

藍藻 *Oscillatoria agardhii* 由来レクチン (OAA) の 抗インフルエンザウイルス活性

佐藤雄一郎・森本金次郎

Anti-influenza Activity of Cyanobacterial Lectin, OAA from *Oscillatoria Agardhii*

Yuichiro SATO and Kinjiro MORIMOTO

緒 言

2009年から2010年にかけて、新型インフルエンザは、世界的な大流行（パンデミック）となり、従来の季節性インフルエンザを淘汰する勢いとなった。徐々に解明されつつある本ウイルスの正体は、従来から懸念されていた高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のような高い致死性を有した株ではなく、比較的病原性の低いウイルス株（H1N1）であった¹⁾。新型インフルエンザは、若年層に感染者の割合が多いことが特徴的であるが、死亡者数や致死率など季節性インフルエンザと同程度の病原性であると現在は考えられている。しかしながら、同様のパンデミックが高病原性インフルエンザウイルス株により引き起こされた場合、極めて深刻な事態になることは想像に難くない。高病原性ウイルス株（H5N1）がインドネシアにおいて、豚に高頻度に感染しており、最近、一部ウイルスにはヒトに感染しやすくなる変異が起きているとの報告がなされ²⁾、高病原性ウイルスの世界的な大流行が警戒されている。現在の主な予防法としては、手洗い、うがい、マスクの使用などの日常的予防に加え、ワクチンの接種による免疫の賦活が挙げられる。インフルエンザワクチンは、症状の重篤化を抑える効果や、流行の遅延に一定の効果을挙げている。しかしながら、高病原性株が出現した場合、ワクチンの効果は不透明であることに加え、パンデミック発生から新型のウイルスに適合したワクチンの開発・供給までに相当の時間を要すること、またその供給の配分に関しては大きな問題が生じる懸念がある。このような背景の下、ウイルスを不活性化し、感染を抑制する薬剤の必要性は依然高い状況にある。その一方、ウイルス感染した場合には、ウイルスの脱殻阻害剤であるアマンタジンやノイラミニダーゼ阻害剤であるオセルタミビル（タミフル）やザナミビル（リレンザ）が治療薬として用いられるが、有効性や耐性株の出現など問題点も多い。

インフルエンザウイルスは、ウイルス粒子内の核蛋白質複合体の抗原性の違いから、A、B、Cの3型に分けられ、A型ウイルス表面には2種類のスパイク蛋白質、すなわち、赤血球凝集素（HA）およびノイラミニダーゼ（NA）が存在し、HAは16の亜型に、NAは9つの亜型に分類される。インフルエンザウイルスは、感染に際して、このHAを介して宿主細胞のシアル酸含有レセプターに結合し、宿主細胞に吸着することが知られている。また、近年の研究からインフルエンザウイルスのHA表面には、種々のN型糖鎖が存在することが明らかとなっている³⁾。従って、HAに存在するN型糖鎖、中でもレセプター結合部位近傍に存在する高マンノース型糖鎖は、感

染阻害剤の標的分子となり得ると考えられる。

そこで本研究では、高マンノース型糖鎖に特異的に結合するレクチンを用いて、インフルエンザウイルスに対する感染阻害効果を調べた。

実 験 方 法

1. 試 料

藍藻 *Oscillatoria agardhii* 由来レクチンは、大腸菌で発現後、精製し、 -20°C で保存したものをを用いた。インフルエンザウイルス株 A/Udorn/72 (H3N2) は広島大学大学院医歯薬総合研究科ウイルス教室の坂口剛正教授より供与された。また、新型インフルエンザウイルス株 A/Oita/OU1 P3-3/09 (H1N1) は大分大学医学部微生物教室の西園晃教授より供与された。

2. ウイルス株の培養

各ウイルス株は、PBS により 10^2 倍希釈後、 $100\ \mu\text{l}$ を孵化鶏卵の漿尿液中に接種し、 33°C で 2 日間培養を行った。増殖した各ウイルスを含む漿尿液を注射器により $8\ \text{ml}$ 程度採取し、 -80°C に保存してウイルスストック原液とした。

3. ウイルス感染価の測定

ウイルスストック原液を DMEM (Dulbecco's modified eagle's minimum essential medium) 培地で10倍段階希釈列を調製した。96穴プレートにコンフルエントとなった MDCK 単層細胞に、希釈したウイルス液を接種し、 37°C で 1 時間、 $5\% \text{CO}_2$ インキュベーターによりインキュベートした。続いて、ウイルス液を除去し、 $20\ \mu\text{g/ml}$ トリプシンを含む DMEM 培地 $100\ \mu\text{l}$ を加え、 37°C で48時間インキュベートした。細胞をエタノール：酢酸 (5:1) $100\ \mu\text{l}$ により室温下で固定した。固定後、 0.5% アミドブラック 10B 溶液 $50\ \mu\text{l}$ により細胞を染色した。染色後、細胞傷害の程度より、 TCID_{50} (50% tissue culture infectious dose) を算出し、ウイルス感染価を求めた。

4. レクチンによるインフルエンザウイルスの細胞感染阻害活性の測定

レクチンの抗ウイルス活性は、ニュートラルレッド取り込み試験により調べた。MDCK 細胞を培養した96穴プレートにレクチンの各段階希釈列を $20\ \mu\text{g/ml}$ トリプシン含有 DMEM 培地中で調製し、各ウェルに multiplicity of infection が0.001となるようにウイルスを添加した。プレートを 37°C で48時間インキュベート後、 $200\ \mu\text{l}$ のニュートラルレッド溶液 ($150\ \mu\text{g/ml}$ in DMEM) を添加して、2時間さらにインキュベートした。ウイルス液を除去後、 1% 酢酸/ 50% エタノールで色素を溶出した。溶出された色素は、プレートリーダーを用いて定量した。

結 果

藍藻由来レクチン OAA は、供試インフルエンザウイルス株 A/Udorn/72 (H3N2) および A/Oita/OU1 P3-3/09 (H1N1) のいずれに対しても、ウイルスの感染阻害活性があることが示された。OAA は、濃度依存的に両インフルエンザ亜型の MDCK 細胞への感染を阻害し、OAA の存在下では生存する細胞が増加することが示された (Fig. 1)。OAA の A/Udorn/72 株に対する

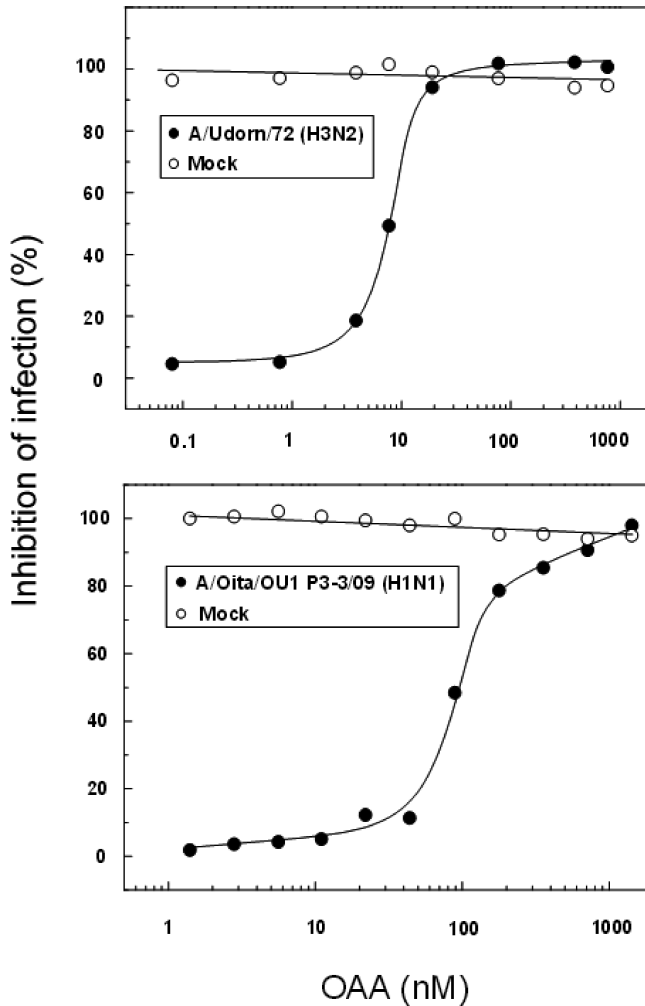


Fig. 1. Anti-influenza activity of OAA. The activity was determined by NR dye uptake assay. Open and closed circles indicate mock-infected (○) or influenza virus infected (●) cells inoculated with OAA. The assay was performed in duplicate and the activity was expressed as the average value.

50%感染阻害濃度 (EC₅₀) 値は7.83 nMであったのに対し、新型インフルエンザウイルス株 A/Oita/OU1 P3-3/09 に対しては 89.12 nMであった (Table-1)。OAA の細胞毒性は試験した 1538 nM まで認められなかったため、抗ウイルス活性の有効係数 (IC₅₀/EC₅₀) は A/Udorn/72 株および A/Oita/OU1 P3-3/09 株に対してそれぞれ >196.4 および >17.3 と求められる。

Table-1. *In vitro* antiviral activity of OAA against two influenza virus strains.

Virus	Strain	EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	Antiviral index*
Influenza A	Udorn/72 (H3N2)	7.83 ± 0.28	>1538	>196.4
	Oita/OU1 P3-3/09 (H1N1)	89.12 ± 6.84		>17.3

*Antiviral index represents the ratio of IC₅₀ to EC₅₀

考 察

藻類由来の糖結合性蛋白質（レクチン）は、新規の抗ウイルス性蛋白質として注目されている。これまでに種々の生物種由来の高マンノース型糖鎖結合性レクチンの *in vitro* における抗ウイルス活性が HIV を中心として調べられている。中でも藍藻を含む藻類由来レクチンは、植物や他の生物種由来レクチンと比較して EC₅₀ で 1～2 オーダー高い感染阻害活性を持つことが示された。これらレクチンには藍藻 *Nostoc ellipsosporum* 由来の CV-N⁴⁾ や海藻 *Griffithsia* sp. 由来の Griffithsin (GRFT)⁵⁾ などが含まれる。著者らは、藍藻 *Oscillatoria agardhii* より強い抗 HIV 活性を示す新規レクチン (OAA) を単離・精製し、その分子構造および糖鎖結合特異性を明らかにしている⁶⁾。興味深いことに、これらの藻類レクチンはいずれもアミノ酸配列において、既知レクチンおよび既知蛋白質との相同性を示さないが、極めて類似した内部アミノ酸配列が 2 ないし 3 回繰り返したタンデムリピート構造を有しているという共通点を持つ。

藍藻レクチン OAA の糖鎖結合特異性は、蛍光標識糖鎖との結合試験より、供試した N-グリコシド型糖鎖中、高マンノース型糖鎖とのみ結合し、複合型、混成型および共通コア構造、および糖脂質由来の糖鎖とは全く結合しないことが判明している⁶⁾。インフルエンザウイルスの HA のレセプター結合部位近傍には高マンノース型糖鎖が付加していることが示されていることから³⁾、本レクチンはインフルエンザウイルスの感染阻害剤として作用する可能性が示唆された。本研究では、H3N2 の亜型として A/Udorn/72 株、H1N1 の亜型として昨年度のパンデミックウイルス株 A/Oita/OU1 P3-3/09 を用いて、OAA の抗ウイルス活性を調べた。その結果、活性の強さは異なるものの、いずれの亜型に対しても顕著な抗インフルエンザウイルス活性が検出された。OAA の抗ウイルス活性のメカニズムについては、HIV については既に明らかにしており、宿主 CD4 抗原ならびに CCR5 などのケモカインレセプターと相互作用するエンベロープ gp120 に存在する高マンノース型糖鎖に選択的に結合することにより、細胞への吸着を阻害することが判明している⁶⁾。OAA のインフルエンザウイルスに対する感染阻害機構についても、HIV の場合と類似して、レクチン分子がウイルス表面のスパイク蛋白質 HA のレセプター結合部位近傍に存在する糖鎖に結合することによって entry inhibitor として作用すると考えられるが (Fig. 2)、HA とレクチン分子の相互作用について、今後の更なる解析が必要である。

以上、著者らの研究より、高マンノース結合性の藍藻由来レクチン OAA は、エイズやインフルエンザといった人類社会において重大な懸案となっている感染症の原因ウイルスに対する新規の感染阻害剤として有用であることが示された。

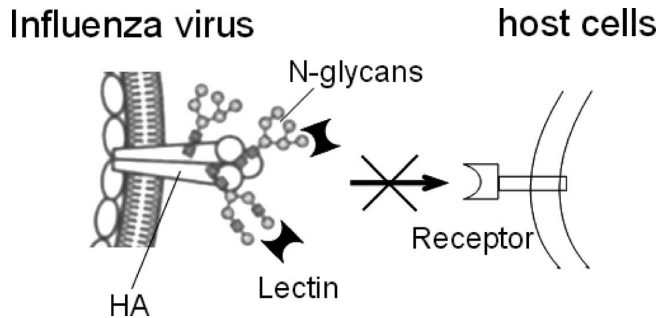


Fig. 2. Schematic representation of possible inhibitory mechanism of influenza virus infection by OAA.

参 考 文 献

- 1) Neumann G, et al: Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459, 931–939, 2009
- 2) Octaviani CP, et al: High level of genetic compatibility between swine-origin H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. *J. Virol.* 84, 10918–10922, 2010
- 3) Mir-Shekari SY, et al: The glycosylation of the influenza A virus hemagglutinin by mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272, 4027–4036, 1997
- 4) Bewley CA, et al: Solution structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein. *Nature Struct. Biol.* 5, 571–578, 1998
- 5) Mori T, et al: Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. *J. Biol. Chem.* 280, 9345–9353, 2005
- 6) Sato Y, et al: Primary structure and carbohydrate binding specificity of a potent anti-HIV lectin isolated from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *J. Biol. Chem.* 282, 11021–11029, 2007

謝 辞

インフルエンザウイルス株を供与していただいた広島大学大学院医歯薬総合研究科ウイルス教室の坂口剛正教授、大分大学医学部微生物教室の西園見教授に深く感謝いたします。

要 約

藻類由来のレクチンは、特定の糖鎖構造に対して極めて高い特異性ならびに親和性で結合することから、ウイルス表面に存在する糖鎖にタイトに結合することで、ウイルスの細胞への感染を極めて低濃度で阻害するため、マイクロサイドなどの抗ウイルス剤としての応用が期待されている。本研究では、微細藻類である藍藻 *Oscillatoria agardhii* より単離されたレクチン (OAA) のインフルエンザウイルスに対する感染阻害活性を調べ、昨年度パンデミックとなった新型インフルエンザウイルス株を含むウイルス株に強い抗ウイルス活性をもつことを明らかにした。抗ウイルス活性は、*in vitro* において MDCK 細胞を用いてニュートラルレッドの取り込み試験により調べた。その結果、OAA は濃度依存的に、インフルエンザウイルスの細胞への感染を阻害し、A/Udorn/72 (H3N2) および A/Oita/OU1 P3-3/09 (H1N1) に対する感染阻害の EC₅₀ 値はそれぞれ

れ 7.8 nM および 89.1 nM であった。OAA は、これまでに HIV ウイルスに対しても顕著な感染阻害活性を示すことを明らかにしており、本レクチンは新規の抗ウイルス性蛋白質として有用であることが示された。

Summary

Algal lectins are one of the promising compounds for anti-HIV or anti-viral agents such as microbicides, because they exhibit exclusive specificity toward certain oligosaccharide(s) on virus surface with extremely high affinity, thereby inhibiting virus entry into the host cells. Here, we report that a high mannose-binding lectin (OAA) from blue-green algae, *Oscillatoria agardhii*, shows potent anti-influenza virus activity against two influenza virus strains including the recent pandemic strain, swine-origin influenza virus (H1N1-2009). Anti-influenza activity was tested by neutral red (NR) dye uptake assay *in vitro* with MDCK cells, where the cell viability was measured after the virus challenge in the presence of various concentrations of OAA. OAA inhibited the virus infection into the MDCK cells in a dose dependent manner with EC₅₀s of 7.8 nM and 89.1 nM against A/Udorn/72 (H3N2) and A/Oita/OU1 P3-3/09 (H1N1), respectively. We have previously demonstrated that OAA also inhibits HIV replication with low nanomolar levels. Therefore, this lectin would be useful as a novel antiviral compounds.

[2010. 10. 4 受理]