

トピックス

2. プロテアーゼ依存性ウイルス病原性発現機構と TMPRSS2

竹田 誠

国立感染症研究所 ウイルス第三部

宿主プロテアーゼの局在と、ウイルス膜融合タンパクのプロテアーゼに対する基質としての特異性が、ウイルスの細胞や臓器トロピズム、そしてウイルス病原性の重大な決定因子になっている。この宿主プロテアーゼ依存性ウイルストロピズムの解明は、1970年代の本間らの宿主依存性修飾という現象の解明に始まり、タンパク質解析技術の導入とともに、それがウイルス膜融合タンパクの開裂による活性化で説明ができること、そして、核酸解析技術の導入によってプロテアーゼに対する感受性の違いを決定するウイルス側の分子生物学的要因が次々と明らかになった。例えば、高病原性鳥インフルエンザウイルスなど、ウイルス膜融合タンパクの開裂部位に multi-basic モチーフを持つウイルスは、真核細胞が普遍的に持つフーリンで開裂活性化するため、全身の臓器で増殖するポテンシャルを持ち高い病原性を発揮する。一方、通常低病原性鳥インフルエンザウイルスなど開裂部位の配列が mono-basic な場合には、ウイルスの増殖部位に局在する特定のプロテアーゼで開裂活性化されると考えられる。ただし、そのプロテアーゼは長年未同定のままであった。数多くの候補プロテアーゼがリストアップされる中、近年、遺伝子改変マウスを用いて II 型膜貫通型セリンプロテアーゼの一つ TMPRSS2 が、mono-basic な HA を持つインフルエンザウイルスの生体内活性化プロテアーゼであることが明らかになった。さらに、重篤な新興呼吸器感染症を引き起こす重症急性呼吸器症候群コロナウイルスや中東呼吸器症候群コロナウイルスの生体内での増殖にも、TMPRSS2 が関与していることが明らかになった。

はじめに

ウイルスは宿主となるべき動物の種類、臓器または細胞を選び好みます。この性質はウイルスのトロピズムと呼ばれている^{1,2)}。ウイルスのトロピズムを規定している最も分かりやすい例は、受容体である。ウイルスは、受容体のある細胞に感染し、受容体の無い細胞には感染できない。しかし、このような明確なトロピズム決定原理が、宿主プロテアーゼとウイルス膜融合タンパクとの関係で明らかにされており「宿主プロテアーゼ依存性ウイルストロピズム」

と呼ばれている³⁾。宿主プロテアーゼによるウイルストロピズムの決定は、ウイルスの病原性発現にも深く関係している。この原理の確立における日本人ウイルス研究者の貢献は大きく、本稿ではその発見の歴史と共に、最近の知見である宿主プロテアーゼ TMPRSS2 の本原理における意義について紹介する。

宿主依存性修飾

宿主プロテアーゼ依存性ウイルストロピズムの原理確立の元となる発見を行ったのは、セндаイウイルス (SeV) (パラミクソウイルス科) を研究していた本間守男らとその研究チームである。1970年代の本間らの発見の要点は以下である。①培養細胞である L 細胞に一代通した SeV は (L-SeV と呼ぶ)、卵で継代した SeV とは異なり、溶血能や L 細胞に対する感染性が消失する。②この変化は、宿主細胞による見かけ上の生物活性の隠蔽 (Masking 現象) である。③トリプシン処理によって、それらの活性は完全に復活する⁴⁻⁶⁾。④ Masking 現象によって、細胞への penetration が阻害されている^{7,8)}。当時、本間らは、

連絡先

〒208-0011
東京都武蔵村山市学園4-7-1
国立感染症研究所 ウイルス第三部
TEL: 042-848-7060
FAX: 042-562-8941
E-mail: mtakeda@nih.go.jp

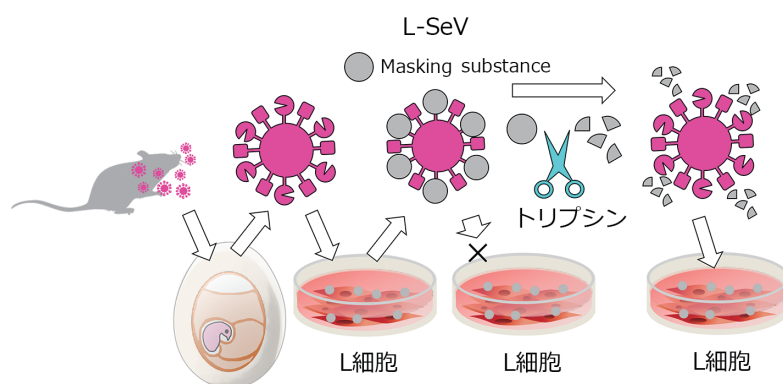


図1 本間らの Masking substance 仮説 (1970 年代)

センドライウイルス (SeV) は、発育鶏卵で容易に連続継代できるが、培養細胞である L 細胞に継代した SeV は (L-SeV と呼ぶ)、卵で継代した SeV とは異なり、溶血能や L 細胞に対する感染性が消失する (Masking 現象)。トリプシン処理によって、それらの活性は完全に復活する。L-SeV が一部の活性を持たないのは、L 細胞に由来した何らかの Masking substance をウイルスが持つためであり、トリプシン処理によって Masking substance がウイルス表面から除かれると考えられる。

L-SeV が一部の活性を持たないのは、L 細胞に由来した何らかの Masking substance をウイルスが持つためであり、トリプシン処理によって Masking substance がウイルス表面から除かれると予想していた^{4, 5, 9-11)} (図1)。そして、この一連の現象を、「宿主依存性修飾」と呼んだ^{8, 12)}。また、L-SeV を卵の漿尿液に接種すると感染性が復活するのは、卵の漿尿液中に、トリプシンと同じ効果をもつ Activator が存在すると考えた^{12, 13)}。さらに本間らは、このような宿主依存性修飾は、ウイルスの特性を考える上で受容体とともに重要な意味を持ち、いわゆる Host range とよばれているものが受容体への結合以降の段階で規定されうる可能性があると結論づけた^{11, 12, 14)}。

開裂活性化機構の発見

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の導入に伴い、トリプシン処理によって L-SeV の活性が復活する現象と、SeV の糖タンパク質が開裂によって分割されることとの強い相関が明らかになった¹⁵⁻¹⁷⁾。本間らは Masking substance 仮説を修正し、開裂により SeV の糖タンパクが活性化されて (Proteolytic activation: 開裂活性化)、SeV のエンベロープと細胞膜の融合が可能になることが、これまで観察した現象の本質であると結論づけた¹⁵⁻¹⁷⁾ (図2)。SeV は、マウスに肺炎を起こすウイルスである。そこで田代と本間は、1983 年にマウス肺の組織培養を用いて SeV が、マウス肺で開裂活性化されることを示した¹⁸⁾。その一方、培養細胞でトリプシン無しで増殖させた SeV は、培養細胞に対する感染性のみならず、マウスへの経気道的な感染性も消失していることを示した (本実験では L 細胞の代わりに LLC-MK2 細胞を用いているため、このウイルスを MK-SeV と呼んでいる)^{12, 18, 19)}。ただし、MK-SeV

をトリプシン処理してからマウスに接種すると効率よく多段階増殖を開始し、病原性を発揮することから、SeV のマウス肺での活性化は、マウスの気道内腔ではなく、肺を構成する細胞の内部または細胞表面で起こると予想した^{18, 19)}。

ウイルス病原性における意義

トリの病原体、ニューカッスル病ウイルス (NDV) には、強い呼吸器症状、神経症状を呈する致死性の強毒株と、軽い呼吸器症状もしくは無症状の病態しか示さない弱毒株がある。1976 年、永井美之らは、NDV の膜融合タンパク (F タンパク) のプロテアーゼによる開裂性と、強毒株または弱毒株の区別とは高い相関性があることを発表した²⁰⁾。弱毒株の場合、SeV の場合と同様に培養細胞での増殖 (F タンパクの開裂活性化) にはトリプシンが必要であり、トリプシン非存在下では L-SeV と同様に、溶血能、細胞融合能、培養細胞への感染能を欠いた非活性型粒子しか産生されない。一方、強毒株の場合、培養細胞での増殖 (F タンパクの開裂活性化) にトリプシンは不要で、常に活性型の粒子が産生される。さらに永井らは、NDV 強毒株、弱毒株のニワトリ胎児における臓器指向性を解析し、強毒株が全身臓器で増殖する一方、弱毒株が特定の臓器でしか増殖しないことを明らかにした²¹⁾。

高病原性鳥インフルエンザウイルスと開裂モチーフ

1975 年に A 型インフルエンザウイルス (IAV) においても、ほぼ同様の現象が観察されることが報告された²²⁾。通常の (低病原性) 鳥 IAV 株やヒト由来の季節性 IAV 株は、発育鶏卵ではヘマグルチニン蛋白 (HA) が開裂活性化されて多段階増殖するが、培養細胞ではトリプシン無添加の場合、HA は開裂せず、産生される粒子量ならびに感染価

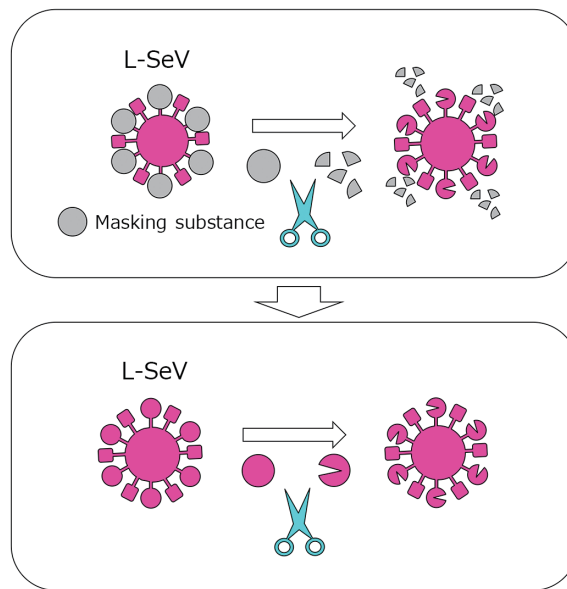


図2 Masking substance 仮説からウイルス膜タンパク開裂活性化機構の発見へ (1970年代から1980年代はじめ)

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の導入に伴い、トリプシン処理によってL-SeVの活性が復活する現象と、SeVのウイルス膜タンパク質が開裂によって分割されることとの強い相関が明らかになった。Masking substance 仮説(上段)は修正され、開裂によりSeVのウイルス膜タンパクが活性化されて(Proteolytic activation:開裂活性化)(下段)、SeVのエンベロープと細胞膜の融合が可能になることが、プロテアーゼによるウイルス活性化の本質であることが明らかになった。

は著しく低い^{22, 23}。ただし、全身の臓器を侵す高病原性鳥IAV株の場合は、NDV強毒株の場合と同様に、トリプシン無添加でも常に開裂活性化された状態で多段階増殖する^{22, 24, 25}。HA遺伝子の解析から、低病原性株のHAが塩基性アミノ酸(RまたはK)を単一もしくは不連続にしか保有しないのに対して(mono-basic)、高病原性株HAは、開裂部に塩基性アミノ酸を複数個並べた配列を持つこと(multi-basic)が示された²⁶⁻³⁰(図3)。この結果から、ゴルジ装置またはトランスゴルジネットワーク(TGN)に普遍的に存在し、oligobasicモチーフを認識・切断する細胞性前駆体プロセシング酵素によって強毒株HAが開裂活性化されると考えられた^{31, 32}。その後、ファーリン(furin)やファーリン様プロタンパク転換酵素PC5/6が、multi-basic HAを開裂活性化する宿主プロテアーゼであることが証明された^{33, 34, 35}(図3)。NDV強毒株も、Fの開裂部位にmulti-basicモチーフを持ち、ファーリンで開裂活性化されることが証明された^{36, 37}。

卵漿尿液中での活性化と血液凝固第10因子

SeV, NDV, IAVは、発育鶏卵で多段階増殖させることができる。永井らの研究グループは、発育鶏卵内でSeV, NDV, そしてIAVを開裂活性化しているプロテアーゼが、血液凝固の第10因子活性型FXaであることを明らかにした^{38, 39}。FXaの基質特異性は高く³⁸、基質であるトロンビンの開裂部P3-P1位のアミノ酸配列は、EGR↓である(↓

は開裂部)⁴⁰。P1位のアルギニン(R)のみならず、P3位のグルタミン酸(E)の重要性が示されている⁴⁰。このグルタミン酸(E)はグルタミン(Q)に変えても大きな影響はないため、FXaに対する基質特異性には、カルボニル側鎖が重要であることが示唆されている⁴⁰。尿膜腔で活性化される様々なウイルスのアミノ酸配列の比較から、永井らはFXaによる開裂には、ZXR↓という配列が重要であり(Xは、任意のアミノ酸、Zは、EまたはQを指す)、多くの場合P2位のXは、セリン(S)、スレオニン(T)、またはグリシン(G)であり、この開裂部配列をトリペプチドモチーフとして考える必要があると述べている^{38, 41, 42}。このトリペプチドモチーフ(ZXR↓)は、限られた基質分子にしか見出せないため、ウイルス膜タンパクが特異的なプロテアーゼで開裂活性化されることを示唆している。

Tryptase Clara や細菌性プロテアーゼの意義

1992年に、ラットの細気管支上皮の分泌細胞であるClara細胞から、SeVやIAVを活性化する酵素としてTryptase Claraが同定された^{43, 44}。しかし、ヒトの気道においてClara細胞は、終末気管支や呼吸気管支などの下気道に分布すると考えられており^{43, 45}、季節性ヒトIAV株が上気道を主な増殖の場としていることとは合致しない。また、Tryptase Claraの特異抗体と交叉反応を示す酵素は、ヒトでは同定されていない⁴⁶。細菌が分泌するプロテアーゼがIAVを開裂活性化することも示されている⁴⁷⁻⁵⁰。

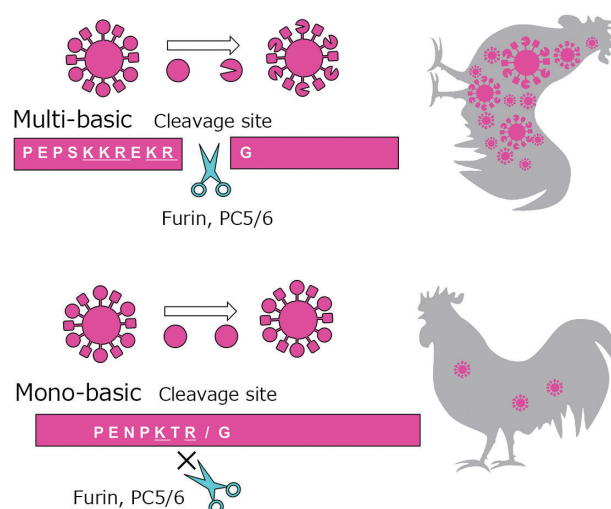


図3 インフルエンザウイルスの病原性における開裂活性化の意義 (1980年代)

高病原性鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA) は、開裂部 (cleavage site) に塩基性アミノ酸を複数個並べた配列を持ち (multi-basic)、そのためゴルジ装置またはトランスゴルジネットワークに普遍的に存在するフルリンやフルリン様プロタンパク転換酵素 PC5/6 で開裂活性化を受けることができる。そのため多種多様な細胞で多段階増殖が可能であるため、感染したニワトリの全身臓器を侵す。一方、通常の (低病原性) 鳥インフルエンザウイルスや季節性インフルエンザウイルスの HA は、開裂部に塩基性アミノ酸 (R または K) を単一もしくは不連続にしか持たないため (mono-basic)、フルリンや PC5/6 を利用することができず、ほとんどの細胞で開裂活性化されず、一回感染で終わる。Mono-basic HA を開裂活性化できるプロテアーゼは、特定の臓器や組織にのみ発現していると考えられ、mono-basic HA を持つウイルスは、それら特定の臓器や組織でのみ増殖すると考えられる。

通常のインフルエンザの病態における役割は不明であるが、細菌プロテアーゼがインフルエンザの重症化に参与している可能性がある。

TMPRSS2 と呼吸器ウイルス

宿主プロテアーゼ依存性ウイルストロピズムに従えば、呼吸器ウイルスを活性化させるプロテアーゼは、必ず呼吸器上皮に存在するはずである。田代と本間らは、マウス肺の組織培養の系を用いて、肺から放出される SeV が放出時にはすでに開裂活性化されていること、肺組織培養の上清中には開裂活性化を担うプロテアーゼは分泌されていないことを示した^{18,19)}。また、その未同定のプロテアーゼは、侵入してくる (incoming) ウイルスを活性化できないことを示し、SeV の *in vivo* での活性化は肺を構成する細胞の内部で起こると予測した^{18,19)} (図4)。しかしながら、肺のホモジネートにも SeV を開裂活性化する活性はなく¹⁹⁾、未同定のプロテアーゼの存在様式は不明のままであった。

培養細胞を用いた実験、生化学的実験などによって、2005年頃までに、多数のプロテアーゼが IAV や SeV を開裂活性化するプロテアーゼとして報告されていた⁵¹⁾。そのうちのひとつとして、2003年の沖縄で開催された Options for the Control of Influenza V. の国際会議で、Garten らが、前立腺や気道上皮に発現している TMPRSS2 (II 型膜貫通

型セリンプロテアーゼ [TTSP] の一種) が、IAV を開裂活性化することを報告した⁵²⁾。2006年、同グループによって TMPRSS2 ならびに、同じく TTSP である HAT (human airway trypsin-like protease: TMPRSS11D) が IAV を開裂活性化することを国際誌に発表した⁵³⁾。TMPRSS2 や HAT は、不活性型前駆体として発現し、自己開裂することによって活性型となる⁵⁴⁻⁵⁷⁾ (図5)。すなわち、自分自身が基質ともなるが、自身に特有の自己開裂配列を持つ (TMPRSS2 の P3-P1 配列が QSR, HAT が EQR)。特に TMPRSS2 の QSR 配列は、多くの呼吸器ウイルスの膜融合タンパクの開裂部に保存されていることが明らかになった⁵⁸⁾。TMPRSS2 が、IAV、B 型インフルエンザウイルス (IBV)、SeV、ヒトパラインフルエンザ (HPIV) 1~4 型、ヒトメタニューモウイルス (HMPV) など、様々な呼吸器ウイルスを開裂活性化することが確認されている⁵⁸⁻⁶¹⁾。ウェスタンブロットではもはや検出できない低レベルの発現で、TMPRSS2 は、これら呼吸器ウイルスを効率的に開裂活性化できる⁵⁹⁾。この開裂活性化は、ウイルス膜融合タンパクの合成・輸送過程、すなわちウイルス粒子形成過程で起こると考えられ^{59,62)}、侵入してくる (incoming) ウイルスは全く開裂活性化できず⁶²⁾、また TMPRSS2 を高発現させた細胞破碎液中にも、ウイルスを開裂活性化する活性が検出できない (Shirogane et al. 未発表データ)。

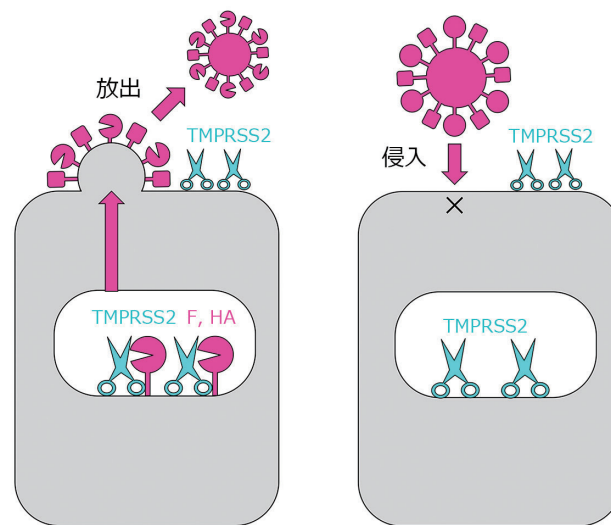


図4 SeV やインフルエンザウイルスの TMPRSS2 による開裂活性化

SeV やインフルエンザウイルスの膜融合タンパク（それぞれ F と HA）は、感染細胞内で合成されて細胞内を輸送される過程で TMPRSS2 による開裂活性化を受ける（左図）。結果、それらのウイルスは、細胞から放出された段階で、すでに完全な感染性を持っている（左図）。一方、TMPRSS2 は、侵入してくる SeV やインフルエンザウイルス粒子を開裂活性化することはできない（右図）。TMPRSS2 とウイルス膜融合タンパクが、同じ細胞膜上に乗った状態で発現していることが開裂反応に必要なためと考えられる。

おそらくは、TMPRSS2 とウイルス膜融合タンパクが、同じ細胞膜上に乗った状態で発現することが活性発揮に必要なためと考えられる。これら TMPRSS2 に関する全てのデータは、これまでの先行研究が示してきた未同定のプロテアーゼによる呼吸器ウイルス活性化の現象を全て説明しうると考えられた。

TMPRSS2 による開裂活性化機構： コロナウイルスにみられる違い

TMPRSS2 による開裂活性化は、重篤な新興呼吸器感染症を引き起こす重症急性呼吸器症候群（SARS）コロナウイルス（CoV）や中東呼吸器症候群（MERS）-CoV⁶³⁻⁶⁶、そして一般的な風邪の原因となる 229E-, OC43-, HKU1-CoV においても観察されることが明らかになった⁶⁷⁻⁶⁹。しかしながら、CoV 開裂活性化の機構は、IAV, HPIV, SeV, HMPV などの場合とは異なっているようである。SARS-CoV での解析をみる限り、ウイルス膜融合タンパク（S タンパク）の合成や輸送、ウイルスの粒子形成過程において TMPRSS2 が利用されることはなく、ウイルスが受容体に結合した後、細胞へ侵入しようとする過程で TMPRSS2 による S タンパクの開裂活性化が行われるようである^{64, 65, 70}（図 5）。CoV は、エンドゾーム内のカテプシンを使った開裂活性化経路でも細胞へ侵入できるが^{63, 71-73}、TMPRSS2 を用いた経路がより優先的に利用されることが 229E-, OC43- HKU1-CoV で示されている^{68, 69}。

病原性発現における TMPRSS2 の意義

TMPRSS2 は、上気道から下気道にわたる気道全域の上皮に発現している⁷⁴。呼吸器ウイルスの *in vivo* での増殖や病原性発現に、TMPRSS2 がどう貢献しているかを明らかにするために、ノックアウトマウスを用いた解析が行われた。TMPRSS2 ノックアウト（TMPRSS2^{-/-}）マウスは、通常のマウスと変わらない健康な表現型を示すことが、異なる領域を欠損させた 2 種類の TMPRSS2^{-/-} マウスで確認されている^{75, 76}。そのこともあり TMPRSS2 の生理的機能は未だによく分かっていない。TMPRSS2^{-/-} マウスへの IAV 感染実験の結果が、複数の研究グループから発表された⁷⁶⁻⁷⁸。フーリンや PC5/6 で開裂活性化する multi-basic HA を保有する高病原性 IAV 株は、予想通り TMPRSS2^{-/-} マウス、野生型マウス、いずれの肺内でも同等の増殖性と病原性を示した^{76, 77}（図 6）。一方、TMPRSS2^{-/-} マウスの肺内では、mono-basic HA をもつ IAV の開裂活性化や増殖は著しく制限されており、野生型マウスにとっては致死量の感染に対しても強い耐性を示した（図 6）。ただし、H3 亜型に関しては、mono-basic HA を有するにもかかわらず、TMPRSS2^{-/-} マウス内で高い増殖性や病原性を示す株がみられた⁷⁸。IBV も、TMPRSS2 非依存的にマウス肺内で増殖できるようである⁷⁹。H3 亜型に関しては、より詳しい解析の結果、HA stalk 部の糖鎖の有無や、立体構造上 HA 開裂部周辺へのプロテアーゼの接近に影響を与えるような変異が、TMPRSS2 への依存性の違いに関係して

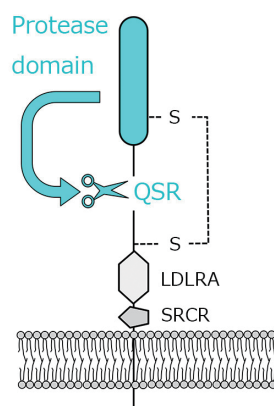


図5 TMPRSS2のドメイン構造

II型膜貫通型セリンプロテアーゼ（Type II transmembrane serine protease: TTSP）の一種である。N末端から細胞外に Serine protease domain, low-density lipoprotein receptor class A: LDLA) domain, scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain を持つ。前駆体（Zymogen）として合成され、自身の酵素活性によってプロセッシングされ活性型となる。開裂部の P3-P1 のアミノ酸配列は、QSR になっている。

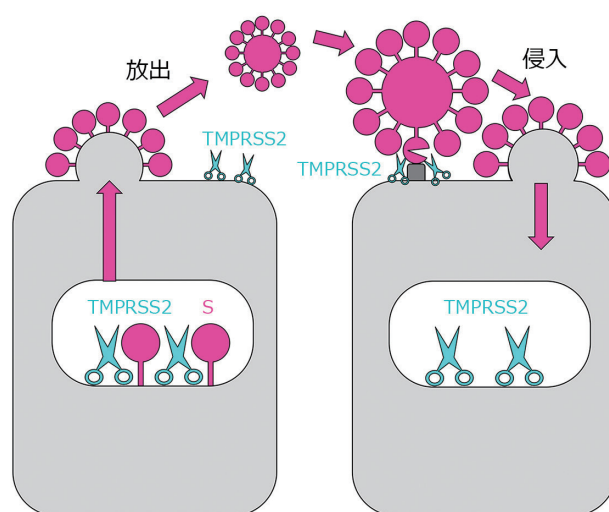


図6 コロナウイルスのTMPRSS2による開裂活性化

ヒトのコロナウイルスの膜融合タンパク（Sタンパク）は、感染細胞内で合成されて細胞内を輸送される過程ではTMPRSS2による開裂を受けない。ウイルスが受容体に結合した後、細胞へ侵入しようとする過程で、形質膜上に発現しているTMPRSS2によってSタンパクの開裂活性化が行われるようである。ヒトのコロナウイルスは、エンドゾーム内のカテプシンを使った開裂活性化経路でも細胞へ侵入できるが、TMPRSS2を用いた経路がより優先的に利用される。

いると考えられた^{80, 81)}。TMPRSS2非依存的なIAV H3重型株の開裂活性化には、TMPRSS4が少なくとも部分的に関与していることが示されており⁸²⁾、培養細胞を用いた実験では、Matriptase (ST14) など、その他のTTSPによるIAVやCoVの活性化が多数報告されている^{60, 83-88)}。しかしながら、少なくともIAVのマウス感染モデルにおいては、TMPRSS2がmono-basic HAの開裂活性化を担う最も重要なプロテアーゼのひとつであることは間違いな

さそうである。さらに最近の遺伝子改変マウスを用いた研究で、SARS-CoVやMERS-CoVのin vivoでの増殖にもTMPRSS2に重要な役割があることが証明された⁸⁹⁾ (図8)。実際には、マウスでなく、ヒトでの解析が重要となるが、ヒトの一塩基多型のゲノムワイド関連解析から、TMPRSS2高発現群において、IAV感染の重症化リスクが高まることが示されている⁹⁰⁾。

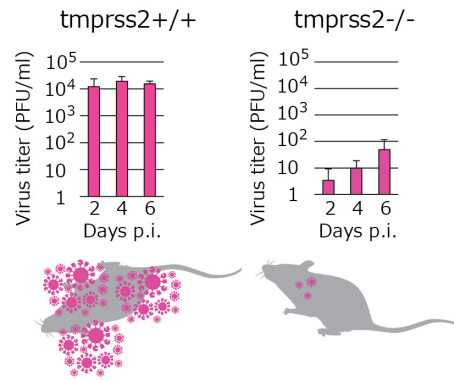


図7 A型インフルエンザウイルス (H1N1 亜型) のマウスへの感染

マウスへ馴化したA型インフルエンザウイルス (H1N1 亜型) MA-CA04 株を, TMPRSS2 ノックアウトマウス (tmprss2^{-/-}), または通常の野生型マウス (tmprss2^{+/+}) へ感染させた. tmprss2^{+/+} マウスの肺内では, HA が開裂しウイルス力価も非常に高くなるが, tmprss2^{-/-} マウスの肺内では, HA の開裂がほとんど認められず, ウイルス力価も著しく低い. 野生型マウスの致死量のウイルスを接種しても体重減少も認めなかった⁷⁶⁾.

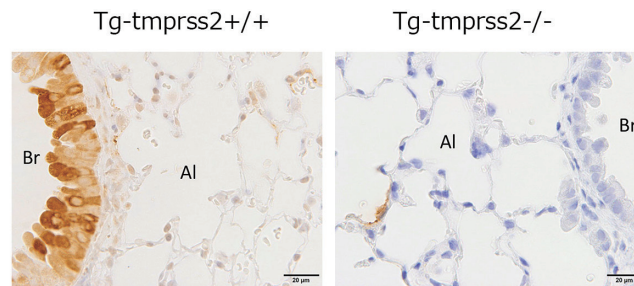


図8 MERS コロナウイルスのマウスへの感染

MERS コロナウイルスをヒト DPP4 (MERS コロナウイルスの受容体) 発現 (Tg-) tmprss2^{-/-}, または Tg-tmprss2^{+/+} へ感染させた. 感染後1日目の病理像 (免疫組織化学染色: MERS コロナウイルス NP 抗体) では, Tg-tmprss2^{+/+} マウスの気管支 (Br) や肺胞 (Al) では, 多数のウイルス抗原陽性細胞が観察されるが, Tg-tmprss2^{-/-} マウスの気管支 (Br) にウイルス抗原陽性細胞は検出されず, 肺胞 (Al) においても少数のウイルス抗原陽性細胞が観察されたのみであった (画像提供: 国立感染症研究所感染病理部 岩田奈織子博士, 永田典代博士).

おわりに

宿主プロテアーゼの局在と, ウイルス膜融合タンパクのプロテアーゼに対する基質としての特異性が, ウイルスの細胞や臓器トロピズム, そしてウイルス病原性の重大な決定因子になっている. この宿主プロテアーゼ依存性トロピズムの解明は, 宿主依存性修飾という現象の解明に始まり, タンパク質解析技術の導入とともに, それがウイルス膜融合タンパクの開裂という観点で説明ができること, そして, 核酸解析技術の導入によってプロテアーゼに対する感受性の違いを決定するウイルス側の分子生物学的要因が次々と明らかになった. 宿主プロテアーゼ側の解析は, 卵漿尿液中の血液凝固第10因子, ゴルジ内のフーリンやPC5/6と

いったプロタンパク転換酵素の同定へと繋がり, そして, 最近のTMPRSS2の同定によって研究はさらに大きく進んだと言える. 一連の研究は, 世界中の研究者によって精力的に進められてきたが, その中に占める日本人ウイルス研究者の貢献は, 非常に大きいものであった. 全容解明には, まだ, 未解明な課題も多く残されている. 今後, 益々の発展を期待したい.

本稿に関連し, 開示すべき利益相反状態にある企業等はありません.

参考文献

- 1) 本間守男. 1985. センダイウイルスのトロピズム. 感

- 染・炎症・免疫 15:221-31.
- 2) 本間守男. 1985. センダイウイルス (HVJ) のマウス肺病原性の機構. *モダンメディア* 31:32-40.
 - 3) Nagai Y. 1993. Protease-dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends Microbiol* 1:81-7.
 - 4) Homma M. 1971. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. I. Restoration of the infectivity for L cells by direct action of tyrrpsin on L cell-borne Sendai virus. *J Virol* 8:619-29.
 - 5) Homma M. 1972. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. II. Restoration of the hemolytic activity if L cell-borne Sendai virus by trypsin. *J Virol* 9:829-35.
 - 6) Homma M, Tamagawa S. 1973. Restoration of the fusion activity of L cell-borne Sendai virus by trypsin. *J Gen Virol* 19:423-6.
 - 7) 本間守男, 福田孝子, 石田名香雄. 1970. 非感染性 L-HVJ に対するトリプシンの影響 (会議録). *ウイルス* 20:97.
 - 8) Ishida N, Homma M. 1961. Host-controlled variation observed with Sendai virus grown in mouse fibroblast (L) cells. *Virology* 14:486-8.
 - 9) 本間守男, 多田孝太郎. 1972. 非感染性 L HVJ に対するトリプシンの影響 (第4報) 非溶血性 egg HVJ の産生 (会議録). *ウイルス* 22:249.
 - 10) 本間守男. 1972. 宿主細胞による HVJ の修飾 (会議録). *ウイルス* 22:171-2.
 - 11) 本間守男. 1973. 宿主細胞による HVJ の修飾. *ウイルス* 23:85-8.
 - 12) 本間守男. 1973. HVJ の宿主依存性修飾. *最新医学* 28:1209-14.
 - 13) Muramatsu M, Homma M. 1980. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. V. An activating enzyme for Sendai virus in the chorioallantoic fluid of the embryonated chicken egg. *Microbiol Immunol* 24:113-22.
 - 14) 本間守男. 1975. HVJ (センダイウイルス) のいわゆる宿主依存性修飾現象について. *ウイルス* 25:7-18.
 - 15) 大内正信, 本間守男. 1973. 非感染性 L HVJ に対するトリプシンの影響 (第5報) L HVJ のペプチドの電気泳動 (会議録). *ウイルス* 23:371-2.
 - 16) 大内正信, 本間守男. 1974. HVJ 糖たん白の cleavage による活性化. *ウイルス* 24:353-5.
 - 17) Homma M, Ouchi M. 1973. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. 3. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *J Virol* 12:1457-65.
 - 18) Tashiro M, Homma M. 1983. Evidence of proteolytic activation of Sendai virus in mouse lung. *Arch Virol* 77:127-37.
 - 19) Tashiro M, Homma M. 1983. Pneumotropism of Sendai virus in relation to protease-mediated activation in mouse lungs. *Infect Immun* 39:879-88.
 - 20) Nagai Y, Klenk HD, Rott R. 1976. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72:494-508.
 - 21) 永井美之. 1977. ウイルス病原性の分子的基盤. 蛋白質・核酸・酵素 22:385-95.
 - 22) Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68:426-39.
 - 23) Lazarowitz SG, Choppin PW. 1975. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 68:440-54.
 - 24) Ogawa T, Ueda M. 1981. Genes involved in the virulence of an avian influenza virus. *Virology* 113:304-13.
 - 25) Bosch FX, Orlich M, Klenk HD, Rott R. 1979. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* 95:197-207.
 - 26) Kawaoka Y, Webster RG. 1988. Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:324-8.
 - 27) Bosch FX, Garten W, Klenk HD, Rott R. 1981. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses. *Virology* 113:725-35.
 - 28) Horimoto T, Kawaoka Y. 1994. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* 68:3120-8.
 - 29) Vey M, Orlich M, Adler S, Klenk HD, Rott R, Garten W. 1992. Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* 188:408-13.
 - 30) Kawaoka Y, Webster RG. 1988. Molecular mechanism of acquisition of virulence in influenza virus in nature. *Microb Pathog* 5:311-8.
 - 31) Thomas G. 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:753-66.
 - 32) Morrison T, Ward LJ, Semerjian A. 1985. Intracellular processing of the Newcastle disease virus fusion glycoprotein. *J Virol* 53:851-7.
 - 33) Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* 11:2407-14.
 - 34) Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, Kawaoka Y. 1994. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol* 68:6074-8.
 - 35) Remacle AG, Shiryaev SA, Oh ES, Cieplak P, Srinivasan A, Wei G, Liddington RC, Ratnikov BI, Parent A, Desjardins R, Day R, Smith JW, Lebl M, Strongin AY. 2008. Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases. A comparative study. *J Biol Chem* 283:20897-906.
 - 36) Toyoda T, Sakaguchi T, Imai K, Inocencio NM, Gotoh B, Hamaguchi M, Nagai Y. 1987. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of New-

- castle disease virus. *Virology* 158:242-7.
- 37) Glickman RL, Syddall RJ, Iorio RM, Sheehan JP, Bratt MA. 1988. Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J Virol* 62:354-6.
 - 38) Gotoh B, Ogasawara T, Toyoda T, Inocencio NM, Hamaguchi M, Nagai Y. 1990. An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo. *EMBO J* 9:4189-95.
 - 39) Ogasawara T, Gotoh B, Suzuki H, Asaka J, Shimokata K, Rott R, Nagai Y. 1992. Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *EMBO J* 11:467-72.
 - 40) Kettner C, Shaw E. 1981. The selective affinity labeling of factor Xa by peptides of arginine chloromethyl ketone. *Thromb Res* 22:645-52.
 - 41) 永井美之. 1990. ウイルス糖蛋白質のプロセッシングと病原性発現. 蛋白質・核酸・酵素 35:2211-22.
 - 42) 永井美之, 後藤敏. 1992. 古くて新しい感染論, プロテアーゼ依存性トロピズム. 蛋白質・核酸・酵素 37:2774-84.
 - 43) Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Katunuma N. 1992. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem* 267:13573-9.
 - 44) Tashiro M, Yokogoshi Y, Tobita K, Seto JT, Rott R, Kido H. 1992. Trypsin-like protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J Virol* 66:7211-6.
 - 45) Lumsden AB, McLean A, Lamb D. 1984. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax* 39:844-9.
 - 46) 木戸博, Ye_Chen, 山田博司, 奥村裕司. 2003. インフルエンザウイルスの感染感受性をきめる個体のプロテアーゼ群とインフルエンザ脳症の発症機序. 日薬理誌 122:45-53.
 - 47) Tashiro M, Ciborowski P, Klenk HD, Pulverer G, Rott R. 1987. Role of Staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia. *Nature* 325:536-7.
 - 48) Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk HD, Rott R. 1987. Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology* 157:421-30.
 - 49) Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M, Rott R. 1992. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis* 166:783-91.
 - 50) Akaike T, Molla A, Ando M, Araki S, Maeda H. 1989. Molecular mechanism of complex infection by bacteria and virus analyzed by a model using serratial protease and influenza virus in mice. *J Virol* 63:2252-9.
 - 51) Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Pan HY, Wang S, Chida J, Le TQ, Yano M. 2008. Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *J Mol Genet Med* 3:167-75.
 - 52) Garten W, Matrosovich M, Matrosovich T, Eickmann M, Vahhabzadeh A. 2004. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by host cell protease. *Int Congr Ser* 1263:218-221.
 - 53) Bottcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M. 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 80:9896-8.
 - 54) Kato M, Hashimoto T, Shimomura T, Kataoka H, Ohi H, Kitamura N. 2012. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 inhibits protease activity and proteolytic activation of human airway trypsin-like protease. *J Biochem* 151:179-87.
 - 55) Menou A, Duitman J, Flajolet P, Sallenave JM, Mailleux AA, Crestani B. 2017. Human airway trypsin-like protease, a serine protease involved in respiratory diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 312:L657-L668.
 - 56) Afar DE, Vivanco I, Hubert RS, Kuo J, Chen E, Saffran DC, Raitano AB, Jakobovits A. 2001. Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res* 61:1686-92.
 - 57) Antalis TM, Bugge TH, Wu Q. 2011. Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 99:1-50.
 - 58) Abe M, Tahara M, Sakai K, Yamaguchi H, Kanou K, Shirato K, Kawase M, Noda M, Kimura H, Matsuyama S, Fukuhara H, Mizuta K, Maenaka K, Ami Y, Esumi M, Kato A, Takeda M. 2013. TMPRSS2 is an activating protease for respiratory parainfluenza viruses. *J Virol* 87:11930-5.
 - 59) Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, Yanagi Y. 2008. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol* 82:8942-6.
 - 60) Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Tsegaye TS, Takeda M, Bugge TH, Kim S, Park Y, Marzi A, Pohlmann S. 2009. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol* 83:3200-11.
 - 61) Bottcher-Friebertshauser E, Lu Y, Meyer D, Sielaff F, Steinmetzer T, Klenk HD, Garten W. 2012. Hemagglutinin activating host cell proteases provide promising drug targets for the treatment of influenza A and B virus infections. *Vaccine* 30:7374-80.
 - 62) Bottcher-Friebertshauser E, Freuer C, Sielaff F, Schmidt S, Eickmann M, Uhlendorff J, Steinmetzer T, Klenk HD, Garten W. 2010. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol* 84:5605-14.
 - 63) Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, Kramer-Kuhl A, Welsch K, Winkler M, Meyer B, Drosten C, Dittmer U, von Hahn T, Simmons G, Hofmann H, Pohlmann S. 2013. The spike protein of the emerg-

- ing betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J Virol* 87:5502-11.
- 64) Glowacka I, Bertram S, Muller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, Steffen I, Tsegaye TS, He Y, Gnirss K, Niemeyer D, Schneider H, Drosten C, Pohlmann S. 2011. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol* 85:4122-34.
 - 65) Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. 2010. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol* 84:12658-64.
 - 66) Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. 2013. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Infection Mediated by the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J Virol* doi:10.1128/JVI.01890-13.
 - 67) Bertram S, Dijkman R, Habjan M, Heurich A, Gierer S, Glowacka I, Welsch K, Winkler M, Schneider H, Hofmann-Winkler H, Thiel V, Pohlmann S. 2013. TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *J Virol* 87:6150-60.
 - 68) Shirato K, Kanou K, Kawase M, Matsuyama S. 2017. Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *J Virol* 91.
 - 69) Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. 2018. Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry. 517:9-15.
 - 70) Shulla A, Heald-Sargent T, Subramanya G, Zhao J, Perlman S, Gallagher T. 2011. A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J Virol* 85:873-82.
 - 71) Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. 2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11876-81.
 - 72) Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ, Bates P. 2004. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4240-5.
 - 73) Kawase M, Shirato K, Matsuyama S, Taguchi F. 2009. Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *J Virol* 83:712-21.
 - 74) Bertram S, Heurich A, Lavender H, Gierer S, Danisch S, Perin P, Lucas JM, Nelson PS, Pohlmann S, Soilleux EJ. 2012. Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts. *PLoS ONE* 7:e35876.
 - 75) Kim TS, Heinlein C, Hackman RC, Nelson PS. 2006. Phenotypic analysis of mice lacking the Tmprss2-encoded protease. *Mol Cell Biol* 26:965-75.
 - 76) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki 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. 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.
 - 77) Hatesuer B, Bertram S, Mehnert N, Bahgat MM, Nelson PS, Pohlman S, Schughart K. 2013. Tmprss2 is essential for influenza H1N1 virus pathogenesis in mice. *PLoS Pathog* 9:e1003774.
 - 78) Tarnow C, Engels G, Arendt A, Schwalm F, Sediri H, Preuss A, Nelson PS, Garten W, Klenk HD, Gabriel G, Bottcher-Friebertshausen E. 2014. TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. *J Virol* 88:4744-51.
 - 79) 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. 2016. TMPRSS2 independency for haemagglutinin cleavage in vivo differentiates influenza B virus from influenza A virus. *Sci Rep* 6:29430.
 - 80) 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. 2015. 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* 89:5154-8.
 - 81) Lambertz RLO, Pippel J, Gerhauser I, Kollmus H, Anhlan D, Hrinicius ER, Krausze J, Kuhn N, Schughart K. 2018. Exchange of amino acids in the H1-haemagglutinin to H3 residues is required for efficient influenza A virus replication and pathology in Tmprss2 knock-out mice. *J Gen Virol* 99:1187-1198.
 - 82) Kuhn N, Bergmann S, Kosterke N, Lambertz RL, Keppner A, van den Brand JM, Pohlmann S, Weiss S, Hummler E, Hatesuer B, Schughart K. 2016. The proteolytic activation of (H3N2) influenza A virus hemagglutinin is facilitated by different type II transmembrane serine proteases. *J Virol* 90:4298-307.
 - 83) Bertram S, Glowacka I, Blazejewska P, Soilleux E, Allen P, Danisch S, Steffen I, Choi SY, Park Y, Schneider H, Schughart K, Pohlmann S. 2010. TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J Virol* 84:10016-25.
 - 84) Hamilton BS, Gludish DW, Whittaker GR. 2012. Cleavage activation of the human-adapted influenza virus subtypes by matriptase reveals both subtype and strain specificities. *J Virol* 86:10579-86.
 - 85) Baron J, Tarnow C, Mayoli-Nussle D, Schilling E, Meyer D, Hammami M, Schwalm F, Steinmetzer T, Guan Y, Garten W, Klenk HD, Bottcher-Friebertshausen E. 2013. Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses. *J Virol*

- 87:1811-20.
- 86) Beaulieu A, Gravel E, Cloutier A, Marois I, Colombo E, Desilets A, Verreault C, Leduc R, Marsault E, Richter MV. 2013. Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium. *J Virol* doi:10.1128/JVI.03005-12.
- 87) Zmora P, Blazejewska P, Moldenhauer AS, Welsch K, Nehlmeier I, Wu Q, Schneider H, Pohlmann S, Bertram S. 2014. DESC1 and MSPL activate influenza A viruses and emerging coronaviruses for host cell entry. *J Virol* 88:12087-97.
- 88) Zmora P, Hoffmann M, Kollmus H, Moldenhauer AS, Danov O, Braun A, Winkler M, Schughart K, Pohlmann S. 2018. TMPRSS11A activates the influenza A virus hemagglutinin and the MERS coronavirus spike protein and is insensitive against blockade by HAI-1. *J Biol Chem* 293:13863-13873.
- 89) Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N. 2019. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. *J Virol* 93:e01815-18.
- 90) Cheng Z, Zhou J, To KK, Chu H, Li C, Wang D, Yang D, Zheng S, Hao K, Bosse Y, Obeidat M, Brandsma CA, Song YQ, Chen Y, Zheng BJ, Li L, Yuen KY. 2015. Identification of TMPRSS2 as a susceptibility gene for severe 2009 pandemic A(H1N1) influenza and A(H7N9) influenza. *J Infect Dis* 212:1214-21.

Protease-dependent virus tropism and pathogenicity: The role for TMPRSS2

Makoto TAKEDA

Department of Virology 3, National Institute of Infectious Diseases

The distribution pattern of host proteases and their cleavage specificity for viral fusion glycoproteins are key determinants for viral tissue tropism and pathogenicity. The discovery of this protease-dependent virus tropism and pathogenicity has been triggered by the leading studies of the host-induced or -controlled modification of viruses by Homma et al. in 1970s. With the introduction of advanced protein analysis method, the observations by Homma et al. have been clearly explained by the cleavage activation of viral fusion glycoproteins by proteases. The molecular biological features of viruses, which show distinct protease specificity or dependency, have been also revealed by newly introduced nucleotide and molecular analysis method. Highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIVs) have multi-basic cleavage motif in the hemagglutinin (HA) protein and are activated proteolytically by furin. Furin is ubiquitously expressed in eukaryotic cells and thereby HPAIVs have the potential to cause a systemic infection in infected animals. On the other hand, the HA cleavage site of low pathogenic avian influenza viruses (LPAIVs) and seasonal human influenza viruses is mono-basic and thus not recognized by furin. They are likely cleaved by protease(s) localized in specific organs or tissues. However, the protease(s), which cleaves mono-basic HA *in vivo*, has long been undetermined, although many proteases have been shown as candidates. Finally, recent studies using gene knocked out mice revealed that TMPRSS2, a member of type II transmembrane serine proteases, is responsible for the cleavage of influenza viruses with a mono-basic HA *in vivo*. A subsequent study further demonstrated that TMPRSS2 contributes to replication and pathology of emerging SARS- and MERS coronaviruses *in vivo*.

