

免疫学的手法を用いた、ヒトおよびウサギプラスミノゲンのインフルエンザA型ウイルスに対する結合解析

鈴木秀明、J. L. McKimm-Breschkin¹⁾、Joseph N. Varghese¹⁾、梶原淳一²⁾、松村彰子²⁾、伊東八重²⁾、水柿道直³⁾、菱沼隆則³⁾、富岡佳久³⁾、高橋忠伸⁴⁾、村松 宰⁴⁾、鈴木 隆⁴⁾、鈴木康夫⁴⁾

宮城大学看護学部

キーワード

インフルエンザA型ウイルス、プラスミノゲン、ノイラミニダーゼ、スロット・ブロット解析
influenza A viruses, plasminogen, neuraminidase, slot-blot analysis

要 旨

スロット・ブロット法を用いて、レセプター破壊酵素であるノイラミニダーゼ糖タンパク質スパイクの型が異なるインフルエンザA型ウイルス9株（ヒトN1、N2亜型、トリN9亜型）とヒトおよびウサギプラスミノゲンとの結合性を解析した。ヒト由来 A/WSN/33 (H1N1)、A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) が強い結合性を示したのをはじめ、他のヒト由来N1、N2亜型およびトリ由来N9亜型を持つインフルエンザウイルス7種もプラスミノゲンと結合し、多様なインフルエンザA型ウイルスがプラスミノゲンを介した感染機構を持つことが示唆された。また各ウイルスノイラミニダーゼスパイクの1次構造を比較した結果、A/WSN/33 (H1N1) は基質結合部位近傍の130位が糖鎖付加されていないのに対しA/Puerto Rico/8/34 (H1N1) は付加の可能性が示され、プラスミノゲンの結合にノイラミニダーゼの130位への糖鎖付加は必ずしも重要ではないことが示唆された。今後、ノイラミニダーゼとプラスミノゲンの結合様式を3次元的に検討することにより、インフルエンザウイルスの新しい感染機構を明らかにできると考えられる。

An immunological study of the binding between influenza A viruses and human or rabbit plasminogens by slot blot analyses

Hideaki Suzuki, J. L. McKimm-Breschkin¹⁾, Joseph N. Varghese¹⁾, Jun-ichi Kajihara²⁾, Akiko Matsumura²⁾, Yae Ito²⁾, Michinao Mizugaki³⁾, Takanori Hishinuma³⁾, Yoshihisa Tomioka³⁾, Tadanobu Takahashi⁴⁾, Tsukasa Muramatsu⁴⁾, Takashi Suzuki⁴⁾, Yasuo Suzuki⁴⁾

Division of Biochemistry, Miyagi University School of Nursing

Abstract

The binding of 9 strains of influenza A viruses with human or rabbit plasminogens are examined by slot blottings. A/WSN/33(H1N1) and A/Puerto Rico/8/34(H1N1) indicated strong bindings with plasminogens, and other 7 strains which have human N1, N2 or tern N9 subtypes indicated weak bindings. These data suggest that not only N1 subtype influenza A viruses but also viruses of other neuraminidase subtypes can sequester plasminogens, providing plasminogen-mediated pathogenicity in humans. We compared the amino acid sequences of N1 neuraminidase of each A viruses, and showed that A/Puerto Rico/8/34 has a glycosylation site at the position of 130 amino acid but A/WSN/33 has not. According to these evidences, it is suggested that the presence of glycosylation site at the position of 130 amino acid is not essential for binding with plasminogens. The new pathogenic mechanism of influenza A viruses to humans could be elucidated by further examining of the binding of virus neuraminidase with plasminogen by X ray cristal analyses.

1) Biomolecular Research Institute, Parkville 3052, Australia

2) 日本ケミカルリサーチ株式会社・開発研究所 (〒651-2241 神戸市西区室谷2-2-10)

3) 東北大学医学部附属病院・薬剤部 (〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1)

4) 静岡県立大学薬学部・生化学教室 (〒422-8526 静岡市谷田52-1)

1) Biomolecular Research Institute, Parkville 3052, Australia

2) Development and Research Laboratories, JCR Pharmaceuticals Co., Ltd., Kobe 651-2241, Japan

3) Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital, Miyagi 980-8574, Japan

4) Department of Biochemistry, University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Science, Shizuoka 422-8526, Japan

緒 言

インフルエンザA型ウイルス膜には、宿主細胞レセプターへの結合に関わるヘマグルチニンのほかに、レセプターシアロ糖鎖に含まれるシアル酸を切断するノイラミニダーゼ (EC3.2.1.18; IUPAC名シアリダーゼ) 糖タンパク質スパイクが存在する (Fig. 1)。ノイラミニダーゼは糖タンパク質、糖脂質、オリゴ糖などの末端に結合しているシアル酸を遊離する加水分解酵素であり、宿主細胞レセプターのシアロ糖鎖を破壊するためレセプター破壊酵素 (Receptor Destroying Enzyme) とも呼ばれているが、なぜ感染に不利とも考えられる酵素がウイルス膜に存在するのか、これまで不明とされてきた。ノイラミニダーゼの機能における古くからの仮説として、インフルエンザウイルスが気道粘膜上皮細胞へ感染する際、粘膜上皮を覆っているムチン (シアル酸を含み、ウイルスはまずこのムチンへ吸着する可能性がある) のシアル酸を除去し、粘度を下げ、粘膜上皮細胞レセプターへ到達しやすくする可能性が提唱されているが、証明はなされていない¹⁾。ただしAirらのグループ²⁾によって、ノイラミニダーゼを欠くインフルエンザウイルス粒子は宿主細胞へ感染できるが、宿主細胞表面から遊離できず凝集してしまうことが明らかにされた。この結果からインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼはウイルスの感染宿主細胞からの遊離に重要な役割を果たしていることが示されている。

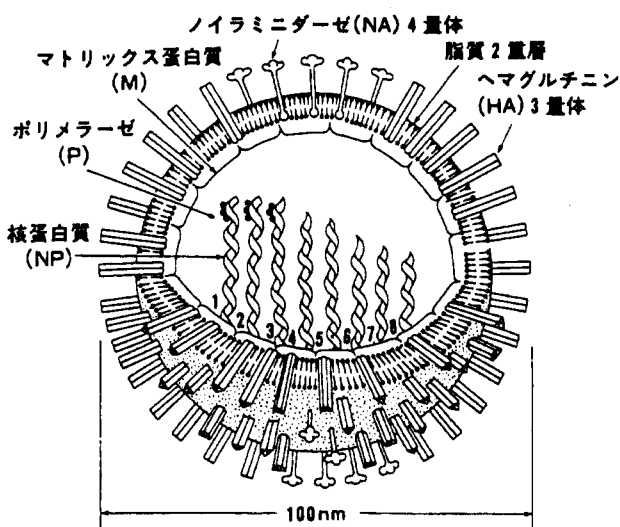


Fig. 1 インフルエンザウイルス粒子の構造模式図¹⁵⁾

近年、A、B型ウイルスノイラミニダーゼの3次構造が明らかになり^{3,4)}、その機能が詳細に検討されつつある。A型インフルエンザウイルスA/WSN/33 (H1N1) 株 (WSN) は、この親株であるWS株をマウス脳内で継代し脳における病原性 (Neurovirulence) を獲得したウイルスである。Kawaokaらのグループ⁵⁾は、WSNのノイラミニダーゼがヒトプラスミノージェンと結合することを示し、新しいウイルス感染機構を提唱した。プラスミノージェンは血中に存在するプラスミン (EC.3.4.21.7) の前駆体である。プラスミンはエンドプロテアーゼ活性を有しているため、ウイルスヘマグルチニンをHA1およびHA2サブユニットへと切断することが可能である。

ヘマグルチニン (Fig. 2) はC末端側をアンカードメインとする糖タンパク質で、宿主側のプロテアーゼによってHA1およびHA2に切断されることがウイルス感染に必須である⁶⁻⁸⁾。そのため培養細胞にインフルエンザウイルスを感染させる場合、通常は培養系にトリプシンを添加するが、例外的にWSNはトリプシン非存在下でも培養細胞に感染することが知られている⁹⁾。従ってWSNの感染にはユニークなヘマグルチニン切断機構の存在が示唆されるものの、その機構は明らかにされていない。Kawaokaらのグループ⁵⁾は、WSNのノイラミニダーゼが他のインフルエンザA型ウイルスと比較して特異的にC末端にリシンを有していること、またそのC末端の立体的近傍に位置すると考えられる130位アミノ酸に糖鎖付加部位が存在しないことに注目し、この2つの特徴がプラスミノージェンとノイラミニダーゼとの結合に深く関与している可能性を示した。すなわち、この2つの特徴を有するノイラミニダーゼがウイルス膜表面上に存在する場合、宿主側の血中プラスミノージェンがノイラミニダーゼによってプラスミンへと変換される。そしてこのプラスミンがウイルス膜表面上のヘマグルチニンをHA1とHA2に切断し、これによってウイルスの宿主細胞に対する感染力が増強される、という新しい感染機構の存在を示唆した。

筆者ら¹⁰⁾はすでに、インフルエンザA型ウイルスがヒトおよびウサギを含む種々の動物血清プラスミノージェンと結合することを報告している。そこで筆者らは、複数株のインフルエンザA型ウイルスとヒ

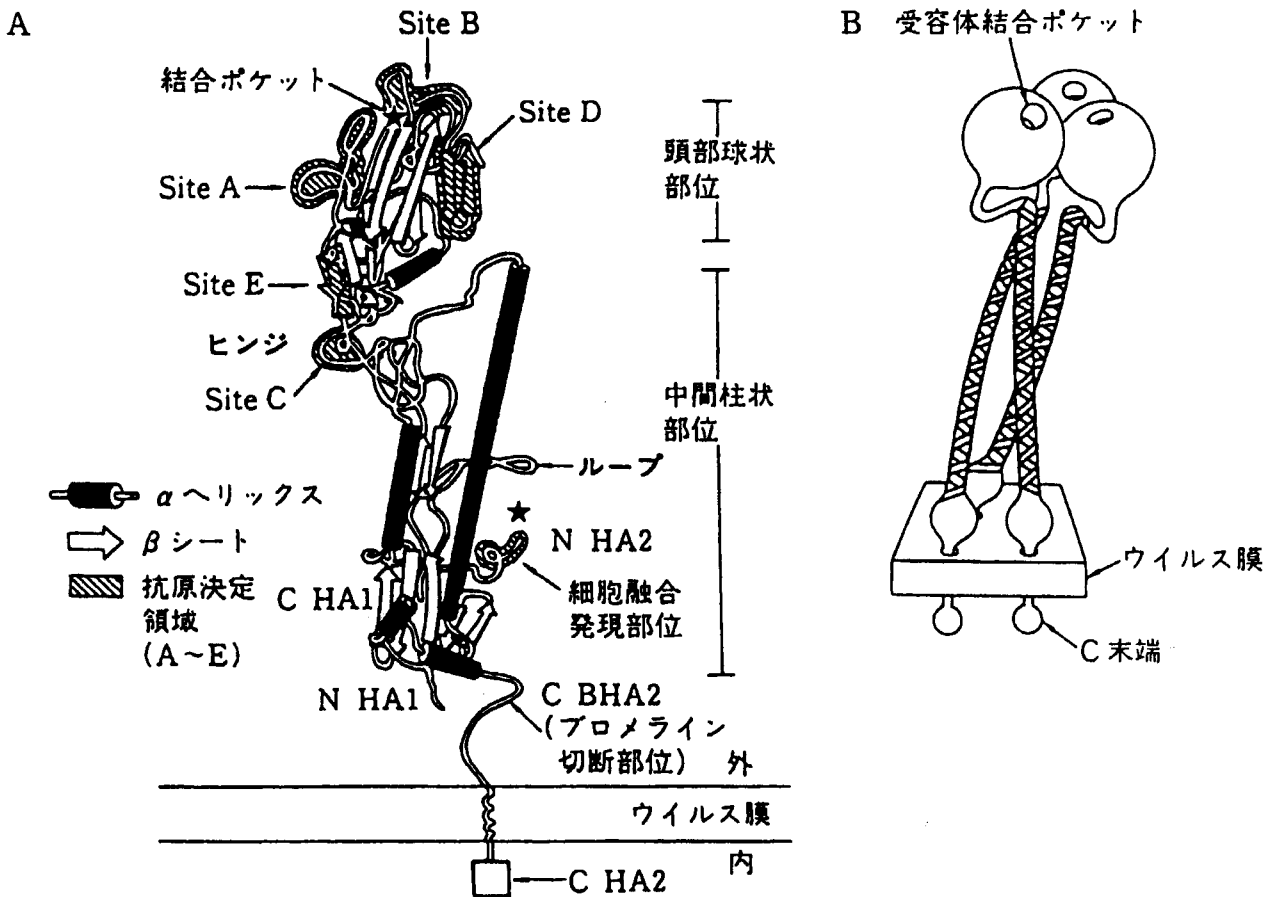


Fig. 2 インフルエンザウイルスヘマグルチニンの3次構造¹⁵⁾
 A: 単量体、B: 三量体

トおよびウサギプラスミノーゲンとの結合性をスロット・プロット法により解析した。また各A型ウイルスのノイラミニダーゼのアミノ酸配列を比較し、ノイラミニダーゼ処理を施したプラスミノーゲンとの結合性とKawaokaらのグループ³⁾の提唱するノイラミニダーゼの2つの特徴が相関するか否かを検討した。

方 法

1. インフルエンザA型ウイルス

インフルエンザA型ウイルスはすべてBiomolecular Research Institute (Parkville, Australia) に貯蔵されている株を使用した。用いたウイルスの本文中における略称と由来、ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼの亜型をそれぞれ以下に示した。

ヒト由来: A/WSN/33 (WSN;H1N1)、A/Puerto Rico/8/34 (PR/8;H1N1)、A/Chile/1/83 (Chile;H1N1)、A/USSR/90/77 (USSR;H1N1)、A/Memphis/71

(Memphis; H3N2)

ヒトウイルス間の reassortant: WSN/HK (A/WSN/33 と A/Hong Kong/1/68 との reassortant; H1N2)、Tokyo (A/NWS/33 と A/Tokyo/67 との reassortant; H1N2)、Mem-Bel (A/Memphis/71 と Bellamy 42 との reassortant; H3N1)

ヒトおよびトリウイルスとの reassortant: G70C (A/NWS/33 と A/tern/Australia/G70C/75 との reassortant; H1N9)

2. ノイラミニダーゼ処理-ビオチン標識プラスミノーゲンの作成

ヒトまたはウサギプラスミノーゲンを常法に従ってビオチン標識した。さらにこのビオチン標識プラスミノーゲンを *Clostridium perfringens* 由来ノイラミニダーゼ (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) 250mU/ml と 37℃、1 h 反応させ、シアル酸を除去したビオチン標識ヒトまたはウサギプラスミノーゲン (ノイラミニダーゼ処理-ビオチン

標識プラスミノーゲン)を作成した。

3. 基質保存液の作成

TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Boeringer Mannheim, Germany)をdimethyl sulphoxideに5 mg/mlとなるよう溶解させ、50倍濃度基質保存液として、-20°Cに保存した。

4. 発色液の作成

1% dextran sulphate, 10mM sodium citrate, 10mM EDTA, pH5.0の溶液に基質保存液を50倍希釈し、これを発色液とした。

5. スロット・プロット解析

PBS (phosphate buffered saline)を用い、各インフルエンザウイルス液を2倍希釈法にて希釈し、各溶液を50 μ lずつニトロセルロース膜 (BAS 83, Schleicher and Schuell, Germany)にコートした。1%カゼイン-PBSでブロッキングした後、一次抗体(ヒトまたはウサギビオチン標識プラスミノーゲン、ヒトまたはウサギノイラミニダーゼ処理-ビオチン標識プラスミノーゲン、マウス抗核タンパク質モノクローナル抗体)と室温下1h反応させた。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン(Boehringer Mannheim, Germany)またはHRP標識抗マウスIg (Silenus, Melbourne, Australia)と室温下30min反応させ、McKimm-Breschkinの方法¹¹⁾に従い発色液を用いて発色させた。スロット・プロット器具はSchleicher and Schuell (Germany)のものを使用した。

結 果

スロット・プロット解析によるインフルエンザA型ウイルス各株とノイラミニダーゼ処理-ビオチン標識プラスミノーゲンとの結合性

インフルエンザA型ウイルス複数株と、ノイラミニダーゼ処理によりインフルエンザウイルスへの結合に関与するシアル酸を除去したビオチン標識ヒトまたはウサギプラスミノーゲン(ノイラミニダーゼ処理-ビオチン標識プラスミノーゲン)との結合を、スロット・プロット法により解析した(Fig. 3)。ニトロセルロース膜に吸着したウイルス量については、マウス抗核タンパク質モノクローナル抗体との反応

性により確認した。

その結果、WSN (H1N1) およびPR/8 (H1N1)がノイラミニダーゼ処理-ビオチン標識プラスミノーゲンと強く結合することが判明した。Chile (H1N1)、USSR (H1N1)、WSN/HK (H1N2)、Tokyo (H1N2)、G70C (H1N9)、Mem-Bel (H3N1) およびMemphis (H3N2)の各株はノイラミニダーゼ処理-ビオチン標識プラスミノーゲンと弱い結合性を示した。いずれの株に於いても、ヒトプラスミノーゲンとウサギプラスミノーゲンの間で結合性に大きな差は認められなかった。また各株とも、ノイラミニダーゼ処理を施したビオチン標識プラスミノーゲンよりノイラミニダーゼ処理を施さないビオチン標識プラスミノーゲンのほうと強い結合性を示した(data not shown)。

考 察

インフルエンザA型ウイルスのうち、現在流行しているハマグチニ型(H1, H3)を持つヒトのウイルス株9種(うち1種はヒトとトリウイルスとのreassortant)につき、ヒトおよびウサギプラスミノーゲンとの結合性を解析した。プラスミノーゲンは糖タンパク質であり、それに含まれるシアリル糖鎖はインフルエンザウイルスハマグチニ型と結合する可能性があるため、スロット・プロット解析ではあらかじめ*Clostridium perfringens*由来ノイラミニダーゼで処理したビオチン標識プラスミノーゲンを用いた。

Kawaokaらのグループ¹¹⁾は、実験的脳炎を起こすインフルエンザウイルス(A/WSN/33, N1型)のノイラミニダーゼがプラスミノーゲンと結合し、ウイルス表面のハマグチニ型をHA1およびHA2に切断することを見出した。そこで著者らはN1型スパイク以外のノイラミニダーゼを持つインフルエンザウイルス株についてもプラスミノーゲンとの結合性を解析した。

スロット・プロット解析の結果、WSN (H1N1) およびPR/8 (H1N1)がノイラミニダーゼ処理-ビオチン標識プラスミノーゲンと強い結合性を示し、またChile (H1N1)、USSR (H1N1)、WSN/HK (H1N2)、Tokyo (H1N2)、G70C (H1N9)、Mem-Bel (H3N1) およびMemphis (H3N2)の各株がノイラミニダー

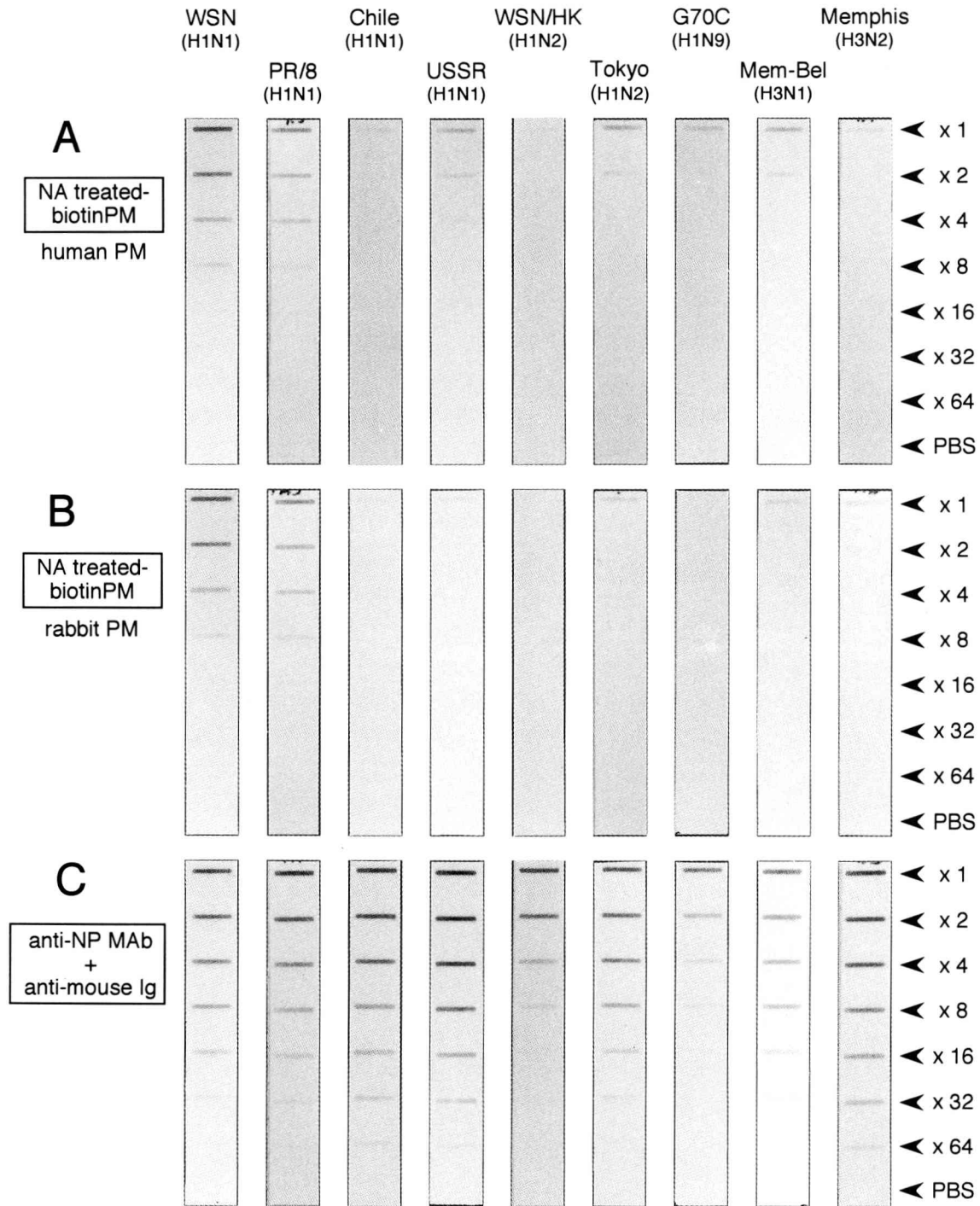


Fig. 3 スロット・ブロット解析によるインフルエンザA型ウイルス各株とノイラミナーゼ処理-ヒトまたはウサギビオチン標識プラスミノージェンとの結合性

各ウイルスをPBSを用いて64倍まで2倍希釈法にて7段階に希釈し、スロットに添加し、それぞれニトロセルロース膜に吸着させた（8番目のスロットにはPBSのみを添加した）。その後、A：ノイラミナーゼ処理-ヒトビオチン標識プラスミノージェンおよびHRP標識ストレプトアビジン、B：ノイラミナーゼ処理-ウサギビオチン標識プラスミノージェンおよびHRP標識ストレプトアビジン、C：マウス抗核タンパク質モノクローナル抗体およびHRP標識抗マウスIg、とそれぞれ反応させ、発色液（TMB）を用いて発色させた。NA：ノイラミナーゼ、PM：プラスミノージェン、NP：核タンパク質、MAb：モノクローナル抗体

ゼ処理-ビオチン標識プラスミノージェンと弱い結合性を示した。

プラスミンはインフルエンザウイルスのヘマグルチニンを解裂し、ウイルスの膜融合活性を付与し、これによりウイルスを活性化させ病原性を高める作用と持つと考えられている。今回我々は、N1亜型スパイク以外のノイラミニダーゼ亜型を持つインフルエンザウイルス株もプラスミノージェンと結合することを見出した。これにより、多様なインフルエンザウイルスがプラスミノージェンを介する新しい感染様式によって感染可能であることが示唆された。

また我々は、インフルエンザA型ウイルスのうちWSNのノイラミニダーゼが特異的にプラスミノージェンと結合しヘマグルチニンを切断するというKawaokaらのグループの報告³⁾に注目し、N1亜型ノイラミニダーゼの1次構造を検討した。WSNは130位アミノ酸に糖鎖付加部位を持つが、この部位を点突然変異させるとヒトまたはウシプラスミノージェン存在下でpolykarion formation形成能力を失うこと、またノイラミニダーゼとプラスミノージェンの結合にはノイラミニダーゼのC末端リシンの存在が必須であると考えられている¹²⁻¹⁴⁾が、N1亜型ノイラミニダーゼはC末端リシンを有していることから、Kawaokaらのグループ³⁾はノイラミニダーゼのこれら2つの1次構造的特徴がプラスミノージェンによるウイルス表面のヘマグルチニン切断に関与している可能性を示した。すなわち、(1)宿主のプラスミノージェンがインフルエンザウイルスノイラミニダーゼのC末端リシンと結合する、(2)結合したプラスミノージェンはプラスミノージェン活性化因子(多くは宿主細胞由来)によりプラスミンへと活性化される、(3)プラスミンはウイルスヘマグルチニンをHA1およびHA2へと切断し、これによりウイルスが宿主細胞に感染する、(4)ウイルスノイラミニダーゼがC末端にリシンを持たない場合、またはノイラミニダーゼ分子内の130位に糖鎖が付加していない場合、プラスミノージェンはノイラミニダーゼに結合せずヘマグルチニンは切断されない、というインフルエンザウイルスの新しい感染機構を提唱した。

今回用いた各ウイルスノイラミニダーゼについて、そのアミノ酸1次構造を比較した(Fig. 4)。PR/8、

ChileおよびUSSRはN1亜型ノイラミニダーゼを持ち、130位(または146位)アミノ酸配列はアスパラギン(N)-グリシン(G)-スレオニン(T)であり、いずれもアスパラギン結合型糖鎖が付加されている可能性が示された。WSNは同じくN1亜型ノイラミニダーゼスパイクを持つが、130位のアミノ酸配列はアルギニン(R)-グリシン(G)-スレオニン(T)であり、アスパラギン結合型糖鎖を持たないと考えられる。スロット・ブロット解析の結果では、WSNおよびPR/8が共にプラスミノージェンとの強い結合を示していた。このことから、N1亜型インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ内130位(または146位)アミノ酸における糖鎖付加の有無と、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼとプラスミノージェンとの結合性との間に相関性が認められない場合もあることが明らかになった。インフルエンザウイルスノイラミニダーゼとプラスミノージェンとの結合様式については、今後X線結晶解析などによる3次元構造的解析が必要であると考えられる。

また、WSNウイルスの宿主への感染はプラスミンがウイルス表面のヘマグルチニンをHA1およびHA2に分解することによって生じることから、今回用いたウイルスがプラスミノージェンをプラスミンに変換するか否かについてさらに解析する必要がある。WSNは脳に対して毒性を示すがPR/8は示さないことが知られている。これはWSNのトリプシン非要求性およびプラスミノージェンのプラスミンへの変換によるウイルス膜ヘマグルチニンスパイクの解裂と深い関係がある。本研究ではWSNおよび弱毒株ともにプラスミノージェンに対する強い結合性を示したが、プラスミンへの変換能力に差がある可能性もある。

従って、今後は各ウイルス株のプラスミン生成能力を検討するとともに、各ウイルスノイラミニダーゼのプラスミノージェンに対する結合様式を3次元構造的に解析してゆくことにより、インフルエンザウイルスの新しい感染機構を明らかにできるものと考えられる。

本研究の一部は、研究課題名「現代生命科学研究の現状視察」として平成10年度宮城大学研究補助金による助成を受けておこなわれた。

文 献

- 1) Burnet F M, Stone J D: The receptor-destroying enzyme of *V. cholerae*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 25 : 227-233, 1947.
- 2) Liu C, Air G M: Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* 69 : 1099-1106, 1995.
- 3) Varghese J N, Laver W G, Colman P M: Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 303 : 35-40, 1983.
- 4) Burmeister W P, Ruigrok R W H, Cusack S: The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *EMBO J* 11 : 49-56, 1992.
- 5) Goto H, Kawaoka Y: A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 10224-10228, 1998.
- 6) Klenk H-D, Garten W: Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 2 : 39-43, 1994.
- 7) Lazarowitz S G, Choppin P W: Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 68 : 440-454, 1975.
- 8) Klenk H-D, Rott R, Orlich M, Blödorn J : Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68 : 426-439, 1975.
- 9) Choppin P W: Replication of influenza virus in a continuous cell line: high yield of infective virus from cells inoculated at high multiplicity. *Virology* 39 : 130-134, 1969.
- 10) Suzuki T, Tsukimoto M, Kobayashi M, Yamada A, Kawaoka Y, Webster R, Suzuki Y: Sialoglycoproteins that bind influenza A virus and resist viral neuraminidase in different animal sera. *Biochem J* 75 : 1769-1774, 1994.
- 1) McKimm-Breschkin J L : The use of tetramethylbenzidine for solid phase immunoassays. *J Immunol Methods* 135 : 277-280, 1990.
- 12) Lottenberg R, Broder C C, Boyle M D, Kain S J, Schroeder B L, Curtiss R 3d: Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *J Bacteriol* 174 : 5204-5210, 1992.
- 13) Fuchs H, Wallich R, Simon M M, Kramer M D: The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin (ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 12594-12598, 1994.
- 14) Miles L A, Dahlberg C M, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow E F: Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30 : 1682-1691, 1991.
- 15) 鈴木康夫: インフルエンザウイルスの宿主域変異の分子機構. *ファルマシア* 34 : 678-683, 1998.

