

## 118. インフルエンザウイルス HA ストークの糖鎖機能の解明

酒井 宏治

国立感染症研究所 ウイルス第三部

Key words : インフルエンザ A ウイルス, HA ストーク, プロテアーゼ, 共通抗原

### 緒言

インフルエンザ A ウイルス (IAV) の表面には HA と NA の 2 つの糖タンパク質がある。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る。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。これまでに、TMPRSS2 遺伝子発現を欠損したマウス (*TMPRSS2* 遺伝子欠損マウス) を用いて、季節性 IAV の H1N1 や H7N9 の原発性ウイルス肺炎の病原性発現 (HA 開裂) には、呼吸器上皮に発現するセリンプロテアーゼの TMPRSS2 が必須の宿主因子 (宿主プロテアーゼ) であることを明らかになっている<sup>1-3)</sup>。しかし、季節性 IAV の H3N2 については、研究グループ間において、*TMPRSS2* 遺伝子欠損マウスでの病原性、ウイルス増殖性などの TMPRSS2 依存性の結果が異なっていた。

一方、感染性獲得に重要な HA は、感染防御抗原としても重要であり、HA 抗原を効率よく認識する抗体があれば、感染防御することができる。しかしながら、季節性 IAV は HA の抗原性を変異させ (連続変異)、毎年世界中で流行している。これまでの季節性 IAV は、受容体結合部位である HA タンパク質球状部領域の糖鎖修飾による、抗体からの免疫回避機構が知られている。更に Ekiert らの研究から、H3 亜型の HA のストーク領域には、異なる亜型間にまたがって中和能を有する共通抗原のエピトープが存在することが報告されている<sup>4)</sup>。

本研究では、①「HA 開裂部位近傍の HA ストーク領域の糖鎖欠損によるプロテアーゼ指向性の変化」と②「HA ストーク糖鎖による共通抗原エピトープのシールド機能」について、解析を試みた。

### 方法

#### 1. HA ストーク糖鎖欠損ウイルスの *TMPRSS2* 遺伝子欠損マウスでの病原性の解析

H3N2 の HA ストーク領域には、8 位、22 位、38 位の糖鎖修飾部位があるが、2015 年から 2017 年 3 月までに登録されているデータベースを用いて、8 位あるいは 22 位あるいは 38 位の糖鎖を欠損した季節性インフルエンザが自然界に存在するか検索した。次に、HA ストーク糖鎖欠損ウイルスと親株の TMPRSS2 依存性 HA ストーク糖鎖付加ウイルスを用いて、野生型マウスと *TMPRSS2* 遺伝子欠損マウスの肺への感染実験より、プロテアーゼ指向性、ウイルス増殖性について、糖鎖修飾の意義を解析した。

#### 2. TMPRSS2 非依存性 HA ストーク糖鎖欠損ウイルスの開裂プロテアーゼの同定の試み

TMPRSS2 非依存性 HA ストーク糖鎖欠損ウイルスと親株の TMPRSS2 依存性 HA ストーク糖鎖付加ウイルスを用いて、トリプシン非存在下 MDCK 細胞及び LoVo 細胞でのウイルス増殖能、TMPRSS13、Matriptase による HA 開裂能、TMPRSS4、TMPRSS13、Matriptase 等の siRNA を用いたプロテアーゼ利用能の解析を実施した。

#### 3. HA ストーク糖鎖による共通抗原エピトープのシールド機能の解析

HA ストーク 8 位糖鎖欠損ウイルス及び親株に対する抗血清を作製し、それら抗血清と親株と抗原性の違う様々な H3N2 亜型分離株 (A/Switzerland/9715293/2013 株、A/Indiana/07/2012 株、A/Aichi/116/2013 株、A/Hiroshima/

21/2013株)、あるいはH3亜型とは異なるがHA系統解析で同じGroup2に分類されるH7亜型ウイルス株とのウイルス中和能解析により、HAストーク糖鎖欠損ウイルスの抗原性を解析した。

### 結果および考察

H3N2季節性インフルエンザウイルスのHAストーク糖鎖欠損ウイルスは、登録されている2016年1月から12月までの6,650株、2017年1月から3月までの1,775株のうち、8位の糖鎖欠損ウイルスが146株(1.7%)を確認できたが、22位及び38位の糖鎖欠損ウイルスは確認できなかった。22位及び38位の糖鎖が存在する領域は、プロテアーゼによる開裂後、pHの低下に伴い、 $\beta$ シートから $\alpha$ ヘリックスへと膜融合には必須の構造変化する領域であり、非常に高い保存性が求められる。ウイルスの感染性保持のために、変異の導入された22位及び38位の糖鎖欠損ウイルスは感染性を失い、そのため自然界に存在できないウイルスではないかと推測された。

糖鎖の付加されている親株のウイルス感染では、野生型マウスのLD50の10倍に相当するウイルス量感染時においても、*TMPRSS2*遺伝子欠損マウスでは致死や発症、顕著な体重変動は認められなかったが、8位糖鎖欠損ウイルスでは、*TMPRSS2*遺伝子欠損マウスは野生型マウスと同様に著しい体重減少、致死が認められた(図1)。

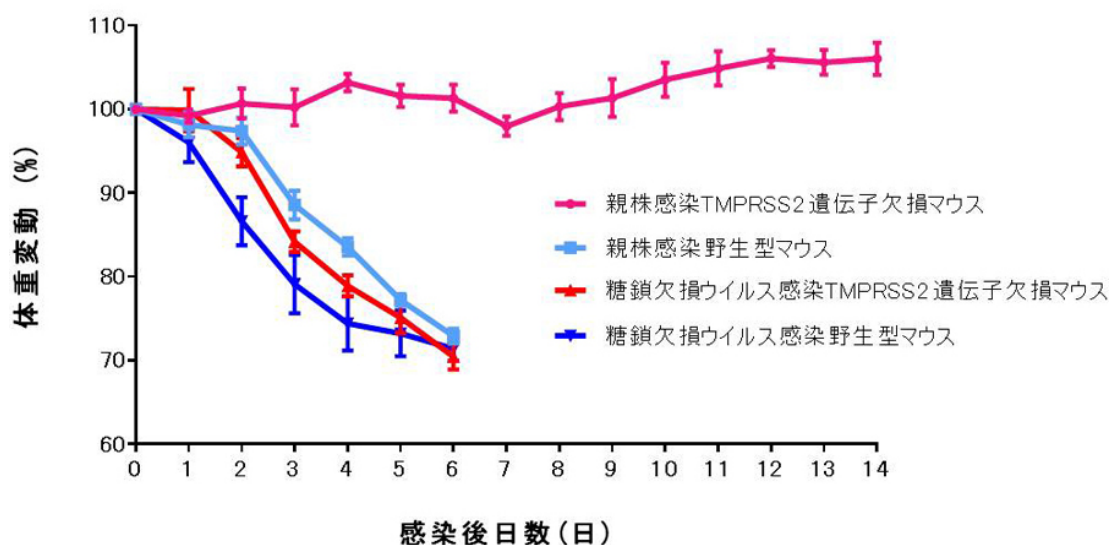


図1. ウイルス感染後の体重推移

親株及び8位糖鎖欠損ウイルス感染後のマウスの体重推移。親株感染野生型マウスは著しい体重減少を伴い、致命的経過を示したが、親株感染 *TMPRSS2* 遺伝子欠損マウスでは、発症や体重変動もなく、全て生存した(親株は *TMPRSS2* 依存性)。一方、8位糖鎖欠損ウイルス感染 *TMPRSS2* 遺伝子欠損マウスでは、8位糖鎖欠損ウイルス感染野生型マウスと同様に、著しい体重減少を伴い、致命的経過を示した(8位糖鎖欠損ウイルスは *TMPRSS2* 非依存性)。

また、親株と異なり、8位糖鎖欠損ウイルスでは、*TMPRSS2*遺伝子欠損マウス感染肺において、野生型マウスと同様に、HAタンパク質の開裂(HA0からHA1とHA2への開裂)が認められた(図2)。

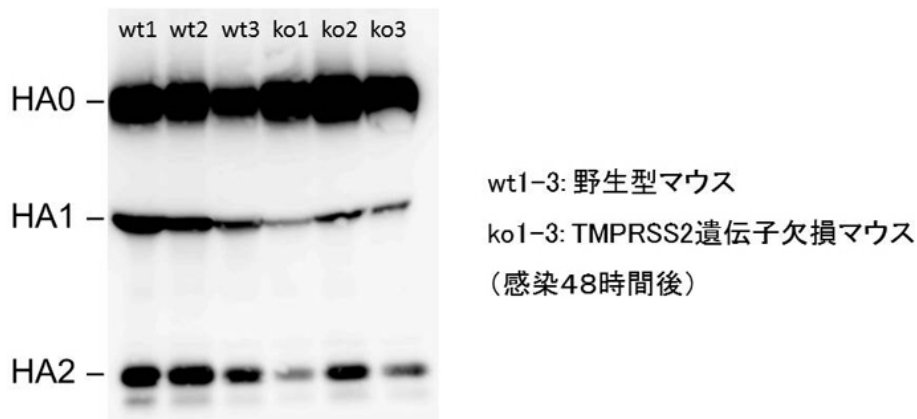


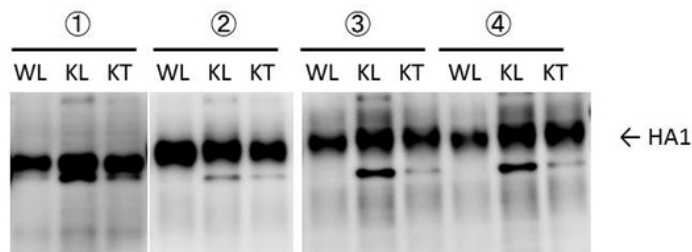
図2. 感染肺での HA 開裂

8 位糖鎖欠損ウイルス感染 48 時間後のマウス肺における HA 開裂像。野生型マウス (wt1, 2, 3) と同様に、TMPRSS2 遺伝子欠損マウス (ko1, 2, 3) においても、HA の開裂 (HA0 →HA1、HA2) が認められた。

つまり、用いたマウス馴化株という実験室株では、HA ストック領域の 8 位の糖鎖の有無がプロテアーゼ指向性、マウスでの病原性に関与してことが示された<sup>5)</sup>。また、H7N1 のマウス馴化実験室株では、H3N2 実験室株と同様に、HA 開裂部位の近傍の糖鎖欠失を伴い、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスでの病原性、感染肺での HA 開裂が認められたことから、亜型に関わらず、HA 開裂部位の近傍の糖鎖欠失は、プロテアーゼ指向性に大きく関与することが示唆された。

8 位糖鎖欠損ウイルスは、親株と異なり、トリプシン非存在化 MDCK 細胞でプラック形成能を有することから、furin が利用プロテアーゼとして考えられたが、LoVo 細胞と furin を用いた解析では、その利用能を明らかにすることは出来なかった。また、発現細胞において、TMPRSS13、Matriptase による 8 位糖鎖欠損ウイルスの HA 開裂が認められたため、siRNA を用いて HA 開裂効率の変化を解析したが、実施した条件では、HA 開裂効率の有意な減少は認められず、8 位糖鎖欠損ウイルスが新たに利用できるようになったプロテアーゼを同定することはできなかった。また、TMPRSS2 非依存性 H3N2 の実験室株を用いた研究で、野生型マウスに比べ、TMPRSS2 と TMPRSS4 の両遺伝子欠損マウスで致死性の有意な低下が最近報告された<sup>6)</sup>が、両遺伝子欠損マウスでも十分な体重減少を示していることから、TMPRSS4 も関与はしているが HA 開裂の主要プロテアーゼではないことが推測された。更に、B 型インフルエンザウイルスを用いた研究でも、本研究の 8 位糖鎖欠損ウイルスと同様に、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスにおいて、TMPRSS2 以外のプロテアーゼにより HA 開裂能が認められた<sup>7)</sup>ため、今後、これらウイルスの利用しているプロテアーゼについて更なる研究が必要である。

他の研究グループ<sup>1, 2)</sup>が用いた H3N2 の実験室株では、TMPRSS2 遺伝子欠損マウスでも病原性を示したことから、本研究では、臨床分離株 (A/Indiana/07/2012 株、A/Yamaguchi/39/2013 株、A/Aichi/116/2013 株、A/Hiroshima/21/2013 株) を用いて、8 位の糖鎖の有無とプロテアーゼ指向性について解析した。いずれの臨床分離株の TMPRSS2 遺伝子欠損マウス感染肺においても、HA 開裂は検出限界以下であった。用いた臨床分離株は、マウス馴化した実験室株と異なり、マウス肺で効率よく増殖することができないことが考えられたため、TMPRSS2 遺伝子欠損マウス肺由来細胞、気管由来細胞を作製し、高力価感染時の HA の開裂能を解析したところ、いずれの臨床分離株でも、野生型マウス肺由来細胞と同様に HA1 が検出された (図 3)。



① A/Indiana/07/2012  
 ② A/Yamaguchi/39/2013  
 ③ A/Hiroshima/21/2013  
 ④ A/Aichi/116/2013

WL: 野生型マウス肺細胞  
 KL: TMPRSS2遺伝子欠損マウス肺細胞  
 KT: TMPRSS2遺伝子欠損マウス気管細胞  
 (感染48時間後)

図3. マウス由来細胞での HA 開裂

8位糖鎖欠損ウイルス (A/Indiana/07/2012株、A/Yamaguchi/39/2013) と糖鎖付加ウイルス (A/Hiroshima/21/2013、A/Aichi/116/2013) 感染48時間後のマウス由来細胞 (WL: 野生型マウス肺細胞、KL: TMPRSS2遺伝子欠損マウス肺細胞、KT: TMPRSS2遺伝子欠損マウス気管細胞) における HA 開裂像。8位糖鎖の有無に関わらず、全て臨床分離株において、HA 開裂後の HA1 を検出した。

また、TMPRSS2発現 HeLa 細胞では、8位糖鎖欠損ウイルスの A/Indiana/07/2012株で効率的な HA の開裂が認められた。マウスと培養細胞という異なる感染実験系を考慮する必要もあるが、8位糖鎖欠損ウイルスの A/Yamaguchi/39/2013株と8位糖鎖付加ウイルス A/Aichi/116/2013株については、HA の8位糖鎖の有無以外、膜タンパク質である HA と NA の配列が一致しているにもかかわらず、TMPRSS2遺伝子欠損マウス肺由来細胞、気管由来細胞、TMPRSS2発現 HeLa 細胞で HA 開裂に有意な差が認められなかったことから、HA ストック領域の8位糖鎖の有無のみが TMPRSS2 のプロテアーゼ指向性を決定していないことが示唆された。

HA ストック糖鎖欠損ウイルス及び親株に対する抗血清を用いたウイルス中和能解析では、すべての抗血清で親株と同一の抗原性ウイルスには高い中和能を示したが、親株とは抗原性の異なる H3N2 亜型分離株、H7N1 亜型分離株、いずれの分離株に対しても中和能は認められなかった。本研究期間中に、本研究と同様の研究が報告された<sup>8)</sup>。その報告において、H1N1 及び H5N1 の HA1 の3か所の糖鎖を欠損させた組換え抗原は、モノクローナル抗体を用いた抗原性解析により、球状部領域への抗原性は親株と同等に維持していたが、ストック領域への抗原性は親株に比べ有意に低下していたことが明らかとなった<sup>8)</sup>。本研究の H3N2 についても、同様のことが推測され、HA タンパク質の球状部領域への抗体認識が強く、目的とする HA タンパク質のストック領域への効率的な抗体産生が行われなかったことが考えられた。

## 文 献

- 1) Hatesuer B, Bertram S, Mehnert N, Bahgat MM, Nelson PS, Pöhlmann S, Schughart K. Tmprss2 is essential for influenza H1N1 virus pathogenesis in mice. PLoS Pathog. 2013;9(12):e1003774. PMID: 24348248
- 2) Tarnow C, Engels G, Arendt A, Schwalm F, Sediri H, Preuss A, Nelson PS, Garten W, Klenk HD, Gabriel G, Böttcher-Friebertshäuser E. TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. J Virol. 2014 May;88(9):4744-51. PMID: 24522916
- 3) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzuki Y, Aina 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. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. J Virol. 2014 May;88(10):5608-16. PMID: 24600012

- 4) Ekiert DC, Friesen RH, Bhabha G, Kwaks T, Jongeneelen M, Yu W, Ophorst C, Cox F, Korse HJ, Brandenburg B, Vogels R, Brakenhoff JP, Kompier R, Koldijk MH, Cornelissen LA, Poon LL, Peiris M, Koudstaal W, Wilson IA, Goudsmit J. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science*. 2011 Aug 12;333(6044):843-50. PMID: 21737702
- 5) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol*. 2015 May;89(9):5154-8. PMID: 25673722
- 6) Kühn N, Bergmann S, Kösterke N, Lambertz RL, Keppner A, van den Brand JM, Pöhlmann S, Weiß S, Hummler E, Hatesuer B, Schughart K. The Proteolytic Activation of (H3N2) Influenza A Virus Hemagglutinin Is Facilitated by Different Type II Transmembrane Serine Proteases. *J Virol*. 2016 Apr 14;90(9):4298-307. PMID: 26889029
- 7) Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. TMPRSS2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus. *Sci Rep*. 2016 Jul 8;6:29430. PMID: 27389476
- 8) Liu WC, Jan JT, Huang YJ, Chen TH, Wu SC. Unmasking Stem-Specific Neutralizing Epitopes by Abolishing N-Linked Glycosylation Sites of Influenza Virus Hemagglutinin Proteins for Vaccine Design. *J Virol*. 2016 Sep 12;90(19):8496-508. PMID: 27440889