

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04596

研究課題名(和文)細菌性プロテアーゼによる呼吸器ウイルス活性化機序の全容解明

研究課題名(英文)Analysis of respiratory virus activation mechanism by bacterial proteases

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：季節性インフルエンザウイルス(IAV)の原発性ウイルス性肺炎の病原性発現に、呼吸器上皮細胞に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼTMPRSS2が必須の生体内活性化酵素であることを明らかにした。一方、細菌感染が関与する二次性感染型肺炎は、IAV死亡例の大半を占めているが、詳細な機序は不明である。マウス生体を用いて検証を試みたが、実施した感染条件では、重症化は認められたが、細菌性プロテアーゼによるIAVのHA開裂の促進は認められなかった。一方、TMPRSS2依存性なH3N2及びH7N1亜型IAVのTmprss2 KO マウス体内での新たなプロテアーゼ利用能獲得が観察された。

研究成果の概要(英文)：The host protease TMPRSS2 plays an essential role in HA proteolytic activation of the influenza A virus (IAV) for the pathogenic expression of primary viral pneumonia. Secondary infectious pneumonia involving bacterial infection, accounts for the majority of IAV deaths, but the detailed mechanism is unknown. We performed to verify using mouse model. However promotion of HA cleavage of IAV by bacterial protease was not observed. On the other hand, after passages in TMPRSS2 knockout mice, an H3N2 and H7N1 subtype IAVs began to undergo cleavage activation of HA, showing high virulence in the mice due to the loss of an oligosaccharide in the HA stalk region. Thus, these TMPRSS2 knockout mice adapted IAVs acquired cleavability by an alternative HA activation proteases.

研究分野：獣医学

キーワード：細菌性プロテアーゼ インフルエンザウイルス 膜蛋白質 開裂 重症化肺炎

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、季節性インフルエンザ A ウイルス (IAV) の原発性ウイルス性肺炎の病原性発現に、呼吸器上皮細胞に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 が必須の生体内活性化酵素であることを明らかにした (J Virol. 88(10):5608-16. )。つまり、TMPRSS2 遺伝子発現を欠損したマウス (Tmprss2 KO マウス) は、TMPRSS2 遺伝子を発現する通常のマウス (野生型マウス) の最小致死量の 1000 倍量の季節性 IAV を感染させても、ほとんど症状を示さなかった。

一方、細菌感染が関与する二次性感染型肺炎は、インフルエンザ死亡例の大半を占め、マウス感染実験による重症化肺炎が報告 (Nature. 325:536-7. 1987) されている。最近では、肺炎球菌の二次感染によるインフルエンザ特異的 CD8 陽性細胞の抑制報告 (J Immunol. pii: 1400529. 2014) や、IAV 感染による肺炎球菌接着因子、血小板活性化因子 (PAF) レセプターの有意な増加が報告 (Jpn J Infect Dis. 62:6-10. 2009) され、二次性感染型肺炎におけるウイルスと細菌の相乗作用の関与が示唆されているが、詳細な発症機序は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、『混合感染時、IAV の活性化が、何のプロテアーゼで?、いつ?どこで?修飾されているか』を解明するために、細菌の二次感染による重症肺炎モデルの作成 (*in vivo*) 細胞内でのウイルス活性化の時空間的制御機序な解明 (*in vitro*) を行い、重症肺炎での細菌性プロテアーゼによる IAV 活性化機序の分子基盤解明を試みた。

IAV は細胞表面の受容体に結合し、エンドサイトーシスにより取り込まれ、ウイルスと細胞膜が融合する。膜融合は、プロテアーゼにより開裂した HA タンパク質とエンドソーム内の酸性 pH により誘起される。つまり、HA タンパク質が開裂した活性型ウイルスのみが融合することができる。一方、肺炎レンサ球菌は細胞内で発現した受容体 pIgR と基底膜側で結合し、IAV と同様に、エンドサイトーシスにより取り込まれる。これまで培養細胞で様々なプロテアーゼによる季節性 IAV の HA タンパク質開裂は報告されていたが、このことから、申請者は、『細菌性プロテアーゼによる HA タンパク質の開裂も、狭いエリア (エンドソームや TGN) 内で効率的に起こる』と考え、『IAV と肺炎球菌が同じエンドソーム内で出会い、細菌性プロテアーゼにより HA タンパク質が開裂する』、『TMPRSS2 と同様に、肺炎球菌の細菌性プロテアーゼが TGN にも存在し、HA タンパク質を開裂する』、『分泌型の細菌性プロテアーゼが細胞内もしくは表面に存在し、HA タンパク質を開裂する』、という仮説の検証を行った。

これまでの研究から、脂質ラフトが細胞内で合成された HA の集積装置及び出芽部位への効率的な輸送装置として機能していることが報告されている。また、細胞内の HA の開裂はゴルジ装置以降で行われていることが示唆されている報告がある。そこで、脂質ラフトへの親和性を失った人為的な変異ウイルス (nonraftHA ウイルス) と脂質ラフトへの親和性のある野生株を用いて、マウス生体内での HA 開裂について解析を行った。HA 開裂に脂質ラフトの輸送経路が関与しているのであれば、野生型ウイルスが野生型マウスで病原性を示すような HA 開裂条件時、nonraftHA ウイルスでは、非病原性で、HA 開裂が認められないと考えられ、HA 開裂場所として、脂質ラフト輸送経路の利用の検証を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) IAV と肺炎球菌の混合感染による重症化肺炎モデルを用いた細菌性プロテアーゼによる HA 開裂の検証

IAV は TMPRSS2 感受性 (Tmprss2 KO マウス肺内で効率的な HA 開裂起きず、非病原性) が確認されたマウス馴化株を、肺炎球菌はヒト臨床分離株、莢膜をもたない非病原性株、モルモット繊維索性肺病変由来株を用いた。野生型マウスを用いて IAV 単独感染群、肺炎球菌単独感染群、混合感染群において、混合感染群でのみ致死もしくは重篤な体重減少が認められる二次性重症化肺炎の感染条件の決定を試みた。次に、Tmprss2 KO マウスを用いて、感染実験を行い、混合感染群において、HA の開裂が起こるか検証した。

### (2) IAV の HA 開裂場所の検索

#### i) 開裂した HA タンパク質のみを検出する抗体の作製

「いつ開裂したのか?」を詳細に解析するために、非開裂の HA タンパク質は検出せず、開裂した HA タンパク質のみを検出する抗体があると有用である。これまで、そのような抗体は報告されていないため、HA 開裂により構造変化の伴う領域からペプチド抗体の作成を試みた。

#### ii) pIgR 発現 MDCK 細胞における、IAV と肺炎球菌の混合感染時の HA 開裂の検証

培養細胞レベルでの IAV との肺炎球菌の混合感染実験のために、肺炎球菌が感染可能な pIgR 発現 MDCK 細胞を用い、トリプシン非存在下の IAV と肺炎球菌の pIgR 発現 MDCK 細胞での混合感染において、HA の開裂促進の有無を検証した。

#### iii) HA 開裂場所として、脂質ラフト輸送経路の利用の検証

脂質ラフトへの親和性のある野生株及び脂質ラフトへの親和性を失った変異ウイルス (nonraftHA ウイルス) を用いて、マウス

生体内での HA 開裂、病原性について解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) IAV と肺炎球菌の混合感染による重症化肺炎モデルを用いた細菌性プロテアーゼによる HA 開裂の検証

Tmprss2 遺伝子欠損マウスが C57BL/6 マウスベースであるため、野生型マウスの感染条件も、優先して、C57BL/6 マウスで検証を試みた。IAV は、野生型マウスで致死性であるが、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスでは非病原性のマウス馴化株を用いた。しかしながら、用いたいずれの IAV 及び肺炎球菌株の組み合わせの感染条件において、混合感染群のみでの致死的な重症化モデルの作成、HA 開裂条件の設定はできなかった。このことは、C57BL/6 マウスへの肺炎球菌の感受性が非常に低いことが起因すると考えられた。一方、Tmprss2 KO マウスへの IAV の高力価単独感染時、Tmprss2 非依存的な HA 開裂は、用いた H3N2, H7N1 亜型の 2 つのウイルスで確認され、Tmprss2 KO マウス馴化株が得られた。ただし、用いた H1N1 亜型では、Tmprss2 KO マウス馴化株は得られなかった。得られた H3N2, H7N1 亜型の Tmprss2 KO マウス馴化株では、HA において、HA 開裂部位近傍の糖鎖欠失が共通して、認められ、プロテアーゼ指向性の変化が、Tmprss2 KO マウス感染において、認められた。これまで、物理的に Tmprss2 のみが HA 開裂部位に接触できる空間（スペース）があり、マウスでの病原性に必須の宿主因子と限定されていたが、HA 開裂部位近傍の糖鎖欠失により、Tmprss2 以外の新たなプロテアーゼが物理的に HA 開裂部位に接触できる空間（スペース）が生まれ、新たなプロテアーゼ利用能獲得になったと考察された。

ICR マウス及びマイコプラズマ易感染性マウス(MPS マウス、ICR マウスの突然変異体)を用いた場合、混合感染群のみでの致死的な重症化モデルは作成できた。このことから、この感染条件を、基本感染条件とした。

野生型マウスを用いた場合、IAV 単独感染群及び肺炎球菌単独感染群では、有意な体重変動あるいは致死的な体重減少を示さないが、混合感染群でのみ、致死的な経過を示した。興味深いことに、肺炎球菌感染マウス肺洗浄液を菌液として用いた場合、肺炎球菌感染肺洗浄液をフィルター濾過したる液（菌体なし）、そのろ液にプロテアーゼインヒビターを添加したものの、どちらにおいても、混合感染群と同様な致死的な経過を示した。また、この感染条件において、Tmprss2 遺伝子欠損マウスを用いて、同様に感染実験を実施したが、野生型マウスのように、混合感染群でのみ、重症化や感染肺でのウイルス複製効率の増加、HA 開裂の促進は認められなかった。以上より、本申請で用

いた IAV と肺炎球菌の混合感染による重症化は、細菌性プロテアーゼに起因しないことが考えられた。今後は、重症化の起因となった、ろ液成分の解析を試みる。

興味深いことに、MPS マウスは、ベースである ICR マウスより、肺炎球菌感受性が有意に高かった。現在、ICR マウスと MPS マウスの肺炎球菌感受性の遺伝学的因子については、検索中である。今後、野生型マウスで得られた結果から、Tmprss2 遺伝子欠損マウスを C57BL/6 マウスベースから MPS マウスに変更し、再度検証を試みる。

##### (2) IAV の HA 開裂場所の検索

###### i) 開裂した HA タンパク質のみを検出する抗体の作製

「いつ開裂したのか？」を詳細に解析するために、非開裂の HA タンパク質は検出せず、開裂した HA タンパク質のみを検出する抗体の作製を試みた。HA 開裂により構造変化の伴う領域からペプチド抗体の作製を試みたが、そのペプチド抗体では HA タンパク質をウェスタンブロットングにより検出することはできなかった。引き続き、同様の領域の別のペプチド抗体の作製を試みる。

###### ii) pIgR 発現 MDCK 細胞における、IAV と肺炎球菌の混合感染時の HA 開裂の検証

培養細胞レベルでの IAV との肺炎球菌の混合感染実験のために、肺炎球菌が感染可能な pIgR 発現 MDCK 細胞を作製した。トリプシン非存在下の IAV と肺炎球菌の pIgR 発現 MDCK 細胞での混合感染において、HA の開裂促進は認められなかった（検出限界以下であった）。

###### iii) HA 開裂場所として、脂質ラフト輸送経路の利用の検証

H1 と H3 の nonraftHA ウイルス及びそれぞれの親株のウイルスを用いて、マウスへの感染実験を行ったが、親株ウイルスの高力価ウイルス攻撃であっても、マウス馴化ウイルスでないため、十分なウイルス複製が行われず、nonraftHA ウイルスとの HA 開裂の有無の比較解析を実施することができなかった（検出限界以下であった）。

#### 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 8 件)

Yoshida A, Kawabata R, Honda T, Sakai K, Ami Y, Sakaguchi T, Irie T. (2018) A single amino acid substitution within the Paramyxovirus Sendai virus nucleoprotein is a critical determinant for production of IFN-beta-inducing copyback-type defective interfering genomes. J Virol. 92(5). pii: e02094-17.

Sangsriratanakul N, Toyofuku C, Suzuki M, Komura M, Yamada M, Alam MS,

Ruenphet S, Shoham D, Sakai K, Takehara T. (2018) Virucidal Efficacy of Food Additive Grade Calcium Hydroxide against Surrogate of Human Norovirus. *J Virol. Methods*. 251:83-87.

Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakamura K, Kitazawa M, Anraku M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komura M, Sangsriratanakul N, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. (2016) TMPRSS2 independency for haemagglutinin cleavage in vivo differentiates influenza B virus from influenza A virus. *Sci Rep*. 6:29430.

Sakai K, Hagiwara K, Omatsu T, Hamasaki C, Kuwata R, Shimoda H, Suzuki K, Endoh D, Nagata N, Nagai M, Katayama Y, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Mizutani T, Maeda K. (2015) Isolation and characterization of a novel Rhabdovirus from a wild boar (*Sus scrofa*) in Japan. *Vet Microbiol*. 179: 197-203.

Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. (2015) Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Sci Rep*. 5:8850.

Sakai K\*, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Sekizuka T, Kubota T, Komase K, Takehara K, Kuroda M, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Takeda M. (2015) H3N2 Influenza virus uses an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol*. 89 (9):5154-8. (\*Corresponding author)

酒井宏治 (2018) 『宿主プロテアーゼ TMPRSS2 とインフルエンザウイルス』、*獣医畜産新報* 71(6)414-424

酒井宏治, 関塚剛史 (2015) 『インフルエンザ A ウイルスの HA ストック領域の糖鎖欠失によるプロテアーゼ特異性の変化』、*臨床とウイルス* 43(3): 75 -85.

[学会発表](計 21 件)

酒井宏治, 宿主プロテアーゼ TMPRSS2 とインフルエンザウイルス, 第 160 回日本獣医学会学術集会 微生物分科会シンポジウム「最先端微生物学研究に基づいた疾病対策の試み」, 鹿児島, 2017 年 9 月

酒井宏治, 高山郁代, 網康至, 須崎百合子, 駒瀬勝啓, 竹原一明, 竹田誠, 小田切孝人, 変異型インフルエンザウイルス A/H3N2v のマウスでの病原性, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017 年 10 月

酒井宏治, センダイウイルスのマウスでの病原性, 7th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 沖縄, 2018 年 1 月

酒井宏治, インフルエンザウイルスと宿主プロテアーゼ TMPRSS2, 第 8 回 SENRI の会, 大阪, 2018 年 1 月

酒井宏治, 竹田誠, 野生水禽由来 H7N1 のマウスでの病原性, 第 30 回 インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 山形, 2016 年 5 月

酒井宏治, 中島典子, 駒瀬勝啓, 竹田誠, 呼吸器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プログラム, 福島, 2016 年 6 月

古村みゆき, 酒井宏治, Nathanan Sangsriratnakul, 網康至, 山口良二, 駒瀬勝啓, 竹原一明, 竹田誠, サルとヒトの犬ジステンパーウイルスへの感受性の違いを決める受容体上のアミノ酸置換の同定, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 2016 年 9 月

Nathanan Sangsriratnakul, 酒井宏治, 古村みゆき, 駒瀬勝啓, 竹原一明, 竹田誠, インフルエンザウイルスのマウス水平感染モデル作出の試み, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 神奈川, 2016 年 9 月

Nathanan Sangsriratnakul, Kouji Sakai, Miyuki Komura, Masaki Anraku, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Makoto Takeda, Roles of TMPRSS2 in human metapneumovirus infection, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札, 2015 年 11 月

酒井宏治, 竹田誠, 「インフルエンザウイルスの HA ストック領域糖鎖欠失とプロテアーゼ特異性の変化」, 第 57 回日本臨床ウイルス学会プログラム, 福島, 2016 年 6 月

Kouji Sakai, Yasushi Ami, Minori Kitazawa, Katsuhiko Nakajima, Tsuyoshi Sekizuka, Noriko Nakajima, Masaki Anraku, Maino Tahara, Toru Kubota, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Takato Odagiri, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda, Host and viral determinants of proteolytic activation of influenza viruses, 202, Negative Strand Virus Meeting 2015, Siena, Spain, June 2015.

Kouji Sakai, Yasushi Ami, Tsuyoshi Sekizuka, Minori Kitazawa, Katsuhiko Nakajima, Masaki Anraku, Noriko Nakajima, Katsuhiko Komase, Kazuaki

Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Makoto Takeda, Molecular determinants of proteolytic activation of respiratory Ortho- and Paramyxoviruses in vivo. P-21, The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan, Sep 2015.

酒井宏治、網康至、中島勝紘、北沢実乃莉、中島典子、関塚剛史、安楽正輝、竹原一明、小田切孝人、長谷川秀樹、黒田誠、田代真人、竹田誠、宿主プロテアーゼ TMPRSS2 非依存的インフルエンザウイルスの in vivo 増殖機構、9、第 29 回 インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、東京、2015 年 5 月

北沢実乃莉、酒井宏治、関塚剛史、中島勝紘、網康至、安楽正輝、中島典子、久保田耐、駒瀬勝啓、竹原一明、長谷川秀樹、田代真人、黒田誠、竹田誠、H3N2 インフルエンザ A ウイルスの HA タンパク質糖鎖欠失による TMPRSS2 非依存的なウイルス増殖、DVO-4、第 158 回日本獣医学会学術集会、青森、2015 年 9 月  
中島勝紘、酒井宏治、北沢実乃莉、SANGSRIRATANAKUL Natthanan、安楽正輝、網康至、駒瀬勝啓、竹原一明、竹田誠、カモ由来 H7N1 インフルエンザ分離株の性状解析、DVO-6、第 158 回日本獣医学会学術集会、青森、2015 年 9 月

SANGSRIRATANAKUL Natthanan、酒井宏治、高木翼、北沢実乃莉、中島勝紘、安楽正輝、駒瀬勝啓、竹原一明、竹田誠、Activation of human metapneumovirus subtype A2 strain by TMPRSS2、DVO-70、第 158 回日本獣医学会学術集会、青森、2015 年 9 月

Angeline Ping Ping The、平井卓哉、山口良二、酒井宏治、関文緒、竹田誠、インフルエンザウイルスのマウス脳接種とマウスネクチン 4 発現 Vero 細胞の感受性についての検討、DVO-40、第 158 回日本獣医学会学術集会、青森、2015 年 9 月

Kouji Sakai, Tsuyoshi Sekizuka, Yasushi Ami, Minoru Kitazawa, Katsuhiro Nakajima, Noriko Nakajima, Masaki Anraku, Katsuhiro Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Makoto Takeda, The stalk oligosaccharide of influenza A virus hemagglutinin protein modulates protease specificity for virus activation and pathogenicity, W2-F-08、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月

Makoto Takeda, Kouji Sakai, Yasushi Ami, Minoru Kitazawa, Katsuhiro Nakajima, Sangsriratanakul Natthanan, Masaki Anraku, Noriko Nakajima, Katsuhiro Komase,

Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, A natural host model revealed the essential role of the host protease TMPRSS2 for respiratory paraxovirus pathogenicity, W1-E-01、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月

酒井宏治、野生水禽由来 H7N1 IAV と宿主プロテアーゼ TMPRSS2、5th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2015 年 1 月

21 酒井宏治、「インフルエンザウイルスと宿主プロテアーゼ TMPRSS2」、東京大学農学部シンポジウム「若手獣医出身者による最先端感染症研究」、東京、2015 年

〔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〕

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15H04596/>

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir3.html>

<https://researchmap.jp/read0091853/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

小川 道永 (OGAWA, Michinaga)  
国立感染症研究所・細菌第一部・室長  
研究者番号：80361624

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

中島 勝紘 (NAKAJIMA, Katsuhiro)

北沢 実乃莉 (KITAZAWA, Minori)

Nathanan Sangsriratnakul

古村 みゆき (KOMURA, Miyuki)