

A型インフルエンザウイルスの病原性を決定する ノイラミニダーゼの新規機能に関する研究

五藤 秀男

東京大学医科学研究所感染・免疫部門ウイルス感染分野

A型インフルエンザウイルスにおいて赤血球凝集素(HA)の開裂は感染性に不可欠であるため、HAはウイルスの病原性を決定する重要な因子である。トリインフルエンザウイルスでは、病原性に関与するHAの役割についてよく調べられてきたが、哺乳動物由来インフルエンザウイルスでは、ほとんど未解決の問題である。著者らは、ヒト由来でマウスの経鼻接種において呼吸器以外の多臓器で感染増殖するA/WSN/33(WSN)株を病原性解析のモデルとした。解析の結果、WSN株のノイラミニダーゼ(NA)がシアリダーゼ活性とは関係なく、細胞表面でplasminogen受容体として機能してplasminへの活性化を促進し、HAを開裂することを見いだした。さらに、NAとplasminogenの結合には、カルボキシル末端のLysの存在と146番の糖鎖付加の欠損が必要であることがわかった。リバーシ・ジェネティクス法で作製したplasminogen結合活性を欠損させたNAをもつ変異ウイルスは、マウスに対し弱毒化した。これらの結果から、NAのプラスミノゲン受容体としての新規機能はWSN株の病原性を決定すると結論した。

1. はじめに

A型インフルエンザウイルスは毎年冬期に急性呼吸器疾患を引き起こすインフルエンザ(流行性感冒)の原因であり、我々人類にとって身近なウイルスの一つである。しかし、近年小児におけるインフルエンザ脳症の問題や2003年から2004年にかけて東アジアの広い範囲で発生している高病原性トリインフルエンザウイルスの流行とそのヒトへの感染により、A型インフルエンザウイルスは新興再興感染症の病原体としてその重要性が再認識されるようになった。

A型インフルエンザウイルスの病原性に関しては、強毒型と弱毒型が存在するトリインフルエンザウイルスでは、その分子機構が明らかにされているが¹⁾、哺乳動物由来、特にヒトインフルエンザウイルスでは、未だほとんど解っていない。病原性発現機構の分子レベルでの説明は、予防法や治療法の開発に貴重な情報を提供することから、

感染症研究の重要な課題である。このような観点から、筆者らはヒトインフルエンザウイルスの病原性発現機構の解明を目指し、ヒト由来インフルエンザウイルスの中で特徴的な性状を持つA/WSN/33(WSN)株をモデルとして解析を行ってきた。WSN株の病原性に関しては、1980年に杉浦昭先生らによりウイルス構造蛋白質であるノイラミニダーゼ(NA)が決定因子であることが発見されたが、その後20年以上の間、その機構の詳細に関しては不明であった。筆者らは分子生物学的手法とリバーシ・ジェネティクス法を用いることにより、WSN株のNAに新規機能を見だし、さらにその機能がウイルスの病原性に深く関与することを明らかにした。

本稿では、そのWSN株NAの新規機能とウイルス病原性への関与について、これまでの研究の背景と内容を紹介する。

2. A型インフルエンザウイルス

A型インフルエンザウイルスは、オルソミキソウイルス科に分類されるRNAウイルスであり、ヒト、ウマ、ブタ、野生の水禽類、アザラシやクジラなどの海獣類に広く分布する²⁾。ウイルス粒子は球形または多型性を示し、ゲノムである8本の分節状マイナス一本鎖RNAが核蛋白質複合体(RNP)としてエンベロープに被われる(図1)。

連絡先

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1
TEL: 03-5449-5431
FAX: 03-5449-5408
E-mail: hgoto@ims.u-tokyo.ac.jp

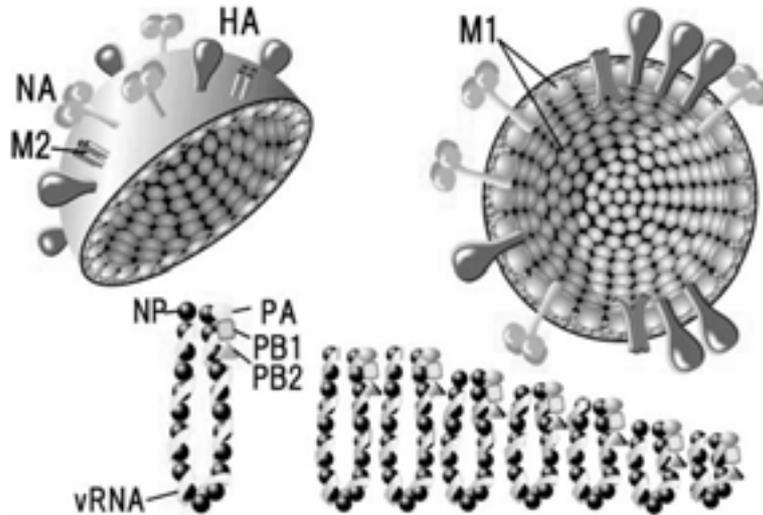


図1 A型インフルエンザウイルスの構造

各ゲノム分節は1ないし2個の蛋白質をコードし、感染細胞内では合計10種類のウイルス蛋白質が合成される³⁾。ウイルスの感染は、エンベロープに突出する赤血球凝集素(HA)が細胞表面のレセプターであるシアル酸と結合することで開始される。エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたウイルスはエンドソームに至り⁴⁾、そこでエンベロープと細胞膜の融合によりRNPを細胞質に放出する。RNPは核内に移動し、ウイルス由来のRNA依存性RNAポリメラーゼ(PB1, PB2, PA)により転写と複製を行う⁵⁾。転写されたRNAはCapとポリAテールが付加され、mRNAとしてウイルス蛋白質の合成を行う。複製されたゲノムRNAはNPとPB1, PB2, PAと共にRNPを構築する。核内で複製されたRNPはM1およびNS2蛋白質により細胞質に輸送され^{6,7)}、細胞膜で発現しているHA, NA, そしてM2蛋白質と細胞の脂質二重膜に被われ出芽する⁸⁾。

3. HAの開裂はウイルス病原性を決定する

エンベロープに存在するHAは感染初期のレセプターへの結合と膜融合で機能するため、A型インフルエンザウイルスの病原性を考える上で、HAは最も重要な分子である。HAはウイルスゲノムから一本鎖のポリペプチドHA0として合成されるが、HA0には膜融合能がないためHA0のみを持つウイルスは感染性がない。ウイルスが感染性を獲得するためにはHA0が宿主由来の蛋白質分解酵素により特定の部位で開裂を受け、HA1とHA2のサブユニットに開裂される必要がある⁹⁾。ウイルス粒子がエンドソームに到達すると低pHの影響によりHAの構造が変化し、HA2のN末端に露出したfusion peptideが細胞

膜に進入し膜融合が開始されるためである¹⁰⁾。

HAの開裂と同じく宿主由来蛋白質分解酵素もウイルスの感染性を決定する因子であり、他のパラミキソウイルスと同様にその生体内分布は病原性の発現と深く関与する¹¹⁾。このことは、トリインフルエンザウイルスにおいてよく調べられてきた。家禽では、呼吸器と消化管でのみ感染増殖し病原性を示さない弱毒型トリインフルエンザウイルスと全身の臓器で感染増殖し100%近い死亡率を示す強毒型トリインフルエンザウイルスが存在する。これらのウイルス病原性の違いは、HAを開裂する宿主蛋白質分解酵素の生体内分布であることが証明された¹²⁾。すなわち、弱毒型ウイルスのHAは呼吸器と消化管に局在する蛋白質分解酵素により開裂されるが、強毒型ウイルスのHAは全身の臓器で発現する蛋白質分解酵素により開裂されるためである。これまでに、強毒型ウイルスのHAを開裂する蛋白質分解酵素としてsubtilisin様蛋白質分解酵素であるfurinとPC6が同定された^{13,14)}。

では、弱毒型と強毒型ウイルスのHAの開裂の違いは何が規定しているのだろうか。それは、HAの開裂部位のアミノ酸配列と蛋白質分解酵素の基質特異性により説明される。弱毒型ウイルスのHAが単一のArgを開裂部位に持つに対し、強毒型ウイルスのHAは、ArgまたはLysの塩基性アミノ酸が連続した特徴的な配列を開裂部位に持つ。この連続した塩基性アミノ酸の配列がfurinとPC6の基質として認識される。すなわち、HAの構造とHAを開裂する蛋白質分解酵素の組み合わせが、最終的にウイルスの病原性を決定する。

ヒトで流行するH1型およびH3型インフルエンザウイルスは、それらHAの開裂部位が単一のArgであり、開

裂する酵素が呼吸器に局在するため呼吸器疾患となる。

4. A/WSN/33株の特徴的な生物性状

WSN 株はインフルエンザの研究において世界中の研究室で古くから実験に用いられてきた標準的なウイルスである。WSN 株は1933年にヒトから分離された A/WS/33株を様々な宿主に馴化させた後、最終的にマウス脳内接種の継代により確立された^{15,16)}。WSN 株はマウスの脳内接種で病原性を示すことから神経病原性ウイルスとして、中枢神経系に感染する A 型インフルエンザウイルスのモデルとして研究の対象となった。1993年には、WSN 株を経鼻接種されたマウスでは呼吸器以外の臓器でもウイルスが増殖することが報告され、このウイルスのトロピズムは中枢神経系に限定しないことが示された¹⁷⁾。また、WSN 株は培養細胞での増殖でも特徴的である。一般的に A 型インフルエンザウイルスの培養細胞での増殖には HA を開裂するために trypsin を培養液に添加する¹⁸⁾。しかし、WSN 株は trypsin 非存在下でも効率よく増殖する¹⁹⁾。これらの生物性状は、細胞で発現する furin や PC 6 を利用して HA を開裂する強毒型トリインフルエンザウイルスと類似する。しかし、WSN 株 HA の開裂部位は furin と PC 6 の基質として認識されない単一の Arg であり、上述の弱毒型ウイルスに相当する。インフルエンザウイルスの感染性獲得には HA の開裂が不可欠であることから、WSN 株には強毒型トリインフルエンザウイルスとは異なる新たな HA の開裂機構が存在する。

5. NA により決定される WSN 株の生物性状

上述の WSN 株の性状は研究対象として古くから扱われてきた。A 型インフルエンザウイルスは分節状のゲノムを持つため、一つの細胞に 2 種類の異なるウイルスが同時に感染すると、一部のゲノム分節を交換した reassortant ウイルスができる。この方法を用い、1977年に、WSN 株が培養細胞において trypsin 非存在下での増殖する性状は NA 分節が決定することが明らかにされた²⁰⁾。さらに、1980年には、同様の手法を用い Sugiura and Ueda は、WSN 株と神経病原性を持たないウイルスとの間で様々な組み合わせの reassortant ウイルスを作製し、神経病原性が WSN 株の NA 分節により決定されることを発見した²¹⁾。これらの報告は、WSN 株の HA 開裂機構には NA が関与することを示唆した。

では、NA はいかにして WSN 株の HA 開裂に影響を与えているのか。NA は HA と同じくエンベロープに突出する膜貫通型の糖蛋白質であり、その主要な機能はシアリダーゼである²²⁾。シアリダーゼは糖蛋白質や糖脂質の糖鎖末端の糖とシアル酸の結合を切断する反応を触媒する酵素であり、NA のウイルス増殖における機能は、細胞表面やエンベロープに存在するシアル酸を取り除くことにより、細

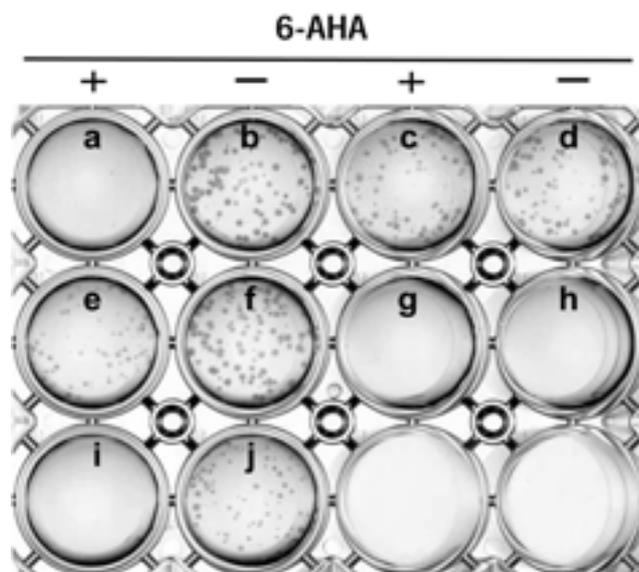


図2 蛋白質分解酵素存在下での WSN 株の増殖
WSN 株感染 MDBK 細胞を以下の条件で培養しプラークを形成させた後、抗 WSN 株抗体で免疫染色した。コントロールは培養液のみである。0.5 μ g/ml plasminogen (a, b), 0.5 μ g/ml plasmin (e, f), 0.1%FCS (i, j), 0.5 μ g/ml TPCK-trypsin (c, d), コントロール (g, h)

胞から出芽したウイルス粒子の遊離を容易にすることである²³⁾。しかし、シアリダーゼ活性では HA 開裂における NA の役割を十分説明することができない。

6. WSN 株の感染により plasminogen が活性化される

WSN 株がマウスの多臓器で感染増殖することは、HA を開裂する蛋白質分解酵素もそれら臓器に分布すると考えられる。そこで、蛋白質分解酵素の同定を行った。セリンプロテアーゼである plasmin は、WSN 株 HA の開裂部位である単一の Arg を認識し実験的に開裂することが既に報告されている^{24,25)}。Plasmin は前駆体 plasminogen として血流を介して全身を循環し、組織中へ浸潤することから、WSN 株の HA を開裂する蛋白質分解酵素の候補として検討した。生理的条件下の生体内では plasmin は酵素活性を持たない plasminogen として存在し、線溶反応など必要に応じて plasminogen から活性化される²⁶⁾。したがって、plasmin が HA を開裂するためには WSN 株の感染と同時に plasminogen が活性化される必要がある。WSN 株を感染させた MDBK 細胞を plasminogen 存在下で培養すると、既に酵素活性を持つ plasmin や trypsin 存在下と同様にプラークを形成する。このとき、plasminogen から plasmin への活性化を阻害する ϵ -Amino-n-caproic acid (6-AHA) を培養液に加えると、plasminogen 存在下で WSN 株のプラーク形成は阻害される(図2)。すなわち、WSN 株はその増殖の過程で plasminogen を活性化し、plasmin の酵素活性を利用して HA を開裂し感染を広げる

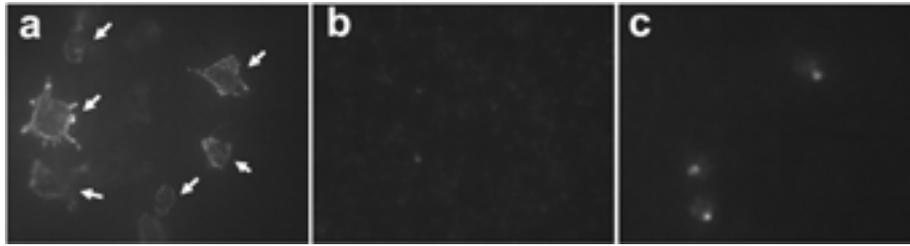


図3 WSN株NA発現細胞での plasminogen の結合
Alexa Fluor488をラベルした plasminogen を以下の細胞に重層した. a, NA発現COS7細胞, b, HA発現COS7細胞, c, 空の発現プラスミドをトランスフェクトしたコントロールCOS7細胞.

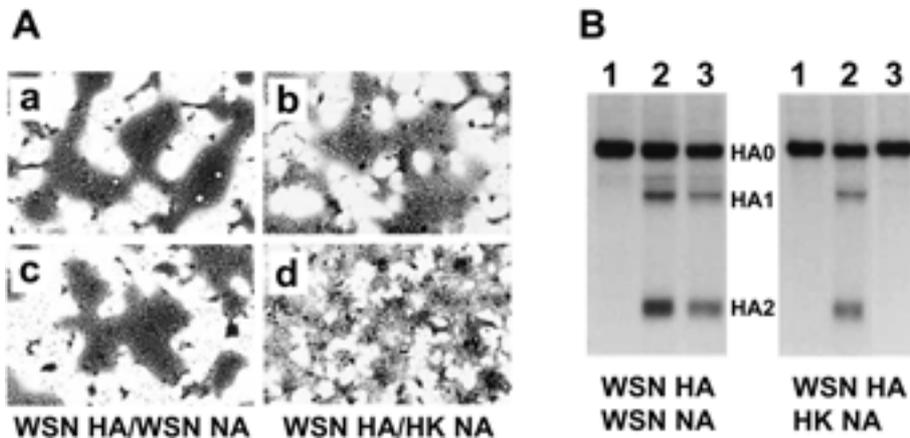


図4 WSN株HA, HA共発現による細胞融合とHAの開裂
A, HA/NA共発現293T細胞を trypsin (a,b) または plasminogen (c,d) 存在下で培養後, pH5.0のバッファーで処理した. HK NAはA/Hong Kong/1/68株由来N2型NA.
B, HA/NA共発現細胞を³⁵S-methionineでラベル後, trypsin (レーン2) または plasminogen (レーン3)で処理し, HAを免疫沈降した. レーン1は非処理コントロール.

ことが考えられた. したがって, WSN株はマウスの体内でも同様に plasminogen を活性化しているものと考えられた. また, 培養細胞では培養液中の血清が plasminogen の供給源となり WSN株の trypsin 非依存性の増殖を可能にしていると考えられた.

7. NAは plasminogen 受容体である

以上の結果から, WSN株の plasminogen 活性化にはNAが関与することが示唆された. このNAが関与する plasminogen 活性化の機構を解明するためには, 生体内での plasminogen 活性化の機構を知る必要がある. 細胞表面での plasminogen 活性化については活性化因子や阻害因子など多くの因子が複雑に関与する²⁷⁾. ここではごく簡単に説明する. Plasminogenは血液中や組織間液中では遊離した状態で存在するが, 活性化を受けるためには細胞表面の plasminogen 受容体と呼ばれる分子と結合し, 同様に細胞表面に存在する plasminogen 活性化因子である urokinase-type plasminogen activator (u-PA) により開裂されな

ければならない²⁸⁾. 活性化された plasmin は, 遊離の状態になると α 2-antiplasmin により速やかに不活化されるために, plasmin は酵素活性を維持するために plasminogen 受容体と結合した状態で存在する必要がある. したがって, plasminogen 受容体は plasminogen の活性化と plasmin の維持に必要な重要な分子である. plasminogen 受容体はある特定の分子ではなく plasminogen と結合する分子群の総称であるが, それらの中にはカルボキシル (C-) 末端が Lys である特徴を持つ分子が含まれる²⁹⁾. Plasminogen は Lys に対し親和性をもつ5個のクリングルドメインを持ち, 受容体の C-末端 Lys を介して結合する³⁰⁾.

WSN株のNAの構造を考えると plasminogen 受容体との類似を見いだすことができた. すなわち, NAのC-末端である456番目のアミノ酸はLysであり, かつNAはType II transmembrane proteinでそのC-末端を細胞表面に露出する. このことから, NAが plasminogen 受容体として機能することを仮定し実験を行った. まず, NAを単独で発現する細胞に plasminogen が結合することを示し

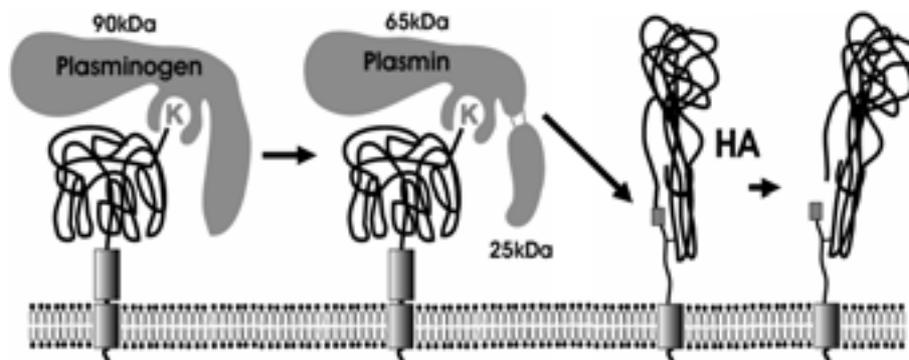


図5 細胞表面におけるNAのplasminogen受容体としての機能とHAの開裂のモデル

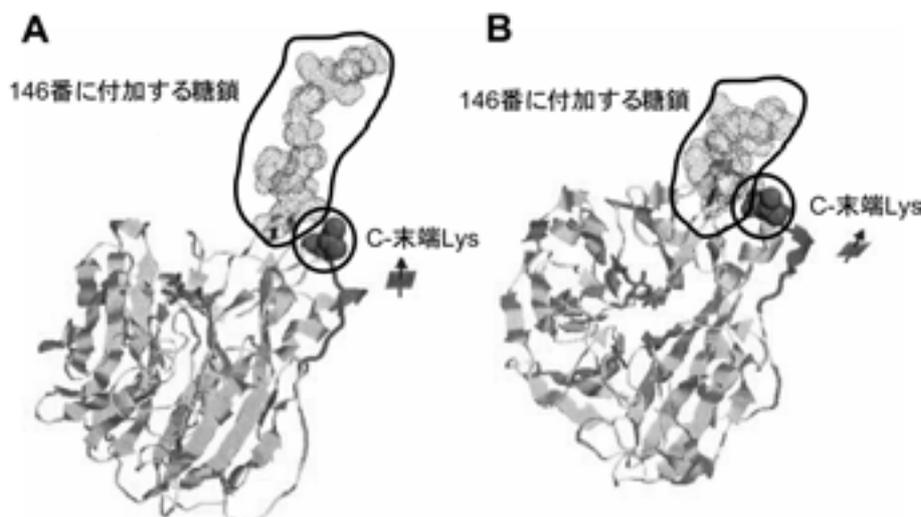


図6 NA分子の立体構造
NA分子の頭部を側面(A), 上から(B)見た. Vargheseらにより決定されたA/Tokyo/3/67株のNA(N2)のX線構造解析の結果を基にした³⁷⁾.

た(図3). 次に, HAとNAの共発現細胞をplasminogenで処理するとHAが開裂し, さらにその細胞を低pH処理すると細胞が融合することを確認した³¹⁾(図4). これらの実験においてplasminogenが結合すると考えられるC-末端のアミノ酸がIleであるA/Hong Kong/1/68株由来のNAを用いた時や, WSN株NAのC-末端をLysからArgまたはLeuに置換した変異NAを用いた時では, plasminogenの結合, HAの開裂, そして細胞融合は認められなかった³¹⁾. また, NAの226番目のアミノ酸に変異を持ちシアリダーゼ活性が欠損した変異NAを用いた時は, 元のNAと同様に細胞融合が観察された. これらの結果から, 細胞表面のNAはそのC-末端Lysを介してplasminogenと結合してplasminへの活性化を促進し, plasminはHAを開裂して膜融合能を付与することが明らかとなった(図5). そして, NAとplasminogenの結合はシアリダーゼ活性が関与しないことから, NA分子の持つ新規

の機能である.

8. NAがplasminogen受容体として機能する分子機構

WSN株が属するN1型のNAでは, C-末端のLysが保存されているにもかかわらず, NAによるplasminogen活性化はWSN株に特徴的である³¹⁾. すなわち, C-末端Lysの他にplasminogen受容体として機能するための条件が必要である. NAのアミノ酸配列を比較すると, WSN株が唯一146番の, 他のNAでは保存されている糖鎖付加シグナルを欠損していることがわかる. また, Liらは, NAの146番の糖鎖付加がWSN株の神経病原性を低下させることを報告しており³²⁾, この糖鎖付加の有無がplasminogen活性化に重要であることが予想された. WSN株NAの146番に糖鎖付加シグナルを持つ変異NAを用いて調べた結果, HAとの共発現細胞が融合するためには, もとのNAに比べ100倍の濃度のplasminogenが必要であること

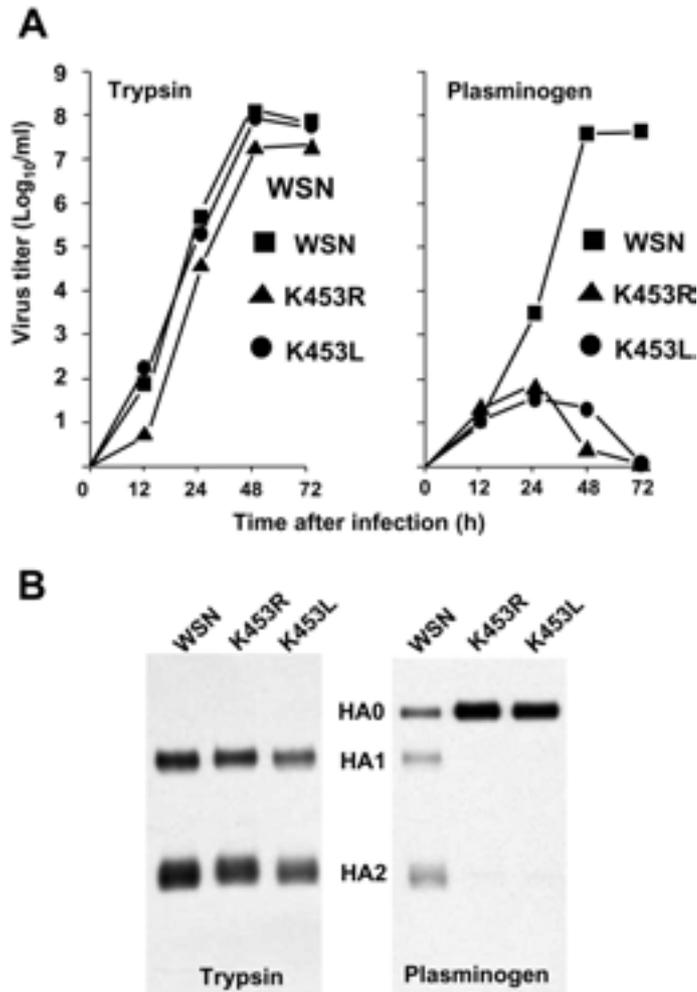


図7 NA変異ウイルスの培養細胞での増殖
A, MDBK細胞における trypsin または plasminogen 存在下のウイルス増殖曲線. B, Aの条件で増殖したウイルスを³⁵S-methionineでラベルし, HAを免疫沈降した.

がわかった³¹⁾. したがって, 146番の糖鎖付加が plasminogenの活性化に阻害的に作用することが示された. この糖鎖付加による plasminogen 活性化の阻害の機構は, NAの立体構造から説明される(図6). 146番に付加する糖鎖はC-末端 Lysの近傍に位置する. したがって, 146番に付加する糖鎖が plasminogenのC-末端 Lysへの結合を構造的に阻害していることを考えるのは容易である.

9. NAの plasminogen 受容体機能はウイルスの病原性を決定する

次に, これまでの結果から構築された plasminogen 活性化のモデルが実際にウイルスの病原性に関与するか否かを調べる必要がある. このために, リバース・ジェネティクス法を用い³³⁾, plasminogen 受容体の機能を欠損させたNAを持つ変異WSN株を作製した. plasminogen 受容体の機能を欠損させるためにNAのC-末端 Lysを Arg また

は Leu に置換した (K453R, K453L). これらの変異ウイルスは, 培養細胞において trypsin 存在下では WSN 株と同程度に増殖するのに対し, plasminogen 存在下では増殖できなかった(図7). 変異ウイルスのHAは plasminogen 存在下では開裂しなかったことから, 変異ウイルスの感染では plasminogen が活性化されないことが確認された. マウスの感染実験では, 変異ウイルスの経鼻接種による50%致死量が WSN 株に対し増加した(表1). さらに, 呼吸器以外の臓器での増殖を調べるために脳内接種を行った結果, 変異ウイルスの増殖は検出できなかった(表2)³⁴⁾. 以上の結果から, NAの plasminogen 受容体機能の欠損により WSN 株の病原性が弱毒化されたことが示された.

10. WSN 株の病原性発現のモデルとその意味

これまでの結果から, NAの新規機能である plasminogen 受容体機能はウイルスの病原性を決定する重要な因子

表1 NA 変異ウイルスのマウス病原性

Virus	PFU (log ₁₀ /ml)
WSN	4.4
K453R	7.3
K453L	7.2

経鼻接種

であることが明らかとなった。Plasminogen は血流を介して全身の臓器に分布する。したがって、WSN 株は NA の plasminogen 受容体としての機能により全身に存在する plasminogen を活性化して感染性ウイルスを産生し、呼吸器以外の多臓器に感染を拡大すると考えられる。この WSN 株の病原性発現機構のモデルは、HA が弱毒型であっても、理論的にはゲノムの 1 塩基変異で十分な NA の変化により成立する。すなわち、現在ヒトで流行している H1N1 型のウイルスが突如として強い病原性を持つウイルスに変異する可能性を示唆する。幸い、これまでに自然界からはそのようなウイルスは分離されていないことから、インフルエンザウイルスが WSN 株のような病原性発現機構を獲得することには何らかの制約があるものと考えられる。しかし、WSN 株がその病原性発現機構を維持して成立している事実から、自然界における可能性を全く否定することはできない。

11. 今後の展開

本研究により NA の新規機能に基づいた A 型インフルエンザウイルスの病原性発現機構の新しいモデルを提唱することができたが、このモデルから様々な疑問が発生する。今後の展開として、現在著者が疑問に思うことを列挙したい。WSN 株はどのような変異の過程を経て A/WS/33 株から確立されたのか？NA 以外の変異はどのように影響したのか？A/WS/33 株以外のウイルスではマウスの脳継代による神経病原性ウイルスが出現しない。ならば、A/WS/33 株にはもともと病原性を獲得しやすい素地を持っているのか？もしそうであれば、それは何か？細かい点では、NA に結合した plasminogen がどのようにして活性化されるのか、また NA に結合した plasmin はどのようにして HA を開裂するのかは興味深い問題である。図 5 のモデルでは NA, HA, plasminogen そして u-PA は細胞表面に局在することになるため、それらの動きは細胞表面に限られる。では、plasminogen/NA と u-PA は、また Plasmin/NA と HA はどこでどのように会合するのか？これらの疑問を解決することにより、最終的にインフルエンザウイルスの病原性発現機構の全貌を明らかにできると考えられる。

視野を広げるとさらに興味深い想像ができる。WSN 株の感染により起こる細胞表面での plasminogen 活性化

表2 NA 変異ウイルスのマウス脳内での増殖

Virus	Virus titer (PFU/g)
WSN	3.9x10 ⁴
K453R	<10
K453L	<10

4.2x10⁴PFU のウイルスを脳内接種した。

は、単に HA に開裂することによる感染性ウイルスの産生に関与しているだけであろうか。細胞表面には他の蛋白質分解酵素やそれらの基質となりうる様々な分子が存在する。活性化された plasmin は、それら蛋白質分解酵素の連鎖的な活性化につながり細胞表面および細胞外基質の破壊を引き起こしことも十分に考えられる。その結果は病原性発現にも影響を与えるであろう。このことに関しては、中枢神経系において HIV-1 の macrophage 感染による matrix metalloproteinase の活性化と、その基質である chemokine SDF-1 の分解により生じるペプチドが最終的にニューロンのアポトーシスを誘導するという報告は³⁵⁾、今後の研究の展開を考える上で参考となるモデルである。

12. 終わりに

寄生体とその侵入や増殖の過程で宿主の plasminogen/plasmin を利用している例は、細菌を中心として多くの報告がある³⁶⁾。したがって、宿主寄生体相互作用における plasminogen/plasmin は重要な意味を持つのかかもしれない。このことを、他のウイルスの感染に適用できるであろうか。今後の知見の蓄積により、宿主寄生体相互作用における plasminogen/plasmin を含めた細胞表面での蛋白質分解酵素活性化の重要性が、確立した概念となることを期待したい。

文学者であり物理学者でもある寺田寅彦は、随筆「池」の中に「もっとも対象はいくら古くても、目と腕とが新しければ、いくらでも新しい「発見」はできるはずだろうが、…」と記している。毎年流行ウイルスが出現する A 型インフルエンザウイルスでは、1933年に分離された WSN 株は古い対象である。しかし、ウイルス学の分野では新しい「生理的 plasminogen 活性化機構」という目と、「分子生物学的実験手法とリバーシブル・ジェネティクス法」の新しい腕により、新しい発見ができたようである。ただ、今後いくらでも新しい「発見」できるかは、自他共に認める疑問である。

謝 辞

本稿は、平成15年度日本ウイルス学会杉浦奨励賞の受賞対象となった研究の内容をまとめたものである。本研究は、米国セントジュード小児研究病院ウイルス・分子生物学部門、ウイスコンシン大学病態生物学部門そして東京大

学医科学研究所感染・免疫部門ウイルス感染分野で継続して行われ、多くの方々のサポートが不可欠でありました。ここでお礼を申し上げます。

また、杉浦奨励賞にご推挙いただきました東京大学医科学研究所河岡義裕教授、北海道大学大学院獣医学研究科喜田宏教授、岐阜大学農学部源宣之教授に深謝致します。そして、本研究を評価して頂いた日本ウイルス学会に感謝致します。

文 献

- 1) Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* **2** : 39-43, 1994.
- 2) Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* **56** : 152-179, 1992.
- 3) Lamb RA, Krug RM 2001. Orthomyxoviridae : The viruses and their replication, p. 1353-1395. In D. M. Knipe and P. M. Howley (Ed), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 4) Fazekas de St. Groth S. Viropexis : The mechanism of influenza virus infection. *Nature* **162** : 294-296, 1948.
- 5) Krug RM, Alonso-Caplen FV, Julkunen I, Katze MG. 1998. Expression and replication of the influenza virus genome, p. 89-152. In RM Krug, H Fraenkel-Conrat, RR Wanger (Ed), *The influenza viruses*. Plenum Press, New York.
- 6) Martin K, Helenius A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins : the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell.* **67** : 117-130, 1991.
- 7) O'Neill RE, Talon J, Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* **17** : 288-296, 1998.
- 8) Murphy JS, Bang FB. Observations with the electron microscope on cells of the chick chorio-allantoic membrane infected with influenza virus. *J Exp Med.* **95** : 259-268, 1952.
- 9) Lazarowitz SG, Choppin PW. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology.* **68** : 440-454, 1975.
- 10) Skehel JJ, Daniels RS, Hay AJ, Ruigrok R, Wharton SA, Wrigley NG, Weiss W, Willey DC. Structural changes in influenza virus haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Biochem Soc Trans.* **14** : 252-253, 1986.
- 11) Nagai Y, Gotoh B. Protease-dependent tropism, a conceptually old but newly established mechanism of viral infection. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* **37** : 2774-2784, 1992.
- 12) Horimoto T, Kawaoka Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol.* **68** : 3120-3128, 1994.
- 13) Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* **11** : 2407-2414, 1992.
- 14) Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, Kawaoka Y. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol.* **68** : 6074-6078, 1994.
- 15) Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* **1** : 66-68, 1933.
- 16) Stuart-Harris CH. Neurotropic strain of human influenza virus. *Lancet* **1** : 497-499, 1939.
- 17) Castrucci MR, Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol.* **67** : 759-764, 1993.
- 18) Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology.* **68** : 426-439, 1975.
- 19) Choppin PW. Replication of influenza virus in a continuous cell line : high yield of infective virus from cells inoculated at high multiplicity. *Virology.* **39** : 130-134, 1969.
- 20) Schulman JL, Palese P. Virulence factors of influenza A viruses : WSN virus neuraminidase required for plaque production in MDBK cells. *J Virol.* **24** : 170-176, 1977.
- 21) Sugiura A, Ueda M. Neurovirulence of influenza virus in mice. I. Neurovirulence of recombinants between virulent and avirulent virus strains. *Virology.* **101** : 440-449, 1980.
- 22) Air GM, Laver WG. The neuraminidase of influenza virus. *Proteins.* **6** : 341-356, 1989.
- 23) Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology.* **61** : 397-410, 1974.
- 24) Lazarowitz SG, Goldberg AR, Choppin PW. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus : host cell activation of serum plasminogen. *Virology.* **56** : 172-180, 1973.
- 25) Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk HD, Rott R. Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology.* **157** : 421-430, 1987.
- 26) Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest.* **88** : 1067-1072, 1991.
- 27) Ellis V. Plasminogen activation at the cell surface. *Curr Top Dev Biol.* **54** : 263-312, 2003.
- 28) Plow EF, Freaney DE, Plescia J, Miles LA. The plasminogen system and cell surfaces : evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *J Cell Biol.* **103** : 2411-2420, 1986.
- 29) Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells : identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry.* **30** : 1682-1691, 1991.
- 30) Miyashita C, Wenzel E, Heiden M. Plasminogen : a

- brief introduction into its biochemistry and function. *Haemostasis*. 18 Suppl 1 : 7–13, 1988.
- 31) Goto H, Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95** : 10224–10228, 1998.
 - 32) Li S, Schulman J, Itamura S, Palese P. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. *J Virol*. **67** : 6667–6673, 1993.
 - 33) Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96** : 9345–9350, 1999.
 - 34) Goto H, Wells K, Takada A, Kawaoka Y. Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus. *J Virol*. **75** : 9297–9301, 2001.
 - 35) Zhang K, McQuibban GA, Silva C, Butler GS, Johnston JB, Holden J, Clark-Lewis I, Overall CM, Power C. HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat Neurosci*. **6** : 1064–1071, 2003.
 - 36) Lahteenmaki K, Kuusela P, Korhonen TK. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev*. **25** : 531–552, 2001.
 - 37) Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*. **303** : 35–40, 1983.

A novel function of plasminogen-binding activity of the NA determines the pathogenicity of influenza A virus

Hideo Goto

Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology,
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639
E-mail : hgoto@ims.u-tokyo.ac.jp

Because cleavage of the hemagglutinin (HA) molecule by proteases is a prerequisite for infectivity of influenza A viruses, this molecule is a major determinant of viral pathogenicity. Although well documented in the pathogenicity of avian influenza viruses, the role of HA cleavage in the pathogenicity of mammalian viruses is not well understood. Therefore, we studied a mouse-adapted human isolate A/WSN/33 (WSN), a neurovirulent influenza virus strain that causes systemic infection when inoculated intranasally into mice. We found a novel mechanism of HA cleavage for WSN virus : the neuraminidase (NA) of WSN virus binds and sequesters plasminogen on the cell surface, leading to enhanced cleavage of the HA. The structural basis of this novel function of the NA molecule appears to be the presence of a carboxyl-terminal lysine and the absence of an oligosaccharide side chain at position 146. To obtain direct evidence that the plasminogen-binding activity of the NA enhances the pathogenicity of WSN virus, we generated mutant viruses that are deficient in plasminogen-binding activity by reverse genetics. The mutant viruses showed attenuated growth in mice and failed to grow at all in the brains of these animals. Therefore, we concluded that the novel function of plasminogen-binding activity of the NA determines the pathogenicity of WSN virus in mice.