

# 博 士 学 位 論 文

## 新規CaMKII阻害ペプチドによる A型インフルエンザウイルス感染制御法の確立

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 博士課程（後期課程）

分子生命化学研究室

2020 年度 2002 番 濱 信一郎

第 1 章	序論	3
第 2 章	M3 の細胞・個体レベルでの抗 IAV 活性	11
2-1	概要	11
2-2	実験方法	11
2-3	結果	14
2-3-1	現流行株に対する M3 の抗 IAV 活性の解析	14
2-3-2	IAV 感染モデルマウスにおける肺内ウイルス RNA と炎症性サイトカインの測定	15
2-4	考察	15
2-5	図表	17
第 3 章	M3 によるウイルス複製抑制機構	27
3-1	概要	27
3-2	実験方法	27
3-3	結果	30
3-3-1	M3 と内在性 CaMKII の直接結合の解析	30
3-3-2	IAV 感染時の CaMKII の活性化と M3 の阻害効果解析	30
3-3-3	CaMKII に対する siRNA の IAV 感染への影響	30
3-3-4	M3 のウイルスタンパク合成量への影響	31
3-3-5	M3 の total ウイルス RNA 合成量への影響	31
3-3-6	M3 の各ウイルス RNA (vRNA, cRNA, mRNA) 合成量への影響	31
3-4	考察	32
3-5	図表	33
第 4 章	M3 で制御される新たな I 型 IFN 発現誘導機構	47
4-1	概要	47

4-2	実験方法	47
4-3	結果	48
4-3-1	M3 の I 型 IFN 産生に及ぼす影響	48
4-3-2	M3 の Mx1 発現に及ぼす影響	49
4-3-3	バロキサビルの抗 IAV 活性	49
4-3-4	バロキサビルの I 型 IFN 産生に及ぼす影響	50
4-4	考察	50
4-5	図表	51
第 5 章	新たな I 型 IFN 発現誘導機構の解析	63
5-1	概要	63
5-2	実験方法	63
5-3	結果	66
5-3-1	A549 における M3 の抗ウイルス活性の解析	66
5-3-2	M3 の IRF3 の活性化に対する影響	66
5-3-3	M3 の TBK1 の活性化に対する影響	66
5-3-4	RIG-I KO 細胞における I 型 IFN 産生への影響	67
5-3-5	TBK1 inhibitor の抗ウイルス活性の解析	67
5-4	考察	67
5-5	図表	69
第 6 章	結論	76
引用文献		78
謝辞		84

## 第1章 序論

### 1-1 インフルエンザウイルスの性状とその治療薬

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、現在では世界で 300 万～500 万人が罹患し、30～50 万人の死者が確認されている<sup>1</sup>。典型的な症状として咳、発熱、咽頭痛、全身倦怠感を引き起こす。特に高齢者や免疫不全者といった患者は重症化するリスクが高く、深刻な合併症を引き起こす危険性がある<sup>2</sup>。

インフルエンザはインフルエンザウイルスの感染により発症する。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 はオルソミクスウイルス科に属する一本鎖 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 IAV の標的細胞への侵入を担う hemagglutinin (HA)、細胞内侵入後の脱殻を担う matrix protein 2 (M2)、新生 IAV の細胞放出を担う neuraminidase (NA) が存在する<sup>3</sup>。HA と NA の抗原性の違いによりさらに複数の亜型に分類される。例としては H1 型の HA と N1 型の NA を持つウイルスは H1N1 と呼称され、その他にも H3N2、H5N1 など様々な亜型の存在が報告されており、現在では季節性のインフルエンザとして H1N1 と H3N2 の亜型が主に流行している。

インフルエンザウイルスの感染を制御する抗 IAV 薬として、これまでに M2 阻害剤、NA 阻害剤、エンドヌクレアーゼ阻害剤が開発され、臨床応用されている<sup>4-6</sup>。この内、M2 阻害剤に対しては 2005 年以降、ほぼ 100% の IAV 臨床分離株において耐性化変異が認められていることから、現在では使用されていない<sup>7</sup>。このため、現在臨床的にはオセルタミビルに代表される NA 阻害剤やエンドヌクレアーゼ阻害剤であるバロキサビルが抗 IAV 薬として用いられている。NA 阻害剤は新生 IAV の細胞からの放出を阻害することにより、強力な抗 IAV 活性を示す。一方で、NA の活性中心部位のアミノ酸変異によって、NA 阻害剤の抗 IAV 活性が著しく減弱することが明らかとなっている<sup>8</sup>。実際に、これらの変異によって耐性を獲得した IAV が国内においても毎年 1% 程度の割合で検出されており、また 2008 年には全世界で 90% 以上の IAV が耐性化した過去がある。バロキサビルは 2018 年から臨床で使用された抗 IAV 薬であり、IAV がもつ PA のエンドヌクレアーゼ活性を阻害することにより IAV mRNA の合成を低下させウイルスの増殖を強力に阻害する<sup>9</sup>。しかしながら、すでにバロキサビルに耐性を有する変異株が分離されたウイルス全体の約 10% にのぼることが確認されており、耐性株の蔓延は防げない現状である<sup>10</sup>。

このような現状をふまえるとインフルエンザの治療基盤は十分であるとは言い難く、既存薬とは異なる作用機構を有する新規抗 IAV 薬の創製は喫緊の課題である。



## 1-2 宿主因子を標的とした抗ウイルス薬の開発戦略

耐性体ウイルスが出現しにくい新たな治療薬開発戦略の一つとして、ウイルス増殖に関与する宿主側の因子を標的とする創薬が注目されており、これまでに、宿主因子同定のための種々の試みが行われている<sup>11-14</sup>。なかでも 2010 年に報告された内容について、ヒトの肺胞上皮細胞を用いた網羅的解析の結果、インフルエンザウイルスの増殖に重要とされる候補分子が約 300 同定された。そしてこの中でも、CaMKII $\beta$  についてその阻害剤である KN-93 によりウイルスの増殖が抑制されること、つまり CaMKII $\beta$  がウイルス増殖に重要な役割を果たしていることが示されている（図 1-1）<sup>12</sup>。しかしながら、現在に至るまで IAV 感染における CaMKII の詳細な機能は解明されておらず、また既存の CaMKII 阻害剤で、個体レベルの感染実験で有効性が示された例もない。

## 1-3 CaMKII の機能と阻害剤の現状

CaMKII は  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼであり、CaMKII に  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン複合体が結合すると、CaMKII は自己リン酸化により活性化し、基質のリン酸化を行う。CaMKII は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の 4 つのサブタイプが存在し、それぞれ異なるゲノムにコードされ、多数のスプライシングバリエーションが存在する<sup>15-17</sup>。CaMKII  $\alpha$ ,  $\beta$  は脳に主に発現しており、CaMKII  $\gamma$ ,  $\delta$  はユビキタスに発現している<sup>18</sup>。

CaMKII は調節ドメイン、会合ドメイン、キナーゼドメインの 3 種類のドメインから構成される。最近 CaMKII の構造解析が行われ、その極めてユニークな高次構造が明らかとなった。すなわち会合ドメインを中心にして 12 分子が円盤状に核構造を形成し、調節ドメインによって触媒部位をパッキングされたキナーゼドメインが、核の周りに配置している（図 1-2）<sup>19</sup>。種々の刺激によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し、 $\text{Ca}^{2+}$ が結合したカルモジュリンが供給され、調節ドメインに結合するとパッキングがほどけ、12 量体の各々のキナーゼドメインが協調的に順次活性化してゆく。その結果、活性型キナーゼが核構造を中心にクラスター状態を形成し、効率のよい基質認識に結びつくと考えられている<sup>20,21</sup>。

既存の CaMKII 阻害剤として低分子化合物の KN-93 とペプチド性阻害剤の Autocamtide-2 related inhibitory Peptide (AIP) が挙げられる。KN-93 は、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン複合体を標的としており<sup>22</sup>、 $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 複合体の CaMKII への結合を阻害することで効果を発揮する。しかしながら、CaMKII 以外にも  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 複合体の直接結合により活性化される種々のタンパク質が知られていることから、その特異性には問題がある。AIP は、そのアミノ酸配列は制御ドメインに存在している自己リン酸化部位に由来する、autocamtide-2 (KKALRRQETVDAL) のリン酸化部位である Thr を Ala 置換したものである<sup>23,24</sup>。しかしながら、AIP は既存の配列に由来するため、各アミノ酸の相対的な重要性が不明であり、臨床応用に向けた、体内動態の制御や膜透過性、安定性の向上など、目的に合わせたさまざまな機能付加が困難であるという問題が存在する。

このため、阻害能力ならびに特異性に優れ、各種機能付加を可能とする一連の阻害薬が求

められている。ウイルス増殖に対する CaMKII の関与を正確に評価して治療薬につなげることは困難であると考えられる。

#### **1-4 多価型ペプチドライブラリー法による新規 CaMKII 阻害ペプチドの開発**

所属研究室ではこれまで、CaMKII の基質アミノ酸配列の特徴として、CaMKII によってリン酸化される Ser/Thr から-5 番目の Leu が、CaMKII の基質認識に重要であることを見出している。そこで、リン酸化部位となる Ser/Thr を Ala に置換し、-5 番目を Leu に固定したライブラリーを、多価型の核構造に導入することで、CaMKII に最適化した多価型ペプチドライブラリーを作成し、これを用いて CaMKII の触媒部位に結合するアミノ酸配列の同定を行った (図 1-3)。その結果、6 種類のモノマーペプチドである新規 CaMKII 阻害ペプチドとして M1-M6 を同定している (図 1-4)。これら M1-M6 は CaMKII の基質のリン酸化を濃度依存的に効率よく阻害することが示されている<sup>25</sup> (図 1-5)。

#### **1-5 本研究の目的**

上述の背景から CaMKII の触媒部位を標的とし特異的に CaMKII の酵素活性を阻害する新規ペプチド M1-M6 を用いてインフルエンザウイルス感染制御法を確立することを目的とした。また、未だ未解明である IAV 感染における CaMKII の機能を明らかにすることを目的とした。

1-6 図表

図 1-1

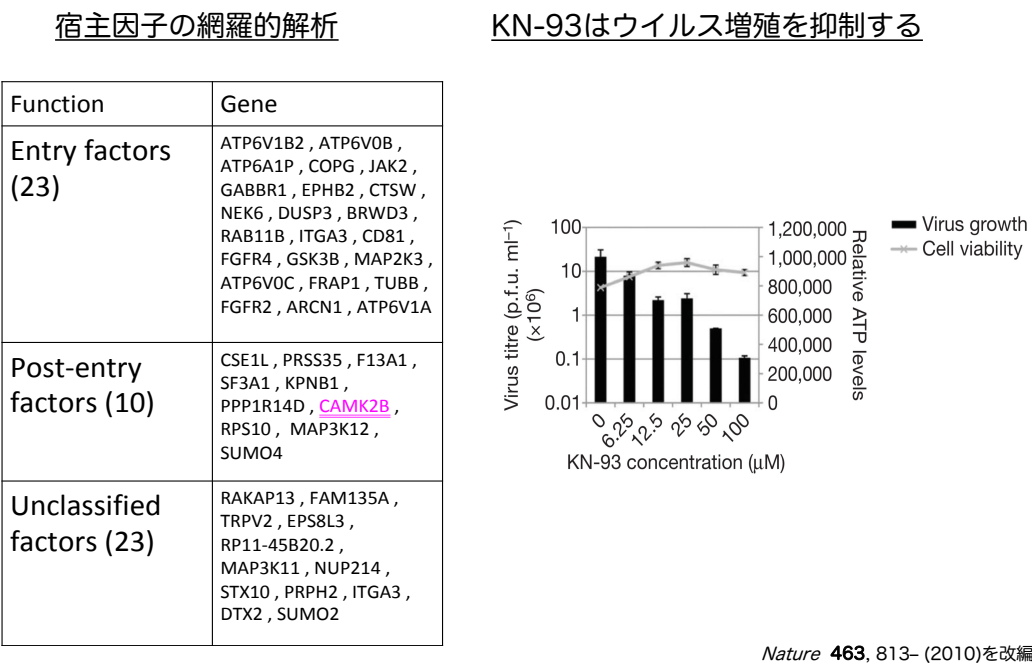
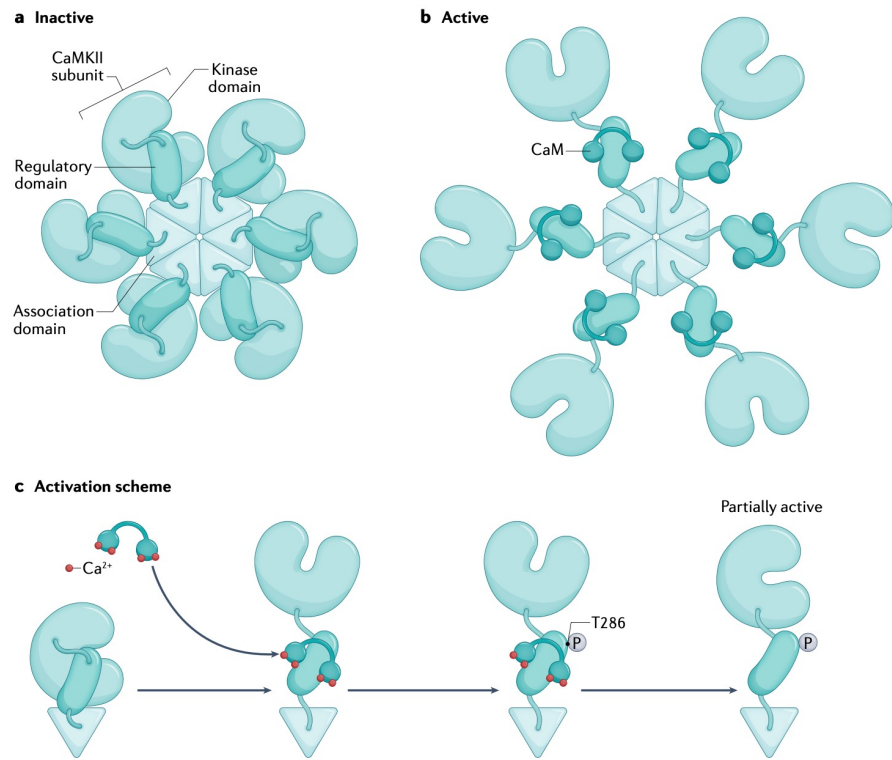


図 1-1. IAV 感染に関与する宿主因子の解析

左表) 2010 年にヒト肺胞上皮細胞を用いたスクリーニングの結果、ウイルス複製のステップごとに表にまとめたものである。右図) A549 細胞を用い、KN-93 のウイルス増殖抑制効果を検討したものであり、濃度依存的にウイルス増殖を阻害することを示している。すなわち、CaMKII がウイルス増殖に関与することを示している。

図 1-2

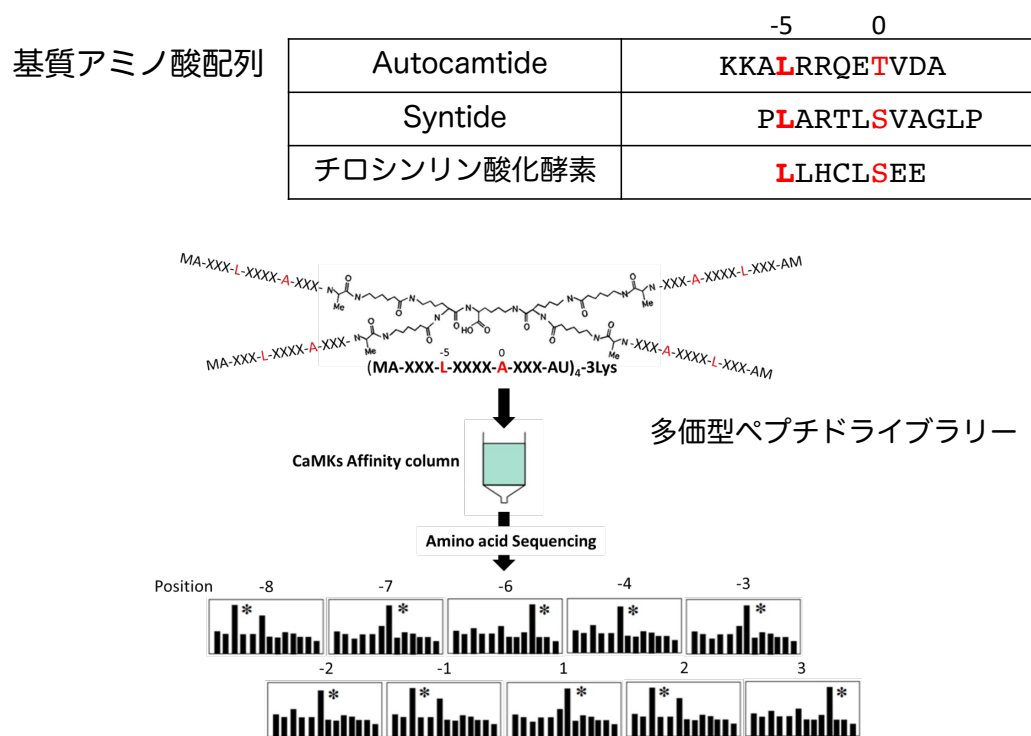


*Nat Rev Neurosci* (2022).

### 図 1-2. CaMKII の活性化機構

ホロ酵素は 12 個のサブユニットから成り、各サブユニットはキナーゼとして機能する。各サブユニットには、会合ドメイン、制御ドメイン、キナーゼドメインが存在し、会合ドメインを介して 12 量体を形成する。本図では CaMKII は 6 量体として描かれているが、実際には 2 つの 6 量体リングが重なった 12 量体であり、回転対称性と平面对称性を持っている。Ca<sup>2+</sup>と CaM が結合し、T286 がリン酸化されると、CaMKII に構造変化する。

図 1-3

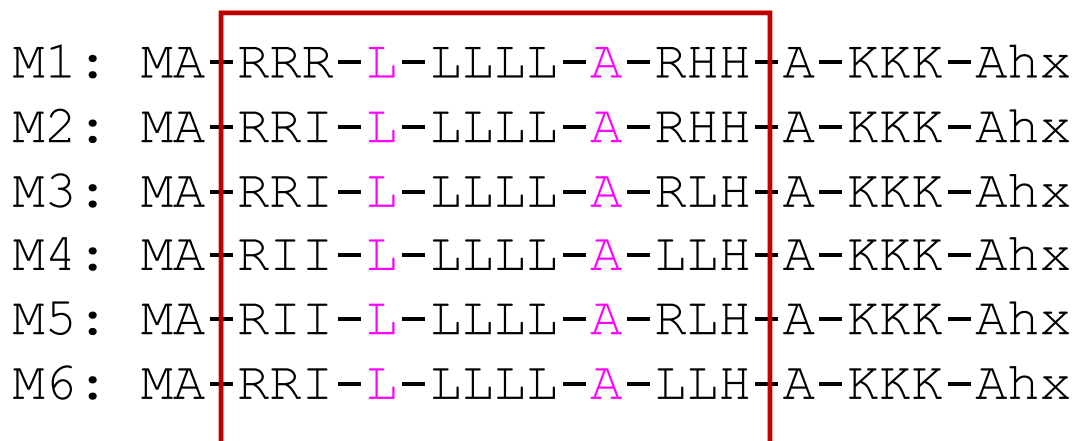


[特許第5754008号]

図 1-3. 多価型ペプチドライブラリー法による CaMKII 結合ペプチドの同定

CaMKII の基質アミノ酸配列の特徴として、CaMKII によってリン酸化される Ser/Thr から-5 番目の Leu が、基質認識に極めて重要である。そこで、リン酸化部位となる Ser/Thr を Ala に置換し、-5 番目を Leu に固定することにより CaMKII に最適化した多価型ペプチドライブラリーを作成し、CaMKII の触媒部位への高親和性結合活性を指標にスクリーニングを行った。

図 1-4



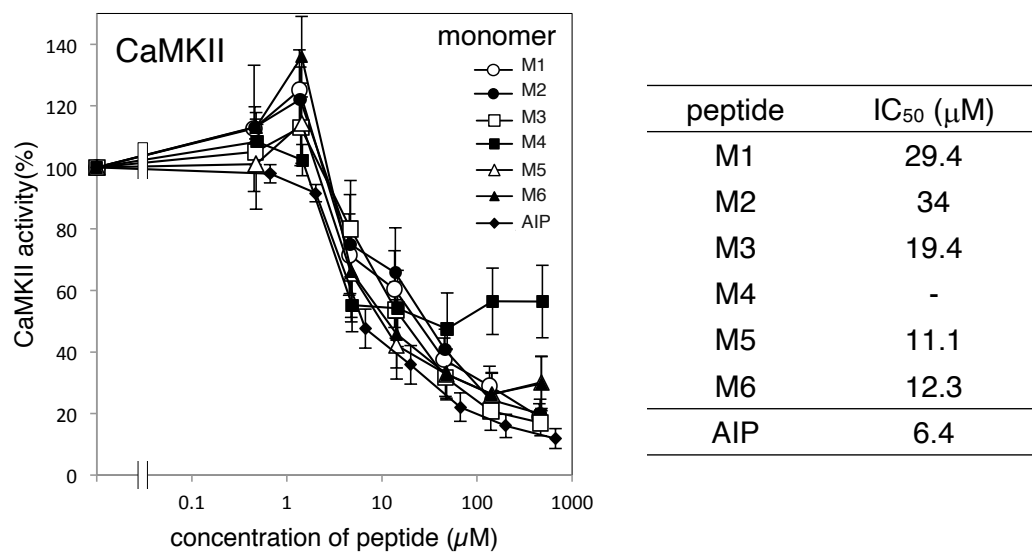
CaMKII結合モチーフ

[特許第5754008号]

図 1-4. 新規 CaMKII 阻害ペプチド

多価型ペプチドライブラリー法により 6 種類の新規 CaMKII 阻害ペプチドを同定した。赤四角は CaMKII の結合モチーフを表しており、N 末の KKK は水溶性を担保するために付加した。

図 1-5



[特許第5754008号]

図 1-5. 新規 CaMKII 阻害ペプチドの酵素阻害活性

CaMKII の酵素活性をリン酸化基質の放射活性を測定した。この際の放射活性を 100%とし、M1-M6 の酵素阻害活性から IC<sub>50</sub> を算出した。

## 第2章 M3の細胞・個体レベルでの抗IAV活性

### 2-1 概要

これまで多価型ペプチドライブラリー法により開発された新規 CaMKII 阻害ペプチド M1-M6 を用い、細胞傷害阻害活性を指標とした検討を行った。その結果、M3 は single-cycle infection と multi-cycle infection の2つの感染条件で行い最も高い阻害活性を持つこと、また KN-93 よりも高い抗ウイルス活性を示すことを見出した(図 2-1) <sup>26</sup>。そこで、本章では現在流行しているウイルス株 (H1N1pdm, H3N2, B 型) についても本ペプチドが抗ウイルス活性を発揮するかを検討した。

これまで、M3 は IAV 感染実験モデルにおいて高い治癒効果を有することを明らかにしている(図 2-2) <sup>26</sup>。そこで、実際に M3 がマウス個体内で効果を発揮しているかを検討するため、感染 3 日目の肺内のウイルス量を測定した。またその際感染 3 日目の炎症性サイトカイン量に対する効果についても検証した。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 実験試薬

##### ・MDCK 細胞の培養

Modified Eagle's Medium (MEM)	(Nacalai Tesque)
Fetal Bovine Serum (FBS)	(biosera)
Penicillin/Streptomycin Solution	(Nacalai Tesque)
Dulbecco's modified Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	(Nacalai Tesque)
0.25% Trypsin-EDTA	(Wako)

##### ・ウイルスの調製・力価の測定・濃縮

A/Puerto Rico/8/34 (H1N1 PR8 株)	
A/Aichi/2/68 (H3N2 Aichi 株)	(東大医科研から供与)
A/Tokyo/UT-BB131/2016 (H1N1pdm 株)	(       "      )
B/Wisconsin/01/2010 (Yamagata lineage)	(       "      )
MEM with HEPES	(GIBCO)
30% ウシ血清アルブミン (培養用)	(Wako)
200 mM L-Glutamine	(GIBCO)
2x MEM	(GIBCO)
DEAE-デキストラン	(Sigma-Aldrich)
Trypsin, Type X-S, From Porcine Pancreas	(Sigma-Aldrich)
Distilled Water	(GIBCO)
Opti-Prep (60%イオジキサノール)	(コスモ・バイオ)



10 x NTC (1M NaCl, 10mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH7.4)

・ペプチド

M3 : MA-RRI-L-LLLL-A-RLH-A-KKK-Ahx

・WST 法

Cell Counting Kit-8

(Nacalai Tesque)

・マウス感染実験

BALB/c マウス (♀) 6~8 週齢

(清水実験材料)

イソフルラン

(Wako)

・RNA 抽出

FastGene RNA Premium Kit

(日本ジェネティクス)

2M DTT

(富士フィルム和光)

・cDNA 合成

ReverTra Ace qPCR RT kit

(TOYOBO)

DEPC 水

(Nacalai Tesque)

・qPCR 法

THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix

(TOYOBO)

各種プライマー (表 1)

(Invitrogen)

## 2-2-2 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  $\mu$ g/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。75cm<sup>2</sup> フラスコ内で培養している MDCK 細胞を 5ml の D-PBS により洗浄後、2.5ml 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 8.5ml の培地で中和すると共に細胞を 15ml 円沈菅へと回収し、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、0.25ml を 10 ml の培地に希釈して新しい 75cm<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。

### 2-2-3 ウイルスの調製

IAV の調製は次の手順で行った。10 cm ディッシュに MDCK 細胞を播種し、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 PR8 株, H3N2 Aichi 株, H1N1pdm Tokyo 株, を添加した 2.5 ml のトリプシン含有無血清培地 (1  $\mu$ g/ml trypsin, 2mM L-glutamine, 0.2% BSA, 100 units/ml Penicillin and 100  $\mu$ g/ml Streptomycin in MEM with HEPES) を加え、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間インキュベートを行った。その後、ウイルス溶液を除去し、5ml の D-PBS で 3 回洗浄した後 7.5ml のトリプシン含有無血清培地で 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。

### 2-2-3 ウイルス力価の測定

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<sup>1</sup>~10<sup>6</sup> 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向きに静置し、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。

### 2-2-4 ウイルスの濃縮

14% イオジキサノール in NTC を作製し、超遠心用 12ml チューブに 2ml 入れる。その後、濃縮するウイルス培養液を 10ml 重層し、SW41Ti ローターにセットする。Optima L-90K Ultracentrifuge (BECKMAN COULTER) にローターをセットし、33,000rpm 4°C 90min 超遠心を行う。遠心後、チューブ内の溶液を全量除去し、無血清培地 (1  $\mu$ g/ml trypsin, 2mM L-glutamine, 0.2% BSA, 100 units/ml Penicillin and 100  $\mu$ g/ml Streptomycin in MEM with HEPES) で懸濁し濃縮を行う。その後、**2-2-3 ウイルス力価の測定**に従い、力価を測定する。

### 2-2-5 現流行株に対する M3 の抗ウイルス活性の解析

**Single-cycle infection** 96well プレートに細胞密度 3 x 10<sup>4</sup> cells/well で播種し、3 日間培養することで単層化させた MDCK 細胞を用いた。各濃度の M3 を単層 MDCK 細胞に添加し、

添加 30 分後に H3N2 Aichi 株、H1N1pdm Tokyo 株、B 型 Wisconsin 株を MDCK 細胞に感染させ、M3 処理による細胞生存率の変化を測定した。その際、H3N2 Aichi 株は MOI 1、H1N1pdm Tokyo 株は MOI 100、B 型 Wisconsin 株は MOI 1、で感染させた。図中の M3 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。

#### 2-2-6 IAV 感染モデルマウスにおける肺ウイルス RNA・炎症性サイトカインの測定

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 1.25mg/kg の M3 と混合し、PBS 中に総液量 50  $\mu$ l を 1 匹分の投与試料として氷上で調製した。非感染群、M3 非投与群については、IAV PR8 株及び M3 を D-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気的に麻酔処理を施したマウスの鼻腔に投与試料 50  $\mu$ l を滴下することにより、経鼻注入を行った。投与から 3 日後、マウスをイソフルランにより安楽死させ、肺を 2ml チューブに摘出し、FastGene RNA Premium Kit 付属の RL buffer 1ml とジルコニアビーズ 1 粒を加え、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、3000rpm 5min 20°Cで破碎した。ホモジネートサンプルを別の 2ml チューブへ移し、1000g 10min 20°C 遠心し、その上清を 2000g 5min 遠心した。その上清を 300ul 分 RL buffer 300ul で希釈し、RNA 抽出を FastGene RNA Premium Kit のプロトコル通り行った。

#### cDNA 合成

抽出した RNA を DEPC 水で希釈し、100ng 分の RNA から逆転写反応により cDNA を合成した。この際、65°C 5min 後に RT buffer, Primer mix, Enzyme mix を加え、37°C 15min 逆転写反応させ、95°C 5min 酵素失活反応させた。

#### qPCR 法

合成した cDNA を用いて、THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR 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)によりリアルタイム PCR を行った。その際、表 1 に示すプライマーセットを用いて、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 ddCt 法に基づいて NP または炎症性サイトカイン (IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) の mRNA の相対発現量を定量した。

### 2-3 結果

#### 2-3-1 現流行株に対する M3 の抗 IAV 活性の解析

シングルサイクルの感染条件を用い、現在流行しているインフルエンザウイルス株に対して M3 が抗ウイルス活性を示すかを検討した。2018/19 年シーズンの国立感染症研究所のウイルス分離・検出情報(図 2-3)を基に H3N2 Aichi 株、H1N1pdm Tokyo 株、B 型 Wisconsin 株の 3 種について検討を行った。その結果、いずれのウイルス株に対しても、M3

は高い抗ウイルス活性を示すことを見出した（図 2-4）。このことから、M3 は亜型を超えた、共通のウイルス増殖機構に対して阻害活性を発揮する、と考えられた。

### 2-3-2 IAV 感染モデルマウスにおける肺内ウイルス RNA と炎症性サイトカインの測定

感染 3 日目の肺組織を用いて、ウイルスタンパクである NP の mRNA 量、各種炎症性サイトカインの mRNA 発現量をそれぞれ qPCR 法により定量した。その結果、ウイルス感染によって、NP mRNA 量は感染により増加するのに対し、M3 処理によって肺内のウイルス RNA 量が顕著に減少していることを見出した（図 2-5）。

次に炎症性サイトカインである IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  の mRNA 量を qPCR で定量したところ、ウイルス感染単独で各種炎症性サイトカイン量著しく増加すること、これに対し、M3 共投与群ではいずれも顕著に減少すること、を見出した（図 2-6）。特にサイトカインストームとの密接な関連が示唆されている IL-6 産生に対してはほぼ完全に抑制することが示された。このことは、M3 は、感染に伴い惹起される激しい炎症を強く抑制する能力があることを示している。

## 2-4 考察

触媒部位を標的として開発された新規 CaMKII 阻害ペプチドである M3, M4 が抗 IAV 活性を持つことが示された。一方で、いずれのペプチドについても同程度の CaMKII の酵素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 M5, M6 は single-cycle infection で抗 IAV 活性を示すのに対し、multi-cycle-infection においては全く抗 IAV 活性を示さなかった。この原因として 2 つの理由が挙げられる。1 つは単純に抗 IAV 活性が低かったからだと考えられる。もう一つは multi-cycle infection での培地の組成は上述したように血清を含んでいないためペプチドの取り込みに影響しているのではないかと考えられる<sup>27,28</sup>。そのため、血清の有無による各ペプチドの取り込みについて検討する必要がある。

研究に汎用的に使用される PR8 株だけでなく現在流行している H3N2 Aichi 株・H1N1pdm Tokyo 株・B 型 Yamagata 株に対しても M3 は高い抗ウイルス活性を示した。本結果から、亜型に関係なくインフルエンザウイルス全般に対して M3 は効果があることが明らかとなり、毎年流行株が変化するインフルエンザの治療薬として非常に有用であると期待できる。M3 がこのように様々な亜型のウイルス株に活性がある理由として、感染時に CaMKII の活性化が必ず起きていることが考えられる。CaMKII は活性化するためには、Ca<sup>2+</sup>とカルモデュリンが結合し複合体を形成すること、すなわち細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が重要である。インフルエンザウイルスは、細胞表面のシアル酸-ガラクトース結合部位を標的として HA が結合し細胞内に侵入する。この時、認識するシアル酸は Ca<sup>2+</sup>チャネルを修飾しており、インフルエンザウイルスが結合した際に Ca<sup>2+</sup>チャネルが開き細胞内に Ca<sup>2+</sup>が流入することが明らかとなっている<sup>29</sup>。したがって、インフルエンザウイルスがシアル酸

-ガラクトース結合部位を細胞内侵入の受容体とする限り感染時には  $\text{Ca}^{2+}$  が流入すること、すなわち CaMKII が必ず活性化すると考えられる。

マウス感染実験において、M3 は IAV による致死性を完全に回復させた。その一方で KN-93 は M3 2.5mg/kg と等モル量投与したにも関わらず全く致死性を回復しなかった。M3 は CaMKII の活性を阻害することで抗ウイルス活性を示すことを個体レベルでも明らかにした初めての例である。KN-93 が全く効果を示さなかった理由として、KN-93 は *in vitro* の実験系において M3 と比較して抗ウイルス活性が低く、その IC50 値も 30 倍ほど違う点が考えられる。したがって、本実験で投与した KN-93 よりも 30 倍以上量を投与する効果を示す可能性が考えられる。

これまで、宿主因子を標的としたインフルエンザ治療薬の研究が進んでおり、様々な宿主因子の阻害剤を用いた研究が進んでいる（図 2-7）<sup>30</sup>。中でもプロテインキナーゼ群について研究が進んでおり、18 種のキナーゼについてその作用点・阻害剤の効果に関する研究がされている（図 2-8）<sup>31</sup>。特に効果が期待されているのが p38 阻害剤である。p38 は vRNA 合成・RNP の核外輸送・侵入・サイトカイン産生など IAV 感染の様々なステップに関与していることが明らかとなっている<sup>32,33</sup>。そのため、阻害剤の *in vivo* での有効性も検証されており、感染による致死性を 80%まで回復すること、サイトカインストームの原因であるとされる IL-6 産生量が 3 分の 1 にまで抑制されることが示されている。しかしながら、本研究で使用されている M3 は、致死性・IL-6 産生について p38 阻害剤より高い抑制効果を発揮しており、臨床的な応用への展開が期待される。

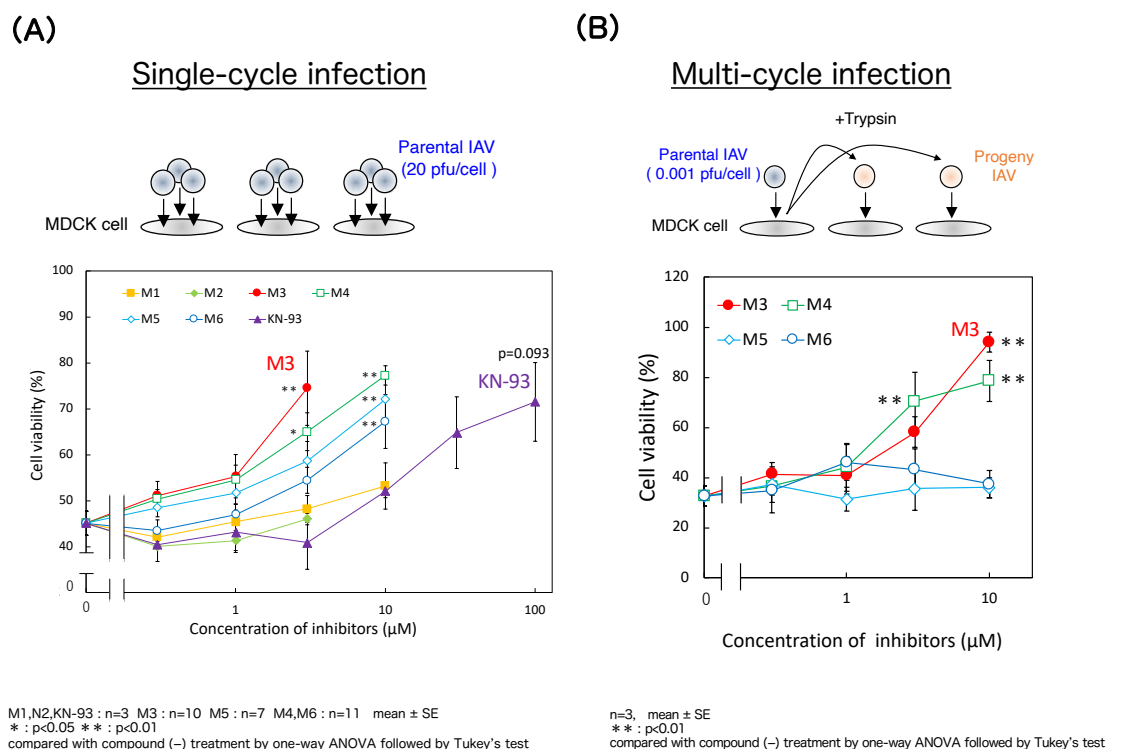
今後の展開として、M3 をさらに有効性の高い薬剤へと発展させてゆくためには、M3 を肺内により長く存在させることが有効であると考えられる。我々はこれまでに、腸管出血性大腸菌が産生する毒素の一種である Subtilase cytotoxin (SubAB) に対する高親和性ペプチド、FFP-tet を開発しているが、さらに FFP-tet を極小ビーズに高密度に安定して集積させる技術を確立している。本ビーズは SubAB を効率よく吸収することが可能である（図 2-9A）<sup>34</sup>。そこで本技術を利用し、M3 をトリプシン様プロテアーゼ切断配列とともに極小ビーズに高密度に集積させたものを作成する。本ビーズは肺内のプロテアーゼによって徐々に切断を受け、長時間に渡って M3 を供給することが可能となり、さらに M3 の有効性を向上させることが期待できる（図 2-9B）。さらにもう一つの利点として、本ビーズは肺胞内に存在している肺胞マクロファージ、並びに単球由来マクロファージに効率よく取り込まれることが期待される。これらマクロファージは IAV 感染時のサイトカインストームに関連すること、その活性化には CaMKII が重要な働きをしていること、が知られている。マクロファージ内に取り込まれた本ビーズは M3 を放出し、長期に渡って種々の炎症性サイトカインの産生抑制など、マクロファージの活性化を抑制できると期待される。

## 2-5 図表

表 1. 使用したオリゴ DNA の配列

qRT-PCR primer name	Sequence (5' to 3')	Ref.
GAPDH_F1	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	28
GAPDH_R1	TTGCTGTTGAAGTCGTAGGAG	28
IL-6_F2	GCCACAGTCCTTCAGAGAGAT	28
IL-6_R2	CTTGGTCCTTAGCCACTCCT	28
IL-1 $\beta$ _F1	TGAAGTTGACGGACCCCAAA	28
IL-1 $\beta$ _R1	TGATACTGCCTGCCTGAAGC	28
TNF- $\alpha$ _F2	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	28
TNF- $\alpha$ _R2	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	28
mIFNg_F1	CAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGG	MP206683 (ORIGENE)
mIFNg_R1	TTTCCGCTTCCTGAGGCTGGAT	MP206683 (ORIGENE)
IAV_NP_F	GACGATGCAACGGCTGGTCTG	28
IAV_NP_R	ACCATTGTTCCAACCTCCTTT	28

図 2-1



【特願 2018-163326】

修士論文, 濱信一郎, 同志社大学 (2020)

図 2-1. 新規 CaMKII 阻害ペプチドの細胞傷害阻害活性における評価

(A) 単層 MDCK 細胞を各濃度の化合物存在下において 20 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。

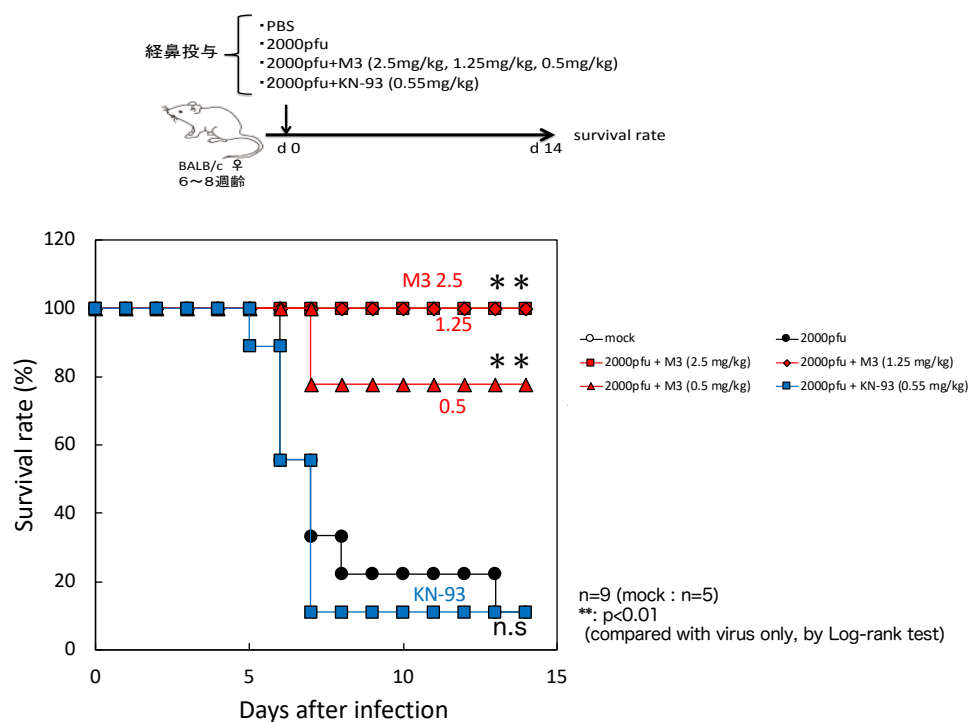
それぞれの平均回数を下記に示す。

M1, M2, KN-93 : n=3 M3 : n=10 M5 : n=7

M4, M6 : n=11 virus 単独 : n=16

(B) 単層 MDCK 細胞を各濃度の化合物存在下において 0.001MOI の IAV PR8 株に感染させた。この時、トリプシン含有非血清培地を用いた。感染 40 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。

図 2-2



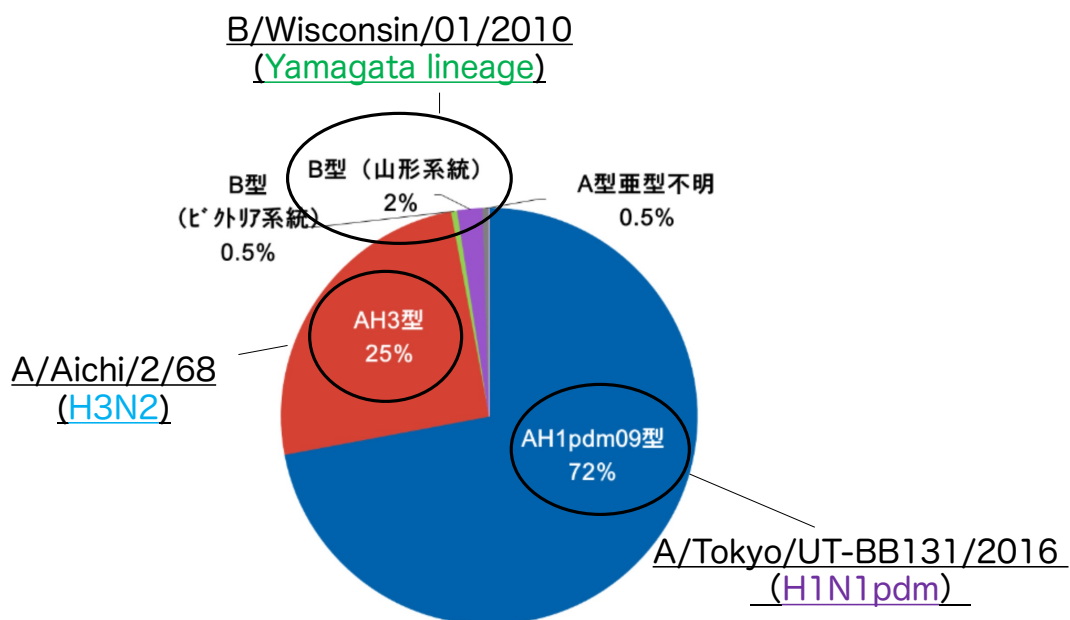
【特願 2018-163326】  
修士論文, 濱信一郎, 同志社大学 (2020)

図 2-2 M3 のマウス個体致死感染モデルへの影響

6~8 週齢 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 M3, KN-93 と共に経鼻注入し、生存を経時的にモニタリングした\*\* :  $p < 0.01$  (by Log rank test).



図 2-3



インフルエンザウイルス分離・検出速報  
(国立感染症研究所)

図 2-3 インフルエンザウイルス検出状況 (2018/19 年シーズン)

18/19 シーズンのインフルエンザウイルス亜型の検出状況。2009 年に世界的パンデミックを起こした、H1N1 のパンデミック株が 70%、同じく IAV の亜型である H3N2 の愛知株が 25%、B 型の山形系統が 2%を占めており、この比率は年によって変動するが、毎年この 3 つの型が流行している。

図 2-4

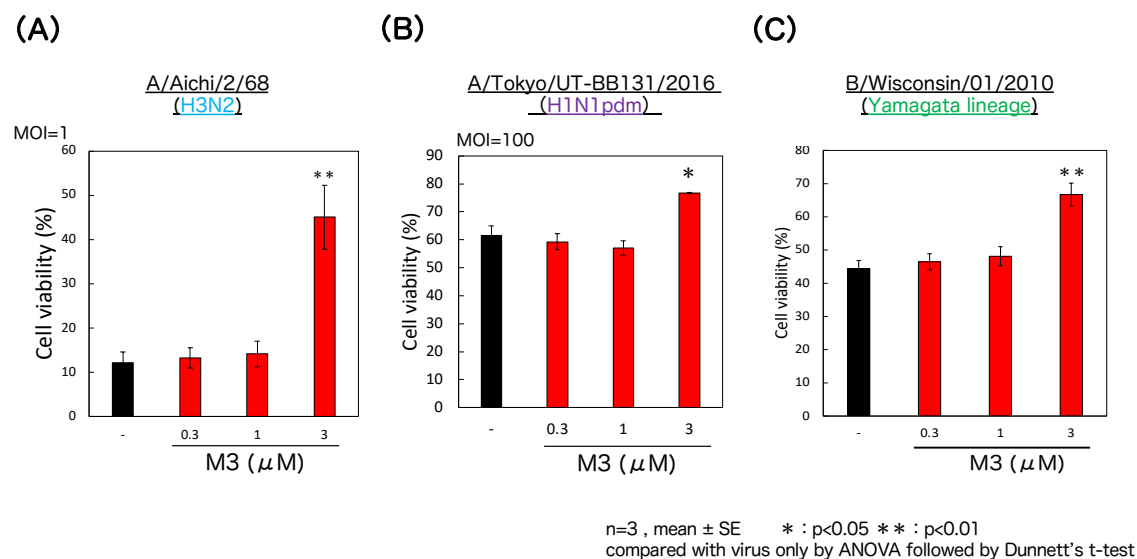


図 2-4 現流行株に対する M3 の細胞傷害阻害活性

(A) 単層 MDCK 細胞を各濃度の M3 存在下において MOI 1 の H3N2 Aichi 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。

(B) 単層 MDCK 細胞を各濃度の M3 存在下において MOI 100 の H1N1pdm Tokyo 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 M3 存在下において MOI 1 の B 型 Wisconsin 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; \*\*P < 0.001 (compared with no compound treatment by ANOVA followed by two-sided Dunnett's test)

図 2-5

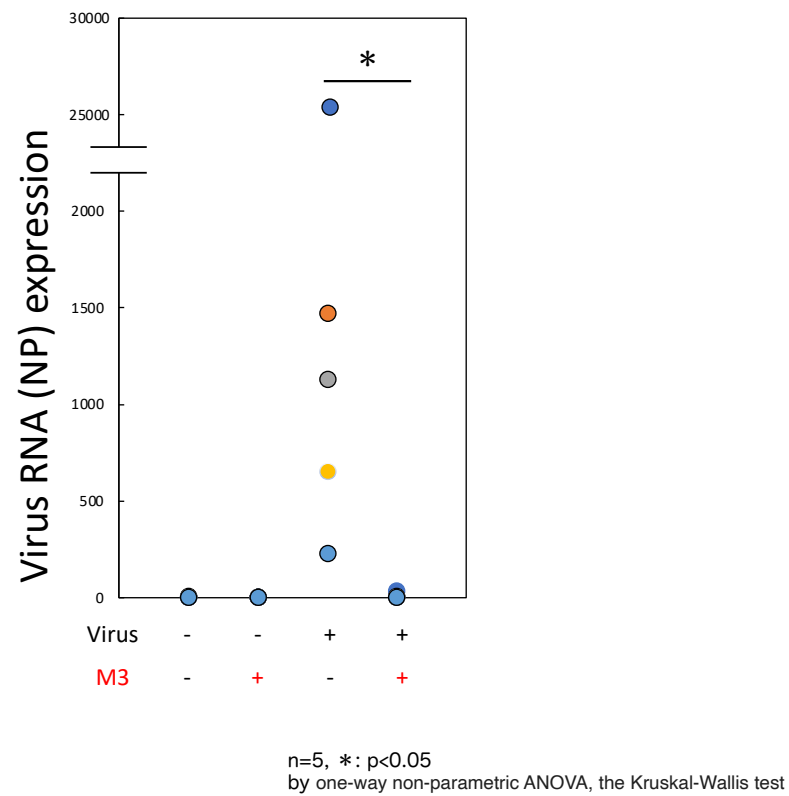
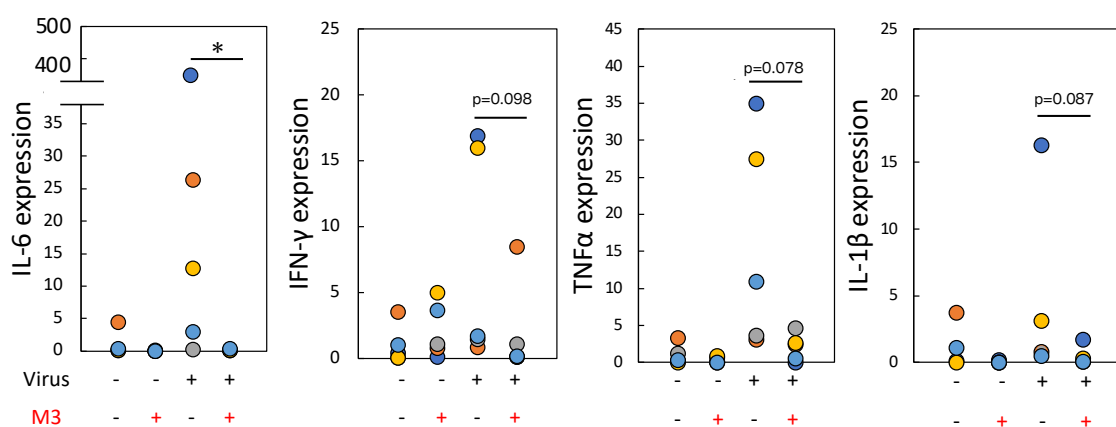


図 2-5 感染 3 日目の肺内ウイルス RNA の測定

6~8 週齢 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 1.25mg/kg の M3 と共に経鼻注入し、感染 3 日目の肺を摘出し RNA を抽出して NP RNA 量を qPCR 法により測定し GAPDH 量で補正した。

n=5, \*: p < 0.01 by one-way non-parametric ANOVA, the Kruskal-Wallis test

図 2-6



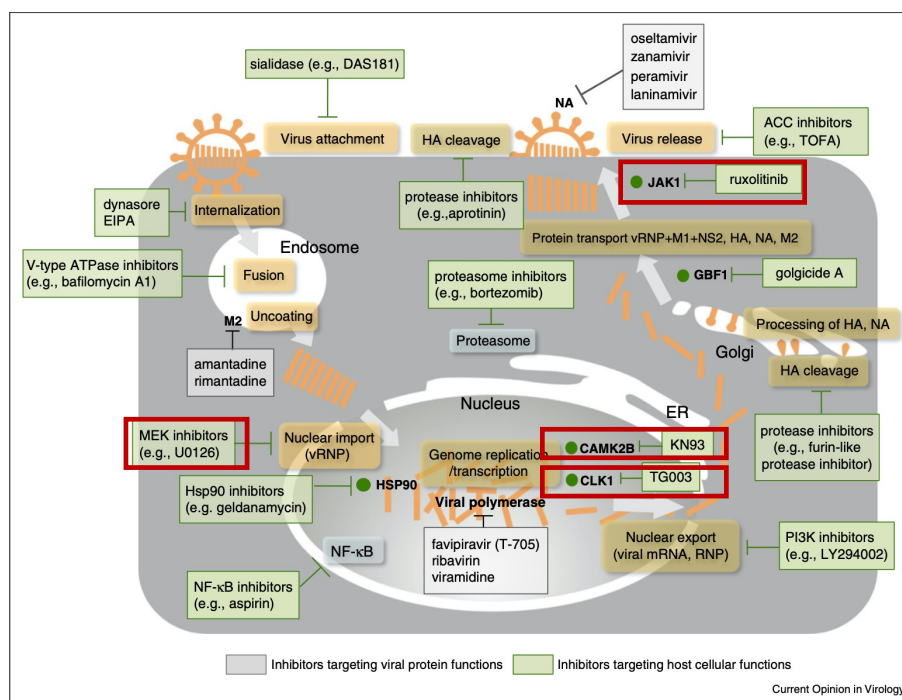
n=5, \*:  $p < 0.05$   
by one-way non-parametric ANOVA, the Kruskal-Wallis test

図 2-6 感染 3 日目の炎症性サイトカイン RNA の測定

6~8 週齢 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 1.25mg/kg の M3 と共に経鼻注入し、感染 3 日目の肺を摘出し RNA を抽出して IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ を qPCR 法により測定し GAPDH 量で補正した。

n=5, \*:  $p < 0.01$  by one-way non-parametric ANOVA, the Kruskal-Wallis test

図 2-7



Current Opinion in Virology 14:71-78 (2015)を改編

図 2-7. IAV 感染に必要な宿主因子とその阻害剤

これまで IAV 感染に関与していることが示されている宿主因子とその阻害剤を示している。特に protein kinase については赤四角で囲んでいる。

図 2-8

Table 1. Overview of cellular kinases and their role in different stages of IAV replication.

	Name	IAV Effect	In Vitro, In Vivo or Ex Vivo	Inh. vs. KO	Reference
Tyrosine	FAK	-Virus entry -Polymerase activity	In vitro	Inhibition	Elbahesh et al., 2014, 2016 [39,40]
	TrkA	-vRNA synthesis -RNP export -Budding	In vitro	Inhibition	Kumar et al., 2011a, 2011b [28,29]
	Btk	-Neutrophil regulation	In vivo	Inhibition	Florence et al., 2018 [49]
	c-Abl	-Pathogenicity mediator	In vivo	Inhibition	Hrincius et al., 2014, 2015 [50,51]
	Tyk2	-Cytokine regulation	Ex vivo	Inhibition	Berg et al., 2017 [52]
Serine/ Threonine	JNK1 / JNK2	-vRNA synthesis -Autophagy -Cytokine regulation	In vivo	Inhibition	Zhang et al., 2016, 2018; Xie et al., 2014 [45,46,53]
	P38 MAPK	-vRNA synthesis -RNP export -Prevents apoptosis -Cytokine regulation -Virus entry	In vivo	Inhibition	Borgeling et al., 2014; Choi et al., 2016; Marchant et al., 2010; Amatore et al., 2014 [37,54–56]
	MEK	-RNP export	In vivo	Inhibition	Haasbach et al., 2017, 2013; Droebner et al., 2011 [57–59]
	ERK	-RNP import -RNP export	In vivo	Inhibition	Pleschka et al., 2001, Marjuki et al., 2006 [31,60]
	RSK2	-Polymerase activity	In vitro	Knockdown	Kakugawa et al., 2009 [61]
	IKK	-Cytokine regulation -Caspase regulation -RNP export -Antiviral response modification	In vitro	Inhibition	Erhardt et al., 2013; Haasbach et al., 2013; Gao et al., 2012; Nimmerjahn et al., 2004; Wurzer et al., 2004 [62–66]
	IRAK-M	-Neutrophil interaction -Cytokine reg.	In vivo	KO	Seki et al., 2010 [67]
	PKC	-Endosomal entry -RNP assembly -Polymerase activity -Prevents apoptosis	In vivo	Inhibition	Mondal et al., 2017; Mitzner et al., 2009; Mahmoudian et al., 2009; Siczakski et al., 2003; Kurokawa et al., 1990 [30,44,68–70]
	GRK2	-viral uncoating	In vivo	Inhibition	Yanguz et al., 2018 [71]
	AMPK	-antiviral response	In vivo	Activation	Moseley et al., 2010 [72]
Lipid	PLK1/3/4	-unknown	ex vivo	KO	Pohl et al., 2017 [73]
	PI3K	-Virus entry -Prevents apoptosis -vRNA synthesis -RNP export -antiviral response modification	In vitro	Inhibition	Erhardt et al., 2006, 2007; Shin et al., 2007; Erhardt and Ludwig, 2009; Erhardt, 2011; Marjuki et al., 2011 [38,41,74–77]
	SphK1 / SphK2	-vRNA synthesis -RNP export	In vivo	Inhibition	Xia et al., 2018; Seo et al., 2013 [78,79]

Viruses 20;11(2):171 (2019)を改編

図 2-8. IAV 感染に関わるキナーゼとその阻害効果

これまで IAV 感染に関与していることが示されている 18 種のキナーゼとその作用宿主因子とその阻害剤を示している。特に protein kinase については赤四角で囲んでいる。

図 2-9

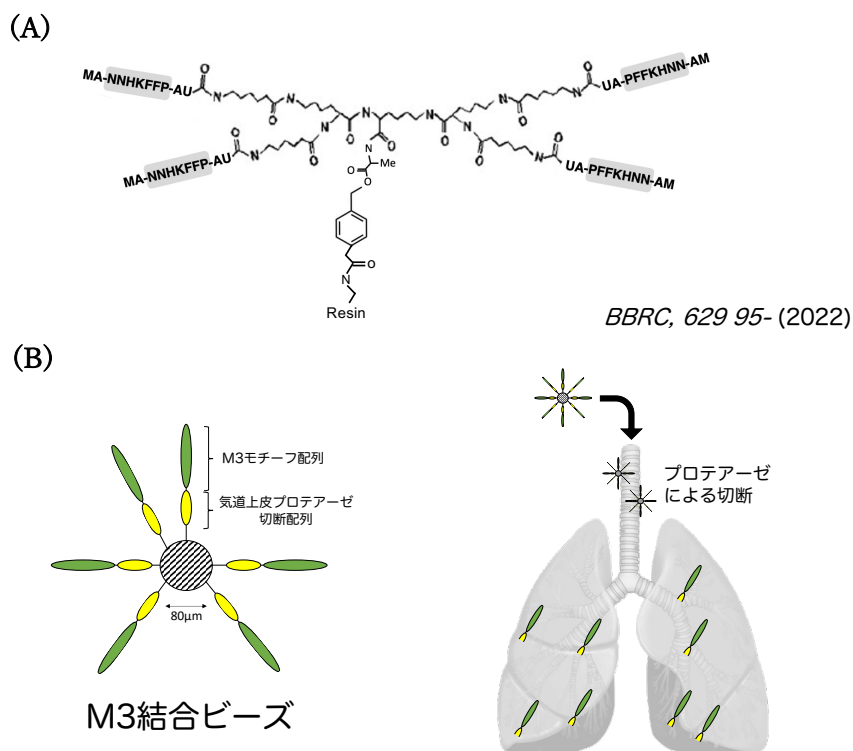


図 2-9. M3 結合ビーズの肺への送達イメージ

(A) SubAB に特異的に結合するペプチドを極小ビーズに高密度に安定して集積させる技術  
を確立している。(B) 同様のビーズに M3 を高密度に安定して集積させる。その際、M3 と  
ビーズの間に気道上皮プロテアーゼによる切断サイトを導入する。

## 第3章 M3 によるウイルス複製抑制機構

### 3-1 概要

前章まで M3 が高い抗ウイルス活性を示すことを明らかにしてきた。本章では M3 が IAV のライフサイクルのどの部分に作用点を有するかを明らかにする。まず IAV 感染における CaMKII の重要性を明らかにした。また、ウイルスタンパク合成量・ウイルス RNA 合成量に対する M3 の影響を検討することで M3 の作用点を明らかにすることを試みた。

### 3-2 実験方法

#### 3-2-1 実験試薬

##### ・抗体

ウサギ抗 HA 抗体	(Genetex)
マウス抗 NA 抗体(clone GT288)	(Genetex)
マウス抗 NP 抗体(clone HT103)	(Kerafast)
ウサギ $\beta$ -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)
CaMKII (pan) (D11A10) Rabbit mAb	(Cell Signaling Technology)
Phospho-CaMKII (Thr286) (D21E4) Rabbit mAb	(Cell Signaling Technology)
モノクローナル抗 FLAG <sup>®</sup> M2 抗体 マウス宿主抗体	(Sigma-Aldrich)

##### ・IAV 感染実験

#### 2-2-1. 細胞培養、IAV 感染実験に準ずる

##### ・ウェスタンブロット法

NP-40	(Sigma-Aldrich)
Sodium Deoxycholate	(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)
アビジン-アガロース from egg white	(Sigma-Aldrich)



BCA assay 試薬

(Thermo Scientific)

・トランスフェクション関連試薬

Flag-hCaMKII $\beta$  plasmid

(VectorBuilder)

siRNA (各配列は表 2)

(JBioS)

Cell Line Nucleofector™ Kit L

(Lonza)

・ペプチド

M3 : MA-RRI-L-LLLL-A-RLH-A-KKK-Ahx

bio-M3 : biotin-Ahx-MA-RRI-L-LLLL-A-RLH-A-KKK-Ahx

### 3-2-2 ウェスタンブロッティング法

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 10%から 16%の間で変動させた。泳動後、ゲルを 10 分間転写バッファー(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。転写後、5% スキムミルク/TBS-T(0.1% Tween-20 を含む TBS)により室温で 1 時間のブロッッキングを行い、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。

### 3-2-3 M3 と内在性 CaMKII の相互作用の解析

10cm dish に MDCK 細胞播種し 3 日間培養しシート状にする。D-PBS(-) 5ml で洗浄後、bio-M3 3 $\mu$ M 含有培地を添加し、90min インキュベートを行う。D-PBS(-) 5ml で 2 回洗浄後、1% NP-40 含有 Lysis buffer で溶解する。溶解後ソニケーションにより破碎し、10,000g 5min 4°Cで遠心し、上清を BCA assay 法によりタンパク量を測定する。500  $\mu$ g/ml にライセートを調製し、アビジン-アガロース from egg white を pack20 添加し、1 時間 4°Cでローテーションを行う。ローテーション後、1% NP-40 含有 Lysis buffer で beads を 5 回洗浄後、1xTBS で 3 回洗浄し、1x sample buffer を 50 $\mu$ l 加え 95°C 5min ボイルし、その上清を 3-2-1 に従い、ウェスタンブロッティング法を行った。その際、CaMKII に特異的な抗体により検出を行った。

### 3-2-4 MDCK 細胞へのトランスフェクション

**2-2-2 MDCK 細胞の培養**の際に  $1.0 \times 10^6$  cell を 1.5ml tube に移し、180g 5min 4°C で遠心する。培養上清を除去し、Cell Line Nucleofector™ Kit L に従い試薬を混合し、細胞を懸濁する。plasmid DNA 1μg 分 (siRNA 5μl) を加え専用キュベットにアプライし、プログラム「P-029」でトランスフェクションを行う。37°C 培養液に加え、72 時間所定のプレートにて培養し、その後の実験に使用した。

### 3-2-5 IAV 感染時の CaMKII の活性化の解析

**3-2-4 MDCK 細胞へのトランスフェクション**に従い 24 well plate に播種し、72 時間後 M3(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 10 で感染させ、1 時間後の細胞溶解液を作製した。BCA assay により濃度を調製し、**3-2-2 ウェスタンブロッティング法**に従い、p-CaMKII 抗体, Flag 抗体,  $\beta$ -actin 抗体を用い解析を行った。

### 3-2-6 CaMKII に対する siRNA の IAV 感染への影響

**3-2-4 MDCK 細胞へのトランスフェクション**に従い各 CaMKII アイソザイムの siRNA (表 2) をトランスフェクションした MDCK 細胞を 96 well plate に播種し、72 時間後 IAV PR8 株 MOI 2 で感染させ、24 時間後の細胞生存率を Cell Counting kit-8 を用いて測定した。

### 3-2-7 M3 のウイルスタンパク合成量への影響

MDCK 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後 M3(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,6,9,16 時間後の細胞溶解液を作製した。BCA assay により濃度を調製し、**3-2-2 ウェスタンブロッティング法**に従い、HA 抗体, NA 抗体, NP 抗体,  $\beta$ -actin 抗体を用い解析を行った。

### 3-2-7 M3 の total ウイルス RNA 合成量への影響

MDCK 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後 M3(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,1,3,6,9,12,16 時間後の RNA を **2-2-8 RNA 抽出 cDNA 合成**に従い作製した。**2-2-8 qPCR 法**に従い cDNA を合成後 qPCR 法により NP 遺伝子量を測定した。その際、表 2 に示すプライマーセットを用いて、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 ddCt 法に基づいて NP の mRNA の相対発現量を定量した。

### 3-2-8 M3 の各ウイルス RNA (vRNA, cRNA, mRNA) 合成量への影響

MDCK 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後 M3(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,1,3,6,9,12,16 時間後の RNA を **2-2-8 RNA 抽出 cDNA**

合成に従い作製した。逆転写の際、各 RNA 特異的なタグ配列を付加したプライマーで逆転写反応を行った<sup>35</sup>。2-2-8 qPCR 法に従い cDNA を合成後 qPCR 法により各 RNA の NP 遺伝子量を測定した。その際、表 2 に示すプライマーセットを用いて、得られた各サンプル・各 RNA 遺伝子の Ct 値から、GAPDH を標準遺伝子とする ddCt 法に基づいて NP の mRNA の相対発現量を定量した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 M3 と内在性 CaMKII の直接結合の解析

内在性の CaMKII と M3 が直接結合しうるかどうかについて検討した。biotin 化 M3 を含む培地で MDCK 細胞をインキュベート後、ライセートをアビジンビーズにて M3 を沈降させ、ウエスタンブロッティングによりビーズ上に存在している CaMKII を、抗体を用いて検出した。その結果、M3 依存的に CaMKII が沈降すること、すなわち、M3 は内在性の CaMKII と結合する能力を有することが明らかとなった（図 3-1）。

#### 3-3-2 IAV 感染時の CaMKII の活性化と M3 の阻害効果解析

次に IAV 感染時の CaMKII の活性化、および M3 の阻害効果の検討を行った。MDCK 細胞において、内在性の CaMKII の活性化（自己リン酸化）はウエスタンブロッティングで確認できる抗体がない。そのため、MDCK 細胞にヒト CaMKII を過剰発現させ、CaMKII の活性化を評価した。ヒト CaMKII 過剰発現 MDCK 細胞では、IAV 感染 1 時間でリン酸化 CaMKII の量が増加することを確認した。この時、感染 30 分前に M3 を処理することで CaMKII のリン酸化レベルが低下することを確認することができた（図 3-2）。すなわち、IAV 感染 1 時間で CaMKII の活性化が増強すること、M3 はこの活性化を顕著に抑制すること、を見出した。

#### 3-3-3 CaMKII に対する siRNA の IAV 感染への影響

CaMKII のどのアイソザイムが IAV 感染に重要であるかを検証するため、親細胞に存在する、各種 CaMKII アイソザイムを siRNA により KD した MDCK 細胞を用いて、IAV 感染による細胞傷害活性への影響を検討した。各種アイソザイムにつき 2 種類の siRNA を用い、ネガティブコントロールとして Luciferase に対する siRNA を用いた、その結果、Luciferase に対する siRNA では IAV に対する細胞傷害活性に影響は確認されなかった。一方で、いずれの CaMKII のアイソザイムをノックダウンした場合でも、細胞障害が阻害されること、を見出した（図 3-3）。すなわち、CaMKII の活性化が続く細胞障害を引き起こしていること、が示された。

#### 3-3-4 M3 のウイルスタンパク合成量への影響

M3 が IAV のライフサイクルにおいてどの部分に作用点を有するかの検討を行った。まずウイルスタンパク質の合成に M3 が影響を及ぼすかについて検討を行った。IAV の構成タンパク質として合成が比較的早いウイルス RNA に結合する NP と、IAV のエンベロープ膜上のタンパク質である HA,NA に着目した (図 3-4) <sup>36</sup>。MDCK 細胞に M3 を添加し、30 分後に IAV を感染させ、6,9,16 時間後の、各ウイルスタンパク質量をウェスタンブロッティング法により定量した。その結果、IAV 感染により時間が経過するにつれ各ウイルスタンパク質量が増加するのに対し、M3 はいずれのウイルスタンパク質量も顕著に減少することを見出した (図 3-5)。このことから、M3 は IAV のウイルスタンパク質を合成するプロセスよりも前の段階に作用していることが示された。

#### 3-3-5 M3 の total ウイルス RNA 合成量への影響

次にウイルス RNA の複製機構に M3 が影響を及ぼすかについて検討を行った。IAV は細胞に感染後、脱殻しウイルス RNA 複合体 (RNP) が核内へ輸送され、核内で転写・複製を行う (図 3-6) <sup>37</sup>。核内に持ち込まれた RNP 由来の vRNA を鋳型にして mRNA が転写され、この mRNA から複製に必要なウイルスタンパク質が翻訳される。これらウイルスタンパク質によって vRNA を相補鎖として cRNA が合成され、さらに cRNA を鋳型にして vRNA が合成される (図 3-7)。そこではじめに NP の total RNA 量に対する M3 の影響の検討を行った。MDCK 細胞に IAV を感染後、各時間 (1,3,6,9 時間) での NP の total NP RNA 量を qPCR 法により定量した。その結果、感染 1,3 時間後では M3 は阻害効果を示さないのに対し、感染 6 時間以降急速に増加する RNA 量を M3 は効率よく抑制すること、が示された。(図 3-8)

#### 3-3-6 M3 の各ウイルス RNA (vRNA, cRNA, mRNA) 合成量への影響

次に、各 RNA (vRNA, cRNA, mRNA) に対する M3 の影響を検討した。MDCK 細胞に IAV を感染後、各時間 (1,3,6,9 時間) での NP の各 RNA を合成し qPCR 法により定量した。この時、逆転写する際に各 RNA 特異的なプライマーを用い cDNA 合成を行い、各 RNA に対してタグプライマーを用い qPCR を行った (図 3-9)。感染初期である 3 時間後において、mRNA 並びに cRNA 量が M3 処理により顕著に減少していることを見出した。その一方、vRNA については 3-3-4 の total RNA の定量結果と同様に、感染 3 時間後では M3 処理による影響をほとんど受けず、感染 6 時間以降に顕著に減少した (図 3-10)。このことから、M3 は複製初期の mRNA ならびに cRNA の合成を阻害することで、ウイルス RNA の複製サイクルを抑制していると考えられた。

### **3-4 考察**

CaMKII の各アイソザイムをノックダウンした際、すべてのアイソザイムのノックダウンについて IAV に対して抵抗性を示した。これまで、CaMKII はヘテロで複合体を形成することが知られている<sup>38</sup>。そのため、CaMKII は様々なサブタイプの組み合わせでヘテロマーを形成しており、協調的に働いている可能性が考えられる。

M3 は感染初期の vRNA から mRNA への転写を阻害していることが明らかとなった。このことは、以前感染初期 1 時間以内に作用点があること（図 3-11）を見出しており<sup>26</sup>、本知見と一致する。また、感染 1 時間時点での total RNA 量や感染 3 時間時点での vRNA 量に対して M3 は影響を与えないことから、M3 は IAV の侵入を阻害していないことが明確に示されている。したがって、通常、先に示したサイクル（図 3-7）でウイルス RNA は複製を行われるが、M3 は、感染直後の、vRNA から mRNA の転写の過程を阻害し、その結果、各ウイルスタンパクの合成量が低下し、そのため cRNA の合成量が低下すること、最終的に vRNA の複製ができなくなり、ウイルスの増殖が抑制されることが考えられる（図 3-12）。

### 3-5 图表

表 2

qPCR primer name	Sequence (5' to 3')	Ref.
cGAPDH_F2	ACGGCACAGTCAAGGCTGAG	28
cGAPDH_R2	CAGCATCACCCCATTGATGTTGG	28
IAV_NP_F	GACGATGCAACGGCTGGTCTG	28
IAV_NP_R	ACCATTGTTCCAACCTCCTTT	28
Fw-NPvRNA	CTCAATATGAGTGCAGACCGTGCT	35
Fw-NPcRNA	CGATCGTGCCTTCCTTTG	35
Fw-NPmRNA	CGATCGTGCCTTCCTTTG	35
Tag_Rv-vRNA	GGCCGTCATGGTGGCGAAT	35
Tag_Rv-cRNA	GCTAGCTTCAGCTAGGCATC	35
Tag_Rv-mRNA	CCAGATCGTTCGAGTCGT	35
RT primer name	Sequence (5' to 3')	
RT_NPvRNA	GGCCGTCATGGTGGCGAATGAATGGACGAAAAACAAGAATTGC	35
RT_NPcRNA	GCTAGCTTCAGCTAGGCATCAGTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTT	35
RT_NPmRNA	CCAGATCGTTCGAGTCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTAATTGTC	35
siRNA name	Sequence (5' to 3')	
siRNA_CaMKII $\alpha$ #1_F	CCUGGACUUGCAUCGAUUCUATT	
siRNA_CaMKII $\alpha$ #1_R	UAGAAUCGAUGGAAGUCCAGGTT	
siRNA_CaMKII $\alpha$ #2_F	CGGAAACAGGAGAUUAUAAAATT	
siRNA_CaMKII $\alpha$ #2_R	UUUUUAUAAUCUCCUGUUUCCGTT	
siRNA_CaMKII $\beta$ #1_F	GACCGGACGUGAUCUCUUUUUTT	
siRNA_CaMKII $\beta$ #1_R	AAAAAGAGAUACGUGCCGUGCTT	
siRNA_CaMKII $\beta$ #2_F	CAAGUGGCAGAAUGUGCACUUTT	
siRNA_CaMKII $\beta$ #2_R	AAGUGCACAUUCUGCCACUUGTT	
siRNA_CaMKII $\gamma$ #1_F	GGAUAUGCCGACUUUUGAACTT	
siRNA_CaMKII $\gamma$ #1_R	GUUUCAAAAGUCGGCAUAUCCTT	
siRNA_CaMKII $\gamma$ #2_F	GGGGCCUAUGAUUUUCCAUCATT	
siRNA_CaMKII $\gamma$ #2_R	UGAUGGAAAAUCAUAGGCCCTT	
siRNA_CaMKII $\delta$ #1_F	GGAUGAAGAUCAACACAGATT	

siRNA_CaMKII $\delta$ #1_R	UCUGUGUUGAUCUUCAUCCTT
siRNA_CaMKII $\delta$ #2_F	AUGCUGCCUGCAUAGCAUACATT
siRNA_CaMKII $\delta$ #2_R	UGUAUGCUAUGCAGGCAGCAUTT

図 3-1

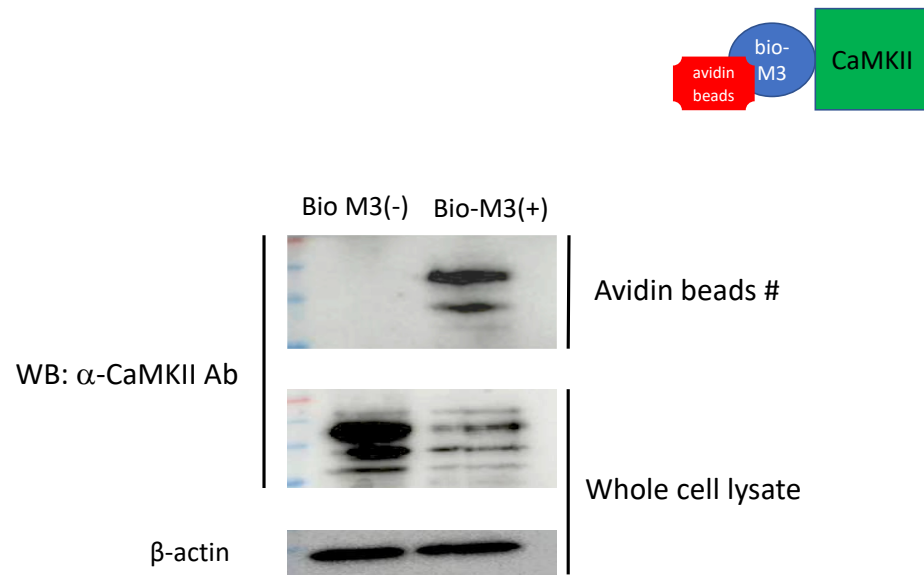


図 3-1 M3 は内在性の CaMKII と直接的結合する能力を持つ

biotin 化 M3 含有培地を MDCK 細胞に処理し、90 分後細胞を溶解し、アビジンビーズにて M3 を沈降させ、そこに存在している CaMKII をウエスタンブロッティングにより検出した。biotin 化 M3 依存的に CaMKII が沈降すること、が示された。



図 3-2

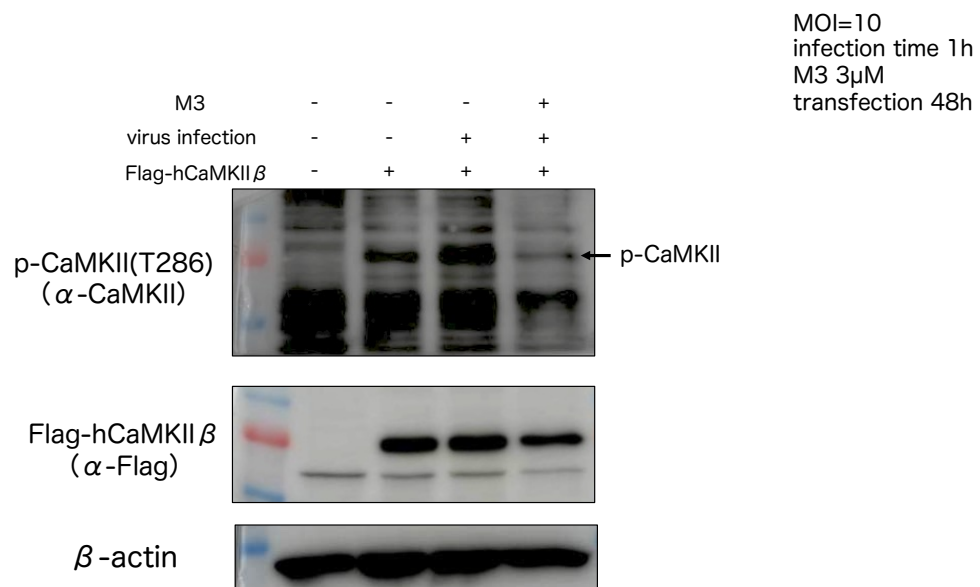


図 3-2 IAV 感染時の CaMKII の活性化と M3 の阻害効果

MDCK 細胞に Flag タグ付きヒト CaMKII $\beta$  を過剰発現させ、IAV PR8 株を MOI 10 で 1 時間感染させた細胞を溶解し、p-CaMKII (T286) をウエスタンブロッティングにより検出した。また、感染 30 分前に M3 3 $\mu$ M を処理し、その時の CaMKII の活性化抑制効果についても確認した。

図 3-3

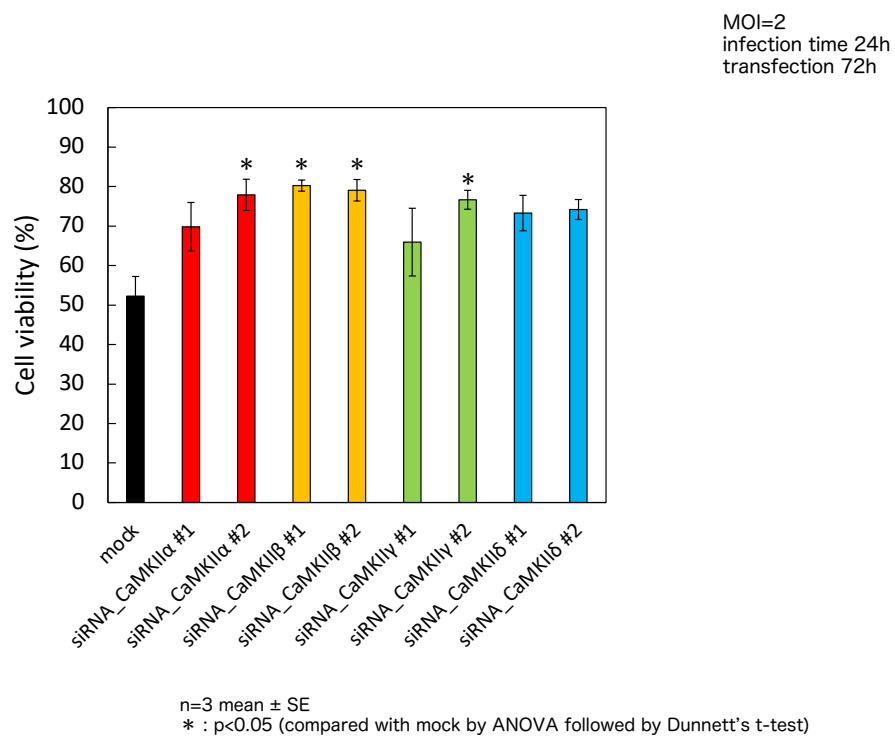
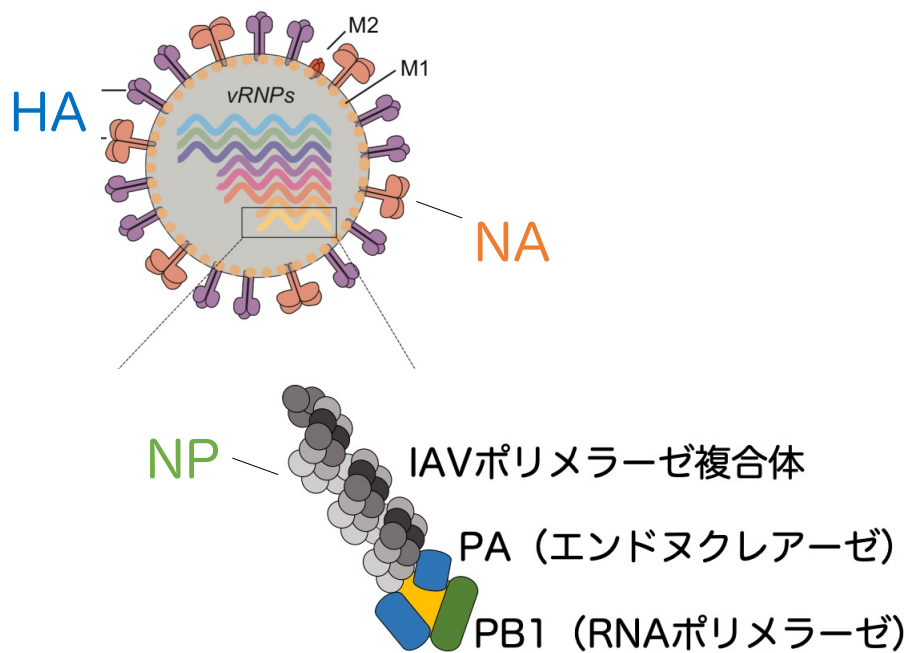


図 3-3 IAV 感染時の CaMKII の各アイソザイムの影響

MDCK 細胞に各 CaMKII アイソザイム ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) に対する siRNA に対する siRNA をそれぞれトランスフェクションし、72 時間後 IAV PR8 株を MOI 2 で感染させ、24 時間後の細胞生存率を WST 法により検出した。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。

\*P < 0.05; (compared with mock by ANOVA followed by two-sided Dunnett's test)

図 3-4



*Front Immunol.* **20**;9:1581.(2018)を改編

図 3-4 IAV の構造と構成するウイルスタンパク

IAV エンベロープ膜上に HA,NA,M2 が存在し、粒子内に 8 分節の RNA を有している。ウイルス RNA にはウイルスタンパクの NP が巻き付いており、IAV ポリメラーゼ複合体 (RNP) として存在している。

図 3-5

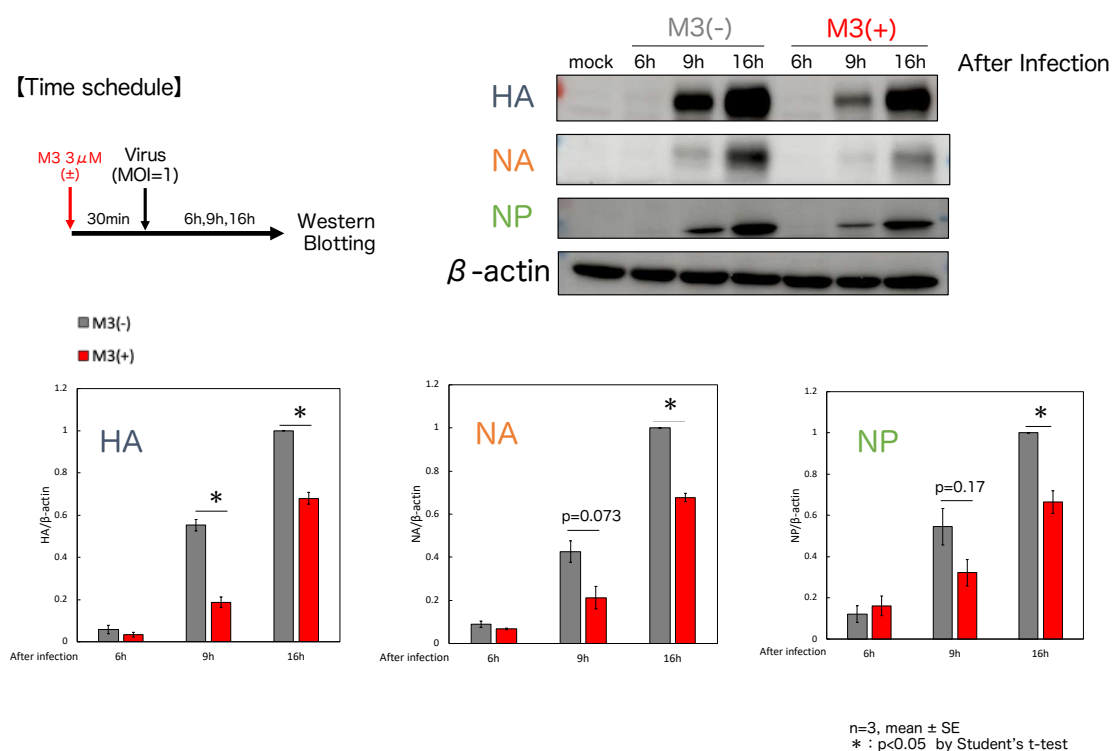
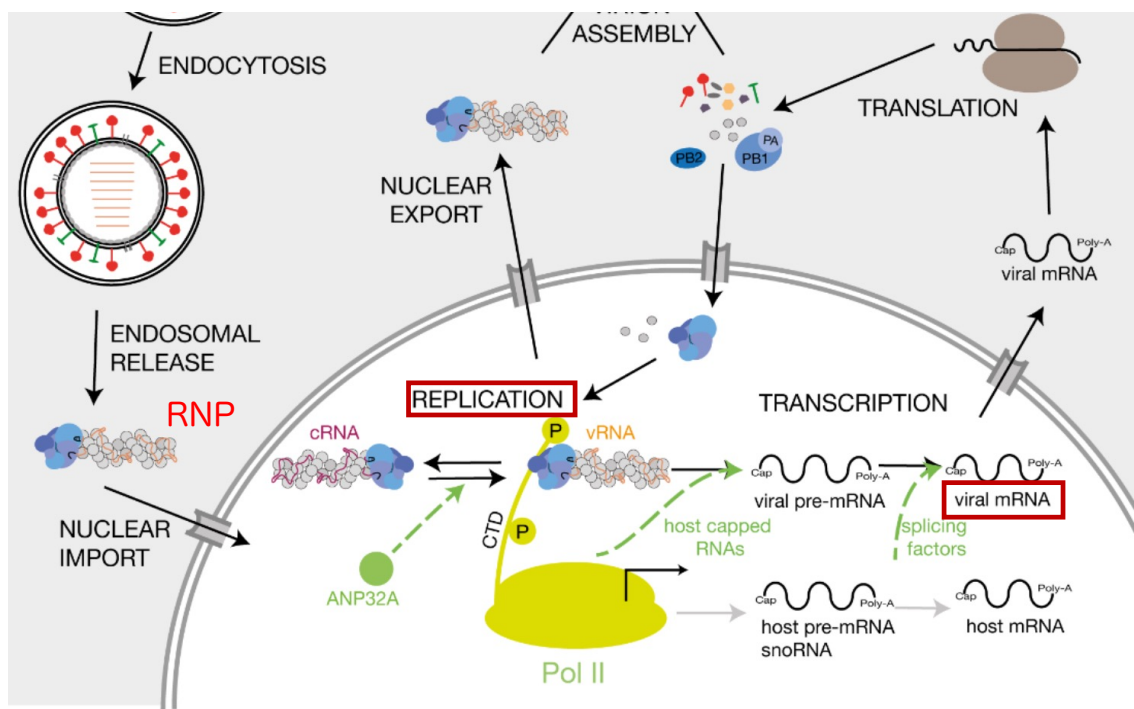


図 3-5 M3 によるウイルスタンパク合成量への影響

単層 MDCK 細胞を D-PBS による洗浄操作ののち、M3  $3\mu\text{M}$  存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 1 の IAV PR8 株に感染させた。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 HA, NA, NP を解析した。image j によりバンドを定量し、 $\beta$ -actin により補正し、M3(-)の 16 時間後のタンパク量を基準としてグラフを作成した。グラフは独立した実験値 3 回分の平均を、エラーバーはその標準誤差(S.E.)を示している。\* :  $p < 0.05$  by Student's t-test

図 3-6



*Viruses* **13**(5), 780 (2021)を改編

図 3-6 IAV の複製機構

IAV は細胞表面へ接着後、エンドサイトーシスにより細胞内へ運ばれ、エンドソーム内の酸性化をともなって脱殻し、ウイルス RNP はサイトソルに放出される。その後、RNP は核内へ移行しウイルス RNA の複製・転写が起こる。

図 3-7

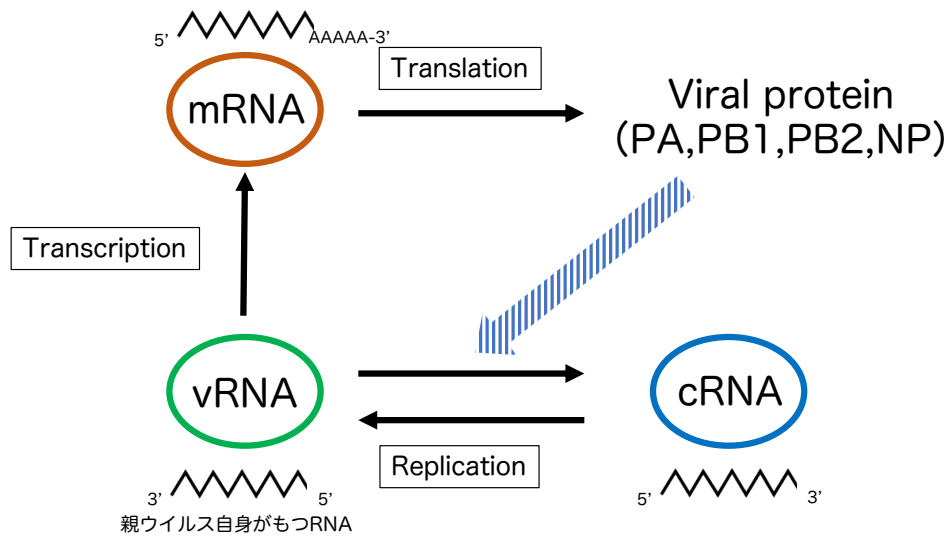


図 3-7 ウイルス RNA の複製機構

核に持ち込まれた RNP 由来の vRNA を鋳型にして、mRNA が転写される。この mRNA から、その後の複製に必要なウイルスタンパクが翻訳され、これらウイルスタンパクの働きにより、vRNA の相補鎖として cRNA が合成され、さらに cRNA を鋳型に vRNA の複製が行われる。

図 3-8

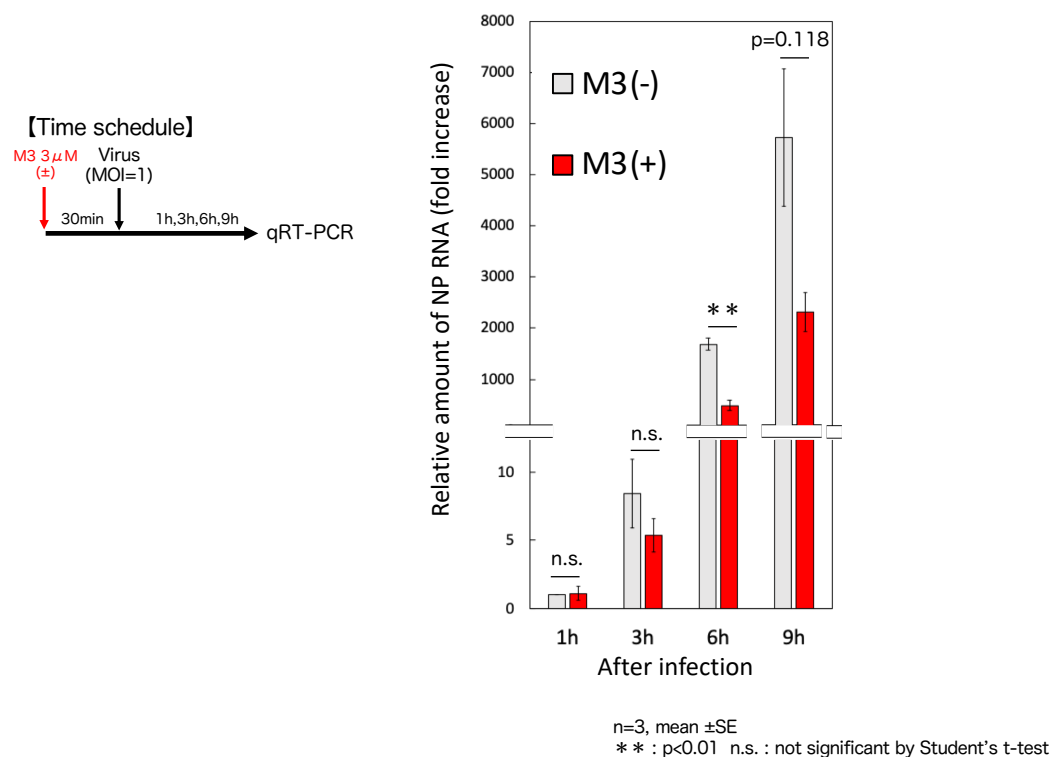


図 3-8 M3 による total ウイルス RNA 合成量への影響

単層 MDCK 細胞を D-PBS による洗浄操作ののち、M3 3  $\mu$ M 存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 1 の IAV PR8 株に感染させた。感染後の各時間点で、RL buffer により細胞を溶解・回収し、RNA 抽出・逆転写反応により cDNA を合成後、qPCR 法により NP の RNA 量を GAPDH の Ct 値により補正し解析した。M3(-)の 1 時間後の NP RNA 量を基準としてグラフを作成した。グラフは独立した実験値 3 回分の平均を、エラーバーはその標準誤差(S.E.)を示している。\*\* : p<0.01 by Student's t-test

図 3-9

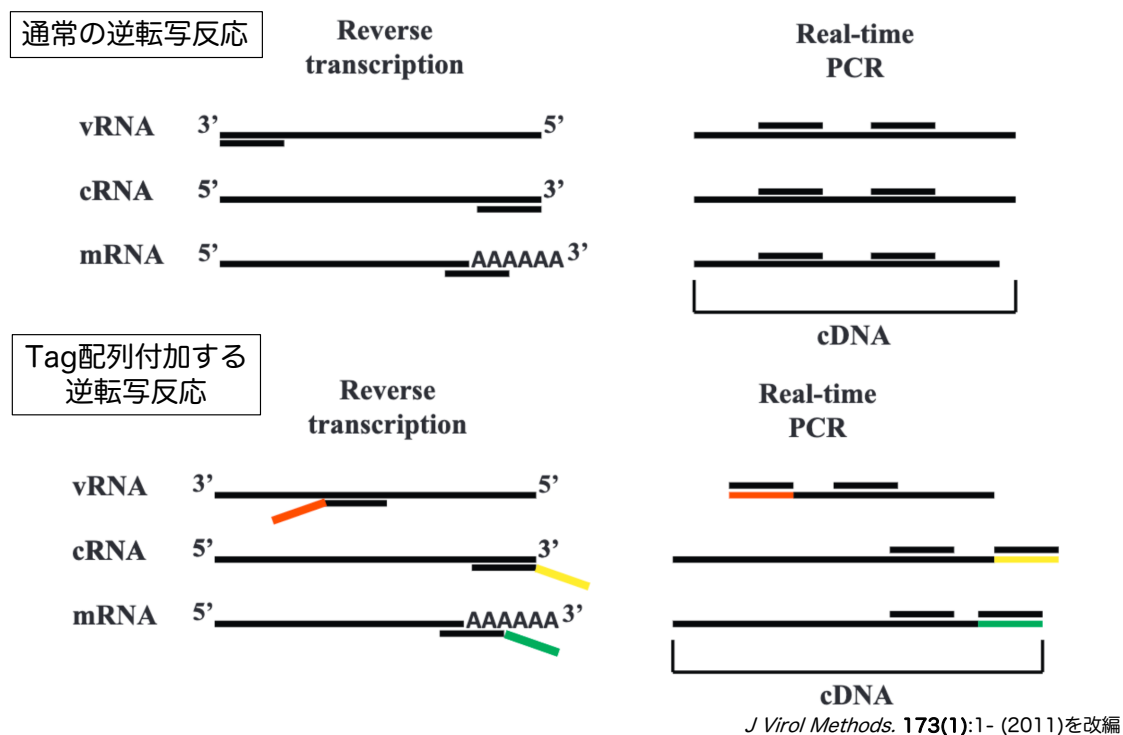


図 3-9 Tag-プライマーによる vRNA, cRNA, mRNA の定量法

通常のランダムヘキサマーを用いた逆転写反応では、合成された cDNA が、どの RNA に由来するものであるかを区別することはできない (上図)。各々の RNA に対して異なった tag 配列を付加したプライマーを作成し、これらを用いて cDNA を合成する。続いて、qPCR の際にそれぞれのタグ配列特異的なプライマーを用いることで、3 種類の RNA を個別に定量することができる。



図 3-10

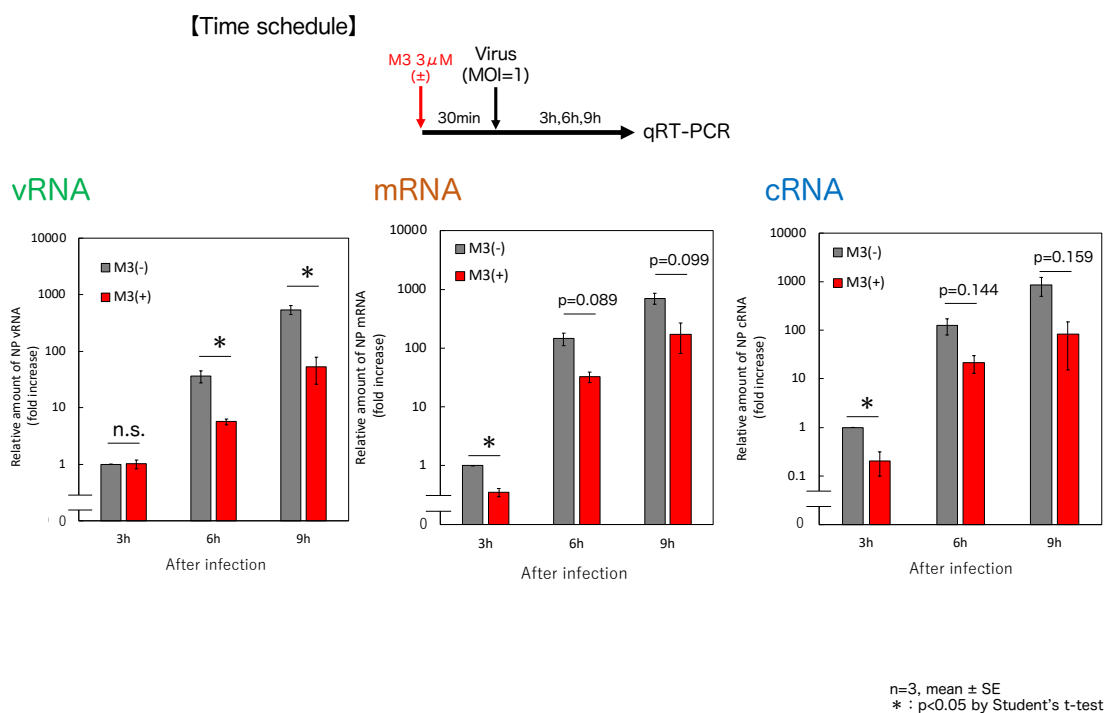
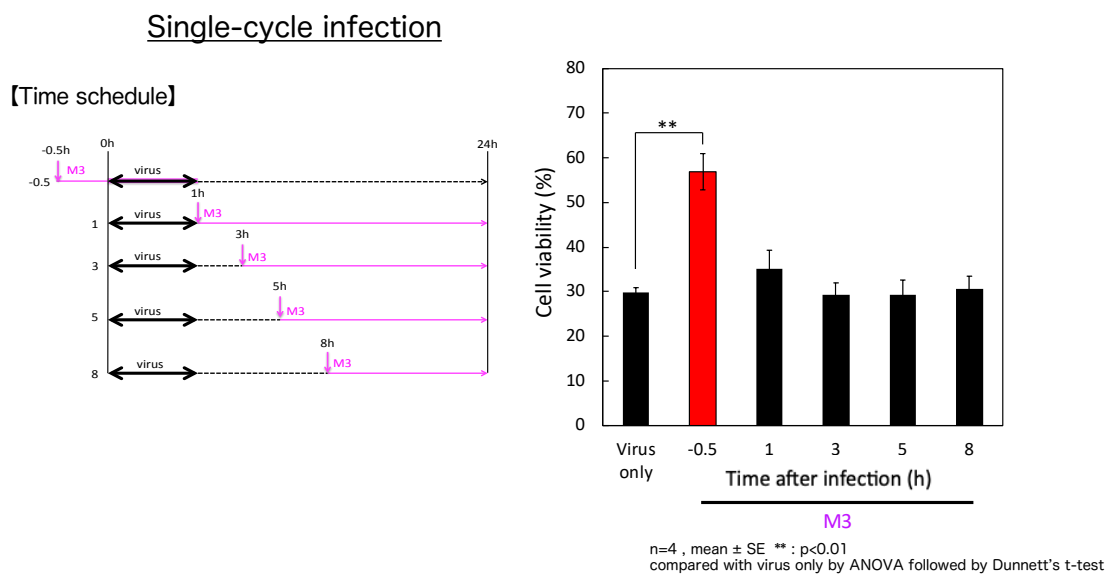


図 3-11



【特願 2018-163326】  
修士論文, 濱信一郎, 同志社大学 (2020)

図 3-11 IAV 感染タイムコースにおける M3 の作用点の解析

単層 MDCK 細胞に M3  $3\mu\text{M}$  を添加し、30 分後に 20 MOI の IAV PR8 株を加え、M3 共存下で 1 時間感染させた。その後細胞を D-PBS により洗浄し、24 時間後に検出した。また、20 MOI の IAV PR8 株を 1 時間感染させた後、D-PBS で洗浄後培地を加えた。この時、感染 1, 3, 5, 8 時間後に M3  $3\mu\text{M}$  を加え、感染 24 時間後に D-PBS により 2 度の洗浄し細胞生存率を検出した。これらのタイムスケールを図式化したもの (左図)。単層 MDCK 細胞を各濃度の化合物存在下において 20 MOI の IAV PR8 株に感染させた。M3 の投与タイミングは (A) のタイムスケールに従った。グラフは独立した実験値 4 回分の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を示している。 \*\* :  $p < 0.01$  compared with virus only by ANOVA followed by Dunnett's t-test

図 3-12

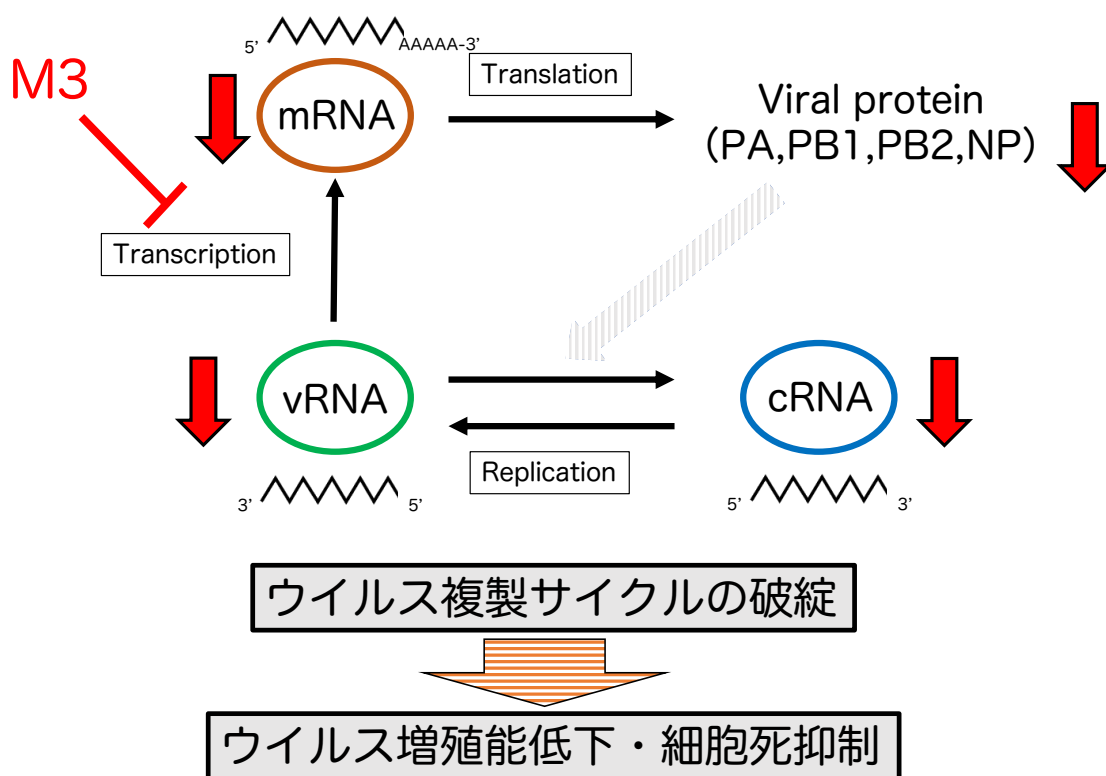


図 3-12 M3 の作用メカニズム

図 3-7 に示したサイクルでウイルス RNA の複製は行われるが、M3 は、感染直後の、vRNA から mRNA の転写の過程を阻害すること、その結果、各ウイルスタンパクの合成量が低下し、そのため cRNA の合成量が低下すること、最終的に vRNA の複製ができなくなり、ウイルスの増殖が抑制される。

## 第4章 M3で制御される新たなI型IFN発現誘導機構

### 4-1 概要

これまで M3 は高い抗ウイルス活性を示すことを明らかにしてきた。そこで、IAV 感染時に機能する抗ウイルス応答について、M3 がその応答を増強するかについて解析を行った。抗ウイルス応答の指標である I 型 IFN とその下流遺伝子である Mx1 遺伝子量を測定した。次に、IAV 感染時の抗ウイルス応答について、IAV mRNA 合成のためのキャップ構造の供給源になっているかどうかを qPCR 法により検討を行った。

### 4-2 実験方法

#### 4-2-1 実験試薬

##### ・ RNA 抽出

FastGene RNA Premium Kit (日本ジェネティクス)  
2M DTT (富士フィルム和光)

##### ・ cDNA 合成

ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO)  
DEPC 水 (Nacalai Tesque)

##### ・ qPCR 法

THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix (TOYOBO)  
各種プライマー (表 3)

##### ・ IAV 感染実験

2-2-1. 細胞培養、IAV 感染実験に準ずる

##### ・ ペプチド・阻害剤

M3 : MA-RRI-L-LLLL-A-RLH-A-KKK-Ahx  
バロキサビル (シオノギ)

#### 4-2-2 M3 の I 型 IFN mRNA 合成量への影響

MDCK 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後 M3(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,1,3,6,9,12,16 時間後の RNA を **2-2-8 RNA 抽出 cDNA 合成**に従い作製した。**2-2-8 qPCR 法**に従い cDNA を合成後 qPCR 法により IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  遺伝子量を測定した。その際、表 3 に示すプライマーセットを用いて、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 ddCt 法に基づいて IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  の mRNA の相対発現量を定量した。

#### 4-2-2 M3 の I 型 IFN 下流遺伝子 (Mx1) mRNA 合成量への影響

MDCK 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後 M3(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,1,3,6,9,12,16 時間後の RNA を **2-2-8 RNA 抽出 cDNA 合成**に従い作製した。**2-2-8 qPCR 法**に従い cDNA を合成後 qPCR 法により Mx1 遺伝子量を測定した。その際、表 3 に示すプライマーセットを用いて、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 ddCt 法に基づいて Mx1 の mRNA の相対発現量を定量した。

#### 4-2-3 IAV の細胞傷害活性を指標とするバロキサビルの抗 IAV 活性の解析

**Single-cycle infection** 96well 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化させた MDCK 細胞を用いた。バロキサビルを単層 MDCK 細胞に添加し、添加 30 分後に 20 MOI の IAV PR8 株を培養培地中で感染させた。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。

#### 4-2-4 バロキサビルの total ウイルス RNA 合成量への影響

MDCK 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後バロキサビル(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,1,3,6,9 時間後の RNA を **2-2-8 RNA 抽出 cDNA 合成**に従い作製した。**2-2-8 qPCR 法**に従い cDNA を合成後 qPCR 法により NP 遺伝子量を測定した。その際、表 3 に示すプライマーセットを用いて、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 ddCt 法に基づいて IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  の mRNA の相対発現量を定量した。

#### 4-2-5 バロキサビルの I 型 IFN mRNA 合成量への影響

MDCK 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後バロキサビル(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,1,3,6,9 時間後の RNA を **2-2-8 RNA 抽出 cDNA 合成**に従い作製した。**2-2-8 qPCR 法**に従い cDNA を合成後 qPCR 法により IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  遺伝子量を測定した。その際、表 2 に示すプライマーセットを用いて、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 ddCt 法に基づいて IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  の mRNA の相対発現量を定量した。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 M3 の I 型 IFN 産生に及ぼす影響

これまで M3 は高い抗ウイルス活性を有することを明らかにしてきた。この時、IAV 感染時に誘導される抗ウイルス応答が増強しているのではないかと仮説を立てた。抗ウイルス応答は感染時に外来センサー分子である Toll like receptor (TLR)や Retinoic acid-inducible

gene I (RIG-I)によって誘導される。その代表的なタンパクとして I 型インターフェロン (IFN) が産生され、オートクラインやパラクラインによって Mx1 等の抗ウイルス因子の発現が誘導される (図 4-1) <sup>39</sup>。そこで、IAV 感染により誘導される I 型 IFN  $\alpha, \beta$  の mRNA の発現を qPCR 法により経時的に測定した。その結果、 $\alpha, \beta$  ともに 9 時間までは緩やかに増加し、それ以降の感染中期・後期にかけて急激に発現誘導されることが確認された。さらにこの時、M3 の効果を検討したところ、I 型 IFN  $\alpha, \beta$  の mRNA 発現誘導を抑制することが明らかになった。特に、9 時間までの誘導に対しては、M3 はほぼ完全に抑制すること、が示された。その一方で、感染中・後期の急激な発現増大に対しては、M3 は遅延・減弱は起こすものの 16 時間後には同程度の発現を誘導すること、を見出した (図 4-2)。

#### 4-3-2 M3 の Mx1 発現に及ぼす影響

次に、I 型 IFN によって発現が増強される、抗ウイルスタンパク、Mx1 に着目し、その発現量を qPCR 法により測定した。Mx1 は、感染後期に増強し、M3 は I 型 IFN の変動と同様、遅延・減弱は起こすものの 16 時間後には同程度の発現誘導を確認した。(図 4-3)

M3 の抗ウイルス活性と I 型 IFN 抑制の関与を検討するため、IAV mRNA の転写メカニズムに着目した。IAV の RNP は核内に侵入すると、宿主 mRNA の Cap 構造が RNP タンパクである PA に切断され、それをプライマーとして PB1 のポリメラーゼ活性により IAV mRNA が転写される。この現象はキャップスナッチングと呼ばれている (図 4-4) <sup>40</sup>。この時、IAV 感染時の宿主 mRNA は大部分が抗ウイルス因子であること <sup>41</sup>、キャップスナッチングの標的となる宿主 mRNA には、特異性はなく、その時細胞内に存在している mRNA 量に依存することが明らかとなっている (図 4-5) <sup>42</sup>。このことから、感染初期には、CaMKII によって誘導される、I 型 IFN mRNA 発現誘導経路があること、この mRNA がキャップ構造の供給源となり、IAV mRNA が転写促進されること (図 4-6A)、M3 は CaMKII を阻害することでこの経路を遮断し、その結果、宿主 IFN mRNA 発現も抑制してしまうが、同時に IAV mRNA 合成も強力に阻害する (図 4-6B)、というモデルが考えられた。

#### 4-3-3 バロキサビルの抗 IAV 活性

上述のモデル (図 4-6) を検証するため、PA のエンドヌクレアーゼ活性を阻害するバロキサビル<sup>9</sup>を処理することで、感染初期の I 型 IFN mRNA が増加すると仮説を立てた (図 4-7)。まず MDCK 細胞を用い、バロキサビルの抗 IAV 活性を確認した。MDCK 細胞にバロキサビルを処理し、30 分後に MOI 10 で感染させ 24 時間後の細胞生存率を WST 法により測定した。その結果、バロキサビルは IAV の細胞障害活性を効率よく阻害することを確認した。(図 4-8) また、この時、NP の total RNA 量を qPCR 法により定量したところ、バロキサビル処理により完全に抑制されていること、を確認した。(図 4-9)

#### 4-3-4 バロキサビルの I 型 IFN 産生に及ぼす影響

本仮説（図 4-7）を検証するため、I 型 IFN mRNA 発現に対するバロキサビルの効果を qPCR 法により検討した。バロキサビルは、感染後期の I 型 IFN mRNA 発現誘導を効率よく阻害する一方で、初期の発現誘導はむしろ増加させることを見出した。（図 4-10）

#### 4-4 考察

これまで、IAV 感染時の抗ウイルス応答として TLR3/7 や RIG-I といった外来センサーにより誘導されるものが知られている<sup>39</sup>。IAV は細胞に感染するとこれら外来センサーの機能を阻害するタンパク NS1 を合成し、細胞がもつ抗ウイルス応答を阻害する<sup>43</sup>。この時、外来センサー阻害活性を欠失させた NS1 を合成する IAV ではウイルスの増殖が低下すること<sup>44</sup>、すなわち IAV 自身が抗ウイルス応答を減弱させる方向に誘導することが明らかとなっている。したがって、抗ウイルス応答をより活性化させることで細胞を防御的に誘導し、IAV 感染を制御する研究が主流となっている。しかしながら、本研究では M3 処理により感染初期の I 型 IFN 産生を抑制する一方で、感染後期の I 型 IFN 産生は遅れるものの最終的に追いつくこと、を見出した。このことから、感染初期には、中・後期に働く RIG-I・TLR 経路ではなく、CaMKII により誘導され、M3 によって抑制される、新たな IFN 発現誘導経路が存在すること、が示唆された。

今回新たに見出した、感染初期に誘導される CaMKII 依存的な IFN 発現誘導経路は、発現量は少ないものの、初期のキャップ構造供給という意味で、ウイルス増殖に重要な働きをしていること、M3 はこの経路を阻害することで抗ウイルス活性を発揮していることが示された（図 4-11）。

#### 4-5 图表

表 3

qRT-PCR primer name	Sequence (5' to 3')	Ref.
cGAPDH_F2	ACGGCACAGTCAAGGCTGAG	28
cGAPDH_R2	CAGCATCACCCCATTTGATGTTGG	28
cIFNa_F1	GCTCTTGTGACCACTACACCA	45
cIFNa_R1	AAGACCTTCTGGGTCATCACG	45
cIFNb_F1	CCAGTTCCAGAAGGAGGACA	45
cIFNb_R1	TGTCCCAGGTGAAGTTTTCC	45
cMx1_F1	GAATCCTGTACCCAATCATGTG	45
cMx1_R1	TACCTTCTCCTCATATTGGCT	45





図 4-2

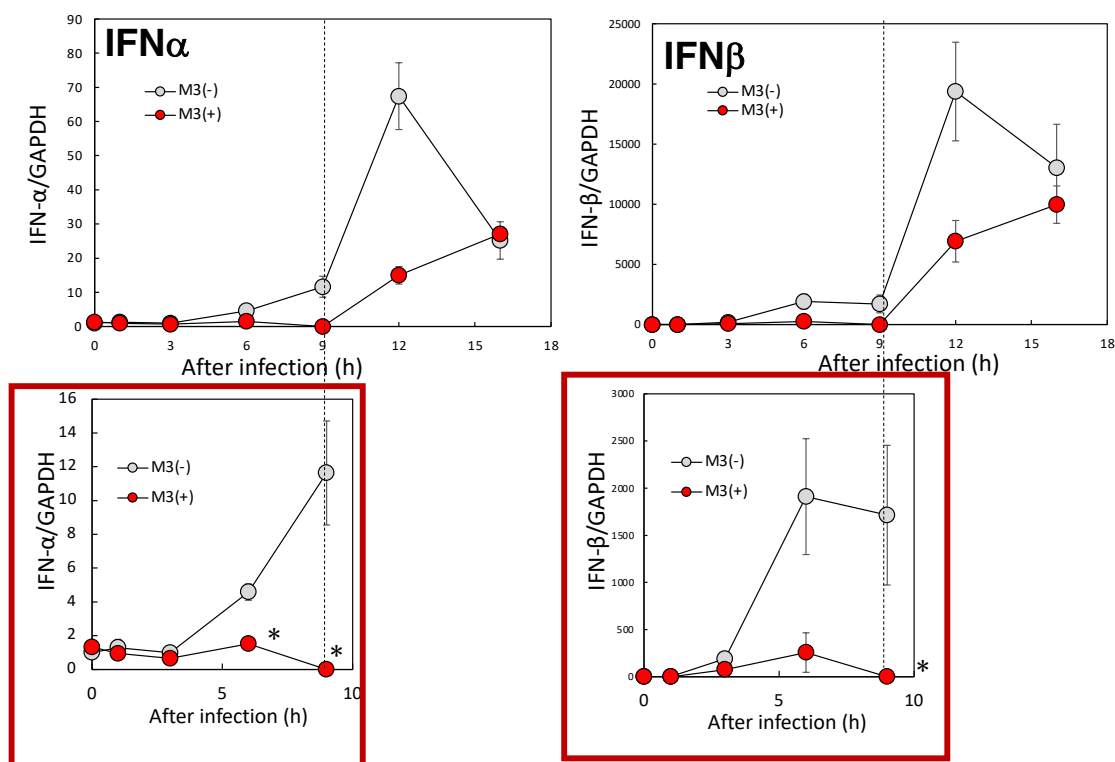


図 4-2 M3 処理した際の I 型 IFN 発現量

単層 MDCK 細胞を D-PBS による洗浄操作ののち、M3  $3\mu\text{M}$  存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 1 の IAV PR8 株に感染させた。感染後の各時間点で、RL buffer により細胞を溶解・回収し、RNA 抽出・逆転写反応により cDNA を合成後、qPCR 法により IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$  の RNA 量を GAPDH の Ct 値により補正し解析した。M3(-) の 0 時間後の IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$  RNA 量を基準としてグラフを作成した。グラフは独立した実験値 3 回分の平均を、エラーバーはその標準誤差(S.E.)を示している。\*:  $p < 0.01$  by Student's t-test

図 4-3

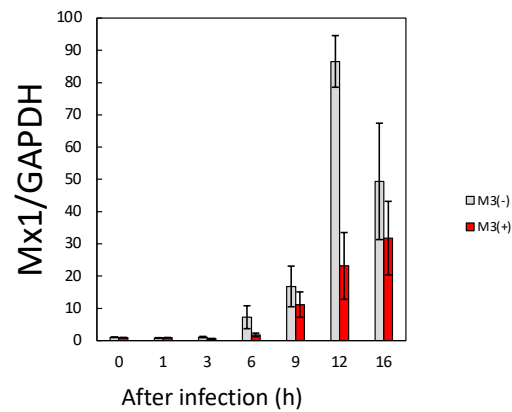


図 4-3 M3 処理した際の I 型 IFN の下流遺伝子 Mx1 発現量

単層 MDCK 細胞を D-PBS による洗浄操作ののち、M3  $3\mu\text{M}$  存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 1 の IAV PR8 株に感染させた。感染後の各時間点で、RL buffer により細胞を溶解・回収し、RNA 抽出・逆転写反応により cDNA を合成後、qPCR 法により Mx1 の RNA 量を GAPDH の Ct 値により補正し解析した。M3(-)の 0 時間後の Mx1 RNA 量を基準としてグラフを作成した。グラフは独立した実験値 3 回分の平均を、エラーバーはその標準誤差(S.E.)を示している。

図 4-4

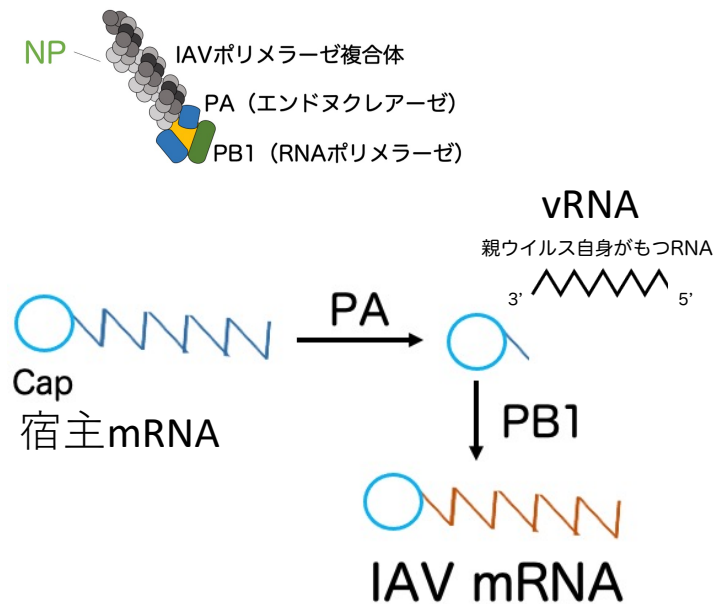
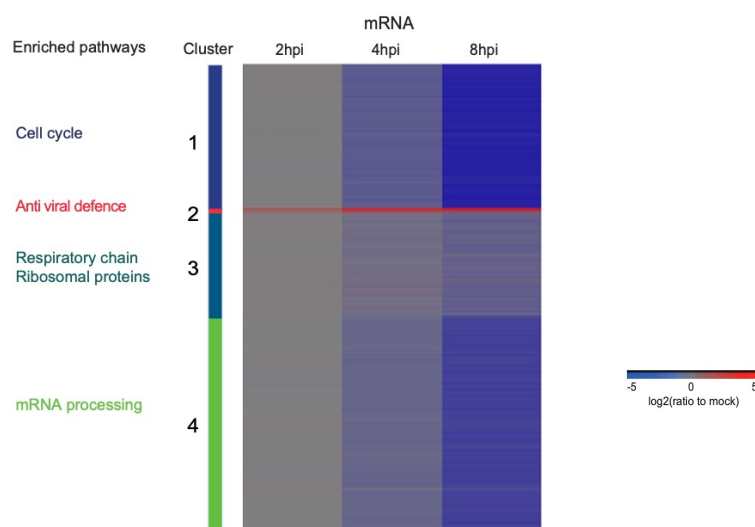


図 4-4 IAV のキャップスナッチング機構 (vRNA→mRNA)

vRNA から mRNA への転写には宿主 mRNA 由来のキャップ構造が必要である。IAV のポリメラーゼ複合体、RNP は、PA が宿主 mRNA ノキャップ構造を切り出し、これをプライマーとし、vRNA を鋳型として、PB1 がウイルス mRNA を転写する。この現象は宿主 mRNA のキャップ構造を奪うことから、キャップスナッチングと呼ばれている。

図 4-5

#### IAV感染時に応答する遺伝子のパスウェイ解析



宿主の遺伝子発現は抗ウイルス応答遺伝子が大部分を占める

*eLife* 5:e18311(2016)

キャップスナッチングの標的となるmRNAは細胞内mRNA量に依存する

*Virology* 509 167- (2017)

#### 図 4-5 IAV 感染時の宿主側応答遺伝子

宿主側に存在している mRNA は、感染時の宿主側の防御機構として、そのほとんどが IFN を含め、感染防御に関わる抗ウイルスタンパクであること、が既に明らかになっている。また、キャップスナッチングの標的となる宿主 mRNA には、特異性はなく、その時細胞内に存在している mRNA 量に依存することが明らかとなっている。

図 4-6

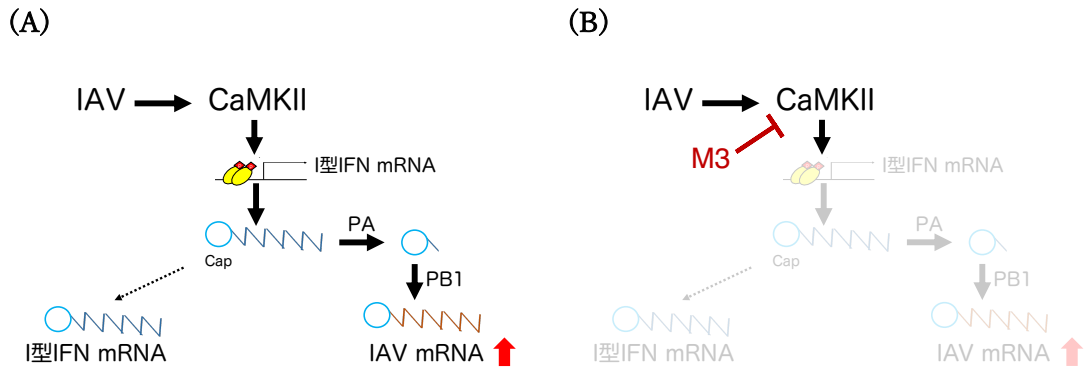


図 4-6 感染初期の I 型 IFN 発現誘導機構

- A) 感染初期には、CaMKII によって誘導される、I 型 IFN mRNA 発現誘導経路があり、この mRNA がキャップ構造の供給源となり、IAVmRNA が転写促進される。
- B) M3 は CaMKII を阻害することでこの経路を遮断し、その結果、宿主 IFN mRNA 発現も抑制してしまうが、同時に IAV mRNA 合成も強力に阻害する。

図 4-7

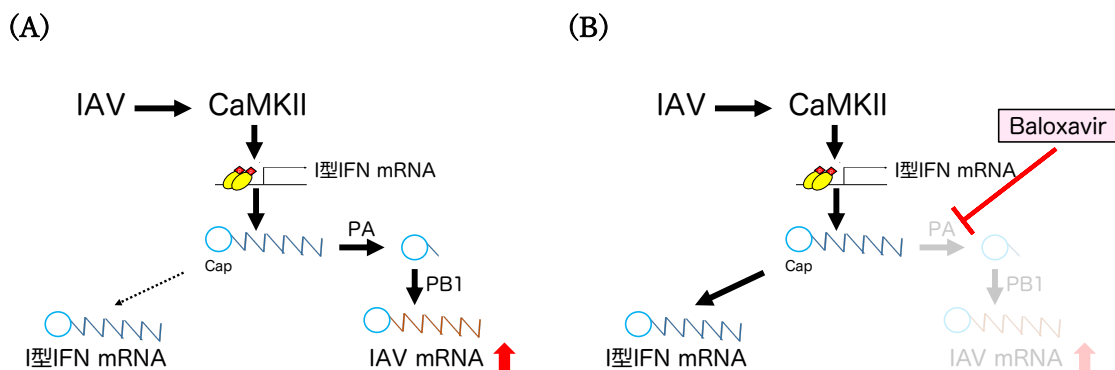
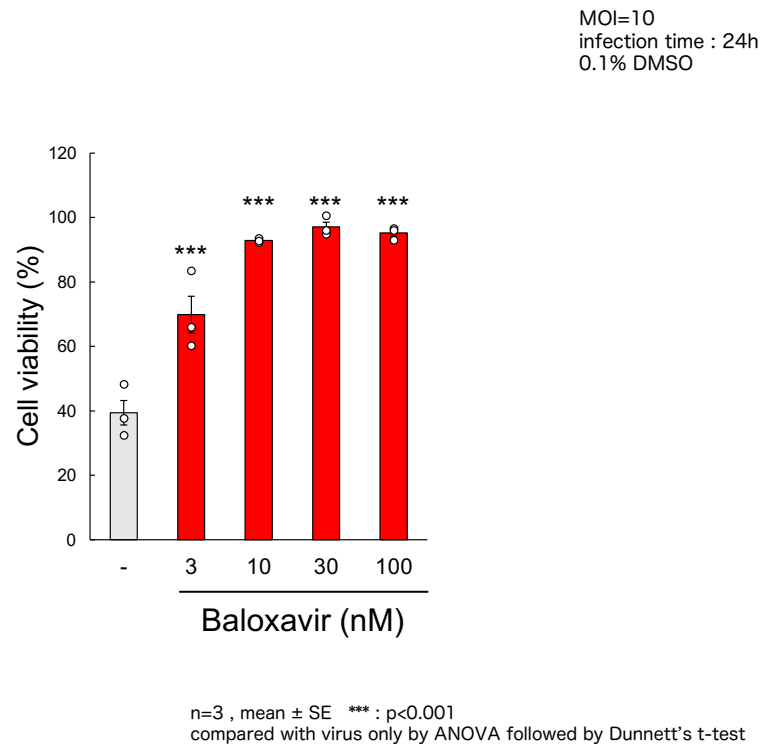


図 4-7 バロキサビルを用いた感染初期の I 型 IFN 発現誘導機構の検証

(A) 感染初期には、CaMKII によって誘導される、I 型 IFN mRNA 発現誘導経路があり、この mRNA がキャップ構造の供給源となり、IAV mRNA が転写促進される。

(B) PA を阻害することにより抗ウイルス活性を示すインフルエンザ治療薬、バロキサビルは、図 4-5 のモデルが正しければ、IAV mRNA の誘導は抑制されると同時に、初期の I 型 IFN mRNA 発現は増加するはずである。

図 4-8



#### 図 4-8. バロキサビルの細胞傷害阻害活性

単層 MDCK 細胞を各濃度のバロキサビル存在下において MOI 10 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<0.001 compared with virus only by ANOVA followed by Dunnett's t-test



図 4-9

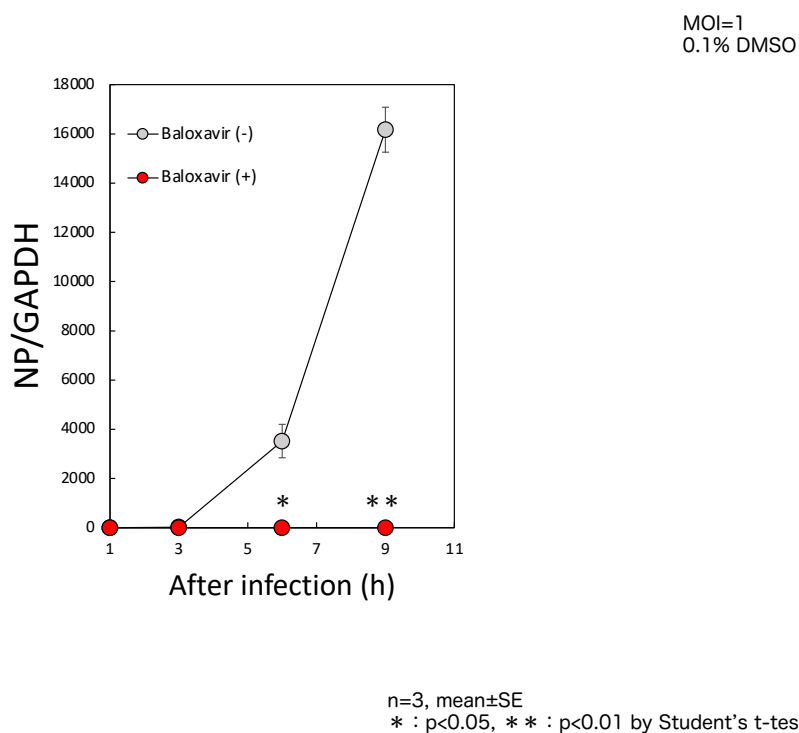


図 4-9. バロキサビルのウイルス RNA 合成阻害活性

単層 MDCK 細胞を D-PBS による洗浄操作ののち、バロキサビル 100nM 存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 1 の IAV PR8 株に感染させた。感染後の各時間点で、RL buffer により細胞を溶解・回収し、RNA 抽出・逆転写反応により cDNA を合成後、qPCR 法により NP の RNA 量を GAPDH の Ct 値により補正し解析した。バロキサビル(-)の 1 時間後の NP RNA 量を基準としてグラフを作成した。グラフは独立した実験値 3 回分の平均を、エラーバーはその標準誤差(S.E.)を示している \* : p<0.05, \*\* : p<0.01 by Student's t-test

図 4-10

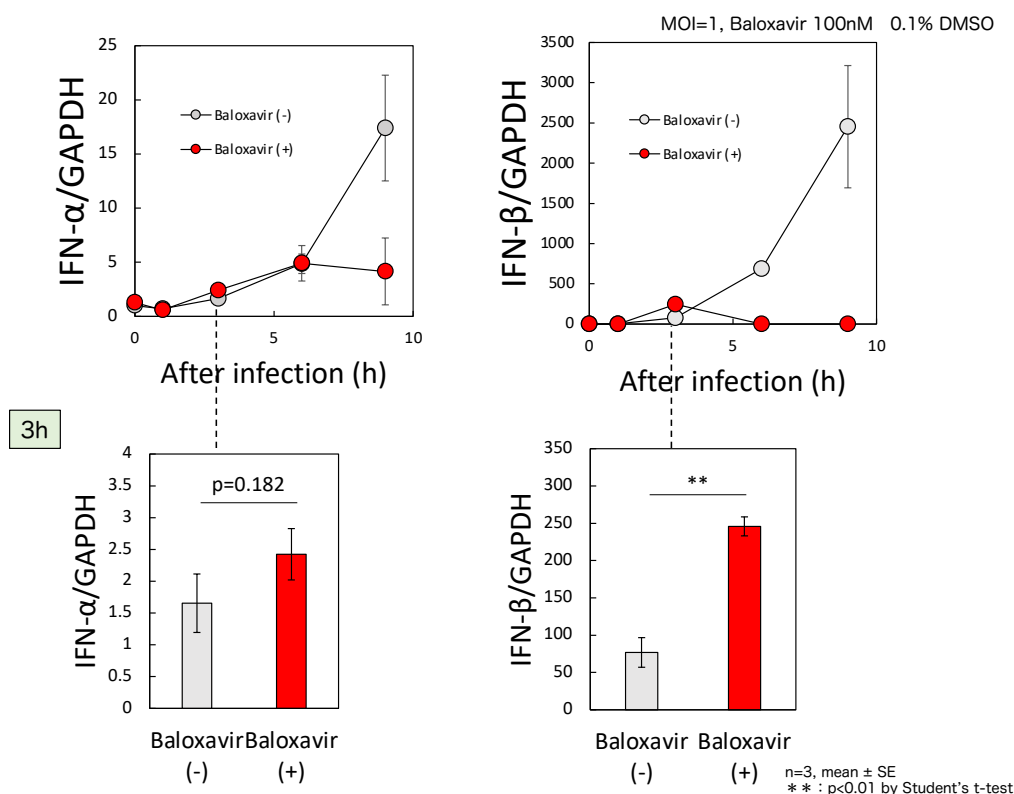


図 4-10 バロキサビル処理した際の I 型 IFN 発現量

単層 MDCK 細胞を D-PBS による洗浄操作ののち、バロキサビル 100nM 存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 1 の IAV PR8 株に感染させた。感染後の各時間点で、RL buffer により細胞を溶解・回収し、RNA 抽出・逆転写反応により cDNA を合成後、qPCR 法により IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  の RNA 量を GAPDH の Ct 値により補正し解析した。バロキサビル(-)の 0 時間後の IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  RNA 量を基準としてグラフを作成した。グラフは独立した実験値 3 回分の平均を、エラーバーはその標準誤差(S.E.)を示している。\*: p<0.01 by Student's t-test

図 4-11

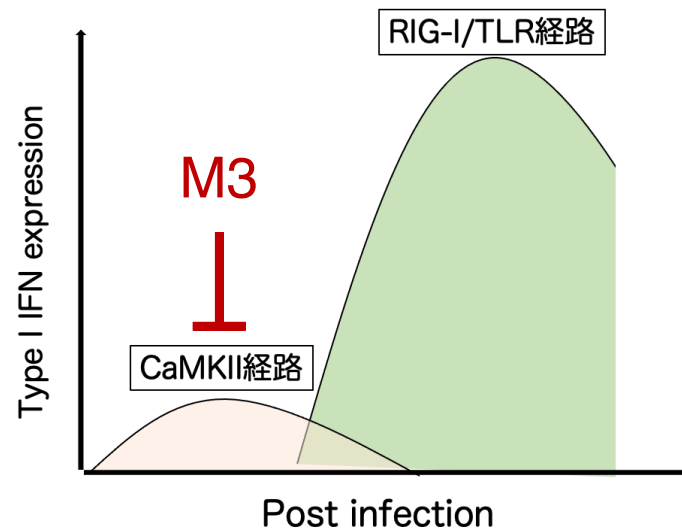


図 4-11 感染初期に CaMKII が関与する I 型 IFN 誘導機構が存在する

感染初期に誘導される CaMKII 依存的な IFN 発現誘導経路は、発現量は少ないものの、初期のキャップ構造供給という意味で、ウイルス増殖に重要な働きをしていること、M3 はこの経路を阻害することで抗ウイルス活性を発揮していることが示された。

## 第5章 新たなI型IFN発現誘導機構の解析

### 5-1 概要

これまで感染初期のI型IFN産生をM3が抑制することを明らかにしている。本章ではI型IFN誘導経路のどの部分にM3が関与するかを解析する。はじめにI型IFNの転写因子であるInterferon regulatory factor 3 (IRF3)の活性化の指標であるリン酸化にM3が影響を与えるかどうかを検討する。次に、IRF3をリン酸化するキナーゼとして知られている、TANK-binding kinase 1 (TBK1)の活性化をリン酸化を指標に検討する。さらに、TBK1の上流であるRIG-Iの感染初期の関与を明らかにするため、RIG-IをKOしたMDCK細胞を樹立し、IAV感染時のIFN産生への影響を検討する。最後に、TBK1の阻害剤であるGSK8612を用いて、感染初期のTBK1の活性を阻害することで抗ウイルス活性を発揮するかを検証する。

### 5-2 実験方法

#### 5-2-1 実験試薬

##### ・A549細胞の培養

F-12K	(富士フィルム wako)
Fetal Bovine Serum (FBS)	(biosera)
Penicillin/Streptomycin Solution	(Nacalai Tesque)
Dulbecco's modified Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	(Nacalai Tesque)
0.25% Trypsin-EDTA	

##### ・抗体

IRF-3 (D6I4C) XP® Rabbit mAb	(Cell Signaling Technology)
Phospho-IRF-3 (Ser386) (E7J8G) XP® Rabbit mAb	(Cell Signaling Technology)
TBK1/NAK (D1B4) Rabbit mAb	(Cell Signaling Technology)
Phospho-TBK1/NAK (Ser172) (D52C2) XP® Rabbit mAb	(Cell Signaling Technology)
Rig-I (D14G6) Rabbit mAb	(Cell Signaling Technology)
ウサギ $\beta$ -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)

##### ・IAV 感染実験

#### 2-2-1. IAV 感染実験に準ずる

・ ウェスタンブロット法

NP-40	(Sigma-Aldrich)
Sodium Deoxycholate	(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)
BCA assay 試薬	(Thermo Scientific)

・ ペプチド・阻害剤

M3 : MA-RRI-L-LLLL-A-RLH-A-KKK-Ahx	
GSK8612	(Sigma-Aldrich)

・ KO 細胞の作製

KOD FX Neo	(TOYOBO)
pSpCas9(BB)-2A-GFP (px458) vector	(addgene)
プライマー・gRNA (表 4)	
BsrBI	(New England Biolabs)
アガロース S	(ニッポンジーン)

## 5-2-2 A549 細胞の培養

IAV の感染モデルのシグナル分子の解析の際にはヒト肺胞基底上皮腺癌細胞由来の細胞株である A549 細胞(ATCC CCL-185)を使用した。A549 細胞の培養には 10% 非働化 FBS、100 units/ml Penicillin ならびに 100  $\mu$ g/ml Streptomycin を含む F-12K (以下、培養培地)を用い、次の手順で継代操作を行った。75cm<sup>2</sup> フラスコ内で培養している A549 細胞を 5ml の D-PBS により洗浄後、2.5ml 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 5 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 8.5ml の培地で中和すると共に細胞を 15ml 円沈菅へと回収し、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、0.25ml を 10 ml の培地に希釈して新しい 75cm<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。

### 5-2-3 A549 細胞における M3 の IAV の細胞傷害阻害活性の解析

**Single-cycle infection** 96well プレートに細胞密度  $3 \times 10^4$  cells/well で播種し、次の日の A549 細胞を用いた。M3 を A549 細胞に添加し、添加 30 分後に MOI 10 の IAV PR8 株を培養培地中で感染させた。各化合物の濃度は最終濃度を示している。感染 48 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。

### 5-2-4 M3 の IRF3 活性化への影響

A549 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後 M3(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,1,3,6,9,12,16,20,24 時間後の細胞溶解液を作製した。BCA assay により濃度を調製し、**3-2-2 ウェスタンブロッティング法**に従い、IRF3 抗体, p-IRF3 抗体, M1 抗体,  $\beta$ -actin 抗体を用い解析を行った。

### 5-2-5 M3 の TBK1 活性化への影響

A549 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後 M3(±)培養液で 30 分インキュベート後、IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,1,3,6,9,12,16,20,24 時間後の細胞溶解液を作製した。BCA assay により濃度を調製し、**3-2-2 ウェスタンブロッティング法**に従い、TBK1 抗体, p-TBK1 抗体,  $\beta$ -actin 抗体を用い解析を行った。

### 5-2-6 RIG-I KO 細胞の樹立

pSpCas9(BB)-2A-GFP (px458) vector に RIG-I gRNA を導入したプラスミドを作製し、MDCK 細胞に **3-2-4 MDCK 細胞へのトランスフェクション**に従いトランスフェクションを行った。トランスフェクション 72 時間後、FACS AriaII(BD)により GFP の蛍光を指標にシングルセルソートを行ない、96 ウェルプレートに播種した。生育の良いシングルコロニーからゲノム DNA を抽出し、KOD-FXNeo の製品書に従い RIG-I の CRISPR 切断部位を含む領域を PCR により増幅した。PCR 産物を BsrBI により制限酵素処理し、その DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により確認することでジェノタイピングを行い、標的部位に変異が導入されているかを検討した。変異導入されているものについて、**3-2-2 ウェスタンブロッティング法**に従い RIG-I が検出されないものについて KO 細胞として樹立した。

### 5-2-7 RIG-I KO 細胞における I 型 IFN 産生に及ぼす影響

MDCK 細胞を 12 well plate に播種し、72 時間後 IAV PR8 株 MOI 1 で感染させ、0,1,3,6,9,12,16 時間後の RNA を **2-2-8 RNA 抽出 cDNA 合成**に従い作製した。**2-2-8 qPCR 法**に従い cDNA を合成後 qPCR 法により IFN $\beta$  遺伝子量を測定した。その際、表 2 に示すプライマーセットを用いて、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 ddCt 法に基づいて IFN $\beta$  の mRNA の相対発現量を定量した。

#### 5-2-8 IAV の細胞傷害活性を指標とする TBK1 阻害剤 (GSK8612) の抗 IAV 活性の解析

**Single-cycle infection** 96well 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化させた MDCK 細胞を用いた。GSK8612<sup>46</sup> を単層 MDCK 細胞に添加し、添加 30 分後に MOI 10 の IAV PR8 株を培養培地中で感染させた。感染 1 時間後に D-PBS(-) により洗浄し、GSK8612 (±) 培養液を加えた。感染後各時間 (3,6,9 時間) 後に、D-PBS (-) で洗浄後して GSK8612 含有培地を加えた。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。

また、感染 1 時間後に D-PBS(-) により洗浄し、GSK8612 (±) 培養液を加えた。感染後 12 時間後に、D-PBS (-) で洗浄後して GSK8612 含有培地を加えるまたは除去した。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 A549 における M3 の抗ウイルス活性の解析

抗ウイルス応答のシグナル経路は主に転写因子の IRF3 をリン酸化させ、I 型 IFN の産生を誘導する (図 5-1)。そこで、これらシグナル経路に M3 はどのように影響を与えるかを検証するため、A549 細胞を用いることにした。まず A549 細胞において M3 が抗ウイルス活性を発揮するかを検討するため、MOI 10 で PR8 株を感染させる 30 分前に M3 を処理し、48 時間後の生存率を WST 法で測定した。その結果、濃度依存的に細胞生存率が回復し、 $3 \mu\text{M}$  では十分な抗 IAV 活性が確認された。(図 5-2)

#### 5-3-2 M3 の IRF3 の活性化に対する影響

次に A549 細胞に、MOI 1 で PR8 株を感染させる 30 分前に M3 を処理し、各時間 (0,1,3,6,9,12,16,20,24 時間) 後の細胞溶解液を作製し、10%アクリルアミドゲルを用いてウエスタンブロッティングを行い、IRF3 の活性化の指標である S386 特異的リン酸化抗体を用いて M3 の影響を観察した。その結果、感染 9 時間以降に IRF3 のリン酸化が確認され、その活性化は 24 時間まで確認された。一方で M3 処理により感染 9 時間時点のリン酸化は減弱すること、この傾向は 24 時間まで続くことが確認された。(図 5-3)

#### 5-3-3 M3 の TBK1 の活性化に対する影響

IRF3 の活性化を M3 は抑制していたことから、その上流キナーゼである TBK1 の解析を行った。A549 細胞に、MOI 1 で PR8 株を感染させる 30 分前に M3 を処理し、各時間 (0,1,3,6,9,12,16,20,24 時間) 後の細胞溶解液を作製し、10%アクリルアミドゲルを用いてウエスタンブロッティングを行い、TBK1 の活性化は同じく、リン酸化型特異的抗体を用いて評価した。その結果、IRF3 と同様に、感染後 9 から 12 時間にかけて見られる活性化に

対して、M3 は明瞭な阻害活性を示し、その傾向は 24 時間まで観察された。(図 5-4)

#### 5-3-4 RIG-I KO 細胞における I 型 IFN 産生への影響

TBK1 の上流である RIG-I が感染初期の IFN 産生に関与するかを検討するため、CRISPR-Cas9 系により RIG-I KO MDCK 細胞を樹立した。その際、RIG-I のタンパク発現量をウェスタンブロッティングにより確認したところ、RIG-I の発現が消失することを確認した (図 5-5A)。本細胞を用いて RIG-I の関与を検証するため、I 型 IFN mRNA 発現に対する効果を qPCR 法により検討した。RIG-I KO により、IAV 感染により誘導する I 型 IFN がほとんど発現しなくなることを見出した。さらに、感染初期の 3 時間時点では RIG-I KO 細胞では全く I 型 IFN の発現が確認されなくなることを見出した (図 5-5B)。

#### 5-3-5 TBK1 inhibitor の抗ウイルス活性の解析

CaMKII-TBK1-IRF3 経路の存在が示唆されたことから、次に TBK1 の阻害剤である GSK8612 を用いて IAV によって誘導される細胞障害活性に対する効果を検討した。MDCK 細胞に TBK1 の阻害剤である GSK8612 を感染 30 分前に処理し MOI 10 で PR8 株を感染させ、24 時間後 WST 法に細胞傷害活性を測定したところ、GSK8612 は十分な抗ウイルス活性を発揮した。さらに、感染 3,6,9 時間以降に阻害剤を加えた場合には顕著な阻害活性が観察されるが、処理時間が遅くなるにつれて阻害効果が減弱すること、を見出した (図 5-6A)。また、感染前期のみ存在させた場合でも、十分な阻害活性を示すこと、を見出した (図 5-6B)。

### 5-4 考察

感染前期においては、TBK1-IRF3 経路の活性化が M3 によって阻害されること、すなわち CaMKII の下流には TBK1-IRF3 経路が存在すると考えられる。また、RIG-I KO MDCK 細胞において、感染初期の I 型 IFN の産生が大きく阻害されること、が明らかとなった。したがって CaMKII は感染初期の RIG-I の活性化を制御しており、M3 は上流の CaMKII を直接阻害することで、この下流シグナルを阻害し、抗ウイルス活性を示す、と考えられた。また、TBK1 阻害剤においても同様の抗ウイルス活性を示したことから、感染初期の本経路の活性化による I 型 IFN 誘導は感染増強に働くシグナルであることが明らかとなった。前章において、感染初期に誘導される CaMKII 依存的な IFN 発現誘導経路はウイルス増殖に促進的に、中・後期に働く RIG-I・TLR 依存的な IFN 発現誘導経路は防御的に働くことを見出したが、実は RIG-I はこの CaMKII 依存的な IFN 発現誘導経路にも共通して関与していることになる。すなわち、本来感染防御に働く RIG-I が CaMKII によって初期に活性化され、ウイルス増殖に必須の初期のキャップスナッチングを増強することで、結果的にウイルス増殖に促進的に働く、と考えられた。

これまで CaMKII は TLR4 活性化時に TAK1-IRF3 経路を直接活性化し炎症生サイトカ



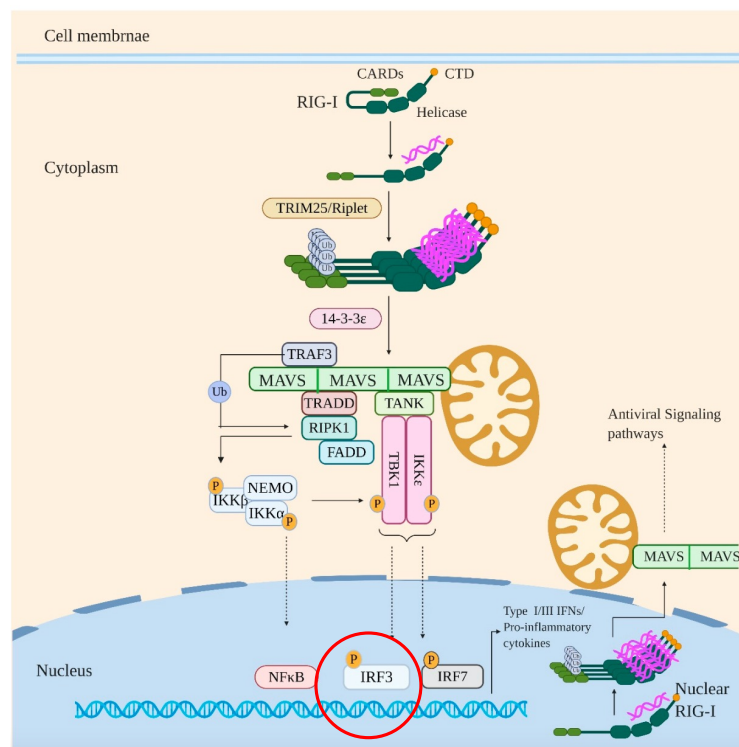
インを誘導することが示されているが<sup>47</sup>、CaMKII が RIG-I を直接制御するという報告はない。RIG-I は CARD ドメインに存在する Ser8 と Thr170、CTD ドメインに存在する Thr770 と Ser854/855、の両方ドメインがリン酸化された状態では活性が抑制され、感染する前のシグナル伝達を防いでいる<sup>48-50</sup>。すなわち、RIG-I に関しては活性を抑制する方向に働くリン酸化部位しか報告されておらず、活性を促進するようなリン酸化部位の報告はない。今後 CaMKII による RIG-I のリン酸化による直接制御について検討する必要がある。また、RIG-I はリン酸化以外にユビキチン化やアセチル化等様々な翻訳後修飾によって活性制御を受ける<sup>51</sup>。したがって、今後 CaMKII による RIG-I の翻訳後修飾に対する影響についても検討する必要がある。

## 5-5 図表

表 4

qPCR primer name	Sequence (5' to 3')	Ref.
cGAPDH_F2	ACGGCACAGTCAAGGCTGAG	28
cGAPDH_R2	CAGCATCACCCCATTTGATGTTGG	28
cIFNb_F1	CCAGTTCCAGAAGGAGGACA	45
cIFNb_R1	TGTCCCAGGTGAAGTTTTCC	45
PCR primer name	Sequence (5' to 3')	
cRIG-I_PCR_F1	CCAGTTGCGGTTTCGATTTCCCA	
cRIG-I_PCR_R1	AAGTCATTTCCCTTCTCTGGGGCTG	
gRNA oligo name	Sequence (5' to 3')	
cRIG-I_gRNA_F1	CACCGGTGCAGGTTTCGCCGCTCCT	
cRIG-I_gRNA_R1	AAACAGGAGCGGCGAAACCTGCACC	

図 5-1



*Viruses*. **14**;12(7):755.(2020)を改編

### 図 5-1 RIG-I による I 型 IFN 誘導経路

RIG-I は外来 RNA をセンスして活性化し、MAVS と複合体を形成し、I 型 IFN を発現誘導する転写因子を活性化する。IAV 感染における I 型 IFN の主要な因子である IRF3 について着目する。

図 5-2

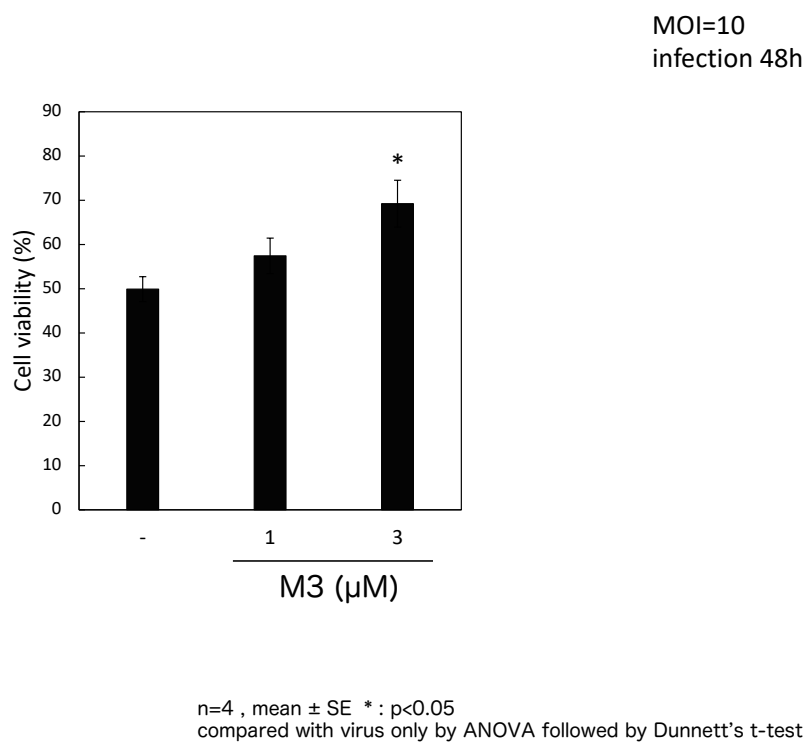


図 5-2 A549 細胞における M3 の細胞傷害阻害活性

A549 細胞を播種し、翌日に各濃度の M3 存在下において MOI 10 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 4 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差(S.E.)を示している。

\*: p<0.05 compared with virus only by ANOVA followed by Dunnett's t-test

図 5-3

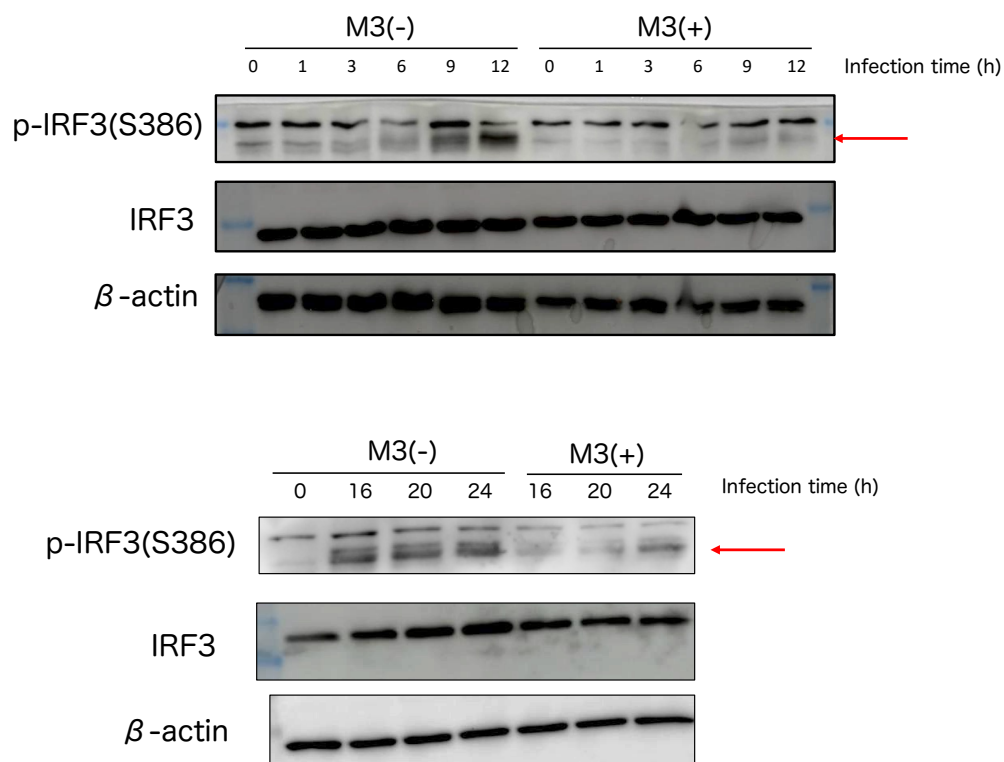


図 5-3 感染初期において M3 は IRF3 の活性化を抑制する

A549 細胞を播種し、翌日に D-PBS による洗浄操作ののち、M3  $3\mu\text{M}$  存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 1 の IAV PR8 株に感染させた。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 IRF3, p-IRF3(S386)を解析した。

図 5-4

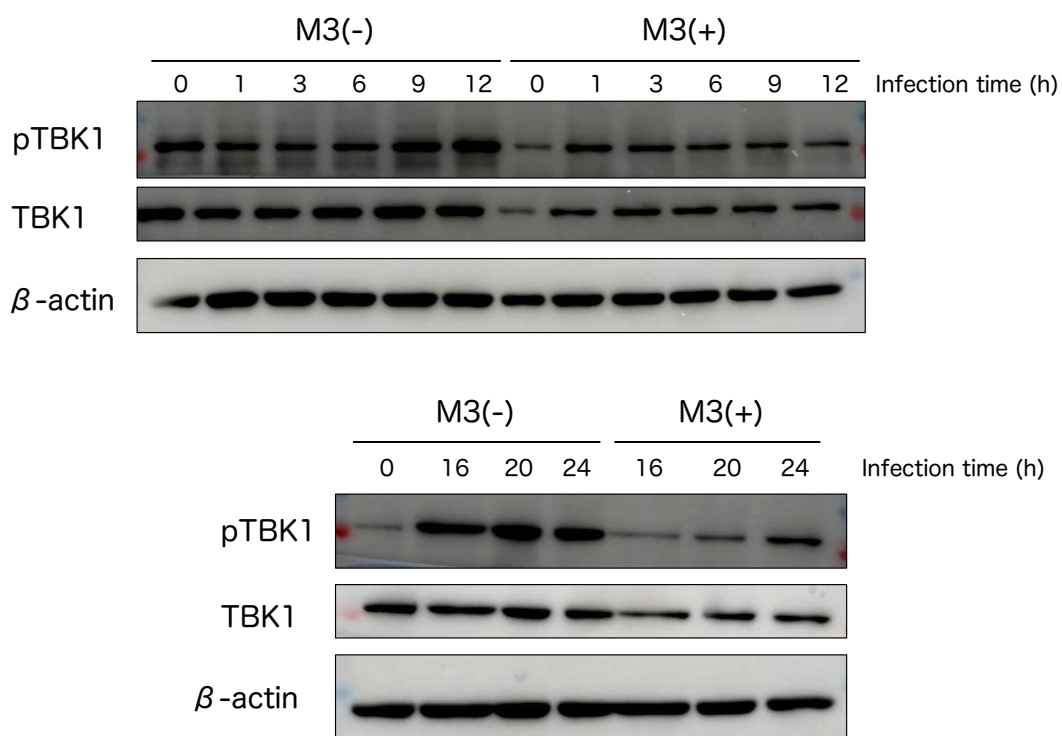


図 5-4 感染初期において M3 は TBK1 の活性化を抑制する

A549 細胞を播種し、翌日に D-PBS による洗浄操作ののち、M3  $3\mu\text{M}$  存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 1 の IAV PR8 株に感染させた。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 TBK1, p-TBK1 を解析した。

図 5-5

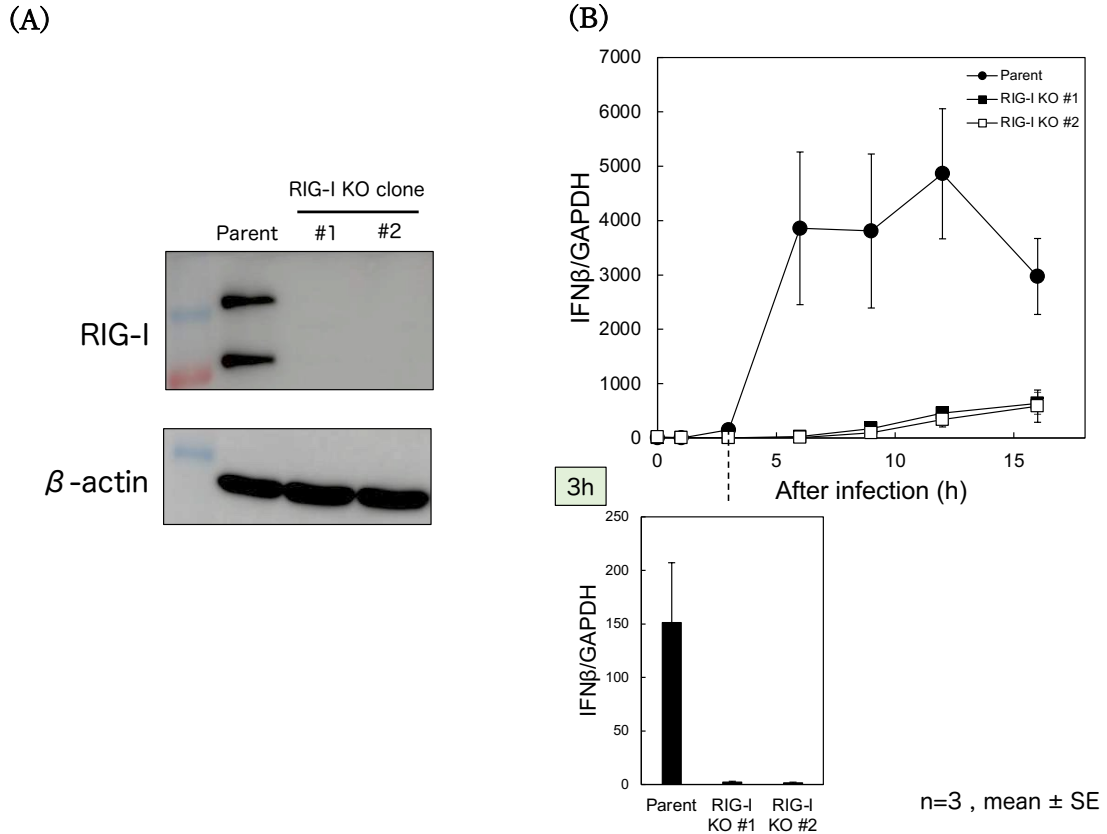


図 5-5 RIG-I 欠損 MDCK 細胞における I 型 IFN 発現量

(A) CRISPR-Cas9 系を用い、RIG-I KO 細胞を単離、ウェスタンブロッティングにより RIG-I が KO されているかを確認した。

(B) 各単層 MDCK 細胞を D-PBS による洗浄操作ののち MOI 1 の IAV PR8 株に感染させた。感染後の各時間で、RL buffer により細胞を溶解・回収し、RNA 抽出・逆転写反応により cDNA を合成後、qPCR 法により IFN $\beta$  の RNA 量を GAPDH の Ct 値により補正し解析した。Parent の 0 時間後の IFN $\beta$  RNA 量を基準としてグラフを作成した。グラフは独立した実験値 3 回分の平均を、エラーバーはその標準誤差(S.E.)を示している。

図 5-6

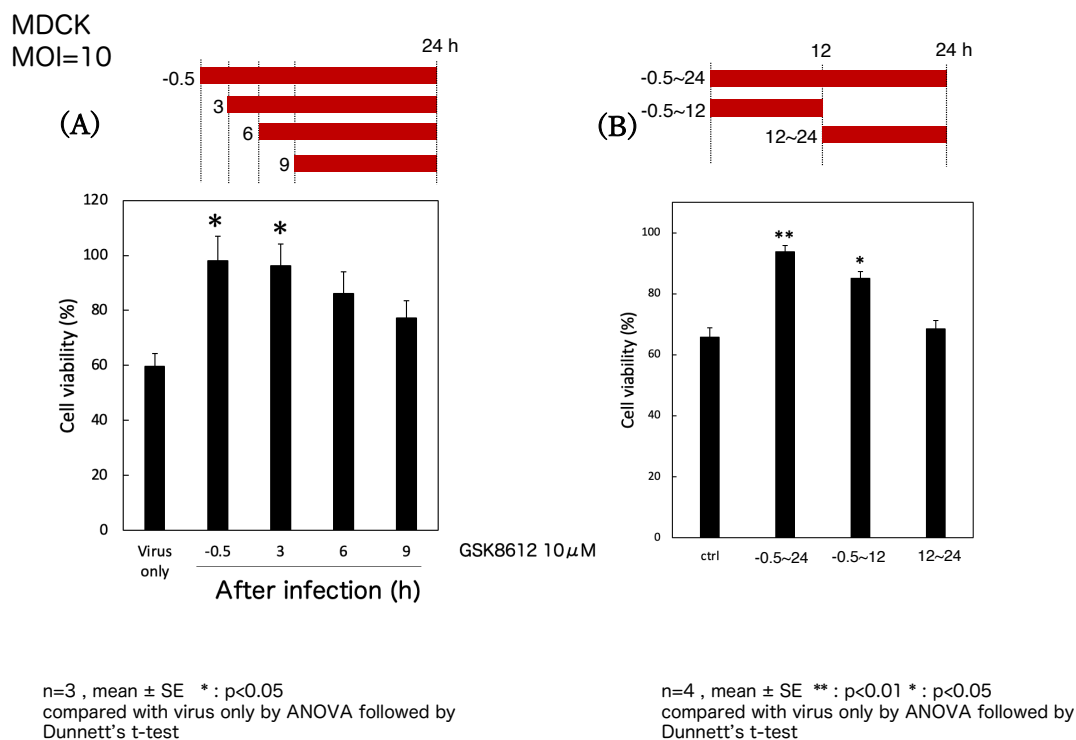


図 5-6 TBK1 inhibitor は感染前期で抗 IAV 活性を示す

(A)単層 MDCK 細胞を D-PBS による洗浄操作ののち、GSK8612 10  $\mu$ M 存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 10 の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後 D-PBS により洗浄し、GSK8612 存在または非存在下で培養した。各時間 (3, 6, 9 時間) で GSK8612 を添加し、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なった。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 virus only by ANOVA followed by Dunnett's t-test

(B)単層 MDCK 細胞を D-PBS による洗浄操作ののち、GSK8612 10  $\mu$ M 存在下あるいは非存在下培養し、30 分後 MOI 10 の IAV PR8 株に感染させた。感染 1 時間後 D-PBS により洗浄し、GSK8612 存在または非存在下で感染 12 時間後まで培養し、GSK8612 を添加または除き、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なった。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.)を示している。

\*\* : p<0.01, \* : p<0.05 compared with virus only by ANOVA followed by Dunnett's t-test



## 第6章 結論

本研究において、CaMKII 阻害ペプチドである M3 を用いて、これまで未解明であった IAV 感染時の CaMKII の関与機構を明らかにした。IAV 感染の初期には、これまで知られていなかった CaMKII 依存的 IFN 誘導経路が存在することを見出した。CaMKII は TBK1-IRF3 経路の活性化を介して IFN 発現を誘導し、本経路は、発現誘導量は少ないものの、感染のごく初期に、ウイルス増殖に必要なキャップ構造を提供することで、感染を増強していると考えられた。この感染初期の誘導は、後半に大量の IFN 産生を誘導することで、感染防御に働く RIG-I/TLR 経路とは質的に全く異なる。M3 は直接 CaMKII を阻害することによって、本経路を遮断し、強力な抗 IAV 活性を示すことが明らかとなった（図 6）。本経路を見出したことで、既存の治療薬とは異なる、新たな抗 IAV 薬の開発が大きく展開することが期待できる。

本研究で明らかとした作用機構と同様の機構で M3 が効果を示すと期待されるウイルスとして、「感染初期に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入すること」と「Cap スナッチング機構を有するウイルス」の両条件を満たすものが考えられる。この 2 条件を満たすウイルスとして、近年発見され致死率の高い重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) が挙げられる。SFTSV はカルシウムチャネルブロッカーにより細胞内への侵入を抑制すること、すなわち感染時に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入しそれが感染に重要であることが報告されている<sup>52</sup>。また、SFYSV はエンドヌクレアーゼ活性を持つ L タンパクを持っており、バロキサビルによって Cap スナッチングが抑制されることが知られている<sup>53</sup>。従って、M3 は SFTSV に対しても IAV と同様の機構で抗ウイルス活性を発揮することが期待される。

また、CaMKII は様々なウイルスの感染に重要であることが示唆されている<sup>54-56</sup>。例えば C 型肝炎ウイルスでは、ウイルス増殖に重要な非構造タンパク質 5A の Ser235 のリン酸化が CaMKII によって引き起こされることが明らかになっている。このことから、これらウイルスについても M3 の効果を検証することで新たな治療薬となることが十分に期待される。

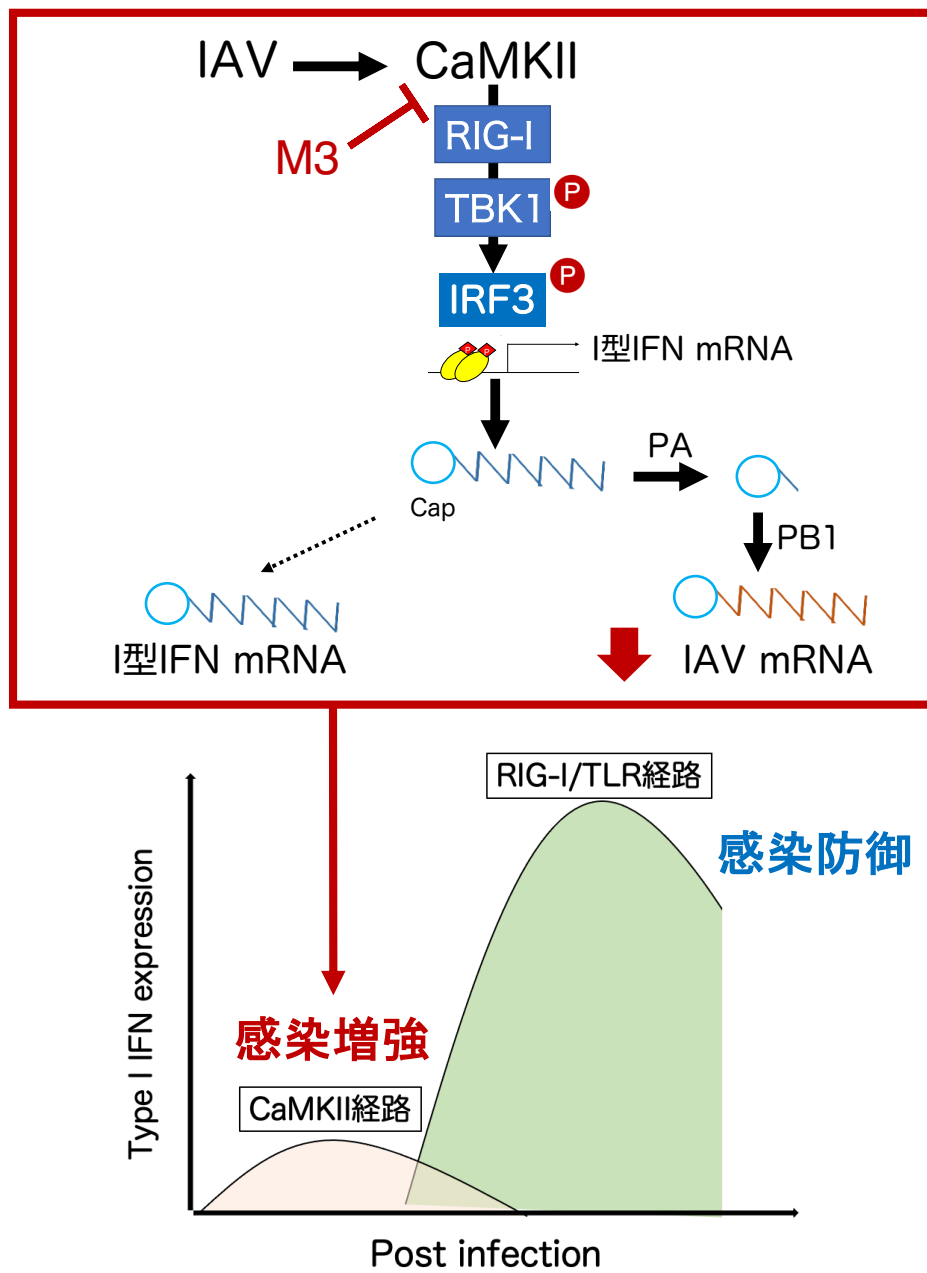


図6 IAV 感染に対する M3 の作用メカニズム

## 引用文献

1. Javanian, M. *et al.* A brief review of influenza virus infection. *J. Med. Virol.* **93**, 4638–4646 (2021).
2. Krammer, F. *et al.* Influenza. *Nature Reviews Disease Primers* **4**, 1–21 (2018).
3. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D49–53 (2008).
4. Hayden, F. G. *et al.* Efficacy and Safety of the Neuraminidase Inhibitor Zanamivir in the Treatment of Influenzavirus Infections. *N. Engl. J. Med.* **337**, 874–880 (1997).
5. Li, W. *et al.* Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 647–653 (1998).
6. Kubo Shuku, Tomozawa Takanori, Kakuta Masayo, Tokumitsu Akane & Yamashita Makoto. Laninamivir Prodrug CS-8958, a Long-Acting Neuraminidase Inhibitor, Shows Superior Anti-Influenza Virus Activity after a Single Administration. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1256–1264 (2010).
7. Suzuki, H. *et al.* Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. *J. Infect. Chemother.* **9**, 195–200 (2003).
8. Moscona, A. Oseltamivir Resistance — Disabling Our Influenza Defenses. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2633–2636 (2005).
9. Todd, B., Tchesnokov, E. P. & Götte, M. The active form of the influenza cap-snatching endonuclease inhibitor baloxavir marboxil is a tight binding inhibitor. *J. Biol. Chem.* **296**, 100486 (2021).
10. Uehara, T. *et al.* Treatment-Emergent Influenza Variant Viruses With Reduced Baloxavir Susceptibility: Impact on Clinical and Virologic Outcomes in Uncomplicated Influenza.

- J. Infect. Dis.* **221**, 346–355 (2020).
11. Shapira, S. D. *et al.* A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell* **139**, 1255–1267 (2009).
  12. König, R. *et al.* Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **463**, 813–817 (2010).
  13. Karlas, A. *et al.* Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* **463**, 818–822 (2010).
  14. Hao, L. *et al.* Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* **454**, 890–893 (2008).
  15. Tobimatsu, T. & Fujisawa, H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J. Biol. Chem.* **264**, 17907–17912 (1989).
  16. Brocke, L., Srinivasan, M. & Schulman, H. Developmental and regional expression of multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms in rat brain. *J. Neurosci.* **15**, 6797–6808 (1995).
  17. Cook, S. G. *et al.* Analysis of the CaMKII  $\alpha$  and  $\beta$  splice-variant distribution among brain regions reveals isoform-specific differences in holoenzyme formation. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).
  18. Braun, A. P. & Schulman, H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 417–445 (1995).
  19. Yasuda, R., Hayashi, Y. & Hell, J. W. CaMKII: a central molecular organizer of synaptic plasticity, learning and memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1–17 (2022).
  20. Rosenberg, O. S., Deindl, S., Sung, R.-J., Nairn, A. C. & Kuriyan, J. Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell* **123**, 849–860 (2005).

21. Chao, L. H. *et al.* Intersubunit capture of regulatory segments is a component of cooperative CaMKII activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 264–272 (2010).
22. Wong, M. H. *et al.* The KN-93 Molecule Inhibits Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) Activity by Binding to Ca<sup>2+</sup>/CaM. *J. Mol. Biol.* **431**, 1440–1459 (2019).
23. Ishida, A. & Fujisawa, H. Stabilization of calmodulin-dependent protein kinase II through the autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 2163–2170 (1995).
24. Ishida, A. *et al.* Critical amino acid residues of AIP, a highly specific inhibitory peptide of calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett.* **427**, 115–118 (1998).
25. 西川喜代孝、高橋美帆、西村浩輝、高柳広、尾藤晴彦. CaMKII 阻害ペプチドおよびそれを含有する CaMKII 阻害剤. *Patent*.
26. 修士論文\_\_濱信一郎\_\_同志社大学.
27. Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A. T. & Futaki, S. Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug. Chem.* **19**, 656–664 (2008).
28. Omi, J. *et al.* The inducible amphisome isolates viral hemagglutinin and defends against influenza A virus infection. *Nat. Commun.* **11**, 162 (2020).
29. Fujioka, Y. *et al.* A Sialylated Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Binds Hemagglutinin and Mediates Influenza A Virus Entry into Mammalian Cells. *Cell Host Microbe* **23**, 809–818.e5 (2018).
30. Watanabe, T. & Kawaoka, Y. Influenza virus-host interactomes as a basis for antiviral drug development. *Curr. Opin. Virol.* **14**, 71–78 (2015).
31. Meineke, R., Rimmelzwaan, G. F. & Elbahesh, H. Influenza Virus Infections and Cellular

Kinases. *Viruses* **11**, (2019).

32. Choi, M.-S. *et al.* A novel p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) specific inhibitor suppresses respiratory syncytial virus and influenza A virus replication by inhibiting virus-induced p38 MAPK activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **477**, 311–316 (2016).
33. Börgeling, Y. *et al.* Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection. *J. Biol. Chem.* **289**, 13–27 (2014).
34. Hama, S. *et al.* Development of a novel tetravalent peptide that absorbs subtilase cytotoxin by targeting the receptor-binding B-subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **629**, 95–100 (2022).
35. Kawakami, E. *et al.* Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA. *J. Virol. Methods* **173**, 1–6 (2011).
36. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H. & Daniels, R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* **9**, 1581 (2018).
37. Weis, S. & Te Velthuis, A. J. W. Influenza Virus RNA Synthesis and the Innate Immune Response. *Viruses* **13**, (2021).
38. Shen, K., Teruel, M. N., Subramanian, K. & Meyer, T. CaMKII $\beta$  functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKII $\alpha$ / $\beta$  heterooligomers to dendritic spines. *Neuron* **21**, 593–606 (1998).
39. Villalón-Letelier, F., Brooks, A. G., Saunders, P. M., Londrigan, S. L. & Reading, P. C. Host Cell Restriction Factors that Limit Influenza A Infection. *Viruses* **9**, (2017).
40. De Vlugt, C., Sikora, D. & Pelchat, M. Insight into Influenza: A Virus Cap-Snatching. *Viruses* **10**, (2018).

41. Bercovich-Kinori, A. *et al.* A systematic view on influenza induced host shutoff. *Elife* **5**, (2016).
42. Sikora, D., Rocheleau, L., Brown, E. G. & Pelchat, M. Influenza A virus cap-snatches host RNAs based on their abundance early after infection. *Virology* **509**, 167–177 (2017).
43. Kochs, G., García-Sastre, A. & Martínez-Sobrido, L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* **81**, 7011–7021 (2007).
44. Wang, X. *et al.* Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* **74**, 11566–11573 (2000).
45. Seitz, C., Frensing, T., Höper, D., Kochs, G. & Reichl, U. High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J. Gen. Virol.* **91**, 1754–1763 (2010).
46. Thomson, D. W. *et al.* Discovery of GSK8612, a Highly Selective and Potent TBK1 Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **10**, 780–785 (2019).
47. Liu, X. *et al.* CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages. *Blood* **112**, 4961–4970 (2008).
48. Gack, M. U., Nistal-Villán, E., Inn, K.-S., García-Sastre, A. & Jung, J. U. Phosphorylation-mediated negative regulation of RIG-I antiviral activity. *J. Virol.* **84**, 3220–3229 (2010).
49. Nistal-Villán, E. *et al.* Negative role of RIG-I serine 8 phosphorylation in the regulation of interferon-beta production. *J. Biol. Chem.* **285**, 20252–20261 (2010).
50. Sun, Z., Ren, H., Liu, Y., Teeling, J. L. & Gu, J. Phosphorylation of RIG-I by casein kinase II inhibits its antiviral response. *J. Virol.* **85**, 1036–1047 (2011).
51. Rehwinkel, J. & Gack, M. U. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA

- sensing. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 537–551 (2020).
52. Li, H. *et al.* Calcium channel blockers reduce severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) related fatality. *Cell Res.* **29**, 739–753 (2019).
  53. Wang, W. *et al.* The Cap-Snatching SFTSV Endonuclease Domain Is an Antiviral Target. *Cell Rep.* **30**, 153-163.e5 (2020).
  54. Saha, S., Ramanathan, A. & Rangarajan, P. N. Regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II inhibitor alpha (CaMKIINalpha) in virus-infected mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 444–449 (2006).
  55. Lee, K.-Y., Chen, Y.-H., Hsu, S.-C. & Yu, M.-J. Phosphorylation of Serine 235 of the Hepatitis C Virus Non-Structural Protein NS5A by Multiple Kinases. *PLoS One* **11**, e0166763 (2016).
  56. Blázquez, A.-B. & Saiz, J.-C. Potential for Protein Kinase Pharmacological Regulation in Flaviviridae Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々にご指導とご協力をいただきました。

終始ご指導とご理解、お力添えを貸して下さいました同志社大学 生命医科学部 医生命システム学科 西川喜代孝教授に心より感謝致します。

高橋美帆助教には、終始適切な助言を賜り、細部に渡るご指導をして頂きました。深く感謝致します。

本研究論文の審査を担当して下さいました、同志社大学 生命医科学部 医生命システム学科 小林聡教授、ならびに西川恵三教授には論文構成にあたり多くのアドバイスを頂き、謹んで御礼を申し上げます。

東京大学医科学研究所 河岡義裕教授、伊藤睦美先生には現流行株のインフルエンザウイルスを供与していただきました、心より感謝いたします。

さらに、本研究の遂行に協力して下さいました及川英子実験補助員、福本美香実験補助員に感謝致します。

本研究を行うにあたり、様々な形でご協力をいただき、支えて下さいました、同志社大学分子生命化学研究室の皆様心より感謝致します。

最後に、博士課程まで研究に専念できるような環境を支援していただいた家族には深く感謝いたします。ありがとうございました。

2023 年 1 月