

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293105

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの生体内での活性化に必須な宿主プロテアーゼに関する研究

研究課題名(英文) Study of host proteases that activate influenza viruses in vivo

研究代表者

竹田 誠 (Takeda, Makoto)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・部長

研究者番号：40311401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、以前に、TMPRSS2の発現を欠いたマウス生体内では、インフルエンザウイルスの膜融合蛋白質の活性化(開裂)が起こらず、ウイルスの増殖が、極端に制限されていることを示した。本研究では、マウスを自然宿主とするパラミクソウイルス科のセンダイウイルスに着目した。野生型マウスは、センダイウイルスの感染に対して致死性であったが、TMPRSS2ノックアウトマウスは、センダイマウスの感染に対して耐性を示した。TMPRSS2ノックアウトマウス内では、センダイウイルスの増殖が制限されており、センダイウイルスを例に、TMPRSS2が呼吸器ウイルスの活性化に必須の生体内プロテアーゼであることが証明できた。

研究成果の概要(英文)：Using knockout (KO) mice we have previously revealed that TMPRSS2, which is expressed on epithelia of the respiratory tract is an essential protease for proteolytic activation of influenza viruses. In TMPRSS2 KO mice the hemagglutinin (HA) of influenza viruses remained to be uncleared and virus replication was severely impaired. In the present study we focused on Sendai virus, a member of the Paramyxoviridae family, because mice are the natural host of Sendai virus and Sendai virus also requires host proteases for its activation in vivo. Sendai virus showed a lethal infection for wild type mice, while TMPRSS2 KO mice were resistant to the Sendai virus infection. The replication of Sendai virus was severely restricted in the TMPRSS2 KO mice. These data for the first time demonstrated that TMPRSS2 is the essential protease for proteolytic activation of an ARI virus, Sendai virus, in the natural host.

研究分野：ウイルス学

キーワード：プロテアーゼ インフルエンザウイルス パラミクソウイルス センダイウイルス 開裂

1. 研究開始当初の背景

多くの急性呼吸器感染症 (ARI) ウイルスの増殖には、ウイルス膜融合タンパク質の活性化を担う宿主プロテアーゼが必要である。しかし、*in vivo*において実際に ARI ウイルスを活性化する宿主プロテアーゼは明らかになっていなかった。2006年にドイツの研究グループが、膜タンパク型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 が、インフルエンザウイルスを活性化する酵素のひとつであることを報告した。われわれは、TMPRSS2 が、インフルエンザウイルスのみならず、ヒトメタニューモウイルス、SARS コロナウイルス、パラインフルエンザウイルスなど、主要な ARI ウイルスのほとんどを、極めて低い発現レベルで効率よく活性化することを明らかにした。中東で出現した新たな ARI ウイルスである MERS コロナウイルスもまた、この酵素によって活性化を受けることが示されている。そこで、呼吸器上皮細胞における TMPRSS2 によるウイルス膜タンパク質の活性化こそが、ARI ウイルスの *in vivo*における増殖に必要であるという仮説を立て、そのことを証明するために、TMPRSS2 ノックアウト (TMPRSS2 KO) マウスを作出した。TMPRSS2 KO マウスは、正常の発生、成長、繁殖能力を示した。インフルエンザウイルスを TMPRSS2 KO マウスに接種した場合、通常マウス (TMPRSS2 WT) の致死量 (10⁶pfu) の 1000 倍量 (10⁹pfu) を投与しても、マウスは明確な体重減少を示さず、TMPRSS2 KO マウスが、インフルエンザウイルス感染に完全に抵抗性であることが示された。また、TMPRSS2 KO マウス体内では、インフルエンザウイルスの増殖は著しく制限されていた。

しかも、WT マウス肺内では、100%のウイルスが活性化され感染力を有しているのに対して、TMPRSS2 KO マウス生体内では、ウイルス粒子がほとんどプロテアーゼによる活性化を受けておらず、感染力をもったウイルスがほとんど産生されていなかった。これらの結果から、インフルエンザウイルスの *in vivo*における活性化機構が解明され、すなわち、TMPRSS2 こそが、生体内インフルエンザウイルス活性化酵素であることが証明された。

2. 研究の目的

(1) 様々な ARI ウイルスの *in vivo* 増殖における TMPRSS2 の役割の解明

培養細胞を用いた実験によって、TMPRSS2 で活性化されることが明らかになっているヒトの ARI ウイルスは、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型～4 型、SARS コロナウイルス、MERS コロナウイルス、NL63 コロナウイルスである。インフ

ルエンザウイルスとこれらのウイルスで、小児のウイルス性肺炎の原因ウイルスの 50 パーセント以上を占める。また、SARS コロナウイルス、MERS コロナウイルスは、特に病原性の高い ARI ウイルスである。TMPRSS2 KO マウスを用いて、これらのウイルスの *in vivo* 増殖における TMPRSS2 の役割を解明する。センドライウイルス (SeV) は、マウスに肺炎を起こすパラインフルエンザウイルスである。SeV もまた TMPRSS2 で活性化されることが明らかになっている。そこで、SeV についても、同様の実験を実施し、TMPRSS2 が ARI ウイルスの自然宿主内での増殖に必須のプロテアーゼであることを証明する。

3. 研究の方法

TMPRSS2 KO マウスが、季節性インフルエンザウイルスの感染に対して完全に耐性であることをわれわれはすでに明らかにしている。本研究では、他の ARI ウイルス (SARS コロナウイルス、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等) について TMPRSS2 KO マウスの感受性を確認し、ウイルス性肺炎全般に対する TMPRSS2 の重要性を解明する。

(1) ヒトメタニューモウイルスの *in vivo* 解析

小児や高齢者に重症肺炎を引き起こす代表的な病原体である。培養細胞において TMPRSS2 で活性化を受けることが示されている。マウスで増殖することが報告されている。われわれは蛍光タンパク (GFP ならびに RFP) を発現する組換えヒトメタニューモウイルス

(JPS02-76-EGFP、JPS02-76- RFP) 株の作成に成功しているため、本株を実験に用いる。蛍光タンパクを発現するウイルスを用いることによって、感染個体内でのウイルス増殖が高感度に捉えられることが多くの実験で示されている。

しかしながら、われわれのこれまでの実験で JPS02-76-EGFP、JPS02-76- RFP がマウスではほとんど増殖できないことが明らかになっている。JPS02-76- RFP 株を、マウスで継代して、マウスで増殖する JPS02-76- RFP 株を得る。得られたウイルス株のゲノム遺伝子配列を解析して、マウス増殖に必要な遺伝子変異を特定する。その変異を組換えウイルスに人工的に導入して、マウスで増殖する JPS02-76- RFP variant を用意する。インフルエンザウイルスと同様の感染実験を TMPRSS2 KO マウスならびに TMPRSS2 WT マウスで実施する。TMPRSS2 の役割を明らかにするとともに、ウイルス増殖を蛍光で捉えられる利点があるので、蛍光イメージングによって、ヒトメタニューモウイルスが多段階増殖

する場を詳細に解析する。

(2) パラインフルエンザウイルスの in vivo 解析

ヒトパラインフルエンザウイルスには1~4型の4種類がある。培養細胞を用いて、これら全てがTMPRSS2で活性化されることを既に明らかにしている。マウスでの増殖性は、充分には分かっていない。野生株を順次感染させてマウス性を確認後、TMPRSS2 KOマウスへ接種する。臨床材料より分離されたヒトパラインフルエンザウイルス株をすでに26株入手している。これらウイルス株のTMPRSS2 WTマウスでの増殖性を、まずは解析する。

TMPRSS2 WTマウスで増殖する株が見られた場合には、インフルエンザウイルスと同様の感染実験をTMPRSS2 KOマウスならびにTMPRSS2 WTマウスで実施する。加えて、マウスの自然宿主でマウスに致死的な肺炎を起こすことが明らかであるSeV(マウスパラインフルエンザウイルス1型)を用いて同様の解析を行う。蛍光タンパクを発現する組換えSeV(SeV-RFP)は、すでに作成済みである。マウスTMPRSS2がヒトTMPRSS2と立体構造上極めて相同性が高いことは、in silicoにて解析済みである。さらにマウスTMPRSS2発現細胞を作成し、マウスTMPRSS2が機能的にSeVの膜融合タンパク(Fタンパク)を開裂(活性化)することを示している。

4. 研究成果

(1) ヒトメタニューモウイルスの in vivo 解析

組換えウイルス4種、臨床分離株数種を試したが、いずれもマウス体内でほとんど増殖せず、解析はできなかった。また、馴化する株も取得できなかった。

(2) パラインフルエンザウイルスの in vivo 解析

ヒトパラインフルエンザウイルスの臨床分離株十数種を試したが、いずれもマウス体内でほとんど増殖せず、解析はできなかった。一方、センダイウイルスは、自然宿主であるマウスでよく増殖し、野生型マウスTMPRSS2 WTは、センダイウイルスの感染に対して致死的であった。TMPRSS2 KOは、センダイマウスの感染に対して耐性を示した。TMPRSS2ノックアウトマウス内では、センダイウイルスの増殖が制限されており、センダイウイルスを例に、TMPRSS2が呼吸器ウイルスの活性に必須の生体内プロテアーゼであることが証明できた。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. (2014) The Host Protease TMPRSS2 Plays a Major Role in In Vivo Replication of Emerging H7N9 and Seasonal Influenza Viruses. *J Virol.* 88:5608-16.

[学会発表] (計 18 件)

1. Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Nakajima N, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. (2014 July 27-August 1) The host protease TMPRSS2 plays a major role for influenza virus replication in vivo. 16th IUMS International Congress of Virology.
2. Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Nakajima N, Sekizuka T, Komase K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. (2014 September 23-26) The host protease TMPRSS2 is essential for influenza A virus pathogenicity. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara.
3. Sakai K, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Sekizuka T, Nakajima N, Anraku M, Tahara M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Odagiri T, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. (2015 June 14-19, Siena, Italy) Host and viral determinants of proteolytic activation of influenza viruses. Negative Strand Virus Meeting 2015.
4. Takeda M. (2015 August 28-29, Evanston, IL, USA) Proteolytic activation of influenza and parainfluenzaviruses in vivo. From Flu to Parainflu and Beyond: Honoring Four Decades of RNA Virus Research and Teaching (Dr. Robert A. Lamb) at Northwestern University.
5. Sakai K, Ami Y, Sekizuka T, Kitazawa M, Nakajima K, Anraku M, Nakajima N, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M (2015 September 6-9, Hyogo, Japan) Molecular

- determinants of proteolytic activation of respiratory Ortho- and Paramyxoviruses in vivo. The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity.
6. Sakai K, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Sekizuka T, Nakajima N, Anraku M, Kubota T, Odagiri T, Kuroda M, Hasegawa H, Tashiro M, Takeda M. (2015 September 17-20, Potomac, MD, USA) Host and viral determinants of in vivo proteolytic activation of influenza viruses. 2015 ASBMB Special Symposia Series. Membrane-Anchored Serine Proteases.
 7. Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Anraku M, Ikuyo Takayama, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. (2016 September 6-9, Hyogo, Japan) Proteolytic activation of hemagglutinin proteins of influenza A and influenza B viruses in vivo. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity.
 8. 竹田誠、中島典子、水田克巳、宿主プロテアーゼTMPRSS2は、急性呼吸器感染症ウイルスの生体内活性化酵素である、第55回日本臨床ウイルス学会、札幌、2014年6月14-15日
 9. 竹田誠、中島典子、河岡義裕、TMPRSS2は、インフルエンザウイルスの病原性発現に必須の宿主プロテアーゼである、第88回日本感染症学会、福岡、2014年6月18-20日
 10. 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、関塚剛史、駒瀬勝啓、長谷川秀樹、黒田誠、河岡義裕、田代真人、竹田誠、宿主プロテアーゼTMPRSS2は、インフルエンザウイルスの生体内活性化酵素である、第157回日本獣医学会、札幌、2014年9月9-12日
 11. 北沢実乃莉、酒井宏治、田原舞乃、安部昌子、中島勝紘、網康至、中島典子、安楽正輝、駒瀬勝啓、長谷川秀樹、竹原一明、田代真人、加藤篤、竹田誠、宿主プロテアーゼTMPRSS2はセンダイウイルスの病原性決定因子のひとつである、第157回日本獣医学会、札幌、2014年9月9-12日
 12. Takeda M, Sakai K, Seki F, Otsuki N, Yamaguchi R, Maenaka K. Host range and cell tropism determinants of measles virus and canine distemper virus. 第62回日本ウイルス学会、横浜、2014年11月10-12日
 13. 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠、II型膜貫通セリンプロテアーゼTMPRSS2は、HA開裂部位にmono-basicなアミノ酸配列をもつA型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である、第62回日本ウイルス学会、横浜、2014年11月10-12日
 14. 竹田誠、酒井宏治、A型ならびにB型インフルエンザウイルスの病原性発現における宿主プロテアーゼ要求性の明確な違いについて、第47回日本小児科学会、福島、2015年10月31日～11月1日
 15. Takeda M, Sakai K, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Natthanan S, Anraku M, Nakajima N, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Tashiro M. A natural host model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paramyxovirus pathogenicity. 第63回日本ウイルス学会、福岡、2015年11月22-24日
 16. Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Kitazawa M, Nakajima K, Nakajima N, Anraku M, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. The stalk oligosaccharide of the influenza A virus hemagglutinin protein modulates protease specificity for virus activation and pathogenicity. 第63回日本ウイルス学会、福岡、2015年11月22-24日
 17. 酒井宏治、中島典子、駒瀬勝啓、竹田誠、呼吸病ウイルスの病原性発現に関わる宿主プロテアーゼTMPRSS2の意義、第57回日本臨床ウイルス学会、郡山、2016年6月18-19日
 18. Takeda M. Host and viral determinants for proteolytic activation of respiratory viruses. The 2nd International Symposium on Molecular Basis of Virus-Host Interactions. 札幌、2016年10月22-23日
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 誠 (TAKEDA, Makoto)
国立感染症研究所・ウイルス第三部・部長
研究者番号：40311401

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

酒井宏治 (SAKAI, Kouji)
国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任
研究官
研究者番号：70515535

(4) 研究協力者

()