

インフルエンザウイルスの感染を制御する気道内酵素とインヒビター

村上明子, 唐渡孝枝, 大場久望子, 木戸博

徳島大学分子酵素学研究センター酵素分子化学部門

(平成11年9月17日受付)

インフルエンザウイルスやセンダイウイルスの感染細胞特異性は, 感染する細胞側の因子によって極めて厳密に規定されている。その主要な細胞性因子は, われわれが気道の粘膜上皮分泌細胞に見出したトリプターゼクララである。トリプターゼクララによってウイルスは膜融合活性と感染能を獲得する。また, 最近ミニプラスミンにも同様の生理活性があることを見出した。一方この活性を抑制しウイルス感染を防御する物質群が, 気道の分泌液中に存在するが, その因子として肺サーファクタント粘液プロテアーゼインヒビターが見い出された。この両者の量的バランスが個体のウイルスに対する感受性を決める因子と推定される。

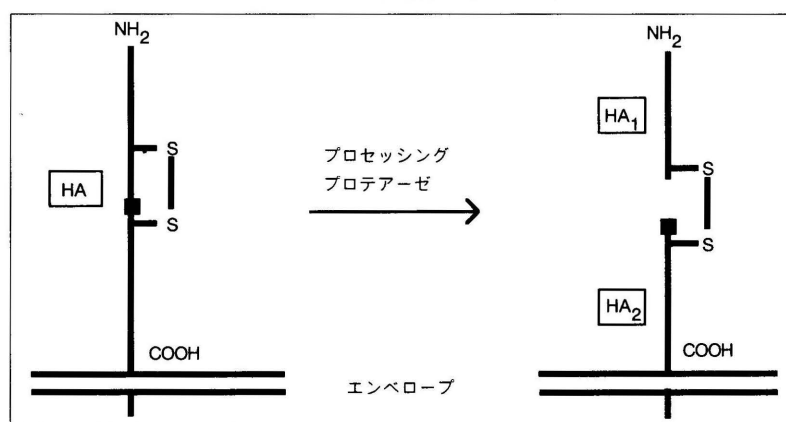
1. はじめに

厚生省結核感染症課のまとめによると, 1997年から1998年の冬はインフルエンザが大流行し, 全国の保育所, 小・中学校で過去10年間で最高の127万人が感染した。1998年から1999年の冬の感染者は88万人にとどまったが, 厚生省の人口動態統計月報によると, 死者は前年度より倍増し, 1999年の1月から3月だけで1287人が死亡しており, そのうち65歳以上の老人が85.9%を占めている。また, 呼吸器や循環器, 代謝系などに基礎疾患を持った患者はインフルエンザに罹患することで重篤な肺炎を併発しやすく, さらに基礎疾患も増悪して死亡例が多数報告されるなど, このような患者への対策が強く望まれている。

一般にウイルスが細胞に感染する初期過程は, ウイルスが細胞膜上のレセプターに結合する過程と, 膜融合を含む細

胞内輸送過程の2段階に分けられる。インフルエンザウイルスやセンダイウイルスの場合, 細胞膜上のレセプターはほとんど全ての細胞膜表面に見い出されるシアル酸で, これによってウイルスは細胞膜に固定される。しかしこれらのウイルスはシアル酸と結合するだけでは細胞内に侵入することができず, 次に起こるウイルス膜と細胞膜との融合, さらにウイルス遺伝子の細胞内への挿入が初期感染の重要なステップとなる。実際にこれらのウイルスが感染性と増殖性を示す細胞は, レセプターであるシアル酸の組織分布と大きく異なり, 気道の粘膜上皮細胞が主要な感染細胞となっている。その理由は図1に示すように, 主に気道の粘膜上皮細胞に局在するプロセッシングプロテアーゼでインフルエンザウイルスの外膜糖タンパク質, ヘムアグルチニン (HA) や, センダイウイルスの外膜糖タンパク質前駆体 (F₀) が特異的に一カ所で切断され, これによって初めてウイルスの外膜糖タンパク質の膜融合活性が発現して細胞内輸送システムが働くからである¹⁻³⁾。すなわち, 気道粘膜上皮細胞

図1 インフルエンザウイルスの細胞性プロテアーゼによるプロセッシング



HA: ヘムアグルチニン (インフルエンザウイルス外膜糖蛋白質前駆体)
 ■: 細胞膜融合領域 (HA₂サブユニットのN末端に位置する)

の分泌するプロテアーゼはこれらのウイルスの感染に不可欠な生体因子で、ウイルスの感染細胞性トロピズムを決定しているといっても過言ではない。当教室では、長い間不明であったインフルエンザウイルスやセンダイウイルスを活性化するトリプシン型セリンプロテアーゼをいくつか見出すことに成功した。本稿では、すでに報告しているトリプターゼクララ⁴⁾と最近明らかとなってきたミニプラスミン、さらにこれらの活性を阻害するインヒビターの肺サーファクタント⁵⁾とMPIについて報告する。

2. トリプターゼクララ

ラットの気管支粘膜上皮分泌細胞（クララ細胞）中に見いだされたトリプターゼクララは、クララ細胞の分泌顆粒に局在し、ほかの組織には認められない⁶⁾。このトリプターゼクララは、ウイルスの感染が刺激となって気道の分泌細胞から大量に分泌される様子が抗体染色により明らかとなった⁴⁾。ラットにセンダイウイルスを経鼻感染させると、軽度感染部位では細胞の分泌顆粒に局在していたトリプターゼクララは細胞外に分泌され、その多くは気道の管腔側の粘膜上皮膜表面に結合するようになる。すなわち、ウイルス感染が刺激となって細胞内のトリプターゼクララのほとんどが細胞外に分泌され、ウイルスの増殖に適した条件がつけられている。さらに感染が進むとトリプターゼクララは気道粘膜細胞表面から気道腔内に移向すると推定される。このようにウイルスの感染に伴って分泌細胞からのトリプターゼクララの分泌が亢進することによって、ウイルス増殖が加速されるしくみが明らかになってきた⁷⁾。

分泌されたトリプターゼクララにより、インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2) 株の HA は R³²⁵ で切断され HA₁ と HA₂ に⁴⁾、またセンダイウイルスの F₀ は F₁ と F₂ の 2 つのサブユニットを形成した⁸⁾。切断によって HA₂ や F₁ の N 末端に新たに出現した疎水性領域（膜融合領域）がウイルスと細胞膜との融合に関与する。その結果、ウイルスは膜融合能を示して細胞に感染性を示すようになる。インフルエンザウイルスの HA タンパク質は極めて変異性に富み、そのため従

来インフルエンザワクチンの有効性に限界があった。しかしこれまでに報告されているほとんど全てのインフルエンザ（トリのインフルエンザを除く）の HA やセンダイウイルスの F₀ タンパク質の切断部位には共通した Q/E-X-R-構造があり、トリプターゼクララはこの切断シグナルを認識して切断していると推定される。

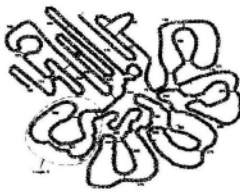
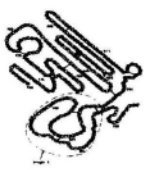
またセンダイウイルスを経鼻感染させたラット肺でのウイルスの増殖が、抗トリプターゼクララ抗体を気道に投与することで良く抑制されたことから、気道の主要なウイルス活性化プロテアーゼは気管支腔に分泌されるトリプターゼクララであると推定されている⁸⁾。さらに最近の研究では、この酵素に類似する一連の酵素群の遺伝子構造が明らかになりつつある。

3. ミニプラスミン

ラットの肺中で、細胞膜画分にインフルエンザウイルスやセンダイウイルスを活性化する酵素の存在が示唆され、これを精製したところ、ミニプラスミンであることがわかった。

プラスミンとミニプラスミンの違いを表 1 にまとめた。プラスミンはプラスミノゲンの R⁵⁶⁰-V⁵⁶¹ がプラスミノゲンアクチベーターでプロセシされた分子量 90~94 kDa の蛋白質であるが、その H 鎖に塩基性アミノ酸を豊富に含むクリングル構造を持つ親水性の蛋白質である。最近このクリングル領域に血管新生阻止作用が発見され

表 1 プラスミンとミニプラスミンの比較

	プラスミン ^{*1}	ミニプラスミン ^{*1}
一次構造		
分子量	90~94 kDa (H鎖+L鎖)	38 kDa (クリングル5+L鎖)
クリングル構造	クリングル1~5	クリングル5
疎水性度	-146.09 ^{*2}	-48.66 ^{*2}

*1: ヒト

*2: Eisenberg等の方法で計算した疎水性度

るほか¹⁰⁾, 組織の創傷治癒にプラスミンが重要な働きを示すことが, プラスミノーゲンのノックアウトマウスを用いた研究から明らかにされ¹¹⁾, フィブリン溶解作用の他にプラスミンの新たな生理活性が注目されている。また, プラスミンは特定のインフルエンザウイルス株 (WSN 株) を活性化することがわかっている¹²⁾。一方, ミニプラスミンはプラスミノーゲンのクリングル5とプラスミンのL鎖の部分よりなる38kDaの蛋白で, これまでに生体内での存在が知られていたが, その生理的意義を含めて十分に解析されていない分子である。試験管内においてはミニプラスミンはプラスミンをエラスターゼ処理することにより作られる。このミニプラスミンはプラスミノーゲンのN末端側の4つのクリングル構造を欠いていることから, 分子量が小さくなっただけでなく, プラスミンに比して著明に疎水性が上昇し, Eisenberg 等の方法による疎水性スコアが-146.09から-48.66に変化している。すなわちミニプラスミンはプラスミンに比べて疎水性の蛋白質で, そのため気道の細胞膜に接着し, 出芽してくるウイルスの活性化に関与すると推定された。また, プラスミンに比べて分子量が小さいことから, 高次構造を持ったHAの開裂部位へよ

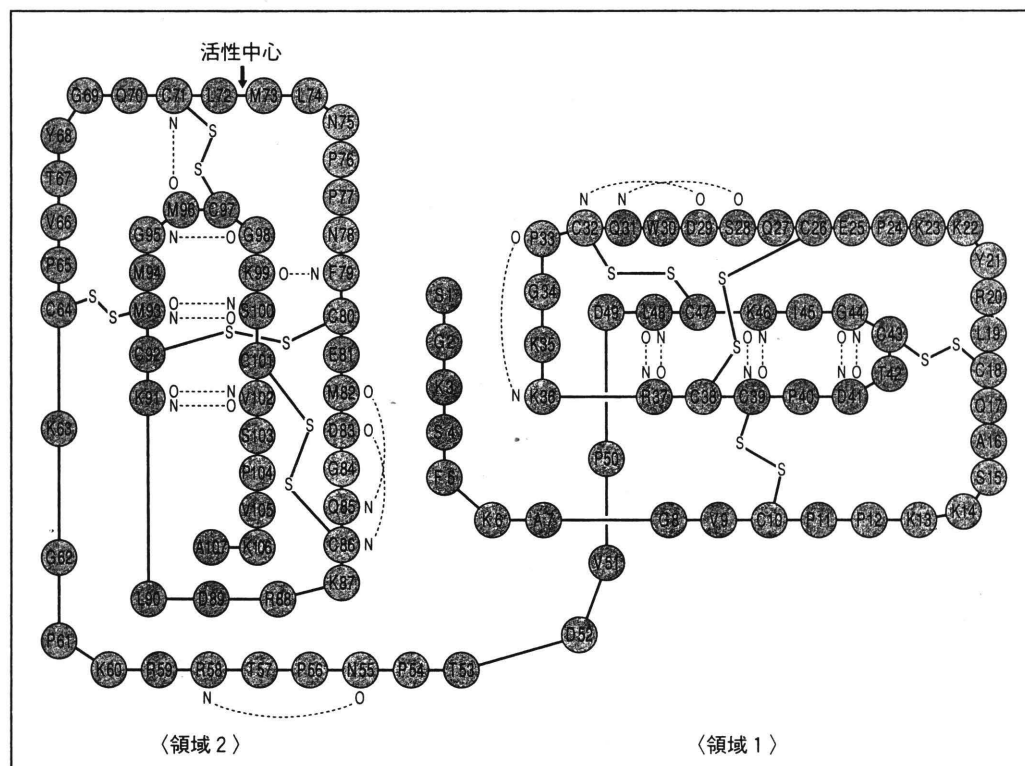
り接近しやすくなっていることもインフルエンザウイルスのHA蛋白質の開裂のしやすさと関係していると考えられる。今後, ミニプラスミンの組織分布を検討すると同時に, 生体内でのウイルス感染の増幅にミニプラスミンがどのように関与しているか検討を行う必要がある。

4. 肺サーファクタントとMPI

ヒトの気管支洗浄液中には, 不活性型インフルエンザウイルスを活性化するトリプシン型プロテアーゼとともに, インフルエンザウイルスの感染を抑制する物質群が我々によって相次いで明らかにされた。一般に, 生体は互いに作用の相反する物質群が近くに存在して生理活性調節を行っている。この場合も気道分泌液中に, プロテアーゼによるインフルエンザウイルスの活性化を抑制する物質が2種類発見された。ヒトの気道分泌液より精製された阻害物質の一次構造解析の結果, その1つは肺サーファクタント⁵⁾で, もう1つは, 粘液プロテアーゼインヒビター (MPI) であると判明した。

肺サーファクタントは, 肺胞のみならず, 気道の分泌細胞からも多量に分泌されており, 気道の表面を覆い気

図2 MPIの構造



道粘膜を保護したり、界面活性作用により空気抵抗を下げて換気効率を高めている。肺サーファクタントは、多量のリン脂質と微量の疎水性蛋白質を主要構成成分としており、ウイルス活性化プロテアーゼを吸着してつつみこみ、抗ウイルス効果を発揮することが明らかとなった。しかし、おのおのの組成単独では、阻害活性をもたず複合体を形成したときのみ阻害活性を示す。肺サーファクタントのウイルス感染の阻止効果は、動物実験でも確かめられた。すなわち肺サーファクタントは単に肺の表面張力を低下させて肺の換気効率を高めるだけでなく、ウイルスの増殖を極めて効率的に抑制して生体防御物質として働いている。

ヒトの気道分泌液から1997年に我々が精製した、強力なトリプターゼクララ活性阻害ペプチドのアミノ酸配列を図2に示す。このインヒビターはMPIとしてすでに報告されていたペプチドと同一物質であることが判明した¹³⁾。MPIはトリプターゼクララ以外にエラスターゼや種々のトリプシン型プロテアーゼ、キモトリプシン型プロテアーゼの阻害物質としても作用する。従来エラスターゼ阻害の活性中心とされていたL⁷²~M⁷³が同じくトリプターゼクララ阻害の活性中心になっていることが種々のアミノ酸変異体を作成することで明らかとなった。しかしMPIはトリプターゼクララに対する効果とは異なり、ミニプラスミンの活性を直接抑制することはなかった。しかし、前項で述べたように、ミニプラスミンはプラスミンをエラスターゼ処理することによってつくられる。従って、MPIはこのエラスターゼ活性を阻害することによりミニプラスミンの形成を阻害し、インフルエンザウイルスやセンダイウイルスが活性化されるのを抑制していると推定される。

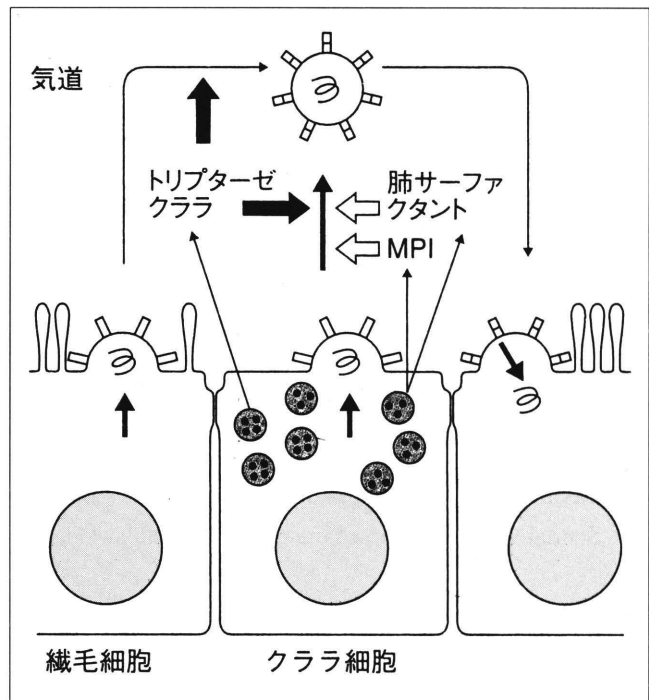
マウスに馴化したインフルエンザ A/Aichi/1/57 (H2N2) 株を経鼻感染させたラット肺におけるウイルスの増殖が、MPIを気道内に投与することでほぼ完全に抑制されたことから、MPIのインフルエンザウイルス増殖抑制効果と活性化抑制効果が確認された¹³⁾。ヒトの産生するMPIは気管支分泌液中で11.0 ± 11.2nM、鼻汁で208.9 ± 44.5nMと推定されている。試験管内の実験では、MPIは500~1000nMの濃度でほぼ完全にインフルエンザウイルスの増殖を抑制することから、生理濃度のMPIでは多量のインフルエンザウイルスにさらされた場合、そのウイルス増殖抑制効果は不十分である。インフルエンザウイルスに対する予防および治療効果を発揮するためには一時的な

MPIの追加投与が有効と推定された¹³⁾。

5. おわりに

インフルエンザウイルスやセンダイウイルスの感染を左右する生体物質群の作用を図3にまとめる。細胞内で複製されたインフルエンザウイルスが細胞膜表面から出芽する際、これらのウイルスの外膜糖蛋白質HAは膜融合活性を持たない前駆体としてウイルス膜に存在している。この膜融合蛋白質前駆体を限定分解し、膜融合活性の発現のカギを握る生体内因子が、気管支粘膜上皮分泌細胞の分泌するトリプターゼクララやミニプラスミンを代表する特定のトリプシン型酵素である。これらの酵素によって活性化されたウイルスは、細胞との膜融合が可能となり細胞内に侵入し増殖していく。一方これらのウイルス感染を、プロテアーゼによる限定分解の段階で抑制して感染を防御する因子として、気道の分泌液中に

図3 インフルエンザウイルスやセンダイウイルスの気道での活性化機構とその制御系



インフルエンザウイルスやセンダイウイルスは出芽の際、その外膜糖蛋白質は切込みのない前駆体であるが、気道の粘膜上皮または気道腔内でトリプターゼクララやミニプラスミンにより、1ヶ所限定分解を受け、これらのウイルスは膜融合能と感染性を獲得する。このトリプターゼクララやミニプラスミンによる限定分解を、クララ細胞と肺胞上皮細胞の分泌する肺サーファクタントとMPIは抑制し、ウイルス感染を阻止する。

↑：活性化，∪抑制。

存在する肺サーファクタントやMPIが明らかとなった。感染を左右する両者の量的バランスがこれらのウイルスの感染性を決定していると思われる^{14,15)}。

文 献

- 1) Homma, M., Ohuchi, M.: Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells; Structural difference of Sendai virus grown in eggs and tissue culture cells. *J. Virol.*, 12 : 1457-1465, 1973
- 2) Klenk, H.D., Rott, R.: The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv. Virus Res.*, 34 : 247-281, 1988
- 3) Nagai, Y., Klenk, H.D., Rott, R.: Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology*, 72 : 494-508, 1976
- 4) Kido, H., Yokogoshi, Y., Sakai, K., Tashiro, M., et al.: Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells: A possible activator of viral fusion glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 267 : 13573-13579, 1992
- 5) Kido H., Sakai, K., Kishino, Y., Tashiro, M., et al.: Pulmonary surfactant is potential endogenous inhibitor of proteolytic activation of Sendai virus and influenza A virus. *FEBS Lett.*, 322 : 115-119, 1993
- 6) Sakai K., Kawaguchi, Y., Kisho, Y., Kido, H., et al.: Electron immunohistochemical localization in rat bronchiolar epithelial cells of tryptase Clara, which determines the pneumotropism and pathogenicity of Sendai virus and influenza virus. *J. Histochem. Cytochem.*, 41 : 89-93, 1993
- 7) Sakai K., Kohri, T., Tashiro, M., Kishino, Y., et al.: Sendai virus infection changes the subcellular localization of tryptase Clara in rat bronchiolar epithelial cells. *Euro. Respir. J.*, 7 : 686-682, 1994
- 8) Tashiro M., Yokogoshi, Y., Tobita, K., Seto, J.T., et al.: Tryptase Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J. Virol.*, 66 : 7211-7216, 1992
- 9) Kido H., Murakami, M., Oba, K., Chen, Y., et al.: Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Mol. Cells*, 9 : 235-244, 1999
- 10) Folkman, J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1 : 27-31, 1995
- 11) Romer, J., Bugge, T.H., Pyke, C., Lund, L.R., et al.: Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat. Med.*, 2 : 287-292, 1996
- 12) Choppin, P. W.: Replication of influenza virus in a continuous cell line: high yield of infective virus from cells inoculated at high multiplicity. *Virology*, 38 : 130-134, 1969
- 13) Beppu, Y., Imamura, Y., Tashiro, M., Towatari, T., et al. Human mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai virus. *J. Biochem.*, 121 : 309-316, 1997
- 14) Kido H., Beppu, Y., Sakai, K., Towatari, T., et al.: Molecular basis of proteolytic activation of Sendai virus infection and the defensive compounds for infection. *Biol. Chem.*, 378 : 255-263, 1997
- 15) Kido, H., Beppu, Y., Imamura, Y., Chen, Y., et al.: Human mucus protease inhibitor and its mutants are novel defensive compounds against infection with influenza A and Sendai viruses. *Biopolymers*, 51 : 79-86, 1999

Enzymes and inhibitors in airway that regulate infection of influenza virus

Meiko Murakami, Takae Towatari, Kumiko Ohba, Hiroshi Kido

Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima

SUMMARY

It has been proposed that the pathogenicity of the influenza and Sendai virus is primarily determined by host cellular proteases that activate viral infectivity. We isolated trypsin-type serin proteases from rat lungs, candidates for the processing proteases of viral envelope glycoproteins, such as tryptase Clara localized in the Clara cells of the bronchial epithelium and mini-plasmin. These enzymes specifically cleave the precursor of fusion glycoprotein HA of influenza virus at Arg³²⁵, and the Fo of Sendai virus at Arg¹¹⁶ in the consensus cleavage motif, Gln (Glu) -X-Arg, resulting in the induction of infectivity of these viruses. Proteolytic activation of viruses by these enzymes occurs extracellularly, probably on the surface and/or in the lumen of the respiratory tract. On the other hand, we isolated two compounds from human bronchial lavage, which inhibitor the activity of tryptase Clara. One was a mucus protease inhibitor and the other was a pulmonary surfactant. These compounds inhibited multiple cycles of virus replication *in vitro* and *in vivo*, but did not themselves affect the hemagglutination and the infectivity of the virus. Administration of these compounds in the airway may be useful for preventing and treating infection with influenza virus and Sendai virus.

Key words: influenza virus, tryptase clara, mini-plasmin, pulmonary surfactant, mucus protease inhibitor (MPI)