

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23890252

研究課題名（和文）ウイルス性肺炎発症病態における宿主膜貫通型タンパク分解酵素 TMPRSS2 の役割

研究課題名（英文）Study on the role of TMPRSS2 in respiratory virus spread

研究代表者

安部 昌子 (ABE MASAKO)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・研究員

研究者番号：80613968

研究成果の概要（和文）：ヒトパラインフルエンザウイルス（HPIV）及びマウスパラインフルエンザウイルスであるセンダイウイルス（SeV）が膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 によって活性化されることを示した。TMPRSS2 ノックアウトマウスを用いた感染実験から、マウス体内における SeV の増殖には TMPRSS2 は必須ではない可能性を示した。HPIV、SeV、ヒトメタニューモウイルスといった複数の呼吸器感染性ウイルスにおいて、ウイルス膜蛋白開裂部位 P3～P1 位のアミノ酸配列（QSR）が高度に保存されていることを明らかにした。さらに SeV を用いた実験から、ウイルスの増殖には P2、P3 位のアミノ酸が重要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：We showed that human parainfluenza viruses and Sendai virus (murine parainfluenza virus type 1) use TMPRSS2 for their activation. TMPRSS2 knockout mouse model suggested the possibility that TMPRSS2 might not be critical for SeV spread in mice. Residues at the P3, P2 and P1 positions (QSR) of the cleavage site of virus membrane fusion proteins are highly conserved among many respiratory viruses, such as human parainfluenza viruses, SeV and human metapneumovirus. Finally, our data demonstrated importance of the P2 serine and P3 glutamine residues for SeV replication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	0	1,300,000
2012 年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	0	2,400,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：医歯薬学・小児科学

キーワード：TMPRSS2、ウイルス性肺炎

1. 研究開始当初の背景

ウイルス性呼吸器感染症は代表的な小児疾患の一つである。重篤化すると致死的な肺炎につながるため、早期治療が重要である一方、有効な治療法は確立されていない。本症

の原因となるウイルスとして、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスが挙げられる。近年、これらのウイルスの多くが、その増殖に共通して膜貫通型蛋白分解酵素

TMPRSS2を利用することが明らかとなった。このことから、ウイルス性肺炎の発症における TMPRSS2 の重要性が示唆されるものの、実証はされていない。

2. 研究の目的

パラインフルエンザウイルス、マウスパラインフルエンザウイルスであるセンダイウイルスを用いて、ウイルスによって引き起こされる肺炎の発症機構における TMPRSS2 の重要性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)パラインフルエンザウイルス (HPIV) 1、2、3、4a および 4b 型を Vero 細胞および TMPRSS2 発現 Vero 細胞 (Vero/TMPRSS2) に感染させ、トリプシン添加あるいは非添加の条件下で培養し、プラーク形成の有無を観察した。また、赤色蛍光蛋白 (RFP) 発現センダイウイルス (SeV-RFP) を同様に両細胞に感染させ、ウイルス感染細胞の拡がりを観察した。さらに、感染細胞上清中のウイルス力価を測定した。ウイルス膜蛋白の開裂の有無は、感染細胞あるいは感染細胞上清を用いたウェスタンブロッティングを行って確認した。

(2)TMPRSS2 ノックアウトマウスを作出し、赤色蛍光蛋白 (RFP) 発現センダイウイルス (SeV-RFP) をノックアウトマウスおよび野生型マウスそれぞれに感染させた。感染マウスの体重、肺におけるウイルス感染部位の拡がりを観察した。

(3)SeV-RFP を用いて、ウイルス膜蛋白である F 蛋白の開裂部位 P3 位のアルギニン (Q)、P2 位のセリン (S) をそれぞれ変異させた変異ウイルス (Q114A、Q114S、Q114V、S115R および S115V) を作製した。変異ウイルスを活性型 TMPRSS2 発現 Huh-7 細胞

(Huh-7/TMPRSS2-18)、非活性型 TMPRSS2 発現 Huh-7 細胞 (Huh-7/TMPRSS2m-4)、ヒト気管上皮細胞である Calu-3 細胞およびヒト腸管上皮細胞である Caco-2 細胞に感染させ、トリプシンを加えない条件下で感染細胞の拡がりを観察した。また、感染細胞上清中のウイルス力価を測定した。

4. 研究成果

(1) Vero 細胞では、トリプシンを添加した群ではいずれのウイルス感染細胞でも明瞭なプラークの形成が認められたものの、トリプシン非添加の群ではプラークの形成は認められなかった (図 1)。一方、Vero/TMPRSS2 細胞では、トリプシン非添加の条件下でも、すべてのウイルス感染細胞で明瞭なプラークの形成が認められた。

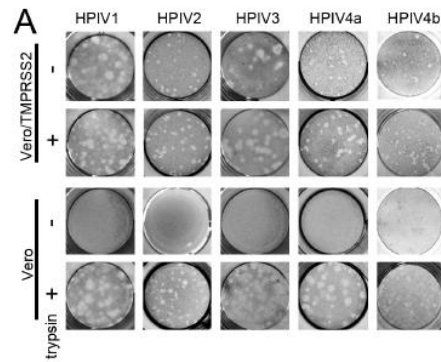


図 1 HPIV1-4a、4b 型の Vero および Vero/TMPRSS2 細胞におけるプラークアッセイ

SeV では、SeV-RFP を用いてウイルス感染細胞の拡がりを経目的に蛍光顕微鏡下で観察した (図 2)。Vero 細胞ではトリプシンを加えないとウイルス感染細胞の拡がりは認められない一方、Vero/TMPRSS2 細胞では、トリプシン非添加の条件下においてもウイルス感染細胞が広がる様子が観察された。

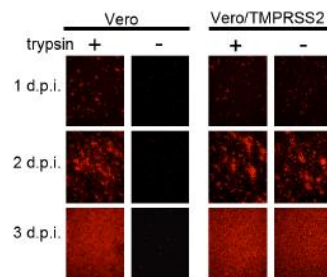


図 2 SeV-RFP の Vero および Vero/TMPRSS2 細胞での拡がり

また、感染細胞上清中には、高い感染力価を有するウイルス粒子の放出が確認された (図 3 および 4)。

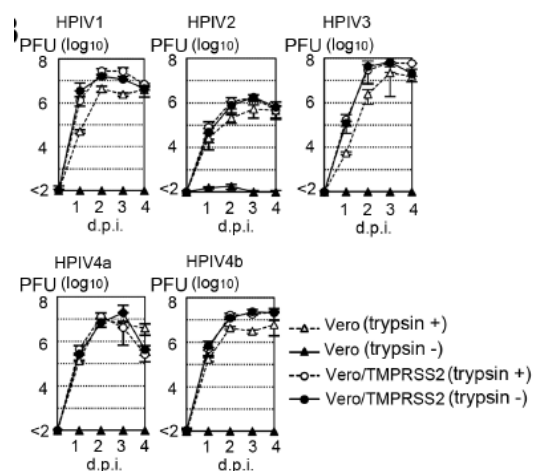


図 3 HPIV1-4a、4b 型の Vero および Vero/TMPRSS2 細胞における増殖曲線

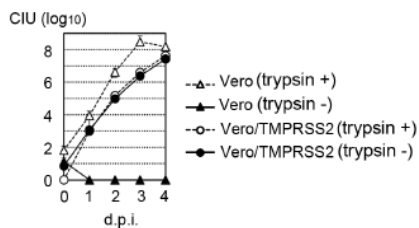


図4 SeV-RFP の Vero および Vero/TMPRSS2 細胞における増殖曲線

以上の結果から、TMPRSS2 は HPIV1、2、3、4a、4b 型および SeV の多段階増殖を促進することが示された。

TMPRSS2 によってウイルス膜蛋白の開裂が起きているかを確認するため、感染細胞を用いてウェスタンブロッティングを行った。Vero 細胞では、トリプシンを添加すると膜蛋白の開裂産物 (F1) が確認できるもののトリプシンがない条件下では開裂前の状態 (F0) しか検出されなかった (図5および6)。一方、Vero/TMPRSS2 細胞では、トリプシンを加えない条件下でも F1 が検出された。以上の結果から、TMPRSS2 によって HPIVs および SeV が活性化され、膜蛋白の開裂が起きていることが示された。

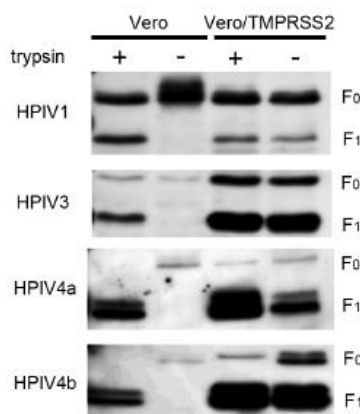


図5 Vero および Vero/TMPRSS2 細胞における HPIVs 膜蛋白の開裂像

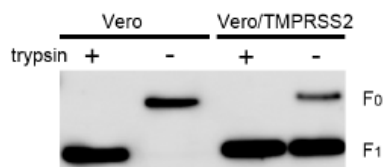


図6 Vero および Vero/TMPRSS2 細胞における SeV 膜蛋白の開裂像

(2) 今回行った条件においては、TMPRSS2 ノックアウトマウスと野生型マウスの間で、感染後のマウスの体重変化および感染部位でのウイルスの拡がりに顕著な差は認められなかった。更なる条件検討が必要ではあるものの、今回の結果から、マウス体内における SeV の増殖には、TMPRSS2 は必須ではない可能性が示唆された。

(3) 呼吸器感染性ウイルスにおける膜融合蛋白質開裂部位 P1、P2 および P3 位のアミノ酸配列を比較した (表1)。その結果、ヒトメタニューモウイルス、SeV、HPIV、A 型インフルエンザウイルスといった複数のウイルスで、この部位のアミノ酸配列 (QSR) が高度に保存されていることがわかった。

表1 各ウイルスの膜融合蛋白質開裂部位における P1、P2 および P3 位のアミノ酸配列

Viruses	P3	P2	P1
HMPV	Q	S	R
SeV	Q	S	R
HPIV1	Q	S/T	R
HPIV2	Q	E	R
HPIV3	T	E/K/R	R
HPIV4a	Q	S	R
HPIV4b	Q	S	R
IAV H1 subtype	Q	S	R
IAV H2 subtype	E	S	R
IAV H3 subtype	Q	T	R

HMPV: ヒトメタニューモウイルス

IAV: A 型インフルエンザウイルス

SeV-RFP の P2 位あるいは P3 位のアミノ酸を変異させた変異ウイルス (Q114A、Q114S、Q114V、S115R および S115V) を Huh-7/TMPRSS2-18 細胞に感染させたところ、どの変異ウイルスも増殖はするものの、その程度は親株よりも低かった (図7)。特に P2 位を変異させた S115R 株において、ウイルスの増殖効率が親株と比較して顕著に低下した。

一方、Calu-3 および Caco-2 細胞に感染させた場合は、P3 位を変異させた株においてウイルス増殖の低下が認められた (図8)。特に、Q114V 株において顕著な差が認められた (図8および9)。

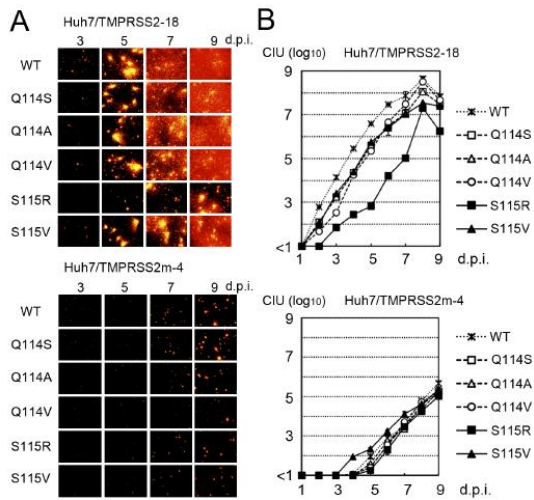


図7 Huh-7/TMPRSS2-18 細胞および Huh-7/TMPRSS2m-4 細胞における SeV-RFP (Wt) および変異株 (Q114A、Q114S、Q114V、S115R および S115V) の感染像 (A) と増殖曲線 (B)

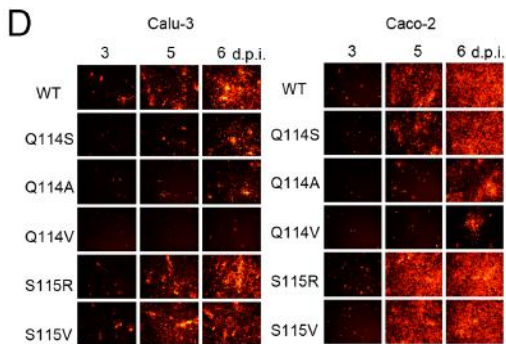


図8 Calu-3 および Caco-2 細胞における SeV-RFP (Wt) および変異株 (Q114A、Q114S、Q114V、S115R および S115V) 感染細胞の拡がり

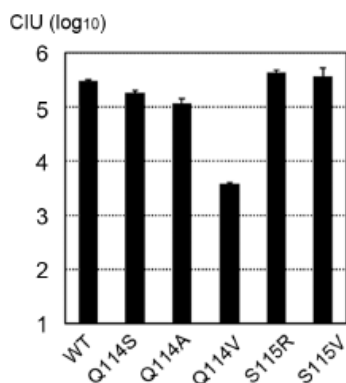


図9 SeV-RFP (Wt) および変異株 (Q114A、Q114S、Q114V、S115R および S115V) 感染 Calu-3 細胞における、感染後 5 日目のウイルス力価

以上の結果から、SeV の増殖には P2 あるいは P3 位のアミノ酸が重要であることが示された。今回、TMPRSS2 を強制発現させた細胞と Calu-3 および Caco-2 細胞で変異株の増殖性に違いが認められた。Calu-3 および Caco-2 細胞は TMPRSS2 以外にも様々なプロテアーゼを発現していることから、この増殖性の差は TMPRSS2 以外のプロテアーゼによってウイルスが活性化されたことによるものではないかと考えられる。

TMPRSS2 の重要性についてはさらなる検討が必要であるものの、TMPRSS2 が複数の呼吸器感染性ウイルスを活性化すること、ウイルス活性化には膜融合蛋白開裂部位 P2 あるいは P3 位のアミノ酸が重要であることを明らかにすることができた。以上の成果は、呼吸器感染性ウイルスを制御する上で有用な情報を提供するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

① 安部昌子、田原舞乃、酒井宏治、加納和彦、白戸憲也、野田雅博、木村博一、松山州徳、水田克巳、網康至、加藤篤、竹田誠

呼吸器感染症ウイルス増殖における TMPRSS2 の役割ならびに膜融合タンパク P3 位保存グルタミンの重要性について
第 2 回 First Negative Strand Virus-Japan Symposium
2013 年 1 月、沖縄

② 安部昌子、加藤篤、田原舞乃、酒井宏治、加納和彦、白戸憲也、野田雅博、木村博一、網康至、松山州徳、水田克巳、竹田誠

膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 はパラインフルエンザウイルス F 蛋白を活性化し増殖を促進する
第 60 回日本ウイルス学会学術集会
2012 年 11 月、大阪

③ Masako Abe, Atsushi Kato, Maino Tahara, Kouji Sakai, Kazuhiko Kanou, Kazuya Shirato, Masahiro Noda, Hirokazu Kimura, Yasushi Ami, Shutoku Matsuyama, Katsumi Mizuta, Makoto Takeda
Importance of the P3 Glutamine residue for proteolytic activation of the fusion protein of parainfluenza virus

by TMPRSS2
The 11th Awaji International Forum on
Infection and Immunity
2012年9月、淡路島

- ④ Masako Abe, Atsushi Kato, Kouji Sakai,
Kazuhiko Kanou, Katsumi Mizuta, Kazuya
Shirato, Shutoku Matsuyama, Makoto
Takeda
Proteolytic activation of the fusion
protein of human and murine
parainfluenza viruses by the type II
transmembrane serine protease TMPRSS2
The 31st American Society for Virology
2012年7月、University of
Wisconsin-Madison, America
- ⑤ 安部昌子、加藤篤、酒井宏治、網康至、
加納和彦、水田克巳、河岡義裕、白戸憲
也、福原秀雄、前中勝実、松山州徳、竹
田誠
パラインフルエンザウイルス及びインフ
ルエンザウイルス感染における膜貫通型
セリンプロテアーゼ TMPRSS2 の生体内で
の役割解明
第1回 First Negative Strand
Virus-Japan Symposium
2012年1月、長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 昌子 (ABE MASAKO)
国立感染症研究所・ウイルス第三部・研
究員
研究者番号：80613968