

## 学内グラント 報告書

## 平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>)  
欠損マウスにおけるウイルス感染防御

研究代表者 中野 貴成 (医学部 生化学)

研究分担者 松井 政則<sup>1)</sup>, 小谷 典弘<sup>2)</sup>

## 緒言

脂質ラフトはコレステロールに富んだドメインをなし、細胞膜上のタンパク質の不均一性および機能的集合に寄与している。特定のタンパク質は脂質ラフトへ輸送され、そこに係留される。脂質ラフトに集積したタンパク質はシグナル伝達など細胞の重要な機能に関わる<sup>1)</sup>。さらに膜の陥入や出芽を介して膜の代謝にも寄与している<sup>2)</sup>。また脂質ラフトはウイルスタンパクの集積に利用され、その後ウイルス粒子は脂質ラフトを介して細胞から出芽する<sup>3)</sup>。

脂質ラフトを介した膜の出入り、そしてその流動性にはクラスリンなどのタンパク成分だけでなく、膜成分の組成の変化も寄与していると考えられている。ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> はリン脂質をリゾリン脂質に酸化することで膜の構造を変化させる (図1)。それが、ウイルスが利用するラフトの fission に利用されている可能性がある。実際に人工膜においてホスホリパーゼ A<sub>2</sub> は脂質ラフトの出芽を促進する<sup>4)</sup>。

我々は小腸における細胞外酵素の食後ダイナミクスについて検討したとき、ミセルを形成する成分の1つであるリゾリン脂質によってラフトに係留されているアルカリホスファターゼが消失することを認めた<sup>5)</sup> (図2)。次いで腸上皮培養モデルを用いて、この消失には脂質ラフトが必要であり、また内因性のホスホリパーゼ A<sub>2</sub> を活性化することで、その遊離を促進できることを確かめた<sup>6)</sup>。

このようにホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の活性は脂質ラフトの fission に関係していることから、その障害はヒトに感染するウイルスの生活環の1つである細胞からの出芽が抑制されるかもしれない。これらの解明はウイルス感染メカニズムにおける更なる分子生物学的理解

と、新たな治療戦略を提示しうる可能性がある。そこで本研究では、*in vitro* および *in vivo* においてホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性を修飾した場合のウイルス感染・増殖効率の検討を試みた。

## 材料と方法

## インフルエンザウイルス

A/Aichi H3N2 インフルエンザウイルス (北海道大学獣医学部微生物学 喜田宏先生より) は孵化鶏卵培養法によって増殖させ、以下のウイルス感染実験に供試した。

*In vitro* ウイルス感染阻止アッセイ

MDCK にインフルエンザウイルスを 0.1 M.O.I (multiplicity of infection) で 1 時間感染させ、細胞を洗浄後 3 日間 2 μg/ml のアセチル化トリプシンを含む培養液で培養した。培養液を回収し、ウイルス力価を測定した。

カルシウム非依存ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> β 欠損マウス

カルシウム非依存ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> β 欠損マウス (iPLA<sub>2</sub> β<sup>-/-</sup>) は大阪大学大学院医学系研究科遺伝医学講座遺伝子学 辻本賀英先生より供与いただいた<sup>7)</sup>。埼玉医大動物施設内で iPLA<sub>2</sub> β<sup>+/-</sup> 同士によるメーティングで iPLA<sub>2</sub> β<sup>-/-</sup>, iPLA<sub>2</sub> β<sup>+/+</sup> の個体を得た。遺伝子型は、ゲノム DNA をテンプレートとして、特異的プライマーを用いた PCR により確認した。

*In vivo* ウイルス感染実験

ケタミン麻酔下で、カルシウム非依存ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 欠損マウスもしくはその野生株に、1 匹あたり 1 × 10<sup>4</sup> の 50% 培養細胞感染濃度 (TCID<sub>50</sub>) のウイルスを鼻腔より感染させた<sup>8)</sup>。感染より 5 日後に肺組織を採取し、1 ml の PBS でホモジナイズして、その遠心上清をウイルス力価試験に供試した。

## インフルエンザウイルス力価試験

肺ホモジネートおよび培養上清の TCID<sub>50</sub> は Matsui らの方法<sup>9)</sup> に従い実施した。すなわち、肺ホモジネートの 10 倍希釈列を U 底の 96-well プレート内に

1) 医学部 微生物学

2) 医学部 生化学

調製し, そこに  $2.5 \times 10^4$  cells/well の細胞を播種した. 一日後にアセチル化トリプシンを含む培養液に交換し, さらに4日間培養した. 0.5%ニワトリ赤血球溶液を各wellに50  $\mu$ lずつ加え, 凝集パターンを観察した. ウイルス力価はTCID<sub>50</sub>により求めた.

#### 脂質ラフト染色

マウスより得た脾細胞の脂質ラフト Vybrant® Alexa Fluor® 488 Lipid Raft Labeling Kit (Invitrogen) を用いて染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した.

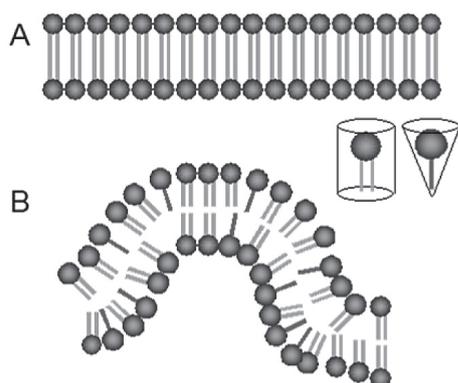


図1. リゾリン脂質の増加による膜構造変化のモデル図. A: 通常のリン脂質による二重膜構造. B: リゾリン脂質増加による膜構造の変化. B右上にリン脂質(左)とリゾリン脂質(右)の空間支配を示す.

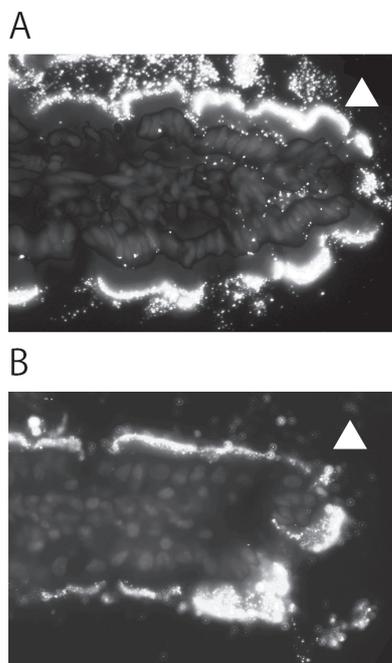


図2. 脂質負荷後に起こる脂質ラフト係留タンパク質アルカリホスファターゼ (ALP) の消失. 食前 (A) および食後 (B) の絨毛 ALP 活性染色像. 食後に矢印で示した活性陽性の部分の多くがBで消失していた.

## 結果

### iPLA<sub>2</sub> 活性阻害はMDCK細胞においてインフルエンザ増殖を抑制する

iPLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤 bromoenol lactone (BEL) および cPLA<sub>2</sub>/iPLA<sub>2</sub> 阻害剤 MAFP (methyl arachidonyl fluorophosphonate) は, 脂質ラフト形成阻害剤である methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) と同程度に培養上清中のウイルス力価を減少させた (図3). iPLA<sub>2</sub> は細胞膜リン脂質の再構成や分泌経路に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>10</sup>. iPLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤 BEL 単独でもウイルス増殖を抑制できたことは, 本酵素が生体において脂質ラフト構造を利用した膜の代謝とダイナミクスを制御していることが考えられた.

### iPLA<sub>2</sub> $\beta$ 欠損マウスにおけるウイルス感染

MDCK細胞を用いた実験系において, iPLA<sub>2</sub> が脂質ラフトのダイナミクスを介してウイルス感染の経路に関与していることが示唆された. iPLA<sub>2</sub> には iPLA<sub>2</sub>  $\beta$  と iPLA<sub>2</sub>  $\gamma$  のアイソザイムがあるが, 生体では iPLA<sub>2</sub>  $\beta$  がその活性の多くを占め, 脳組織ではホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性全体のおよそ半分を占める. そこでこの iPLA<sub>2</sub>  $\beta$  を欠損したマウスで感染したインフルエンザの増殖を検討した. 予備検討の段階では wild-type, 欠損マウスにおいて肺ホモジネート中のウイルス力価に大きな差は認められなかった (図4). さらに個体数を増やして検討する必要がある.

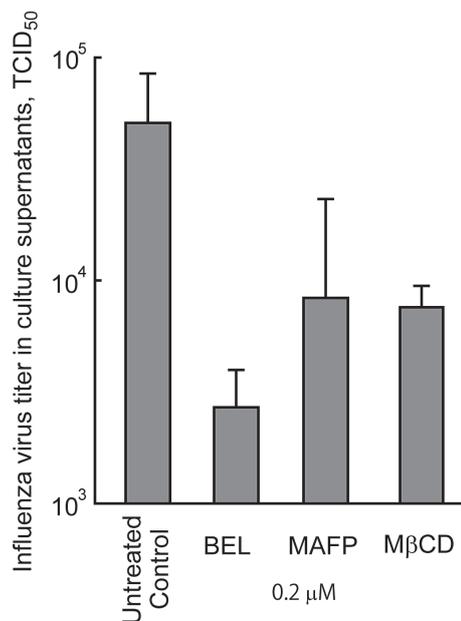


図3. 薬剤による *in vitro* ウイルス増殖防御. BEL, iPLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤; MAFP, iPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub> 阻害剤. M $\beta$ CD, 脂質ラフト形成阻害剤. BEL, bromoenol lactone; MAFP, methyl arachidonyl fluorophosphonate; M $\beta$ CD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

### iPLA $_2$ $\beta$ 欠損マウスの脾細胞および腎臓初代培養細胞の脂質ラフト染色

インフルエンザ感染実験ではiPLA $_2$   $\beta$  欠損によって感染防御能への変化はあまり認められなかった。ウイルス感染防御は多様な因子が関係するシステムで

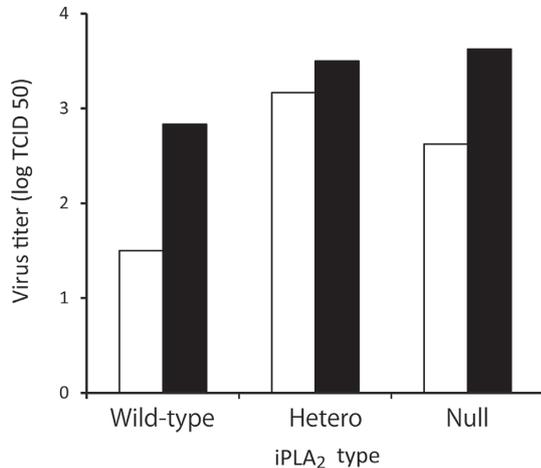


図 4. iPLA $_2$  欠損マウスにおけるウイルス感染防御能. インフルエンザ感染マウスより得た肺ホモジネートのウイルス力価により感染防御能を評価した. n2/ 群, 各個体の結果を白・黒のバーで示す.

あり, iPLA $_2$   $\beta$  欠損の影響が現れにくかった可能性がある. ではiPLA $_2$   $\beta$  欠損によって脂質ラフトの量的・質的变化はなかったのだろうか. iPLA $_2$   $\beta$  欠損の脂質ラフトへの影響を観察すべく, 脾細胞を調製し, 脂質ラフトを染色した. その結果, iPLA $_2$   $\beta$  欠損マウスでは脂質ラフトの染色が強く, 脂質ラフトが多く存在することが示唆された (図 5). また腎臓由来の繊維が細胞様初代培養細胞を同様に染色したところ, 野生株由来細胞に比較し, iPLA $_2$   $\beta$  を欠損した細胞では大きな脂質ラフトの形成が多く見られる傾向があった. これらの結果についてはまだ予備検討の段階にあり, 今後その有意性を確認する必要がある.

### 考 察

脂質ラフトはダイナミックに変化しながら, シグナル伝達, 膜の不均一性, 構造維持などに寄与している. そのダイナミクスを制御する因子はこれまで知られていない. 我々は小腸上皮細胞に発現する脂質ラフト集積タンパク質であるアルカリホスファターゼを観察する中で, その遊離とリゾリン脂質との関連を見いだした. アルカリホスファターゼを指標とした細胞レベルでの検討では, その遊離はホスホリパーゼ活性上昇により増加し, 脂質ラフト形成阻害剤により抑制されることを認めた.

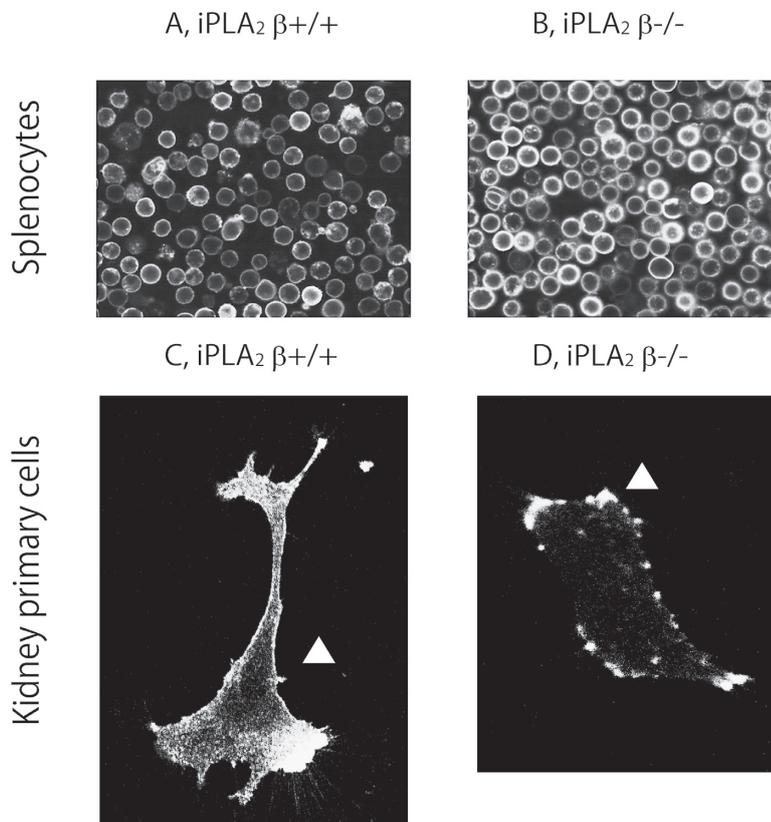


図 5. 脾臓リンパ球および腎臓由来線維芽細胞の脂質ラフト染色.

インフルエンザウイルスは細胞から出芽する際に脂質ラフトを利用する。その過程にホスホリパーゼ活性が関与しているかどうかを、細胞およびマウスにて検討した。その結果、ホスホリパーゼ活性、特に*iPLA<sub>2</sub>*の阻害によって細胞におけるウイルス増殖が減少していた。しかしながら主要な*iPLA<sub>2</sub>*アイソザイムである*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスではウイルス増殖抑制効果は認められなかった。これは発生過程において*iPLA<sub>2</sub>β*欠損が*iPLA<sub>2</sub>*のアイソザイムである*iPLA<sub>2</sub>γ*などによって補償された可能性もある。*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスを昨年4月によく導入できたが、繁殖が悪く*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスを多数得ることが難しいため、まだ実験数が少ない。今後メーティングの規模をスケールアップし、試験数を増やして検討していく必要がある。

幸いなことに今年四月より生化学に赴任された小谷典弘先生は細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法<sup>11)</sup>を開発された脂質ラフト研究の第一人者である。早速共同研究を開始し、*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスの脾細胞の脂質ラフトを染色したところ、Wild typeに比較し、*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスの細胞の方がより強く染色され、脂質ラフトに富んでいることが示唆された。また腎臓由来の繊維が細胞様初代培養細胞では*iPLA<sub>2</sub>β*欠損により大きな脂質ラフトが形成される傾向を認めた。今後、*iPLA<sub>2</sub>β*欠損による脂質ラフトの質的・量的変化についてさらに検討を進めていく予定である。

*iPLA<sub>2</sub>β*はパーキンソン病の早期発症関連遺伝子であり<sup>12)</sup>、この欠損マウスは神経軸索ジストロフィー様の表現型を示す。欠損マウスは末梢・中枢を問わず神経細胞が加齢とともに退行し運動を含めた広範な機能低下を示す。しかしながらその神経細胞退行のメカニズムについてはよく分かっていない。我々はさらに*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスを用いてその退行と脂質ラフトとの関連について研究を進めたい。

## 謝 辞

本研究の実施にあたりご協力いただきました生化学ならびに微生物学の皆様に感謝いたします。また感染動物の利用について有益なご助言をいただきました実験動物施設の皆様に深謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(1):31-9.
- 2) Lajoie P, Nabi IR. Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med* 2007;11(4):644-53.
- 3) Takeda M, Leser GP, Russell CJ, Lamb RA. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(25):14610-7.
- 4) Staneva G, Angelova MI, Koumanov K. Phospholipase A<sub>2</sub> promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chem Phys Lipids* 2004;129(1):53-62.
- 5) Nakano T, Inoue I, Alpers DH, Akiba Y, Katayama S, Shinozaki R, et al. Role of lysophosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297(1):G207-14.
- 6) Nakano T, Inoue I, Shinozaki R, Matsui M, Akatsuka T, Takahashi S, et al. A possible role of lysophospholipids produced by calcium-independent phospholipase A(2) in membrane-raft budding and fission. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788(10):2222-8.
- 7) Shinzawa K, Sumi H, Ikawa M, Matsuoka Y, Okabe M, Sakoda S, et al. Neuroaxonal dystrophy caused by group VIA phospholipase A2 deficiency in mice: a model of human neurodegenerative disease. *J Neurosci* 2008;28(9):2212-20.
- 8) Suda T, Kawano M, Nogi Y, Ohno N, Akatsuka T, Matsui M. The route of immunization with adenoviral vaccine influences the recruitment of cytotoxic T lymphocytes in the lung that provide potent protection from influenza A virus. *Antiviral Res* 2011;91(3):252-8.
- 9) Matsui M, Kohyama S, Suda T, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, et al. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A\*0201 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(3):1494-9.
- 10) Takenouchi T, Sato M, Kitani H. Lysophosphatidylcholine potentiates Ca(2+) influx, pore formation and p44/42 MAP kinase phosphorylation mediated by P2X7 receptor activation in mouse microglial cells. *J Neurochem* 2007;102(5):1518-32.
- 11) Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, Honke K. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(21):7405-9.
- 12) Kauter KM, Höft C, Rissling I, Oertel WH, Möller JC. The PLA2G6 gene in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011;26(13):2415-7.