HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Akt活性抑制ペプチド ”Akt-in” を用いたインフルエンザウイルス感染の病態修飾効果
Author(s)	平田, 徳幸
Description	配架番号：1686
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第6964号
Issue Date	2015-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6964
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60036
Type	doctoral thesis
File Information	Noriyuki_Hirata.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

Akt 活性抑制ペプチド”*Akt-in*”を用いた
インフルエンザウイルス感染の病態修飾効果
(Inhibition of Akt kinase activity impacts on influenza virus infection by using “*Akt-in*”, a peptide Akt inhibitor.)

２０１５年９月

北　海　道　大　学

平　田　徳　幸

学　位　論　文

Akt 活性抑制ペプチド”*Akt-in*”を用いた
インフルエンザウイルス感染の病態修飾効果
(Inhibition of Akt kinase activity impacts on influenza virus infection by using “*Akt-in*”, a peptide Akt inhibitor.)

２０１５年９月

北　海　道　大　学

平　田　徳　幸

目　　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・　1頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　9頁

材料と方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　11頁

実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　16頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　30頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・　32頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　33頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　34頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Noriyuki Hirata, Futoshi Suizu, Mami Matsuda-Lennikov, Tatsuma Edamura, Jyoti Bala, Masayuki Noguchi.
   Inhibition of Akt kinase activity suppresses entry and replication of influenza virus.
   Biochem Biophys Res Commun, 450・891-898, (2014)

2. Manabu Hashimoto, Futoshi Suizu, Wataru Tokuyama, Hiroko Noguchi, Noriyuki Hirata, Mami Matsuda-Lennikov, Tatsuma Edamura, Mikio Masuzawa, Noriko Gotoh, Shinya Tanaka, Masayuki Noguchi.
   Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase co-activator that exhibits oncogenic potency *in vivo*.
   Oncogenesis, 2・e70, (2013)

3. Mami Matsuda, Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Tadaaki Miyazaki, Chikashi Obuse, Masayuki Noguchi.
   Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt.
   Biochem Biophys Res Commun, 395・312-317, (2010)

4. Masayuki Noguchi, Noriyuki Hirata, Tatsuma Edamura, Satoko Ishigaki, Futoshi Suizu
   Intersection of apoptosis and autophagy cell death pathways.
   Austin Journal of Molecular and Cellular Biology, 2・1004, (2015)

5. Masayuki Noguchi, Noriyuki Hirata, Futoshi Suizu.
   The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy.
   BBA Reviews in Cancer, 1846・342-352, (2014)

6. Mami Matsuda-Lennikov, Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Manabu Hashimoto, Kohki Kimura, Tadashi Nagamine, Yoichiro Fujioka, Yusuke Ohba, Toshihiko Iwanaga, Masayuki Noguchi.
   Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy.
   PLoS One, 9・e79795, (2014)

7. Futoshi Suizu, Yosuke Hiramuki, Fumihiko Okumura, Mami Matsuda, Akiko J. Okumura, Noriyuki Hirata, Masumi Narita, Takashi Kohno, Jun Yokota, Miyuki Bohgaki, Chikashi Obuse, Shigetsugu Hatakeyama, Toshiyuki Obata, Masayuki Noguchi: The E3 ligase TTC3 that facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev Cell* 17・800-810, (2009)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yosuke Hiramuki, Futoshi Suizu, Mami Matsuda, Noriyuki Hirata, Masayuki Noguchi: A characterization of a novel Akt interacting molecule that preferentially binds to the phosphorylated Akt, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日(水)～12 日(土), 横浜
2. Mami Matsuda, Yosuke Hiramuki, Noriyuki Hirata, Futoshi Suizu, Masayuki Noguchi: PI3K-AKT signal cascade and its roles in influenza virus infection, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日(水)～12 日(土), 横浜
3. Futoshi Suizu, Yosuke Hiramuki, Fumihiko Okumura, Mami Matsuda, Akiko Okumura, Noriyuki Hirata, Masumi Narita, Takashi Kohno, Jun Yokota, Miyuki Bohgaki, Chikashi Obuse, Shigetsugu Hatakeyama, Toshiyuki Obata, Masayuki Noguchi: A novel E3 ligase for Akt that facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日(水)～12 日(土), 横浜
4. Futoshi Suizu, Masayuki Noguchi, Yosuke Hiramuki, Fumihiko Okumura, Mami Matsuda, Miyuki Bohgaki, Noriyuki Hirata, Shigetsugu Hatakeyama : TTC3 is an E3 ligase for Akt that facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt, Keystone Symposia, 2010 年 3 月 12 日(金)～17 日(水), Vancouver, Canada.

5. Mami Matsuda, Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Tadaaki Miyazaki, Chikashi Obuse, Masayuki Noguchi : Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会, 2010 年 12 月 7 日(火)～10 日(金), 神戸.
6. Futoshi Suizu, Yosuke Hiramuki, Fumihiko Okumura, Mami Matsuda, Akiko Okumura, Noriyuki Hirata, Masumi Narita, Takashi Kohno, Jun Yokota, Miyuki Bohgaki, Chikashi Obuse, Shigetsugu Hatakeyama, Toshiyuki Obata, Masayuki Noguchi : Regulatory mechanisms of Akt activity by ubiquitination, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会, 2010 年 12 月 7 日(火)～10 日(金), 神戸.
7. Mami Matsuda, Futoshi Suizu, Hirata, Tadaaki Miyazaki, Chikashi Obuse, Masayuki Noguchi, Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt, Keystone Symposia, 2011 年 2 月 13 日(日)～18 日(金), Keystone, Colorado, USA.
8. Manabu Hashimoto, Futoshi Suizu, Mami Matsuda, Noriyuki Hirata, Masayuki Noguchi: Characterization of protooncogene TCL1b as an Akt kinase co-activator, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 8 月 3 日(月)～5 日(水), 名古屋.
9. Manabu Hashimoto, Futoshi Suizu, Mami Matsuda, Noriyuki Hirata, Masayuki Noguchi: Characterization of protooncogene TCL1b as an Akt kinase co-activator, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日(火)～16 日(金), 横浜.
10. Manabu Hashimoto, Futoshi Suizu, Wataru Tokuyama, Hiroko Noguchi, Mami Matsuda, Noriyuki Hirata, Tadashi Nagamine, Sinya Tanaka, Masayuki Noguchi: Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase coactivator that exhibits oncogenic potency in vivo, The 2012 Meeting on Mechanisms & Models of Cancer, 2012 年 8 月 14 日(火)～18 日(土), Cold Spring Harbor, New York, USA,
11. Manabu Hashimoto, Mami Matsuda, Futoshi Suizu, Tadashi Nagamine, Noriyuki Hirata, Hiroko Noguchi, Shinya Tanaka, Wataru Tokuyama, Masayuki Noguchi: Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日(水)～21 日(金), 札幌

12. Manabu Hashimoto, Futoshi Suizu, Wataru Tokuyama, Hiroko Noguchi, Mami Matsuda, Noriyuki Hirata, Tadashi Nagamine, Shinya Tanaka, Masayuki Noguchi: Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日(火)～14 日(金), 福岡
13. 松田-レニコフ真実，水津太，平田徳幸，橋本学，木村光輝，枝村達磨，藤岡容一郎，大場雄介，岩永敏彦，野口昌幸: 新規 Akt 結合因子 Phafin2 によるオートファジー制御の仕組み. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日(火)～6 日(金), 神戸.
14. Masayuki Noguchi Noriyuki Hirata Mami Matsuda-Lennikov, Futoshi Suizu Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy. FASEB meeting, 2014 年 4 月 27～30 日 San Diego, USA.
15. 平田徳幸, 水津太, レニコフ真実, 橋本学, 宮崎忠昭, 野口昌幸: Akt 活性抑制ペプチドを用いたインフルエンザウイルス感染症の治療への試み. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2014 年 6 月 19~20 日, 札幌
16. 平田徳幸, 水津太, 野口昌幸: Akt 活性抑制ペプチド"*Akt-in*"を用いたインフルエンザ感染におけるオートファジー修飾効果の検討. 第 8 回オートファジー研究会・第 2 回新学術「オートファジー」班会議, 2014 年 10 月 10~11 日, 札幌
17. 平田徳幸, 水津太, レニコフ真実, 枝村達磨, 木村光輝, バラジョティ, 野口昌幸: Akt 活性抑制ペプチド"*Akt-in*"を用いたインフルエンザウイルス感染の病態修飾効果の検討. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, 横浜
18. Masayuki Noguchi, Noriyuki Hirata, Jyoti Bala, Futoshi Suizu: The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. Keystone symposia, 2015 年 1 月 13 日～17 日, Vancouver, Canada
19. Masayuki Noguchi, Noriyuki Hirata, Kohki Kimura, Mami Matsuda-Lennikov, Tatsuma Edamura, Jyoti Bala, Futoshi Suizu: Modulation of the status of Influenza Infection by Akt peptide inhibitor *Akt-in*. International Conference on Flu, 2015 年 6 月 8 日～10 日, Chicago, USA.

緒言

セリン・スレオニンキナーゼ Akt は、cAMP と cGMP 依存的なプロテインキナーゼ C (cAMP-dependent, cGMP-dependent, protein kinase C, AGC) グループに属し、元々はマウスの胸腺腫を発症させる Akt8 急性形質転換ウイルスから同定されている [1,2]。細胞外からの様々な外的刺激を受け、Akt は phosphoinositide 3-kinase (PI3K) による膜リン脂質、つまり Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P_3, PIP_3)とその分解産物である PtdIns(3,4)P_2のイノシトール基の第 3 位のリン酸化により活性化される [3,4]。第 3 位がリン酸化されたイノシトールは、Akt キナーゼの N 末端にある pleckstrin homology (PH) ドメインと呼ばれる機能ドメインに結合し、Akt の構造上の変化が起こる。その結果、phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) により Akt のスレオニン 308 (Thr308)のアミノ酸残基がリン酸化を受け、Akt の活性化が惹起される [1,2,5]。また最近、The mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2)が、Akt の C 末端に存在する疎水性のセリン 473 (Ser473) のアミノ酸残基のリン酸化に、主要な役割を果たすことが示された(図 1)[6]。

Akt が活性化されると、細胞内の下流において、アポトーシスや細胞増殖、細胞周期、グルコース代謝、血管形成、テロメラーゼ活性などを制御する(図 1)。また、Akt は蛋白質分解においても重要な役割を果たしており、私たちはこれまでに、ユビキチン・プロテアソームによって、リン酸化された Akt 自身を選択的に分解する tetratricopeptide repeat domain 3 (TTC3)の報告や、細胞が飢餓状態に陥った場合に、リソソーム局在性分子である PH and FYVE domain 2 (Phafin2)と Akt が結合し、オートファジーが誘導されることを報告してきた [7-9]。したがって、PI3K-Akt シグナル伝達経路は、ヒトの様々な疾患の原因としての生理学的な重要性が非常に高い。そして注目すべきことに、Epstein-Barr ウイルス(EBV)や B 型肝炎ウイルス(HBV)、C 型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、そしてインフルエンザウイルスなどの感染症において、この PI3K-Akt シグナル伝達経路は臨床的な兆候を示すことが報告されている [2,10,11]。

近年、H5N1 型もしくは H1N1 型の鳥インフルエンザウイルスによる、高病原性のインフルエンザが出現してきている。この高病原性インフルエンザウイルスは、これまでヒトへの感染例が非常に少ないうえに、変異性が非常に高い。そのため、この高病原性インフルエンザウイルスに感染した場合、季節性のインフルエンザで用いられる免疫学的な治療法が間に合わない。例えば、ヒトが感染した後でなければワクチンの作成もできず、さらにウイル

ス粒子に対する治療薬(タミフルやリレンザ等)も感染から 48 時間以内に投与しないと効果が得られない。そして、飛行機によるヒトの高速輸送が可能な時代となった今、その感染が世界中へ拡大するのは時間の問題である[12]。

インフルエンザウイルスは、11 の蛋白を発現する 8 つに区分されたマイナス鎖 RNA で構成されるが、宿主細胞の多くのシグナル伝達経路がこのインフルエンザウイルス蛋白と相互作用しており、ウイルス増殖のためにその過程が必須であることが知られている。11 個のウイルス蛋白の中で、8 つ目の区分にエンコードされ、約 26-kDa の蛋白である non-structural protein 1 (NS1) が、感染宿主細胞のアポトーシス抑制や Nuclear factor κB(NF-κB)依存的な機構など、いくつかの生理的な機能を有することが報告されてきた[13-15]。

最近、私たちはインフルエンザウイルス蛋白である NS1 と PI3K の主要な細胞内制御因子である Akt が、互いに生理学的そして機能的に結合することを示した[10]。NS1 の RNA 結合ドメイン(RBD)が Akt の PH ドメインに結合し、その結果として、Akt の活性化を上昇させ、NS1 の Thr215 のアミノ酸残基のリン酸化が誘導されていた。この Akt-NS1 の機能的な相互作用が、宿主細胞とウイルスとの間の関係性を強く結びつけ、インフルエンザウイルスの増殖のために、細胞生存を促進させると考えている。また、Akt に加えて NS1 は、PI3K の p85βの SH3 ドメインと C 末端の SH2 ドメインと直接的に結合することが知られ、この結合も PI3K-Akt シグナル伝達経路を活性化することが知られている[16]。従って、宿主細胞の細胞反応を制御し得るウイルス感染の各段階に、NS1 蛋白が PI3K-Akt シグナル伝達経路の活性化に働くと考えられる。ヒトの宿主細胞における様々な因子は、インフルエンザウイルスの増殖に必要なことが知られている[17,18]。細胞内の PI3K-Akt シグナル伝達経路は、感染早期のウイルス侵入の段階だけでなく、感染終期のアポトーシス誘導の抑制、そしてウイルス RNA の発現やリボヌクレオプロテイン(RNP)の局在などの制御に不可欠である[11,12,16,19,20]。ウイルス感染細胞は、感染によって細胞自身が死ぬことを避けるために、効率的に PI3K-Akt シグナル伝達経路を活性化させ、宿主細胞と細胞内の感染過程を制御する役割を担う。従って、この宿主細胞内のシグナル伝達機構の抑制剤が、インフルエンザウイルス感染の新たな治療法となる可能性が高い[11,18,21,22]。以前に私たちの教室では、Akt の活性化補助因子として yeast-two hybrid 法を用いて T cell leukemia 1 (TCL1)を同定した[23]。今回、私はこの TCL1 を基にした Akt 活性抑制ペプチド"*Akt-in*" (図 2,3)[24,25] を用い、インフルエンザウイルス感染に対する新たな治療法の開発に試み、宿主細胞中の PI3K-Akt シグナル伝達経路が、どのようにインフルエンザウイルス感染症を制御するかを検討した。

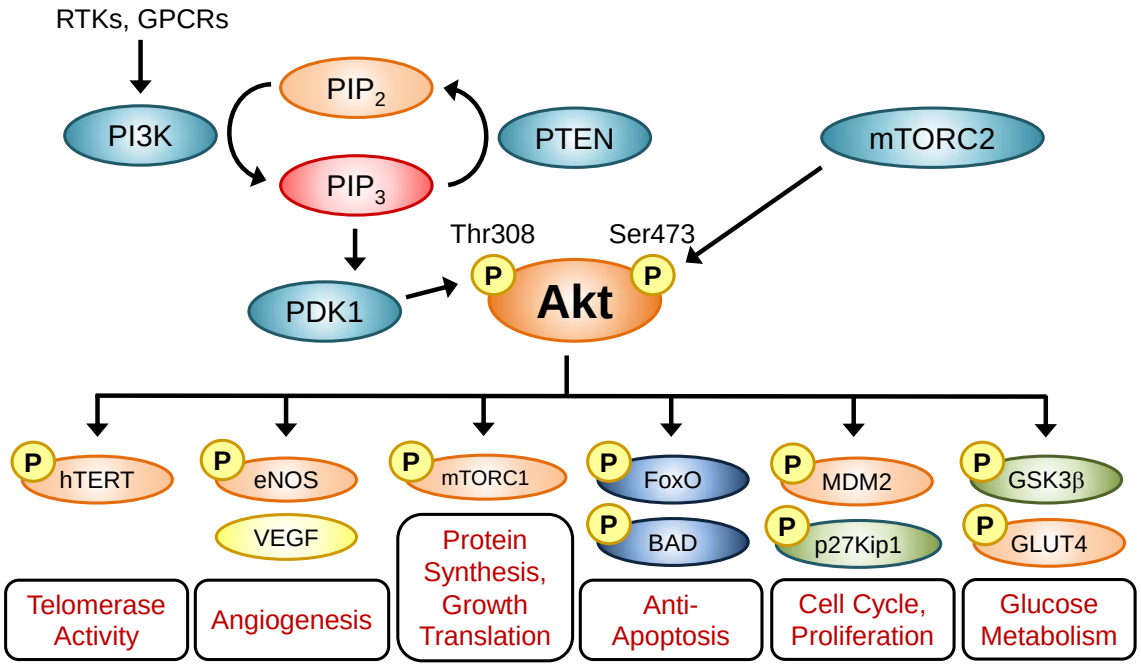

図 1. PI3K-Akt シグナル伝達経路の模式図

Akt は PI3K によって産生された PIP3 と結合し、PDK1 によって Akt の Thr308 がリン酸化される。また、mTORC2 によって、Akt の Ser473 がリン酸化される。下流に示した分子はそれぞれの機能を担う代表的な分子のみに注目し、掲載した。

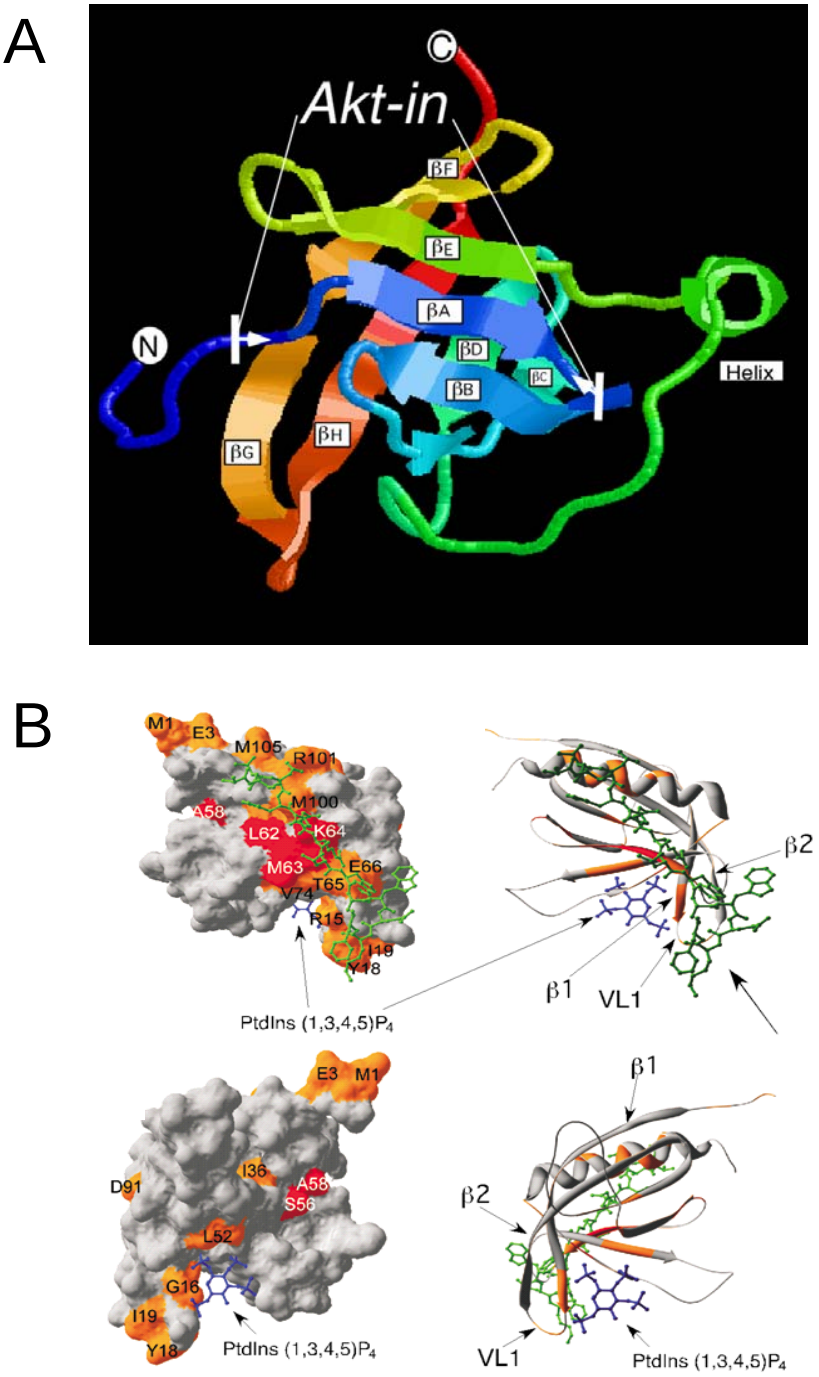

図 2. *Akt-in* のペプチド立体構造図と Akt に対する *Akt-in* の結合図

T-cell leukemia (TCL)1 のペプチド構造図(A)に示しているβA-シート鎖が今回実験で用いた”*Akt-in*”である。この TCL1 のβA-シート鎖は、Akt の PH ドメインのイノシタイドに結合しない反対側に結合し、Akt の分子構造を歪ませることにより、本来 Akt の活性化に必要な PIP3 に PH ドメインが結合することを減弱させ、Akt キナーゼの活性を抑制するという仕組みである(B)。

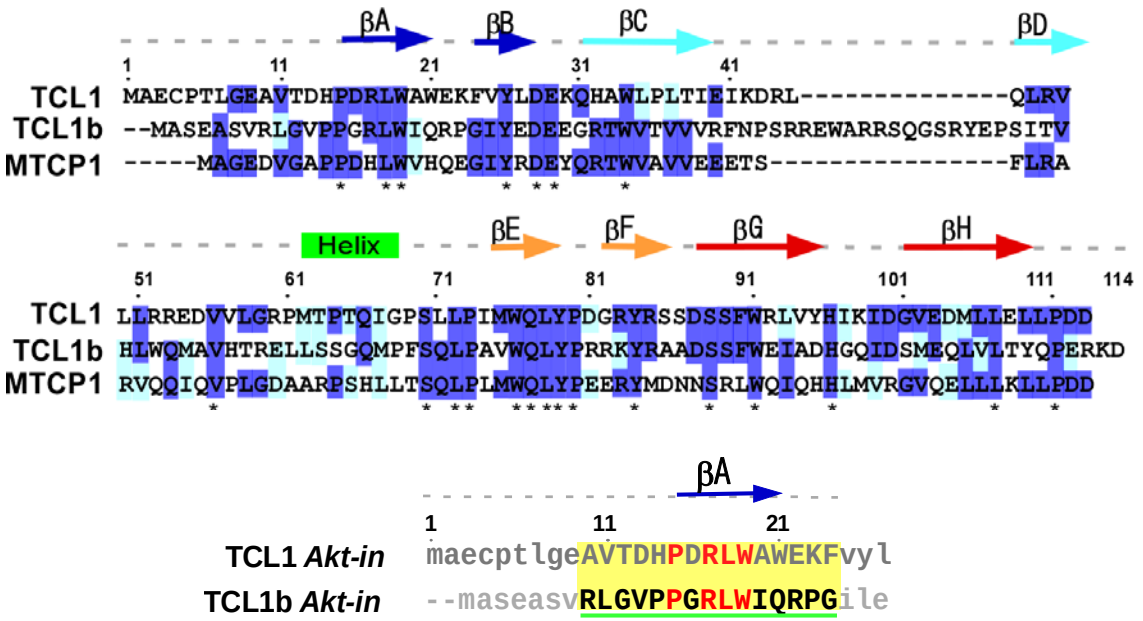

図 3. TCL1 ファミリー蛋白(TCL1, TCL1b, MTCP1)の相同性解析

これらの蛋白分子は構造上非常に良く似ており、特にβA シートの中心部分(PXXLW)の相同性が非常に高い。今回の実験では、下に示す TCL1-*Akt-in* と TCL1b-*Akt-in* の Akt 活性抑制ペプチドを使用した。

略語表

AGC	cAMP-dependent, cGMP-dependent, protein kinase C
APPL	adaptor protein containing PH domain, PTB domain, and Leucine zipper motif
ATCC	American Type Culture Collection
BPB	bromphenol blue
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco’s modified eagle medium
ECL	enhanced chemiluminescence
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FYVE	Fab1,YOTB,Vac1,EEA1
GSK	glycogen synthase kinase
HA	hemagglutinin
HRP	horseradish peroxidase
mAb	monoclonal antibody
MDCK	madin darby canine kidney
MEM	minimum essential media
2-ME	2-mercapto ethanol
MOI	multiplicity of infection
mTORC2	mammarian target of rapamycin complex 2
NF-κB	nuclear factor κB
NS1	non-structural protein 1
pAb	polyclonal antibody
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS(-)-0.15% Tween20
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PH	pleckstrin homology
Phafin2	PH and FYVE domain 2
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PR8	influenza A/Puerto-rico/8/34
PtdIns, PI	phosphatidylinositol

PVDF	polyvinylidene difluoride
TCL1	T-cell leukemia 1
TCL1-*Akt-in*	a TCL1-based Akt inhibitor
TCL1b-*Akt-in*	a TCL1b-based Akt inhibitor
Tris	tris (hydroxymetyl) aminomethane
TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3

材料と方法

1. 培養細胞株

A549 及び Madin Darby Canine Kidney (MDCK), NIH3T3 細胞株は、American Type Culture Collection(ATCC)より購入した。これらの細胞は、予め 56ºC で 30 分間加熱して非働化した 10%(v/v)ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma, 172012 もしくは Fetal Calf Serum, FCS, Sigma, 12133C と、100 mU/ml ペニシリン G、100 μg/ml ストレプトマイシン(Nakalai Tesque, 26253-84)を添加した RPMI-1640 培地 (Sigma, R8758)もしくは Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Sigma, D5796)を用いて、37 ºC、5% CO_2 で培養した。細胞の継代は 100% confluent になり次第、Phosphate-Buffered Saline (PBS)(-)と Trypsin 液(0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS(-))を用いて行った。

2. インフルエンザウイルス

この実験で用いた influenza A/Puerto-rico/8/34 (PR8) virus は北海道大学大学院獣医学研究科の喜田宏教授より供与された。

3. 抗体

Anti-phospho-Glycogen Synthase Kinase (GSK)3α/β (Ser21/9) polyclonal antibody (pAb) (#9331)、Anti-GSK3α/β (D75D3) XP rabbit monoclonal antibody (mAb) (#5676)、Anti-Akt rabbit pAb (#9272)、Anti-Akt mouse mAb (#2966)、Anti-phospho-Akt (Ser473) rabbit mAb (#4060)、Anti-phospho-Akt (Thr308) rabbit mAb (#2965) は Cell Signaling Technology より購入した。また、Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate (A11034), Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 conjugate (A11031), Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 conjugate (A21245) は Molecular Probes より購入した。Anti-α-tubulin mouse mAb (DM1A, T9026)は Sigma より、Anti-influenza A NS1 goat pAb (vC-20, sc-17596)は Santa Cruz より購入した。Anti-LC3 rabbit pAb (PM036)は MBL より、Anti-LAMP2 mouse mAb (ab25631)は Abcam より購入した。Influenza nucleoprotein mouse mAb (IC5-1B7)は BEI resources より入手した。

4. Akt 活性抑制ペプチド”*Akt-in*”

細胞侵入に必要なペプチド配列 TAT(YGRKKRRQRRR)を N 末端に付した下記のペプチド配列は医学生物学研究所(Medical & Biological Laboratories, MBL)に作成依頼を行い購入した。

TAT-FLAG (Control peptide): YGRKKRRQRRR-DYKDDDDK

TAT-TCL1-*Akt-in*: YGRKKRRQRRR-AVTDHPDRLWAWEKF [24]

TAT-TCL1b-*Akt-in*: YGRKKRRQRRR-RLGVPPGRLWIQRPG [25]

5. A549 細胞株へのインフルエンザウイルス感染と PI3K 抑制剤もしくは Akt 活性抑制ペプチド”*Akt-in*”の反応

1 x 10^5 個の A549 細胞株を 6-well plate に播き、PR8 ウイルスを Minimum Essential Media(MEM)を用いて multiplicity of infection (MOI) = 0.1 に合わせ、37 ºC、5% CO_2 で 1 時間感染させた。感染後、ウイルス上清を新しい培地(RPMI-1640-0.3% BSA-0.0005% trypsin)に交換し、図に表記された各抑制反応と時間で、37 ºC、5% CO_2 で培養して感染させた。

6. インフルエンザウイルス感染細胞の培養上清の回収と細胞溶解

PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞株の培養上清回収は、各図に表記された時間で感染後、上清を回収した。細胞溶解には、PR8 ウイルス感染 A549 細胞株を氷上に置き、氷冷した PBS(-)で 3 回洗浄した。そして、氷冷した蛋白分解酵素抑制剤(100 μM AEBSF, 5 μg/ml Leupeptin)と脱リン酸化酵素抑制剤(1 mM Na_3VO_4, 10mM NaF)を含む Modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1%(v/v) NP-40, 0.25%(v/v) Sodium deoxycholate)を 50 μl 用い、氷上で 30 分溶解を行った。溶解液を全て回収し、15000 回転、4ºC で 15 分遠心を行って上清を回収し、蛋白濃度測定 (Protein Assay, Bio-Rad)を行った。その後、5x sample buffer (250 mM Tris-HCl pH6.8, 10% (v/v) SDS, 50%(v/v) glycerol, 25%(v/v) 2-mercaptoethanol(ME), 1.25% Bromphenol blue(BPB))と Modified RIPA buffer を用いて、最終濃度 20 μg/10 μl となるように蛋白量を調整し、100ºC で 5 分間煮沸して 2 分間氷上で冷却した後、15000 回転、4ºC で 2 分間遠心を行って、試料とした。

7. プラークアッセイ

回収して置いた PR8 ウイルス感染細胞の培養上清を MEM-0.3% BSA を用いて、10 倍で系列希釈 (10^1~10^6)を行い、12-well plate に 100% confluent で播いた MDCK 細胞株に 37 ºC、5% CO_2 で 1 時間感染させた。その後、温めておいた PBS(-)で細胞を一度洗浄し、0.0005% trypsin を含む MEM-0.8% agarose を 500 μl/well で載せ 37 ºC、5% CO_2 で 48 時間培養した。感染した細胞の周囲に存在する細胞は、PR8 ウイルスの毒性により死に始め、穴(プラーク)が空くことから、そのプラークの数を測定し、培養細胞上清中のウイルス増殖濃度を評価した。

8. インフルエンザウイルス感染細胞の免疫共沈法

$3x10^6$ 個の A549 細胞株に PR8 ウイルスを MOI=1 で 18 時間感染させた後、氷冷した PBS(-)で 3 回洗浄を行った。そして、氷冷した 100 μM AEBSF, 5 μg/ml Leupeptin, 1 mM Na_3VO_4, 10mM NaF を含む Brij97 cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 0.875 %(v/v) Brij97, 0.125%(v/v) NP-40)を 1 ml を用いて、氷上で 30 分溶解を行った。溶解液を全て回収し、15000 回転、4ºC で 15 分遠心を行って上清を回収、30 μl の Sepharose CL-4B beads (50% slurry, GE healthcare)を添加し、4ºC で 30 分間、緩やかに回転させて溶解液洗浄を行った。洗浄後、12000 回転、4ºC で 30 秒間遠心を行って上清を回収し、その 800 μl を免疫共沈用に 1.5 ml tube に分け、30 μl の Protein A/G beads (50% slurry, GE healthcare)と、Anti-Akt mouse mAb (#2966, Cell Signaling) もしくは Mouse-IgG (X0931, Dako Cytomation)を添加して、4ºC で 1 時間、緩やかに回転させて免疫共沈を行った。共沈後、12000 回転、4ºC で 30 秒間遠心して beads を 4 度洗浄し、50 μl の 2x sample buffer (125 mM Tris-HCl pH6.8, 4% (v/v) SDS, 20%(v/v) glycerol, 10%(v/v) 2-ME, 0.5%(v/v) BPB) を加え、100ºC で 5 分間煮沸して 2 分間氷上で冷却した。その後、15000 回転、4ºC で 2 分間遠心を行って、試料とした。残りの細胞溶解液は内部コントロールとして、40 μl の溶解液に 10 ml の 5x sample buffer を添加し、100ºC で 5 分間煮沸して 2 分間氷上で冷却した。その後、15000 回転、4ºC で 2 分間遠心を行って、試料とした。

9. イムノブロッティング法

ポリアクリルアミドゲル(8%, 10%, 12%)と Running buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.35% SDS) を用いて、100-150V で 1.5 時間電気泳動を行って試料を分離し(SDS-PAGE)、メタノールにより親水処理後、Blotting buffer (30 mM Tris, 230 mM Glycine, 10%(v/v) メタノール)で平衡化した PolyVinylidene DiFluoride (PVDF)膜(Immobilon-P, Millipore)へ転写した。転写は、Blotting buffer で浸したペーパータオルとろ紙でゲルと PVDF 膜をはさみ、35V、1.5 時間の通電で行った。転写後、PVDF 膜を PBS(-)-0.15% Tween 20 (PBST)-5% skim-milk で 1~2 時間振盪し、任意の一次抗体と 4ºC で一晩反応させた。その後、PBST で 3 度洗浄(15 分→5 分→5 分)を行い、Horseradish Peroxidase(HRP)標識二次抗体(Anti-Rabbit IgG-HRP, Anti-mouse IgG-HRP (GE Healthcare), もしくは Anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz))と室温で 1 時間反応させ、再度 PBST で 3 度洗浄し、ECL 試薬(GE Healthcare)を用いて検出した。

10. 間接蛍光抗体染色法による顕微鏡観察

カバーガラスを敷いた 6-well plate に A549 細胞を $1x10^5$ 個ずつ播き、24 時間後に PBS(-)で一度洗浄し、ウイルスを添加する 30 分前に、図に表記した抑制剤を 1 ml の MEM-0.3% BSA に溶解して反応させた。反応後、培養上清を除いて PR8 ウイルスを MOI=0.1 となるように添加して 90 分間、37 ºC、5% CO_2 で培養して感染させた。感染細胞は 3.6%ホルムアルデヒド溶液を用いて室温で 15 分間固定し、次に 1% NP-40 に溶液を交換して、室温で 15 分間、細胞膜の穴開けを行った。そして、PBS(-)を用いて 4 度洗浄を行い、表記された一次抗体を添加して 4ºC で一晩反応させた。その後、PBS(-)で 3 度洗浄を行い、表記された二次抗体を室温で 30 分間、暗所で反応させた。そして 0.1 μg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) を含む PBS(-)に、室温で 15 分浸して核を染色し、PBS(-)で 3 度洗浄を行った。洗浄したカバーガラスは精製水でよく洗浄し、ろ紙上で乾燥させてから、Fluoromount/Plus (DBS)を用いてスライドガラス上に包埋した。各サンプルは共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview FV-1000, Olympus)にて、60 倍対物レンズを用いて油浸で観察を行った。

11. 培養上清中のサイトカイン測定

PR8 ウイルスを MOI=0.1 で感染させた A549 細胞培養上清を、IL-6 もしくは IL-8 測定用の ELISA MAX Deluxe Set (BioLegend)を用いて測定を行った。

12. 統計解析

検定には対応のある *t*-検定を用いて *p* 値を求め、統計学的な有意差を求めた(*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)。

13. 実験を実施するに当たり遵守した規定

以上の実験については、北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定、及び、北海道大学病原体等安全管理規定に従って行った。

実験結果

1. インフルエンザウイルスの感染が Akt 活性を促進する

PI3K-Akt ネットワークは、ウイルス感染の様々な段階で臨床的な兆候を示すことが報告されている[2,10,16]。以前に私たちは、インフルエンザ A ウイルスの NS1 が Akt と直接的に結合し、Akt の活性を高めることを報告した[10]。

インフルエンザウイルスの NS1 は、細胞の免疫反応に拮抗的に働くことや、ウイルス増殖に効果的に働くような宿主細胞の主なシグナル伝達分子、特に PI3K-Akt シグナル伝達の活性化によって、病原性に影響を及ぼすことが示されてきている[13,15,16]。これらの所見は、インフルエンザウイルスの感染時に、どのような機構で細胞が Akt のリン酸化とその基質である NS1 の度合を変化させるかが、実験の目的として非常に興味深い[10]。この目的を達成するため、まず、A549 細胞に PR8 ウイルスを感染させ、Akt と NS1 のリン酸化レベルの測定を行った。確かに、私たちが PR8 ウイルスを A549 に感染させた結果、Akt のリン酸化が有意に上昇し、それに伴って NS1 のリン酸化も上昇した(図 4A)。

NS1 はまた、PI3K の主なサブユニットである p85βとの結合を介して、活性化され、その結果として、Akt のリン酸化が起きることが知られている[14,26]。高相同性である NS1 チロシンモチーフが、p85βと結合することによって PI3K を活性化する役割を担っている[27]。NS1 が直接的に Akt に結合し、Akt 活性を高めるという所見は[10]、PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞株について、免疫共沈法を用いて解析することで、内在性の Akt と NS1 の直接的な結合により、Akt と NS1 のリン酸化が亢進することを証明した(図 4B)。

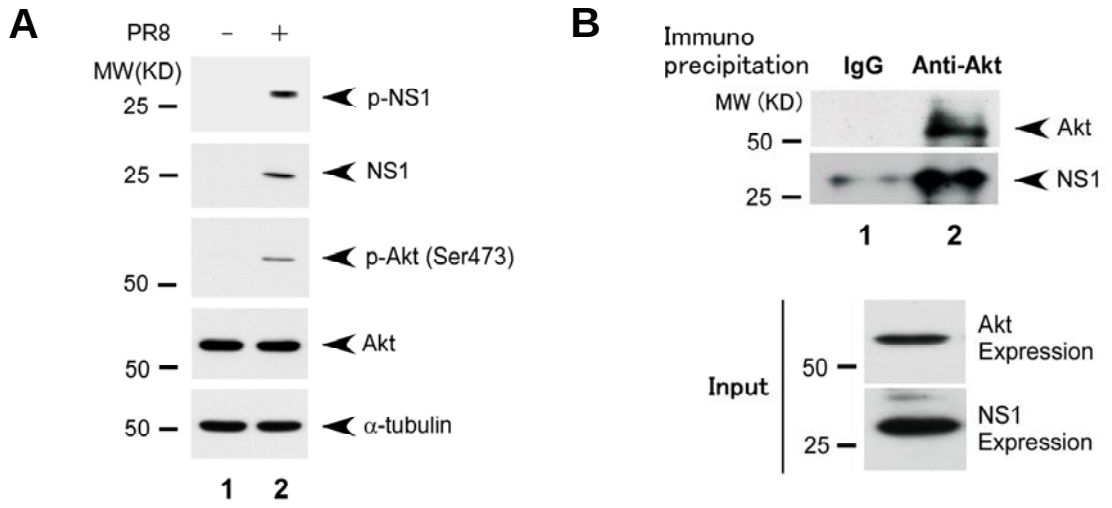

図 4. A549 細胞株への PR8 ウイルスの感染と、免疫共沈法による解析

(A) A549 細胞株に PR8 ウイルス(MOI=1)を感染させると Akt の活性が上昇し、NS1 のリン酸化も上昇する。(B) PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞株の内在性の Akt の免疫共沈法によって、Mouse IgG (IgG)では NS1 蛋白が共沈されず、Anti-Akt mouse mAb では NS1 蛋白が共沈された。内在性のコントロールは B の下段のブロットに示した。

2. Akt 活性抑制ペプチドによる Akt 活性の抑制がインフルエンザウイルスの増殖を効果的に抑える

ヒト宿主細胞内の因子の調節は、インフルエンザウイルス増殖の制御に非常に重要である [17]。PI3K-Akt シグナル伝達は、インフルエンザウイルス増殖の様々な段階で役割を担うことが知られている [16,19,20]。Akt シグナルは、抗アポトーシス反応、細胞増殖、蛋白翻訳、代謝、細胞周期など、多くの細胞反応を制御する。PI3K-Akt シグナル伝達経路は、ヒトのウイルス感染症において、有効な治療標的となり得る可能性が高い [14,18]。PR8 ウイルスの感染が、Akt とその基質でありウイルス蛋白である NS1 が活性化されるという事実は、どのようなメカニズムで Akt と NS1 がインフルエンザウイルスの感染と増殖に影響しているのか、非常に興味深い。TCL1 と Akt の蛋白複合体形成についての構造機能解析を基に、私たちは以前に TCL1 と TCL1b の構造を基本とした、TCL1-*Akt-in* (a TCL1-based Akt inhibitor encompassing the βA strand of TCL1)と、TCL1b-*Akt-in* (a TCL1b-based Akt inhibitor)を同定した(図 2,3)。TCL1-*Akt-in* と TCL1b-*Akt-in* は Akt 活性を抑制することで、癌細胞の増殖も抑制した [24,25,28]。そこで今回、このインフルエンザウイルスの感染と増殖にも重要とされる Akt の活性を抑制するために、これらの TCL1-*Akt-in* と TCL1b-*Akt-in* の Akt 活性抑制ペプチドが、新たなインフルエンザウイルス感染症の治療薬として有用かどうかについて検討した。

LY294002 はよく知られている PI3K の抑制剤であり、脂質キナーゼの ATP 結合サイトと競合的に働くことが知られている。LY294002 は効果的に Akt と NS1 のリン酸化を抑制した。PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞を TCL1-*Akt-in* (または TCL1b-*Akt-in*)で処理すると、これも効果的に Akt と NS1 のリン酸化を抑制した(図 5A)。この実験においては、Akt の発現量は LY294002, TCL1-*Akt-in* または TCL1b-*Akt-in* で処理により変化していないにも関わらず、NS1 の発現は減少しており、これが NS1 のリン酸化の減少は影響されている可能性が考えられた。さらに、PR8 ウイルスを感染させた A549 に、これらの PI3K 活性もしくは Akt 活性抑制剤を処理すると、効果的にウイルス増殖を抑制した(図 5B)。

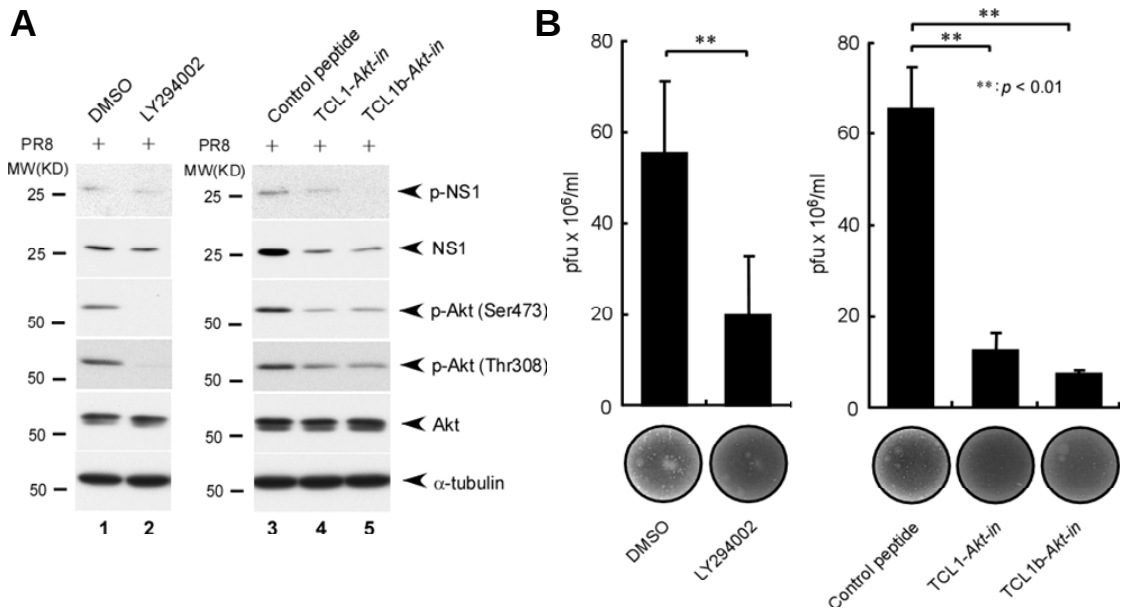

図 5. A549 細胞株における、PR8 ウイルスの感染と増殖に対する Akt 活性抑制剤による効果

A549 細胞株に PR8 ウイルスを MOI=0.1 で感染させ、その後 LY294002 (10 μM)、TCL1-*Akt-in* (50 μM)、または TCL1b-*Akt-in* (50 μM)を添加して、37 ºC、5% CO_2 で 72 時間培養し、イムノブロッティング(A)とプラークアッセイ(B)をした結果である。

3. TCL1 もしくは TCL1b 由来のペプチド抑制剤(*Akt-in*)による Akt 活性の抑制は、濃度および時間依存的なウイルス増殖抑制効果を示す

インフルエンザウイルスは、NS1 蛋白を介して、自然免疫と獲得免疫のどちらも回避できると考えられ、その間、ウイルスの NS1 は PI3K シグナル伝達経路を活性化し、ウイルス増殖に効果的な下流の宿主因子を活性化させることが知られている[14-16]。最近の研究では、細胞内のシグナル伝達経路の抑制剤が、インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス治療として期待されている[18,29,30]。これらの見解から、ウイルス感染宿主細胞の Akt 活性の抑制が、インフルエンザウイルス感染症に対する新たな治療標的分子になり得ると考え、検討を行った。

PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞に、ペプチド量を増加させた TCL1-*Akt-in* (図 6A)と、TCL1b-*Akt-in* (図 6B)で処理を行うと、ペプチドの濃度の上昇とともに、Akt と NS1 のリン酸化の減少が認められた。ここで注目すべきことは、*Akt-in* 処理を 50 μM まで上昇させても、内在性の Akt の発現は変化しなかったことである。しかしながら、NS1 の総蛋白量は、50 μM の TCL1-*Akt-in* もしくは TCL1b-*Akt-in* で処理を行うと減少し、この実験においても、NS1 のリン酸化の減少の一因となる可能性があった。また、この NS1 の発現減少は、Akt のアロステリックな抑制剤である MK2206 による処理においても証明されている[22]。次に、ペプチド処理の濃度の上昇に伴うウイルス増殖に対する効果の評価を行うため、プラークアッセイを行った。結果として、TCL1-*Akt-in* (図 7A)もしくは TCL1b-*Akt-in* (図 7B)のペプチド量の増加に伴い、ウイルス増殖が抑制される効果が得られた。

PI3K-Akt シグナル伝達経路は、インフルエンザウイルスの感染初期から後期の各段階で役割を担っているため、次に、TCL1-*Akt-in* もしくは TCL1b-*Akt-in* を用いて長期的な処理を行い、PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞の Akt と NS1 のリン酸化への影響について、時間依存的な検討を行った。PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞に、TCL1-*Akt-in* もしくは TCL1b-*Akt-in* を 24、48、72 時間処理すると、Akt の Ser473 と Thr308、NS1 のリン酸化が、時間経過とともに効果的に抑制されていた(図 8A)。また、感染宿主細胞におけるウイルス増殖について、プラークアッセイを行ったところ、Akt 活性が抑制されることによって、ウイルス増殖が時間経過とともに減少していた(図 8B)。これらの結果から、TCL1 と TCL1b 由来のペプチド抑制剤が、ウイルス結合や侵入の感染初期から炎症性サイトカイン(IL-6 や IL-8 など)の産生を誘導する感染後期を抑制する可能性が示唆された[16]。

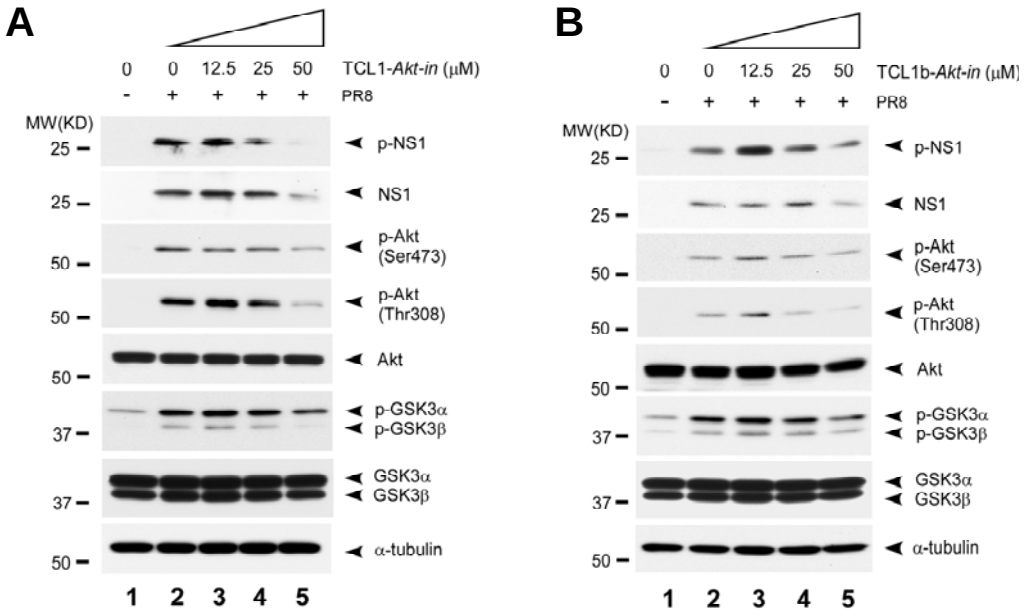

図 6. PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞株における、*Akt-in* の濃度依存的な Akt 活性抑制効果

TCL1-*Akt-in* (A)もしくは TCL1b-*Akt-in* (B)のペプチド濃度の上昇とともに、Akt と NS1 のリン酸化が減少した。

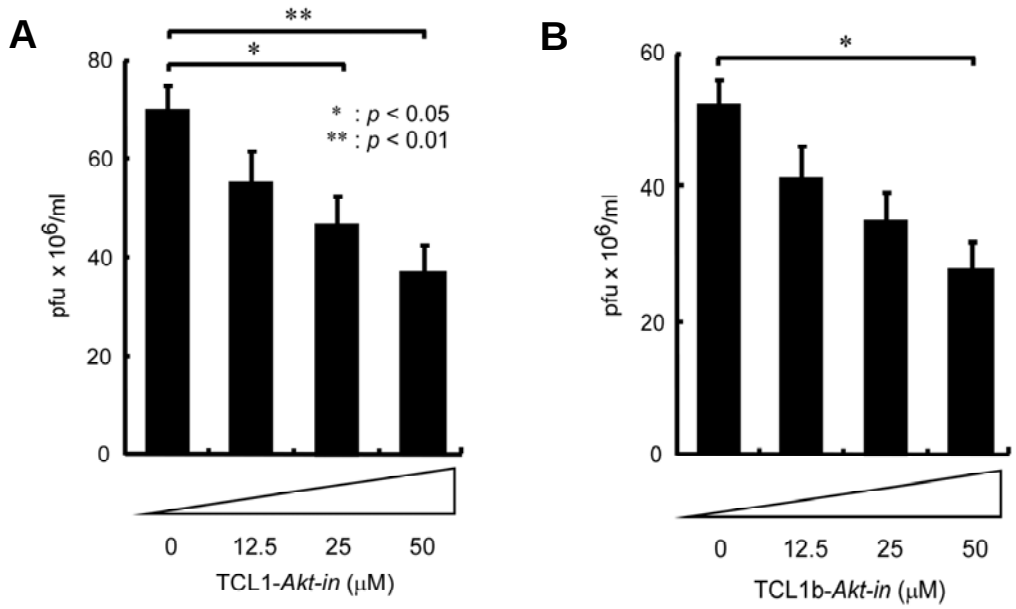

図 7. PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞株における、*Akt-in* の濃度依存的なウイルス増殖の抑制効果

TCL1-*Akt-in* (A)もしくは TCL1b-*Akt-in* (B)のペプチド濃度の上昇とともに、PR8 ウイルスの増殖が抑制された。

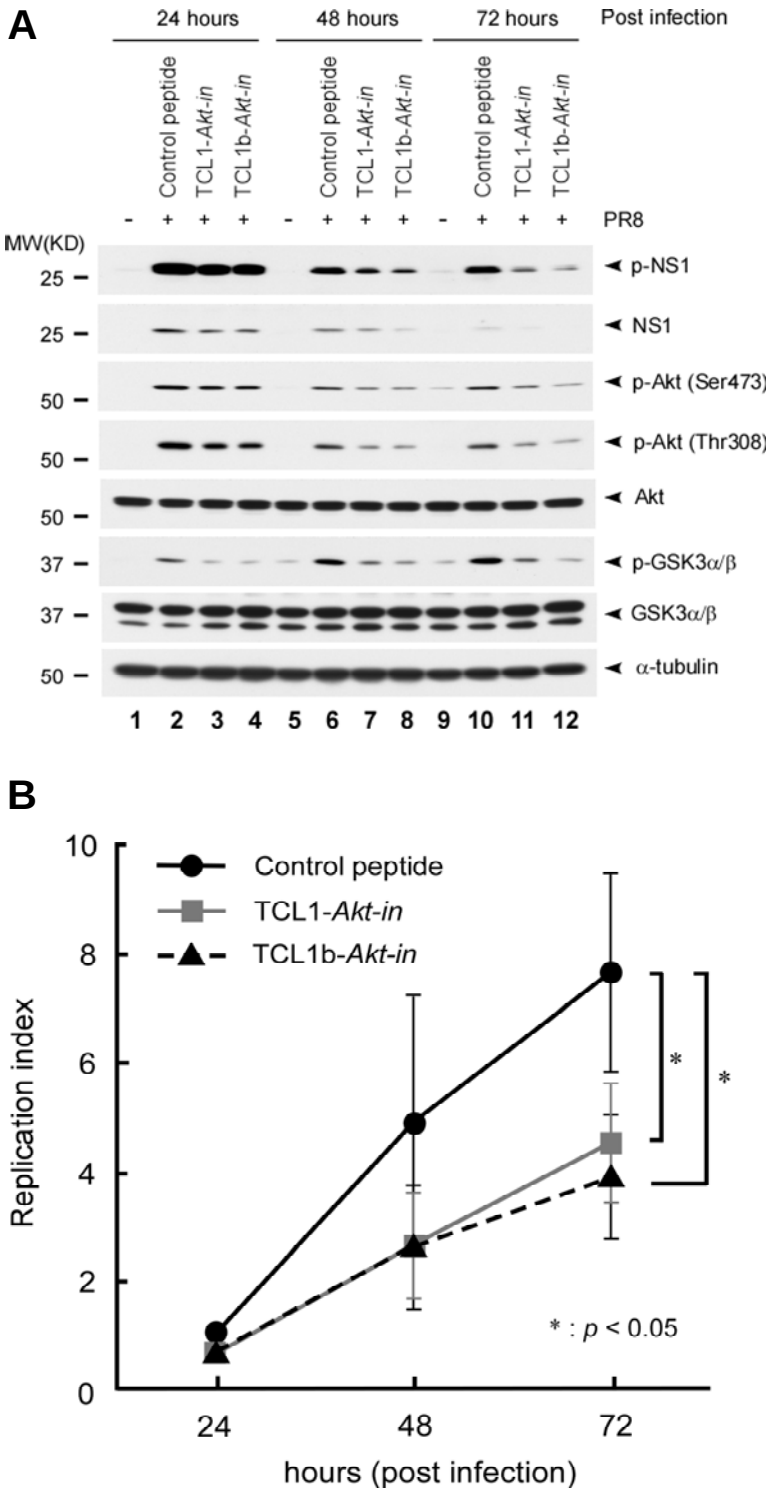

図 8. PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞株における、*Akt-in* の時間依存的な Akt と NS1 のリン酸化とウイルス増殖の抑制効果

TCL1-*Akt-in* もしくは TCL1b-*Akt-in* の処理時間(24, 48, 72 時間)の増加に伴い、Akt と NS1 のリン酸化(A)と、PR8 ウイルスの増殖(B)が抑制された。

4. Akt 活性抑制ペプチドは、宿主細胞のサイトカイン産生ではなく、インフルエンザウイルス自身の侵入と細胞内でのウイルス分解を抑止する

インフルエンザウイルスの感染は、IL-6 や IL-8 といった炎症性サイトカインの産生を促進するような反応を拡大させることが知られている[30,31]。そこで次に、PR8 を感染させた宿主細胞を TCL1-*Akt-in* または TCL1b-*Akt-in* で処理することで、この炎症反応を抑制ができるか検討した。

PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞株の培養上清中の IL-6 や IL-8 の濃度は、未感染の細胞株と比較して、約 2~3 倍に増加していた。これらの細胞を PI3K 抑制剤である LY294002 で処理すると、IL-6 もしくは IL-8 の産生が抑制された。この結果はウイルス感染における炎症性サイトカインの産生において、非常に重要な知見である[30,31]。しかしながら、TCL1-*Akt-in* または TCL1b-*Akt-in* で処理された A549 細胞株においては、IL-6 産生 (図 9A)または IL-8 産生 (図 9B)において、全く抑制効果が認められなかった。

この結果は、LY294002 処理とは異なり、TCL1-*Akt-in* または TCL1b-*Akt-in* 処理によるウイルス増殖の抑制は、IL-6 や IL-8 などによる炎症性サイトカインの産生の抑制が原因ではないことが示唆された。この相違は、LY294002 は有名な PI3K 活性の抑制剤であり、PI3K の下流にある Akt 以外にも、p70S6 kinase といった細胞増殖や蛋白翻訳を制御する分子も抑制することから、LY294002 による別の抑制効果であると考えられた[1,2,4]。対称的に *Akt-in* は、PI3K の主な下流分子である Akt の PtdIns の結合を特異的に抑制することから、Akt キナーゼに非常に強固な抑制効果をもたらしている[24]。

この TCL1-*Akt-in* または TCL1b-*Akt-in* 処理によるウイルス増殖の抑制の性質をさらに調べるため、濃度依存的もしくは時間依存的にウイルス増殖の抑制効果を示した、プラークアッセイの結果に基づき、そのメカニズムについて検討を行った。インフルエンザウイルスの増殖に極めて重要であり、RNA 翻訳やウイルスの増殖等を行うために、ウイルスゲノムをカプシドで包む等、様々な機能を持つ RNA 結合蛋白である Nucleoprotein を、ウイルス感染の同定マーカーとして用い[32]、間接蛍光抗体法を用いて細胞を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行った。図 4A のイムノブロッティング結果を再現するように、PR8 ウイルスを感染させた細胞において、Akt のリン酸化が著しく強くなり、抗 Nucleoprotein 抗体と抗リン酸化 Akt 抗体が、どちらも陽性に染色されていた(図 10A)。しかしながら、TCL1-*Akt-in* または TCL1b-*Akt-in* 処理によって、Akt のリン酸化の減少に伴い、Nucleoprotein の発現が減少し、ウイルスの結合と侵入が減少することが示唆された(図

10.

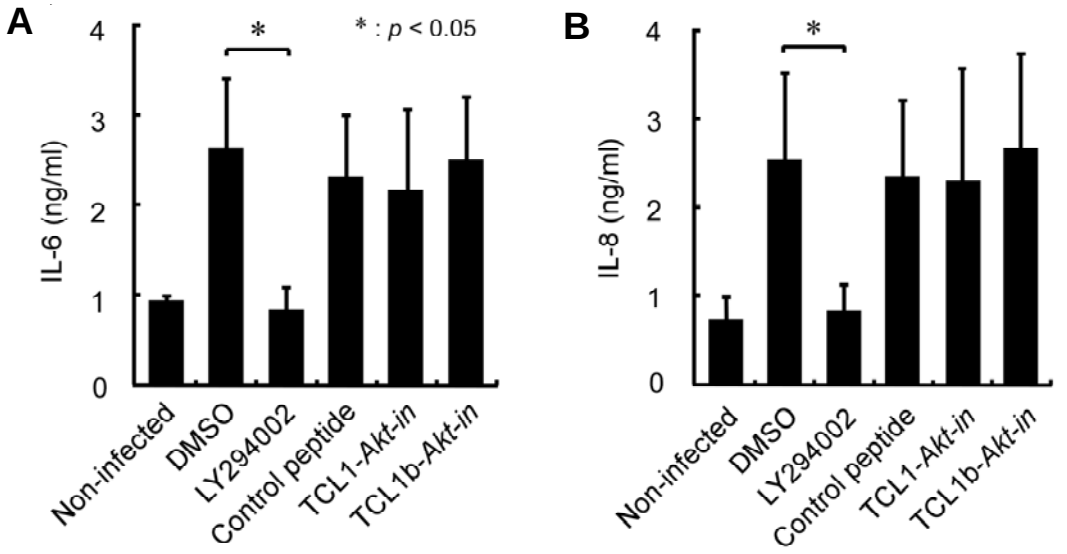

図 9. PR8 ウイルスを感染させ、表記された抑制剤を加えて 72 時間培養した A549 細胞株の培養上清中の IL-6(A)と IL-8(B)の測定結果

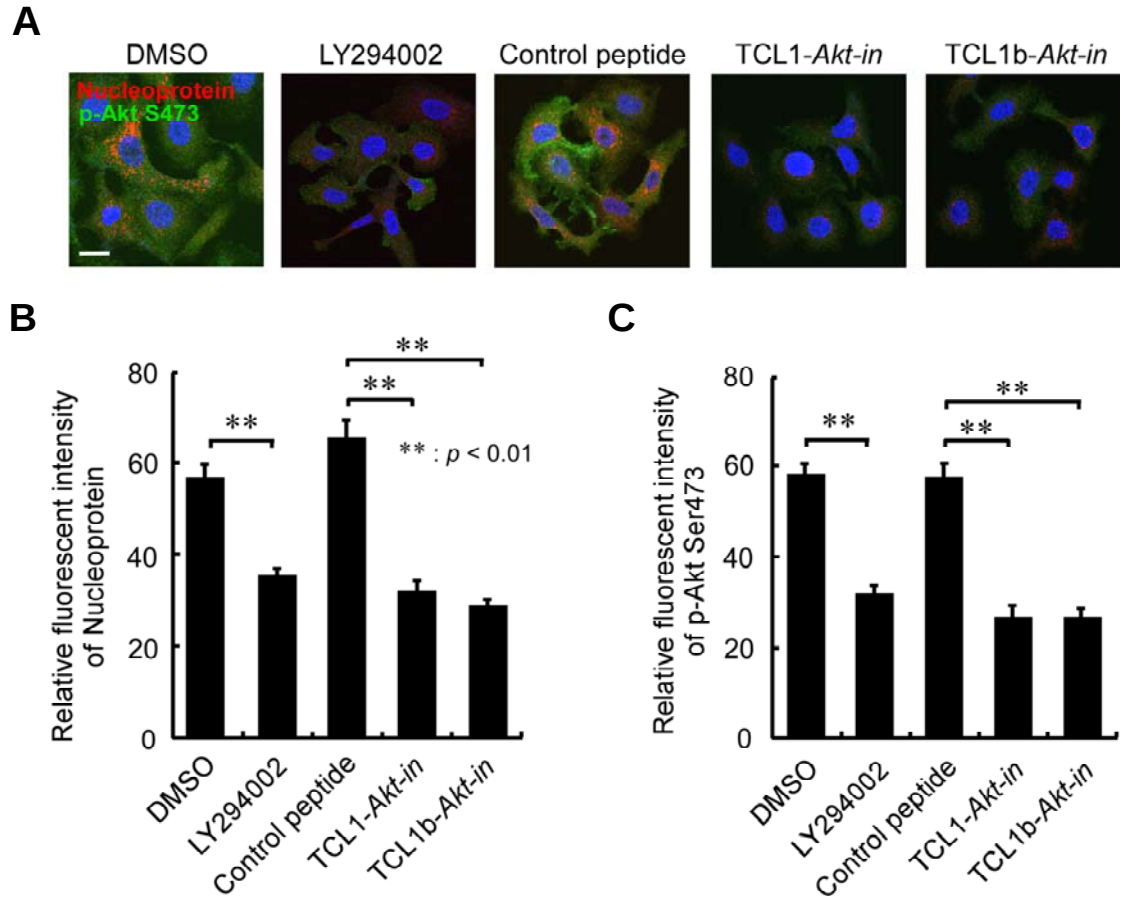

図 10. PR8 ウイルスを感染させ、表記された抑制剤を 90 分間加えて培養した A549 細胞株について、Nucleoprotein(赤)とリン酸化 Akt (緑)で染色し、共

焦点レーザー顕微鏡で観察した写真(A)と各蛍光強度の平均値(B,C)。

また、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症において、Akt が誘導に関与するオートファジーにより、病原性が制御されるという報告がなされた[33]。オートファジーは、元々は酵母において、飢餓状態になった細胞のアミノ酸リサイクル機構として発見された。最近では、哺乳類細胞においても、病原性微生物の除去や細胞内蛋白質の品質管理機構としてのオートファジーの生理学的な機能が注目されている(図 11)。私たちは最近、Akt が Phafin2 と結合してリソソームへ移動することにより、オートファジーが誘導されるという報告をした(図 12)[8,9]。そこで次に、Akt 活性抑制ペプチド*"Akt-in"*によるインフルエンザウイルス増殖の減少に、オートファジーが関与するか検討を行った。

実験は 1 度しか行っていないが、PR8 ウイルスを感染させた A549 細胞における LC3 の発現を、イムノブロッティングを用いて解析を行った結果、感染前と比較して感染後において、LC3-I から LC3-II への変化が高くなり、オートファジーが誘導されていた(図 13A)。また同様に、共焦点レーザー顕微鏡で、LC3 の局在を見た結果、感染後において、LC3 の局在がリソソーム上に局在し、オートファジーが誘導されていた(図 13A)。次に、これらと同様のインフルエンザウイルスの感染実験において、PI3K 抑制剤である LY294002 や Akt 活性抑制ペプチド*"Akt-in"*を用いて、PI3K-Akt シグナル伝達経路を抑制し、LC3 の発現をイムノブロッティングで解析した。その結果、PI3K もしくは Akt の活性が抑制されると、LC3-II の発現が強くなり、オートファジーがより強く誘導される傾向が認められた(図 13B)。

これらの結果から、宿主細胞中の PI3K-Akt シグナル伝達経路は、インフルエンザウイルスの NS1 によって活性化を受けるため[10,14,26,27]、PR8 を感染させた A549 宿主細胞において、インフルエンザウイルスの NS1 の発現を減少させ、リン酸化 Akt の活性を抑制させることが、ウイルスの宿主細胞への結合や侵入、さらには細胞内でのウイルス分解を亢進する主な原因であると考えられた。

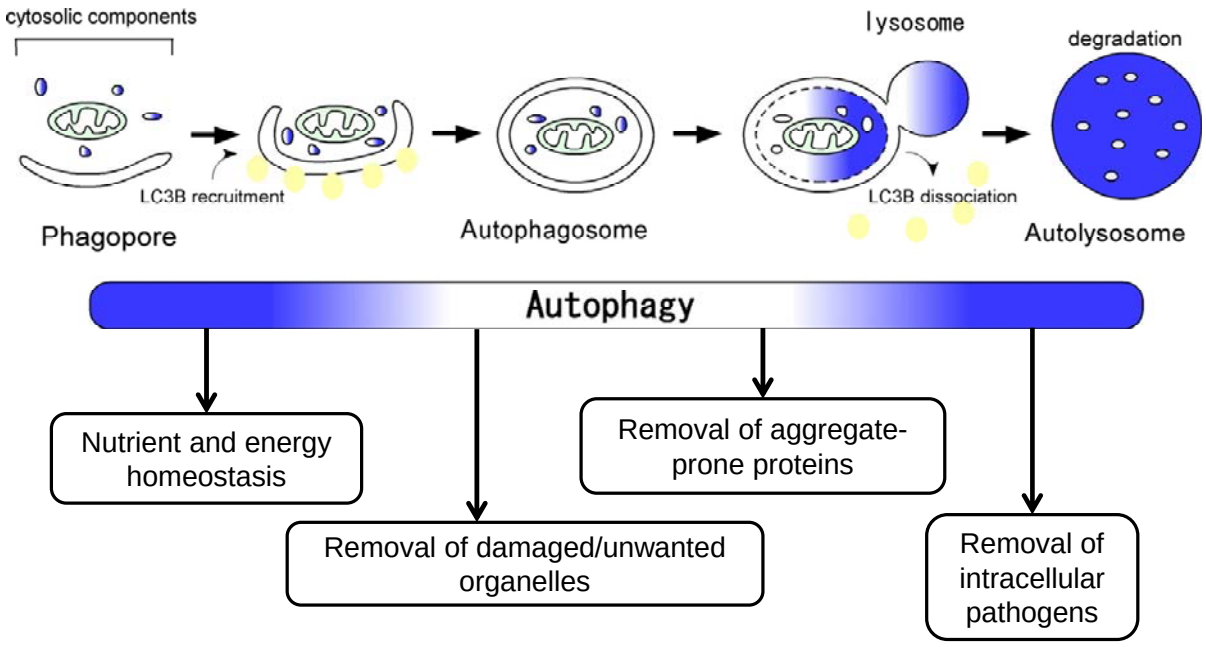

図 11．哺乳類細胞におけるオートファジーの生理学的機能

オートファジーは元々酵母において、飢餓状態に陥った細胞が、図に示したような、リソソームを用いて細胞内蛋白質を分解し、細胞生存のためにアミノ酸のリサイクルを行う仕組みである。最近では、哺乳類細胞におけるオートファジーの生理学的な機能が注目されてきており、解析が進んでいる。

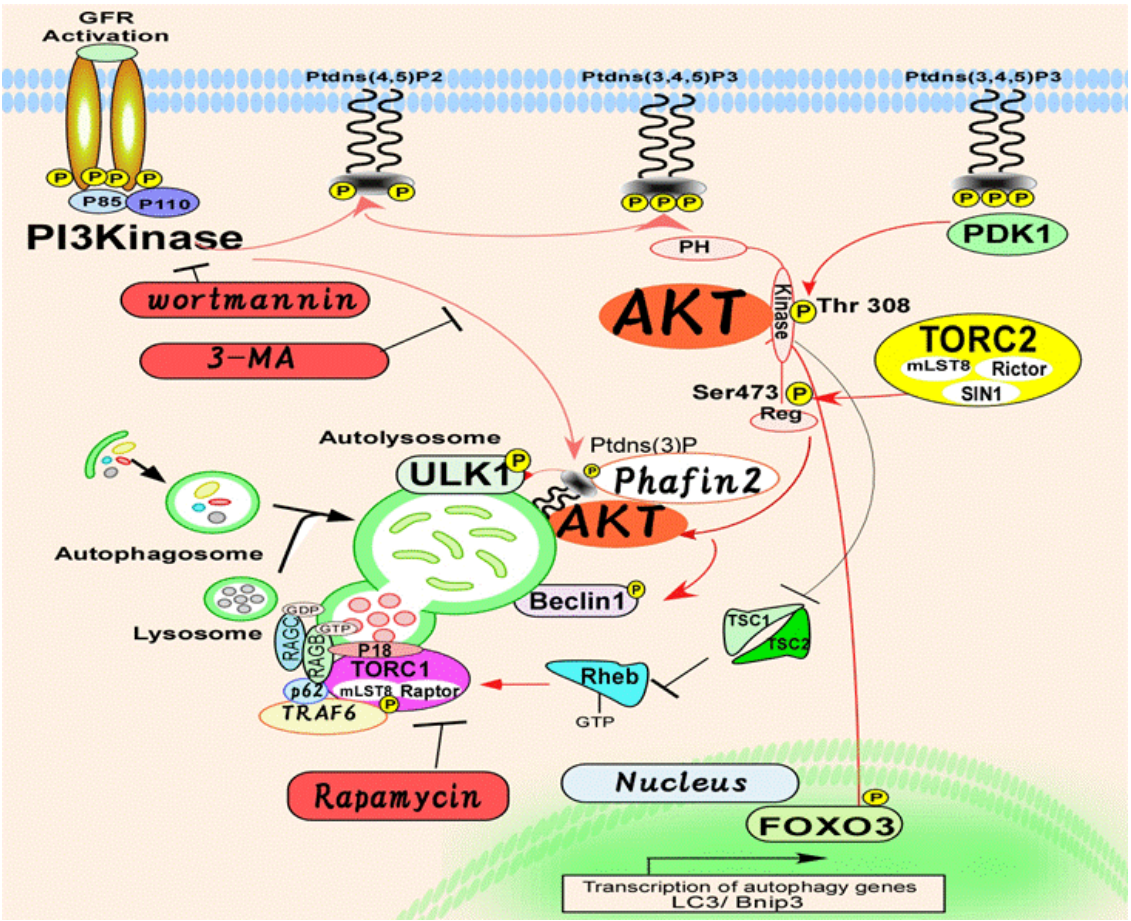

図 12．オートファジーと PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達経路との関係

細胞内のアミノ酸の枯渇や、Rapamycin による抑制により、リソソーム上に局在する mTORC1 の活性化が、オートファジーを制御している。私たちは、Akt が Phafin2 と結合し、PI3P 依存的にリソソームへ移動して、オートファジーを誘導することを報告した [8]。このリソソームに局在する Akt は、ULK1 や Beclin1 をリン酸化し、オートファジーを誘導するという報告もなされている [9]。これらの結果から、mTORC1 と同様、Akt がオートファジーを制御する因子として、リソソームに局在していることが示唆される。

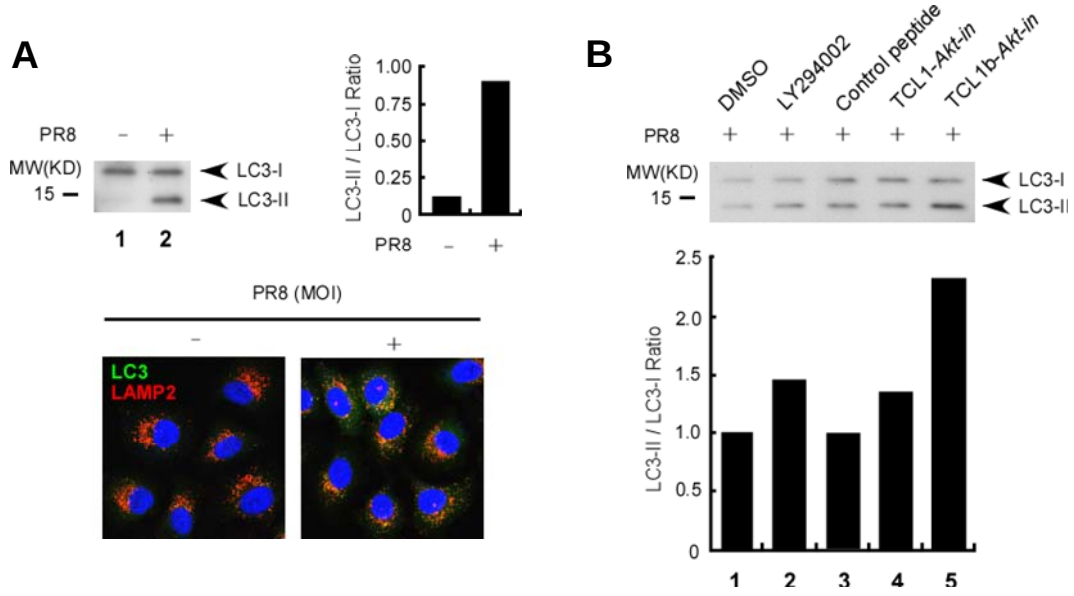

図 13. PR8 ウイルス感染後と、その感染細胞株に PI3K-Akt シグナル伝達経路の抑制剤を用いた後のオートファジー誘導への影響

(A) PR8 ウイルスを A549 細胞株に MOI=0.1 で感染させ、72 時間培養した後の LC3 の発現をイムノブロッティングもしくは共焦点レーザー顕微鏡で解析した結果。(B) (A)と同様の感染条件で、72 時間培養時に PI3K 抑制剤もしくは Akt 活性抑制ペプチドを加えた A549 細胞株における、LC3 の発現と LC3-II/LC3-I の比率。

考察

インフルエンザウイルス感染におけるウイルス増殖には、PI3K-Akt シグナル伝達経路に代表される、様々な宿主由来の因子が必要となる[29,30]。従って、Akt 活性の抑制剤は、ヒトのウイルス感染症の治療の標的として、非常に興味深く、既に Akt の活性抑制剤の開発がいくつか試みられている[2]。私たちが以前に開発した Akt 活性化補助因子 TCL1 の構造に基づいて同定した"*Akt-in*"は、Akt と特異的に結合し、Akt キナーゼ活性を抑制する[24,28]。本研究で用いた TCL1 もしくは TCL1b を基にした抑制剤である"*Akt-in*"は、PR8 ウイルス感染宿主細胞の Akt 活性を抑制し、その結果として、炎症性サイトカインの産生を減少させることなく、ウイルスの増殖を抑制していた(図 14)。これらの結果は、アロステリックな Akt 活性抑制剤である MK2206 が、NS1 の発現を減少させ、H1N1 型のインフルエンザウイルスの感染を抑制するという最近の報告と一致する[22]。私は Akt 活性抑制ペプチド"*Akt-in*"が、グリコーゲン合成酵素をリン酸化して不活化する酵素であり、Akt の基質として報告される GSK3βのリン酸化を減少させる結果を示した(図 6A,B; 図 8A)。近年、この GSK3 がインフルエンザウイルスの侵入と増殖に関与する制御因子であることが報告されている[14,17,29]。この報告では、インフルエンザウイルスは hemagglutinin (HA)を利用し、低 pH 依存性エンドソームを介して感染が進むことから、WSN-pseudotyped particle entry assay を行い、GSK3βの small interfering RNA (siRNA)と低分子抑制剤が、インフルエンザウイルスの侵入と増殖を抑制すると考えられている[17]。また、PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達経路は、オートファジーの誘導に関与しており、特に、自然免疫によって制御されるウイルス感染症において、非常に重要な役割を果たしている。実際に、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症において、Akt が誘導に関与するオートファジーが、その病原性に影響を与えることが示された[8,33]。今回我々が用いた PI3K 抑制剤や Akt 活性抑制ペプチドにより、オートファジーが誘導される傾向が認められたことから、Akt 活性の抑制によって誘導されたオートファジーによって、細胞内におけるウイルス分解が亢進している可能性もあると考えている。

H5N1 型や H1N1 型鳥インフルエンザウイルスが誘導する疾患は、世界的な健康問題として取り上げられ、大多数の国で既に出現してきている。様々な細胞内シグナル伝達経路は、インフルエンザウイルスの増殖に寄与している[17,18,21,30]。その中で PI3K-Akt シグナル伝達系は、ヒトの癌の遺伝子変化に

よる腫瘍形成にも直接的に関与するほか、ウイルス感染症の感染初期から感染後期の各段階においても、臨床的な兆候を示す[2,16,19]。この PI3K-Akt シグナル伝達系を効率的に活性化させることにより、恐らくウイルス感染細胞が自ら死ぬことを防いでいる可能性が考えられる。従って、抗アポトーシス性に働く PI3K-Akt シグナル伝達経路は、様々な宿主細胞同士の感染過程の段階を制御する経路となる可能性がある[12,22]。

現在存在する抗ウイルス製剤は、ウイルス粒子を標的としている。しかしながら、*Akt-in* による宿主細胞の Akt 活性の抑制は、免疫反応に影響を与えることなく、インフルエンザウイルスの侵入と増殖に関与するシグナル伝達分子である GSK3 の抑制する可能性と、Akt が誘導に関与したオートファジーによるウイルス分解する可能性があった。従って、ウイルス粒子を標的とした抗ウイルス製剤が効果を示さない症例において、Akt 特異的な活性抑制ペプチドを使用すること（例えば、ネブライザで宿主に吸入させるなど）は、ヒトの命を脅かす疾患であるインフルエンザウイルス感染症において、より有用な効果が得られることが示唆された。

本研究では、細胞内の生存因子である Akt は、インフルエンザウイルス感染症に際してその活性が上昇、その活性を制御することにより宿主細胞での侵入や増殖を制御できることを示した。最近、世界的な伝搬が危惧されているエボラ出血熱ウイルスやデング熱ウイルスなどの現在有効な治療法の模索中である RNA ウイルス感染症においても、インフルエンザウイルスと同様、この *Akt-in* をはじめとする Akt 阻害剤を用いて宿主細胞の Akt 活性をコントロールすることが新たな補助治療法となる可能性を秘めている。従来、抗がん剤としての開発が進んできた、Akt に特異的な抑制剤のウイルス感染制御などへの適応の拡大などに関する新しい研究の展開が、さらに促進されることが望まれる。

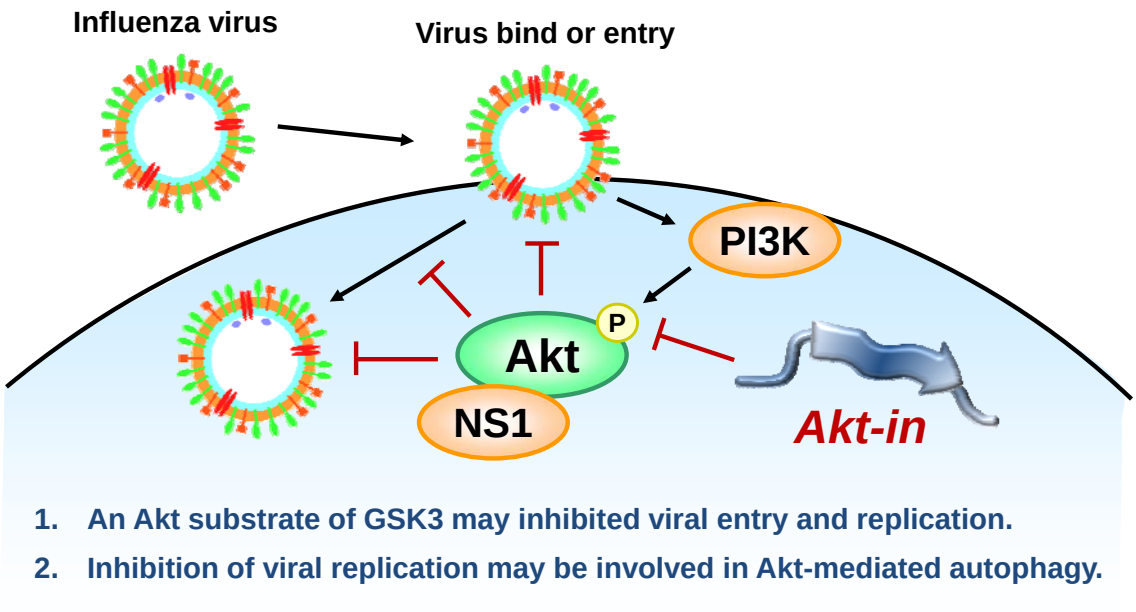

図 14. Akt 活性抑制ペプチド”*Akt-in*”による、インフルエンザウイルス感染症の抑制効果の想像図

感染初期において Akt の活性が抑制されると、Akt のリン酸化基質として報告のある GSK3 が抑制され、インフルエンザウイルスの細胞内での増殖が抑制されることが推測される。また、Akt の活性化によって抑制されることが知られている、オートファジーの誘導の促進も、感染宿主細胞におけるウイルスの増殖の抑制に寄与している可能性も推測される。

総括および結論

本研究では、インフルエンザウイルスを感染させた宿主細胞に対し、TCL1 由来もしくは TCL1b 由来の Akt 活性抑制ペプチド”*Akt-in*”を用いることにより、Akt の活性とインフルエンザウイルスの NS1 の発現を抑制し、また、炎症性サイトカインの産生に影響を及ぼすことなく、ウイルスの侵入と増殖を抑制する結果を得ることができた。

謝辞

本研究の遂行におきまして、終始適切なご指導、ご討論を賜り、本論文作成にあたり、惜しみないご助言をいただきました北海道大学遺伝子病制御研究所癌生物分野、野口昌幸 教授に深く感謝いたします。

また、実験の基礎から丁寧にご指導いただき、本研究に多大なご協力を賜りました、北海道大学遺伝子病制御研究所癌生物分野、水津太 講師に心より感謝いたします。

本論文を審査していただきました、北海道大学遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学分野 村上正晃 教授、RNA 生体機能分野 廣瀬哲郎 教授、幹細胞生物学分野 近藤亨 教授に深く感謝いたします。

研究生活のあらゆる面でお世話になりました、北海道大学遺伝子病制御研究所癌生物分野の皆様に厚く御礼申し上げます。

2015 年 9 月

引用文献

1. Brazil, D. P., Yang, Z. Z. & Hemmings, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 233-242 (2004).
2. Noguchi, M., Obata, T. & Suizu, F. Regulation of the PI3K-Akt network: current status and a promise for the treatment of human diseases. *Current Signal Transduction Therapy* **3**, 138-151 (2008).
3. Engelman, J. A., Luo, J. & Cantley, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 606-619 (2006).
4. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657 (2002).
5. Stephens, L. *et al.* Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**, 710-714 (1998).
6. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101 (2005).
7. Suizu, F. *et al.* The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev. Cell* **17**, 800-810 (2009).
8. Matsuda-Lennikov, M. *et al.* Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy. *PLoS One* **9**, e79795 (2014).
9. Noguchi, M., Hirata, N. & Suizu, F. The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1846**, 342-352 (2014).
10. Matsuda, M. *et al.* Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**, 312-317 (2010).
11. Murray, J. L. *et al.* Inhibition of influenza A virus replication by antagonism of a PI3K-AKT-mTOR pathway member identified by gene-trap insertional mutagenesis. *Antivir. Chem. Chemother.* **22**, 205-215 (2012).
12. Medina, R. A. & Garcia-Sastre, A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 590-603 (2011).

13. Jackson, D., Hossain, M. J., Hickman, D., Perez, D. R. & Lamb, R. A. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 4381-4386 (2008).
14. Ehrhardt, C. *et al.* Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell. Microbiol.* **8**, 1336-1348 (2006).
15. Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J. & Jackson, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **89**, 2359-2376 (2008).
16. Ehrhardt, C. & Ludwig, S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell. Microbiol.* **11**, 863-871 (2009).
17. Konig, R. *et al.* Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **463**, 813-817 (2010).
18. Planz, O. Development of cellular signaling pathway inhibitors as new antivirals against influenza. *Antiviral Res.* **98**, 457-468 (2013).
19. Shin, Y. K., Liu, Q., Tikoo, S. K., Babiuk, L. A. & Zhou, Y. Effect of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on influenza A virus propagation. *J. Gen. Virol.* **88**, 942-950 (2007).
20. Zhirnov, O. P. & Klenk, H. D. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis* **12**, 1419-1432 (2007).
21. Ludwig, S. Targeting cell signalling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 1-4 (2009).
22. Denisova, O. V. *et al.* Akt inhibitor MK2206 prevents influenza pH1N1 virus infection in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 3689-3696 (2014).
23. Laine, J., Kunstle, G., Obata, T., Sha, M. & Noguchi, M. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol. Cell* **6**, 395-407 (2000).
24. Hiromura, M. *et al.* Inhibition of Akt kinase activity by a peptide spanning the betaA strand of the proto-oncogene TCL1. *J. Biol. Chem.* **279**, 53407-53418 (2004).
25. Hashimoto, M. *et al.* Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase

co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo. *Oncogenesis* **2**, e70 (2013).

26. Li, Y., Anderson, D. H., Liu, Q. & Zhou, Y. Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85beta, but not the p85alpha, subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 23397-23409 (2008).
27. Hale, B. G., Batty, I. H., Downes, C. P. & Randall, R. E. Binding of influenza A virus NS1 protein to the inter-SH2 domain of p85 suggests a novel mechanism for phosphoinositide 3-kinase activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 1372-1380 (2008).
28. Noguchi, M., Ropars, V., Roumestand, C. & Suizu, F. Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB J.* **21**, 2273-2284 (2007).
29. Muller, K. H. *et al.* Emerging cellular targets for influenza antiviral agents. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 89-99 (2012).
30. Zhang, L., Katz, J. M., Gwinn, M., Dowling, N. F. & Khoury, M. J. Systems-based candidate genes for human response to influenza infection. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 1148-1157 (2009).
31. Matsukura, S., Kokubu, F., Noda, H., Tokunaga, H. & Adachi, M. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *J. Allergy Clin. Immunol.* **98**, 1080-1087 (1996).Julkunen, I. *et al.* Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**, 171-180 (2001).Guillot, L. *et al.* Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J. Biol. Chem.* **280**, 5571-5580 (2005).
32. Portela, A. & Digard, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* **83**, 723-734 (2002).
33. Sun, Y. *et al.* Inhibition of autophagy ameliorates acute lung injury caused by avian influenza A H5N1 infection. *Sci. Signal.* **5**, ra16 (2012).