

## 誘導性アンフィソームはインフルエンザウイルス感染防御に働く

近江 純平<sup>1</sup>, 西川 喜代孝<sup>2</sup>

### 1. はじめに

細菌やウイルスなどの病原微生物は、生存戦略として宿主細胞の分子機構を巧みに利用することで効率よく増殖し、病原性を発揮する。その一方で、宿主細胞には病原微生物に対抗するための防御機構が存在する。近年、宿主細胞内のさまざまなオルガネラが、病原微生物-宿主間相互作用の主たる場として固有の機能を有することが明らかになってきた<sup>1)</sup>。最近我々は、A型インフルエンザウイルス (IAV) のヘマグルチニン (HA) を標的として、強い抗IAV活性を示す4価型ペプチドを同定した。興味深いことに本ペプチドは親ウイルスのHAを標的とせず、感染成立後細胞内で新生されるHAに結合すること、その後オートファゴソーム様の特殊オルガネラの形成を誘導し、そこにHAを隔離することによりIAVの増殖を顕著に抑制すること、を見いだした<sup>2)</sup>。このことは、本誘導性オルガネラは生体が本来有している新たな防御機構である可能性を示している。本稿では、本オルガネラの形成機構とオートファジー経路との関連について概説するとともに、新たな病原微生物-宿主間相互作用の場としての本オルガネラの機能を紹介する。

### 2. 抗IAV活性を示す4価型HA結合ペプチドの同定

IAVは毎年大流行する季節性インフルエンザの主要な病原ウイルスであるとともに、時に世界的なパンデミックを引き起こすことから人類にとっていまだに大きな脅威であ

る。IAVの感染サイクルは、(1)標的細胞への結合と侵入 (感染初期)、(2)ウイルスゲノムRNAとmRNAの合成 (感染中期)、(3)ウイルスタンパク質の新生、ならびに子ウイルスの形成・放出 (感染後期)、から構成されており、各段階に関わるウイルスタンパク質、ならびに宿主因子が抗IAV薬の創薬標的として注目されている。そこで我々は、感染初期において機能するIAVのエンベロープタンパク質の一つ、HAに対する阻害ペプチドの開発を試みた。

HAは標的細胞表面に存在する糖タンパク質あるいは糖脂質の糖鎖末端シアル酸を認識し、IAVの標的細胞への結合、さらにそれに続くウイルスエンベロープと細胞膜との膜融合に必須の役割を果たしている。この膜融合によってウイルスゲノムRNAが細胞質に放出される。HAはホモ三量体構造をとっており、一度に最大3分子のシアル酸と結合する。この多価型の相互作用により、1対1の結合と比較して結合親和性は数千倍亢進する。本現象は「クラスター効果」と呼ばれており、他にもコレラ毒素や志賀毒素などAB5型の細菌毒素が受容体を認識する際に幅広く観察される<sup>3,4)</sup>。我々はこれまでに、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、多価型ペプチドライブラリー法を開発している<sup>3,5)</sup>。本法では、クラスター効果を発揮して機能する標的分子に対して、それ自体がクラスター効果を発揮できるようにランダムペプチド部を4価で有するペプチドライブラリーを作製し、高親和性結合活性を指標にスクリーニングを行う。一般的な低分子化合物スクリーニングでは1対1の結合にしか適用できないため、このような分子の同定はきわめて困難である。そこで、HAの受容体結合部位を標的として本法を適用し、4価型高親和性HA結合ペプチド、PVF-tetを同定した (図1A)<sup>2)</sup>。PVF-tetは、HA結合モチーフとして、RRPVNHFの配列を4価で有するが、同配列のモノマー型ペプチドではHAに対する結合活性をまったく示さない。このことは、従来型のペプチドライブラリー法やファージディスプレイ法では本モチーフの同定は不可能であることを示している。

PVF-tetはMDCK細胞におけるIAVの増殖ならびに感染による細胞傷害を効率よく抑制し、さらにマウスを用いたH1N1 IAVの感染実験でも高い治癒効果を示した (図1B, C)。in vitroでは、PVF-tetはHAと受容体ミミックであるシアル酸ポリマーとの結合を効率よく阻害することが示さ

<sup>1</sup> 東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室 特任助教 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)

<sup>2</sup> 同志社大学大学院生命医科学研究科分子生命化学 教授 (〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷1-3)

**The inducible amphisome defends against influenza A virus infection**

**Junpei Omi<sup>1</sup> and Kiyotaka Nishikawa<sup>2</sup>** (<sup>1</sup>Department of Health Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan, <sup>2</sup>Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, 1-3 Miyakotani, Tatara, Kyotanabe, Kyoto 610-0394, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930234

© 2021 公益社団法人日本生化学会

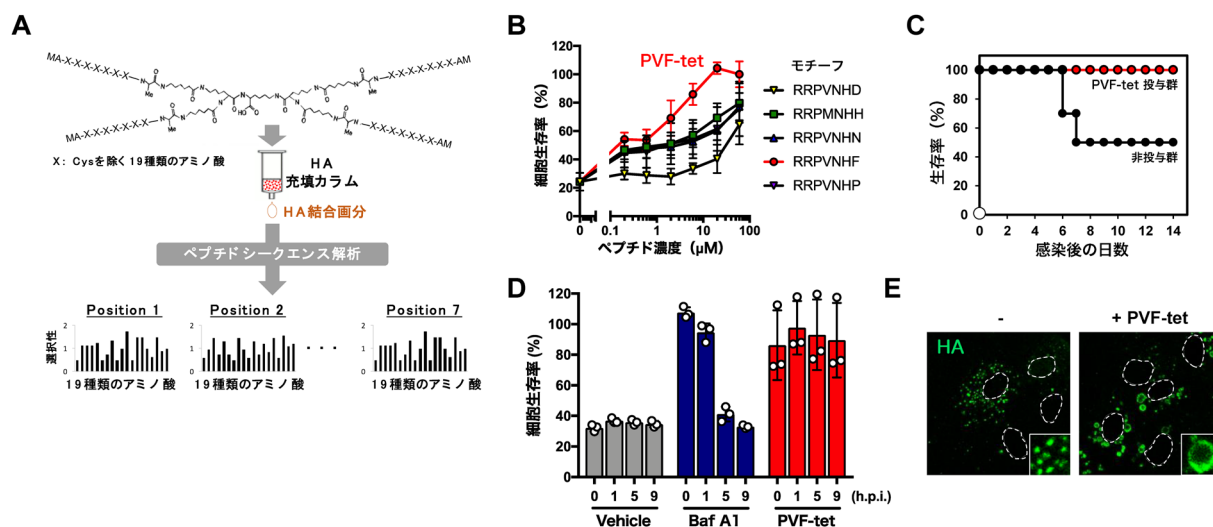


図1 4価型HAペプチドはHAを隔離することで抗IAV活性を示す

(A)多価型ペプチドライブラリーの構造を示す。HA結合画分について、X<sub>n</sub>で示すランダムペプチド部をシーケンス解析することにより、HA結合モチーフを取得する。(B)各HA結合モチーフを多価型ペプチドライブラリーと同じ骨格に組み込んだ4価型ペプチドは、IAV感染による細胞傷害を阻害する。(C)IAV (A/California/09株)感染マウスの致死性に対してPVF-tetは高い治療効果を示す。(D)感染後の各時間 (h.p.i.) に各阻害剤を添加した際の細胞生存率を示す。膜融合を阻害するBafilomycin A1 (Baf A1)は、感染初期にのみ、PVF-tetは後期でも高い抗ウイルス活性を示す。(E)感染16時間後、PVF-tet存在下ではHAは液胞様構造体に蓄積する。点線は核の輪郭を示す。

れた。しかしながら、予想に反してPVF-tetは親ウイルスの細胞内侵入をまったく阻害せず、細胞内での各種ウイルスタンパク質の産生も阻害しないこと、むしろHAの産生量は増加すること、を見いだした。そこでPVF-tetの作用機構の詳細を明らかにするため、IAV感染後期にPVF-tet処理した場合の効果を検討したところ、この場合でも十分な抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった(図1D)。さらに、蛍光標識PVF-tetを用いて感染後新生される各種ウイルスタンパク質との共局在性を検討したところ、PVF-tetはHAとのみ共局在性を示すこと、この時HAは液胞様構造体中に蓄積していること、が示された(図1E)。以上のことから、PVF-tetはそれ自体が膜透過性を有しており、感染後新生されてくるHAの受容体結合部位に特異的に結合すること、その結果液胞様構造体の形成が誘導され、そこにHAを隔離することによりIAVの産生を強力に阻害すること、が明らかとなった。

### 3. 抗IAV活性を示す液胞様構造体の性状解析

PVF-tetにより形成誘導され、HAを蓄積・隔離する液胞様構造体について性状解析を行ったところ、1) 本構造体には後期エンドソームやリソソームのマーカー分子であるLAMP-1やCathepsin Dが局在しており、酸性コンパートメントを染色するLysoTrackerで強染色されること、2) 本構造体はコレステロールを染色するfilipin、ならびに細胞外から添加した蛍光セラミドで強く染色されること、が示さ

れた。このことは、本構造体が脂質に富んだりソーム関連オルガネラであることを示している。

脂質に富んだりソーム関連オルガネラとしては、肺胞II型上皮細胞内に多く存在するラメラボディーが知られている。このラメラボディーはリン脂質を主成分とする肺サーファクタントを肺胞内に供給するためのオルガネラであり、境界膜に局在するリン脂質トランスポーター、ABCA3の脂質輸送活性によって後期エンドソームから成熟して形成される<sup>6)</sup>。そこで、ABCA3をMDCK細胞に高発現させ、ラメラボディーを恒常的に産生する細胞株を樹立し、IAV感染に対する効果を検討した。その結果、本細胞株はPVF-tet非存在下でも高い抗ウイルス活性を示すこと、このときPVF-tet処理の場合と同様にHAを蓄積した液胞様構造体が形成されることを見いだした(図2A)。この構造体にはABCA3が存在するが、ラメラボディーとは異なり、LysoTrackerで強染色され、またコレステロールの蓄積も顕著であった。以上の結果は、HAを蓄積・隔離することで抗IAV活性を示す液胞様構造体は、細胞が本来有している生体防御機構であり、PVF-tet処理やABCA3の高発現の条件下でIAV感染により形成誘導される新たなオルガネラである可能性を示している。

### 4. 抗IAV活性を示す新規オルガネラの形成にはオートファジー経路が関与する

PVF-tet処理やABCA3の高発現下でIAV感染により誘導

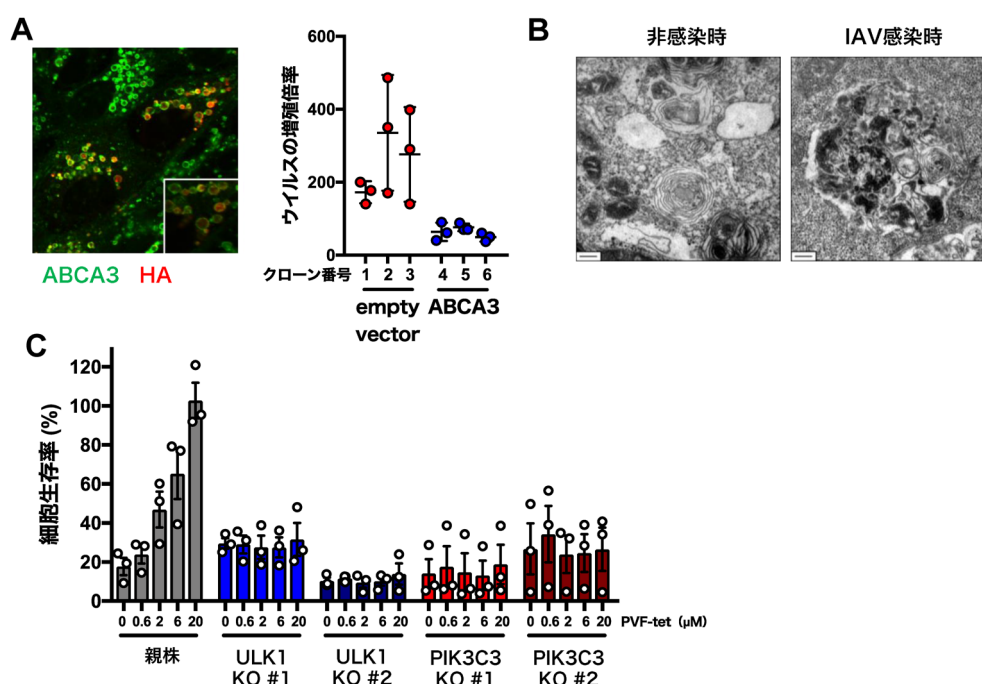


図2 抗IAV活性を示す液胞様構造体の形成にはオートファジー経路が関与する

(A) ABCA3 高発現細胞に IAV を感染させると, HA は ABCA3 陽性液胞様構造体に隔離され(左), IAV の増殖は抑制される(右). (B) ABCA3 高発現細胞で非感染時に観察されるラメラボディ(左), ならびに IAV 感染時に出現する HA 陽性構造体の電子顕微鏡像を示す(右). バーは 200 nm を示す. (C) ULK1-あるいは PIK3C3-ノックアウト (KO) 細胞株では, PVF-tet による抗ウイルス活性が消失する.

される, 本抗ウイルスオルガネラの形成機構を解明するため, 透過型電子顕微鏡による微細形態観察を行った. その結果, いずれの場合にもその内腔には高電子密度構造体とともに, ラメラ様の膜構造体が含まれていることを見いだした(図2B). このような形態的性状は, 後期エンドソームとオートファゴソームの融合により生じる既知のオルガネラ「アンフィソーム」の性状と非常によく一致する<sup>7)</sup>. そこで, 本オルガネラ形成におけるオートファジー経路の関与を検討した. まず, PVF-tet 処理や ABCA3 高発現下で誘導されるオルガネラには, オートファゴソーム膜のマーカーである LC3 が局在していることを見いだした. そこで, オートファゴソーム形成に必須の役割を果たしているクラス III PI3K, ならびにその上流分子である ULK1 を欠損した MDCK 細胞由来細胞株を樹立し, 本オルガネラの形成ならびに抗ウイルス活性を検討した. その結果, いずれの場合にも本オルガネラの形成が起こらず, また抗ウイルス活性も消失することが示された(図2C). このことから, 本オルガネラは, IAV 感染時に PVF-tet 処理や ABCA3 高発現下で形成誘導され, その形成にはオートファゴソームの形成が密接に関与する, 誘導性アンフィソームである, ということができる(図3).

## 5. IAV 感染におけるオートファジー機構の多面性

これまで, IAV 感染によって誘導されるオートファジーは, 感染に促進的であるとする報告が主流であった<sup>8)</sup>. たとえば, IAV 感染によって LC3-II が蓄積し, オートファゴソーム形成が誘導されること, PI3K の阻害剤はこれらの現象を妨げ, ウイルスの増殖に対して抑制的に働くことが報告されている<sup>9)</sup>. さらに, IAV の構造タンパク質である M2 は, そのプロトンチャネル活性によりオートファゴソームからオートリソソームへの成熟を阻害し, 未成熟なオートファゴソームを蓄積させること, その後 M2 上に存在する LC3 と相互作用するモチーフ (LC3-interacting region: LIR) を介して, 蓄積したオートファゴソームを細胞膜へとリクルートし, IAV 粒子形成に必要な膜の供給源として利用していること, が報告されている<sup>10, 11)</sup>. さらに最近, IAV の感染に伴ってオートファゴソームにウイルス mRNA とリボソーム複合体がリクルートされること, すなわちオートファゴソームが IAV タンパク質合成の場として機能する可能性が示されている<sup>12)</sup>. これに対し, PVF-tet 処理や ABCA3 高発現下で形成誘導され, 強い抗ウイルス活性を示す誘導性アンフィソームの存在は, オートファジー機構が感染に防御的に働く場合があることを明瞭に示している. これまでの報告と一致して, PVF-tet 未処



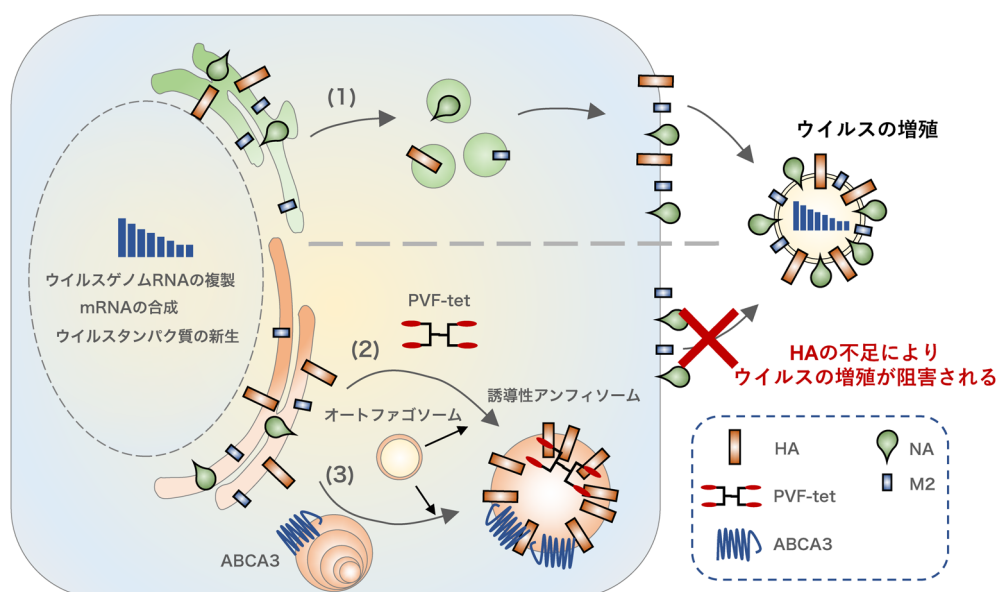


図3 抗ウイルス活性を示す誘導性アンフィソームの形成モデル

(1) 感染後新生されるHAは小胞輸送により細胞膜に輸送され、ウイルス粒子へと取り込まれる。その一方で、(2) PVF-tet存在下、あるいは(3)ABCA3を高発現させた条件下では、オートファジー機構依存的にアンフィソーム様の構造体が形成誘導され、そこにHAが隔離される。

理の場合でも感染によりLC3-II陽性のオートファゴソームは形成されるが、ここには新生HAはまったく局在しない。一方、抗ウイルス活性を示すLC3-II陽性の誘導性アンフィソーム内には大量の新生HAが分解されることなく蓄積・隔離されているが、M2を含む他のウイルスタンパク質は存在しない。このことから、PVF-tetは抗ウイルス活性を示す誘導性アンフィソームの形成を促進するだけでなく、感染によって誘導されIAV増殖に促進的に働くオートファゴソーム形成を抑制することによっても、抗IAV活性を発揮していると考えられる。

## 6. おわりに

近年、ペルオキシソームやミトコンドリアがウイルスに対する免疫応答の起点として機能する例や<sup>13, 14)</sup>、エンテロウイルスが小胞体・ゴルジ体を複製オルガネラへと変容させることで自己複製のための場を形成する例など<sup>15)</sup>、オルガネラを場とした宿主-病原微生物の攻防が明らかにされつつある。本稿で紹介した、抗IAV活性を示すオルガネラとしての誘導性アンフィソームは、その新たな例として位置づけられる。今後はその形成機構の詳細について、分子レベルで解明してゆく必要がある。すでに、PVF-tet処理ならびにABCA3高発現下で形成誘導される誘導性アンフィソームを、それぞれ単離する系を確立しており、その構成脂質ならびにタンパク質について網羅的な解析が進行中であり、新たな創薬標的の同定等へと発展することが期

待できる。

## 文 献

- 1) Glingston, R.S., Deb, R., Kumar, S., & Nagotu, S. (2019) Organellar dynamics and viral infections: At cross roads. *Micro. Infect.*, **21**, 20–32.
- 2) Omi, J., Watanabe-Takahashi, M., Igai, K., Shimizu, E., Tseng, C.Y., Miyasaka, T., Waku, T., Hama, S., Nakanishi, R., Goto, Y., et al. (2020) The inducible amphisome isolates viral hemagglutinin and defends against influenza A virus infection. *Nat. Commun.*, **11**, 162.
- 3) Nishikawa, K. (2011) Recent progress of Shiga toxin neutralizer for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, **59**, 239–247.
- 4) Nishikawa, K., Matsuoka, K., Kita, E., Okabe, N., Mizuguchi, M., Hino, K., Miyazawa, S., Yamasaki, C., Aoki, J., Takashima, S., et al. (2002) A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 7669–7674.
- 5) Nishikawa, K., Watanabe, M., Kita, E., Igai, K., Omata, K., Yaffe, M.B., Natori, Y., Nishikawa, K., Watanabe, M., Kita, E., et al. (2006) A multivalent peptide-library approach identifies a novel Shiga toxin-inhibitor that induces aberrant cellular transport of the toxin. *FASEB J.*, **20**, 2597–2599.
- 6) Perez-Gil, J. & Weaver, T.E. (2010) Pulmonary surfactant pathophysiology: Current models and open questions. *Physiology (Bethesda)*, **25**, 132–141.
- 7) Yi, J. & Tang, X.M. (1999) The convergent point of the endocytic and autophagic pathways in leydig cells. *Cell Res.*, **9**, 243–253.
- 8) Rong, Z., Xiaojuan, C., Song, W., Baomin, Q., Xiaoqiang, Y., &

- Chen, J.-L. (2014) The regulation of autophagy by influenza A virus. *BioMed Res. Int.*, **2014**, 2014.
- 9) Yeganeh, B., Ghavami, S., Rahim, M.N., Klonisch, T., Halayko, A.J., & Coombs, K.M. (2018) Autophagy activation is required for influenza A virus-induced apoptosis and replication. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1865**, 364–378.
- 10) Rupert, B., Helen, W., Amanda, S., Benjamin, J.R., Paul, D., & Felix, R. (2014) A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microb.*, **15**, 239–247.
- 11) Yizhong, R., Chufang, L., Liqiang, F., Weiqi, P., Liang, L., Qian, W., Jiashun, L., Na, L., Ling, H., Xuehua, Z., et al. (2016) Proton channel activity of influenza A virus matrix protein 2 contributes to autophagy arrest. *J. Virol.*, **90**, 591–598.
- 12) Andrea, C.B., Monique, G., Sebastian, G., Zehan, H., Shadi, A.-E., Carole, R., Petra, P., Lea, B., Christine, G., Veronica, I.D., et al. (2018) Influenza A virus induces autophagosomal targeting of ribosomal proteins. *Mol. Cell. Proteomics*, **17**, 1909–1921.
- 13) Evelyn, D., Steeve, B., Yijing, Z., Amy, S.Y.L., Charlotte, O., Bennett, S., Nir, H., Zhijian, J.C., Sean, P.W., Marc, F., et al. (2010) Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell*, **141**, 668–681.
- 14) Sharma, S. & Fitzgerald, K.A. (2010) Viral defense: It takes two MAVS to Tango. *Cell*, **141**, 141.
- 15) Nai-Yun, H., Olha, I., Georgiy, B., Marianita, S., Ying-Han, C., Peter, M.T., & Cyrilla, P. (2010) Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*, **141**, 799–811.

## 著者寸描

### ●近江 純平 (おおみ じゅんぺい)

東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室特任助教。博士（理学）。

■略歴 2019年同志社大学大学院生命医科学研究科博士後期課程修了。19～20年東北大学大学院薬学系研究科分子細胞生化学分野特任助教。20年5月より現職。

■研究テーマと抱負 免疫システムにおけるリン脂質・リゾリン脂質の未知機能を探る。予想外の現象に遭遇した時こそ、ユニークな発見のチャンスと捉えて全力で取り組みたい。

■ウェブサイト <https://sites.google.com/view/eiseikagaku-jp/home>

■趣味 お笑い鑑賞（吉本新喜劇など）。

### ●西川 喜代孝 (にしかわ きよたか)

同志社大学生命医科学部教授。薬学博士。

■略歴 1989年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。89～97年慶應義塾大学医学部薬理学教室助手。95～98年Harvard Medical School, Dr. L. C. Cantley ポスドク。98～2006年国立国際医療センター研究所室長。07年より現職。

■研究テーマと抱負 細菌毒素・ウイルスタンパク、各種疾患関連分子を標的とした創薬研究。オリジナルな制御分子（主にペプチド）を同定し、その分子を使ったからこそ見えてくる生命現象に魅力を感じる。

■ウェブサイト [http://medsystems.doshisha.ac.jp/labo\\_base\\_1/p1/](http://medsystems.doshisha.ac.jp/labo_base_1/p1/)

■趣味 犬の散歩中の瞑想。