

称号及び氏名 博士(獣医学) 河合 高生

学位授与の日付 平成22年2月20日

論文名 STUDIES ON ANTIVIRAL ACTIVITY OF
MANNAN-BINDING LECTINS AGAINST
INFLUENZA A VIRUS

(A型インフルエンザウイルスに対するマンナン結合レクチン
の抗ウイルス活性に関する研究)

論文審査委員 主査 小崎 俊司
副査 三宅 眞実
副査 山崎 伸二
副査 児玉 洋

論文要旨

緒言

ヒトのインフルエンザは、インフルエンザウイルスの感染により発症する急性熱性呼吸器疾患である。本ウイルスは、内部蛋白の抗原性により、A、B、Cの3型に分類される。このうち、A型とB型インフルエンザウイルスは毎年流行を繰り返す。特に、A型インフルエンザウイルス(IAV)は、2009年に発生した新型インフルエンザのような世界的大流行を起こし、社会全体に多大な被害を及ぼすことがある。さらに、IAVはトリ、ブタ、ウマなどにも感染して動物の感染症や人獣共通感染症を起こすため、獣医学の領域でも重要視されている。

IAVの感染防御には抗体が重要な働きをするが、哺乳動物の血清中には、抗体とは別のIAVの感染性を抑制するインヒビターが先天的に存在する。血清インヒビターのうちで β インヒビターと呼ばれる物質は、マウスやヒトではmannan-binding lectin(MBL)であることが明らかにされている。MBLは、内部に特徴的なコラーゲン様領域とカルシウムイオン依存性糖鎖認識領域(CRD)を有する動物レクチンの1つである。ヒトMBLは、CRDを介してウイルスを含め細菌や真菌など種々の病原微生物の表面糖鎖に結合し、オプソニン作用や補体活性化作用を示すことが報告され、抗体非依存性の生体防御に働くことが明らかになってきた。また、抗ウイルス活性として、ヒトMBLが補体を介さずにIAVを直接中和し、さらに感染細胞から隣接細胞へのIAVの拡散を阻害すること(感染拡大阻止活性)が報告された。この直接的な抗IAV活性は、MBLがIAVの感染防御に働く

のみならず、呼吸器系で作用する新たな抗 IAV 薬となる可能性を示している。しかし、ヒト以外の哺乳動物 MBL の抗 IAV 活性はほとんど調べられていない。また、MBL を大量に得るための手段の 1 つとして考えられる組換え MBL の大量発現系も構築されていない。

本研究では、MBL の抗 IAV 活性に着目し、ヒト血清と同等以上の β インヒビター活性を持つウシとウサギの血清から MBL を精製し、これらが IAV に対して赤血球凝集抑制 (HI) 活性、中和活性および感染拡大阻止活性を示すかを明らかにした。さらに、MBL を抗 IAV 創薬として利用するために、天然型 MBL と同様の生物学的活性を有する組換え MBL の大量発現系を構築することを目的とした。

第 1 章 ウシおよびウサギ MBL の cDNA クローニングと精製

PCR 法で作製したヒト MBL の C 末端部分あるいはマウス MBL の全コード領域に対するジゴキシンゲン標識 DNA プローブを用い、ウシおよびウサギの肝臓 cDNA ライブラリーから MBL をコードする cDNA をそれぞれクローニングし、決定した塩基配列より推定されたアミノ酸配列を解析した。ウシおよびウサギ MBL は、ヒト MBL とそれぞれ 65%、68% の相同性を示し、MBL に特徴的なコラーゲン様領域と CRD を持っていたことから、ヒト MBL と同様の機能を発揮することが予測された。

ウシ、ウサギおよびヒト血清からの MBL 精製法として、マンナンアガロースによるアフィニティクロマトグラフィーを 2 回繰り返す方法を用いた。最初は血清中のマンナン結合画分を EDTA で溶出させ、次はその溶出画分からマンナン結合画分をマンノースで溶出させた。得られたウシ、ウサギおよびヒト由来の蛋白は、還元条件下の SDS-PAGE 分析でそれぞれ 33、32、32 kDa の分子量を示した。N 末端アミノ酸配列の解析で、ウシ、ウサギおよびヒト由来蛋白の 25、27 および 24 残基は、システイン残基など解析不能であったアミノ酸残基を除き、推定アミノ酸配列と 100% 一致した。これらの結果より、ウシ、ウサギおよびヒト精製蛋白は MBL であると結論づけた。

精製ウシおよびウサギ MBL の補体活性化能を受動溶血試験で検討した。これはマンナンを吸着させたヒツジ赤血球と MBL の混合液にモルモット補体を添加し、37°C で 1 時間反応させた後の溶血度を測定する試験法である。ウシ MBL はヒト MBL と同程度の補体活性化能を示したが、ウサギ MBL はヒト MBL よりも約 5 倍高い補体活性化能を示した。ウシおよびウサギ MBL の補体活性化能は、ヒト MBL の場合と同様にマンノースの添加により抑制されたことから、これらの MBL は糖鎖と結合して補体系を活性化することが明らかになった。

第 2 章 A 型インフルエンザウイルスに対するウシおよびウサギ MBL とヒト MBL の抗ウイルス活性の比較

精製ウシおよびウサギ MBL とヒト MBL の IAV に対する HI 活性、中和活性および感染拡大阻止活性を比較した。HI 試験は、MBL とインフルエンザウイルス A/Ibaraki/1/90 (H3N2) を 37°C で 30 分反応させた後に 0.5% ニワトリ赤血球を加え、室温で 1 時間反応させた後、凝集を観察することにより行った。ウシ、ウサギおよびヒト MBL の HI 活性を示す最小濃度は 0.08~0.15 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であったことから、3 種類の MBL は A/Ibaraki/1/90 (H3N2) に対してほぼ同等の HI 活性を有することがわかった。中和試験は、A/Ibaraki/1/90 (H3N2) を MBL と 37°C で 1 時間反応させた後に MDCK

細胞に感染させ、24 時間培養後に生じた感染ウイルスフォーカス数を測定することにより行った。50%以上のフォーカス数を減少させる最小濃度を中和価とした。ウシ、ウサギおよびヒト MBL の中和価はそれぞれ 0.08、0.2 および 0.3 $\mu\text{g/ml}$ であり、3 者の中で中和価に大きな差は認められなかった。感染拡大阻止試験は、A/Ibaraki/1/90 (H3N2)を吸着させた MDCK 細胞に MBL を添加したゲル状培地を重層して3日間培養した後、MBLによるウイルス感染領域の減少率を求めることにより行った。ウイルス感染領域は、PAP 法で免疫組織化学染色した後、染色像をスキャンして画像処理ソフトを用いることにより測定した。MBL を含まない培地を重層した時のウイルス感染領域を100%とした。1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、ヒトおよびウシ MBL は5%以下に、ウサギ MBL は16%にウイルス感染領域を減少させた。いずれの MBL を用いた場合でも、感染拡大阻止活性はマンノースの添加により抑制されたことから、3 種類の MBL は、レクチン活性でウイルス表面の糖鎖に結合して感染拡大阻止活性を発揮することが明らかとなった。以上の結果、ウシおよびウサギ MBL はヒト MBL と同様に、IAV の感染阻止または感染拡大阻止に働くと考えられた。

第3章 組換えヒト MBL の CHO 細胞での大量発現

第2章の結果より、ウシおよびウサギ MBL は、ヒト MBL と同程度の抗 IAV 活性を示すことが判明した。本章ではこれら3種類の MBL のうち、将来的な臨床応用がもっとも期待できるヒト MBL を使って、組換え MBL の大量発現系を構築することを目的とした。

MBL は3量体を基本単位としたホモ多量体を形成し、ヒトでは3量体が2~6個会合した分子構造を有する。この構造形成にはプロリンやリシン残基の水酸化といった翻訳後修飾が必要であるため、実験には哺乳動物細胞による発現系を用いた。ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行い、ヒト MBL cDNA を調製した。この cDNA を挿入した発現ベクター pNOW/CMV-A (*dhfr*⁺) で *dhfr* (ジヒドロ葉酸レダクターゼ) 遺伝子欠失の CHO 細胞を形質転換し、得られた細胞株からヒト MBL に対する2種類のポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により、MBL 発現細胞株をスクリーニングした。発現量が 23.3 $\mu\text{g/ml}$ ともっとも高かった細胞株を、DHFR 拮抗阻害剤であるメトトレキサート (MTX) の濃度を段階的に増加した培地で順次培養した。MTX の添加により *dhfr* 遺伝子とともに MBL 遺伝子が増幅される現象を利用し、MBL 量が 129 $\mu\text{g/ml}$ に増幅された高濃度 MBL 発現細胞株を得た。この細胞株をプロリンとリシン残基の水酸化を促進させるビタミン C 存在下で培養し、得られた培養上清からマンナンアガロースによるアフィニティクロマトグラフィーで組換えヒト MBL を精製した。

還元条件下の SDS-PAGE により、組換えヒト MBL と天然型ヒト MBL はともに、分子量 32 kDa のポリペプチドで構成されることがわかった。しかし、組換えヒト MBL は、非還元条件下の SDS-PAGE で天然型に認められないポリペプチドの 1~3 量体に相当するバンドを示した。ゲルろ過分析では、天然型ヒト MBL は約 1,300 kDa の単一ピークを示したのに対し、組換えヒト MBL は約 1,150 kDa と約 300 kDa の2つの主要ピークを示した。アミノ酸分析の結果、組換えヒト MBL はプロリンとリシン残基の水酸化の程度が天然型ヒト MBL よりも低いことが明らかとなり、これが多量体形成度の低い約 300 kDa の組換えヒト MBL が生じた原因と考えられた。

組換えヒト MBL と天然型ヒト MBL の糖結合特異性を、固相化したマンナンに対する結合を50%拮抗阻害する糖濃度により比較解析した。使用した10種類の糖により若干のバラツキが認められたが、いずれの MBL も N-アセチル-D-グルコサミンやグルコースにもっとも親和性が高く、N-アセチル-D-ガラクトサミンやラクトースに親和性が低かった。また、組換えヒト MBL は天然型ヒト

MBL と同様に、補体活性化能を有すること、IAV の膜表面に存在する糖蛋白のヘマグルチニンとノイラミナーゼに結合すること、HI 活性、中和活性、感染拡大阻止活性といった抗 IAV 活性を発揮することが確認された。

ヒトやラット MBL の補体活性化反応には高次の多量体を形成した MBL が必要であると報告されている。ゲルろ過で分画した 1,150 kDa の組換えヒト MBL の補体活性化能と HI 活性はいずれも、300 kDa の組換えヒト MBL に比べて強かったことから、組換えヒト MBL の HI 活性発現には、補体活性化の場合と同様に高次の多量体が必要であると考えられた。

本研究で構築した組換えヒト MBL の発現系は、天然型とほぼ同様の生物学的活性を有する組換え MBL の大量発現を可能にし、種々の動物 MBL の発現に有用であると考えられた。得られた高次多量体型組換え MBL は、抗 IAV 薬として応用できる可能性が考えられた。

総括

1. ウシおよびウサギ MBL が、ヒト MBL とアミノ酸レベルでそれぞれ 65%、68% の相同性を示し、ヒト MBL と同様に糖鎖と結合して補体系を活性化することを明らかにした。
2. ウシおよびウサギ MBL が、インフルエンザウイルス A/Ibaraki/1/90 (H3N2) に対してヒト MBL と同程度の HI 活性、中和活性、感染拡大阻止活性を示すことを明らかにした。これら MBL は、レクチン活性により IAV と結合して、IAV の感染阻止あるいは感染拡大阻止に働くと考えられた。
3. 発現ベクター pNOW/CMV-A と CHO 細胞を用いて、天然型ヒト MBL と同様の糖結合特異性、補体活性化能および抗 IAV 活性を示す組換えヒト MBL の大量発現系の構築に成功した。本発現系は、種々の動物 MBL の大量発現に有用であると考えられた。

審査結果の要旨

ヒトのインフルエンザは、インフルエンザウイルスの感染により発症する急性熱性呼吸器疾患で、内部蛋白の抗原性により、A、B、C の 3 型に分類される。A 型と B 型インフルエンザウイルスは毎年流行を繰り返すが、特に、A 型インフルエンザウイルス (IAV) は、世界的大流行を起こし、トリ、ブタ、ウマなどにも感染する人獣共通感染症でもある。IAV の感染防御には抗体が重要な働きをするが、哺乳動物の血清中には、抗体とは異なる IAV の感染性を抑制するインヒビターが先天的に存在し、血清 β インヒビターと呼ばれる物質は、マウスやヒトでは mannan-binding lectin (MBL) であることが明らかにされている。ヒト MBL は、カルシウムイオン依存性糖鎖認識領域 (CRD) を介して種々の病原微生物の表面糖鎖に結合し、オプソニン作用や補体活性化作用を示すことが報告されている。また、抗ウイルス活性として、補体を介さず IAV を直接中和することから、MBL が IAV の感染防御のみならず、呼吸器系感染症の新規抗 IAV 薬となる可能性を示している。しかし、

ヒト以外の哺乳動物 MBL の抗 IAV 活性はほとんど調べられていない。本研究では、ウシ、ウサギ精製 MBL の IAV に対する赤血球凝集抑制 (HI) 活性、中和活性および感染拡大阻止活性を調べた。さらに、抗 IAV 創薬として利用するための基礎的知見を得るために、天然型 MBL と同様の生物学的活性を有する組換え MBL 発現系の確立を試みた。

第 1 章ではウシおよびウサギ肝臓 cDNA ライブラリーから MBL cDNA をクローニングし、決定した塩基配列より推定アミノ酸配列を推定した。ウシおよびウサギ MBL は、ヒト MBL とそれぞれ 65%、68% の相同性を示し、MBL に特徴的なコラーゲン様領域と CRD を保有していた。次にウシ、ウサギおよびヒト血清から各 MBL をマンナンアガロースによるアフィニティクロマトグラフィーで精製したところ、ウシ、ウサギおよびヒト由来 MBL は、それぞれ 33、32、32 kDa の分子量を示した。ウシ MBL はヒト MBL と同程度の補体活性化能を示したが、ウサギ MBL はヒト MBL よりも約 5 倍高い活性を有していた。これらの補体活性化能は、マンノースの添加により抑制されたことから、得られた MBL は糖鎖と結合して補体系を活性化すると考えられた。

第 2 章では、精製ウシおよびウサギ MBL とヒト MBL の IAV に対する HI 活性、中和活性および感染拡大阻止活性を比較した。HI 試験で 3 種類の MBL の HI 活性を示す最小濃度は 0.08–0.15 $\mu\text{g/ml}$ であった。中和試験で、ウシ、ウサギおよびヒト MBL の中和価に大差は認められなかった。感染拡大阻止試験においても各 MBL 間で活性に違いがなく、いずれの MBL でも感染拡大阻止活性はマンノースの添加により抑制された。これらの結果から、ウシおよびウサギ MBL はヒト MBL と同様に IAV の感染阻止または感染拡大阻止に働くと考えられた。

第 3 章では、臨床応用が最も期待できるヒト MBL を使って、組換え MBL の大量発現系を構築した。MBL はホモ多量体を形成し、ヒトでは 3 量体が 2–6 個会合した分子構造を有する。この構造形成には翻訳後修飾が必要であるため哺乳動物細胞による発現系を用いた。ヒト MBL cDNA を発現ベクター-pNOW/CMV-A (*dhfr*+) で *dhfr* (ジヒドロ葉酸レダクターゼ) 遺伝子欠失の CHO 細胞を形質転換し、得られた細胞を DHFR 拮抗阻害剤であるメトトレキサート (MTX) の濃度を段階的に増加した培地で順次培養した。確立した高濃度 MBL 発現細胞株の培養上清から組換えヒト MBL を精製した。組換えヒト MBL は、非還元条件下の SDS-PAGE で天然型に認められない 1–3 量体に相当するバンドを示した。ゲルろ過では、天然型ヒト MBL は約 1,300 kDa の単一ピークを示したのに対し、組換えヒト MBL は約 1,150 kDa と約 300 kDa の 2 つの主要ピークを示し、多量体形成度が低いことがわかった。しかし、組換えヒト MBL は天然型ヒト MBL と同様に、補体活性化能、HI 活性、中和活性、感染拡大阻止活性有することが確認された。

以上の結果から、ウシおよびウサギ MBL は、ヒト MBL と同程度の活性を持ち IVA の感染阻止に有効であること、さらに組換えヒト MBL が天然型とほぼ同様の生物学的活性を有することから、抗 IAV 薬として応用できる可能性を示している。これらの成果は、応用獣医学、特に感染制御学領域で新たな知見を提供するものであり、学力確認の結果と併せて博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。