



セリンプロテアーゼのセンダイウイルス活性化作用 と小分子インヒビターによるその阻害

奥宮, 明子
片岡, 陳正
小西, 英二

(Citation)

神戸大学医学部保健学科紀要, 18:143-148

(Issue Date)

2002-12-20

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00333048>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00333048>



セリンプロテアーゼのセンダイウイルス活性化作用と 小分子インヒビターによるその阻害

奥宮 明子、片岡 陳正、小西 英二

要 約

ウイルス感染防御におけるプロテアーゼ・インヒビターの有用性を明らかにする目的で、セリンプロテアーゼによるセンダイウイルス活性化作用と小分子合成インヒビターの阻害効果を検討した。トリプシンは0.1 μ g/ml まで、プラスミンは200 μ g/ml まで酵素濃度に依存してセンダイウイルスの感染力価を増加させたが、トロンビン(100units/ml) およびトリプターゼ(5 μ g/ml) は活性化作用を示さなかった。トリプシンによる活性化作用は活性部位指向型のインヒビター MNAPPA((2R, 4R)-4-phenyl-[N α -(7-methoxy-2-naphthalenesulfonyl)-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid) により強く阻止された。また、プラスミンによる活性化作用は活性部位指向型のインヒビター PASI535 (N α -(4-aminomethylbenzoyl)-4-(3-picolylloxy)-L-phenylalanine n-hexylamide) により用量依存的に阻止されたが、lysine binding site 指向型のインヒビター t-AMCHA(trans-aminomethylcyclohexylcarboxylic acid) は阻害を示さなかった。以上の結果は、活性部位指向型の小分子合成インヒビターが *in vitro* でウイルス感染を阻害する有用な手段であることを示している。

索引用語：プロテアーゼ、合成インヒビター、センダイウイルス、トリプシン、プラスミン

緒 言

ウイルスはさまざまな細胞の膜表面のレセプター分子に接着するが、それだけでは感染しない。感染が成立するためには、レセプターと接着後、細胞内に取り込まれ(侵入)、外皮を脱いで遺伝子を露出し(脱殻)、細胞内で増殖する(複製)ことが必要であり、ウイルス膜と細胞膜との融合とそれに続くウイルス遺伝子の細胞内への侵入は感染初期の重要なステップである。インフルエンザウイルスやセンダイウイルスでは外膜蛋白質の限定分解(開裂)によってはじめてウイルス外膜の膜融合活性が発現し、細胞内へ侵入することができる。すなわち、開裂はウイルスが感染性を獲得する(活性化され

る)上で必須の過程である。開裂作用を持つプロテアーゼとしてトリプシンをはじめとするセリン酵素が知られており、ウイルスのトロピズムを規定する因子としてのみならず、ウイルス感染の治療薬開発の標的として注目されている^{1,2)}。

筆者らはセリンプロテアーゼ・インヒビターの構造・活性相関研究を通じて、トロンビン、トリプシン、プラスミンなどのトリプシン様酵素に対する選択的な合成インヒビターの構造要件を明らかにした³⁻⁶⁾。その結果、トロンビン、トリプシン、プラスミンにおのおの選択的な一連のインヒビターを得、これらは血栓症をはじめとする種々の病態を臨床的に統御する上で、あるいは実験的病態モデルにおけるこれら酵素

の役割を解析する上で、有用な手段となることを示してきた。セリン酵素による外膜蛋白質開裂作用が感染性獲得に必須の過程であることに着目すれば、われわれの開発した活性部位指向型の小分子合成インヒビターがウイルス感染防御の一方策となりうる可能性があると考えられる。本論文ではいくつかのトリプシン様酵素すなわちトリプシン、プラスミン、トロンビンおよびトリプターゼのセンダイウイルス活性化作用について基礎的な検討を行い、選択的な小分子合成インヒビターを用いてウイルス活性化作用を阻害する手段を提示した。

材料と方法

1) 酵素；トリプシン（ウシ膵臓、Sigma 社）、プラスミン（ヒト血漿、Chromogenix 社）、トロンビン（ウシ血漿、持田製薬）、トリプターゼ（ヒト肥満細胞、Cortex Biochem 社）を用いた。

2) センダイウイルス活性化作用の測定；センダイウイルス株（MVC 株）は神戸大学医学部伊藤正恵博士より分与された。このセンダイウイルス株を LLC-MK₂細胞に感染させ、トリプシンを含まない MEM 培地で24時間培養した上清をウイルス原液として実験に供した。このウイルス原液は酵素処理をしなければ感染性をも

たない（図1）。センダイウイルスと酵素（およびインヒビター）を37℃で10分間反応させた後、MEMで10～1000倍に希釈し、24穴プレートに培養した LLC-MK₂単層細胞に接種した。CO₂インキュベータ内（37℃）で1時間吸着させた後、MEMで洗浄し、37℃で24時間培養後、アセトン・エタノール（1：1）液で固定した。感染細胞を抗センダイウイルス抗体を用いてABC法（Avidin-Biotin-Peroxidase 液および基質VIP；Vector Lab 社）で染色し、顕微鏡下で1.2 mm²区画内の染色細胞数を計測した。

3) インヒビター；trans-aminomethylcyclohexylcarboxylic acid (t-AMCHA、第一製薬) およびダイズトリプシン・インヒビター（SBTI、Sigma 社）を用いた。(2 R, 4 R)-4-phenyl-[N α -(7-methoxy-2-naphthalenesulfonyl)-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid (MNAPPA) は三菱化学株により、N α -(4-aminomethylbenzoyl)-4-(3-picolyl)-L-phenylalanine n-hexylamide (PASI535) は昭和電工株により合成・提供された^{4,5)}。

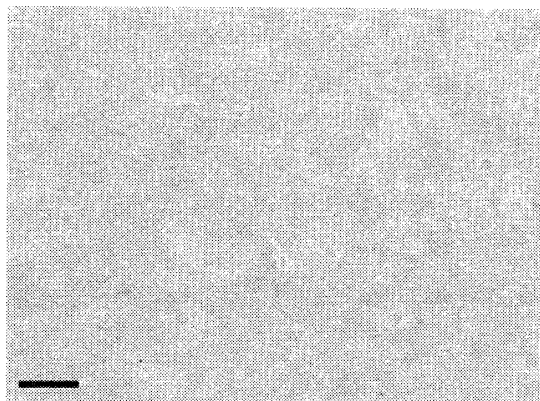
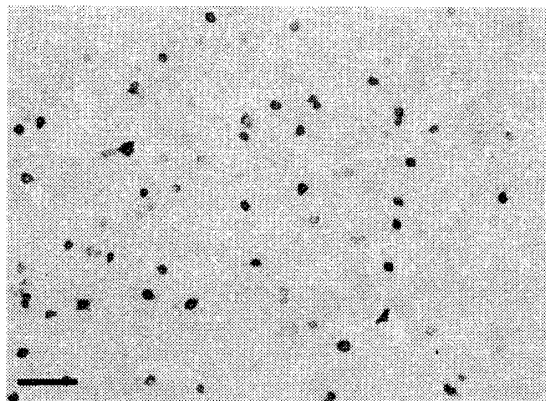
結 果

1) セリン・プロテアーゼのセンダイウイルス活性化作用

図1（左）に示すように、トリプシン処理により活性化されたセンダイウイルスに感染した

図1. トリプシン活性化センダイウイルス接種 LLC-MK₂細胞（左図）とトリプシン未処理センダイウイルス接種 LLC-MK₂細胞（右図）

左図の濃く染まっている細胞がウイルス抗原を産生している細胞である（倍率100倍）。図中の挿入線は100 μ mを示す。



LLC-MK₂細胞は抗センダイウイルス抗体を用いた免疫染色法により鮮明に染色された。酵素処理をしないウイルスを接種された細胞は全く染色されず (図1 (右))、本法はウイルス活性化を測定するのに適切な方法であると考えられた。

トリプシンは0.1 $\mu\text{g/ml}$ まで酵素濃度に依存してセンダイウイルスを活性化した (図2)。トリプシンと同じくアルギニンおよびリジンのC末側を切断するという基質特異性をもつ線溶酵素プラスミン、凝固因子トロンビンおよび肥満細胞トリプターゼのセンダイウイルス活性化作用を検討したところ、プラスミンは200 $\mu\text{g/ml}$ まで酵素濃度に依存してセンダイウイルス活性化作用を示した (図3)。一方、トロンビンは100units/ml まで、トリプターゼは5 $\mu\text{g/ml}$ まで共に作用がみられなかった。

2) センダイウイルス活性化に対する小分子インヒビターの効果

トリプシンによるセンダイウイルスの活性化はトリプシン・インヒビター MNAPPA により強く阻止された (図4)。MNAPPA はトリプシ

図2. トリプシンのセンダイウイルス活性化作用

トリプシンとセンダイウイルスを37℃で10分間反応させた後、LLC-MK₂細胞にCO₂インキュベータ内(37℃)で感染させた。1時間後にウイルス液を洗浄除去した後、37℃で24時間培養し、アセトン・エタノール液で固定した。感染細胞を抗センダイウイルス抗体を用いて免疫染色し、顕微鏡下で染色細胞数を計測した。縦軸に8区画内の染色細胞数を示した。

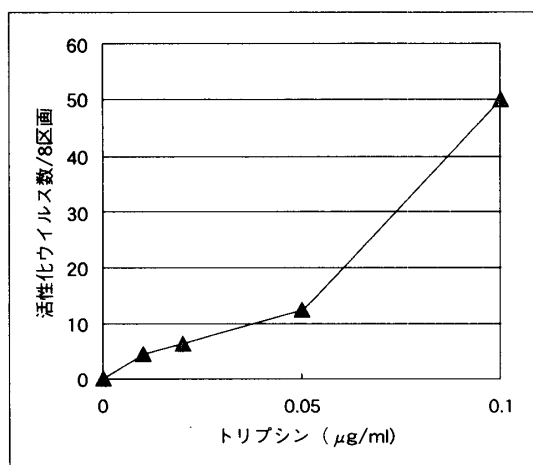


図3. プラスミンのセンダイウイルス活性化作用

センダイウイルスをプラスミンと37℃で10分間反応させた。ウイルスのLLC-MK₂細胞への感染および感染細胞数の測定は図2と同様におこなった。縦軸に8区画内の染色細胞数を示している。

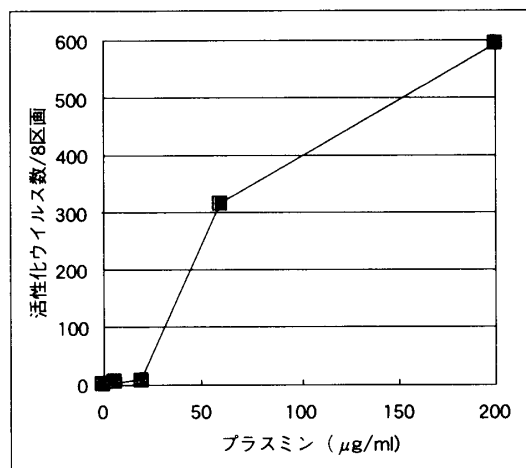
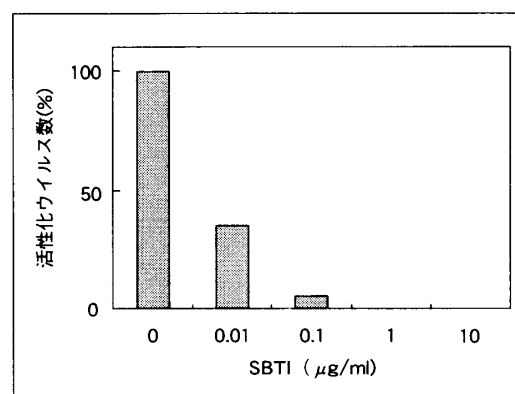
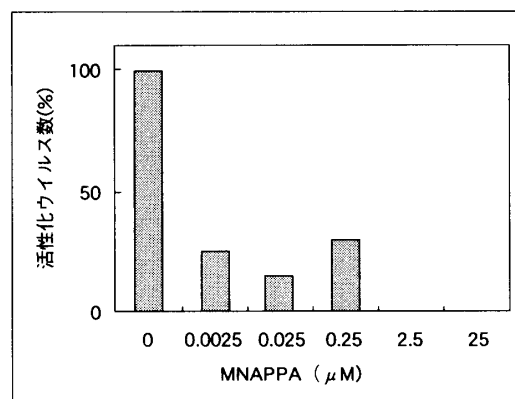


図4. トリプシンによるセンダイウイルス活性化に対する MNAPPA と SBTI の阻害効果

センダイウイルスをトリプシン (0.1 $\mu\text{g/ml}$) および各インヒビターと37℃で10分間反応させた。ウイルスのLLC-MK₂細胞への感染および感染細胞数の測定は図2と同様におこなった。縦軸はインヒビター存在下での感染細胞数をコントロールを100%として表示した。

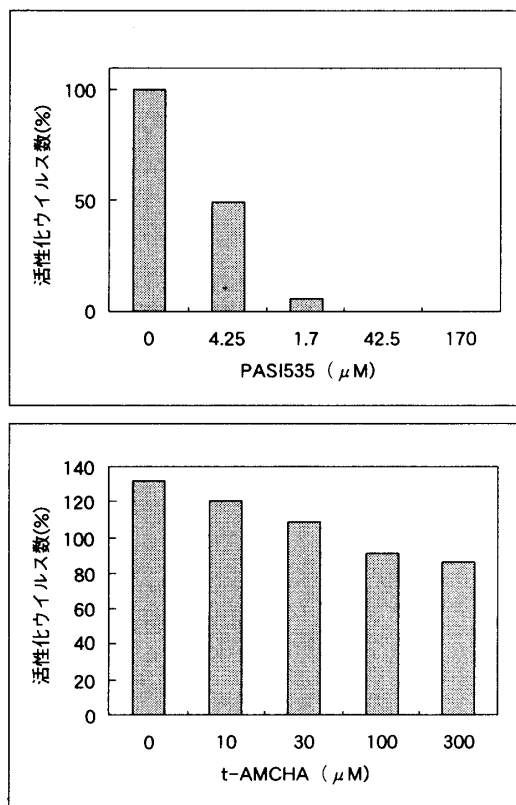


ンに選択的な活性部位指向型の可逆的な小分子合成インヒビターである⁴⁾。また、蛋白性のインヒビターである SBTI は、ウイルス活性化反応を 0.1 $\mu\text{g/ml}$ でほぼ完全に阻害した。この SBTI 濃度は、用いたトリプシン濃度 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) とモル比がほぼ等しく、1:1 の複合体を形成して酵素活性を阻害する濃度であった。

プラスミンによるウイルス活性化はプラスミンの活性部位指向型の選択的な小分子合成インヒビターである PASI535 により用量依存的に阻止されたが、lysine binding site (LBS) 指向型のインヒビターである t-AMCHA はほとんど阻害を示さなかった (図 5)。

図 5. プラスミンによるセンダイウイルス活性化に対する PASI535 と t-AMCHA の阻害効果

センダイウイルスをプラスミン (100 $\mu\text{g/ml}$) および各濃度のインヒビターと 37°C で 10 分間反応させた。ウイルスの LLC-MK 2 細胞への感染および感染細胞数の測定は図 2 と同様におこなった。縦軸はインヒビター存在下での感染細胞数をコントロールを 100% として表示した。



考 察

センダイウイルスの感染性獲得にはセンダイウイルス膜表面の F 糖蛋白の開裂が必須である¹⁾。開裂を引き起こすプロテアーゼとしてはトリプシンが知られており、開裂により F1 (分子量 51,000) と F2 (分子量 15,000) を生じ、F1 糖蛋白質の N 末端に出現した疎水性構造が細胞膜との融合を引き起こすために必要とされている。発育鶏卵漿尿膜腔やマウス肺細気管支上皮細胞内にも開裂を誘導する酵素があり、インヒビターに対する挙動から、これらはトリプシンではないがトリプシンに似た酵素であると報告されている^{1,7)}。

本報告では、精製酵素によるセンダイウイルス活性化作用とインヒビターによる阻害効果を、LLC-MK₂ 細胞感染系を用いた酵素抗体免疫染色法により測定した。この方法は簡便かつ定量性があり、トリプシンとプラスミンによるウイルス活性化作用が用量依存的に示された (図 2、3)。トリプシンの活性化作用は SBTI のみならず、活性部位指向型の可逆的な小分子合成インヒビター MNAPPA で強く阻止された。また、プラスミンのウイルス活性化作用は活性部位指向型の小分子合成インヒビター PASI535 で阻止されたが、LBS 指向型小分子合成インヒビター t-AMCHA では阻害を受けなかった。これらのことは、セリンプロテアーゼによる活性化に酵素の活性部位が必須であることを示すとともに、MNAPPA や PASI535 に代表される新しい活性部位指向型の小分子合成インヒビターがウイルス外膜蛋白質の開裂を制御するのに有効であることを示唆している。

トロンピンは多くのインフルエンザウイルス株について活性化作用はきわめて弱いと報告されているが⁸⁾、センダイウイルスでも活性化作用は見られなかった。炎症の場で遊離される可能性のある肥満細胞トリプターゼには用いた濃度範囲でセンダイウイルス活性化作用は見られなかった。

ウイルスのプロテアーゼによる活性化について

では、インフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌の混合感染時に死亡率が高いことが報告されており、菌の放出するプロテアーゼによるウイルス活性化が注目されている⁸⁾。黄色ブドウ球菌はプラスミノーゲンをプラスミンに活性化するスタフィロキナーゼを放出することが知られており⁹⁾、インフルエンザウイルスと黄色ブドウ球菌の混合感染時に、感染部位でプラスミンが生成される可能性が考えられる。本研究で、プラスミンによるウイルス感染を制御するためには、LBS 指向型の抗プラスミン剤 t-AMCHA ではなく、新しい活性部位指向型のインヒビター PASI535 が有効であることが明らかになり、プロテアーゼ・インヒビターによるウイルス感染防御の方策を *in vitro* の実験系で原理的に示すことができた。

謝 辞

本研究は平成13年度文部科学省科学研究費補助金の援助のもとにおこなわれた。

文 献

1. Tashiro M, Homma M. Evidence of proteolytic activation of Sendai virus in mouse lung. *Arch Virol* 77 : 127-137, 1983.
2. Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M et al. Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology* 157 : 421-430, 1987.
3. Hijikata-Okunomiya A, Okamoto S. A strategy for a rational approach to designing synthetic selective inhibitors. *Semin Thromb Hemost* 18 : 135-149, 1992.
4. Hijikata-Okunomiya A, Tamao Y, Kikumoto R et al. Selective inhibition of trypsin by (2 R, 4 R) - 4 -phenyl-[N α -(7-methoxy-2-naphthalenesulfonyl)-L-arginyl]-2-piperidine carboxylic acid. *J Biol Chem* 275 : 18995-18999, 2000.
5. Okamoto S, Wanaka K, Okamoto U et al. Further studies on a newly synthesized active center-directed plasmin inhibitor. *Thromb. Haemostas.* 65 : 886, 991.
6. Wanaka K, Okamoto S, Horie N et al. Use of an active center-directed plasmin inhibitor elucidates the multiplicity of plasmin actions. *Thrombos Res* 82 : 79-86, 1996.
7. Muramatsu M, Homma M. Trypsin activation on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. V. An activating enzyme for Sendai virus in the chorioallantoic fluid of the embryonated chicken egg. *Microbiol Immunol* 24 : 113-122, 1980.
8. Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M et al. Interactions between bacteria and influenza virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis* 166 : 783-791, 1992.
9. Lijnen HR, Van Hoef B, Matsuo O et al. On the molecular interactions between plasminogen-staphylokinase, α 2-antiplasmin and fibrin. *Biochim Biophys Acta* 1118 : 144-148, 1992.

Proteolytic activation of Sendai virus and its inhibition by active site-directed synthetic inhibitors

Hijikata-Okunomiya A, Kataoka N and Konishi E

Faculty of Health Science, Kobe University School of Medicine

ABSTRACT : To evaluate the efficacy of protease inhibitors in the protection of viral infection, we studied the activation of Sendai virus by serine proteases and its inhibition by synthetic inhibitors using LLC-MK₂ cells. Treatment with trypsin and plasmin increased the infective titers of Sendai virus dose-dependently, whereas thrombin and tryptase had no detectable effect on activation within the dose range used in the present study. MNAPPA ((2R, 4R)-4-phenyl-[N α -(7-methoxy-2-naphthalenesulfonyl)-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid), an active site-directed trypsin inhibitor, inhibited the trypsin-induced activation of Sendai virus. PASI535 (N α -(4-aminomethylbenzoyl)-4-(3-picolyl)-L-phenylalanine n-hexylamide), an active site-directed plasmin inhibitor, inhibited plasmin-induced virus activation, but the lysine binding site-directed plasmin inhibitor t-AMCHA (trans-aminomethylcyclohexylcarboxylic acid) had no detectable effect. The present study provided an experimental basis for potential use of active site-directed synthetic inhibitors as preventive tools for viral infection.

Key Words : Protease, Synthetic inhibitors, Sendai virus, Trypsin, Plasmin