

ウイルス吸着・侵入あるいはレクチン結合により誘導される 宿主細胞遺伝子の発現変動

森本金次郎・佐藤雄一郎

Expression Changes of Host Cellular Genes in Early Stage of Virus Infection or Lectin Binding

Kinjiro MORIMOTO and Yuichiro SATO

緒 言

ウイルス粒子が細胞の表面に吸着し細胞内へ侵入するあるいは細胞表面になんらかの分子が結合する、これらの現象を感知することで、細胞は情報を受取り、その情報を伝達し、なんらかの細胞応答が行われる。ウイルス感染の場合はウイルスのゲノム (DNA, RNA) や特徴的な構造を感知し、いち早く防御機構を発動しようとする (自然免疫応答)¹⁾。それに対して、ウイルスはその防御機構を妨害する機構を働かせようとする。ウイルス感染のごく初期の段階でこのような攻防が始まっている。そして、この両者のせめぎ合いが感染の帰結を決定することとなる。培養液中にある種のレクチンを添加した場合、ウイルス存在下では、レクチンはウイルス粒子に結合し、その侵入を阻止することで抗ウイルス効果を発揮する。それ以外の状況では、レクチンは細胞表面の様々な分子に結合し、宿主細胞に多様な作用を惹起させることで様々な生物活性を呈する。我々は高マンノース結合性レクチン PFL がインフルエンザウイルス粒子表面上の HA 蛋白質の糖鎖と結合することで、抗ウイルス活性を示すことを明らかにした。さらに、細胞表面にあるインテグリン α_2 分子に結合することで、細胞接着障害を伴う細胞死を誘導することを明らかにしている²⁾。

本研究では、ウイルス感染とレクチン添加の初期に応答する宿主細胞遺伝子の変動をマイクロアレイ法により解析した。これらの結果を基に、新たな抗ウイルス剤開発に向けて、ウイルス感染初期過程での細胞応答をより理解するために、ウイルス侵入を感知する遺伝子群とそれに引き続く自然免疫応答に関する遺伝子群の発現変動を探索した。また、生体内へのレクチン投与に際し、レクチン結合により誘導される細胞応答を理解するために、レクチン結合後に応答する遺伝子群を検索することで、レクチン PFL の多様な生物活性の作用機序を探る手始めとした。

実 験 方 法

1. ウイルス感染細胞、レクチン PFL 添加細胞からの RNA の抽出

インフルエンザウイルス A/Udorn/72 (H3N2) をヒト肺がん細胞 A549 細胞に感染、0 時間 (コントロール細胞)、4 時間、8 時間後の感染細胞より total RNA を抽出した。培養液に最終濃度

200 nM, 2 μ M PFL 添加後 4 時間の A549 細胞より total RNA を抽出した。

2. 遺伝子発現変動の解析

抽出した RNA を Agilent 社 Expression Array 解析 (Super Print G3 Human Gene Expression) に供した。この解析は約 5 万のプロープを用いて, Entrez にエンタリーされている 27,958 の遺伝子の変動を解析する。解析データはコントロール細胞の遺伝子の発現に対するそれぞれの条件の細胞の遺伝子の発現増減として得られる。

結 果

1. インフルエンザウイルス感染初期の宿主遺伝子の変動

非感染 A549 細胞とインフルエンザウイルス感染 A549 細胞 (感染後 4 時間と 8 時間) の遺伝子の発現変動を解析した。非感染 A549 細胞と比べ, 2 倍以上の発現変動がみられた遺伝子は感染 4 時間後ではおよそ 166 種類, 8 時間後ではおよそ 216 種類となり, 感染進行とともに変動遺伝子の数が増加していることが分かった。また, 殆どの変動は発現の増加として検出され, 発現減少を示す遺伝子は僅かであった。

その中で, ウイルス感染の初期段階に関与する遺伝子群として, 先ず, ウイルスの吸着・侵入を感知する遺伝子に注目した。近年, 解析が進んでいるパターン認識受容体³⁾として, Toll 様受容体関連では TLR2, TLR3 の発現増加とそのアダプター分子である MyD88, TRIF の発現増加, そして, これらにより活性化される転写因子であるインターフェロン調節因子 IRF-7 (interferon regulatory factor-7) の発現増加が確認できた。また, RIG-I 様受容体関連では RIG-I, MDA5, LGP2 遺伝子の発現増加, そのアダプター分子である TRIM21 の発現増加, それに引き続く IRF-7 遺伝子の発現増加が見られた。さらに, NOD 様受容体関連では NOD1, NOD2 遺伝子の発現増加からそれに引き続く CASP1 (IL-1 β の活性化をもたらす) の発現増加が見られた。転写因子 IRF-7 遺伝子の発現増加により誘導される I 型インターフェロン (IFN- α , IFN- β) をはじめとする炎症性サイトカイン遺伝子群の活性化も認められた。さらには, I 型インターフェロンの発現誘導は JAK/STAT から IRF-9 経路を経て, 一連のインターフェロン応答遺伝子⁴⁾ (ISGs: interferon-stimulated genes) の誘導を導いていることが認められた。すなわちインターフェロン誘発性の 2'-5'-オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子 (OAS-1, -2, -3), ウイルスの mRNA を分解する RNase L, 二本鎖 RNA 依存 protein kinase (PKR), 抗ウイルス作用を示す MxA (myxovirus resistance A), PML (promyelocytic leukemia) -1, -5, -8 遺伝子⁵⁾ や ISG15 の遺伝子の誘導が確認できた。

アポトーシス発動の初期に関わる CAPS8, CAPS10 遺伝子の発現増加が見られたが, アポトーシス抑制因子である BCL-2 の発現減少, 促進因子である BCL-2 相同遺伝子の BCL2L13 は増加, BCL2L14 は減少, アポトーシス誘発因子 Granzyme A は発現増加という相反的な状況が見出された。遺伝子の変動ではなく, 関与するタンパク質の産生がどうなり, 最終的にどちらに向うか追跡する必要があると考える。また, 同様に, がん抑制遺伝子 p53 遺伝子においても, p53 遺伝子の発現増加と p53 を活性化する PML (promyelocytic leukemia) -1, -5, -8 遺伝子 (PML は TRIM タンパク質ファミリーに属するインターフェロン誘導抗ウイルス作用を持つほか幅広い生物活性が知られている⁶⁾) の発現増加, 逆に, p53 を不活性化する Mdm2 遺伝子⁷⁾ の発現増加

も見られた。

多数の炎症性サイトカイン（TNF, FasL superfamily の多数の遺伝子群, IL-6, IL-7, IL-12, IL-28, IL-29), ケモカイン（CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10, CXCL11, CXCL13) の遺伝子発現の増加が見られた。一方, IL-9 は顕著な発現減少を示した。逆に, サイトカインシグナル抑制因子（SOCS1, SOCS3) 遺伝子の発現も増加していることが示された。

PI3K/Akt シグナル伝達経路において, Akt (protein kinase B; a serine/threonine kinase) を活性化させる PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 遺伝子の増加が確認された。シグナル伝達経路の制御に関わるユビキチン化関連遺伝子⁸⁾として, ユビキチン活性化酵素 (UBA7), ユビキチン結合酵素 (UBE2L6), ユビチキン特異的ペプチダーゼ (USP18, USP28, USP41) の発現増加と, TRIM (tripartite motif) タンパク質ファミリー遺伝子群では TRIM14, -21, -25, -31, -38 の発現増強が見られた。感染のごく初期（4 時間後）に著しい発現増加が見られた興味深い遺伝子として FasL, CXCL13, IL-28, デイフェンシン α_4 (DEFA4) が挙げられる。IL-28 はⅢ型インターフェロンあるいは IFN- λ とも呼ばれていて抗ウイルス能を誘導するものであり⁹⁾, デイフェンシン α_4

表1 インフルエンザウイルス感染初期に発現変動する自然免疫に関連する遺伝子*

ウイルス認識関連	ユビキチン関連	サイトカイン
TLR-2	UBA7	TNF, FasL
TLR-3	UBE2L6	IL-6
MyD88	USP18	IL-7
TRIF	USP28	IL-9 ↓
RIG-I	USP41	IL-12
MDA-5	TRIM14	IFN- α
LGP2	TRIM21	IFN- β
NOD1	TRIM25	IFN- λ (IL-28, IL-29)
NOD2	TRIM31	ケモカイン
転写因子	TRIM38	CCL2
IRF-1	カスパーゼ・	CCL3
IRF-2	アポトーシス関連	CCL5
IRF-7	CASP1	CXCL10
IRF-9	CASP7	CXCL11
STAT1	CASP8	CXCL13
	CASP10	IFN 応答遺伝子
	BCL2 ↓	2'-5'-OAS
	BCL2L13	RNase L
	BCL2L14 ↓	PKR
	Granzyme A	MxA
		PML-1
		PML-5
		PML-8
		IGS15

* 通常遺伝子記号は英大文字イタリック体で表記されるが, イタリック体とせず, 分かり易い表記にしたものもある。発現減少の遺伝子は ↓ で示した。

表2 ウイルス感染とレクチン PFL 添加による変動遺伝子の比較*

ウイルス感染	レクチン PFL 添加
転写因子	
STAT1 IRF-1, IRF-2, IRF-7, IRF-9	NF- κ B C/EBP AP-1 (c-Jun, c-Fos) STAT3, STAT5
サイトカイン	
TNF, FasL IL-6, IL-7, IL-12 IL-9 ↓ IFN- α , IFN- β IFN- λ (IL-28, IL-29)	TNF, FasL IL-1, IL-6, IL-8, IL-11 IL-9 ↓
サイトカイン抑制遺伝子	
SOCS1, SOCS3	SOCS3
ケモカイン	
CCL2, CCL3, CCL5 CXCL10, CXCL11, CXCL13	CCL2, CCL20 CXCL1, CXCL2, CXCL3
カスパーゼ・アポトーシス関連	
CASP1, CASP7, CASP8, CASP10 BCL2 ↓ , BCL2L13, BCL2L14 ↓ Granzyme A	BCL2 ↓ , BCL2L14 ↓
増殖因子	
p53 Mdm2	p53 VEGF, PDGF, TGF- β
シグナル伝達	
PI3K	PI3K PKA, PKC
TRIM family	
TRIM14, TRIM21, TRIM25 TRIM31, TRIM38	TRIM17, TRIM55, TRIM63 RNF43 ↓

* 通常遺伝子記号は英大文字イタリック体で表記されるが、イタリック体とせず、分かり易い表記にしたものもある。発現減少の遺伝子は↓で示した。

は抗菌ペプチドとして知られている。

これらウイルスの感知機構とインターフェロン、サイトカインの誘導に関する遺伝子、いわゆる自然免疫発動の制御に係わる遺伝子を表1にまとめた。また、後述するレクチン添加時と比較したものを表2にまとめて記載した。

2. レクチン結合による細胞遺伝子の変動

レクチン結合により引き起される遺伝子発現変動を解析し、ウイルス吸着・侵入の状況と比較した。高マンノース結合性レクチン PFL を 200 nM あるいは 2 μ M 培養中に添加後、極初期の 4 時間後の遺伝子変動を調べた。無添加状態と比べ、2 倍以上の変動を示した遺伝子は 200 nM において 1,306 個、2 μ M では 1,375 個と包括的に見ると、PFL 濃度による変動遺伝子の数には大きな違いは見られなかった。

レクチン PFL は高い抗ウイルス活性に加えて、細胞表面にあるインテグリン α_2 分子に結合することで細胞接着傷害を伴う細胞死を誘導することが分かっている²⁾。そこで、増殖、生存、がん化に関与する情報伝達経路に関わる遺伝子に注目して、それらの変動を解析した。細胞外マトリックスにより囲まれた細胞は細胞表面に存在するインテグリンを介して細胞の形態変化、移動、増殖、分化、生存などの制御に関わっている^{10,11)}。インテグリン α_2 (ITG2A) 遺伝子の発現増加とともに、インテグリンを介したアクチン細胞骨格の制御に関連し、細胞の運動性やアクチンの重合に関係する Talin, Parvin, Paxillin, Zyxin の遺伝子発現が増加していることが示された。また、チューブリン (TUBB1)、ケラチン (KRT5) 遺伝子の発現増加も見られた。インテグリンがケラチノサイトの接着・移動に関与していることは既によく知られている¹²⁾。また、インテグリンを介したシグナル伝達経路のキーファクターである FAK (focal adhesion kinase) の下流に位置する PI3K 遺伝子の増加も確認できた。

がん形成に関与する遺伝子群の変動も多く見られ、STAT3, STAT5, C/EBP, AP-1 (c-Jun, c-Fos), NF- κ B などの転写因子、血管内皮細胞増殖因子 (VEGFA)、血小板由来成長因子 (PDGFB)、TGF- β などの成長因子やがん抑制遺伝子である p53 の発現増加が認められた。細胞の分化・増殖を制御する Wnt シグナル伝達経路に関与する転写因子である LEF1 (Lymphoid enhancer-binding factor) に著しく強い発現増加が見られた。この LEF1 は c-jun, c-myc などのがん遺伝子の発現誘導に関わっている¹³⁾。神経回路の形成、免疫細胞の調節やがん転移の関与が知られているセマフォリン・シグナル伝達経路 (Semaphorin signaling) の Semaphorin 7A (SEMA7A) の強い発現増加も顕著である。この Semaphorin はインテグリンからのシグナル伝達経路とのリンクも示唆されている¹⁴⁾。cysteine-rich angiogenic inducer (CYR61) 遺伝子の発現減少も興味深い。この CYR61 は、分泌性のヘパリン結合タンパク質であり、細胞外マトリックス結合の情報伝達分子として機能し、インテグリンとの相互作用で内皮細胞接着を促進することが分かっている¹⁵⁾。

アポトーシス関連遺伝子の変動はウイルス感染時と同様に、Bcl2 様遺伝子群では促進的に働く遺伝子と抑制的に働く遺伝子の両者において増加するものと減少するものが混在している。しかし、ウイルス感染と異なる挙動として、カスパーゼ遺伝子の発現増加が全く見られなかったことが特徴的である。また、ウイルス感染時では起こらなかった cAMP dependent protein kinase (PKA), protein kinase C (PKC) の発現増加も見られた。ウイルス感染により誘導される遺伝子と PFL 添加により誘導される遺伝子を比較して、まとめたものを表 2 に記載する。

その他、興味深い点として、血管新生 (angiogenesis) 関連の遺伝子群の増減が顕著であった。血管新生制御因子であるアンジオポイエチン (ANGPTL4)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現促進、エンドセリン-1, -2、エンドセリン受容体 (GRP37) の発現減少、血管新生、血管拡張を促進し降圧作用を持つ adenomedullin (ADM) 遺伝子の発現抑制、逆に血管収縮に関与し昇圧作用を持つアンジオテンシン I 転換酵素 (ACE2) 遺伝子の発現促進も見られた。血管内皮細

表3 レクチン PFL 添加後に変動が見られる特徴的な遺伝子*

Integrin- α 2 (<i>ITGA2</i>)
Tubulin- β 1 (<i>TUBB1</i>)
Keratin 5 (<i>KRT5</i>)
Parvin (<i>PARV</i>)
Paxillin (<i>PXN</i>)
Talin 1 (<i>TLN1</i>)
Zyxin (<i>ZYX</i>)
Lymphoid enhancer-binding factor 1 (<i>LEF1</i>)
Semaphorin 7A (<i>SEMA7A</i>)
Cystein-rich angiogenic inducer 61 (<i>CYR61</i>) ↓
Adenomedullin (<i>ADM</i>) ↓
Angiopoietin 4 (<i>ANGPTL4</i>)
Angiomotin 2 (<i>AMOTL2</i>) ↓
Angiotensin I converting enzyme (<i>ACE2</i>)
Endothelin-1 (<i>END1</i>) ↓
Endothelin-2 (<i>END2</i>) ↓
Endothelin Receptor (<i>GPR37</i>) ↓

* 括弧内に遺伝子記号を示す。発現減少の遺伝子は↓で示した。

胞の移動制御やがん抑制シグナルとして知られている Hippo シグナル経路¹⁶⁾に関わる Angiomotin (AMOTL2) の発現減少も示された。これらアンジオジェネシスに参与する遺伝子は炎症や腫瘍細胞の転移との関わりからも興味深い点である¹⁷⁾。これら遺伝子の変動は表3にまとめた。

考 察

インフルエンザウイルスの吸着・侵入において、細胞膜上、エンドゾーム内、細胞質中でのウイルスを感知する分子とそれらより誘導されるシグナル伝達経路の活性化、その結果引き起こされる炎症性サイトカイン遺伝子の誘導、I 型インターフェロンの誘導、さらにインターフェロン誘導により引き起こされる各種抗ウイルス遺伝子群の活性化が確認された。レクチン結合により引き起こされる遺伝子変動をウイルス感染の場合と比較すると、当然のことながら、多くの異なる応答が示された。例えば、転写因子において、感染細胞ではインターフェロン調節因子として知られている転写因子 IRFs の発現増強がみられるが、レクチン結合では NF- κ B, AP-1, C/EBP などの転写因子に発現増強がみられた。サイトカインの誘導において、共通のサイトカインの増強も見られるが、レクチン結合では IFN- α , IFN- β の発現誘導はみられていない。アポトーシスに関しても、レクチン結合ではカスパーゼの発現変動は見られなかった。

レクチン結合では、いくつかの増殖因子やプロテイン・キナーゼ (PKA, PKC) の発現誘導など、インテグリンを介しての細胞の形態変化、増殖、生存などの制御に影響を及ぼすことが示された。また、ユビキチン化など様々な機能制御に関わる TRIM ファミリータンパク質において、ウイルス感染とレクチン結合では異なる種類の TRIM が発現増強していることも明らかとなった。

レクチン結合において、インテグリンを介したシグナル伝達系の遺伝子の活性化だけでなく、血管新生関連の遺伝子発現に増減が顕著に見られたことは、今後このレクチン PFL の生物活性を解析する上で興味深い結果である。

参 考 文 献

- 1) 高岡晃教, 大和弘明: 自然免疫とウイルス感染 ゲノム医学 8(3), 183-198, (2008).
- 2) Sato Y., Morimoto K., Kubo T., Yanagihara K., Seyama T.: High mannose-binding antiviral lectin PFL from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 promotes cell death of gastric cancer cell MKN28 via interaction with $\alpha 2$ -integrin. PLOS ONE, 7(9), e45922, (2012).
- 3) Kawai T., Akira S.: The role of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Int Immunol, 21(4), 317-337, (2009).
- 4) 米山光俊, 藤田尚志: ウイルス感染に応答した I 型インターフェロン遺伝子の発現誘導メカニズム ウイルス 第54巻 第2号, 161-168, (2004).
- 5) Borden K. L.: Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. Mol Cell Biol, 22(15), 5259-5269, (2002).
- 6) Engelhardt O. G., Sirma H., Pandolfi P. P., Haller O.: Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. J Gen Virol, 85(8), 2315-2326, (2004).
- 7) Momand J., Wu H. H., Dasgupta G.: MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. Gene, 242, 15-29, (2000).
- 8) 有元啓一郎, 下遠野邦忠: ユビキチン化によるウイルス認識分子シグナルの制御 ウイルス 第58巻 第1号, 47-54, (2008).
- 9) Ank N., Iversen M. B., Bartholdy C., Staeheli P., Hartmann R., Jensen U. B., Dagnaes-Hansen F., Thomsen A. R., Chen Z., Haugen H., Klucher K., Paludan S. R.: An important role for type III interferon (IFN- λ /IL-28) in TLR-induced antiviral activity. J Immunol, 180, 2474-2485, (2008).
- 10) Giancotti F. G., Rouslahti E.: Integrin signaling. Science, 285, 1028-1032, (1999).
- 11) Nagano M., Hoshino D., Koshikawa N., Akizawa T., Seiki M.: Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. Int J Cell Biol, doi: 10.1155/2012/310616, (2012).
- 12) Kariya Y., Gu J.: N-Glycosylation of $\beta 4$ integrin controls the adhesion and motility of keratinocytes. PLOS ONE, 6(11), e277084, (2011).
- 13) 山科敬太郎, 菊地 章: Wnt シグナル伝達経路における転写制御 蛋白質・核酸・酵素, 49(10), 1421-1427, (2004).
- 14) Zhou Y., Gunput R. F., Pasterkamp J.: Semaphorin signaling: progress made and promise ahead. Trends in Biochem Sci, 33(4), 161-170, (2008).
- 15) Su J. L., Chiou J., Tang C. H., Zhao M., Tsai C. H., Chen P. S., Chang Y. W., Chien M. H., Peng C. Y., Hsiao M., Kuo M. L., Yen M. L.: CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the $\alpha \nu \beta 3$ integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. J Biol Chem, 285(41), 31325-31336, (2010).
- 16) Ota M., Sasaki H.: Mammalian TEAD proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. Development, 135(24), 4059-4069, (2008).
- 17) Klein S., de Fougères A. R., Blaikie P., Khan L., Pepe A., Green C. D., Koteliensky V., Giancotti F. G.: $\alpha 5 \beta 1$ integrin activates an NF- κ B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. Mol Cell Biol, 22(16), 5912-5922, (2002).

謝 辞

本研究の一部は平成24年度科学研究費補助金基盤研究 (C)「広範な抗ウイルス薬ターゲット

となる新規シグナル伝達分子の検索とその機構解析」(研究代表: 森本金次郎, 課題番号 24590167) の助成を受けたものである。

Summary

Expression changes of cellular genes in the early stage of influenza virus infection or administration of high mannose-binding lectin PFL were examined by microarray gene expression analysis. In the virus infection, genes involving pathogen-recognition sensors, genes participating interferons and inflammatory cytokines, and the downstream genes coordinating anti-viral programs as interferon stimulated genes (ISGs) were detected to be up-regulated. On the other hand, in binding of lectin PFL mediated by integrin on the cell surface, not only genes involving signaling pathway mediated by integrin but also genes about transcription factors and growth factors concerning cellular multiplication or carcinogenesis were remarkably detected to be up-regulated. Interestingly, expression of many genes involving angiogenesis was detected to be changed, some genes exhibited enhanced expression others exhibited suppressed expression. The results unravel a new aspect to understand various biological effects of lectin PFL.

[2013. 9. 26 受理]