma-Aldrich)
1 M HEPES solution	(GIBCO)
クリスタルバイオレット	(Sigma-Aldrich)
Zanamivir	(東京化成工業)
Cell Counting Kit-8	(Nacalai Tesque)
<b>・ バキュロウイルス発現系を用いた組換え HA の調製</b>	
BacPAK タンパク質発現キット	(Clontech)
Tris	(Wako)
NaCl	(Wako)
Glycerol	(Wako)
Imidazole	(Wako)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	(Rosche)
Nonidet P-40 (NP-40)	(Sigma-Aldrich)
Ni Sepharose High Performance	(GE Healthcare Sciences)
NAP-5 desalting column	(GE Healthcare Sciences)
BCA assay reagent	(ThermoFischer Scientific)
<b>・ スクリーニング</b>	
酢酸	(Wako)
滅菌水	(GIBCO)
Iodogen	(Pierce)
放射性ヨウ素 <sup>125</sup> I	(PerkinElmer)
スキムミルク粉末	(Wako)
<b>・ 固相結合実験</b>	
ウシ血清アルブミン (フラクション V)	(Wako)
Tween-20	(Sigma-Aldrich)
マウス抗 His-tag 抗体 (clone 9C11)	(Wako)
HRP 標識抗マウス IgG 抗体	(Cell Signaling Technology)
<i>o</i> -Phenylendiamine	(Wako)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Wako)
Citric acid monohydrate	(Wako)
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Wako)
<b>・ AlphaScreen 法</b>	
AlphaScreen His-Detection kit	(PerkinElmer)

- α2-3 Sialyllactose-PAA (Glycothech)
- **BiaCore システムによる相互作用解析**
  - NTA センサーチップ (GE Healthcare Sciences)
  - Nickel solution (GE Healthcare Sciences)
- **MALDI-TOF/MS による質量分析**
  - Acetonitrile (Wako)
  - Trifluoric acetic acid (Wako)

## 2-2-2 細胞培養ならびに IAV の調製

**Sf21 細胞の培養** Sf21 細胞の培養には 10% 非働化 FBS、100 units/ml Penicillin ならびに 100 µg/ml Streptomycin を含む TNM-FH を用い、次の手順で継代操作を行った。75 cm<sup>2</sup> フラスコ内で接着培養している Sf21 細胞の培養上清を除去したのち、新たに 10 ml の培地を添加し、スクレーパーにより細胞を剥離した。剥離した細胞を 15 ml 遠沈管へと回収し、血球計算板により細胞数を計数し、新たな 75 cm<sup>2</sup> フラスコに 2 x 10<sup>5</sup> cells/ml の細胞濃度で 10 ml 分を播種し、28°C のインキュベーター内で培養を行った。

**MDCK 細胞の培養** IAV (H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8 株)) の感染モデルにはイヌ腎臓上皮細胞由来の細胞株である MDCK 細胞 (ATCC CTL-34) を使用した。MDCK 細胞の培養には 10% 非働化 FBS、100 units/ml Penicillin ならびに 100 µg/ml Streptomycin を含む MEM (以下、培養培地) を用い、次の手順で継代操作を行った。75 cm<sup>2</sup> フラスコ内で培養している MDCK 細胞を 5 ml の D-PBS により洗浄後、2.5 ml のトリプシン-EDTA を添加し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 20 分間保温することにより細胞をフラスコ底面から剥離させた。細胞の剥離後、トリプシン-EDTA を 8.5 ml の培地で中和すると共に細胞を 15 ml 遠沈管へと回収し、遠心操作 (4°C, 180 g, 5 分間) により細胞を沈殿させた。細胞のペレットを 5 ml の培地により懸濁したのち、0.25 ml を 10 ml の培地に希釈して新しい 75 cm<sup>2</sup> フラスコへと播種し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養を行った。

**IAV の調製** IAV の調製は次の手順で行った。2 x 10<sup>6</sup> cells の MDCK 細胞を 75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、3 日間培養することにより単層状へと分化させた。単層 MDCK 細胞を 5 ml の D-PBS で 2 度洗浄後、0.001 MOI (感染多重度 = 感染粒子数 (pfu) / 細胞数) となるように IAV PR8 株を添加した 10 ml のトリプシン含有無血清培地 (1 µg/ml trypsin, 2 mM L-glutamine, 0.2% BSA, 100 units/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin in MEM with HEPES) を加え、72 時間培養した。培養上清を全量回収し、遠心操作 (4°C, 1000 g, 10 分間) により死細胞等を除去した上清を IAV ストックとして分注後 -80 °C にて保存した。

### **IAV の力価測定**

IAV ストックの力価は、標準的なプラークアッセイにより測定した。6 well プレートにて培養した単層 MDCK 細胞を 2 ml の D-PBS で洗浄後、トリプシン含有無血清培地により  $10^1 \sim 10^6$  倍まで段階希釈した IAV ストック希釈液を 200  $\mu$ l 添加し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間静置することにより感染を行った。感染後、2 ml の D-PBS で 2 度洗浄したのち、2 ml のアガー含有無血清培地 (1  $\mu$ g/ml trypsin, 0.01% DEAE-デキストラン, 0.2% BSA, 25 mM HEPES and 0.6% Agar in 1 x MEM) を添加し、室温で 15 分間静置することにより固化させた。培地が完全に固化したことを確認し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内にプレートを逆さまに静置し、40 時間の培養を行った。40 時間後、固化培地をスパーテルにより除去し、2 ml の 1% クリスタルバイオレット溶液を添加することにより固定ならびに細胞染色を行った。水道水にてプレートを洗浄後、各 well のプラーク数 (pfu) を計数し、希釈倍率を元に IAV ストックの力価 (pfu/ml) を算出した。

### **2-2-3 バキュロウイルス発現系を用いた組換え HA の調製**

#### **組換えバキュロウイルスの調製**

後述のスクリーニングに用いる組換え HA (H1N1 A/Puerto Rico/8/34 由来) は Sf21 細胞 (Clontech) を用いたバキュロウイルス発現系により調製した。野生型 HA もしくは L194A 変異型 HA の C 末端側に His-tag を付加した組換え遺伝子を pBacPAK8 transfer vector に組み込み、pBacPAK6 バキュロウイルス DNA と共に製品プロトコルにしたがって Sf21 細胞へ導入した。導入 72 時間後に遠心操作 (4°C, 1000 g, 10 分間) により死細胞等を除去した培養上清 P<sub>0</sub> を組換えバキュロウイルス画分として回収した。次いで、Sf21 細胞を新たに細胞濃度  $0.7 \times 10^7$  cells/10 ml で 75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、2 時間後に 1 ml の組換えバキュロウイルス画分を添加し、感染を行った。感染 96 時間後の培養上清 P<sub>1</sub> について同様の操作をもう一度繰り返し、高力価の組換えバキュロウイルスを含む培養上清 P<sub>2</sub> を得た。

#### **HA の発現ならびに精製**

細胞濃度  $0.7 \times 10^7$  cells/10 ml で 75 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、2 時間後に 1 ml の培養上清 P<sub>2</sub> を添加し、感染を行った。感染 48 時間後にスクレーパーにより培養上清ごと細胞を 15 ml 遠沈管へと回収し、遠心操作 (4°C, 1000 g, 5 分間) により細胞を沈殿させた。上清を除去した後、5 ml の冷 PBS で細胞を懸濁し、遠心操作 (4°C, 1000 g, 5 分間) により再度細胞を沈殿させた。細胞のペレットに 1 ml の Lysis buffer (1% NP-40, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% Glycerol ならびに Complete Protease Inhibitor を含む) に懸濁し、氷冷下でのソニケーションにより十分に破碎した。遠心操作 (4°C, 20,000 g, 5 分間) により Lysate の可溶性画分を分取し、次いで本画分に packed vol. 10  $\mu$ l の Ni beads を添加し、4°C で一晩の回転混和を行った。その後、Ni beads を洗浄バッファー (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM



imidazole, pH7.9) ならびに洗浄バッファー2 (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 60 mM imidazole, pH7.9)により各3回ずつバッチ法での洗浄を行い、固相化 HA 標品を得た。さらに、本標品を溶出バッファー (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 M imidazole, pH7.9) 中で3時間混和したのち、溶出画分を NAP-5 カラムにより脱塩処理することにより、可溶化 HA 標品を得た。各 HA 標品の濃度は BCA 法により定量した。

#### 2-2-4 多価型ペプチドライブラリー法によるスクリーニング

上記の 250  $\mu$ g 相当の固相化 HA 標品を 300  $\mu$ g の多価型ペプチドライブラリーと 200  $\mu$ l の PBS 中で回転混和させ、4°C で一晩の結合反応を行った。反応後、PBS により固相化 HA 標品を 5 回洗浄することで未結合画分を除去し、HA に結合したペプチドフラクションを 30%酢酸により溶出した。減圧遠心 (SpeedVac) により溶出画分の酢酸を除去したのち、滅菌水により再溶解したペプチド画分について N 末端側から順次アミノ酸シーケンス解析を行った。各ランダムポジションについて、Cys を除く 19 種のアミノ酸のモル比を算出し、その和が 19 となるように補正した。その後、各アミノ酸について、野生型 HA を用いて得られた値と L194A 変異型 HA を用いて得られた値の比 (野生型 HA/L194A 変異型 HA) を求め、再度その和が 19 となるように補正した。すなわち、野生型 HA と L194A 変異型 HA との間で選択性に差がないアミノ酸については、この比が 1 となる。

#### 2-2-5 IAV の細胞傷害活性を指標とする候補ペプチドの抗 IAV 活性の解析

**Single-cycle infection** 96 well プレートに細胞密度  $3 \times 10^4$  cells/well で播種し、3 日間培養することで単層分化させた MDCK 細胞 (以降、単層 MDCK 細胞と記述する) を用いた。各濃度の化合物を単層 MDCK 細胞に添加し、添加 30 分後に 10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させた。図中の各化合物の濃度は最終濃度を示している。感染 24 時間後、D-PBS により 2 度の洗浄を行い、死細胞を除去したのち、Cell Counting Kit-8 により細胞生存率を計測した。

**Multi-cycle infection** 感染細胞より産生された新生 IAV が感染性を獲得するためには、トリプシンによる HA の開裂が必須である。基本的な実験条件は上述の Single-cycle infection の場合と同様であるが、Multi-cycle infection の際には化合物ならびに IAV の希釈調製にはトリプシン含有無血清培地を用い、感染力価は 0.001 MOI とした。感染 40 時間後、D-PBS により 2 度の洗浄を行い、死細胞を除去したのち、Cell Counting Kit-8 により細胞生存率を計測した。

#### 2-2-6 多価型ペプチドアレイによるスクリーニング

Intavis AG 社のスポットペプチドシンセサイザーを用いてセルロースシート上に一連の多価型ペプチドを合成し、多価型ペプチドアレイを作製した。多価型ペプチドア

レイを 5%スキムミルク/PBS に浸し、室温で 1 時間のブロッキングを行った。ブロッキングの後、PBS-T による洗浄を 3 回行い、次いで Iodogen 法により  $^{125}\text{I}$  をチロシン残基に導入した  $^{125}\text{I}$ -HA (野生型ならびに L194A 変異型) を各 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で結合反応を行った。結合反応後、PBS-T による洗浄を 3 回行い、アレイ上の放射活性を BAS-2500 バイオイメージングアナライザー (GE Healthcare Sciences) により検出すると共に、各スポットの放射活性を定量した。野生型 HA あるいは L194A 変異型 HA でのそれぞれでプロットした各アレイについて、各スポットの定量値の総和がスポット総数となるように補正し、この値を各ペプチドの HA 結合親和性の指標とした。また、各ペプチドについて野生型 HA 結合量と L194A 変異型 HA 結合量の比 (野生型 HA の結合量/L194A 変異型 HA の結合量) を各ペプチドの L194 に対する特異性の指標とした。以上の双方ともに優れていることを示す指標である両者の積野生型 HA の結合量  $\times$  (野生型 HA の結合量/L194A 変異型 HA の結合量) を指標として、候補ペプチドを同定した。

#### 2-2-7 候補ペプチドの HA 結合活性の解析

PBS により 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に希釈した各化合物を ELISA 用 96 well プレートの各 well に添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩の固相化反応を行った。固相化液を除去したのち、2% BSA/PBS を添加して室温で 1 時間のブロッキングを行った。PBS-T (0.1% Tween-20 を含む PBS) による 3 回の洗浄後、各濃度の可溶化 HA 標品を 2% BSA/PBS 中で調製して各 well へと添加し、室温で 1 時間の結合反応を行った。結合反応ののち、同様の洗浄・反応手順で 1 次抗体 (抗 His-tag 抗体) ならびに 2 次抗体 (HRP 標識抗マウス IgG 抗体) を順次反応させ、発色液 (0.012%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 40 mM *o*-Phenyldiamine, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 24 mM Citric acid) を添加した。室温で 10 分の発色の後、反応停止剤として等量の 1 M 硫酸を添加し、分光光度計 Multiskan FC (Thermo Fischer Scientific) により吸光度測定を行った。

#### 2-2-8 候補ペプチドの HA-受容体間相互作用に対する競合阻害活性の解析

AlphaScreen assay buffer で希釈することにより可溶化 HA 標品 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、ビオチン化シアル酸ポリマー (16 nM) ならびに各濃度の化合物を調製した。384 well プレートの各 well 中に可溶化 HA 標品と化合物を 5  $\mu\text{l}$  ずつ混合し、室温で 30 分の結合反応を行ったのち、5  $\mu\text{l}$  のビオチン化シアル酸ポリマーを添加し、さらに室温で 60 分の反応を行った。反応後、5  $\mu\text{l}$  の Ni-chelate Acceptor beads (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ならびに 5  $\mu\text{l}$  の Streptavidin Donor beads (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し、暗室で 1 時間の反応後、EnVision プレートリーダーにより発光を検出した。

#### 2-2-9 Biacore システムを用いた PVF-tet と HA の相互作用カイネティクス解析

T100 Biacore システム (GE Healthcare sciences) による解析は全てマニュアル操作により行った。流速 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  で Nickel solution を 240 秒間流し、NTA センターチップ上に  $\text{Ni}^{2+}$  を固定化したのち、流速 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  で 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のリガンド(可溶化 HA 標品)を 60 秒間流し、リガンドの固定化を行った。その後、流速 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  で各濃度のアナライト (PVF-tet ならびに PVF-monomer) を 180 秒間流し、センサーグラムを得た。図では HA 非固定化チップにおけるレスポンス(すなわち非特異的なアナライトの結合)をサブトラクションしたセンサーグラムを示した。

## 2-2-10 MALDI-TOF を用いたペプチドの質量分析

1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のトリプシン存在下において 0.1  $\mu\text{g}$  の PVF-tet あるいは(D)PVF-tet を 37°C で 24 時間処理したのち、反応液 1  $\mu\text{l}$  を等量の質量分析用マトリクス (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CHCA/0.1% TFA/ 50% acetonitrile) と混合し、384 MALDI target プレート上に塗布した。サンプルが乾固したのち、Autoflex II MALDI-TOF 質量分析装置 (Bruker Daltonics) により質量測定を行った。

## 2-2-11 IAV の増殖を指標とする PVF-tet の抗 IAV 活性の解析

24 well プレートに細胞密度  $1.5 \times 10^5$  cells/well で播種し、3 日間培養することで単層分化させた MDCK 細胞を用いた (以降、単層 MDCK 細胞と記述する)。各化合物を単層 MDCK 細胞に添加し、添加 30 分後に 0.2 MOI ( $6 \times 10^4$  pfu/ml) の IAV PR8 株を培養培地中で感染させた。感染 16 時間後の培養上清をトリプシン含有無血清培地により段階希釈し、**2-2-2** に記述したプラークアッセイ法により IAV の力価測定を行った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 多価型ペプチドライブラリースクリーニングによる HA 結合ペプチドの同定

図 3A に示す 4 つのランダムポジションを含む多価型ペプチドライブラリーから、野生型 HA に対する特異性 (野生型 HA/L194A 変異型 HA) を指標としてスクリーニングを行ったところ、全てのポジションにおいて Lys が、またポジション 1 ならびに 2 において Val が、ポジション 4 において Gly がそれぞれ強く選択された(図 3B)。次に、これらのアミノ酸をライブラリーの中心部に組み込んだ 2 次ライブラリーを合成し、同様のスクリーニングを行ったところ、Lys ならびに Val を固定したライブラリーではそれぞれ各ポジションにおいて高い選択性を示すアミノ酸情報が得られた(図 3B)。そこで、各ライブラリーについて各ポジションで最も高い選択性を示したアミノ酸から成るモチーフ『HHTKRRR』ならびに『RRRVNHH』を多価型ペプチドライブラリーと同じ 4 価の核構造に組み込んだ TKR-tet ならびに RVH-tet を合成し、

その抗 IAV 活性の解析を行った。その結果、いずれのペプチドも濃度依存的に IAV の細胞傷害活性を阻害し、特に RVH-tet が優れた阻害活性を示すことを見出した (図 3C)。

次に、RVH-tet の抗 IAV 活性をさらに向上させるために、『RRRVNHH』をベースとして、各ポジションについて他の 18 種類 (Cys を除く) のアミノ酸に順次置換した誘導体を網羅的に合成した多価型ペプチドアレイを作製し、HA に対する特異的結合を指標としてスクリーニングを行った (図 4A, 4B)。2 段階の多価型ペプチドアレイスクリーニングを経て、最終的に上位 5 種 (RRPVNHD・RRPMNHH・RRPVNHN・RRPVNHF・RRPVNHP) を HA 高親和性結合モチーフとして同定した。

### 2-3-2 新規 HA 結合ペプチドの抗 IAV 活性の解析

同定した各モチーフについて同様に 4 価の核構造に組み込んだ 4 価型ペプチド (それぞれ PVD-tet・PMH-tet・PVN-tet・PVF-tet・PVP-tet と命名した) を合成し、その HA 結合活性の解析を行った。結果として、いずれのペプチドについても HA に対して同程度の高親和性結合を示すこと、さらに HA とシアル酸ポリマーの相互作用を競合的に阻害することを見出した (図 5A, 5B)。また、抗 IAV 活性についても検討を行ったところ、既存の NA 阻害剤である Zanamivir には劣るものの、PVD-tet を除く 4 種のペプチドが濃度依存的に IAV の細胞傷害活性を阻害し、特に PVF-tet が優れた阻害活性を示すことを見出した (図 5C)。一方で、特定のモチーフを持たない 4 価の核構造 MA-tet は全く阻害効果を示さなかった。また、これらのペプチドは 60  $\mu\text{M}$  まで全く細胞毒性を示さないことを確認した。(図 5D)

多価型ペプチドライブラリー法はクラスター効果に基づくペプチドスクリーニング技術であることから、本法により同定した HA 結合モチーフは多価型構造に最適化されていることが予想された。そこで、PVF-tet と同じモチーフ『RRPVNHF』を有する 1 価型ペプチド PVF-monomer を合成し、両者の HA 結合活性ならびに抗 IAV 活性を比較評価した。Biacore システムを用いた相互作用カイネティクス解析を行ったところ、PVF-tet では解離が遅い典型的な多価型相互作用を示すセンサーグラムが得られた (図 6A)。一方で、PVF-monomer についてはほとんど HA との相互作用が検出されず、また抗 IAV 活性も示さないことを見出した (図 6B)。すなわち、PVF-tet はクラスター効果に基づいて抗 IAV 活性を示すことが明らかとなった。

### 2-3-3 トリプシン耐性型 PVF-tet の開発

HA は感染細胞内において合成されたのち、細胞外のトリプシン様プロテアーゼにより部分切断を受けることで開裂し、pH 感受性の膜融合活性を獲得する<sup>13,14</sup>。このため、IAV の感染には宿主のプロテアーゼが必須であり、IAV の主たる感染局所であ

る気道上皮では、種々のトリプシン様プロテアーゼが盛んに分泌されていることが明らかとなっている。これらのトリプシン様プロテアーゼは基質配列中の塩基性アミノ酸 (Arg/Lys/His) を認識し、その C 末端側を加水分解する切斷特異性を有することが知られている。このことから、モチーフ中に 2 つの Arg 残基を有する PVF-tet についても、IAV の感染局所で分解を受けることが推測された。PVF-tet とトリプシンを混合し、一定時間の反応後に質量分析を行ったところ、確かに PVF-tet の部分的な分解が起こることを見出した (図 7A)。分解後の分子量からモチーフ中の N 末端 Arg がトリプシンによって認識されていることが予想されたため、当該 Arg を D 体に置換した (D)PVF-tet を合成し、そのトリプシンに対する安定性を検討したところ、(D)PVF-tet は完全なトリプシン耐性を示した (図 7A)。

そこで、(D)PVF-tet について IAV の Multi-cycle infection 時、ならびに Single-cycle infection 時の細胞傷害活性に対する阻害活性を解析した。この際、ウシ血清タンパク質である fetuin を比較対照として用いた。fetuin は分子内に 10 価以上のシアル酸を有する糖タンパク質であり、HA と結合することにより、IAV の感染を阻害することが報告されている<sup>17,26</sup>。低力価感染条件である Multi-cycle infection の場合には、(D)PVF-tet は PVF-tet と比較して効率良く IAV の細胞傷害活性を阻害したが、その活性は fetuin と比較すると限定的であった (図 7B, 左)。一方で興味深いことに、高力価感染条件である Single-cycle infection では、fetuin は全く阻害活性を示さず、PVF-tet ならびに (D)PVF-tet は優れた阻害活性を示した (図 7B, 右)。また同じく Single-cycle infection の条件で、通常 IAV は 16 時間で 600 倍程度まで増殖するが、PVF-tet ならびに (D)PVF-tet では増殖が著しく抑制されていることを見出した (図 7C)。

以上の一連の結果は、PVF-tet ならびに (D)PVF-tet が HA を標的とする新規抗 IAV 薬となりうることを示唆している。

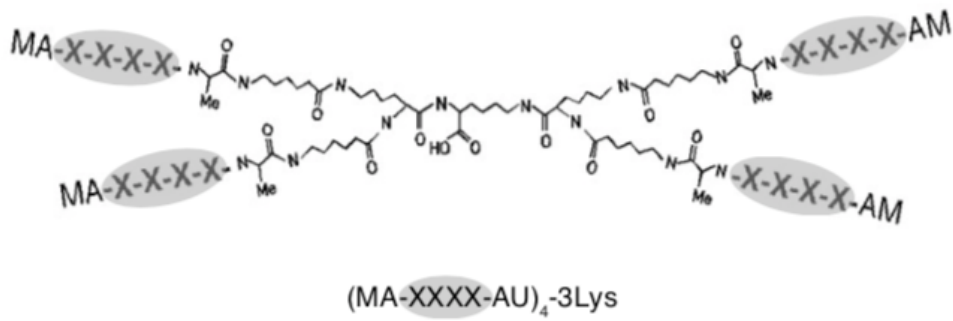
## 2-4 考察

2 つの多価型ペプチドスクリーニング技術を組み合わせることにより、クラスター効果に基づいて抗 IAV 活性を示すペプチドの同定に成功した。同定した一連のペプチドは、HA とシアル酸の相互作用を競合的に阻害することから、HA のシアル酸結合部位を標的として結合していることが推測される。一方で、いずれのペプチドについても同程度の HA 結合親和性と競合阻害活性を示すにも関わらず、その抗 IAV 活性にはペプチド間で大きな差が見られた。特に PVD-tet がほとんど抗 IAV 活性を示さないことをふまえると、細胞レベルでの抗 IAV 活性には HA 結合活性や競合阻害活性以外の決定要因が存在することが示唆された。また、同じく HA を標的として、IAV の細

胞への結合を阻害すると考えられている fetuin が高力価感染条件では全く抗 IAV 活性を示さない一方で、PVF-tet は優れた抗 IAV 活性を示した。このことは、PVF-tet が fetuin とは異なる抗 IAV メカニズムを有していることを示唆している。

2-5 図表

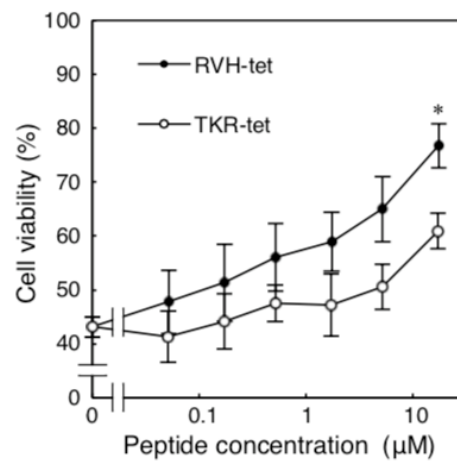
3A



3B

1st-Library	Position						
	1	2	3	4			
(MA-XXXX-AU) <sub>4</sub> -3Lys	<b>K(1.3)</b>	<b>K(1.3)</b>					
	V/A(1.2)	V/A(1.2)	K/A(1.2)	K/G/A(1.2)			
2nd-Libraries	Position						
	1	2	3	4	5	6	7
(MA-XXXGXXX-AU) <sub>4</sub> -3Lys				<b>G</b>		<b>G(1.3)</b>	<b>G(1.5)</b>
(MA-XXXKXXX-AU) <sub>4</sub> -3Lys			<b>T(1.6)</b>	<b>K</b>			
	<b>H(1.3)</b>	<b>H(1.4)</b>	<b>S/I(1.3)</b>				
	A/M(1.2)	A(1.2)			R(1.2)	R(1.2)	R(1.2)
(MA-XXXVXXX-AU) <sub>4</sub> -3Lys	<b>R(1.4)</b>			<b>V</b>		<b>H(1.4)</b>	<b>H(1.5)</b>
		<b>R(1.3)</b>	<b>R(1.3)</b>		<b>N(1.3)</b>	<b>D/N(1.3)</b>	<b>D(1.3)</b>
	K(1.2)				H(1.2)	R(1.2)	N/R(1.2)

3C



### 図 3. 多価型ペプチドライブラリーの構造

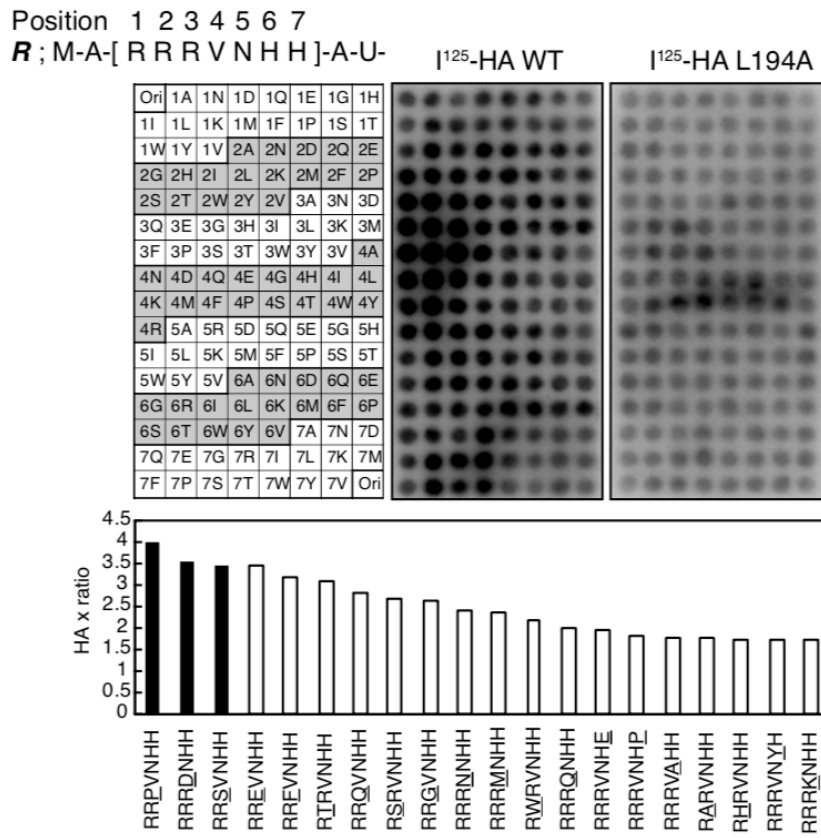
(A) 3つの Lys から構成される核構造に、カプロン酸 (U) をスペーサーとしてランダムペプチドライブラリーが等価に 4 本結合した構造をとる。X は Cys を除く 19 種類のアミノ酸のミクスチャーであることを示している。

(B) 1 次ライブラリーならびに 2 次ライブラリーのスクリーニングにおいて、各ランダムポジションにおいて選択されたアミノ酸を表している。() 内の数字は選択性 (野生型 HA/L194A 変異型 HA) を示しており、1.3 以上の値を示したアミノ酸については太字で表記している。

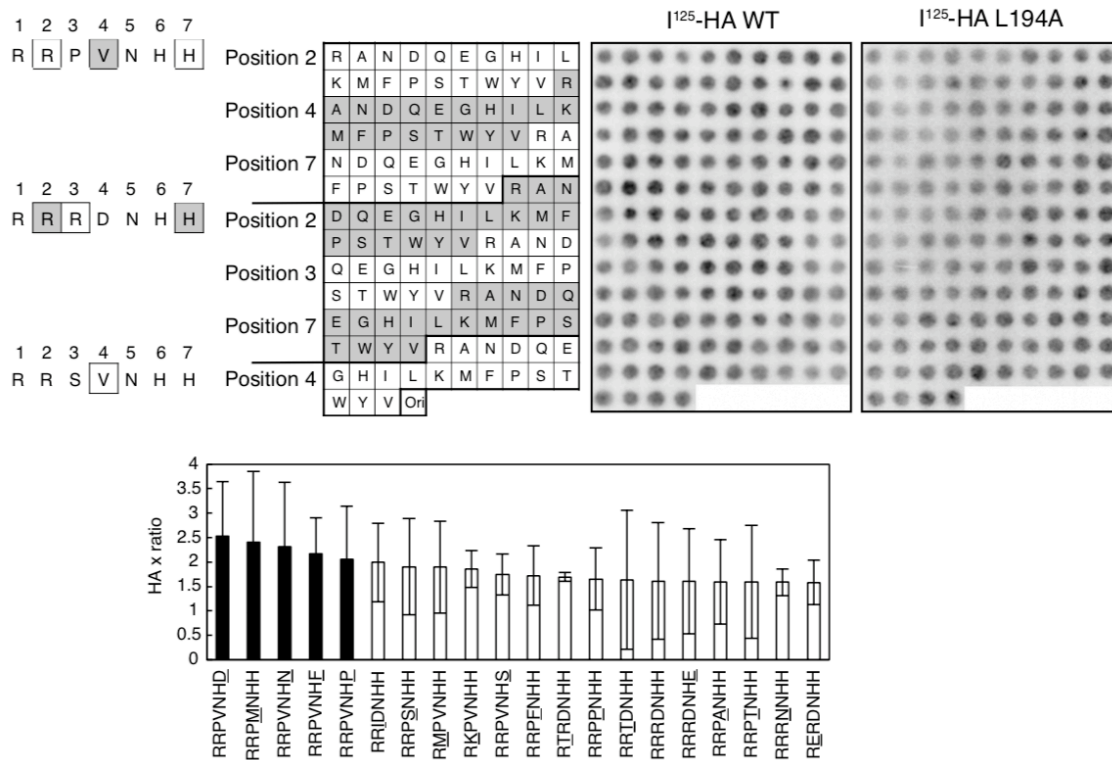
(C) 単層 MDCK 細胞を各濃度のペプチド存在下において 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 24 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。\* $P < 0.05$  (compared with TKR-tet by two-sided Student's t-test).



### 4A



### 4B

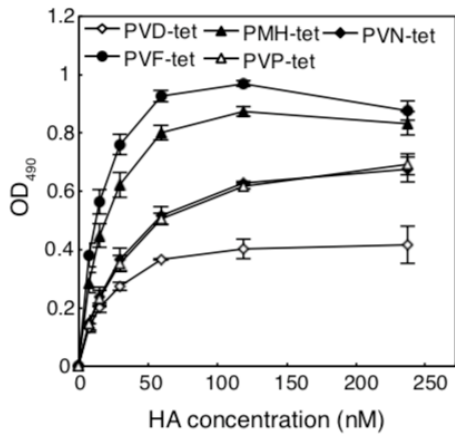


#### 図 4. 多価型ペプチドアレイによるスクリーニング

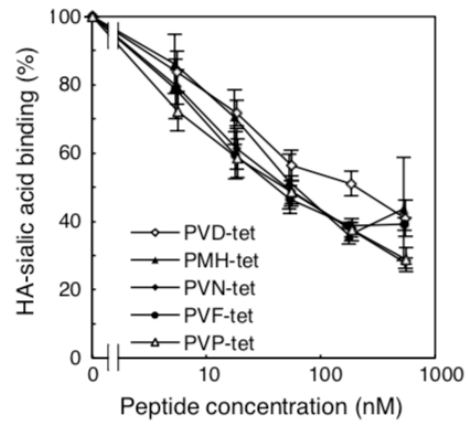
**(A)** 上段左図の通り、オリジナルモチーフ (Ori, RRRVNHH) の各ポジションについて、Cys を除く 18 種のアミノ酸に置換した改変モチーフをセルロースシート上に 4 価型ペプチドとして合成した。本アレイを  $^{125}\text{I}$ -野生型 HA (上段中央図) ならびに  $^{125}\text{I}$ -L194A 変異型 HA (上段右図) によりプロットし、その放射活性を検出し、各ペプチドの結合力とした。野生型 HA に対する結合力と、野生型 HA に対する特異性 (野生型 HA に対する結合力/L194A 変異型 HA に対する結合力) の積を各ペプチドの特異的結合活性の指標として算出した。下段図は上位 20 種のモチーフを示している。図は同志社大学 修士論文 (Ching-Yi Tseng., 2014) より引用した。

**(B)** 上段左図の通り、3 つのオリジナルモチーフ (RRPVNHH, RRRDNHH, RRSVNHH) の各ポジションについて、Cys を除く 18 種のアミノ酸に置換した改変モチーフをセルロースシート上に 4 価型ペプチドとして合成した。1st スクリーニングと同様の操作を行い、各ペプチドの特異的結合活性を解析した。下段図は上位 20 種のモチーフを示している。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。図は同志社大学 修士論文 (Ching-Yi Tseng., 2014) より引用した。

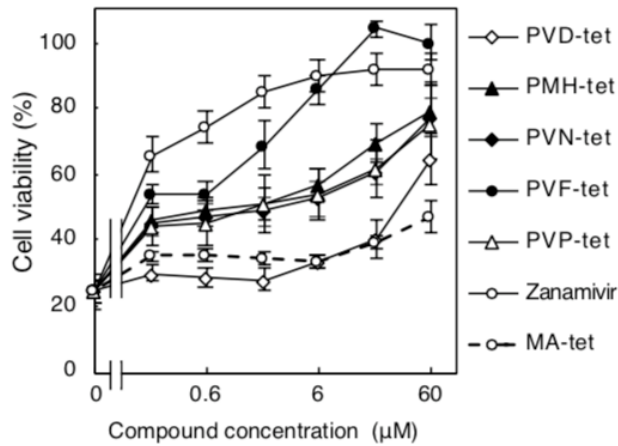
5A



5B



5C



5D

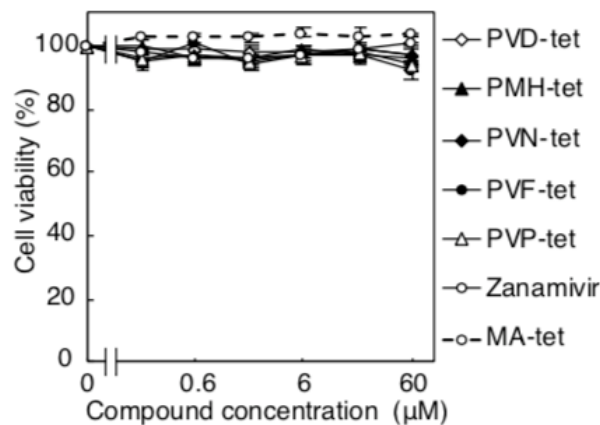


図5. 候補ペプチドのHA阻害活性ならびに抗IAV活性の評価

(A) ELISAプレートに固相化した各ペプチド (2  $\mu\text{M}$ ) に対する各濃度の野生型HAの結合を

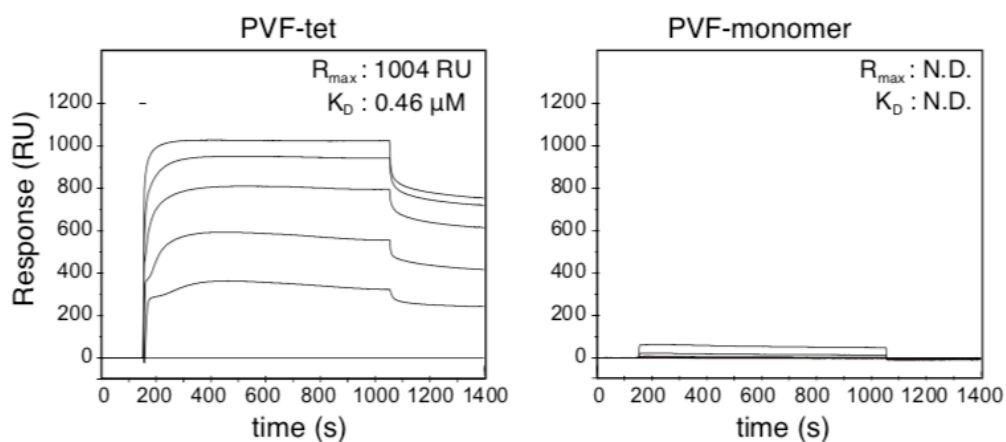
抗 His-tag 抗体ならびに HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて検出した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

**(B)** 野生型 HA (10  $\mu\text{g/ml}$ )と各濃度のペプチドを混合して 30 分間の結合反応を行ったのち、 $\alpha$ 2-3 シアル酸ポリマー (16 nM)を添加し、さらに 60 分間の結合反応を行った。結合反応後の野生型 HA と各シアル酸ポリマーとの相互作用を AlphaScreen 法により検出した。ペプチド非存在下におけるシグナル値を 100%として、各回の実測シグナル値の標準化を行った。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

**(C)** 単層 MDCK 細胞を各濃度の化合物存在下において 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 24 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

**(D)** 単層 MDCK 細胞を各濃度の化合物存在下において培養した。培養 24 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

6A



6B

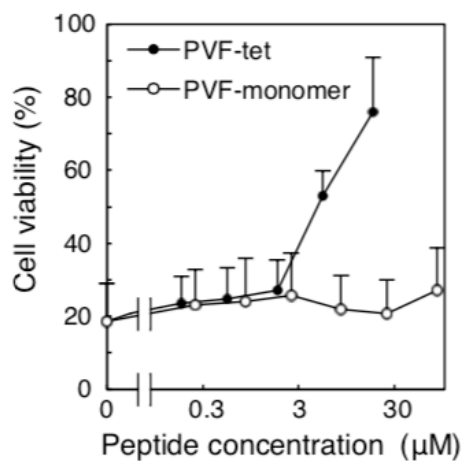
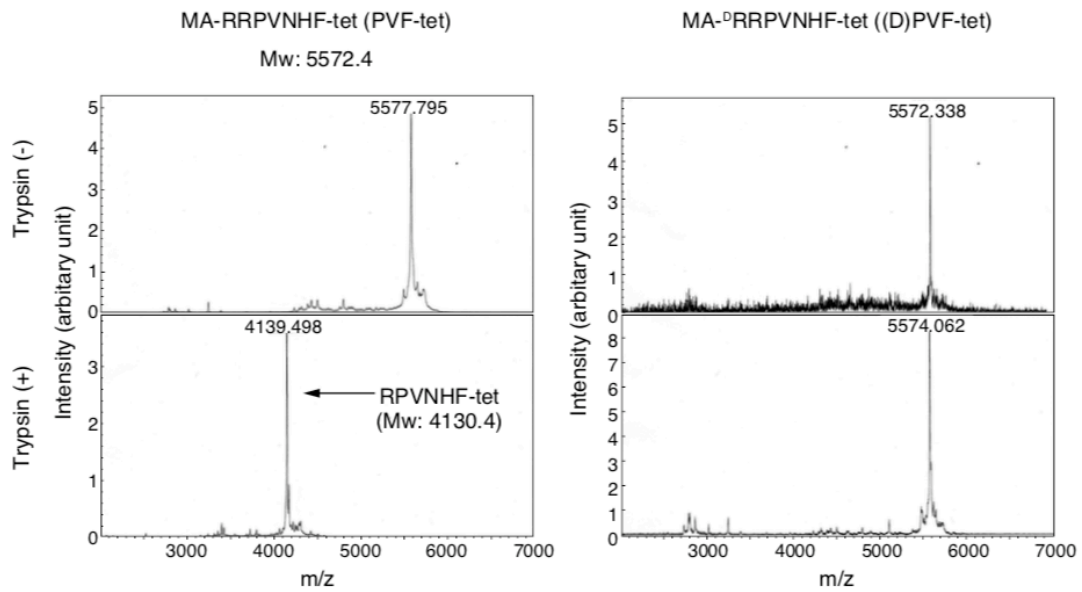


図 6. PVF-tet はクラスター効果に基づいて抗 IAV 活性を示す

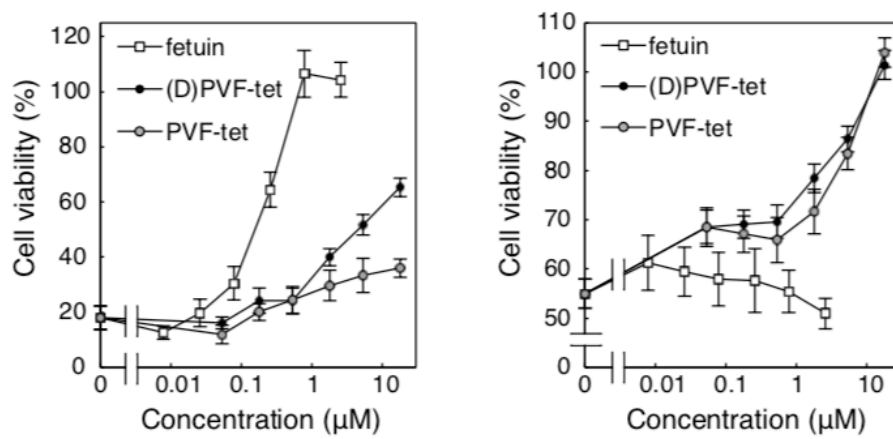
(A) 野生型 HA に対する PVF-tet あるいは PVF-monomer の相互作用カイネティクスを Biacore T-100 システムにより解析した。

(B) 単層 MDCK 細胞を各濃度のペプチド存在下において 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 24 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

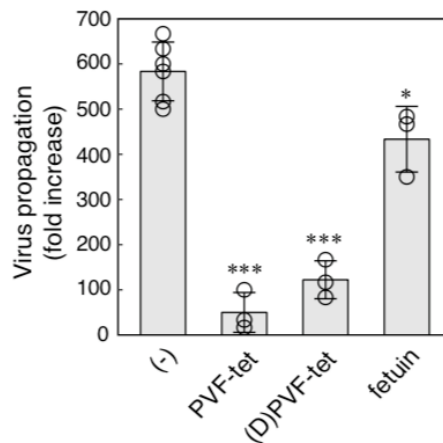
7A



7B



7C



## 図 7. (D)PVF-tet の開発ならびにその抗 IAV 活性の解析

**(A)** 1 µg/ml のトリプシン存在下、非存在下で 0.1 µg の PVF-tet あるいは(D)PVF-tet を 37°C で 24 時間インキュベートした後、MALDI-TOF/MS により各ペプチドの質量分析を行った。

**(B)** (左図) 単層 MDCK 細胞をトリプシン含有無血清培地中で各濃度の化合物存在下において 0.001 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 48 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

(右図) 単層 MDCK 細胞を各濃度の化合物存在下において 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 24 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

**(C)** 単層 MDCK 細胞を各濃度の化合物存在下において 0.2 MOI (60,000 pfu/ml) の IAV PR8 株に感染させた。感染 16 時間後、培養上清を回収し、プラークアッセイにより IAV 力価を定量した。各定量値について IAV 初期力価 (60,000 pfu/ml) に対する増殖比 fold increase を算出した。グラフは独立した 3-6 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示しており、ドットは各回の実験値を表している。\*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001 (compared with no compound treatment by ANOVA followed by one-sided Dunnett's test).

## 第3章 PVF-tet の抗 IAV メカニズムの解明

### 3-1 本章の概要

これまでの解析から、PVF-tet が IAV の細胞内侵入阻害とは異なるメカニズムによって抗 IAV 活性を示している可能性が示唆された。感染初期、すなわち IAV が細胞内に侵入した直後に、HA はその膜融合活性によって IAV 膜と宿主細胞膜を融合させることにより、細胞質中へとゲノム RNA 複合体を放出させる<sup>10</sup>。また感染後期（侵入 6 時間以降）には、感染細胞内で新生 HA が合成され、細胞膜まで輸送されたのち、子孫 IAV に取り込まれる。したがって、PVF-tet の抗 IAV メカニズムが IAV の細胞内侵入阻害に依らない場合には、その作用点を時間的に切り分けて解析する必要がある。そこで Single-cycle infection を IAV ライフサイクルのモデルとして、前述の感染初期ならびに感染後期のイベントに対する PVF-tet の効果を解析し、PVF-tet の抗 IAV メカニズムの解明を試みた。

### 3-2 実験方法

#### 3-2-1 実験試薬

- 抗体

マウス抗 HA 抗体 (clone C102)	(Genetex)
ウサギ抗 HA 抗体	(Genetex)
マウス抗 NA 抗体 (clone GT288)	(Genetex)
ウサギ抗 M2 抗体	(Genetex)
マウス抗 NP 抗体 (clone HT103)	(Kerafast)
マウス抗 His-tag 抗体 (clone 9c11)	(Wako)
ウサギ抗 FITC 抗体	(Molecular Probes)
ウサギ抗 $\beta$ -actin 抗体	(MBL International)
HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体	(Cell Signaling Technology)
HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	(Cell Signaling Technology)
Alexa Fluor488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa Fluor546 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa Fluor488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa Fluor546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)

- IAV 感染実験

- 2-2-1. 細胞培養、IAV 感染実験に準ずる。

- 免疫蛍光染色法



13 mm 丸カバーガラス	(松浪硝子工業)
Bafilomycin A1	(Cayman Chemicals)
Paraformaldehyde (PFA)	(Wako)
HEPES	(Wako)
塩化カルシウム	(Wako)
塩化マグネシウム	(Wako)
Triton X-100	(Wako)
ウシ血清アルブミン (フラクション V)	(Wako)
DAPI	(同仁化学研究所)
Glycerol	(Wako)
Alexa594 標識デキストラン	(ThermoFischer Scientific)
・ <b>ウェスタンブロット法</b>	
NP-40	(Sigma-Aldrich)
Sodium Deoxycholate	(Wako)
SDS	(Wako)
Dithiothreitol (DTT)	(Wako)
Bromo-phenol blue (BPB)	(Wako)
Acrylamide-bis	(Wako)
Methylene-bis-acrylamide	(Wako)
Glycine	(Wako)
Methanol	(Wako)
ECL plus	(PerkinElmer)
Immunostar LD	(Sigma-Aldrich)
・ <b>固相结合実験</b>	
ニワトリ赤血球	(日本バイオテスト)
Biotin-Sulfo-Osu	(同仁化学研究所)
Sodium Bicarbonate	(Wako)
スクロース	(Wako)
Leupeptin	(Wako)
fetuin	(Sigma-Aldrich)
asialofetuin	(Sigma-Aldrich)

### 3-2-2 IAV の細胞内侵入の定量解析

24 well プレーートの各 well に沈めた 13 mm 丸カバーガラス上に播種した単層 MDCK

細胞を用いた。vehicle、PVF-tet (20  $\mu$ M)あるいはBafilomycin A1 (100 nM) を含む培養培地を単層 MDCK 細胞に添加し、添加 30 分後に 10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させた。感染 3 時間後、D-PBS により 2 回の洗浄を行い、次いで PFA 固定液 (3.75% PFA, 100 mM HEPES pH7.2, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 9 mM CaCl<sub>2</sub>を含む) により室温で 20 分間の固定反応を行った。PBS により固定液を洗浄したのち、0.3% Triton X-100/PBS により室温で 10 分間の膜透過処理を行い、次いで 2% BSA/PBS により室温で 30 分間のブロッキング反応を行った。ブロッキング後、抗 NP 抗体を室温で 1 時間反応させ、次いで PBS による洗浄後に Alexa Fluor 標識抗マウス IgG 抗体 (希釈率 1:2000) を室温で 1 時間反応させ、蛍光標識を行った。この際、1  $\mu$ g/ml DAPI を同時に反応させ、核染色を行った。PBS による洗浄後、90% glycerol/PBS を封入剤として、スライドガラス上にカバーガラスの細胞面の封入を行った。各サンプルの蛍光画像は Zeiss 製 LSM710 共焦点レーザー顕微鏡を用いてランダムに複数の視野を撮像し、NP 発現陽性細胞を感染細胞としてその割合を計数した。

### 3-2-3 IAV 感染タイムコースにおける PVF-tet の作用点の解析

96 well プレートに播種した単層 MDCK 細胞を用いた。10 MOI の IAV PR8 株を氷冷下の培養培地中で単層 MDCK 細胞と 45 分間反応させ、感染の同期を行った。D-PBS による 2 回の洗浄後に 37°C の培養培地を添加し、この添加時を基準として 0、1、5、9 時間の時点で vehicle、PVF-tet (20  $\mu$ M)あるいは Bafilomycin A1 (100 nM) を含む培養培地をさらに添加して 37°C CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養を行った。各化合物の濃度は最終濃度を示している。感染 24 時間後、D-PBS により 2 度の洗浄を行い、死細胞を除去したのち、Cell Counting Kit-8 により細胞生存率を計測した。

### 3-2-4 ウェスタンブロット法による新生 IAV タンパク質の半定量解析

**サンプルの調製** 24 well プレートに播種した単層 MDCK 細胞を用いた。10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させ、感染 1 時間後に洗浄後、vehicle あるいは PVF-tet (20  $\mu$ M)を含む培養培地を添加して培養を行った。感染後 3、6、9、16 時間の各時点で D-PBS による洗浄後に 50  $\mu$ l の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.2% SDS, Complete protease inhibitor cocktail を含む) で溶解し、Cell lysate を調製した。回収した Cell lysate は超音波処理によりゲノム DNA を剪断したのち、BCA 法により総タンパク質量の定量を行うと共に、サンプルの 1/4 vol.の 5x Laemmli Sample Buffer (250 mM Tris-HCl pH6.8, 500 mM DTT, 10% SDS, 0.5% BPB, 50% glycerol を含む) を添加して 95 °C、5 分間の加熱変性を行った。

**SDS-PAGE ならびにウェスタンブロット法** 上述の各タンパク質サンプルを電気泳

動装置 NA-1020 (NIHON EIDO.Corp) を用いて、標準的な SDS-PAGE により定法にしたがって分離・展開した。なお、分離ゲルのアクリルアミド (アクリルアミド : メチレンビスアクリルアミド = 30 : 0.8) の濃度はタンパク質の分子量に基づいて 6% から 16% の間で変動させた。泳動後、ゲルを 10 分以上転写バッファー (100 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol を含む) 中で震盪させ平衡化を行ったのち、セミドライ式転写装置 AE-6677 (ATTO) により PVDF 膜への転写を行った。なお、HA の転写には Methanol を 10% とし、さらに終濃度 0.01% の SDS を添加した転写バッファーを用いた。転写後、5% BSA/TBS-T (0.1% Tween-20 を含む TBS) により室温で 1 時間のブロッキングを行い、次いで各タンパク質に対する 1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。TBS-T による 3 回の洗浄後、HRP 標識 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、再度の洗浄後に化学発光試薬により検出反応を行った。 $\beta$ -actin の検出には ECL plus (Perkin Elmer) を、その他のタンパク質の検出には Immunostar LD (Wako) を用いた。化学発光の検出は LAS500 imager (GE Healthcare Sciences) により行った。

### 3-2-5 免疫蛍光染色法による新生 IAV タンパク質ならびにペプチドの局在解析

#### 細胞内の新生 IAV タンパク質の局在解析

24 well プレートの各 well に

沈めた 13 mm 丸カバーガラス上に播種した単層 MDCK 細胞を用いた。10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させ、感染 1 時間後に洗浄後、vehicle あるいは PVF-tet (20  $\mu$ M) を含む培養培地を添加して培養を行った。感染 16 時間後に D-PBS により 2 回の洗浄を行ったのち、PFA 固定液により室温で 20 分間の固定反応を行い、以降の操作は 3-2-2 と同様の手順で行った。また、ペプチドの局在解析の際には、FITC 標識ペプチドを用いて抗 FITC 抗体を 1 次抗体として検出した。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Zeiss) を用いて取得した。

#### 細胞膜表面 HA の検出

細胞膜表面の HA を選択的に標識する際には、感染 16 時間後に D-PBS により 2 回の洗浄を行ったのち、氷冷下でマウス抗 HA 抗体を反応させた。反応後、PFA 固定液により室温で 20 分間の固定反応を行い、以降の操作は 3-2-2 と同様の手順で行った。細胞内の HA はウサギ抗 HA 抗体により標識し、蛍光標識抗マウス IgG 抗体ならびに抗ウサギ IgG 抗体により、細胞膜表面の HA と細胞内の HA を検出した。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Zeiss) を用いて取得し、培養底面から細胞膜上方へと 0.6  $\mu$ m 間隔で連続撮像した画像を元に、画像解析ソフトウェア ZEN を用いて z-スタック画像を構築した。

#### ペプチドの細胞内局在解析

ペプチドのエンドサイトーシスの解析の際には、MDCK 細胞を 250  $\mu$ g/ml の Alexa594 標識デキストランを含む培養培地中で 4°C あるいは 37°C において 1 時間培養し、その後 PFA 固定液により固定し、観察を行った。

蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Zeiss) を用いて取得した。

### 3-2-6 IAV 粒子ならびに開裂 HA に対する PVF-tet の結合活性の解析

#### ビオチン標識 IAV の調製

#### 2-2-2. IAV の調製

手順でストックした感染培養上清を遠心操作 (4°C, 18,000 g, 30 分間) により不溶物の除去を行い、培養上清 40 ml あたり 520  $\mu$ l の 20% ニワトリ赤血球を添加し、4°C で 1 時間の回転混和を行った。遠心操作 (10°C, 1,250 g, 5 分間) により IAV-赤血球複合体を沈殿させたのち、沈殿を冷 PBS により懸濁し、再度遠心操作 (10°C, 1,250 g, 5 分間) を行った。遠心後、沈殿を PBS により懸濁し、37°C にて 1 時間の回転混和を行うことで、赤血球から IAV を溶出させた。IAV を 30% スクロースをベッドとして超遠心操作 (4°C, 100,000 g, 90 分間) にかけて、沈殿を精製 IAV として PBS に懸濁した。精製 IAV (HA 5  $\mu$ g 相当) を 100 mM Sodium Bicarbonate 中で 2  $\mu$ g の Biotin-sulfo-Osu と室温で 1 時間反応させた。反応後、30% スクロースをベッドとして超遠心操作 (4°C, 100,000 g, 90 分間) を行い、未反応標識試薬の除去を行った。ビオチン標識 IAV の定量はニワトリ赤血球を用いた赤血球凝集試験により行った。赤血球凝集試験は IAV 溶液の 2 段階希釈系列標品と等量の 0.5% ニワトリ赤血球を U 型底 96 well プレーットの well 中で反応させ、IAV の HA による赤血球凝集反応を目視により判別する手法である。本試験により赤血球凝集反応を起こす最大希釈倍率 (=それ以上の希釈倍率では赤血球凝集反応を起こさない) を求め、その希釈溶液中に含まれる IAV 量を赤血球凝集反応に十分な単位 (1 HA unit) と定義した。

#### 開裂 HA 標品の調製

可溶化 HA 標品を終濃度 10  $\mu$ g/ml のトリプシンと PBS 中で混合し、37°C で 30 分間反応させたのち終濃度 1 mM の Leupeptin を添加することにより反応を停止させた。HA の開裂効率は SDS-PAGE ならびに CBB 染色により確認した。

#### 結合試験

PVF-tet、fetuin ならびに asialofetuin を各 10 $\mu$ g/ml の濃度で固相化し、2-2-7 の手順に準じて結合試験を行った。開裂 HA ならびに未開裂 HA については抗 His-tag 抗体と HRP 標識 2 次抗体により検出した。またビオチン標識 IAV については全てのバッファー中に 100  $\mu$ M の Zanamivir を添加して実験を行い、検出は HRP 標識ストレプトアビジンにより行った。

### 3-2-7 PVF-tet の HA 架橋活性の解析

組換え HA 標品 (2  $\mu$ M) を各濃度の PVF-tet あるいは PVF-monomer と PBS 中で混合し、4°C で 1 時間の結合反応を行った。その後、終濃度 0.5% の PFA を添加し、室温で 10 分間の固定反応を行ったのち、1/4 vol. の 5x Laemmli Sample Buffer を添加し、さらに室温で 10 分間の変性反応を行った。各サンプルは、泳動バッファー (0.1% SDS,

40 mM Tris-Acetate pH7.4, 2 mM EDTA) 中で 2% acrylamide (アクリルアミド:メチレンビスアクリルアミド = 20:1) と 1% agarose の混合ゲル電気泳動により分離したのち、銀染色により検出を行った。各レーンのバンドパターンは ImageJ により解析を行った。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 PVF-tet は感染後期に作用点を有する

IAV タンパク質の一つである NP は、IAV のゲノム RNA が核内移行したのち即座に合成される early protein として知られている<sup>2</sup>。そこで IAV 感染後の細胞内 NP を免疫蛍光染色により解析し、IAV の細胞内侵入過程 (IAV の細胞への結合と取込み・宿主細胞膜との膜融合・ゲノム RNA の細胞質放出) を評価する指標とした。感染 3 時間後においては、約 50% の細胞で NP の発現が観察される一方で、Bafilomycin A1 (Baf A1) 存在下では NP 陽性細胞率は著減した (図 8A)。Baf A1 はエンドソームの酸性化を阻害することにより IAV の膜融合を阻害することが既に報告されている<sup>27</sup>。興味深いことに、PVF-tet 存在下においても約 50% の細胞が NP 陽性であること、すなわち PVF-tet が IAV の細胞内侵入を全く阻害していないことを見出した (図 8A)。また、IAV 感染時と同時、あるいは 1、5、9 時間後に化合物処理を行った場合、感染初期を標的とする Baf A1 の抗 IAV 活性は感染 5 時間後以降に著減する一方、PVF-tet は感染 9 時間後に処理した場合でも抗 IAV 活性を示すことが明らかとなった (図 8B)。これらの結果は、IAV ライフサイクルにおける PVF-tet の作用点は、感染初期よりもむしろ感染後期にあることを示している。

#### 3-3-2 PVF-tet は感染後期に新生される HA を液胞状オルガネラへと隔離する

そこで次に、感染後期において新生される各 IAV タンパク質の発現タイムコースを解析した。その結果、通常 HA は感染 9 時間を発現ピークとしたのち、子孫 IAV の産生に伴って感染 16 時間後には減少が観察されるが、PVF-tet 存在下では感染 16 時間後においてむしろ細胞内に蓄積していることを見出した (図 9A)。次に、この蓄積の様態を明らかにするために免疫蛍光染色による局在解析を行ったところ、新生 HA は通常、細胞内輸送小胞への局在が観察されるが、PVF-tet 存在下では核辺縁に位置する液胞状オルガネラへと異常局在化していることが明らかとなった (図 9B)。また、FITC 標識 PVF-tet を用いて、同じ条件下で HA との共局在解析を行ったところ、PVF-tet と HA は液胞状オルガネラにおいて共局在することを見出した (図 9C)。また PVF-tet は非感染細胞の細胞内にも puncta 状に検出されることから、それ自身が膜透過性を持つことが明らかとなった。他の IAV タンパク質である NA、M2、NP については、PVF-tet 存在下においても細胞内蓄積ならびに異常局在化

を起こさないことから、本現象は PVF-tet による新生 HA の選択的隔離と捉えられる。

本研究で用いた2種の抗HA抗体はいずれも固定処理ならびに膜透過処理後の細胞膜表面の新生 HA を検出することができなかった。一方で、固定処理前に抗 HA 抗体を氷冷下で反応させ、次いで固定処理を行った場合には、細胞膜表面の新生 HA を選択的に検出することができた。そこでこの性質を利用して、細胞膜表面の新生 HA と細胞内の新生 HA を2種の抗 HA 抗体により識別することに成功した (図 9D, 左)。この手法により PVF-tet 存在下の感染細胞を染色したところ、新生 HA の大部分を細胞内の液胞状オルガネラに隔離している細胞では、細胞膜表面の新生 HA はほとんど検出されなかった (図 9D, 右)。すなわち PVF-tet は感染後期に新生される HA を液胞状オルガネラへと隔離することにより、その細胞膜表面への新生 HA の輸送供給を阻害していることが示唆された。

### 3-3-3 PVF-tet の HA 結合親和性は HA の開裂状態に依存する

PVF-tet は組換え HA に対して優れた結合親和性と競合阻害活性を示すにも関わらず、IAV の細胞内侵入を阻害しない。そこで、実際に組換え HA ならびに精製 IAV に対する PVF-tet の結合活性を比較評価したところ、組換え HA に対しては fetuin と同程度の結合活性を示す一方で、精製 IAV に対しては fetuin と比較してほとんど結合していないことを見出した (図 10A)。ここで IAV 表面の HA と組換え HA との差異に着目すると、前者は細胞外トリプシンによって開裂している一方で、後者は未開裂状態である。そこで、トリプシンにより開裂させた組換え HA に対する PVF-tet の結合活性を評価したところ、PVF-tet の HA に対する結合親和性は HA の開裂によって著しく低下することが明らかとなった (図 10B)。

### 3-3-4 PVF-tet はエンドサイトーシスにより細胞内へとターゲティングする

PVF-tet はそれ自身が膜透過性を持ち、IAV 感染細胞内の新生 HA を標的として結合する。そこで次に、PVF-tet の細胞内移行メカニズムについて解析を行った。FITC 標識 PVF-tet をエンドサイトーシスのマーカーである蛍光標識デキストランと共に、4°C あるいは 37°C で細胞と反応させたところ、37°C では両者が細胞内の小胞において共局在を示すこと、また 4°C においては両者の取込みが阻害され、PVF-tet は主に細胞膜表面に局在することを見出した (図 11A)。すなわち、PVF-tet は細胞膜内外の拡散ではなく、細胞のエンドサイトーシス機構により取込まれていることが示された。また、PVF-tet 以外のペプチドについても蛍光標識体を合成し、その細胞内取込みを解析したところ、興味深いことに PVD-tet においてのみ、細胞内への取込みが観察されなかったことから、これらのペプチドの細胞内移行活性はその配列に強く依存することが示唆された (図 11B)。

### 3-3-5 PVF-tet は HA の分子間架橋を起こす

PVF-tet は4価構造を持つことから、1分子の HA 三量体との1対1の相互作用のみならず、一度に複数の HA 三量体と結合する可能性が推測された。そこで試験管内において

PVF-tet と組換え HA 標品を混合したところ、PVF-tet 存在下では確かに高分子量複合体が検出された (図 12)。また、PVF-monomer については、モル比で HA の 40 倍量を添加した場合でもこのような高分子量複合体は検出されなかった。このことは、PVF-tet が複数の HA 三量体間をも認識し、架橋結合することを示している。

### 3-4 考察

本章では、PVF-tet の作用点が感染初期における IAV の細胞内侵入阻害よりも、むしろ感染後期にあることを明らかにした。PVF-tet は感染後期の新生 HA を標的として液胞状オルガネラへと隔離することにより、抗 IAV 活性を示す。液胞状オルガネラによる新生 HA の隔離に伴って、細胞膜表面において検出される新生 HA の量が著しく減少することから、PVF-tet は新生 HA に結合し、その細胞内輸送に影響を及ぼしていることが示唆される。新生 HA は小胞体 (ER)、ゴルジ体を細胞膜表面まで輸送される過程で、種々の小胞輸送タンパク質と相互作用することが知られている<sup>28,29</sup>。PVF-tet の有する架橋活性を考慮すると、細胞内の新生 HA についても同様に架橋・凝集を引き起こし、それら小胞輸送タンパク質との相互作用が阻害されている可能性が考えられる。HA の細胞内輸送に関するごく初期の研究では、細胞質ドメインにランダムな変異が導入された一連の変異型 HA の内の 1 種として、ゴルジ体において凝集し、液胞状の構造体へと異常局在化する変異体が見出されている<sup>30</sup>。本変異体は、細胞膜表面への輸送効率が極めて低く、本研究で見出した現象とよく一致する。一方で、当該先行研究以降に本変異型 HA ならびに液胞状構造体についての報告例は存在せず、その詳細な性状についてはさらなる解析が必要である

PVF-tet が親 IAV の HA ではなく新生 HA を選択的に標的とするメカニズムは、PVF-tet の HA 結合親和性が HA の開裂状態に強く依存することをふまえると一定の説明が可能である。通常、新生 HA は細胞膜表面まで輸送されたのち、細胞外のトリプシン様プロテアーゼによって開裂するため、PVF-tet は IAV 膜上の HA に対しては十分に結合することができない。一方、輸送途中の新生 HA は組換え HA と同様に未開裂状態であるため、PVF-tet は親 IAV の HA よりも強く新生 HA に結合しうるということが考えられる。

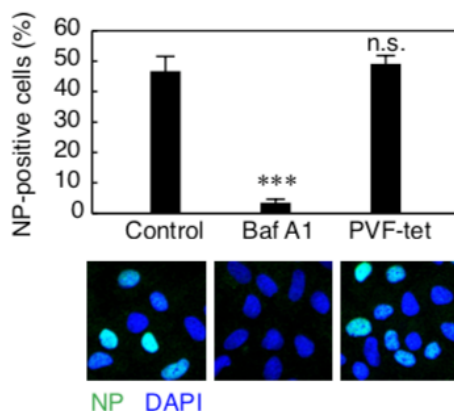
このような PVF-tet の抗 IAV メカニズムをふまえると、同定した 5 種類のペプチドについて、構造活性相関を考えることができる。細胞内の新生 HA と結合するためにはペプチド自体が細胞内へとターゲティングする必要がある。ヒト免疫不全ウイルス 1 (HIV-1)由来の TAT ペプチドに代表される Arg リッチな塩基性ペプチドは、細胞膜の負の電荷との電気的な相互作用により細胞膜表面に濃縮され、エンドサイトーシスにより高い効率で細胞内に取込まれることが報告されている<sup>31,32</sup>。したがってペプチドの持つ正の表面電荷は細胞内移行活性を決定する重要なファクターであり、本研究で同定したペプチドについてもモチーフ中

に 2 残基の Arg を 4 価で有することから、同様の機構に基づいて細胞内に取込まれることが推測された。同定したペプチドの中で唯一、モチーフ中の C 末端側に酸性アミノ酸である Asp を持つ PVD-tet は、細胞内移行活性を欠く。また、同ポジションに Asn を持つ PVN-tet は細胞内移行活性を有し、また抗 IAV 活性も示すことから、PVD-tet の持つ Asp 側鎖の負電荷がその細胞内移行活性ならびに抗 IAV 活性の障壁となっていると考えられる。

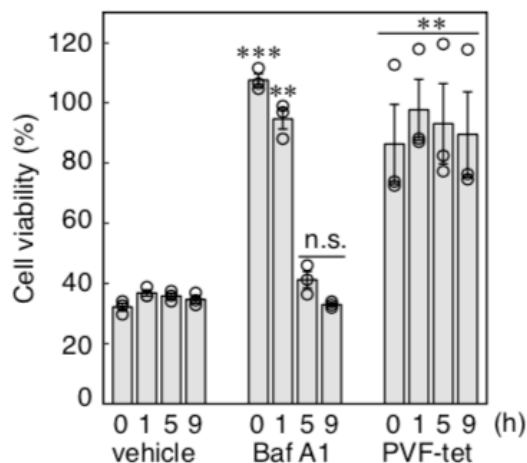


### 3-5 図表

#### 8A



#### 8B



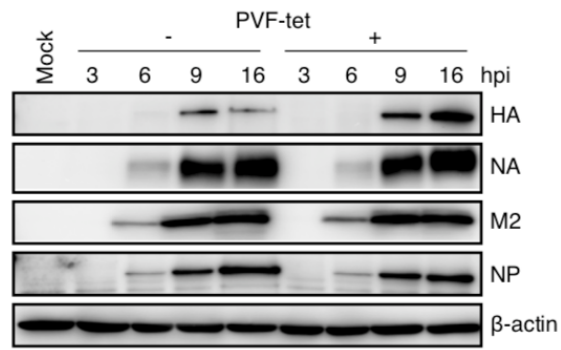
#### 図 8. PVF-tet は IAV の細胞内侵入を阻害しない

**(A)** 単層 MDCK 細胞を Bafilomycin A1 (Baf A1, 100 nM)あるいは PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下において 2 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 3 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、細胞内の IAV タンパク質 NP を免疫蛍光染色法により検出した。ランダムに撮像した各視野で最低 80 個以上の細胞について計数して NP 陽性細胞率を算出した。グラフは 4 視野の平均を、エラーバーはその標準偏差 (S.D.) を示している\*\*\* $P < 0.001$  (compared with no compound treatment by ANOVA followed by one-sided Dunnett's test). n.s., not significant.

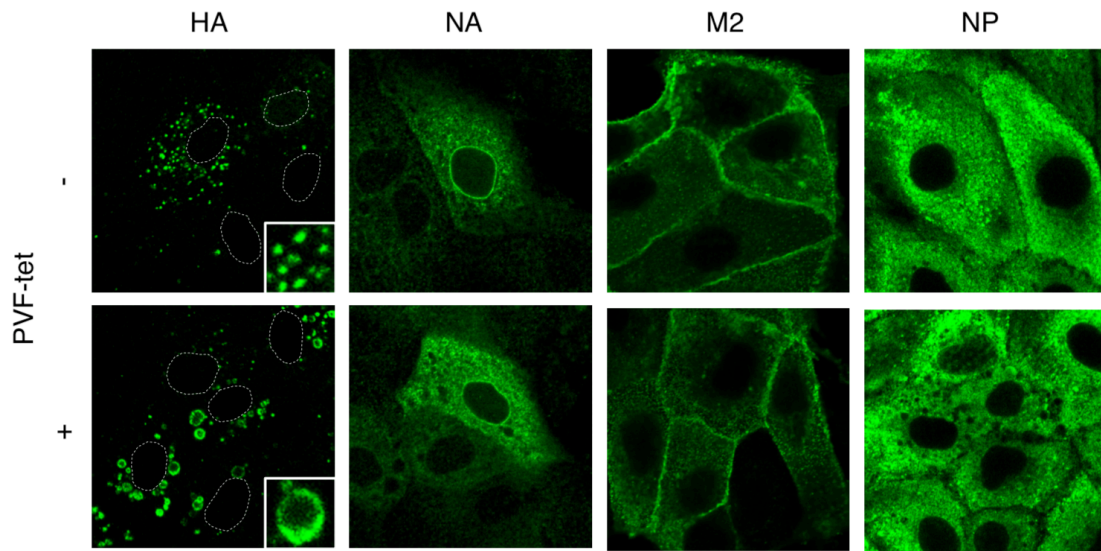
**(B)** IAV の感染開始を同期させるために、単層 MDCK 細胞を氷冷下で 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、洗浄時を基準とする各時間点において vehicle、Baf A1 (100 nM)あるいは PVF-tet (20  $\mu$ M)を添加し、37°C CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養を行った。感染 24 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.)

を示しており、ドットは各回の実験値を表している。**\*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001** (compared with vehicle treatment by ANOVA followed by one-sided Dunnett's test). n.s., not significant.

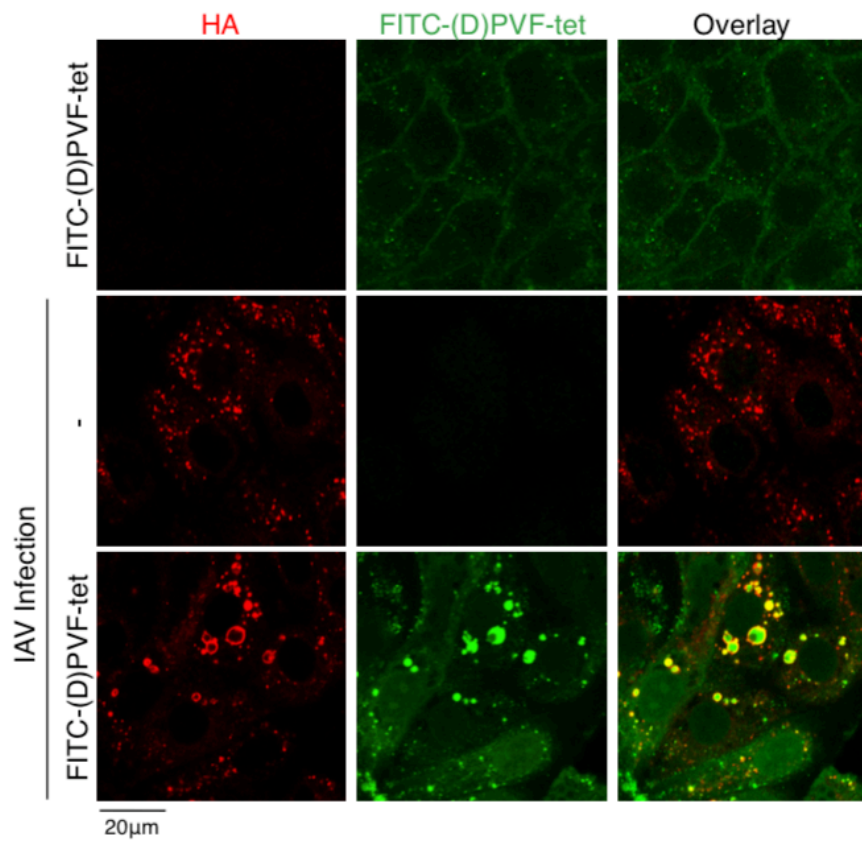
9A



9B



9C



9D

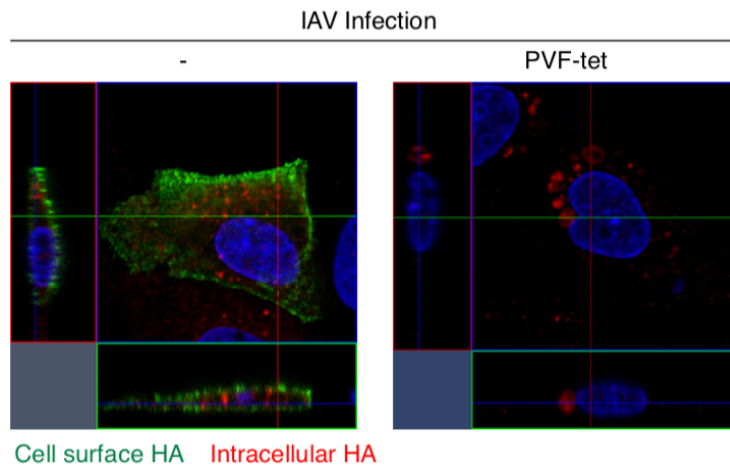


図 9. PVF-tet は感染後期に新生される HA を液胞状オルガネラへと隔離する

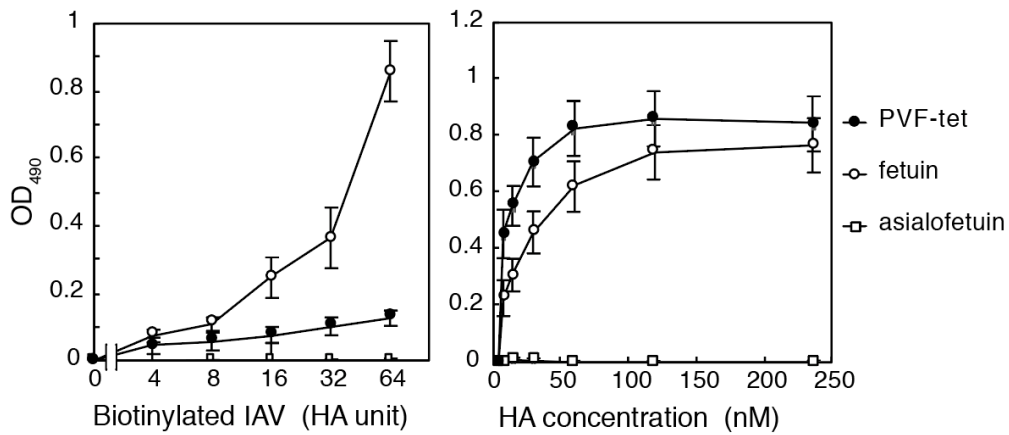
(A) 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20 μM)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染後の各時間点で、Lysis buffer により細胞を溶解・回収し、各タンパク質の発現をウェスタンブロット法により解析した。

**(B)** 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、各 IAV タンパク質の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。図中の点線は核を示している。

**(C)** 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、FITC-(D)PVF-tet (2.5  $\mu$ M) 存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、HA ならびに(D)PVF-tet の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。

**(D)** 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、氷冷下でマウス抗 HA 抗体 (C102) により細胞膜表面の HA を標識したのち、PFA 固定を行った。次いで膜透過処理ののち、ウサギ抗 HA 抗体により細胞内の HA を標識し、各抗 HA 抗体を Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体ならびに Alexa546 標識抗ウサギ IgG 抗体により検出した。各画像は共焦点レーザー顕微鏡により撮像した z-stack 画像の細胞上面像ならびに細胞断面像を示している。

## 10A



## 10B

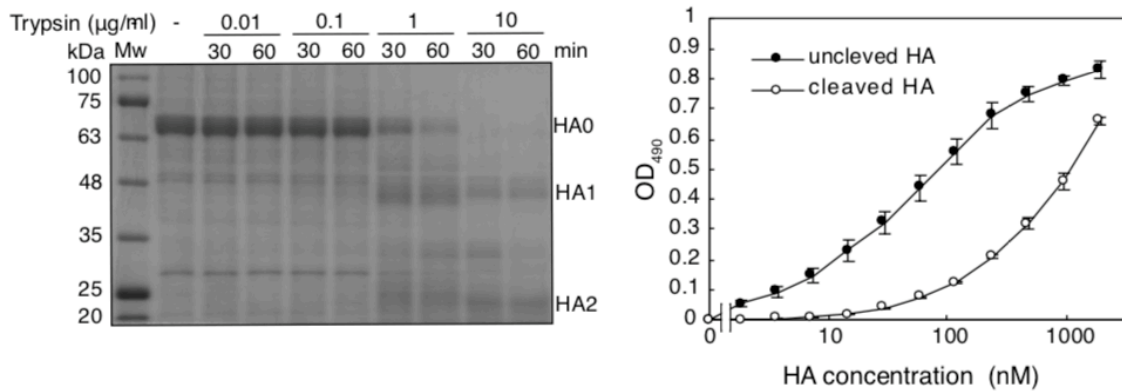
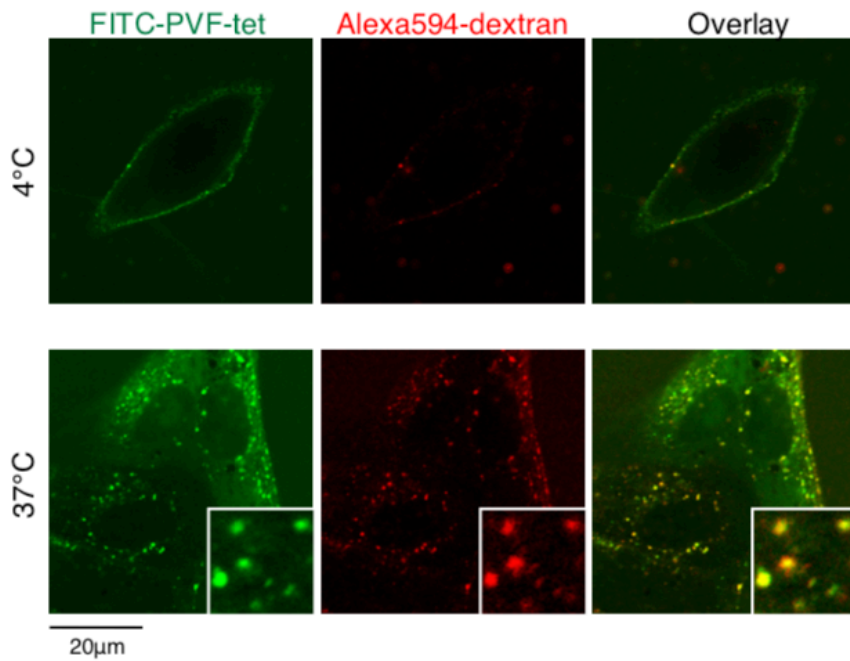


図 10. PVF-tet の HA 結合親和性は HA の開裂状態に依存する

(A) ELISA プレートに固相化した PVF-tet (2 μM)、fetuin (0.3 μM)ならびに asialofetuin (0.3 μM)に対する各量のビオチン標識 IAV の結合を、HRP 標識ストレプトアビジンを用いて検出した (左図)。また、同様に固相化した各化合物に対する各濃度の組換え HA の結合を、抗 His-tag 抗体ならびに HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて検出した (右図)。各グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

(B) 組換え HA (6 μM)を各濃度のトリプシンと 37°C で反応させ、各時間点における HA の開裂を SDS-PAGE により解析した。10 μg/ml のトリプシンで 30 分間処理することにより HA0 は HA1 と HA2 に完全に開裂する (左図)。ELISA プレートに固相化した PVF-tet (2 μM)、fetuin (0.3 μM)ならびに asialofetuin (0.3 μM)に対する各濃度の開裂 HA ならびに非開裂 HA の結合を、抗 His-tag 抗体ならびに HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて検出した (右図)。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

11A



11B

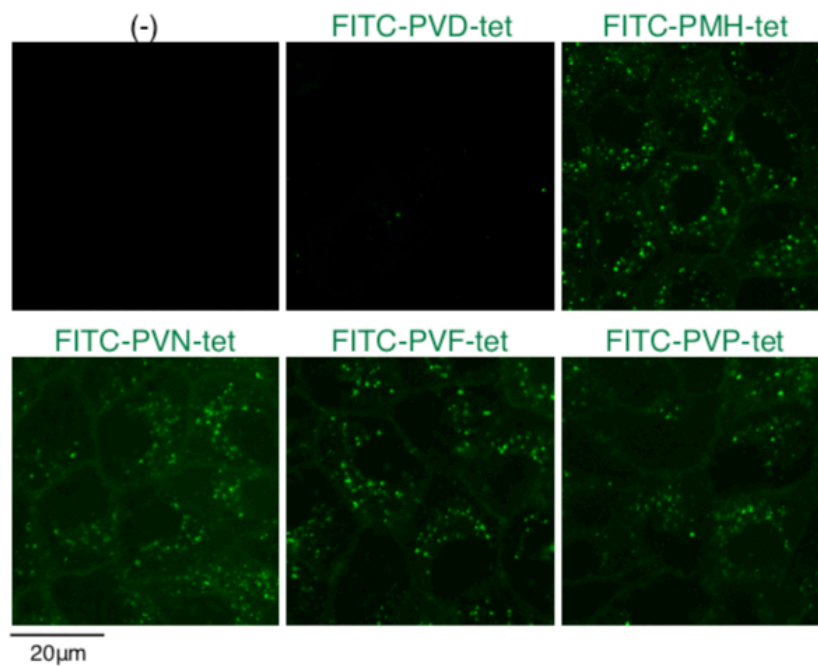


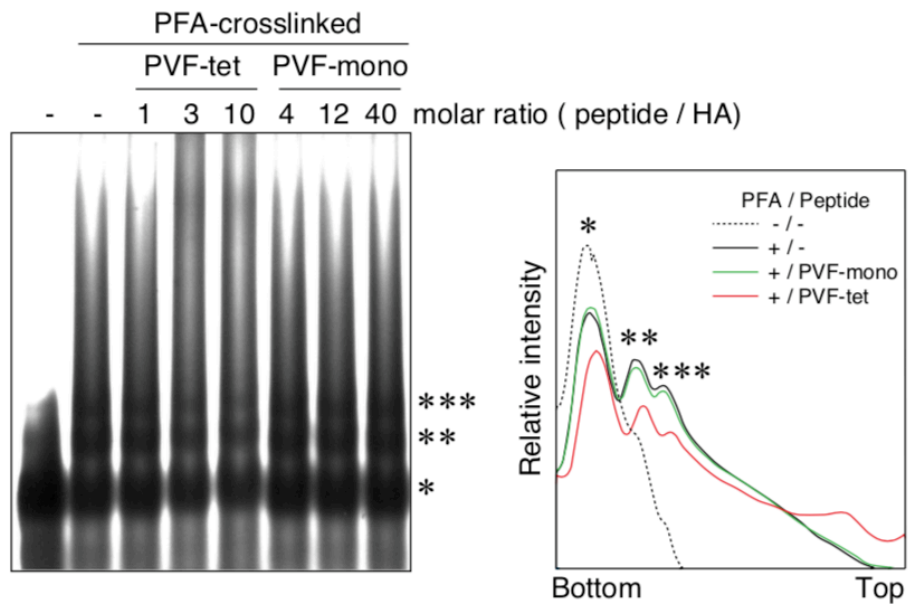
図 11. 4 価型ペプチドの細胞内移行活性の解析

(A) 単層 MDCK 細胞を FITC-PVF-tet (2.5 μM)ならびに Alexa594-dextran (250 μg/ml) 存在下で、4°C あるいは 37°C において培養を行った。培養 1 時間後、D-PBS による洗浄操作のち、PFA 固定を行い、PVF-tet ならびに dextran の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析

した。

**(B)** 単層 MDCK 細胞を各 FITC 標識ペプチド (2.5  $\mu$ M)存在下で培養を行った。培養 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、各ペプチドの細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。





**図 12. PVF-tet は HA の分子間架橋を起こす**

組換え HA (2  $\mu\text{M}$ ) を各濃度の PVF-tet あるいは PVF-monomer と混合して結合反応を行ったのち、PFA によりクロスリンク反応を行った。各サンプルを 2% acrylamide/1% agarose 混合ゲル電気泳動により展開し、銀染色により検出した。各レーンのバンドパターンは ImageJ により解析した。図中の\*、\*\*、\*\*\*はそれぞれ HA monomer、dimer、trimer を示している。

## 第4章 HA を隔離する液胞状オルガネラの性状解析

### 4-1 本章の概要

これまでの一連の解析において、PVF-tet が新生 HA を液胞状オルガネラへと隔離することで抗 IAV 活性を示すことを明らかにした。一方で興味深いことに、PVF-tet 非存在下の IAV 感染細胞内においても、少量ではあるが HA が液胞状オルガネラへと局在することを見出している。すなわちこの現象は PVF-tet に完全に依存した現象ではなく、細胞が元来保有している新規防御機構であり、PVF-tet は本機構を増強させていると考えられる。したがって、液胞状オルガネラの形成を司る分子機構を解明することができれば、これまででない新しいクラスの抗 IAV 薬の創出へと発展することが期待される。そこで本章では分子機構の解明に先駆けて、液胞状オルガネラの詳細な性状解析を行った。

### 4-2 実験方法

#### 4-2-1 実験試薬

##### ・ 抗体ならびに細胞染色試薬

マウス抗 HA 抗体 (clone C102)	(Genetex)
ウサギ抗 LAMP1 抗体	(Abcam)
ウサギ抗 EEA1 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
ウサギ抗 Calnexin 抗体	(Santa Cruz)
マウス抗 p230 抗体	(BD Biosciences)
マウス抗 HSP47 抗体 (clone M16.10A1)	(BD Biosciences)
マウス抗 GS28 抗体 (clone 1/GS28)	(BD Biosciences)
ウサギ抗 $\beta$ -actin 抗体	(MBL International)
HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体	(Cell Signaling Technology)
HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	(Cell Signaling Technology)
Alexa Fluor488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa Fluor546 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa Fluor488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa Fluor546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Lysotracker DND-99	(Thermo Fischer Scientific)
Filipin	(Cayman Chemicals)
BODIPY-TR-C5-ceramide	(Thermo Fischer Scientific)

- ・ **IAV 感染実験**
  - 2-2-1. 細胞培養、IAV 感染実験に準ずる。
 

Leupeptin	(Wako)
Pepstatin A	(ペプチド研究所)
E-64	(ペプチド研究所)
  - ・ **ウェスタンブロット法**
    - 3-2-1 ウェスタンブロット法に準じる。
  - ・ **免疫蛍光染色法**
    - 2-2-1. 免疫蛍光染色法に準ずる。
- ・ **MDCK 細胞の樹立**

pcDNA3.1 (-)	(ThermoFische Scientific)
pVenus-N1	(Addgene)
KOD FX Neo	(TOYOBO)
BamH I	(TOYOBO)
Bacterial alkaline phosphatase (BAP)	(TOYOBO)
大腸菌 DH5 $\alpha$	(TOYOBO)
Mini prep kit	(日本ジェネティクス)
ScreenFect A plus	(Wako)
G418	(GIBCO)
pSpCas9(BB)-2A-GFP (px458)	(Addgene)
Bbs I	(New England Biolabs)
- ・ **RT-PCR 法**

Sepasol	(Nacalai Tesque)
イソプロパノール	(Wako)
DEPC 処理水	(Nacalai Tesque)
RNase-free DNase	(Promega)
SuperScript III	(Applied Biosystems)
SYBR Green Real-Time PCR Master mix	(Applied Biosystems)
- ・ **電子顕微鏡解析**

Paraformaldehyde	(Wako)
20% Glutalaldehyde	(Wako)
SeaPlaque agarose	(Lonza)
四酸化オスミウム	(TAAB)

プロピレンオキサイド	(Wako)
EPON 812 embedding kit	(TAAB)

#### 4-2-2 免疫蛍光染色法による液胞状オルガネラの性状解析

MDCK 細胞の IAV 感染手順は **3-2-5** に、また免疫蛍光染色法の手順は **3-2-2** に準じて行い、1 次抗体として上述の各種オルガネラマーカーに対する抗体を用いた。Lysotracker を用いた共染色の際には、IAV 感染 15 時間後に終濃度 75 nM の Lysotracker を添加して、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間 0.3% Triton X-100 の代わりに 50 µg/ml ジギトニンを膜透過処理剤として使用した。BODIPY-TR-C5 Ceramide を用いた染色の際には、IAV 感染に先立って細胞を終濃度 75 nM の BODIPY-TR-C5 Ceramide を氷冷下で 30 分間標識したのち D-PBS により洗浄を行い、その後 IAV 感染を行った。Filipin 染色の際には、IAV 感染 16 時間後に 3.75% PFA により室温で 20 分間の固定反応を行ったのち、100 µg/ml の filipin により室温で 1 時間の染色反応を行った。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Zeiss) を用いて取得した。

#### 4-2-3 ウェスタンブロット法による HA 分解の評価

24 well プレートに播種した単層 MDCK 細胞を用いた。10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させ、感染 1 時間後に洗浄後、vehicle あるいは PVF-tet (20 µM) を含む培養培地を添加して培養を行った。感染後 3 時間の時点で、リソソームプロテアーゼ阻害剤 (20 µM Leupeptin, 20 µM Pepstatin A, 20 µM E-64) を添加した。さらに 13 時間の培養後に D-PBS による洗浄を行い、50 µl の Lysis buffer で溶解し、Cell lysate を調製した。その後のサンプル調製法、SDS-PAGE ならびにウェスタンブロット法は **3-2-4** に準じて行い、HA ならびにの β-actin の検出を行った。

#### 4-2-4 遺伝子安定発現 MDCK 細胞の樹立

##### 発現コンストラクトの構築

**2-2-3** において構築した HA 発現用 pBacPAK8 プラスミドを鋳型として、表 1 に示したプライマーセットを用いた PCR により HA の ORF 断片を調製した。また、ABCA3 の ORF 断片については、**4-2-6** に後述する手法により MDCK 細胞由来 cDNA を調製し、これを鋳型として、表 1 に示したプライマーセットを用いた PCR により増幅を行った。Monomeric Venus (mVenus) の ORF 断片については、pVenus-N1 プラスミド (Addgene, #61854) を鋳型として、表 1 に示したプライマーセットを用いた PCR により調製した。PCR 反応は全て KOD FX Neo 酵素を用いた 2 ステップ反応により、製品書に従って行った。これら HA あるいは ABCA3 ならびに mVenus の DNA を、BamHI 処理 (37°C 2 時間) ならびに BAP 処理 (37°C 2 時間) を行った pcDNA3.1(-)ベクターと各 2 : 2 : 1 の量比で混合したのち、

さらに等量の Gibson Assembly 2x master mix と混合し、50 °C で 1 時間のライゲーション反応を行った。反応後、製品書に従って大腸菌 DH5α 株に形質転換操作を行い、アンピシリン含有 LB プレートへの播種後、37°C インキュベーター内で培養を行った。翌日、コロニーをピックしてアンピシリン含有 LB 培地内で震盪培養を 37°C で一晩行い、集菌後に製品書にしたがってプラスミド抽出を行った。コンストラクトの配列は表 1 に示したプライマーを用いたシーケンス解析により確認した。

#### **薬剤耐性を指標とする安定発現 MDCK 細胞のセレクション** 遺伝子導入試薬

ScreenFectA plus を用い、製品書に従って前述の発現コンストラクトを MDCK 細胞へトランスフェクションし、24 well プレートへと播種した。導入 72 時間後、トリプシン-EDTA 処理により細胞を剥離し、遠心操作 (4°C, 180 g, 5 分間) によりトリプシン-EDTA を除去したのち、全細胞を 10 cm dish へと播種して G418 (500 µg/ml) 存在下で 1 週間の培養を行った。G418 耐性細胞をトリプシン-EDTA 処理と遠心操作 (4°C, 180 g, 5 分間) により回収し、FACS AriaII (BD) により mVenus の蛍光を指標として、96 well プレートの各 well に安定発現細胞を 1 細胞ずつ播種後、G418 (500 µg/ml) 存在下で 10 日間の培養を行った。蛍光顕微鏡下での観察により安定的に mVenus を発現するクローンを選択したのち、各クローンにおける目的タンパク質の発現量を Western blot 法により解析し、最も高い発現量を示したクローンを以降の実験に用いた。

### **4-2-5 遺伝子ノックアウト MDCK 細胞の樹立**

**sgRNA 発現コンストラクトの構築** イヌ ABCA3 遺伝子のエクソンを標的とする sgRNA の設計は、CRISPR-direct により提示された一連の配列から、3' 末端側 10 塩基の標的特異性が優れたており (交差配列 20 カ所以下)、かつ PAM 配列上流に制限酵素部位を含むものを選択した。本標的配列を含むオリゴ DNA ならびにその相補オリゴ DNA (表.1) を各等量にて混合後にアニーリング反応を行ったのち、BbsI 処理 (37°C 2 時間) を行った px458 ベクター (Addgene, #48138) <sup>33</sup> とのライゲーション反応 (16 °C で 30 分) を行った。その後、**4-2-3 発現コンストラクトの構築** の手順に従い、sgRNA 発現コンストラクトを調製した。

**ABCA3-KO 細胞の樹立** 遺伝子導入試薬 ScreenFectA plus を用い、製品書に従って sgRNA 発現コンストラクトを MDCK 細胞にトランスフェクションし、6 well プレートへと播種した。遺伝子導入 48 時間後、トリプシン-EDTA 処理と遠心操作 (4°C, 180 g, 5 分間) により回収し、FACS AriaII (BD) により GFP の蛍光を指標として、96 well プレートの各 well に 1 細胞ずつ播種を行った。培養 10 日後、シングルコロニーを形成した各クローンについて、継代操作により培養用ならびにジェノタイプング

用の2つに分割し、次いでジェノタイピングを行った。96 well 中の各クローン（10～100細胞程度）を50 mM NaOH に溶解後、1 M Tris-HCl pH 8.0 により中和したものを鋳型として、表.1 に示すプライマーセットにより、sgRNA 標的配列を含むゲノム領域の DNA 断片を KOD FX Neo 酵素を用いた2ステップ PCR 反応にて増幅した。次いで、PAM 配列上流を認識する制限酵素により PCR 産物を処理したのち、2%アガロースゲル電気泳動により切断パターンを確認した。両アレルにおいて PAM 配列上流の制限酵素認識配列がインタクトであれば PCR 産物は完全に消化され、一方で sgRNA-Cas9 複合体による挿入・欠失 (indel) 変異の導入により制限酵素認識配列が欠損している場合には、PCR 産物の消化は起こらない。本法によりホモ indel 変異導入クローンを選抜し、次いで、表 1 に示すプライマーを用いてゲノムならびに cDNA の配列解析を行い、ABCA3-KO クローンを選択した。

#### 4-2-6 RT-PCR 法による mRNA 発現解析

**total RNA の抽出** total RNA の抽出には 24 well プレートに細胞密度  $1 \times 10^5$  cells/well で播種した MDCK 細胞を用いた。播種翌日、D-PBS による洗浄後に 1 ml の Sepasol を添加して室温で5分間静置したのち、1.5 ml チューブ内で 0.2 ml のクロロホルムと混合し、さらに室温で5分間静置した。その後遠心操作（4°C, 13000 g, 15分間）により上清の水相を回収し、等量のイソプロパノールと混合したのち室温で20分間静置した。遠心操作（4°C, 13000 g, 15分間）により RNA を沈殿として回収し、75% エタノールによる洗浄後、DEPC 処理水へと溶解させた。抽出した total RNA の濃度については分光光度計を用いて計測し、クオリティについてはアガロース電気泳動により 18S ならびに 28S rRNA を指標として確認を行った。

**cDNA の合成ならびに PCR 反応** 抽出した total RNA を RNase free DNaseI により 37°C で 30 分間反応させ、ゲノム RNA を除去したものを cDNA 合成反応の鋳型として用いた。cDNA 合成は SuperScriptIII の製品書に従い、Random hexamer をプライマーとする 20  $\mu$ l の反応スケールで 100 ng の total RNA を鋳型として行った。また、前述の **4-2-3 発現コンストラクトの構築** で用いる ABCA3 の全長 ORF 調製用の鋳型 cDNA については、DNaseI 処理を行わず、また Oligo-dT をプライマーとする cDNA 合成反応により調製した。合成反応後、1  $\mu$ l の cDNA 合成反応液を鋳型として、表 1 に示すプライマーセットにより、KOD FX Neo 酵素を用いた2ステップ PCR 反応を行った。また、リアルタイム PCR の際には、表 1 に示すプライマーセットを用いて、SYBR Green Real-Time PCR Master Mix の製品書に従って PCR 反応液を調製し、リアルタイム PCR 装置 (Applied Biosystems) により PCR 反応を行った。得られた各サン

プル・各遺伝子の Ct 値から、GAPDH を標準遺伝子とする  $\Delta\Delta Ct$  法に基づいて ABCA3 の mRNA の相対発現量を定量した。

#### 4-2-7 組換え MDCK 細胞を用いた IAV 感染実験

**IAV の細胞傷害活性を指標とする解析** 96 well プレートに播種した単層 MDCK 細胞を用いた。10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させ、感染 1 時間後に洗浄後、vehicle あるいは PVF-tet (20  $\mu\text{M}$ ) を含む培養培地を添加して培養を行った。感染 24 時間後、D-PBS により 2 度の洗浄を行い、死細胞を除去したのち、Cell Counting Kit-8 により細胞生存率を計測した。

**IAV の増殖を指標とする解析** 24 well プレートに播種した単層 MDCK 細胞クローンを用いた。単層 MDCK 細胞を PVF-tet (20  $\mu\text{M}$ ) 存在下あるいは非存在下で 30 分間培養したのち、0.2 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させた。感染 16 時間後、培養上清を回収し、**2-2-2 IAV の力価測定** に準じてプラークアッセイを行った。

#### IAV 感染細胞における HA の局在解析

MDCK 細胞の IAV 感染手順については **3-2-5** に、また免疫蛍光染色法の手順については **3-2-2** に、Lysotracker ならびに filipin を用いた染色については **4-2-2** に準じて行った。

#### 4-2-8 透過型電子顕微鏡を用いた形態学的解析

10 cm dish 上に播種した単層 MDCK 細胞をトリプシン-EDTA 処理と遠心操作 (4°C, 180 g, 5 分間) により細胞ペレットとして回収し、次いで 2% PFA/1% Glutaraldehyde/PBS により室温で 1 時間の固定反応を行った。細胞を PBS により 2 回洗浄後、5% SeqPlaque アガロースに包埋し、次いで 2% 四酸化オスミウムにより室温で 1 時間の後固定反応を行った。洗浄後、50%、70%、80%、90% (v/v) のエタノールにより各 10 分間、室温で脱水反応を行ったのち、さらに 100%のエタノールならびにプロピレンオキサイドにより各 3 回の脱水反応を行った。脱水後、EPON812 樹脂に包埋した。包埋サンプルをウルトラマイクローム (EM UC6, Leica Microsystems) により切削し、50 nm 厚の超薄層切片を作製した。酢酸ウランならびにクエン酸鉛による超薄層切片の電子染色ののち、透過型電子顕微鏡 (JEM-2010, JEOL) により観察を行った。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 液胞状オルガネラは脂質を含有する酸性オルガネラである

PVF-tet 存在下で形成が誘導される液胞状オルガネラについて、各種オルガネラマーカーの局在の有無を検討した。その結果、小胞体膜のマーカー (HSP47 及び Calnexin)、ゴルジ体膜のマーカー (p230、GS28 及び GM130) ならびに初期エンドソーム膜のマーカー (EEA1)

については局在が観察されなかった一方で、後期エンドソーム/リソソーム膜のマーカーである LAMP-1 については液胞状オルガネラにおける HA との共局在が観察された (図 13A-G)。また、細胞内の酸性コンパートメントを選択的に染色する **Lysotracker** が液胞状オルガネラの内腔に蓄積することから、本オルガネラが後期エンドソーム/リソソーム様の酸性オルガネラであることを明らかにした (図 13H)。一方、リソソームプロテアーゼ阻害剤の処理によって HA の蓄積量は増加しないことから、本オルガネラでは HA の分解は起こっていないことを見出した (図 13I)。

HA はトランスゴルジネットワーク (TGN) においてコレステロールとスフィンゴ脂質に富む脂質ラフト構造へと集積し、細胞膜表面へと輸送されることが報告されている<sup>28, 29, 34, 35</sup>。そこで、これらの脂質についても、液胞状オルガネラへの局在の有無を検討した。しかしながら、一般に脂質性の蛍光プローブは免疫染色時の膜透過処理により容易に除去されてしまうために、抗 HA 抗体との共染色は困難であった。そこで、HA の細胞質側末端に蛍光タンパク質である単量体 Venus (mVenus) を融合させた HAmVenus を安定発現する MDCK 細胞 (MDCK-HAmVenus 細胞) を樹立した。本細胞を PVF-tet 存在下で感染させることにより、通常の HA と同様に HAmVenus についても液胞状オルガネラへと異常局在化する。したがって本細胞を用いることにより、免疫染色をせずに HA の局在、ならびに液胞状オルガネラを可視化することが可能である。そこで前述のコレステロールならびにスフィンゴ脂質について局在解析を行ったところ、先行研究の報告と一致して、HA 輸送小胞に強く検出された (図 13J, 13K)。さらに、これらの脂質は液胞状オルガネラの限界膜ならびに内腔にも強く検出されることを見出した。

以上の結果から、HA を隔離する液胞状オルガネラは脂質を含有する酸性オルガネラであることを見出した。

#### 4-3-2 ラメラボディの過剰形成は IAV 感染を抑制する

液胞状オルガネラの性状と合致するオルガネラとして、ラメラボディに着目した<sup>36, 37</sup>。ラメラボディは II 型肺胞上皮細胞において高発現するリソソーム様オルガネラであり、その内腔にはリン脂質とコレステロールをラメラ状に密度に含有する。ラメラボディの形成には、その限界膜上に局在する ABC transporter subfamily A3 (ABCA3) が内腔脂質の膜間輸送による取込みを担うことから、必須の分子であることが知られている<sup>38</sup>。そこで、MDCK 細胞における ABCA3 の発現解析を行ったところ、mRNA レベルで発現していることを確認した (図 14A, 上段)。さらに、透過型電子顕微鏡による細胞の微細構造を解析したところ、少量ではあるが MDCK 細胞においてもラメラボディが形成されていることを明らかにした (図 14A, 下段)。



そこで、HA を隔離する液胞状オルガネラがラメラボディであるという仮説を立て、その検証を行った。はじめに、MDCK 細胞の cDNA から ABCA3 遺伝子をクローニングし、C 末端側に mVenus を付加した ABCA3mVenus を安定的に高発現する MDCK 細胞 (MDCK-ABCA3mVenus 細胞) を樹立した。MDCK-ABCA3mVenus 細胞は、空ベクターを導入して得られたコントロール細胞クローンと比較して ABCA3 の mRNA を 300 倍以上高いレベルで発現する過剰発現株であり、通常培養条件下においても高いラメラボディ形成能を示した (図 14B)。本細胞株を IAV に感染させたところ、PVF-tet 非存在下においても、HA が極めて高い効率で ABCA3 の局在するラメラボディへと隔離されることが明らかとなった (図 14C)。またこの際、ABCA3 高発現クローンでは IAV の増殖効率が著減すること、さらに IAV の細胞傷害活性に対して抵抗性を示すことを見出した (図 14D)。これらの結果は、ラメラボディが潜在的に HA を隔離する活性を持ち、過剰に形成された際には、抗 IAV オルガネラとして機能することを示唆している。

#### 4-3-3 ABCA3 は液胞状オルガネラの形成に必須ではない

そこで、ラメラボディの関与をより詳細に解析するために、CRISPR-Cas9 をベースとするゲノム編集技術により ABCA3 ノックアウト MDCK 細胞 (ABCA3-KO 細胞) クローンを樹立した (図 15A)。本細胞株は ABCA3 ゲノムの第 4 エクソン内ならびに近傍に、アレル間で異なる indel 変異を有する。一方のアレルにおいては、第 4 エクソンの最上流 2bp が欠失したフレームシフト変異が起こっていた。また、もう一方のアレルにおいては、第 4 エクソンの上流イントロン内の 3' 末端 (第 4 エクソン側末端) に位置するグアニン (G) が欠失していた。後者は直接的に ORF のフレームシフトを起こさないが、イントロン末端の G は mRNA スプライシングに極めて重要であることから、本アレルからは第 4 エクソンが選択的に除去されたジャンク mRNA が生じてことを確認した。意外なことに、PVF-tet は ABCA3-KO 細胞においても親株と同等の抗 IAV 活性を示し、また同様に細胞内 HA 量の蓄積を誘導した (図 15B, 15C)。そこで、ABCA3-KO 細胞内における HA の局在を解析したところ、親株と比較してサイズがやや小さくなるものの、Lysotracker により強く染色される液胞状オルガネラが存在することを見出した (図 15D)。すなわち、PVF-tet 誘導性の液胞状オルガネラの形成においては、ABCA3 は必須ではないことが示された。

ラメラボディの微分干渉像に着目すると、通常培養条件下と IAV 感染条件下では大きく異なる形態を示すことが分かる。これらの形態が異なる 2 つの構造体を Lysotracker ならびに filipin により染色したところ、通常培養条件下で観察されるラメラボディは顕著な酸性を示さず、また主に限界膜上にコレステロールが検出される一方で、IAV 感染時の構造体は強力な酸性を示し、内腔にまでコレステロールが含むことを見出した (図 16A, 16B)。

以上の一連の知見は、IAV 感染時に HA を隔離する構造体がラメラボディとは異なる性状を有するオルガネラであることを示唆している。

#### 4-4 考察

本章ではまず、液胞状オルガネラがリソソーム様の性質を示すにも関わらず、その内部で HA の分解は起こっていないことを見出した。しかしながら、前章において示したように、PVF-tet 存在下では細胞膜表面の HA が減少することからも、液胞状オルガネラに隔離された HA の細胞膜表面への輸送は起こり難いと考えられる。したがって、隔離された HA は分解に依らない機構で不活性化されていることが推測される。可能性の一つとして、前章で示したように、PVF-tet を介して HA が架橋されることにより、難分解性の高分子量凝集体が形成されていることが予想される。また、もう一つの可能性として、酸性環境における HA の構造変化が挙げられる。HA は酸性環境に対して極めて高い感受性を示し、内部の疎水性領域を露出させることで、IAV 膜と宿主膜の膜融合を担うことが知られている<sup>10</sup>。この構造変化は不可逆的であり、構造変化に伴って露出する疎水性領域を介した凝集が強く起こることが予想される。しかしながら、いずれの可能性についても現段階では解明には至っていない。

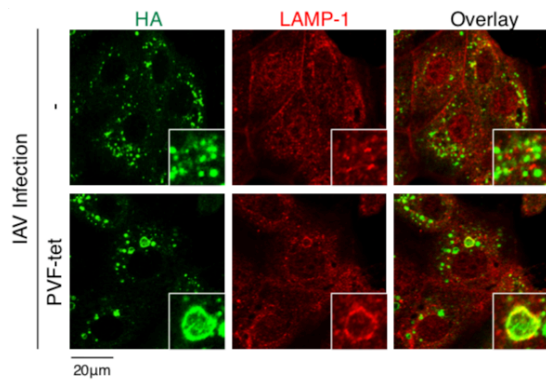
本章では、液胞状オルガネラがリソソーム様の性質を持つオルガネラであること明らかにし、このことを根拠として『その実体がラメラボディである』という仮説に基づいて解析を行った。その結果、ABCA3 の高発現、すなわちラメラボディの過剰形成によって、確かに HA が隔離され、IAV の増殖ならびに細胞傷害活性が抑制されることを明らかにした。一方で興味深いことに、ABCA3 をノックアウトした細胞においても PVF-tet は依然として抗 IAV 活性を示した。これらの知見をまとめると、HA を隔離する液胞状オルガネラの形成において、ABCA3 はそれ自体の高発現によって十分にその形成を誘導することができるものの、必須分子ではない、という結論が導き出される。このことは同時に、本研究でこれまでに見出していた液胞状オルガネラの実体がラメラボディではないことを示しており、その実体の同定のためにはさらなる解析が必要である。

#### 4-5 図表

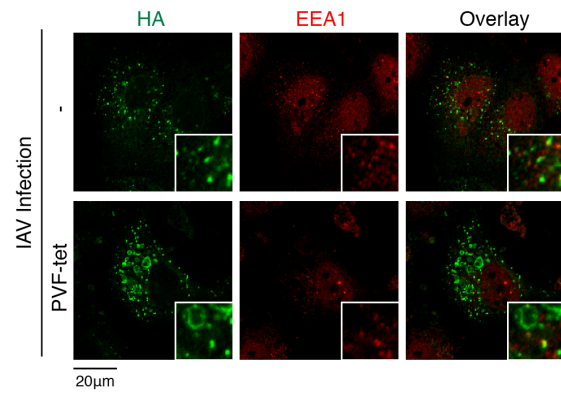
表 1. 使用したオリゴ DNA の配列

Oligo DNA name	
Gene cloning primer	Sequence (5' to 3')
HA-Venus_fwd1	CCACCACACTGGACTAGTGGGATCCGCGAAAGCAG
HA-Venus_fwd2	CGACGATAAGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
HA-Venus_Rev1	CCTTGCTCACCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCA
HA-Venus_Rev2	AGCTTGGTACCGAGCTCGTCACTTGTACAGCTCGT
ABCA3(-99_2412)_fwd	CACCACACTGGACTAGTGTGGCCAGTCCCTGCCATA
ABCA3(-99_2412)_rev	ATAGGCCTTCGAACCTGTGTGTGCTCTC
ABCA3(2413_5106)_fwd	ACACAGGTTCGAAGGCCTATTTGCCAAGCTGGAGA
ABCA3(2413_5106)_rev	CCTTGTAATCCGGCCCCTCGTCCTCGGC
FLAG-Venus_fwd	CGAGGGGCCGGATTACAAGGATGACGAC
Sequencing prime	Sequence (5' to 3')
ABCA3_567	AAACCCAGGACCAAGGGAG
ABCA3_1198	ACTCTCAGCCAGAAGCTG
ABCA3_1797	GGTTCAGATCCGCAAGAG
ABCA3_3086	ATGTCCGGTGAGCGGACAG
ABCA3_3782	GCTTCCATGAGAACTTCG
ABCA3_4489	CTTCGGGGCCTTCTTCTG
sgRNA template	Sequence (5' to 3')
sgABCA3_exon4	CACCGCGAGGAAAGCCTCGAGCTG
sgABCA3_exon4c	AAACCAGCTCGAGGCTTTCCCTCGC
ABCA3_exon4_PCR_F	TGTCCTTGCGGCAGCCAATC
ABCA3_exon4_PCR_R	TGGTTTCCTGGCTTCATGCTG
cDNA sequencing primer	Sequence (5' to 3')
ABCA3(287-306)	AGAGGAATTCCGGCGCGGAGGACATTGGTC
qRT-PCR primer	Sequence (5' to 3')
ABCA3_F1	AAGGAGTACATGCGCATGA
ABCA3_R1	TGACCATGAAGCTGAAGGA
cGAPDH_F2	ACGGCACAGTCAAGGCTGAG
cGAPDH_R2	CAGCATCACCCATTTGATGTTGG

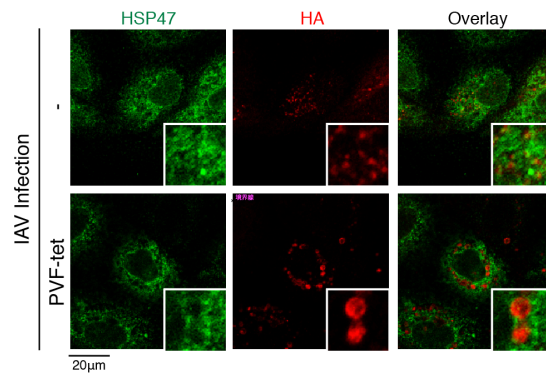
13A



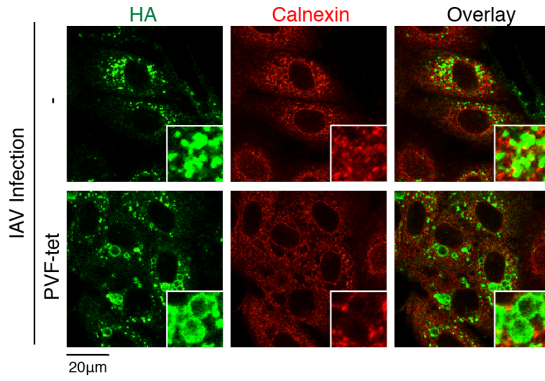
13B



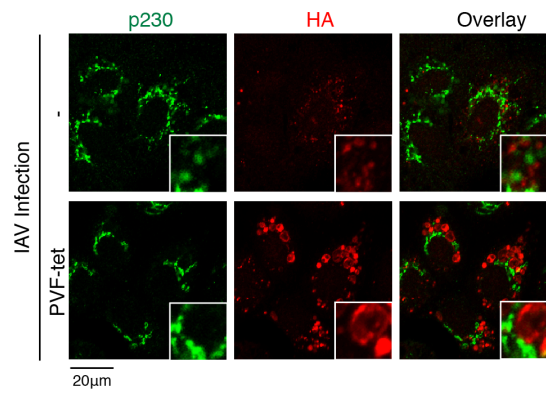
13C



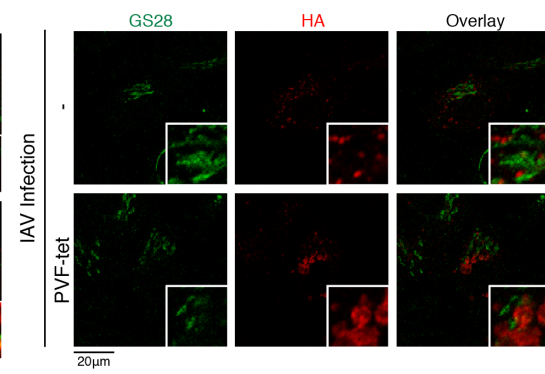
13D



13E

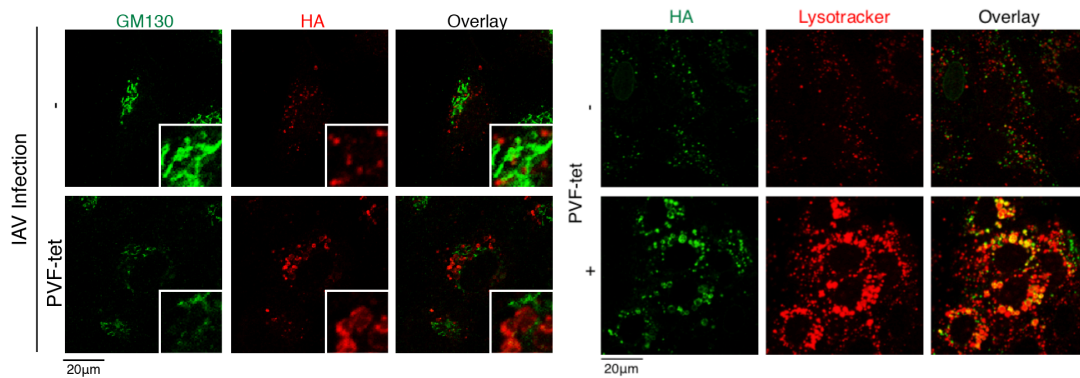


13F

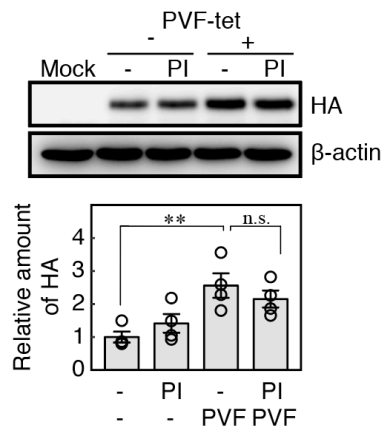


13G

13H



13I



13J

13K

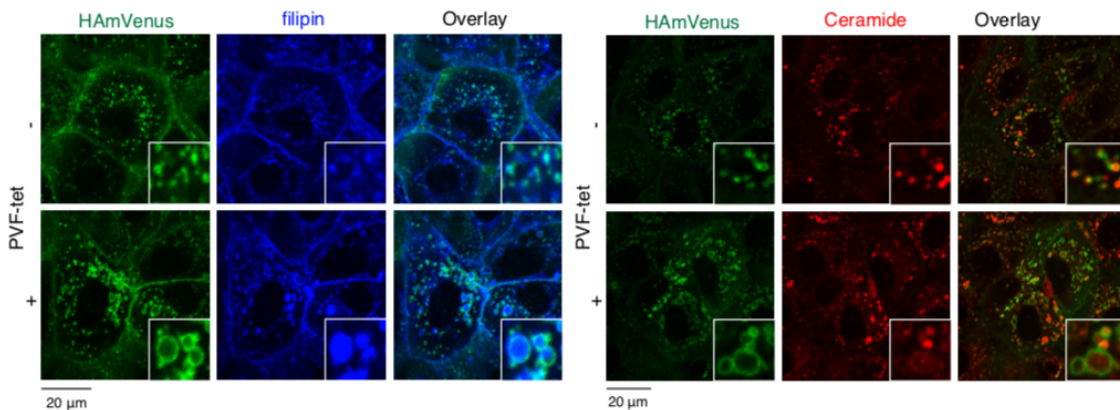


図 13. 液胞状オルガネラは脂質を含有する酸性オルガネラである

(A-G) 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作のち、PVF-tet (20 μM)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作のち、PFA 固定を行い、HA と各オルガネラマーカー

の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。各図は LAMP-1(A)、EEA1(B)、HSP47(C)、Calnexin(D)、p230(E)、GS28(F)、GM130(G)と HA の共染色像を示している。

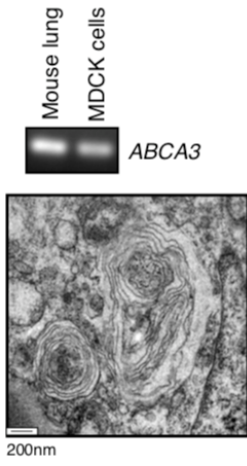
(H) 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 15 時間半後、Lysotracker (75 nM)を添加し、さらに 30 分の培養を行った。D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、HA の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。

(I) 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。さらに感染 3 時間後、0.1% DMSO (-) あるいはリソソームプロテアーゼ阻害剤 (PI) を添加し、13 時間の培養を行った。感染 16 時間後、Lysis buffer により細胞を溶解・回収し、各タンパク質の発現をウェスタンブロット法により解析した。グラフは独立した 4 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示しており、ドットは各回の実験値を表している。 \*\*P < 0.01; n.s., not significant (by one-way ANOVA followed by Tukey's test ) .

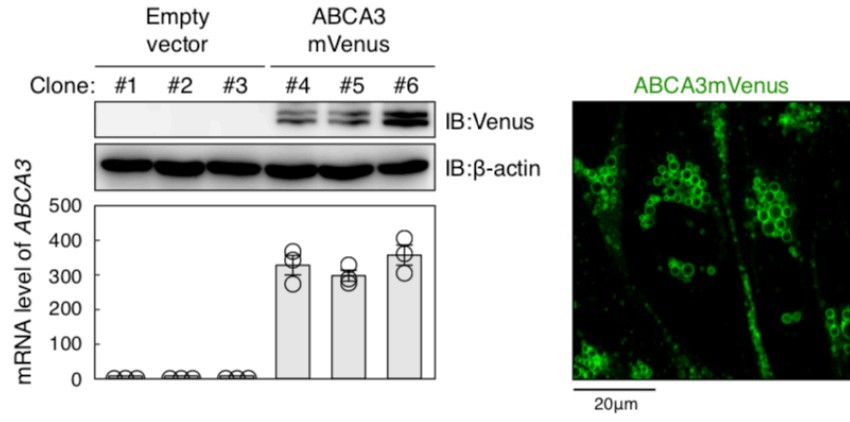
(J) 単層 MDCK-HAmVenus 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、次いで filipin 染色により細胞内の遊離型コレステロールを染色した。

(K) BODIPY-TR-C5-Ceramide を取込ませた単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行った。

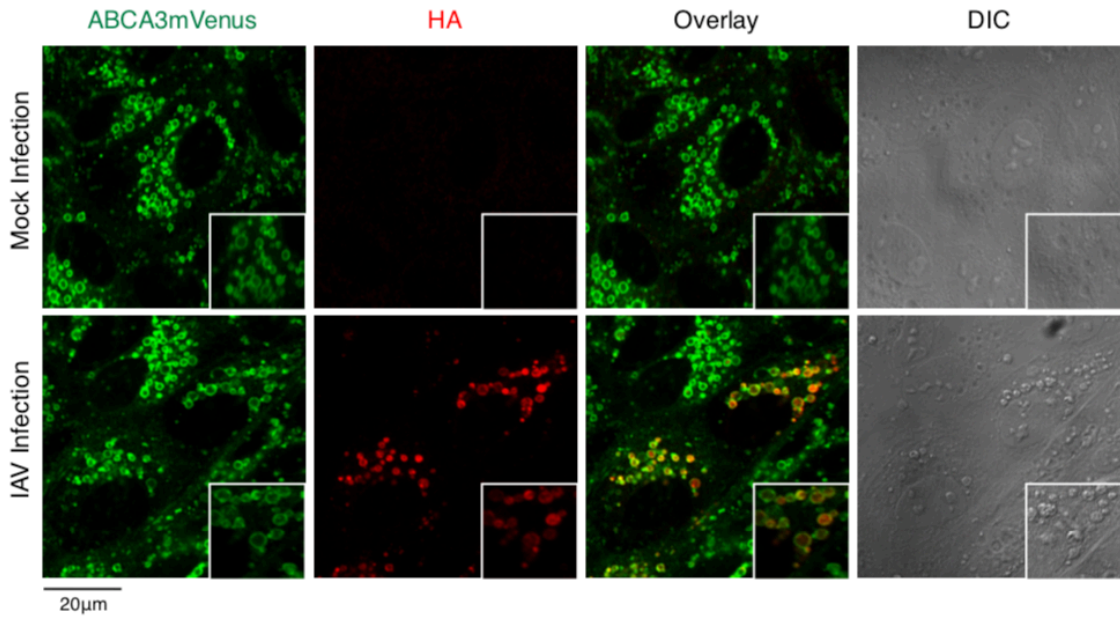
14A



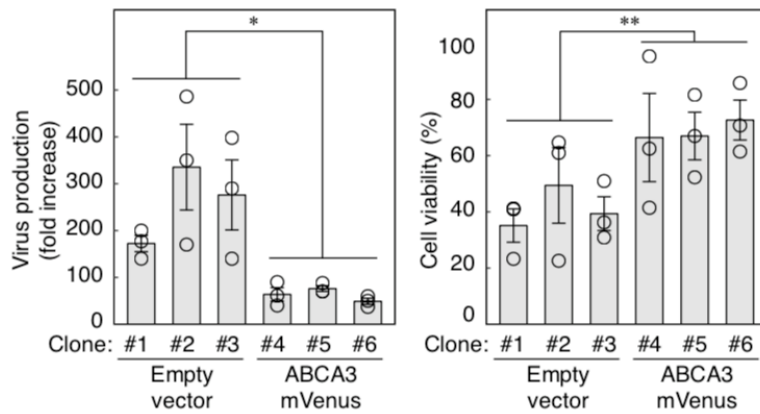
14B



14C



14D



#### 図 14. ラメラボディの過剰形成は IAV 感染を抑制する

(A) マウス肺ならびに MDCK 細胞の total RNA を抽出し、RT-PCR 法により ABCA3 の mRNA 発現を解析した (上段)。下段は MDCK 細胞におけるラメラボディの電子顕微鏡像を示している。

(B) 樹立した各 MDCK 細胞クローンにおける ABCA3mVenus のタンパク質発現(左図上段)ならびに mRNA 発現 (左図下段) を、それぞれウェスタンブロット法ならびに qRT-PCR 法により解析した。右図は Clone #6 におけるラメラボディ形成を示している。mRNA 発現量は Clone #1、#2 ならびに #3 の平均に対する相対値として算出した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示しており、ドットは各回の実験値を表している。

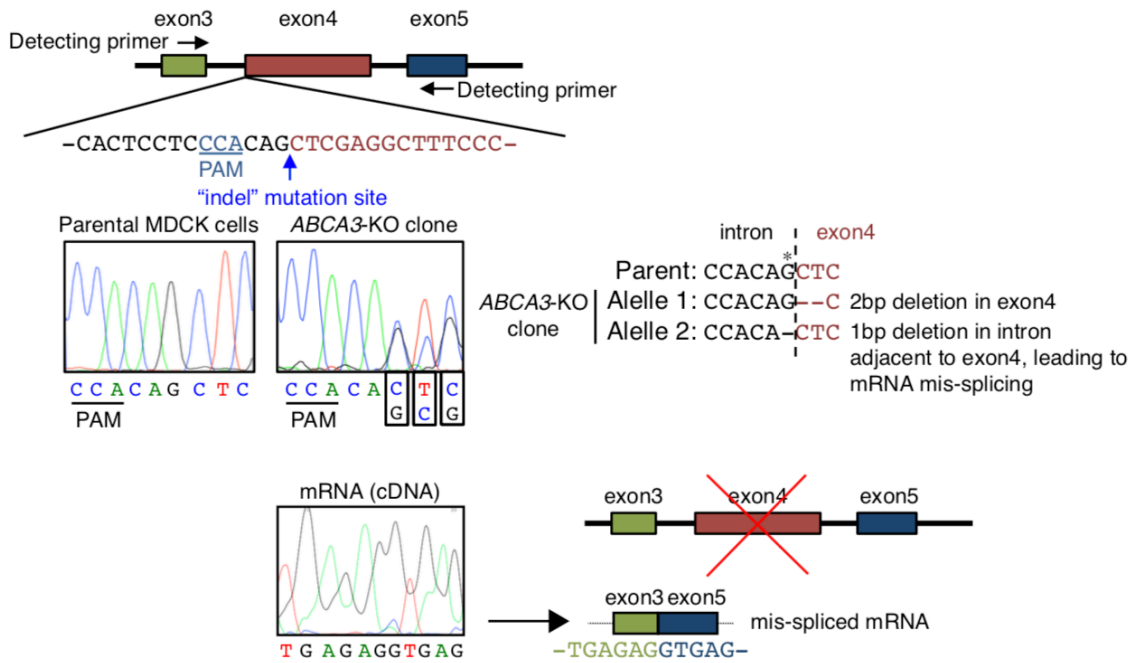
(C) 単層 MDCK-ABCA3mVenus 細胞 (Clone #6) を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、さらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、HA と ABCA3mVenus の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。DIC は微分干渉像を示している。

(D) (左図) 単層 MDCK-ABCA3mVenus 細胞を 0.2 MOI (60,000 pfu/ml) の IAV PR8 株に感染させた。感染 16 時間後、培養上清を回収し、プラークアッセイにより IAV 力価を定量した。各定量値について IAV 初期力価 (60,000 pfu/ml) に対する増殖比 fold increase を算出した。

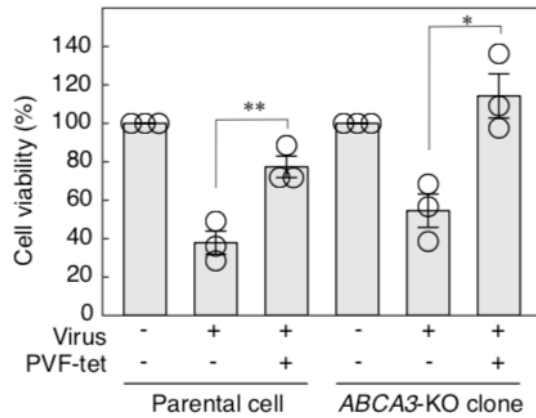
(右図) 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、さらなる培養を行った。感染 24 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。各グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示しており、ドットは各回の実験値を表している。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  (by two-sided Student's t-test).



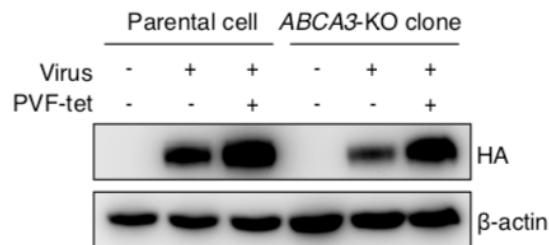
### 15A



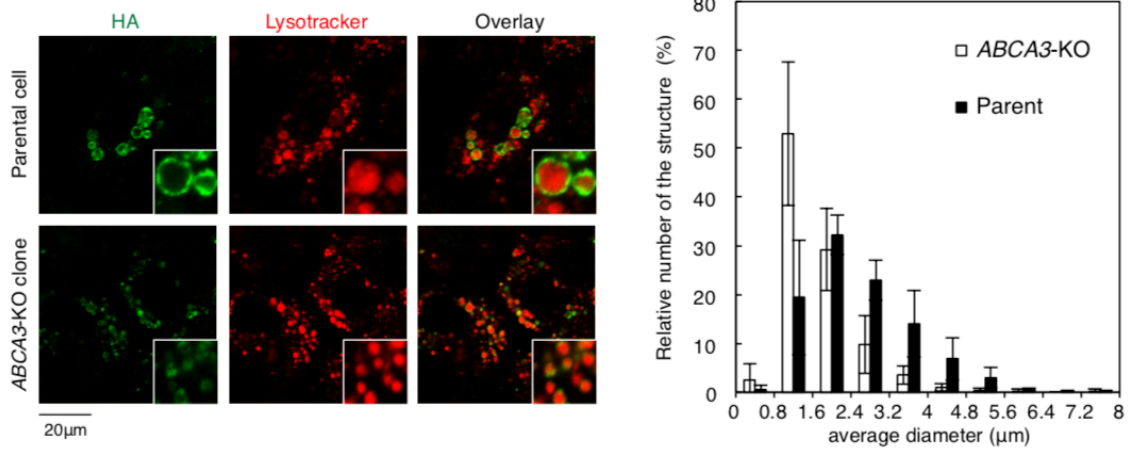
### 15B



### 15C



## 15D



**図 15. ABCA3 は液胞状オルガネラの形成に必須ではない**

**(A)** 樹立した ABCA3-KO 細胞クローンの ABCA3 遺伝子の配列解析を行った。中断は親株ならびに ABCA3-KO 細胞クローンの ABCA3 ゲノム領域を部分的に PCR により増幅し、特異的プライマーによりシーケンス解析を行った結果を示している。下段は ABCA3-KO 細胞クローン由来の cDNA を鋳型として ABCA3 遺伝子を部分的に PCR により増幅し、特異的プライマーによりシーケンス解析を行った結果を示している。

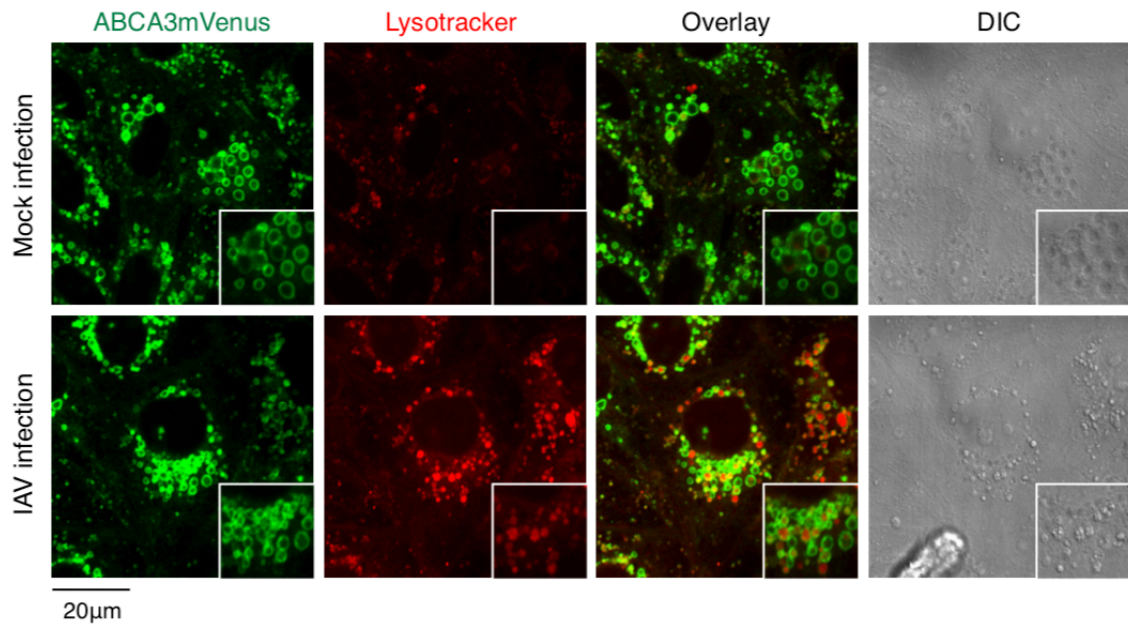
**(B)** 単層 MDCK 細胞（親株ならびに ABCA3-KO 細胞クローン）を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20 μM) 存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 24 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示しており、ドットは各回の実験値を表している。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  (by two-sided Student's t-test).

**(C)** 単層 MDCK 細胞（親株ならびに ABCA3-KO 細胞クローン）を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20 μM) 存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、Lysis buffer により細胞を溶解・回収し、各タンパク質の発現をウェスタンブロット法により解析した。

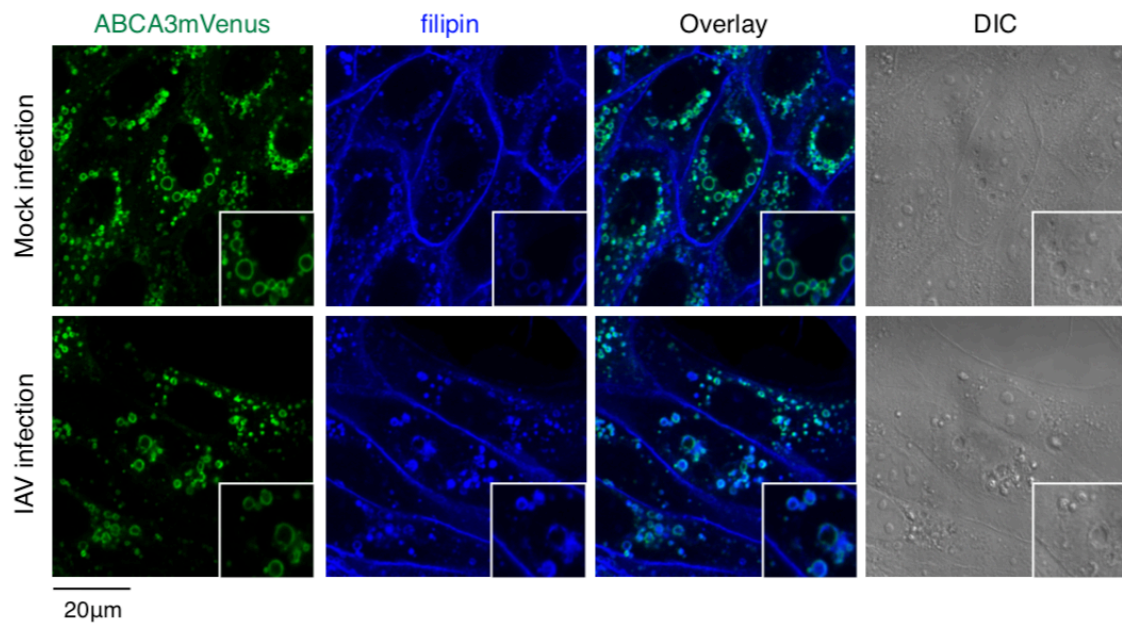
**(D)** 単層 MDCK 細胞（親株ならびに ABCA3-KO 細胞クローン）を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20 μM) 存在下でさらなる培養を行った。感染 15 時間半後、Lysotracker (75 nM) を添加し、さらに 30 分の培養を行った。D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、HA の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した (左図)。各サンプルでランダムに撮像した画像から、細胞内の Lysotracker 陽性かつ HA 陽性の構造体の直径を ImageJ により計測した。各サンプルにおいて一回の実

験で最低 150 個以上の細胞について計測を行い、構造体のサイズ分布を解析した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。

## 16A



## 16B



**図 16. HA を隔離する構造体はラメラボディとは異なる性状を示す**

**(A)** 単層 MDCK-ABCA3mVenus 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、さらなる培養を行った。感染 15 時間半後、Lysotracker (75 nM) を添加し、さらに 30 分の培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、蛍光画像の撮像を行った。

**(B)** 単層 MDCK-ABCA3mVenus 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、

D-PBS による洗浄操作ののち、さらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定ならびに filipin 染色により細胞内の遊離型コレステロールを染色し、蛍光画像の撮像を行った。

## 第 5 章 液胞状オルガネラの形成を担う必須分子の同定

### 5-1 本章の概要

前章までの一連の解析から、HA を隔離する液胞状オルガネラの形成が、PVF-tet あるいは ABCA3 の少なくとも 2 つの分子によって促進されることを見出しているが、その形成を担う必須分子については依然として明らかではない。興味深いことに、両者によって形成促進される液胞状オルガネラは、微分干渉像、内部の酸性環境ならびにコレステロール分布において良く一致する性質を示すことから、機能のみならず構造的にも共通していることが予想された。そこで、各分子によって形成促進される液胞状オルガネラについて、電子顕微鏡による超微細構造観察を行い、構造情報からその実体の同定を試みた。

### 5-2 実験方法

#### 5-2-1 実験試薬

- ・ 抗体ならびに細胞染色試薬

マウス抗 HA 抗体 (clone C102)	(Genetex)
ウサギ抗 HA 抗体	(Genetex)
マウス抗 ULK1 抗体 (clone F-4)	(Santa Cruz)
ウサギ抗 PIK3C3 抗体	(Cell Signaling Technology)
マウス抗 LC3 抗体 (clone 5F10)	(Nano Tools)
ウサギ抗 LC3 抗体 (PM-036)	(MBL International)
ウサギ抗 p62 抗体	(MBL International)
HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体	(Cell Signaling Technology)
HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	(Cell Signaling Technology)
Alexa Fluor488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa Fluor546 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa Fluor488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa Fluor546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
Alexa594-dextran	(Thermo Fischer Scientific)
Lysotracker DND-99	(Thermo Fischer Scientific)
Filipin	(Cayman Chemicals)

- ・ IAV 感染実験

#### 2-2-1. 細胞培養、IAV 感染実験に準ずる。

Leupeptin	(Wako)
-----------	--------

Pepstatin A	(ペプチド研究所)
E-64	(ペプチド研究所)
SAR405	(Cayman Chemicals)

- ・ **ウェスタンブロット法**

**3-2-1 ウェスタンブロット法**に準じる。

- ・ **電子顕微鏡解析**

**4-2-1. 電子顕微鏡解析**に準ずる。

グリッド付カバーガラス (松浪硝子工業)

- ・ **MDCK 細胞の樹立**

**4-2-1. MDCK 細胞の樹立**に準ずる。

### 5-2-2 透過型電子顕微鏡による液胞状オルガネラの超微細構造の解析

**MDCK-ABCA3mVenus 細胞の解析** 10 cm dish 上に播種した単層 MDCK 細胞を用いた。10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させ、感染 1 時間後に洗浄後、通常培養培地中で培養を行った。感染 24 時間後、D-PBS により 2 度の洗浄を行ったのち、トリプシン-EDTA 処理と遠心操作 (4°C, 180 g, 5 分間) により細胞ペレットとして回収し、次いで 2% PFA/1% Glutaraldehyde/PBS により室温で 1 時間の固定反応を行った。以降のサンプル調製、切片の作製は **4-2-7** に準じて行った。

#### 光-電子相関顕微鏡観察法 (CLEM 法) による MDCK-HAmVenus 細胞の解析

カーボン蒸着させたグリッド付カバーガラスを 24 well プレートの各 well 底に設置し、MDCK 細胞を  $2 \times 10^4$  cells/well の密度で播種した。翌日、10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させ、感染 1 時間後に洗浄後、PVF-tet (20  $\mu$ M) 存在下あるいは非存在下で培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS により 2 度の洗浄を行ったのち、3.75% PFA 固定液により室温で 20 分間の簡易固定を行った。水浸レンズを用いて正立型共焦点レーザー顕微鏡により各グリッド中の細胞の蛍光画像を取得し、その後、1% Glutaraldehyde 固定液により室温で 60 分間の固定を行った。以降のサンプル調製、切片の作製は **4-2-7** に準じて行い、蛍光画像を取得した特定の細胞について電子顕微鏡観察用の超薄層切片を作製した。

### 5-2-3 ウェスタンブロット法によるタンパク質発現解析

24 well プレートに播種した単層 MDCK 細胞を用いた。10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させ、感染 1 時間後に洗浄後、vehicle あるいは PVF-tet (20  $\mu$ M) を含む培養培地を添加して培養を行った。感染後 3 時間の時点で、リソソームプロテアーゼ阻害剤 (20  $\mu$ M Leupeptin, 20  $\mu$ M Pepstatin A, 20  $\mu$ M E-64) を添加した。さらに 13 時間の培養後に D-PBS による洗浄を行い、50  $\mu$ l の Lysis buffer で溶解し、Cell lysate を調

製した。その後のサンプル調製法、SDS-PAGE ならびにウェスタンブロット法は **3-2-4** に準じて行い、各タンパク質の検出を行った。

#### 5-2-4 遺伝子ノックアウト MDCK 細胞の樹立

**sgRNA 発現コンストラクトの構築** イヌ *ULK1* 遺伝子ならびにイヌ *PIK3C3* 遺伝子のエクソンを標的とする sgRNA の設計、ならびに発現コンストラクトの構築は表 2 に示すオリゴ DNA を用いて **4-2-5** の手順に従って行った。

**ULK1-KO 細胞ならびに PIK3C3 (+/-)細胞の樹立** sgRNA 発現コンストラクトの導入、ならびにシングルコロニーの形成までの過程については **4-2-5** の手順に従って行った。培養 10 日後、シングルコロニーを形成した各クローンについて、継代操作により培養用ならびにタンパク質発現用の 2 つに分割し、次いでタンパク質の発現解析を行った。96 well 中の各クローン (80%コンフルエント以上) を 30  $\mu$ l の Lysis buffer により溶解し、超音波処理を行うことにより total cell lysate を調製した。その後のサンプル調製法、SDS-PAGE ならびにウェスタンブロット法は **3-2-4** に準じて行い、ULK1 ならびに PIK3C3 のタンパク質レベルでの検出を行った。それぞれについて、親株と比較してタンパク質発現量が著減しているクローンをノックアウト MDCK 細胞として選択し、以降の実験に用いた。

#### 5-2-5 免疫蛍光染色法

**液状オルガネラの性状解析** 各 MDCK 細胞の IAV 感染手順は **3-2-5** に、また免疫蛍光染色法の手順は **3-2-2** に準じて行った。抗 LC3 抗体ならびに抗 p62 抗体を用いた染色の際には、0.3% Triton X-100 による膜透過処理に代えて、100  $\mu$ g/ml ジギトニン/PBS により室温で 10 分間の膜透過処理を行った。Alexa594 標識デキストランを用いた染色の際には、感染 13 時間後に培地中に Alexa594 標識デキストラン (250  $\mu$ g/ml) を添加し、16 時間後に同様の手順で固定操作を行い、その後観察を行った。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Zeiss) を用いて取得した。

**オートファゴソームの定量** 後述するオートファジー欠損 MDCK 細胞の性状解析の際には、24 well プレート各 well に沈めた 13 mm 丸カバーガラス上に  $2 \times 10^4$  cells/well の密度で播種した MDCK 細胞を用いた。播種翌日、D-PBS により 3 度の洗浄を行ったのち、通常の培養培地あるいは HBSS(+) を加え、37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間の培養を行った。培養後、D-PBS により 2 度の洗浄を行ったのち、3.75% PFA/PBS により室温で 10 分間の固定を行った。その後、100  $\mu$ g/ml ジギトニン/PBS により室温で 10 分間の膜透過処理を行い、以降の検出操作は **3-2-2** に準じて行った。各処理群につき複数の視野の細胞をランダムに撮像し、各細胞内の LC3 の輝点の数を計数した。蛍光画像の撮像には ORCA-ER CCD デジタルカメラ (浜松ホト



ニクス) を用いた。

### 5-2-6 IAV 感染実験

#### 遺伝子ノックアウト MDCK 細胞における IAV 細胞傷害活性の解析 96 well

プレートに播種した単層 MDCK 細胞を用いた。10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させ、感染 1 時間後に洗浄後、各濃度の PVF-tet を添加して培養を行った。感染 24 時間後あるいは 40 時間後、D-PBS により 2 度の洗浄を行い、死細胞を除去したのち、Cell Counting Kit-8 により細胞生存率を計測した。

#### 遺伝子ノックアウト MDCK 細胞における HA の局在解析 MDCK 細胞の IAV

感染手順については 3-2-5 に、また免疫蛍光染色法の手順については 3-2-2 に準じて行った。

#### PIK3C3 阻害剤を用いた解析 96 well プレートに播種した単層 MDCK 細胞を用

いた。10 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させ、感染 1 時間後に洗浄後、各濃度の PVF-tet、あるいは培養培地のみを添加して培養を行い、さらに 1 時間後、終濃度 100 nM の SAR405 を添加した。感染 24 時間後、D-PBS により 2 度の洗浄を行い、死細胞を除去したのち、Cell Counting Kit-8 により細胞生存率を計測した。

## 5-3 結果

### 5-3-1 液胞状オルガネラはラメラボディとは異なる膜構造を持つ

CLEM 法は光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡により同一の対象を観察する手法であり、すなわち液胞状オルガネラを形成している細胞の微細膜構造を直接的に観察することができる。CLEM 法による解析の結果、PVF-tet 存在下で形成される液胞状オルガネラは内部に高電子密度構造と、一部でラメラ状の膜構造を有していることを見出した (図 17A)。また、MDCK-ABCA3mVenus 細胞の電子顕微鏡観察を行ったところ、非感染時では多数のラメラボディが観察される一方で、IAV 感染時には先と同様に高電子密度構造と、ラメラ状の膜構造、ならびに小胞構造を多数有していることが明らかとなった (図 17B)。すなわち、これら新生 HA を隔離する液胞状オルガネラはラメラボディとは大きく異なることを見出した。

### 5-3-2 液胞状オルガネラはアンフィソームである

電子顕微鏡により観察した液胞状オルガネラの形態は、アンフィソームの形態と良く一致する<sup>39,40</sup>。アンフィソームはエンドソームを中心とする細胞内輸送小胞がオートファゴソームと融合したオルガネラであり、その後リソソームとの融合によりオートリソソームへと成熟する一過性オルガネラである<sup>41</sup>。したがって、アンフィソームにはエンドソームマーカー (あるいは細胞外から取込んだ物質) と共に、オートファゴソームマーカーが局在することが知られている。そこでまず、これらのマーカー分子に着目して液胞状オルガネラ

の解析を行った。オートファゴソーム膜にはユビキチン様タンパク質である LC3 タンパク質が局在し、その膜伸長活性によりオートファゴソーム膜の伸長を担う。この際、LC3 はホスファチジルエタノールアミン (PE) の付加によって、細胞質局在型 (LC3-I) からオートファゴソーム膜局在型 (LC3-II) へとコンバートする<sup>42</sup>。

そこで、LC3 の細胞内局在について解析を行ったところ、非感染時には細胞質において puncta 状のオートファゴソームへの局在が観察される一方で、IAV 感染時には細胞膜への局在変化が観察された (図 18A)。この局在変化は、細胞膜に局在する新生 M2 タンパク質との相互作用によることが報告されている<sup>43</sup>。PVF-tet 存在下で IAV 感染を行った場合には、液胞状オルガネラにおいて HA と共局在することを見出した。さらに、LC3 との相互作用によりオートファゴソーム内へと取込まれることが知られている p62 についても部分的に液胞状オルガネラの内腔へと局在することを見出した (図 18B)。また、MDCK-ABCA3mVenus 細胞においては、非感染時にもラメラボディ内部に不均一な LC3 の局在が観察されるものの、IAV 感染に伴って構造体の限界膜ならびに内腔において LC3 の顕著な蓄積が観察された (図 18C)。

次に、LC3-II の発現量について解析を行ったところ、IAV 感染条件下において LC3-II の蓄積が観察された (図 18D)。これは、IAV 感染がオートファゴソームの形成を促進するとともに、オートリソソームへの成熟を阻害することを示した先行研究の知見と一致する<sup>43-45</sup>。さらに、PVF-tet 存在下で感染させた場合には、LC3-II の蓄積量が増加することを見出した (図 18D)。また、PVF-tet 単独では LC3-II の増加は観察されなかった。興味深いことに、リソソームプロテアーゼ阻害剤の存在下においてもその蓄積量の増加は見られないことから、HA の場合と同様に液胞状オルガネラにおいて LC3 の分解は起こっていないことが示唆された (図 18D)。以上の一連の結果は、HA を隔離する液胞状オルガネラがオートファゴソームに由来することを示している。

次に、エンドサイトーシスを介して取込まれる細胞外物質のモデルとして Alexa594 標識デキストランを用いて、その液胞状オルガネラへの取込みについて解析を行った。デキストランは HA の輸送小胞とは共局在を示さない一方で、PVF-tet 存在下で形成される液胞状オルガネラへと取込まれていることを見出した (図 18E)。

以上の形態的ならびに生化学的性状から、液胞状オルガネラがアンフィソームである可能性が示唆された。

### 5-3-3 液胞状オルガネラの形成はオートファジーの分子機構に依存する

液胞状オルガネラがアンフィソームであると仮定すると、その形成はオートファジーの分子機構に依存することが推測される。オートファゴソーム膜は Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) を起点として、膜伸長複合体が集積することにより形成される<sup>42</sup>。こ

のことから、PI(3)P の産生酵素である Class III Phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3C3) はオートファゴソーム形成の必須分子であることが明らかになっている。また、これまでに、PIK3C3 は ATG14L、Vps15 ならびに Beclin-1 と複合体を形成して機能すること、この複合体の活性化は、さらに上流の分子である Unc-51 like autophagy activating kinase (ULK1) によるリン酸化によって正に制御されていることが報告されている<sup>46</sup>。ULK1 は栄養飢餓ストレス、DNA 傷害や小胞体ストレスなどの種々のストレス刺激に応答してオートファジーを活性化させることから、PIK3C3 と同様にオートファゴソーム形成の必須分子として知られている<sup>47,48</sup>。そこで、ゲノム編集技術を用いて PIK3C3 ならびに ULK1 のノックアウト MDCK 細胞をそれぞれ樹立し、これらの細胞における液胞状オルガネラの形成能について解析を行った (図 19A)。なお、PIK3C3 のホモノックアウト細胞クローンでは増殖速度が著しく低下したことから、解析には親株と同等の増殖速度を示すヘテロノックアウト細胞クローン (PIK3C3 +/-) を用いた。

まず、細胞質に存在する LC3 puncta 数を指標として栄養飢餓ストレスに対するオートファゴソーム形成能の検討を行ったところ、親株では栄養飢餓条件下でオートファゴソーム数が顕著に増加する一方で、ULK1 ノックアウト細胞では増加が観察されなかった (図 19B)。また、PIK3C3 ヘテロノックアウト細胞ではオートファゴソーム数の微増が観察されたものの、その増加量は親株と比較して限定的であった。したがって、これらのノックアウト細胞では栄養飢餓ストレス時のオートファゴソーム形成能が欠損していることが示された。次に、これらのノックアウト細胞の IAV 感染時における新生 HA の局在について解析を行ったところ、いずれのノックアウト細胞においても親株と同様に、HA の輸送小胞への局在が観察された (図 19C)。PVF-tet 存在下においては、親株では HA が液胞状オルガネラへと異常局在化する一方で、ノックアウト細胞では依然として輸送小胞上への局在が観察された。すなわち、これらのノックアウト細胞が HA を隔離する液胞状オルガネラの形成能を著しく欠くことを見出した。また、MDCK-ABCA3mVenus 細胞におけるオートファジーの分子機構の関与についても、PIK3C3 の特異的阻害剤である SAR405 を用いることにより解析を行った。その結果、SAR405 存在下では、IAV 感染に伴って液胞状オルガネラへと隔離される HA 量が著減することを見出した (図 19D)。

以上の一連の結果は、液胞状オルガネラの形成がオートファジーの分子機構に強く依存することを示している。液胞状オルガネラはエンドソームとオートファゴソームの双方の性状を併せ持つことをふまえると、その実体はアンフィソームであると考えられる。

#### 5-3-4 オートファジーの分子機構は PVF-tet の抗 IAV 活性に必須である

次に、これらのノックアウト細胞における IAV の細胞傷害活性について解析を行った。感染 24 時間後において、親株では 80%程度の細胞傷害が起こる一方で、ノックアウト細胞

では依然として 70%以上の細胞が生存していることを見出した (図 19E)。感染 40 時間後においてはノックアウト細胞についても 80%程度の細胞傷害が起こることから、PIK3C3 ならびに ULK1 のノックアウトにより、IAV による細胞傷害活性が遅延していることが明らかとなった。この結果は、オートファジーが IAV によるアポトーシス誘導に必要であることを報告した先行研究の結果と一致する<sup>49</sup>。そこで、PVF-tet の抗 IAV 活性を検討する際には、親株とノックアウト細胞のそれぞれで十分な細胞傷害が起こる時間点、すなわち親株については感染 24 時間後、ノックアウト細胞については感染 40 時間後において解析を行った。その結果、ノックアウト細胞においては PVF-tet がほとんど抗 IAV 活性を示さないことを見出した (図 19F)。

以上の結果から、オートファジーの分子機構は HA を隔離するアンフィソームの形成に必須であると共に、その抗 IAV 活性についても不可欠であることが明らかとなった。

#### 5-4 考察

本章では電顕レベルでの形態的解析に基づいて、液胞状オルガネラの実体がアンフィソームであると仮説を立て、細胞生物学的手法を用いて仮説の検証を行った。その結果、新生 HA を隔離するアンフィソームは従来のアンフィソームと同様に ULK1 ならびに PIK3C3 に強く依存して形成される一方で、その形成が PVF-tet や ABCA3 などの分子によって IAV 感染時に強く誘導されることから、従来のアンフィソームと区別して誘導性アンフィソーム (inducible amphisome) と表現することができる。誘導性アンフィソームの形成を抑制した場合には PVF-tet の抗 IAV 活性が強く損なわれることから、誘導性アンフィソームは抗 IAV オルガネラであると捉えられる。

通常は細胞膜表面へと輸送される新生 HA が、どのような経路で誘導性アンフィソームへと選別・隔離されるのかは現時点では解明できていない。オートファジーは局所的なタンパク質の凝集に起因するオルガネラストレスに応答して小胞体を選択的に隔離分解しうるものが近年報告されている。しかしながら、本研究で見出した誘導性アンフィソームにはメジャーな小胞体膜タンパク質ならびにゴルジ体膜タンパク質の局在は観察されないことから、これらを隔離分解するオートファゴソームとは明確に区別される。また前章において見出したとおり、新生 HA はコレステロールとスフィンゴ脂質に富む輸送小胞に局在することから、観察を行った時間点では大部分の新生 HA は TGN において脂質ラフトへと集積していることが考えられる。また液胞状オルガネラの限界膜ならびに内腔においても、新生 HA はこれらの脂質と共にその局在が観察されることから、隔離されている新生 HA は post-TGN コンパートメントに由来すると考えられる。新生 HA を細胞膜表面へと輸送する輸送小胞の詳細については未だ解明されていないが、リサイクリングエンドソームを經由

しているとの報告も存在することから<sup>50</sup>、post-TGN コンパートメントの輸送小胞内で凝集した新生 HA がオートファゴソームによる隔離の対象となっていることが推測される。一方で、PVF-tet とは異なり、ABCA3 の高発現によって HA の凝集が起こるとは考え難いため、異なるメカニズムにより、新生 HA の選別・隔離が起こっていると考えられる。

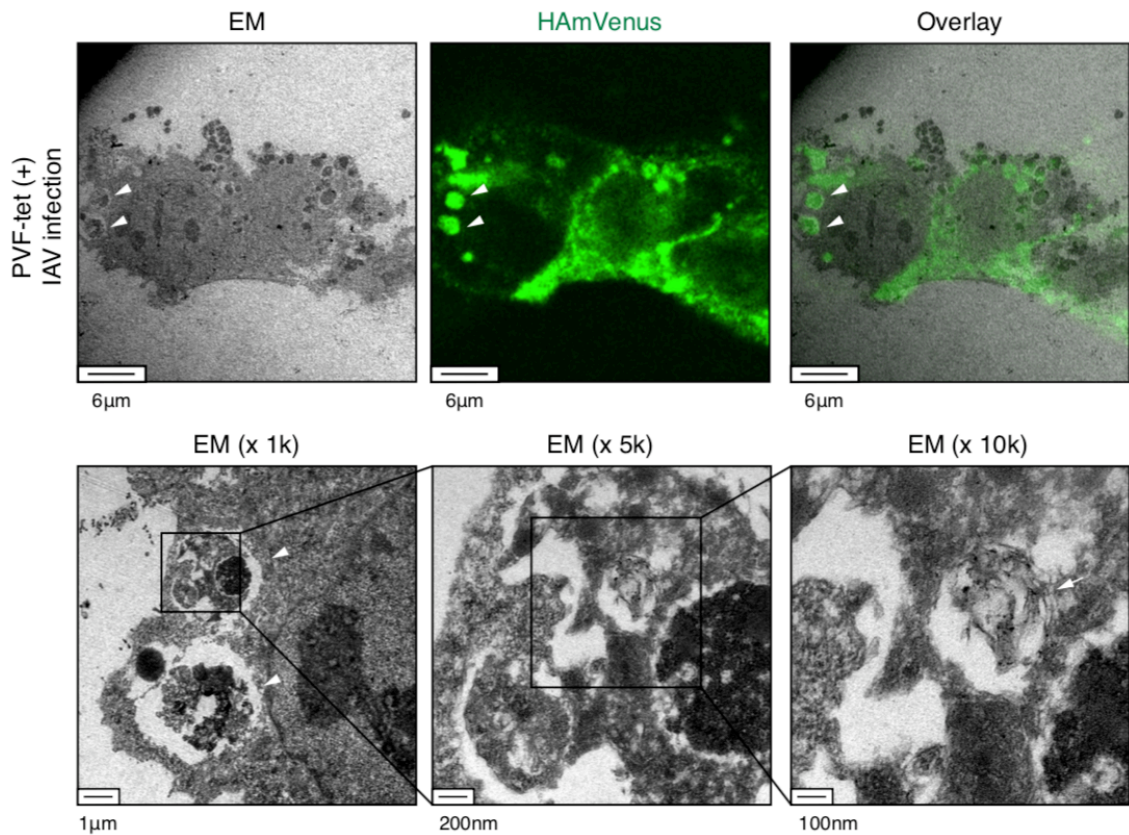
ミトコンドリアや小胞体、核 DNA におけるストレスはそれぞれに特異的なセンサー分子により感知され、各オルガネラに選択的なオートファジーを亢進することが報告されている<sup>51-53</sup>。本研究で見出した誘導性アンフィソームの形成時についても、産生される LC3-II の総量が増加していることから、オートファゴソーム形成の活性自体が亢進していることは明らかである。したがって、PVF-tet による新生 HA の凝集・蓄積をストレスとして感知し、オートファジーの分子機構を作動させる未知のシグナル伝達機構が存在することが示唆される。また近年、損傷エンドソーム膜に付加されたポリユビキチン鎖を足場として ULK1 を含む複合体がリクルートされ、オートファゴソームの形成を誘導することにより、エンドソームがオートファゴソーム内に隔離されることが報告されている<sup>54</sup>。この場合、オートファゴソームとエンドソームの融合により形成される従来のアンフィソームの定義とは異なるものの、新生 HA が特異的に隔離される現象を説明する一つのモデルとしては考えられる。これらの未解明な部分については、近年明らかになっている知見をふまえて、今後より詳細な解析を進める必要がある。

## 5-5 図表

表 2. 使用したオリゴ DNA の配列

Oligo DNA name	
Sequencing prime	Sequence (5' to 3')
U6_fw	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC
sgRNA template	
Sequence (5' to 3')	
ULK1_sgRNA_F	CACCGCGGAATTGGCCATTTCTGC
ULK1_sgRNA_R	AAACGCAGGAAATGGCCAATTCCGC
PIK3C3_sgRNA_F1	CACCGGGCAGGTCAGGGTACTTTAC
PIK3C3_sgRNA_R1	AAACGTAAAGTACCCTGACCTGCCC
PIK3C3_sgRNA_F2	CACCGCCCAGGTGGCCCTCACTATA
PIK3C3_sgRNA_R2	AAACTATAGTGAGGGCCACCTGGGC

17A



17B

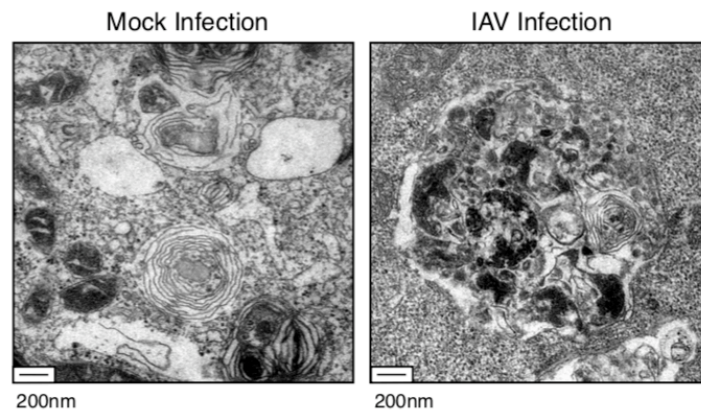


図 17. 液胞状オルガネラはラメラボディとは異なる膜構造を持つ

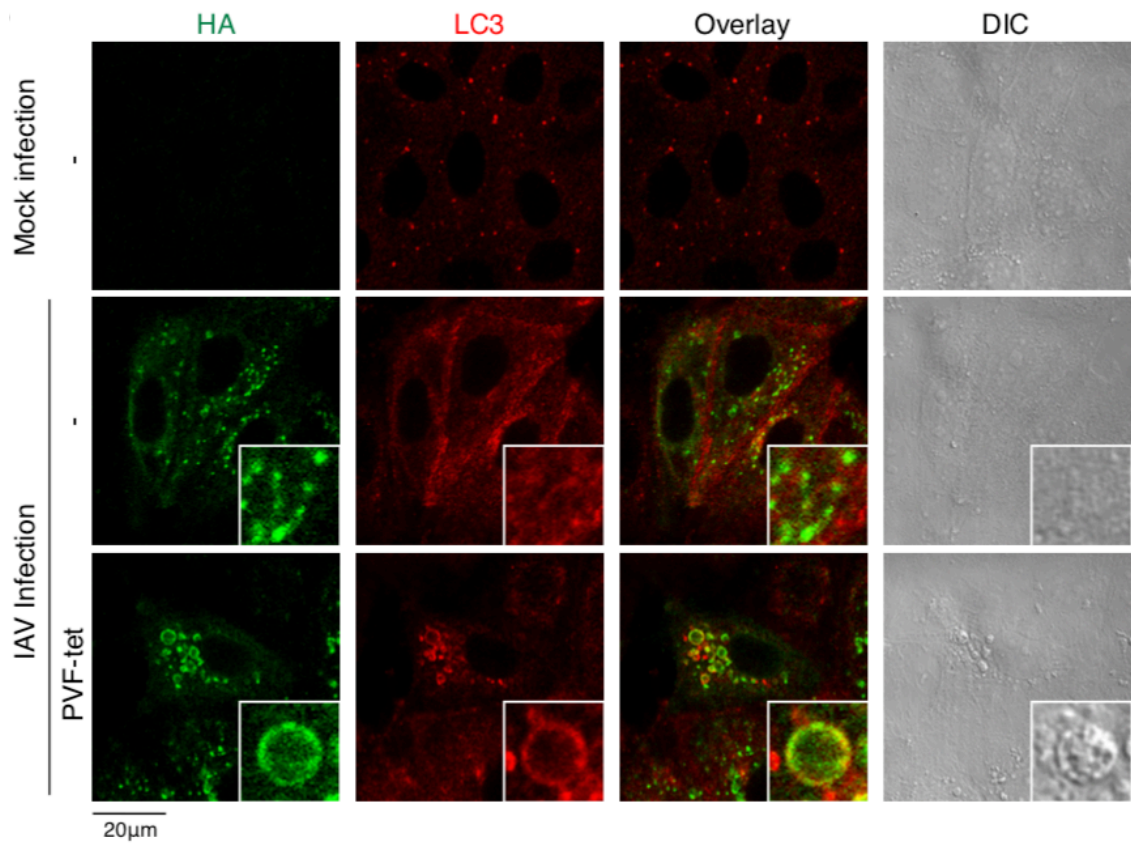
(A) MDCK-HAmVenus 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M) 存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、蛍光画像を撮像した。その後、グルタルアルデヒドによる固定を行ったのち、超薄層切片を作製し、同じ細胞について電子顕微鏡観察を行った。上段は同じ細胞の電子顕微鏡像 (左)、蛍光顕微鏡像 (中)、

重ね合わせ像（右）をそれぞれ示しており、矢頭は液胞状オルガネラを示している。また、下段は液胞状オルガネラの高倍率観察像を示している。

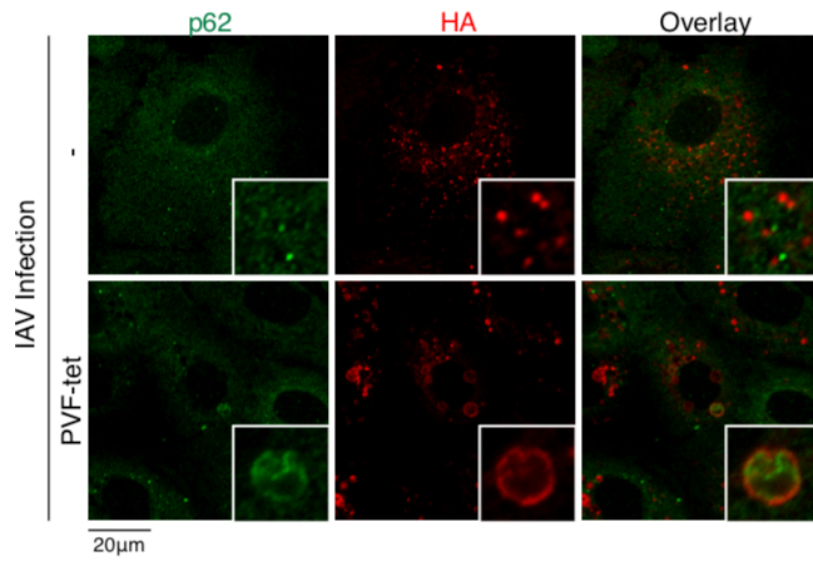
**(B)** 単層 MDCK-ABCA3mVenus 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、さらなる培養を行った。感染 16 時間後、細胞をペレットとして回収したのち PFA ならびにグルタルアルデヒドによる固定を行い、超薄層切片を作製した。左図は非感染細胞のラメラボディを、右図は IAV 感染細胞に特徴的な構造体を示している。



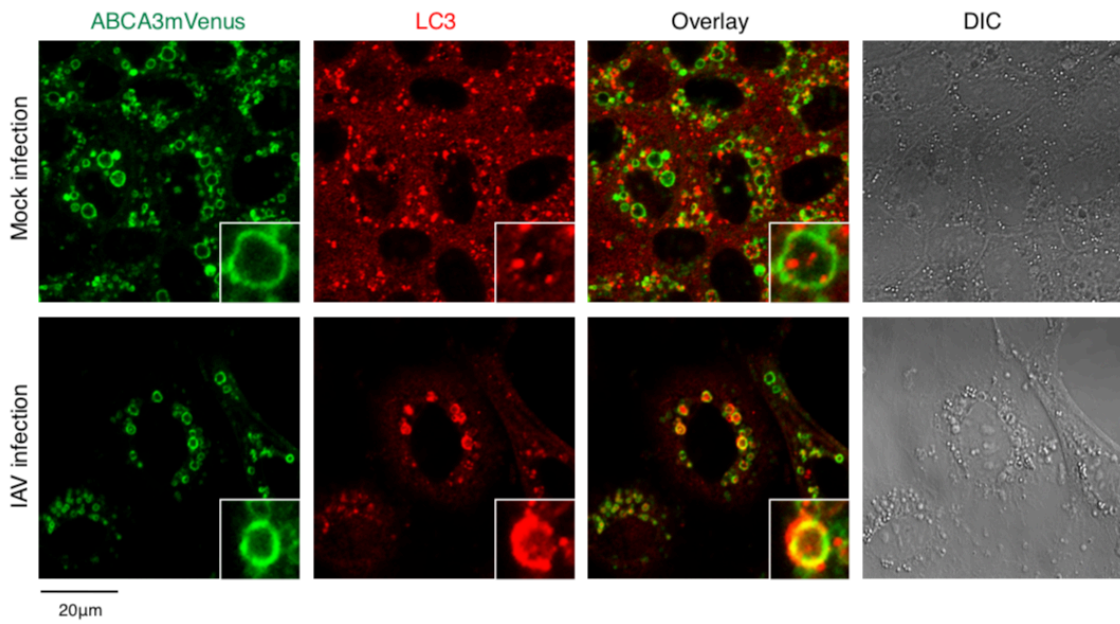
18A



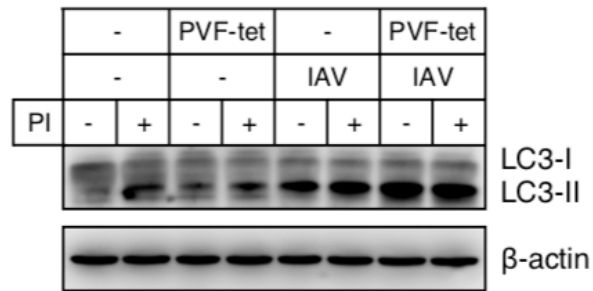
18B



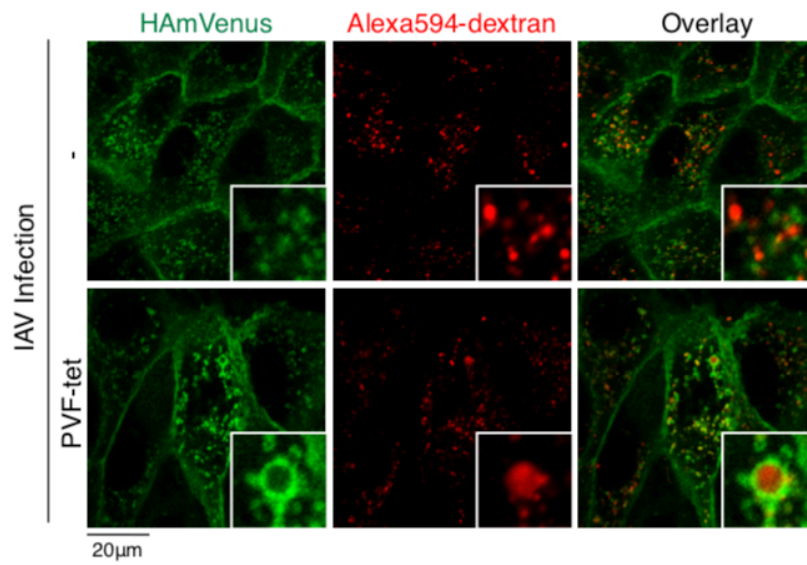
18C



18D



18E



## 図 18. 液胞状オルガネラはアンフィソームである

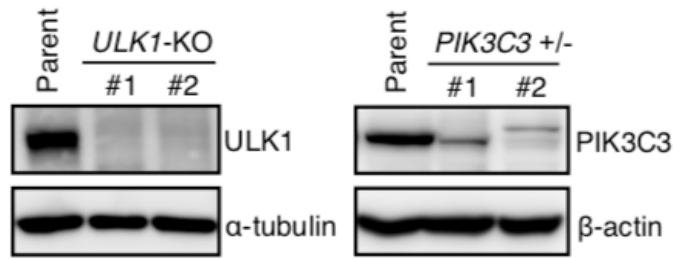
**(A-B)** 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、HA と LC3 **(A)**あるいは p62 **(B)** の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。

**(C)** 単層 MDCK-ABCA3mVenus 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、さらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、ABCA3mVenus と LC3 の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。

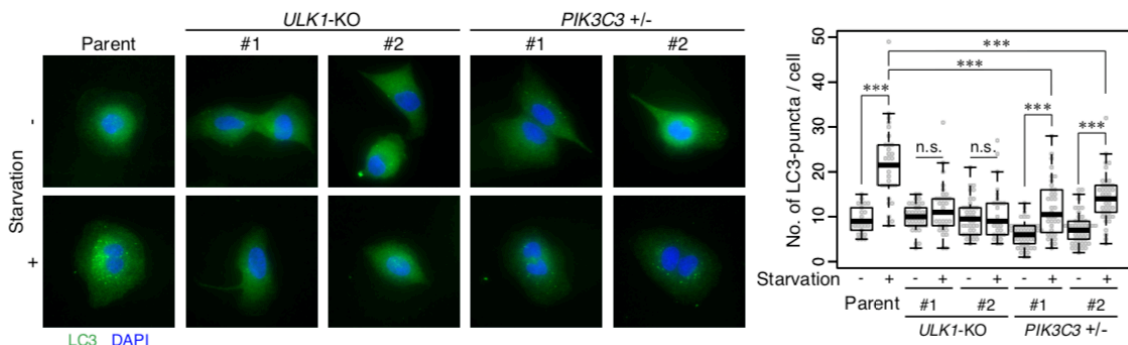
**(D)** 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。さらに感染 3 時間後、0.1% DMSO (-) あるいはリソソームプロテアーゼ阻害剤 (PI) を添加し、13 時間の培養を行った。感染 16 時間後、Lysis buffer により細胞を溶解・回収し、各タンパク質の発現をウェスタンブロット法により解析した。

**(E)** 単層 MDCK 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 15 時間後、Alexa594-dextran (250  $\mu$ g/ml) を添加し、さらに 1 時間の培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、HAmVenus と dextran の細胞内局在を解析した。

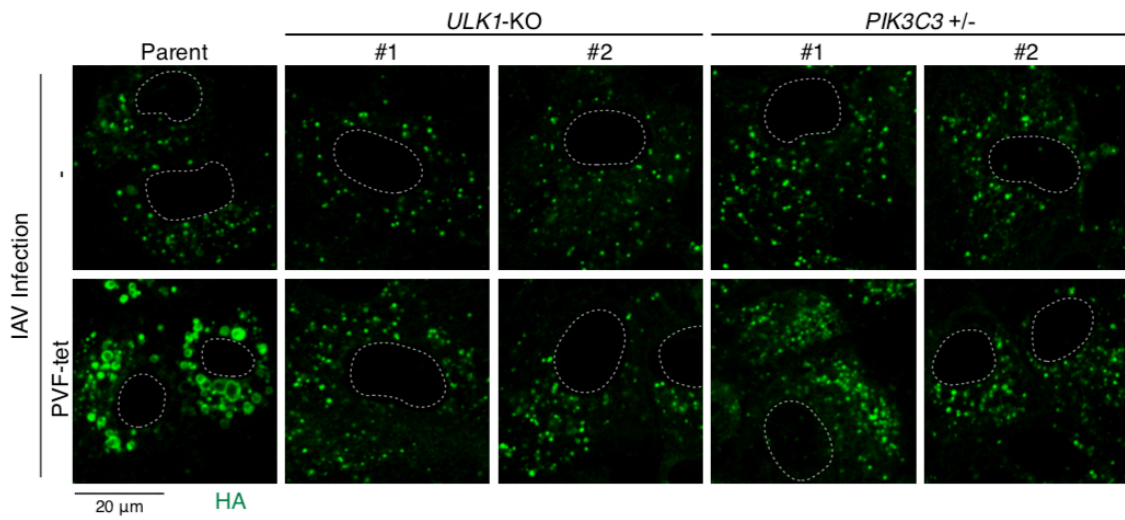
19A



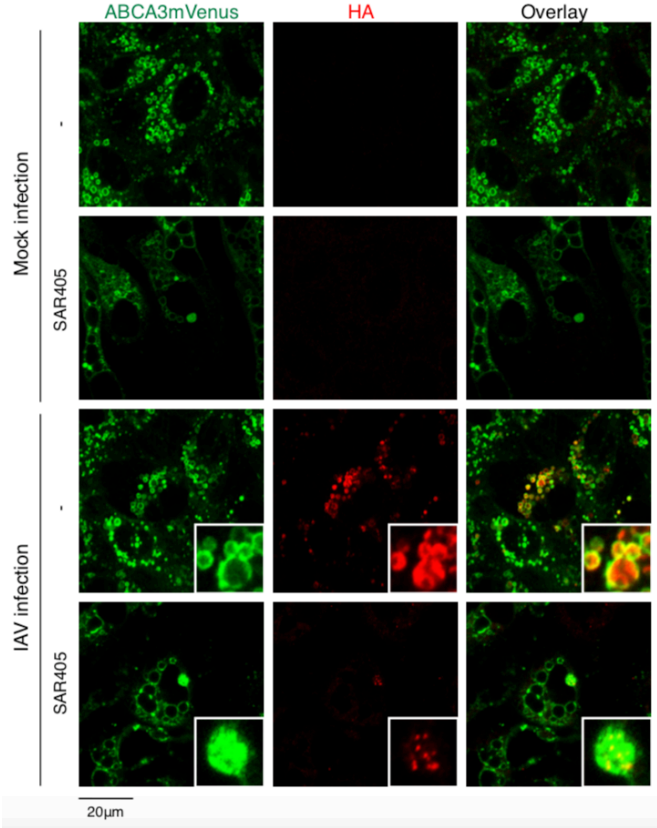
19B



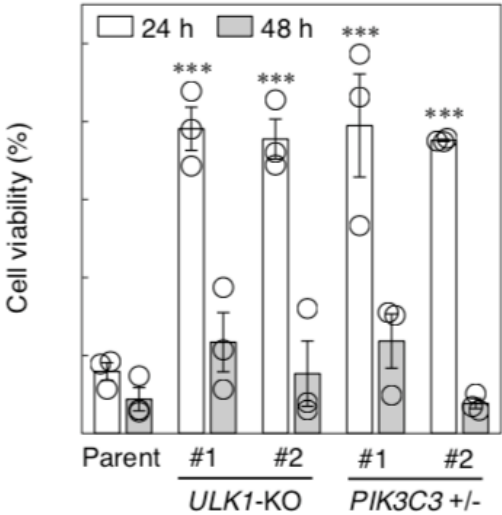
19C



19D



19E



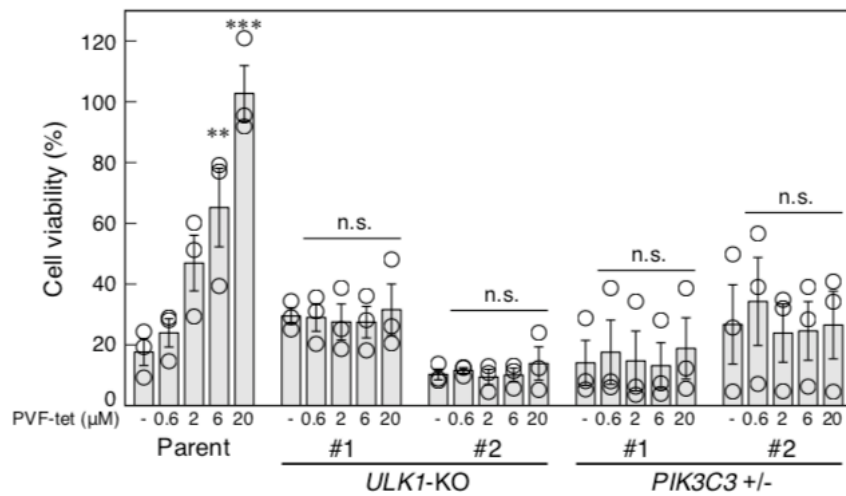


図 19. 液胞状オルガネラの形成はオートファジーの分子機構に依存する

(A) 親株ならびに ULK1-KO 細胞クローン、PIK3C3-KO 細胞クローンについて、ウェスタブロット法により ULK1 ならびに PIK3C3 の発現を解析した。

(B) 親株ならびに ULK1-KO 細胞クローン、PIK3C3-KO 細胞クローンを培養培地中あるいは HBSS(+) 中で培養した。培養 24 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、LC3 の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。蛍光顕微鏡像を CCD カメラにより撮像し、各サンプルにつき最低 25 個以上の細胞について、LC3 puncta の数を計数した。グラフは、箱ひげ図ならびに個々の細胞の計数値をビースウォームプロットにより示している。なお、箱ひげ図のひげ長は、四分位範囲の 1.5 倍を上下限の基準として示している。\*\*\* $P < 0.001$  (by Mann-Whitney U test). n.s., not significant.

(C) 単層 MDCK 細胞 (親株ならびに ULK1-KO 細胞クローン、PIK3C3-KO 細胞クローン) を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20 μM) 存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、HA の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。図中の点線は核を示している。

(D) 単層 MDCK-ABCA3mVenus 細胞を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、100 nM の SAR405 を添加し、さらなる培養を行った。感染 16 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PFA 固定を行い、ABCA3mVenus と HA の細胞内局在を免疫蛍光染色法により解析した。

(E) 単層 MDCK 細胞 (親株ならびに ULK1-KO 細胞クローン、PIK3C3-KO 細胞クローン) を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、さら

なる培養を行った。感染 24 時間後ならびに 48 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。各グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示しており、ドットは各回の実験値を表している。\*\*\*P < 0.001 (compared with parent at 24 h by ANOVA followed by one-sided Dunnett's test). n.s., not significant.

**(F)** 単層 MDCK 細胞 (親株ならびに ULK1-KO 細胞クローン、PIK3C3-KO 細胞クローン) を 10 MOI の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後、D-PBS による洗浄操作ののち、PVF-tet (20  $\mu$ M) 存在下あるいは非存在下でさらなる培養を行った。親株については感染 24 時間後に、また ULK1-KO 細胞クローン及び PIK3C3-KO 細胞クローンについては感染 48 時間後に、D-PBS による洗浄操作ののち、細胞生存率の測定を行った。各グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示しており、ドットは各回の実験値を表している。\*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 (compared with no compound treatment by ANOVA followed by one-sided Dunnett's test). n.s., not significant.

## 第 6 章 個体致死感染に対する(D)PVF-tet の抗 IAV 活性の解析

### 6-1 本章の概要

IAV は吸気により生体内に取込まれたのち、上気道の鼻腔粘膜上皮、ならびに下気道の気管支粘膜上皮と肺胞上皮において感染し、増殖する。特に肺胞領域における IAV 感染は時に死に至る重篤な急性呼吸器障害を引き起こすことが知られている。肺胞は扁平な I 型上皮細胞 (AT-I 細胞) と円柱状の II 型肺胞上皮細胞 (AT-II 細胞) から構成され、前者は肺胞毛細血管内の血流との間でガス交換を、後者は肺胞恒常性の維持に必須とされる肺サーファクタントの分泌を担っている。肺胞領域における IAV 感染の主たる標的細胞は AT-II 細胞であり、IAV 感染に伴って AT-II 細胞の分泌する肺サーファクタント量が減少し、肺胞恒常性の破綻を引き起こされる<sup>55-57</sup>。特に、肺胞領域へと浸潤する好中球を中心とする激しい炎症反応は、IAV のクリアランスを担う一方で、肺胞構造を傷害することにより呼吸器障害を引き起こす<sup>58,59</sup>。そこで、本研究で開発した新規抗 IAV ペプチド(D)PVF-tet について、マウスを用いた個体致死感染モデルに対する抗 IAV 活性の検討を行った。さらに、これまでに見出した PVF-tet の抗 IAV メカニズムについても個体レベルでの検証を試みた。

### 6-2 実験方法

#### 6-2-1 実験試薬ならびに実験動物

- ・ 抗体

マウス抗 HA 抗体 (clone C102)	(Genetex)
ウサギ抗 HA 抗体	(Genetex)
マウス抗 ABCA3 抗体 (clone 3C9)	(Biolegend)
ウサギ抗 Pro-SP-C 抗体	(Abcam)
ウサギ抗 FITC 抗体	(Molecular Probes)
マウス抗 LC3 抗体 (clone 5F-10)	(Nano Tools)
Biotin 標識ラット抗 CD45 抗体 (clone 30-F11)	(Biolegend)
Biotin 標識ラット抗 CD16/32 抗体 (clone 93)	(Biolegend)
Biotin 標識ラット抗 EpCAM 抗体 (clone G8.8)	(Biolegend)

- ・ 生存解析ならびに肺 IAV 力価の定量

BALB/c マウス (♀)	(清水実験材料)
イソフルラン	(Wako)

#### 2-2-1. 細胞培養、IAV 感染実験に準ずる。

- ・ 肺組織の組織学的解析



SeaPlaque アガロース	(Lonza)
正常ヤギ血清	(GIBCO)
ProLong Diamond mounting media	(Thermo Fischer Scientific)
PARAPLAST PLUS Tissue Embedding Medium	(McCormick)
キシレン	(Nacalai Tesque)
ヘマトキシリン液	(Sigma-Aldrich)
1%エオシン Y 溶液	(武藤化学)
・ <b>ウェスタンブロット法</b>	
<b>3-2-1 ウェスタンブロット法</b> に準じる。	
・ <b>RT-PCR 法</b>	
<b>4-2-1 qRT-PCR 法</b> に準じる。	
・ <b>免疫磁気分離法</b>	
20G カニューレ針	(ニプロファーマ)
Dispase II	(合同酒精株式会社)
Dullbecco's modified eagle's medium (DMEM)	(GIBCO)
ウシ臍臓由来 DNase I	(Wako)
Cell strainer (70 μm)	(BD Falcon)
Dynabeads MyOne T1 Streptavidin magnetic beads	(Thermo Fischer Scientific)

## 6-2-2 マウス個体致死感染モデル

**生存解析** 個体感染実験には 6 週～8 週齢の BALB/c 系統マウス (♀) を用いた。マウス半数致死量の 10 倍量に相当する 2000 pfu の IAV PR8 株を各量の(D)PVF-tet と混合し、PBS 中に総液量 50 μl を 1 匹分の投与試料として氷上で調製した。非感染群、(D)PVF-tet 非投与群については、IAV PR8 株及び(D)PVF-tet を PBS に代えて投与試料の調製を行った。イソフルランにより吸氣的に麻酔処理を施したマウスの鼻腔に投与試料 50 μl を滴下することにより、経鼻注入を行った。各個体の体重ならびに生存について経時的にモニタリングを行い、(D)PVF-tet の抗 IAV 活性を評価した。また、IAV 感染後に(D)PVF-tet を投与する際には、2000 pfu の IAV PR8 株を液量 50 μl にて経鼻感染させた 6 時間後に、2.5 mg/kg の(D)PVF-tet を液量 50 μl を経鼻的に投与した。

**肺 IAV 力価の定量** IAV 感染は上述の手順に従って行った。感染 3 日後あるいは 5 日後に過剰量のイソフルランによりマウスを安楽死させたのち、速やかに開胸し、全肺をトリプシン含有無血清培地中に摘出した。5 mm 径ジルコニアビーズ (TOMY) を 1 粒添加したのち、ビーズ式破碎装置 Micro Smash MS-100R (TOMY) を用いて組

織破碎を行った。遠心操作（4°C, 1,5000 g, 5 分間）の後、上清を回収し、**2-2-2 IAV の力価測定** の手順に従って肺 IAV 力価を定量した。

### 6-2-3 肺組織の免疫組織化学的解析

IAV 感染は **6-2-2** の手順に従って行った。感染 3 日後、過剰量のイソフルランによりマウスを安楽死させたのち、速やかに開胸し、全肺を 4%PFA/PBS 中に摘出した。室温で 72 時間の固定反応後、左肺を 5% SeaPlaque アガロース中に包埋し、Micro Slicer (DOSAKA) により 100 µm 厚切片を作製した。切片を 0.1% Tween-20/PBS (PBS-T) 中で 5 分間の膜透過処理反応を 2 回行ったのち、50% メタノール、80% メタノール中で 60 分間の脱脂質を順次行った。次いで、10% ヤギ血清/PBS-T により室温で 1 時間のブロッキング反応を行ったのち、各タンパク質に対する 1 次抗体を添加し、室温で 48 時間の標識反応を行った。反応後、PBS-T 中で 1 時間の洗浄を 4 回行ったのち、蛍光標識 2 次抗体を添加し、さらなる標識反応を行った。反応後、同様の洗浄操作ののち、ProLong Diamond マウント剤を用いて封入操作を行った。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Zeiss) を用いて取得した。

### 6-2-4 WB 法による肺組織のタンパク質発現解析

IAV 感染は **6-2-2** の手順に従って行った。感染 3 日後、過剰量のイソフルランによりマウスを安楽死させたのち、速やかに開腹後に左腎動脈を、次いで左総頸動脈を切断した。その後、開胸し、27G 針を装着したシリンジにより右心室へ 10 ml の PBS を送液することで肺の脱血処理を行った。脱血後、肺組織を 1 ml の Lysis buffer 中に摘出し、5 mm 径ジルコニアビーズを 1 粒添加したのち、ビーズ式破碎装置 Micro Smash MS-100R を用いて組織破碎を行った。遠心操作（4°C, 1,5000 g, 5 分間）の後、上清 Total Lung homogenate として回収し、**3-2-4** の手順に従ってサンプル調製を行ったのち、SDS-PAGE ならびに WB 法によりタンパク質発現の解析を行った。

### 6-2-4 WB 法による単離肺胞上皮細胞のタンパク質発現解析

IAV 感染は **6-2-2** の手順に従って行い、感染 40 時間後、脱血操作までを **6-2-4** の手順に従って行った。次いで、頸部の骨格筋ならびに結合組織を取り除きながら気管を露出させ、20G カニューレ針を気管内に挿入した。カニューレ管を気管内に留置したまま針を抜き取ったのち、シリンジにより 3 ml の 10 mg/ml Dispase II/DMEM（10% 非働化 FBS、100 units/ml Penicillin ならびに 100 µg/ml Streptomycin を含む。以下、DMEM と表記）を肺内へと送液し、さらに 0.5 ml の 1% SeaPlaque アガロースを送液した。その後、氷により胸部を急冷して気管ならびに気管支内のアガロースを固化させることにより、Dispase II 溶液の逆流防止、ならびに気管支上皮細胞の剥離防止を行った。全肺、心臓ならびに胸腺を PBS 中に摘出後、気管支を可能な限り除去しながら右肺葉及び左肺葉を 0.5 ml の 10 mg/ml Dispase

II/DMEM へと回収し、室温で 45 分間の細胞剥離反応を行った。反応後、ピンセットを用いて 100 units/ml の DNase I を含む DMEM 中で肺組織を 1 mm 角以下に細分化し、室温で 10 分間震とうすることで、剥離した上皮細胞を培地中へと放出させた。その後、70  $\mu$ m のセルストレーナーにより濾過を行ったのち、遠心操作 (4°C, 300 g, 10 分間) により細胞を回収した。以降の操作は全て氷上にて行った。回収したトータル肺細胞画分に、ビオチン標識抗 CD16/32 抗体ならびにビオチン標識抗 CD45 抗体を 5  $\mu$ l ずつ添加し、4°C において回転混和により 1 時間の抗体標識反応を行った。抗体反応後、遠心操作 (4°C, 300 g, 10 分間) により細胞を沈殿させ、未反応抗体の除去を行ったのち、25  $\mu$ l の Streptavidin magnetic beads を添加し、さらに 4°C において回転混和により 30 分間の反応を行った。反応後、マグネティックスタンドを用いて Streptavidin magnetic beads を除去し、非結合画分を回収した。次いで、ビオチン標識抗 EpCAM 抗体を 5  $\mu$ l 添加し、4°C において回転混和により 1 時間の抗体標識反応を行った。その後、前述と同様の操作により Streptavidin magnetic beads による抗体標識細胞の回収を行った。マグネティックスタンドを用いて Streptavidin magnetic beads を D-PBS により 3 度洗浄し、肺胞上皮細胞濃縮画分を得た。本画分を 100  $\mu$ l の Lysis buffer 中に懸濁して超音波破碎処理を行ったのち、遠心操作 (4°C, 1,5000 g, 5 分間) により上清を Lysate として回収した。3-2-4 の手順に従ってサンプル調製を行ったのち、SDS-PAGE ならびに WB 法によりタンパク質発現の解析を行った。

なお、トータル肺細胞画分ならびに肺胞上皮細胞濃縮画分の一部について 3.75% PFA/PBS による固定後、免疫蛍光染色により Pro-SP-C タンパク質を検出し、AT-II 細胞が濃縮されていることを確認した。

#### 6-2-5 IAV 感染に伴う肺組織炎症の解析

##### 組織学的解析

IAV 感染は 6-2-2 の手順に従って行った。感染 3 日後、過剰量のイソフルランによりマウスを安楽死させたのち、速やかに開胸し、全肺を 4%PFA/PBS 中に摘出した。室温で 72 時間の固定反応後、左肺を切り分け、以降の切片作製に用いた。肺を 50%、75%、80%、100% エタノール中において各 10 分間、室温で振盪させることで脱水処理を行った。次いで、50% キシレン/エタノール中において 10 分間、室温で振盪させたのち、さらに 100% キシレン中において 10 分間の振盪を 3 度繰り返し、透徹処理を行った。次いで肺をパラフィンへと包埋し、氷冷下で固化反応を行った。固化反応後、マイクロトーム (Leica) を用いて 10  $\mu$ m 厚パラフィン切片を作製し、キシレン処理ならびにエタノール処理による脱パラフィン操作ののち、ヘマトキシリン液及びエオシン液による染色 (HE 染色) を行った。染色後、再度エタノール処理ならびにキシレン処理により透徹操作を行ったのち、ソフトマウント封入剤により封入操作を行い、肺組織像は実体顕微鏡下で観察した。

### 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の解析

IAV 感染は **6-2-2** の手順に従って行った。感染 3 日後、過剰量のイソフルランによりマウスを安楽死させたのち、**6-2-4** の手順に従って、気管にカニューレ管を挿入した。1 ml の冷 PBS をシリンジによる気管支ならびに肺内へと送液し、次いで回収することにより気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。マウス一匹あたり 3 回の BAL 操作を行い、2.4 ml 程度の BAL fluid (BALF) を得た。遠心操作 (4°C, 1,000 g, 5 分間) により BALF 細胞ならびに上清をそれぞれ分離し、BALF 細胞数を計数するとともに、上清中の IL-6 タンパク質量を定量 ELISA キットにより、製品書の手順に従って定量した。

### サイトカインの定量

IAV 感染は **6-2-2** の手順に従って行った。感染 3 日後、過剰量のイソフルランによりマウスを安楽死させたのち開胸し、全肺を摘出後、速やかに液体窒素で急凍結を行った。凍結肺に 1 ml の Sepasol を添加し、5 mm 径ジルコニアビーズを 1 粒添加したのち、ビーズ式破碎装置 Micro Smash MS-100R を用いて組織破碎を行った。以降の RNA 抽出操作、cDNA 合成反応ならびに qRT-PCR 反応は **4-2-6** の手順に従って行った。なお、cDNA 合成反応には Random hexamer を、qRT-PCR 反応には表 3 に示すオリゴ DNA をプライマーとして用いた。

## 6-3 結果

### 6-3-1 (D)PVF-tet はマウス個体致死感染をレスキューする

マウス半数致死量の 10 倍量に相当する 2000 pfu の IAV PR8 株を経鼻感染させた際には、感染 3 日後から顕著な体重減少が観察され、次いで感染 6 日後から 8 日後にかけて全例が死亡した (図 20A)。本感染条件において、(D)PVF-tet を 1.25 mg/kg ならびに 2.5 mg/kg の (D)PVF-tet を感染と同時に投与すると、体重減少の緩和とともに、それぞれ 10%ならびに 50%の個体が生存することを見出した。また、IAV 感染 6 時間後に (D)PVF-tet を投与した場合にも、同時に投与した場合と同等の抗 IAV 活性を示すことを見出した (図 20B)。さらに、同感染条件において肺 IAV 力価を定量したところ、感染 3 日後ならびに 5 日後のいずれにおいても、(D)PVF-tet 投与群では有意な IAV 力価の減少が見られた (図 20C)。さらに、以上の結果は、(D)PVF-tet は個体致死感染に対しても有効な抗 IAV 薬であることを示している。

### 6-3-2 (D)PVF-tet は AT-II 細胞を作用標的とする

次に、個体感染時の (D)PVF-tet の作用標的の同定を試みた。肺胞領域における IAV の主要な標的細胞は AT-II 細胞であることがこれまでに報告されている<sup>56</sup>。そこで、致死感染後 3 日目の肺において、AT-II 細胞の特異的マーカー分子である Pro-SP-C の発現を解析したところ、報告と一致して<sup>55,57</sup>、IAV 感染に伴う Pro-SP-C の著減が観察された (図 21A, 21B)。一方で、(D)PVF-tet を投与した個体では Pro-SP-C の発現量が維持されていることを見出した。

この結果は、(D)PVF-tet の作用点が AT-II 細胞にあることを示唆している。

次に、このことをより詳細に解析するため、ABCA3 を AT-II 細胞の特異的マーカーとして、AT-II 細胞における HA、FITC-(D)PVF-tet の局在解析を行った。肺胞領域では、HA は ABCA3 陰性の AT-I 細胞においてはほとんど検出されず、主として AT-II 細胞において検出された。この結果は先行研究の報告と一致しており、マウスにおいても IAV 感染の主要な標的細胞が AT-II 細胞であることを示している。さらに、4-3-2 で見出した知見と一致して、内在的に ABCA3 を高発現している AT-II 細胞では、IAV 感染に伴って ABCA3 と HA の共局在が観察された (図 21C)。興味深いことに、IAV 感染マウス肺において、(D)PVF-tet は AT-I 細胞にはほとんど検出されない一方で、AT-II 細胞において強く検出され、さらに ABCA3 と同じコンパートメントに共局在していることを見出した。また、HA と (D)PVF-tet についても共局在が観察されたことから、すなわち個体感染時には、IAV 感染 AT-II 細胞内において、HA、(D)PVF-tet ならびに ABCA3 の三者が同じコンパートメントに共局在していることを示唆している (図 21C)。

これまでの結果をふまえて、(D)PVF-tet が AT-II 細胞においても、HA を隔離する誘導性アンフィソームの形成を促進している可能性を考えた。そこで、AT-II 細胞における LC3-II の産生量を解析するために、マウス肺から AT-II 細胞の単離を試みた。その結果、肺胞をディスペーゼ酵素により処理することで得られる細胞懸濁液 (AT-I 細胞、AT-II 細胞に加え、リンパ球、好中球、単球・マクロファージなどの白血球ならびに肺線維芽細胞を含む) を材料として、抗白血球抗原 (CD16/32 ならびに CD45) 抗体による **negative selection** と抗上皮細胞抗原 (EpCAM) 抗体による **positive selection** を組み合わせた免疫細胞磁気分離法により、AT-II 細胞を 6 割ほど含む肺胞上皮細胞の濃縮画分を得ることに成功した (図 21D)。各条件群のマウス個体から本画分を調製し、LC3 の発現を解析したところ、IAV 感染と同時に (D)PVF-tet を経鼻投与した群では、LC3-I に対する LC3-II の量比が増加傾向にあることを見出した。この結果は、MDCK 細胞において見出した PVF-tet の効果と一致している。

以上の一連の結果をまとめると、(D)PVF-tet は個体感染時において AT-II 細胞内へとターゲティングし、誘導性アンフィソームの形成を亢進することにより、IAV の増殖ならびに AT-II 細胞に対する細胞傷害活性を抑制していることが示唆される。

### 6-3-3 (D)PVF-tet は IAV 感染時の炎症反応を緩和する

AT-II 細胞が合成、貯蔵ならびに分泌を担う肺サーファクタントは肺恒常性の維持に重要であり、特に Pro-SP-C の成熟型である SP-C は抗炎症機能を持つことが近年明らかになっている<sup>60</sup>。そこで、IAV 感染時の肺炎症応答に対する (D)PVF-tet の効果についても検討を行った。まず、肺組織切片の HE 染色により病理像の観察を行ったところ、IAV 感染 3 日後の個体の肺では、肺胞毛細血管の周辺部において多数の白血球浸潤が観察された (図 22A)。一

方で、(D)PVF-tet の投与によって体重減少が緩和されている個体の肺では、この浸潤が抑制傾向にあることを見出した。

次に、IAV 感染時に発現誘導されることが報告されている一連のサイトカインについて、その肺における mRNA の発現量を定量した。致死感染条件 3 日目には、TNF- $\alpha$  をはじめとする種々の炎症性サイトカインの中でも、特に IL-6 が強く誘導されていることを見出した (図 22B)。興味深いことに、これらのサイトカインの内、IL-6 の発現量のみが(D)PVF-tet 投与群で有意に減弱することを見出した。また、BALF 中の IL-6 分泌量を ELISA により定量したところ、(D)PVF-tet 投与群では、やはり有意に減弱することを見出した (図 22B, 最下段右)。

以上の一連の知見は、(D)PVF-tet が IAV の増殖ならびに細胞傷害を抑制するとともに、結果として肺組織炎症についても部分的に緩和していることを示唆している。

#### 6-4 考察

本章では、(D)PVF-tet がマウス個体致死感染に対しても優れた抗 IAV 活性を示すことを見出した。さらに、個体感染における(D)PVF-tet の作用標的は AT-II 細胞であり、その投与時には AT-II 細胞内で HA と共局在を示すこと、さらに AT-II 細胞における LC3-II の産生を亢進することを明らかにした。このことから、(D)PVF-tet 誘導性アンフィソームが AT-II 細胞においても IAV 感染に対する防御機構として機能していると考えられる。また、MDCK-ABCA3mVenus 細胞において観察された ABCA3 と HA との共局在が、AT-II 細胞の感染時においても起こっていることを明らかにした。先行研究では、本研究で見出した誘導性アンフィソームと構造的に良く一致する構造体が IAV 感染に伴って AT-II 細胞内に形成されることが報告されている<sup>57</sup>。これらのことをふまえると、AT-II 細胞においても、ABCA3 誘導性アンフィソームが形成されている可能性が十分に示唆される。さらに、(D)PVF-tet と ABCA3 についても共局在が観察されることから、AT-II 細胞においては、(D)PVF-tet ならびに ABCA3 の双方により誘導されるハイブリッド型アンフィソームが形成されていることが考えられる。

(D)PVF-tet は IAV 感染時の肺炎症応答についても、部分的な抑制効果を示した。個体感染時における(D)PVF-tet の作用標的が AT-II 細胞であることをふまえると、この炎症抑制効果についても、AT-II 細胞を介していることが予想される。その一つの可能性として、肺サーファクタントの関与を考えた。先行研究から、肺サーファクタントの分泌低下は様々な肺疾患モデルにおいて肺炎症反応を亢進することが報告されている<sup>61</sup>。特に、サーファクタントに含まれるアポタンパク質 SP-C は抗炎症機能を持つことから、その発現量の低下は直接的に肺炎症を亢進させる。IAV 感染マウス肺においても、SP-C の前駆体である Pro-SP-C の

発現量と共に肺サーファクタントの分泌量についても低下することが報告されており<sup>55,57</sup>、この低下が肺炎症の亢進に寄与していると推測される。このような背景をふまえると、(D)PVF-tet の投与による Pro-SP-C 発現量の回復が、IAV 感染に伴って過剰亢進する炎症反応の抑制につながっている可能性が十分に考えられる。

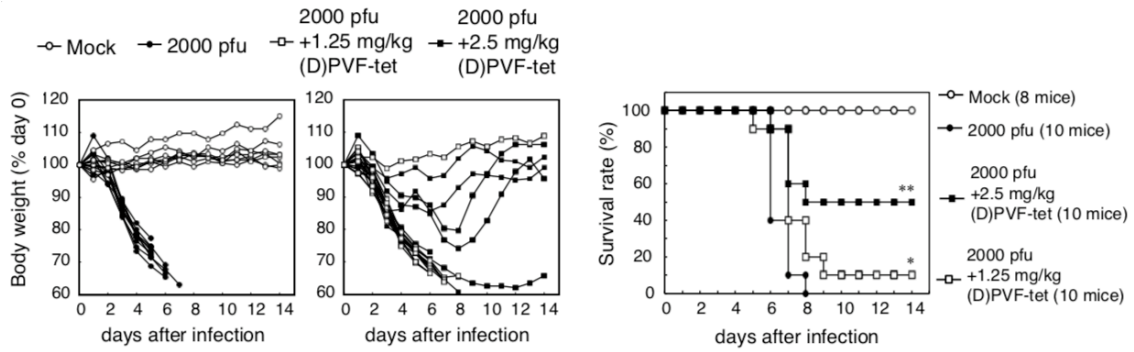
## 6-5 図表

表 3. 使用したオリゴ DNA の配列

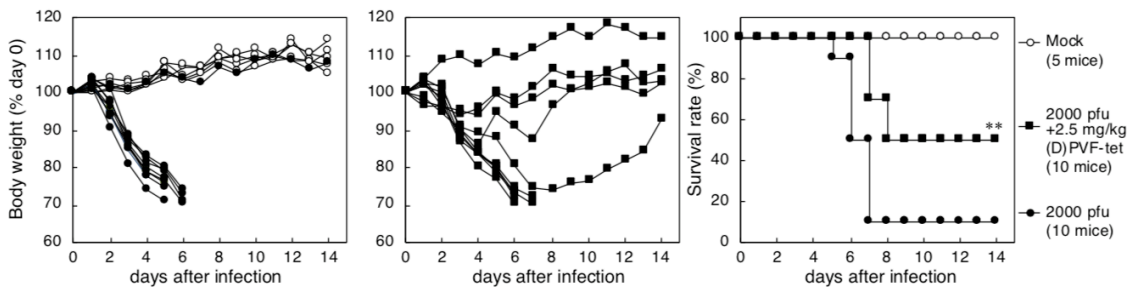
Oligo DNA name	
qRT-PCR primer	Sequence (5' to 3')
IL-15_F1	TTGAAGCTCTTACCTGGGCAT
IL-15_R1	TGAAGACATGAATGCCAGCCT
IL-12_F1	ATTACTCCGGACGGTTCACG
IL-12_R1	ACGCCATTCCACATGTCACT
IL-1 $\beta$ _F1	TGAAGTTGACGGACCCCAA
IL-1 $\beta$ _R1	TGATACTGCCTGCCTGAAGC
TNF- $\alpha$ _F2	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC
TNF- $\alpha$ _R2	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
MIP-1 $\alpha$ _F1	GCAACCAAGTCTTCTCAGCG
MIP-1 $\alpha$ _R1	GAGCAAAGGCTGCTGGTTTC
MIP-1 $\beta$ _F1	TTTCTCTTACACCTCCCGGC
MIP-1 $\beta$ _R1	GTCTGCCTCTTTTGGTCAGGA
IL-6_F2	GCCACAGTCCTTCAGAGAGAT
IL-6_R2	CTTGGTCCTTAGCCACTCCT
GAPDH_F1	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
GAPDH_R1	TTGCTGTTGAAGTCGTAGGAG



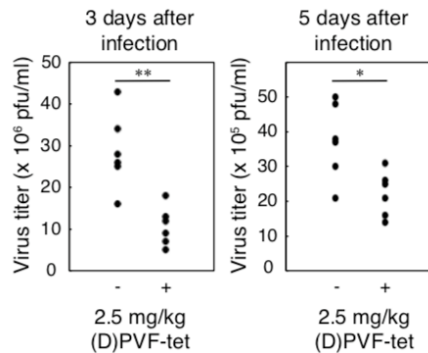
## 20A



## 20B



## 20C



### 図 20. (D)PVF-tet はマウス個体致死感染をレスキューする

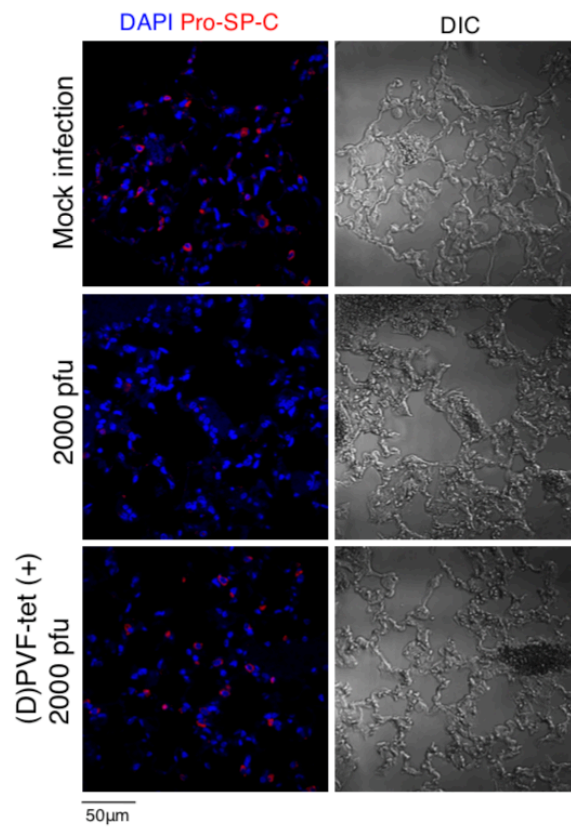
(A) BALB/c 系統マウス(♀)に PBS あるいは 2000 pfu (半数致死量の 10 倍に相当)の IAV PR8 株を各量の(D)PVF-tet と共に経鼻注入し、体重変化ならびに生存を経時的にモニタリングした。体重変化は感染当日 (day 0) の各個体の体重を 100%として、個体ごとの変化を示している。左図は非感染群 (Mock, open circle) ならびに IAV 感染群 (2000 pfu, closed circle) の体重変化を、また中央図は感染と同時に 1.25 mg/kg (open square) あるいは 2.5 mg/kg (closed square) の(D)PVF-tet を投与した群の体重変化を示している。\*P<0.05; \*\*P<0.01 (by Log rank test).

(B) BALB/c 系統マウス (♀) に 2000 pfu の IAV PR8 株を経鼻的に感染させた。感染 6 時

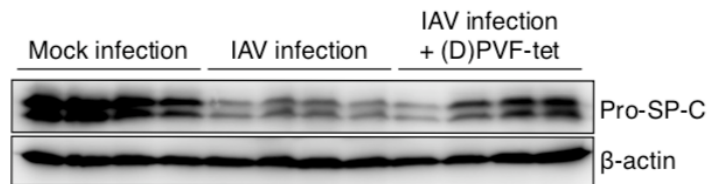
間後に 2.5 mg/kg の(D)PVF-tet を投与し、体重変化ならびに生存を経時的にモニタリングした。左図は非感染群 (Mock, open circle) ならびに IAV 感染群 (2000 pfu, closed circle) の体重変化を、また中央図は感染 6 時間後に 2.5 mg/kg (closed square) の(D)PVF-tet を投与した群の体重変化を示している。\*P<0.05; \*\*P < 0.01 (by Log rank test).\*\*P < 0.01 (by Log rank test).

**(C)** BALB/c 系統マウス (♀) を(A)と同じ条件で IAV ならびに 2.5 mg/kg の(D)PVF-tet を経鼻注入し、感染 3 日後ならびに 5 日後における肺 IAV 力価をプラークアッセイにより定量した。\*P < 0.05; \*\*P < 0.01 (by Mann-Whitney U test).

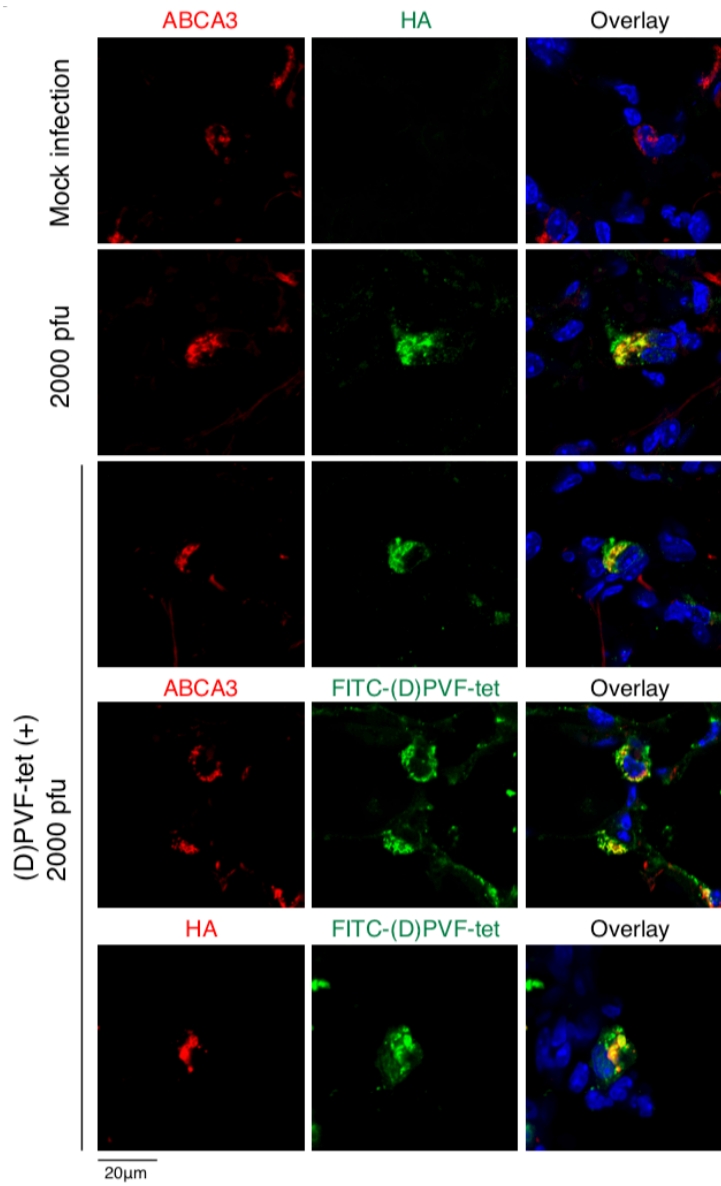
21A



21B



21C



21D

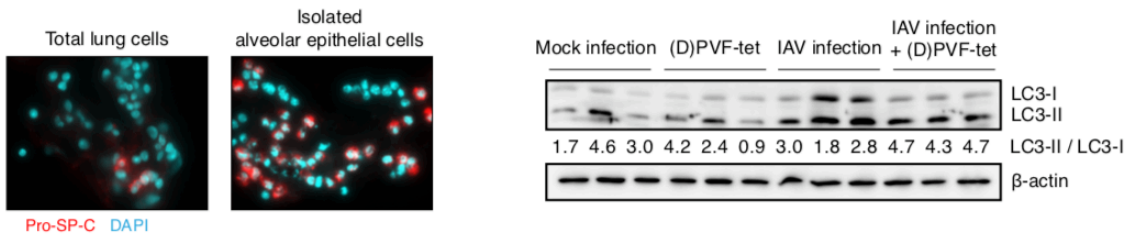


図 21. (D)PVF-tet は AT-II 細胞を作用標的とする

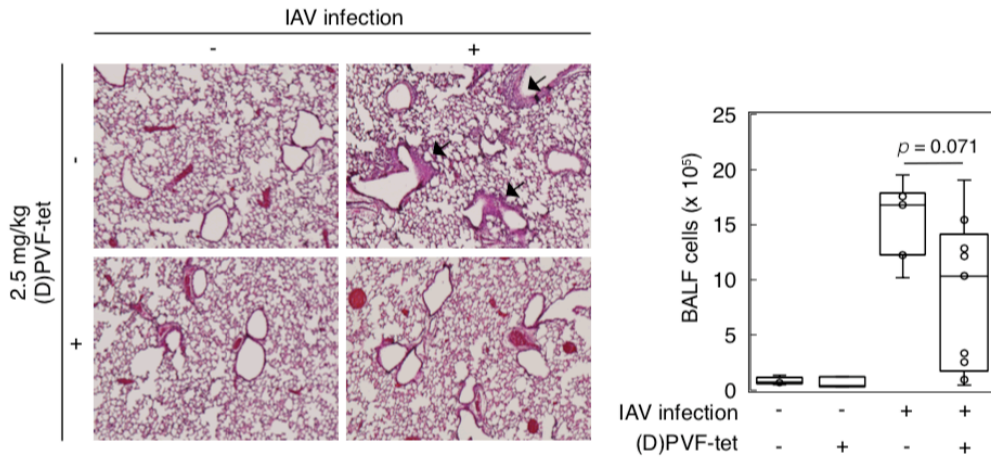
(A, B) BALB/c 系統マウス (♀) に PBS あるいは 2000 pfu の IAV PR8 株を 2.5 mg/kg の

(D)PVF-tet と共に経鼻注入した。感染 3 日後に肺を摘出し、Pro-SP-C の発現を免疫組織染色法(A)ならびにウェスタンブロット法(B)により解析した。

(C) BALB/c 系統マウス(♀)に PBS あるいは 2000 pfu の IAV PR8 株を 2.5 mg/kg の(D)PVF-tet あるいは FITC-(D)PVF-tet と共に経鼻注入した。感染 3 日後に肺を摘出し、肺泡領域における HA、ABCA3 ならびに FITC-(D)PVF-tet の局在を免疫組織染色法により解析した。

(D) BALB/c 系統マウス(♀)を(A)と同じ条件で IAV ならびに 2.5 mg/kg の(D)PVF-tet を経鼻注入し、感染 3 日後に免疫磁気分離法により AT-II 細胞濃縮画分の回収を行った。左図は AT-II 細胞マーカーである Pro-SP-C の発現を指標として、本法により AT-II 細胞が濃縮されていることを示している。各群から回収した AT-II 細胞濃縮画分における LC3 ならびに  $\beta$ -actin の発現量をウェスタンブロット法により解析した(右図)。

## 22A



## 22B

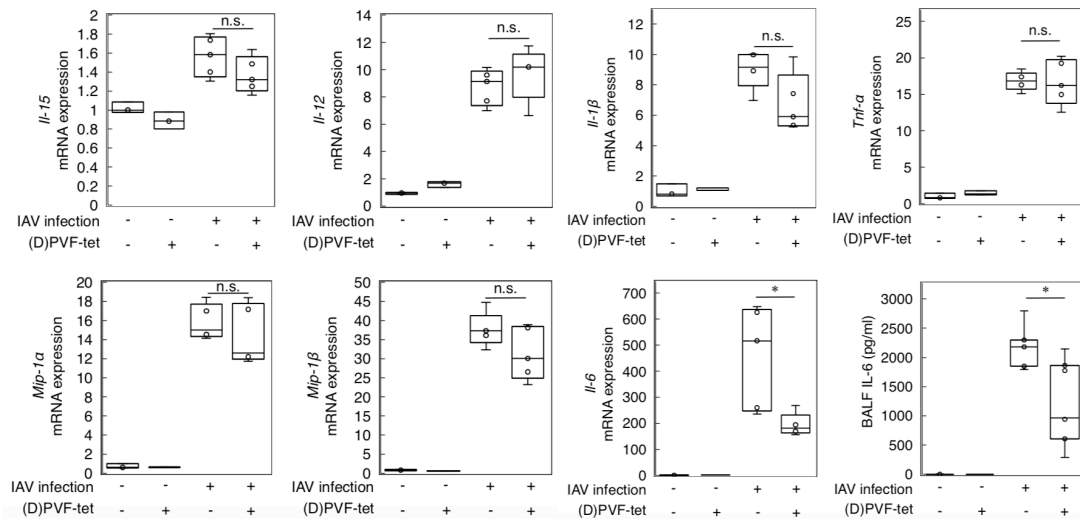


図 22. (D)PVF-tet は IAV 感染時の炎症反応を緩和する

(A) BALB/c 系統マウス(♀)に PBS あるいは 2000 pfu の IAV PR8 株を 2.5 mg/kg の(D)PVF-tet と共に経鼻注入した。感染 3 日後に肺を摘出後、パラフィン切片を作製し、HE 染色を行った。矢印は肺胞領域における白血球の浸潤を示している(左図)。同条件で BALF を回収し、各群の BALF 細胞数を計数した(右図)。P value は Mann-Whitney U test により算出した。

(B) BALB/c 系統マウス(♀)に PBS あるいは 2000 pfu の IAV PR8 株を 2.5 mg/kg の(D)PVF-tet と共に経鼻注入した。感染 3 日後に肺を摘出後、total RNA を抽出し、qRT-PCR により各サイトカインの mRNA 発現量を定量した。各サイトカインの mRNA の発現量は PBS 投与群(Mock)の平均を 1 とする相対値により表している。また、感染 3 日後に BALF を回収し、

ELISA により BALF 中 IL-6 タンパク質を定量した (下段右)。\*P < 0.05 (by Mann-Whitney U test). n.s., not significant.

## 第7章 結論

本研究では既存薬とは異なる作用機構を有する新規抗 IAV 薬の創製を目的として、HA を標的とする多価型ペプチド『PVF-tet』を開発した。一連の解析から、PVF-tet ならびにそのトリプシン耐性型である(D)PVF-tet は、培養細胞のみならずマウス個体レベルでの致死的な IAV 感染に対しても優れた抗 IAV 活性を示すことを見出している。

特に注目すべきは、そのユニークな抗 IAV メカニズムである (図 23)。IAV の感染サイクルの内、PVF-tet の作用標的は感染初期 (IAV の細胞内侵入) ではなく感染後期 (IAV の産生) にある。感染後期には、小胞体において合成された新生 HA がゴルジ体を介して、IAV 産生のある細胞膜表面まで輸送される (経路 i)。PVF-tet はそれ自体が高い細胞内移行活性を持ち、細胞内において新生 HA を標的として選択的に結合する。この際、新生 HA は PVF-tet を介して高度に集積することで、その細胞膜表面への輸送が障害されると共に、液胞状オルガネラへと隔離される (経路 ii)。これにより、IAV の産生ならびに細胞傷害活性は著しく抑制される。

また、本現象は PVF-tet 非存在下においても起こることを明らかにしている。すなわち、AT-II 細胞のように ABCA3 を高発現し、高いラメラボディ形成能を有する細胞 (経路 iii) では、IAV 感染時に新生 HA が高い効率で液胞状オルガネラへと隔離される (経路 iv)。この場合にも同様に、IAV の産生ならびに細胞傷害活性は抑制される。

一連の詳細な解析から、この液胞状オルガネラの実体がアンフィソームであること、したがってその形成には、オートファジーの分子機構 (ULK1 ならびに PIK3C3) が必須であることを明らかにした。特に、IAV 感染時において PVF-tet あるいは ABCA3 によりその形成が誘導されることから、通常アンフィソームと区別して、『誘導性アンフィソーム』と命名した。さらに重要な知見として、IAV に感染した AT-II 細胞内において、HA、(D)PVF-tet、ABCA3 の三者が共局在することを見出している。すなわち、AT-II 細胞では(D)PVF-tet 依存的な経路 ii ならびに ABCA3 依存的な経路 iv の双方によってハイブリッド型の誘導性アンフィソームが形成され、IAV 感染が強力に抑制されていることを示している。

近年、オートファゴソームにより細菌を選択的に隔離分解する xenophagy<sup>62</sup> や、ウイルス由来 RNA を感知して抗ウイルス遺伝子の発現を誘導する mitochondrial anti-viral signaling (MAVS) システム<sup>63,64</sup> など、病原微生物に対するオルガネラレベルでの生体防御機構が明らかとなっている。本研究では、誘導性アンフィソームが HA を選択的に隔離することで IAV 感染を抑制する抗 IAV オルガネラであることを新たに見出した。今後、誘導性アンフィソームの形成を制御する詳細な分子機構を解明することで、これまでになかった新たな抗 IAV 戦略の創出につながることを期待される。



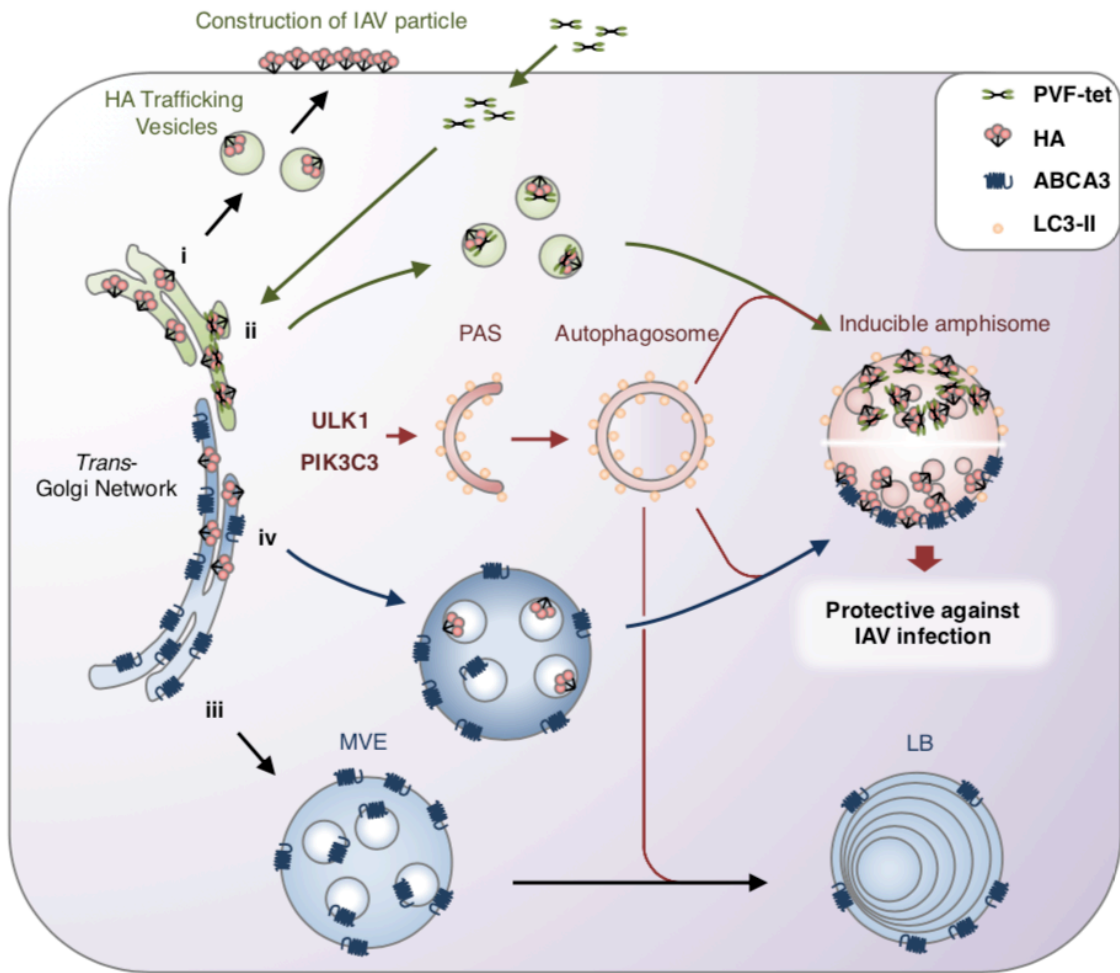


図 23. 誘導性アンフィソームによる抗 IAV 機構の概略図

## 引用文献

- 1 Simonsen, L. *et al.* Global mortality estimates for the 2009 Influenza Pandemic from the GLaMOR project: a modeling study. *PLoS medicine* **10**, e1001558, doi:10.1371/journal.pmed.1001558 (2013).
- 2 Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D49-53 (2008).
- 3 Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**, 931-939, doi:10.1038/nature08157 (2009).
- 4 Suzuki, H. *et al.* Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. *Journal of Infection and Chemotherapy* **9**, 195-200, doi:10.1007/s10156-003-0262-6 (2003).
- 5 Hayden, F. G. *et al.* Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. GG167 Influenza Study Group. *The New England journal of medicine* **337**, 874-880, doi:10.1056/nejm199709253371302 (1997).
- 6 Li, W. *et al.* Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**, 647-653 (1998).
- 7 Kubo, S., Tomozawa, T., Kakuta, M., Tokumitsu, A. & Yamashita, M. Laninamivir prodrug CS-8958, a long-acting neuraminidase inhibitor, shows superior anti-influenza virus activity after a single administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 1256-1264, doi:10.1128/aac.01311-09 (2010).
- 8 Moscona, A. Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. *The New England journal of medicine* **353**, 2633-2636, doi:10.1056/NEJMp058291 (2005).
- 9 Hayden, F. G. *et al.* Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *The New England journal of medicine* **379**, 913-923, doi:10.1056/NEJMoA1716197 (2018).
- 10 Russell, C. J., Hu, M. & Okda, F. A. Influenza Hemagglutinin Protein Stability, Activation, and Pandemic Risk. *Trends in Microbiology* **26**, 841-853, doi:10.1016/j.tim.2018.03.005 (2018).

- 11 Eierhoff, T., Hrincius Er Fau - Rescher, U., Rescher U Fau - Ludwig, S., Ludwig S Fau - Ehrhardt, C. & Ehrhardt, C. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog* (2010).
- 12 Fujioka, Y. *et al.* A Ca(2+)-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. *Nat Commun* **4**, 2763, doi:10.1038/ncomms3763 (2013).
- 13 Goto, H. & Kawaoka, Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10224-10228 (1998).
- 14 Kido, H. *et al.* Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *The Journal of biological chemistry* **267**, 13573-13579 (1992).
- 15 Gamblin, S. J. *et al.* The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1838-1842, doi:10.1126/science.1093155 (2004).
- 16 Sauter, N. K. *et al.* Hemagglutinins from two influenza virus variants bind to sialic acid derivatives with millimolar dissociation constants: a 500-MHz proton nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* **28**, 8388-8396 (1989).
- 17 Takemoto, D. K., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. A surface plasmon resonance assay for the binding of influenza virus hemagglutinin to its sialic acid receptor. *Virology* **217**, 452-458, doi:10.1006/viro.1996.0139 (1996).
- 18 Kato, M., Watanabe-Takahashi, M., Shimizu, E. & Nishikawa, K. Identification of a wide range of motifs inhibitory to shiga toxin by affinity-driven screening of customized divalent peptides synthesized on a membrane. *Applied and environmental microbiology* **81**, 1092-1100, doi:10.1128/aem.03517-14 (2015).
- 19 Mitsui, T. *et al.* Affinity-Based Screening of Tetravalent Peptides Identifies Subtype-Selective Neutralizers of Shiga Toxin 2d, a Highly

- Virulent Subtype, by Targeting a Unique Amino Acid Involved in Its Receptor Recognition. *Infection and immunity* **84**, 2653-2661, doi:10.1128/iai.00149-16 (2016).
- 20 Nishikawa, K. *et al.* A multivalent peptide library approach identifies a novel Shiga toxin inhibitor that induces aberrant cellular transport of the toxin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 2597-2599, doi:10.1096/fj.06-6572fje (2006).
- 21 Tsutsuki, K., Watanabe-Takahashi, M., Takenaka, Y., Kita, E. & Nishikawa, K. Identification of a peptide-based neutralizer that potently inhibits both Shiga toxins 1 and 2 by targeting specific receptor-binding regions. *Infection and immunity* **81**, 2133-2138, doi:10.1128/iai.01256-12 (2013).
- 22 Watanabe-Takahashi, M. *et al.* An orally applicable Shiga toxin neutralizer functions in the intestine to inhibit the intracellular transport of the toxin. *Infection and immunity* **78**, 177-183, doi:10.1128/iai.01022-09 (2010).
- 23 Yang, H. *et al.* Structure and receptor binding preferences of recombinant human A(H3N2) virus hemagglutinins. *Virology* **477**, 18-31, doi:10.1016/j.virol.2014.12.024 (2015).
- 24 Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**, 37-43, doi:10.1038/371037a0 (1994).
- 25 Martin, J. *et al.* Studies of the binding properties of influenza hemagglutinin receptor-site mutants. *Virology* **241**, 101-111 (1998).
- 26 Baenziger, J. U. & Fiete, D. Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *The Journal of biological chemistry* **254**, 789-795 (1979).
- 27 Ochiai, H., Sakai, S., Hirabayashi, T., Shimizu, Y. & Terasawa, K. Inhibitory effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type proton pump, on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells. *Antiviral Res* **27**, 425-430 (1995).
- 28 Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P. & Simons, K. Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *The*

- Journal of cell biology* **142**, 1413-1427 (1998).
- 29 Noda, Y. *et al.* KIFC3, a microtubule minus end-directed motor for the apical transport of annexin XIIIb-associated Triton-insoluble membranes. *The Journal of cell biology* **155**, 77-88, doi:10.1083/jcb.200108042 (2001).
- 30 Doyle C Fau - Roth, M. G., Roth Mg Fau - Sambrook, J., Sambrook J Fau - Gething, M. J. & Gething, M. J. Mutations in the cytoplasmic domain of the influenza virus hemagglutinin affect different stages of intracellular transport. *The Journal of cell biology* **100**, 704-714 (1985).
- 31 Futaki, S., Nakase, I., Suzuki, T., Youjun, Z. & Sugiura, Y. Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides. *Biochemistry* **41**, 7925-7930 (2002).
- 32 Futaki, S. *et al.* Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of biological chemistry* **276**, 5836-5840, doi:10.1074/jbc.M007540200 (2001).
- 33 Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* **8**, 2281-2308, doi:10.1038/nprot.2013.143 (2013).
- 34 Keller, P. & Simons, K. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *The Journal of cell biology* **140**, 1357-1367 (1998).
- 35 Scheiffele, P., Roth, M. G. & Simons, K. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *The EMBO journal* **16**, 5501-5508, doi:10.1093/emboj/16.18.5501 (1997).
- 36 Hariri, M. *et al.* Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Molecular biology of the cell* **11**, 255-268 (2000).
- 37 Lajoie, P., Guay, G., Dennis, J. W. & Nabi, I. R. The lipid composition of autophagic vacuoles regulates expression of multilamellar bodies. *Journal of cell science* **118**, 1991-2003, doi:10.1242/jcs.02324 (2005).
- 38 Cheong, N. *et al.* Functional and trafficking defects in ATP binding

- cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome. *The Journal of biological chemistry* **281**, 9791-9800, doi:10.1074/jbc.M507515200 (2006).
- 39 Berg, T. O., Fengsrud, M., Stromhaug, P. E., Berg, T. & Seglen, P. O. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *The Journal of biological chemistry* **273**, 21883-21892 (1998).
- 40 Fader, C. M. & Colombo, M. I. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell death and differentiation* **16**, 70-78, doi:10.1038/cdd.2008.168 (2009).
- 41 Yi, J. & Tang, X. M. The convergent point of the endocytic and autophagic pathways in leydig cells. *Cell research* **9**, 243-253, doi:10.1038/sj.cr.7290023 (1999).
- 42 Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-326, doi:10.1016/j.cell.2010.01.028 (2010).
- 43 Beale, R. *et al.* A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell host & microbe* **15**, 239-247, doi:10.1016/j.chom.2014.01.006 (2014).
- 44 Gannage, M. *et al.* Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell host & microbe* **6**, 367-380, doi:10.1016/j.chom.2009.09.005 (2009).
- 45 Ren, Y. *et al.* Proton Channel Activity of Influenza A Virus Matrix Protein 2 Contributes to Autophagy Arrest. *Journal of virology* **90**, 591-598, doi:10.1128/jvi.00576-15 (2016).
- 46 Wong, P. M., Puente, C., Ganley, I. G. & Jiang, X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* **9**, 124-137, doi:10.4161/auto.23323 (2013).
- 47 Nie, T. *et al.* Regulation of ER stress-induced autophagy by GSK3 $\beta$ -TIP60-ULK1 pathway. *Cell Death & Disease* **7**, e2563, doi:10.1038/cddis.2016.423 (2016).
- 48 Shimizu, S. Biological Roles of Alternative Autophagy. *Mol Cells* **41**,

- 50-54, doi:10.14348/molcells.2018.2215 (2018).
- 49 Yeganeh, B. *et al.* Autophagy activation is required for influenza A virus-induced apoptosis and replication. *Biochimica et biophysica acta* **1865**, 364-378, doi:10.1016/j.bbamcr.2017.10.014 (2018).
- 50 Golachowska, M. R., Hoekstra, D. & van, I. S. C. Recycling endosomes in apical plasma membrane domain formation and epithelial cell polarity. *Trends Cell Biol* **20**, 618-626, doi:10.1016/j.tcb.2010.08.004 (2010).
- 51 Khaminets, A. *et al.* Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature* **522**, 354-358, doi:10.1038/nature14498 (2015).
- 52 Mochida, K. *et al.* Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* **522**, 359-362, doi:10.1038/nature14506 (2015).
- 53 Pickles, S., Vigie, P. & Youle, R. J. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol* **28**, R170-R185, doi:10.1016/j.cub.2018.01.004 (2018).
- 54 Fujita, N. *et al.* Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *The Journal of cell biology* **203**, 115-128, doi:10.1083/jcb.201304188 (2013).
- 55 Hofer, C. C., Woods, P. S. & Davis, I. C. Infection of mice with influenza A/WSN/33 (H1N1) virus alters alveolar type II cell phenotype. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **308**, L628-638, doi:10.1152/ajplung.00373.2014 (2015).
- 56 Weinheimer, V. K. *et al.* Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *The Journal of infectious diseases* **206**, 1685-1694, doi:10.1093/infdis/jis455 (2012).
- 57 Woods, P. S. *et al.* Lethal H1N1 influenza A virus infection alters the murine alveolar type II cell surfactant lipidome. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **311**, L1160-11169, doi:10.1152/ajplung.00339.2016 (2016).
- 58 Camp, J. V. & Jonsson, C. B. A Role for Neutrophils in Viral

- Respiratory Disease. *Front Immunol* **8**, 550, doi:10.3389/fimmu.2017.00550 (2017).
- 59 Tate, M. D. *et al.* The role of neutrophils during mild and severe influenza virus infections of mice. *PLoS One* **6**, e17618, doi:10.1371/journal.pone.0017618 (2011).
- 60 Jin, H. *et al.* Surfactant protein C dampens inflammation by decreasing JAK/STAT activation during lung repair. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **314**, L882-L892, doi:10.1152/ajplung.00418.2017 (2018).
- 61 Glasser, S. W. *et al.* Persistence of LPS-induced lung inflammation in surfactant protein-C-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **49**, 845-854, doi:10.1165/rcmb.2012-0374OC (2013).
- 62 Gomes, L. C. & Dikic, I. Autophagy in antimicrobial immunity. *Molecular cell* **54**, 224-233, doi:10.1016/j.molcel.2014.03.009 (2014).
- 63 Dixit, E. *et al.* Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* **141**, 668-681, doi:10.1016/j.cell.2010.04.018 (2010).
- 64 Sharma, S. & Fitzgerald, K. A. Viral defense: it takes two MAVS to Tango. *Cell* **141**, 570-572, doi:10.1016/j.cell.2010.04.043 (2010).



## 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご支援をいただいた方々に心より感謝申し上げます。

同志社大学大学院生命医科学研究科 西川 喜代孝教授には学部四年次からの六年間、本研究の遂行ならびに博士学位論文、原著論文の執筆におきまして、終始一貫して厚く温かいご指導、ご鞭撻を賜りました。これまでの、そしてこれからの進路選択に悩んでいた折にも、私の希望に耳を傾け、懇切熱心なご助言、お導きを賜りました。先生の下で研究を学んだからこそ、絶え間なく前進し、成長を遂げることができたと実感しております。

ここに深謝の意を表します。

同志社大学生命医科学部 高橋 美帆助教には、学部四年次に研究室に配属された当時から現在に至るまで、研究を遂行するにあたり、終始的確なご指導を賜りました。当時、研究を学び始めて1年にも満たない私の実験案に熱心に耳を傾け、心ゆくまで様々な実験アプローチに挑戦する機会をいただいたこと、今でも鮮明に覚えております。この経験がなければ、これまでの私の成長は考えられません。

ここに心より感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、東京大学医科学研究所 山下 誠先生には、本研究に対する的確なご助言、ならびに本研究を遂行する上で基礎となる実験技術のご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。

本研究の中でも特に重要な位置付けにある電子顕微鏡像の解析では、兵庫県立大学 宮澤 淳夫教授、西野 有理助教、淵上 千晶技術員には多大なご支援、ご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

本研究の結論を導く上で不可欠な肺の組織学的解析では、同志社大学生命医科学部 宮坂 知宏准教授の懇切丁寧なご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。

同志社大学生命医科学部 池川 雅哉教授、舟本 聡准教授、齋藤 直人准教授、堀 哲也准教授、浦野 泰臣准教授、和久 剛助教、ならびに脳科学研究科 元山 純教授、御園生 裕明教授、渡辺 祥司助教には、本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました。心より感謝申し上げます。

同志社大学生命医科学部 野口 範子教授ならびに小林 聡教授には、本論文の審査にあたり、副査としての確かつ建設的なご助言を賜りました。厚く感謝申し上げます。

私の所属する分子生命化学研究室の皆様には、常日頃から多くのご支援を賜りました。特に博士後期課程の最終年度では、原著論文の投稿に追われ、研究室の持ち回りの仕事にほとんど手が回らない私を温かく支えていただいたこと、厚く感謝申し上げます。

同志社大学生命医科学部事務室の方々には、博士学生として生活を送る上で多くのお力添えを賜りました。深く御礼申し上げます。

最後に、博士後期課程への進学後も絶えず応援し、見守ってくれた家族に、心より感謝の意を表します。