

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15041

研究課題名（和文）高病原性鳥インフルエンザウイルス出現阻止のための宿主因子の同定

研究課題名（英文）Identification of host factors to prevent the emergence of highly pathogenic avian influenza virus

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） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：野生水禽由来低病原性の鳥インフルエンザウイルス（IAV）が、TMPRSS2遺伝子欠損マウス（KOマウス）を用いて、TMPRSS2が必須の宿主因子であることを実証した。また、そのIAVが、KOマウス連続継代により、HAに2箇所のアミノ酸変異（HA開裂部位近傍の糖鎖欠失とHA開裂部位の塩基性アミノ酸へのアミノ酸置換）を伴い、KOマウス生体内で新たなプロテアーゼ利用能を獲得し、病原性を発現することを実証した。一方、野生水禽と家禽のTMPRSS2について、HA開裂に関わるプロテアーゼ機能に有意な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、高病原性IAV出現は、自然宿主である野生水禽と家禽化された鶏の生体内プロテアーゼ環境の違いがトリガーとなっているのではないかと推測した。しかし、野生水禽と家禽のTMPRSS2について、HA開裂に関わるプロテアーゼ機能に有意な差は認められなかった。

一方、遺伝子欠損マウスを用いた生体内プロテアーゼ環境の違いから、野生水禽由来低病原性のIAVが、変異により、新たなプロテアーゼを利用出来ることを実証できたが、これまで報告されている全ての高病原性IAV認められる塩基性アミノ酸の挿入ではなかった。また、HA開裂部位近傍の糖鎖欠失を伴う変異だけでも、新たなプロテアーゼを利用出来ることを確認した。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that TMPRSS2 is an essential host factor for HA cleavage and pathogenicity of a low-pathogenic influenza A virus (IAV) isolated from wild duck using TMPRSS2 gene knockout mice (KO mice) and wild-type mice. In addition, after passages in KO mice, the IAV acquired two amino acid mutations (loss of an oligosaccharide near the HA cleavage site and amino acid substitution to a basic amino acid at the HA cleavage site) and began to undergo cleavage activation of HA in KO mice. On the other hand, there was no significant difference in TMPRSS2 protease-function of HA cleavage between wild duck and domestic poultry.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザAウイルス HA開裂 宿主プロテアーゼ ウイルス変異 TMPRSS2遺伝子欠損マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ A ウイルス (IAV) の感染性獲得には、ウイルス膜蛋白質の HA がプロテアーゼにより蛋白質分解性の修飾 (HA の開裂) を受け、膜融合活性を発現する必要がある。IAV は自身でプロテアーゼ遺伝子を持たないため、HA を開裂できる宿主プロテアーゼを借用する必要があり、IAV 増殖場所はそのプロテアーゼが存在する組織に限定される。

鶏において、HA 開裂部位が mono-basic な IAV の HA 開裂とウイルス増殖は、呼吸器と消化管に限局され、非病原性あるいは低病原性であるため、低病原性トリインフルエンザウイルスと定義され、HA 開裂部位が multi-basic の IAV の HA 開裂とウイルス増殖は、全身に存在するプロテアーゼにより HA が開裂されるため、全身で増殖できるため、致死的な高病原性を示し、高病原性トリインフルエンザウイルスと定義されている。

これまでに mono-basic な季節性 IAV の病原性発現には、呼吸器上皮に発現している膜結合型セリンプロテアーゼ Tmprss2 が必須の宿主プロテアーゼであることを明らかにした (J Virol. 88:5608-16.2014)。つまり、Tmprss2 遺伝子発現を欠損したマウス (Tmprss2 KO マウス) では、HA の開裂が起こらないために、野生型マウス (Tmprss2 遺伝子が発現している) の最小致死量の 1000 倍の感染でも、体重減少すら認められなかった。その継続研究で、Tmprss2 に依存的な H3N2 ウイルス (Tmprss2 KO マウスでは非病原性) が、Tmprss2 KO マウス連続継代 (馴化) により、HA に 1 アミノ酸変異 (糖鎖欠失) を伴い、Tmprss2 KO マウスに致死的なウイルスとなることを明らかにした (J Virol. 89:5154-8.2015)。HA 糖鎖欠失ウイルスは、肺内の Tmprss2 以外の別のプロテアーゼの効率的な利用能を獲得したと考えている。

以上より、申請者は、Tmprss2 KO マウス馴化という『プロテアーゼ環境の変化』により生じた Tmprss2 KO マウス馴化ウイルスは、Tmprss2 以外の新たなプロテアーゼの指向性を獲得したと考えている。

### 2. 研究の目的

IAV の自然宿主である野生水禽 (マガモ等) では、HA 開裂部位が mono-basic な IAV が呼吸器や消化管で維持・保存され、発症はしないと考えられている (発症しない機序は不明)。また、HA 開裂部位が multi-basic な高病原性 IAV においても、通常、致死的な発症をしない (近年の高病原性 IAV 株では、致死的な報告もある)。通常、野生水禽由来 mono-basic IAV は家禽で効率的な感染は起こらず、家禽 (鶏) 群内での継代 (馴化) により、徐々にウイルス増殖性や病原性を獲得する。その中には、塩基性アミノ酸が挿入した multi-basic な変異を持つ IAV が出現し、鶏群で致死性を伴う高病原性を示し、甚大な被害を引き起こす。しかしながら、呼吸器感染での IAV 高病原性化モデルの報告はなく、高病原性化の詳細な機序も不明である。

本申請では、野生水禽から家禽への宿主域の変化に伴う『プロテアーゼ環境の変化』という視点から、マウスモデルと鳥類のプロテアーゼ解析を用いて、IAV の高病原性獲得に必要な宿主因子の同定を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) Tmprss2 KO マウスを用いた IAV 高病原性化モデルの確立・検証

HA 開裂部位が mono-basic な低病原性 IAV (鶏では非病原性株) が、季節性 IAV と同様に Tmprss2 が必須の宿主プロテアーゼであるかの検証を実施した。そのために、野生型マウス馴化株の作出も実施した。低病原性 IAV が、Tmprss2 KO マウスで HA 開裂が効率良く起こらない場合、Tmprss2 KO マウスあるいは Tmprss2 KO マウス由来呼吸器細胞での継代を実施した。その後、Tmprss2 KO マウスあるいは Tmprss2 KO マウス由来呼吸器細胞で HA 開裂、ウイルス増殖、病原性を獲得したならば、ウイルス遺伝子の配列を実施した。

#### (2) カモとニワトリのセリンプロテアーゼの同定及び機能解析

自然宿主の野生水禽由来の IAV は、ニワトリなどの家禽には感染しにくい。本申請では、HA 開裂部位が mono-basic な IAV が開裂するためのプロテアーゼを、Tmprss2 もしくは類似のセリンプロテアーゼに絞り、野生水禽及び家禽のプロテアーゼの同定と HA 開裂の機能解析を実施し、野生水禽と家禽にプロテアーゼ環境の差が認められるか検証した。

### 4. 研究成果

野生水禽から発育鶏卵で分離した HA 開裂部位が mono-basic なアミノ酸配列を持つ低病原性 IAV が、Tmprss2 KO マウスを用いた感染実験で、生体内での HA 開裂、病原性発現に Tmprss2 が唯一必須の宿主因子であることを明らかにした。つまり、Tmprss2 を発現している野生型マウスでは HA が開裂し、効率的なウイルス増殖が認められ、致死性であったが、Tmprss2 KO マウスでは HA 開裂は検出限界以下であり、効率的なウイルスは認められず、非病原性であった。その IAV は、Tmprss2 KO マウスでの継代により、HA に 2 箇所のアミノ酸変異 (HA 開裂部位近傍の糖鎖欠失と HA 開裂部位の塩基性アミノ酸へのアミノ酸置換) を伴い、KO マウス生体内で Tmprss2 以外の新たなプロテアーゼ利用能を獲得し、病原性を発現することを実証した (ウイルス変異の順番も解析した)。これにより、Tmprss2 KO マウスという『プロテアーゼ環境の変化』が、ウイルス変異を誘導したと考えられた。また、HA 開裂部位近傍の糖鎖欠失を有する自然界に存在する H3N2 ウイルスにおいても、Tmprss2 KO マウスで HA 開裂することから、HA 開裂部位近傍の糖鎖欠失と Tmprss2 以外の新たなプロテアーゼ利用能獲得は、IAV の共通原理ではないかと考えられた。本研究で認められた HA 開裂部位の塩基性アミノ酸へのアミノ酸置換は、「HA 開裂部位の伸長の伴わないアミノ酸の置換」であった。これまで、報告されている全ての高病原性 IAV は、「HA 開裂部位の伸長を伴う、塩基性アミノ酸の挿入」であり、本研究のアミノ置換では、こ

れまでの研究報告から、鶏では低病原性と考えられた。

野生水禽(野生マガモ)と家禽(肉用鶏と産卵鶏)の Tmprss2 と ST14 のプロテアーゼの遺伝子配列に差は認められたが、それら各々のプロテアーゼを発現するプラスミド解析において、HA 開裂部位が mono-basic な低病原性 IAV 感染培養細胞において、HA 開裂が認められ、野生マガモと肉用鶏、産卵鶏において、有意な差は認められなかった。培養細胞での解析ではあるが、高病原性 IAV が、野生水禽でなく、家禽のみで出現する理由が、野生マガモと鶏の『プロテアーゼ環境の差』と考え難く、他の因子の存在が推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 酒井宏治	4. 巻 6月号
2. 論文標題 宿主プロテアーゼTMPRSS2とインフルエンザウイルス	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 獣医畜産新報	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 1.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.	4. 巻 6
2. 論文標題 TMPRSS2 independency for haemagglutinin cleavage in vivo differentiates influenza B virus from influenza A virus.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 29430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep29430.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 酒井宏治、永田直也、須崎百合子、竹原一明、網康至
2. 発表標題 変異型インフルエンザウイルスH3N2のHA開裂におけるTMPRSS2利用能と病原性解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kouji Sakai, Naoya Nagata, Kimie Nomura, Takashi Irie, Kazuaki Takehara, Hiroaki Kanda, Yasushi Ami,
2. 発表標題 Role of an oligosaccharide in the hemagglutinin protein on the pathogenesis of H3N2 influenza A virus.
3. 学会等名 The 1st Influenza and other Infections（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井宏治
2. 発表標題 インフルエンザウイルスと宿主プロテアーゼTMPRSS2
3. 学会等名 第8回「SENRIの会」(招待講演)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 酒井宏治
2. 発表標題 宿主プロテアーゼTMPRSS2とインフルエンザウイルス
3. 学会等名 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(招待講演)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 SANGSRIRATANAKUL Natthanan, Kouji Sakai, Miyuki Komura, Masaki Anraku, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Makoto Takeda
2. 発表標題 Roles of TMPRSS2 in human metapneumovirus infection
3. 学会等名 第64回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nathanan Sangsriratnakul、酒井宏治、古村みゆき、駒瀬勝啓、竹原一明、竹田誠
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第159回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 古村みゆき、酒井宏治、Nathanan Sangsriatnaku、網康至、山口良二、駒瀬勝啓、竹原一明、竹田誠
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第159回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 酒井宏治、竹田誠
2. 発表標題 野生水禽由来H7N1の Maus での病原性
3. 学会等名 第30回 インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 酒井宏治、中島典子、駒瀬勝啓、竹田誠
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第57回 日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 酒井宏治、竹田誠
2. 発表標題 インフルエンザウイルスのHAストーク領域糖鎖欠失とプロテアーゼ特異性の変化
3. 学会等名 第57回 日本臨床ウイルス学会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 酒井宏治
2. 発表標題 宿主プロテアーゼとインフルエンザウイルス
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究・学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井宏治
2. 発表標題 インフルエンザウイルスのHA開裂部位近傍の糖鎖欠損と新たな宿主プロテアーゼ利用能の獲得機序の解析
3. 学会等名 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kouji Sakai, Naoya Nagata, Kimie Nomura, Takashi Irie, Kazuaki takehara, Hiroaki Kanda, Yasushi Ami
2. 発表標題 Role of an oligosaccharide in the hemagglutinin protein on protease tropism of H3N2 influenza A virus.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井宏治、永田直也、入江 崇、竹原 一明、網康至
2. 発表標題 インフルエンザウイルスのHA開裂部位近傍の糖鎖欠損と新たなプロテアーゼ利用能の獲得
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井宏治、永田直也、野村起美恵、入江崇、竹原一明、神田浩明、網康至
2. 発表標題 変異型H3N2インフルエンザウイルスの生体内での膜蛋白質開裂機構の解明
3. 学会等名 第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立感染症研究所年報 <a href="https://www.niid.go.jp/niid/ja/annual.html">https://www.niid.go.jp/niid/ja/annual.html</a> 国立感染症研究所 ウイルス第三部 <a href="https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir3.html">https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir3.html</a> researchmap <a href="https://researchmap.jp/read0091853/">https://researchmap.jp/read0091853/</a> researchmap <a href="https://researchmap.jp/read0091853/">https://researchmap.jp/read0091853/</a> 国立感染症研究所 ウイルス第三部 HP <a href="https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir3.html">https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir3.html</a> 国立感染症研究所 ウイルス第三部 平成28年度年報 <a href="https://www.niid.go.jp/niid/images/annual/h28/201603.pdf">https://www.niid.go.jp/niid/images/annual/h28/201603.pdf</a> 国立感染症研究所 ウイルス第三部 <a href="https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir3.html">https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir3.html</a>
---

6. 研究組織		
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)
		備考