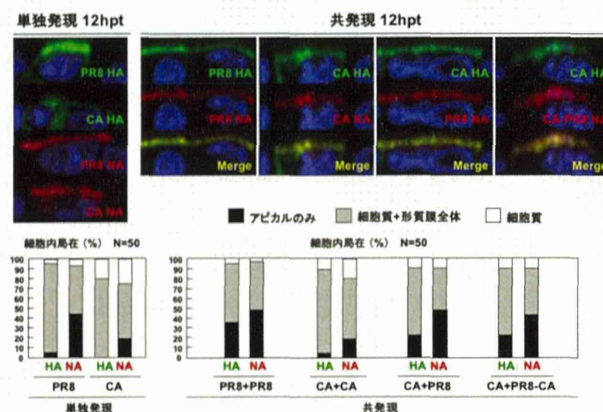


膜輸送に重要である (J Virol, 74: 4634-4644, 2000; Proc Natl Acad Sci USA, 100: 14610-14617, 2003; J Virol, 88: 10039-10055, 2014)。CApdm 株 HA/NA のラフト親和性は PR8 株 HA/NA のラフト親和性と同程度であった (図 2)。しかしながら、分担者らはしばしば head 領域の変異により形質膜輸送が遅延する現象を認めている。そこで、MDCK 細胞に HA/NA 蛋白を発現させ、免疫染色により細胞内局在を調べた。50 個の HA あるいは NA 陽性細胞を観察し、細胞内局在を 3 つ (細胞質のみ、細胞質+形質膜、アピカル膜のみ) に分類した。HA/NA 蛋白は、細胞質→細胞質+形質膜→アピカル膜へと輸送される (J Virol, 88: 10039-10055, 2014)。CApdm 株の HA/NA はいずれも PR8 株 HA/NA より輸送が遅いことが判明した (図 5、単独発現)。

分担者らは、HA と NA は共発現によりアピカル形質膜への輸送が相互に促進することを見いだしている (J Virol, 88: 4828-4838, 2014)。X-179A 株の HA/NA は CApdm 株に由来し、その HA と NA はそれぞれ異なる株 (北米の classical swine 株とユーラシアの avian-like swine 株) から由来する。そこで、HA と NA 蛋白を共発現させ同様に膜輸送を解析した。PR8 株 HA に PR8 株 NA を共発現させると HA のアピカル膜輸送は促進した。しかし、CApdm 株 HA に CApdm 株 NA を共発現させても、HA の膜輸送はほとんど促進しなかった。ところが、CApdm 株 HA に PR8 株 NA を共発現させたところ、CApdm 株 HA のアピカル膜輸送がやや促進した。この PR8 株 NA の促進効果を CApdm 株 NA に付与する目的で、キメラ NA (PR8 株 NA の CT-TM-ST 領域と CApdm 株 NA の head 領域をもつ) を作製し共発現させたところ、CApdm 株 HA のアピカル膜輸送に促進が認められた。また、キメラ化により CApdm 株 NA のアピカル膜輸送も促進することが判明した (図 5、共発現)。

図5. CApdm株HA/NAのアピカル輸送効率



D. 考察

現行ワクチンの X-179A 株は CApdm 株と PR8 株の classical reassortant 株をさらに選抜した株であるが、その増殖性、総蛋白質収量、HA 収量はまだ十分でない。H26 年度は、CApdm 株の HA/NA の蛋白質自体の問題点を解析した。

(1) CApdm 株 HA/NA の脂質ラフト親和性

CApdm 株 HA/NA の脂質ラフト親和性は PR8 株 HA/NA のそれと同程度であり異常はなかった (図 2)。

(2) CApdm 株 HA/NA の多量体形成

中性 pH では安定した多量体 (HA 三量体と NA 四量体) が認められた (図 1)。しかし、CApdm 株 HA の三量体は pH に感受性で単量体に解離しやすいことが報告されている (J Virol, 86: 1405-1410, 2012; J Virol, 88: 4828-4838, 2014) ことから、現在 pH5~7.5 でその安定性を検討している。

(3) CApdm 株 HA/NA の発現量

CApdm 株 HA の発現量を PR8 株 HA と比較する目的で、両者に同じ epitope を導入しその epitope 特異抗体で調べた。CApdm 株 HA の発現量は PR8 株 HA の 1/4-5 と極めて低く、これが HA 低収量の主因の 1 つと考えられた (図 3)。CApdm 株 HA の低発現性が蛋白質分解速度が速いせいなのか、現在 cycloheximide を用いて解析している。また、CApdm 株 HA 遺

伝子のコドン使用頻度を調べたところ、PR8 株 HA 遺伝子のコドン使用頻度に比べ、翻訳開始直後の領域に比較的レアコドンが多いことが判明した。これを改善するため、現在 CApdm 株 HA 遺伝子のコドン最適化を行っている。CApdm 株 HA 遺伝子の 5'-UTR-シグナル配列領域を PR8 株に置換することにより、増殖性と HA 収量を改善した RG 株が報告されている (J Virol, 85: 6086-6090, 2011)。この改善は、5'-UTR-シグナル配列領域の置換によりレアコドンが排除された効果であるかもしれない。

NA については、N1 亜型 NA に対し交差反応性を示す抗 N1 NA ヒツジ抗体を用いて NA 発現量を調べたところ、CApdm 株 NA の発現量は PR8 株 NA の 1/2 であった (図 3)。この発現量は、NA をキメラ化することにより改善できた (図 3)。

(4) CApdm 株 HA/NA の膜輸送

CApdm 株 HA/NA の膜輸送を調べたところ、HA/NA はいずれも PR8 株 HA/NA より輸送効率が悪いことが判明した (図 5)。HA (恐らく NA の場合も) の形質膜輸送には脂質ラフト上での HA 集合が重要であると示唆されている (Proc Natl Acad Sci USA, 100: 14610-14617, 2003)。CApdm 株 HA/NA は脂質ラフト親和性に異常はなかったが (図 2)、その蛋白発現量は低く (図 3)、脂質ラフト上での集合効率は悪いと推測された。この HA/NA 発現量の低さが結果的に膜輸送効率の悪さにつながったと思われる。従って、当初予定した Proximity Ligation Assay で HA-NA 近接を測定する実験は、蛋白発現量があまりに違う条件では不適切であると思われる、行わなかった。

HA+NA の共発現は HA/NA のアピカル膜輸送を相互に促進する (J Virol, 88: 4828-4838, 2014)。CApdm 株の HA と NA は異なる株 (北米 classical swine 株とユーラシア avian-like swine 株) から由来するが、この HA+NA の組合せが不適切であるため、ウイルス増殖性や HA 収量が低い可能性が考えられた。これを検証する

目的で、HA+NA の共発現実験を行ったところ、CApdm 株 HA+CApdm 株 NA の組合せは、PR8 株 HA+PR8 株 NA の組合せより膜輸送効率が悪いことが判明した。CApdm 株 NA を PR8 株 NA に置換する、あるいは、NA をキメラ化 (CApdm 株 NA の CT-TM-ST 領域を PR8 株のものに置換) すると HA/NA 両者の膜輸送効率が増加した。従って、CApdm 株 HA+CApdm 株 NA の組合せにおいて、ワクチンとしての抗原性を保持しつつ、その抗原性にあまり関与しない領域を変更することにより、膜輸送効率を改善できると思われる。HA の TM-CT 領域の置換も候補となる。

(5) その他

Rab family 蛋白質を指標として HA/NA の膜輸送経路を解析したところ、HA と NA は分泌経路の輸送小胞でアピカル膜へ輸送されることが判明した (不掲載)。

(6) 今後の展望

CApdm 株 HA 遺伝子の両末端配列 (5'-UTR-シグナル配列領域と TM-CT-UTR-3'領域) を PR8 株に置換して、増殖性と HA 収量を増加させた RG 株が報告されている (J Virol, 85: 6086-6090, 2011)。その報告では、HA 蛋白のキメラ化しか検討されていない。本研究では、CApdm 株 NA にも問題点があり、その発現量や HA+NA 膜輸送効率は NA のキメラ化により改善できた。従って、HA/NA の TM-CT 領域を標準株に置換した両者を用いることにより、より増殖性や抗原収量の高い株へと改変できると期待される。

各分節遺伝子の両末端 UTR-ORF (約 100 塩基) は分節集合に重要である。遺伝子交雑株ではしばしば HA/NA が伴って交換され、それら分節間に選択性があると考えられる。従って、上記のような標準株とのキメラ化に際しては、HA/NA の両遺伝子の両末端配列を同時に置換するほうが望ましいと思われる。

E. 結論

①CApdm 株 HA/NA の脂質ラフト親和性や多量体形成に異常は認められないが、HA/NA 発現量、特に HA 発現量が低いことが判明した。②NA の発現量は、キメラ化 (PR8 株 NA の CT-TM-ST 領域と CApdm 株 NA の head 領域をもつキメラで、ST 領域が短縮) により PR8 株 NA と同程度になった。③上記の NA キメラ化により、HA/NA のアピカル膜輸送効率が改善した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohkura T, Momose F, Ichikawa R, Takeuchi K, Morikawa Y. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts. J Virol 88: 10039-10055, 2014.

2. 学会発表

- 1) 大倉喬、百瀬文隆、市川玲子、竹内薫、森川裕子:インフルエンザウイルス HA と NA の極性輸送は脂質ラフトのクラスタリングを介して相互促進される
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/10/2014.
- 2) 滝沢直己、百瀬文隆、原口日和、森川裕子、野本明男:インフルエンザウイルス膜タンパク質 HA および M2 のウイルス粒子形成における機能解析
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/11/2014.
- 3) 百瀬文隆、森川裕子:自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのポリシストロニック発現
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/11/2014.
- 4) 百瀬文隆、森川裕子:2A 自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのポリシストロニック発現

第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、11/27/2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

低変異率母体ウイルス株の開発

担当責任者 内藤忠相 川崎医科大学・助教

研究要旨

インフルエンザウイルスの継代を繰り返すと HA や NA タンパク質にアミノ酸置換が起こり、抗原性が変異する。現行 HA ワクチンの製造では、発育鶏卵で大量のウイルスを増幅させるが、ワクチン候補株の継代中に抗原変異が生じた場合には、増殖性が優れていてもその株はワクチン製造株から除外される。そこで、ウイルスポリメラーゼを改変してゲノム複製時のエラー頻度を制御できれば、遺伝的安定性を確保したワクチン製造株の開発に応用できる。本研究では、以前にウイルスポリメラーゼの高忠実化に成功した他の RNA ウイルスの解析結果を基盤情報として、インフルエンザウイルスにおける変異効率を人為的に制御できるか検討した。

遺伝子組換え技術を用いて、ウイルスゲノム複製反応を担うウイルスポリメラーゼの PB1 サブユニットへ人為的に改変を加えることで、変異導入効率の制御に関与するアミノ酸置換（PB1-Tyr82Cys 置換）を見出した。また、最近になりウイルスポリメラーゼの高忠実化に関与するアミノ酸変異（PB1-Val43Ile 置換）が報告された。そこで、現行のワクチン母体株である高増殖性 PR8 株に同様のアミノ酸置換を加えた結果、野生株とほぼ同等のウイルスゲノム複製活性およびウイルス増殖能を保持している PB1-Val43Ile 変異ウイルスを作製することができた。

A. 研究目的

現行の季節性インフルエンザワクチンの場合、毎春に次年度のウイルス流行予測が行われ、ワクチンに選定されたウイルス株は発育鶏卵で増幅される。しかし、株によっては鶏卵内増殖に馴化し、HA や NA タンパク質の抗原部位に変異が導入される場合がある。そのようなウイルスは、抗原性および増殖性が優良でもワクチン候補株からは除外される。ワクチン株は製造時に抗原性が不変的であることが求められる。

そこで、ワクチン製造用にウイルスゲノムに変異が入りにくい「遺伝的安定性に優れた母体ウイルス株」を開発できれば、鶏卵増幅時における抗原性変異を考慮せず済む。本研究の完成により、最大限の効果が期待できるワクチン株を毎年選択できるようになり、さらに近年導入が予定されている細胞培養ワクチンおよび経鼻接種

型ワクチンの製造にも応用が可能である。

ウイルス遺伝子に変異が導入される原因は、ウイルスポリメラーゼの忠実性の低さに起因している。インフルエンザウイルスのゲノム複製は、ウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（PB1）により起こるが、複製サイクル中において、約 1 万塩基に 1 つの割合で変異が導入される。そこで、変異導入率を低下させることができれば、ウイルスゲノムの遺伝的安定性を確保した状態でワクチン株の増幅・製造が行える。本研究では、ウイルスゲノム複製時において「忠実性が向上する改変型ポリメラーゼ」を単離し、変異導入率を低下させたワクチン株の開発を試みる。

B. 研究方法

ポリオウイルスでは、高忠実性の RNA ポリメラーゼの単離に成功している。さら

に、そのポリメラーゼを利用して、ウイルスゲノムに変異が入りにくいワクチン株の作製も報告されている。ポリオウイルスのポリメラーゼモチーフ D 内の Lys359 残基を Arg または His に置換することにより、忠実度が 5 倍以上に向上する。このアミノ酸残基は、ウイルス RNA 合成時において RNA 塩基が取り込まれる「入り口」に位置している。Arg または His へ置換することで、アミノ酸側鎖と RNA との相互作用に影響を及ぼし、ゲノム複製時に基質の選択性が向上したと推測される。

注目するポリメラーゼモチーフ D 内の Lys 残基は、ほとんどの RNA ウイルスで保存されており、インフルエンザウイルスではウイルスポリメラーゼ PB1 サブユニットの 481 番目の Lys 残基に相当する。そこで、同様に変異ウイルスを作製し、インフルエンザウイルスにおいても忠実度が向上するか検討した。

組換えウイルスは、既に確立されている逆遺伝学的操作によって作製した。インフルエンザウイルスの各ウイルスゲノムを組込んだウイルスゲノム発現ベクターと、ウイルスポリメラーゼ PB1、PB2、PA の各サブユニットおよびウイルス核タンパク質である NP 発現ベクターをヒト腎由来 293T 細胞と一緒に導入することで種ウイルスを作製し、発育鶏卵を用いてウイルスの増幅を行った。PB1 の点変異体の作製は、ウイルスゲノム発現ベクターに変異を導入して、同様に他のベクターと共に 293T 細胞に導入することで、変異型組換えウイルスを得た。

また、最近になりインフルエンザウイルス H5N1 株および H3N2 株において、ポリメラーゼの忠実性を向上させるアミノ酸変異 (PB1-Val43Ile 置換) が報告された。現行のワクチン母体株である高増殖性 PR8 株にも応用が可能か検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、特定の研究対象者や動物実験を含まないため、倫理面への配慮は該当しない。

C. 研究結果

ウイルスゲノム複製活性を測定する細胞内レポーター発現系を用いて PB1-K481R および PB1-K481H 変異体ポリメラーゼの活性を調べた結果、野生型 PB1 より 10 倍ほど活性が低下していた。また、K481 をその他のアミノ酸に置換させた変異体では、RNA 合成活性は検出感度以下であった。

逆遺伝学的操作により PB1(K481)にアミノ酸置換を持つ組換えウイルスの作製を試みた結果、PB1-K481H 変異ウイルスを作出できたが、回収された変異ウイルスのゲノム配列を確認したところ、PB1 サブユニットの 82 番目のアミノ酸 Try が Cys に置換する新たな変異が導入されていた。

次世代シーケンサーを用いた解析によりゲノム変異導入効率を検討した結果、野生型ウイルスと比較して PB1-Y82C-K481H 変異ウイルスおよび PB1-Y82C 変異ウイルスは、それぞれ 2.5 倍および 3.5 倍ほど変異導入率が高いことが明らかとなった (Table 1: 筑波大学・永田恭介学長および森幸太郎博士との共同研究結果)。

一方、最近になり PB1 ポリメラーゼの 43 番目のアミノ酸を Val から Ile に置換することで、忠実性が 5 倍ほど向上することが報告された。同変異を現行ワクチン母体株である PR8 ウイルスに導入した。逆遺伝学的操作を用いて 293T 細胞から種ウイルスを作製後、発育鶏卵でウイルスの増幅を行った結果、野生型 PR8 株と同程度の力価をもつ PB1-V43I 変異ウイルスを回収できた。

D. 考察

忠実性の向上を目的として作製した PB1 変異ウイルス (PB1-K481H) は、アミノ酸置換により低下した RNA 合成活性を相補する為に、新たな変異 (PB1-Y82C 置換) が導入されたと考えられる。このことから、PB1-K481H の単一変異が忠実性に及ぼす影響を検討することはできなかった。一方で PB1-Y82C 置換は、変異導

入効率の低下を引き起こし、塩基挿入変異の割合も向上させた (Table 1)。発育鶏卵で増幅させた PB1-Y82C 変異ウイルスは、干渉性不完全粒子 (DI 粒子) を多く含むことが示唆された。近年、温度感受性株や DI 粒子をワクチン株に応用する検討がされており、本研究で新規に見出した PB1 変異も活用できる可能性がある。

また、高忠実化が期待できる PB1-V43I 置換を H1N1 株である PR8 株に導入しても、野生型と同程度のウイルス力価を得ることができた。現在、ウイルスゲノム複製時において忠実性が向上するか検討を行っている。

E. 結論

本年度の成果として、ウイルスゲノムに変異が入りにくい高忠実化ポリメラーゼへと構造変換を誘導するオリジナルなアミノ酸置換を見出すことはできなかった。しかし、他の研究グループから報告された高忠実化が見込まれる PB1-V43I 置換は、H1N1 ワクチン株へも応用できる可能性を示せた。

一方で、ウイルスゲノムの変異導入効率を制御する新たなアミノ酸部位 (PB1 ポリメラーゼ: Try82) を発見した。PB1-Y82C 変異ウイルスは、野生株と比較し増殖性が著しく低く、さらに DI 粒子を多く含むことから、弱毒性ウイルス集団として全粒子生ワクチンへの応用が期待できる。今後は、高忠実性および低忠実性ポリメラーゼの両方を活用し、ワクチンの効力を最大限に発揮できる母体ウイルス株開発に繋げていく。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 内藤忠相、齊藤峰輝、信澤枝里、小田切孝人、田代真人:インフルエンザウイルスのゲノム変異導入率を制御する RNA ポリメラーゼの機能領域
第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横

浜: 2014.11.10

2) 内藤忠相、信澤枝里、小田切孝人、田代真人:インフルエンザウイルスゲノムの変異導入率を制御する RNA ポリメラーゼの機能領域

第 29 回中国四国ウイルス研究会. 山口: 2014.6.29

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1. ゲノム変異導入効率

	Plasmid (BG) ^(C)	PB1野生型	Y82C-K481H	Y82C
解析対象リード数(nt) ^{(A)(B)}	24678	14939	16503	15514
塩基置換総数	223	311	657	785
塩基置換頻度(変異塩基数/10 ⁵ nt) ^(D)	2.98	6.87	13.1	16.7
塩基置換頻度-BG(変異塩基数/10 ⁵ nt)		3.98	10.2	13.7
挿入(IN)	30	15	22	33
欠失(DL)	28	37	45	38
欠失挿入を含むリードの割合(%) ^(E)	0.00235	0.00348	0.00405	0.00457
欠失挿入を含むリードの割合-BG(%)		0.00113	0.0017	0.00222

(A) 各ウイルスをMDCK細胞に感染後、子孫ウイルス粒子からRNAを抽出して第8分節のウイルスゲノムのcDNAを調製し、次世代シーケンサーにより塩基配列を解析した。

(B) 1リードには、第8分節の303塩基分の配列がコードされている。

(C) シーケンス解析のためのDNA増幅に必要となるPCR酵素(DNAポリメラーゼ)の変異導入頻度をバックグラウンド(BG)として差し引くために、PB1のcDNAをコードするプラスミドをコントロールとして用いた。

(D) 塩基置換頻度=置換総数/リード数/リード長(303塩基)

(E) 欠失挿入を含むリードの割合=IN+DL/リード数

ワクチンによる効果的免疫誘導系の開発

担当責任者 高橋宜聖 国立感染症研究所免疫部・室長

研究要旨

抗原変異株に有効な免疫応答では、複数のインフルエンザ HA に交差結合する B 細胞と抗体が重要な役割を果たす。この交差防御性に優れた抗体誘導能をもつワクチン株と免疫法を同定するため、本年度の研究では、複数の HA に結合する交差結合性 B 細胞の同定法を開発し、この方法で検出される B 細胞の抗原エピトープ解析を行った。H3 亜型の X31 ウイルス株由来の HA とその変異株の HA を異なる蛍光色素で標識したプローブを作製し、2つのプローブに交差結合する B 細胞と、X31 HA のみに結合する株特異的 B 細胞の分離を試みたところ、各 B 細胞を高純度で単離することに成功した。さらに、単離した交差結合性 B 細胞が発現する抗体タンパクを使用し、交差結合性 B 細胞のエピトープ構造を解析したところ、HA の stem 領域を認識することを特定した。本研究で開発した技術は、H5 亜型など新型インフルエンザへの利用も可能であり、交差結合性 B 細胞や抗体の誘導能に優れた新型ワクチン株と免疫法の特定に有用である。

A. 研究目的

流行株の正確な予測が困難な新型インフルエンザに対し、ワクチンによる交差防御能の賦与が有効性改善にとって重要な課題となる。本研究では、交差結合性に優れた B 細胞の検出系を確立し、それを用いて交差反応性を示す抗体を効率的に誘導するワクチン株と免疫条件を同定し、最終的に交差防御性に優れた新型インフルエンザワクチン種株の開発を目指す。

B. 研究方法

(1) HA タンパクの蛍光色素での標識

交差結合性細胞の検出系立ち上げのため、基礎データが豊富な H3 亜型ウイルス株を用いて検証した。H3N2 型の X31 株と、その抗原ドリフト株である Uruguay 株のリコンビナント HA タンパクを作製した。これら HA タンパクを、それぞれ allophycocyanin と phycoerythrin で標識し、HA プローブを作製した。

(2) フローサイトメトリによる交差結合性

B 細胞の検出

X31 インフルエンザウイルスを経鼻感染させたマウスから肺細胞を調製し、抗体染色を行った。この抗体染色液の中に 2 種類の HA プローブを添加し、X31/Uruguay 両方に結合する交差結合性 B 細胞と、X31 のみに結合する株特異的 B 細胞をフローサイトメトリ（FACS）にて検出した。

(3) FACS 分離した B 細胞の試験管内培養
FACS にて分離した記憶 B 細胞を、3T3 繊維芽細胞の存在下で IL-2/IL-4/IL-5 をとともに 6 日間培養し、抗体産生細胞への分化を促した。培養上清を回収し、X31 HA ならびに Uruguay HA に結合する IgG 抗体濃度を ELISA 法により解析した。

(3) 抗体重鎖・軽鎖遺伝子のクローニング
分離した細胞から cDNA を合成し、PCR により抗体遺伝子 VH/VL を増幅した。各遺伝子を抗体発現ベクターに組み込みクローニングを行った。

(4) 培養細胞を用いた抗体タンパクの発現
クローニングした抗体 VH/VL 発現ベクタ

一を HEK293 細胞株に形質転換し、5 日間培養した後、上清中に産生された抗体の HA 結合性を ELISA により確認した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所戸山庁舎において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従い実施した。動物実験は、動物実験委員会規程に従い、委員会の承認を得てから行った。

C. 研究結果

(1) FACS による交差結合性 B 細胞の検出
交差結合性 B 細胞を検出するため、我々は 2 種類の H3N2 ウイルスから組換え HA タンパクを調製した。X31 は 1968 年に分離された H3N2 亜型ウイルスであり、A/Uruguay/716/2004 は、2004 年に分離された同じ亜型の抗原変異株である。これら 2 種類の HA プローブをそれぞれ異なる蛍光色素で標識し、FACS 解析を行った。感染防御に関わる B 細胞は、一度記憶 B 細胞に分化して、この状態で生体内に長期間保存される。さらに、感染防御に必要な記憶 B 細胞は肺組織に分布することを我々は見いだしている。肺記憶 B 細胞の交差結合性を解析するため、X31 を感染させたマウスから肺細胞を調製し、2 種類の HA プローブを含む複数の抗体で染色したところ、X31 HA 結合性の記憶 B 細胞の中に、変異 HA にも同時に結合可能な B 細胞が約 30%含まれることを見いだした(図 1 A)。この FACS で検出される B 細胞が本当に交差結合性抗体を発現するかどうかを確認するため、この B 細胞を FACS にて分離し、サイトカイン刺激を加えて抗体産生細胞に分化誘導した。そして、培養上清中に産生された抗体の X31 と変異株に対する結合性を調べたところ、X31 と変異株の両方に結合する細胞群は、交差結合性抗体を産生することを確認した。以上の結果から、この 2 種類の HA プローブを用いた FACS 染色によって交差結合性 B 細胞を検出し、分離可能であることが明らかとなった。

この手法で検出可能な交差結合性 B 細胞の抗原エピトープを明らかにする目的で、この B 細胞からモノクローナル抗体を作製した。まず、交差結合性記憶 B 細胞を 96 ウェルプレートに各ウェル 1 個ずつ分離し、抗体遺伝子可変領域を PCR により増幅した後、発現ベクターにクローニングした。この発現ベクターをヒト細胞株にトランスフェクションすることにより、交差結合性 B 細胞が発現する抗体タンパクを作出した。この方法により、交差結合性記憶 B 細胞から 9 種類のモノクローナル抗体を作製することに成功した(図 2 A)。

これまでマウスやヒトから、様々な亜型のインフルエンザ HA に交差結合するモノクローナル抗体が作出されているが、その多くは HA の stem 領域に結合することが報告されている。Stem 領域は HA1 と HA2 から構成されているが、今回作製したモノクローナル抗体が HA2 stem 領域を認識するか否か検証するため、この領域を含む合成ペプチドを用いて ELISA を行った。すると、9 種類中 7 種類のモノクローナル抗体が HA2 stem 領域のペプチドに結合することが明らかとなった。以上の結果から、2 種類の HA プローブを用いて分離可能な交差結合性 B 細胞の多くは、HA2 stem 領域を認識することが明らかとなった。

D. 考察

近年、単一のマウス・ヒト B 細胞から、抗体 VH/VL 遺伝子をクローニングし、モノクローナル抗体タンパクを作製する技術が開発され、たくさんの種類の交差結合性 HA 抗体が作出された。しかし、この抗体の供給源である交差結合性 B 細胞を効率的に誘導可能なワクチン種株やアジュバントはいまだ開発されていない。本研究では、様々なワクチン種株やアジュバントの交差結合性 B 細胞の誘導能を正確に評価するため、この B 細胞を FACS にて高感度かつ再現性よく検出可能なシステムを構築することに成功した。今後、このシステムを新型の亜型 (H5 や H7 など) に応

用することにより、現在本研究班で開発が進められている様々な新型ワクチン種株の中から、最も交差免疫誘導能が高いワクチン種株の選別を効率的に行う予定である。

E. 結論

交差防御性に優れた新型インフルエンザワクチン種株の開発に利用するため、交差結合性に優れた B 細胞の検出系を確立することに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Nakauchi, M., Takahashi, Y., Onodera, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matsumura, T., Ato, M., Kobayashi, K., Shimotai, Y., Mizuta, K., Hongo, S., Tashiro, M., Nobusawa, E. Epitope Mapping of the Hemagglutinin Molecule of A/(H1N1)pdm09 Virus by Using Monoclonal Antibody Escape Mutants. *J. Virol.* 88, 12364-12373, 2014

2. 学会発表

- 1) Takahashi, Y., Ato, M., Adachi, Y.: B cell pathways for protective memory responses against influenza virus infection.
The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara (奈良、9月)
- 2) 高橋宜聖 ウイルス感染防御抗体と腸内細菌
日本食品免疫学会第 10 回学術大会 (東京、10月)
- 3) Adachi, Y., Inoue, T., Kurosaki, T., Ato, M., Takahashi, Y.: Persistent local germinal centers select cross-reactive antibody into immunological memory following influenza virus infection.
第 43 回日本免疫学会 (京都、12月)
- 4) Onodera, T., Adachi, T., Tsubata, T.,

Kurosaki, T., Adachi, Y., Ato, M., Takahashi, Y.: CD273+ memory B cells replenish bone marrow plasma cells in the steady state after influenza vaccination.

第 43 回日本免疫学会 (京都、12月)

- 5) Miyauchi, K., Sugimoto-Ishige, A., Takahashi, Y., Hasegawa, H., Takemori, T., Kubo, M.: Influenza A virus (IAV) vaccination effectively induces germinal center independent protective immunity.
第 43 回日本免疫学会総会 (京都、12月)
- 6) Adachi, T., Yoshikawa, S., Onodera, T., Takahashi, Y., Karasuyama, H.: In vivo imaging of calcium signaling in B cells of mice expressing the genetically encoded YC3.60 calcium indicator.
第 43 回日本免疫学会総会 (京都、12月)
- 7) 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宜聖、阿戸学、小田切孝人、板村繁之: 剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状に対する TLR アゴニストの影響
第 18 回日本ワクチン学会学術集会 (福岡、12月)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 フローサイトメトリによる交差結合性記憶B細胞の検出と分離

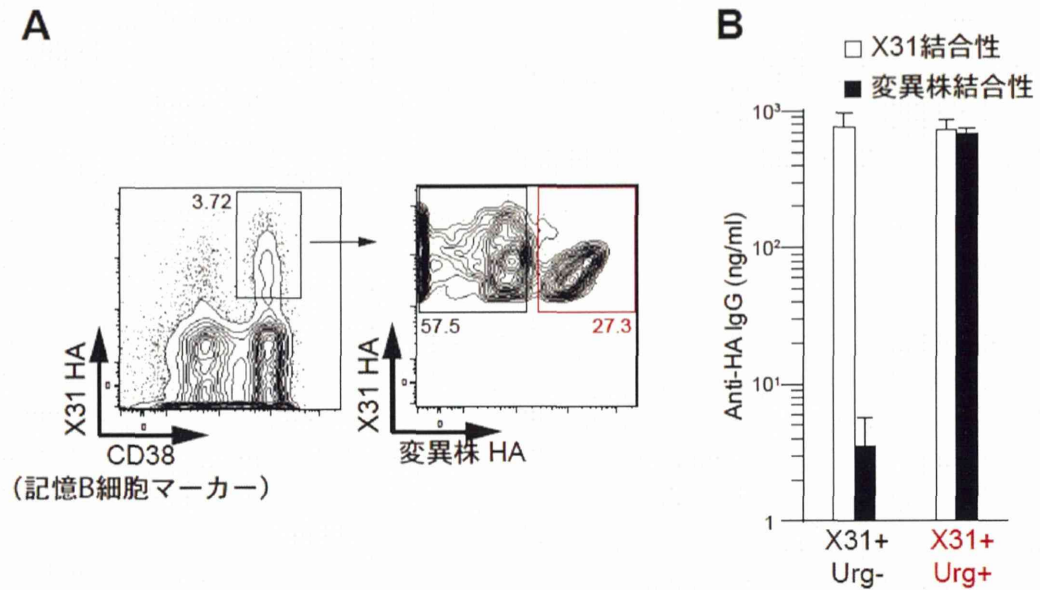
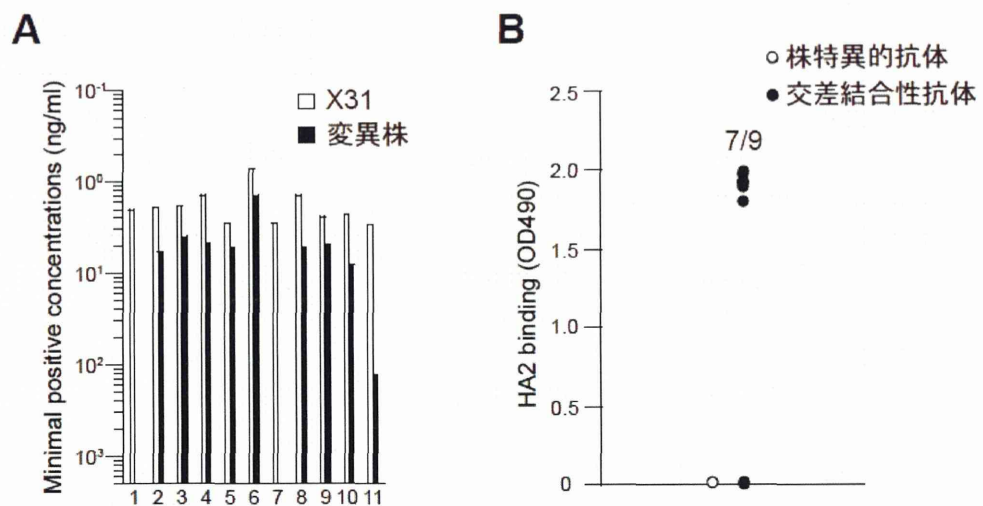


図2 交差結合性B細胞から作製したモノクローナル抗体のエピトープ



III. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「迅速な製造が可能な新型インフルエンザワクチンの開発技術に関する研究」

機関名 国立感染症研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
II型膜貫通型セリンプロテアーゼTMPRSS2は、HA開裂部位にMONO-basicなアミノ酸配列を持つA型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である（口頭）	酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠	第62回日本ウイルス学会 学術集会	2014年11月10日	国内
インフルエンザウイルスのゲノム変異導入率を制御するRNAポリメラーゼの機能領域（口頭）	内藤忠祖、齊藤峰輝、信澤枝里、小田切孝人、田代真人	第62回日本ウイルス学会 学術集会	2014年11月10日	国内
インフルエンザウイルスHAとNAの極性輸送は脂質ラフトのクラスタリングを介して相互促進される（口頭）	大倉喬、百瀬文隆、市川玲子、竹内薫、森川裕子	第62回日本ウイルス学会 学術集会	2014年11月10日	国内
インフルエンザウイルス膜タンパク質HAおよびM2のウイルス粒子形成における機能解析（ポスター）	滝沢直己、百瀬文隆、原口日和、森川裕子、野本明男	第62回日本ウイルス学会 学術集会	2014年11月11日	国内
自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼのポリシストロニック発現（ポスター）	百瀬文隆、森川裕子	第62回日本ウイルス学会 学術集会	2014年11月11日	国内
2A自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼのポリシストロニック発現（口頭）	百瀬文隆、森川裕子	第37回日本分子生物学会 年会	2014年11月27日	国内
Persistent local germinal centers select cross-reactive antibody into immunological memory following influenza virus infection.（口頭）	Adachi, Y., Inoue, T., Kurosaki, T., Ato, M., <u>Takahashi, Y.</u>	第43回日本免疫学会	2014年12月	国内
CD273+ memory B cells replenish bone marrow plasma cells in the steady state after influenza vaccination.（口頭）	Onodera, T., Adachi, T., Tsubata, T., Kurosaki, T., Adachi, Y., Ato, M., <u>Takahashi, Y.</u>	第43回日本免疫学会	2014年12月	国内

Influenza A virus (IAV) vaccination effectively induces germinal center independent protective immunity. (口頭)	Miyauchi, K., Sugimoto-Ishige, A., <u>Takahashi, Y.</u> , Hasegawa, H., Takemori, T., Kubo, M.	第43回日本免疫学会	2014年12月	国内
In vivo imaging of calcium signaling in B cells of mice expressing the genetically encoded YC3.60 calcium indicator. (口頭)	Adachi, T., Yoshikawa, S., Onodera, T., <u>Takahashi, Y.</u> , Karasuyama, H.	第43回日本免疫学会	2014年12月	京都
インフルエンザウイルスゲノムの変異導入率を制御するRNAポリメラーゼの機能領域 (口頭)	内藤忠祖、信澤枝里、小田切孝人、田代真人	第29回中国四国ウイルス研究会	2014年6月29日	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の 別
The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.	Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, <u>Nobusawa E</u> , Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M.	J Virol	2014年 5月	国外
Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts.	Ohkura T, Momose F, Ichikawa R, Takeuchi K, <u>Morikawa Y</u>	J Virol	2014年9月	国外
Amino acid substitutions in PB1 of avian influenza viruses influence pathogenicity and transmissibility in chickens.	<u>Suzuki Y</u> , Uchida Y, Tanikawa T, Maeda N, Takemae N, Saito T.	J Virol	2014年10月	国外
Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants.	Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M, <u>Takahashi Y</u> , Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumura T, Ato M, Kobayashi K, Shimotai Y, Mizuta K, Hongo S, Tashiro M, <u>Nobusawa E.*</u>	J Virol	2014年11月	国外

IV. 研究成果の刊行物・別刷

The Host Protease TMPRSS2 Plays a Major Role in *In Vivo* Replication of Emerging H7N9 and Seasonal Influenza Viruses

Kouji Sakai,^a Yasushi Ami,^b Maino Tahara,^a Toru Kubota,^a Masaki Anraku,^a Masako Abe,^a Noriko Nakajima,^c Tsuyoshi Sekizuka,^d Kazuya Shirato,^a Yuriko Suzuki,^b Akira Ainai,^e Yuichiro Nakatsu,^a Kazuhiko Kanou,^f Kazuya Nakamura,^e Tadaki Suzuki,^c Katsuhiko Komase,^a Eri Nobusawa,^e Katsumi Maenaka,^g Makoto Kuroda,^d Hideki Hasegawa,^c Yoshihiro Kawaoka,^{h,i,j} Masato Tashiro,^e Makoto Takeda^a

Department of Virology 3,^a Division of Experimental Animal Research,^b and Influenza Virus Research Center,^g National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; Department of Pathology,^c Laboratory of Bacterial Genomics, Pathogen Genomics Center,^d and Infectious Disease Surveillance Center,^f National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; Laboratory of Biomolecular Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Hokkaido, Japan^g; Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, and International Research Center for Infectious Diseases, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan^h; ERATO Infection-Induced Host Responses Project, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japanⁱ; Influenza Research Institute, University of Wisconsin—Madison, Madison, Wisconsin, USA^j

ABSTRACT

Proteolytic cleavage of the hemagglutinin (HA) protein is essential for influenza A virus (IAV) to acquire infectivity. This process is mediated by a host cell protease(s) *in vivo*. The type II transmembrane serine protease TMPRSS2 is expressed in the respiratory tract and is capable of activating a variety of respiratory viruses, including low-pathogenic (LP) IAVs possessing a single arginine residue at the cleavage site. Here we show that TMPRSS2 plays an essential role in the proteolytic activation of LP IAVs, including a recently emerged H7N9 subtype, *in vivo*. We generated TMPRSS2 knockout (KO) mice. The TMPRSS2 KO mice showed normal reproduction, development, and growth phenotypes. In TMPRSS2 KO mice infected with LP IAVs, cleavage of HA was severely impaired, and consequently, the majority of LP IAV progeny particles failed to gain infectivity, while the viruses were fully activated proteolytically in TMPRSS2^{+/+} wild-type (WT) mice. Accordingly, in contrast to WT mice, TMPRSS2 KO mice were highly tolerant of challenge infection by LP IAVs (H1N1, H3N2, and H7N9) with $\geq 1,000$ 50% lethal doses (LD₅₀) for WT mice. On the other hand, a high-pathogenic H5N1 subtype IAV possessing a multibasic cleavage site was successfully activated in the lungs of TMPRSS2 KO mice and killed these mice, as observed for WT mice. Our results demonstrate that recently emerged H7N9 as well as seasonal IAVs mainly use the specific protease TMPRSS2 for HA cleavage *in vivo* and, thus, that TMPRSS2 expression is essential for IAV replication *in vivo*.

IMPORTANCE

Influenza A virus (IAV) is a leading pathogen that infects and kills many humans every year. We clarified that the infectivity and pathogenicity of IAVs, including a recently emerged H7N9 subtype, are determined primarily by a host protease, TMPRSS2. Our data showed that TMPRSS2 is the key host protease that activates IAVs *in vivo* through proteolytic cleavage of their HA proteins. Hence, TMPRSS2 is a good target for the development of anti-IAV drugs. Such drugs could also be effective for many other respiratory viruses, including the recently emerged Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus, because they are also activated by TMPRSS2 *in vitro*. Consequently, the present paper could have a large impact on the battle against respiratory virus infections and contribute greatly to human health.

Influenza A virus (IAV) is classified in the *Orthomyxoviridae* family and is a leading agent that affects and kills humans worldwide. IAV enters target cells via endocytosis, and virus-cell membrane fusion occurs at the late endosomes, thus releasing the viral genome to start virus replication. Membrane fusion is mediated by the hemagglutinin (HA) protein, which is synthesized as the inactive precursor HA₀ and cleaved by a host cell protease(s) to gain fusion activity. Proteolytic cleavage of HA₀ into the HA₁ and HA₂ subunits is essential for HA to express membrane fusion activity and, consequently, for IAV to acquire infectivity.

The HA of low-pathogenic (LP) IAVs, for which infection remains localized at respiratory and/or alimentary epithelial cells in birds and mammals, including humans, possesses a single arginine residue at the cleavage site. The HA of LP IAVs is thought to be cleaved and activated by a specific protease(s) present exclusively in these tissues. Trypsin, miniplasmin, tryptase Clara, mast cell tryptase, and type II transmembrane serine proteases (TTSPs) such as TMPRSS2, human airway trypsin-like protease (HAT),

TMPPRSS4, and matriptase have been shown to cleave the HA of LP IAVs at the single arginine residue (1, 2). Previous studies have also demonstrated HA subtype and strain specificities of TTSPs (3–6). On the other hand, the HA of high-pathogenic (HP) IAVs such as HP H5N1, which causes fatal systemic infections, contains multiple basic amino acids at the cleavage site (7–9). The HA of HP IAVs is cleaved by ubiquitous intracellular proteases such as furin and proprotein convertase 5/6, which are present in all cell types (1, 2). The concept of host protease-dependent tissue tro-

Received 11 December 2013 Accepted 27 February 2014

Published ahead of print 5 March 2014

Editor: T. S. Dermody

Address correspondence to Makoto Takeda, mtakeda@nih.gov.jp.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.03677-13

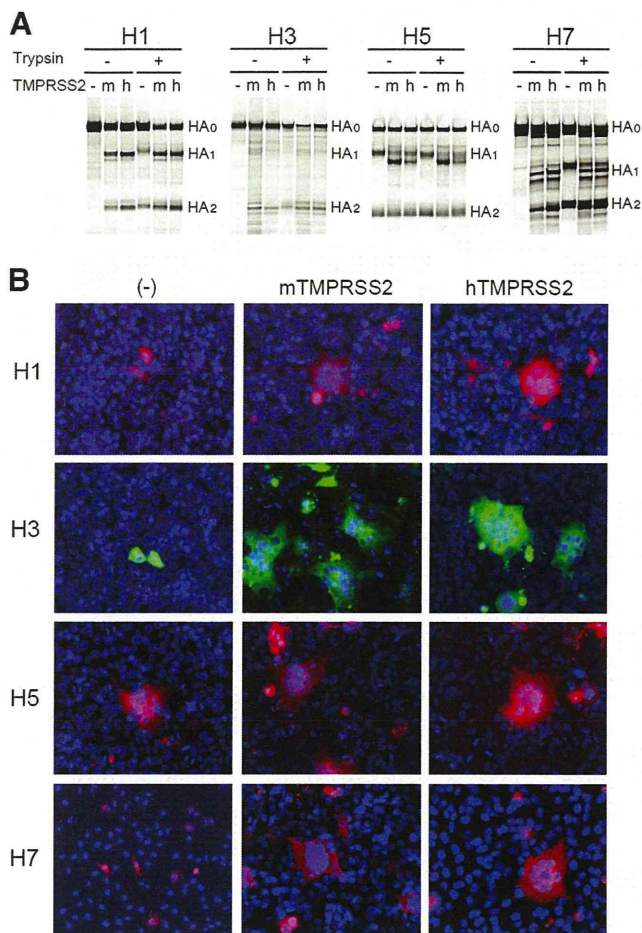


FIG 1 Proteolytic activation of HA by TMPRSS2. (A) HA proteins (H1, H3, H5, and H7 subtypes) were expressed alone (–) or together with mTMPRSS2 (m) or hTMPRSS2 (h) in 293T cells using expression plasmids. The cells were pulse labeled, and the HA components (HA₀, HA₁, and HA₂) were detected and analyzed by immunoprecipitation and SDS-PAGE. (B) HA proteins were expressed in HeLa/mTMPRSS2, HeLa/hTMPRSS2, or parental HeLa (–) cells. At 2 days posttransfection, the cells were treated with low-pH buffer (pH 5.3), and cell-cell fusion was analyzed by immunofluorescence staining using anti-IAV antibodies coupled with Alexa Fluor 488- or 549-conjugated secondary antibodies. The nuclear DNA was stained with DAPI.

pism and pathogenicity of LP and HP IAVs has been well established (7–9). However, the protease(s) directly involved in the cleavage activation of each HA subtype remains to be identified.

In the present study, we focused primarily on TMPRSS2 because this protease is expressed in the respiratory tract, activates a variety of respiratory viruses, and cleaves the HA of IAVs efficiently, even at marginal levels of expression, *in vitro* (4, 10–16). Our working hypothesis was that if TMPRSS2 is essential for IAV activation *in vivo*, mice lacking TMPRSS2 expression (TMPRSS2 knockout [KO] mice) are highly tolerant of challenge infection by IAVs that use primarily TMPRSS2 for HA cleavage.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement. All experiments with animals were performed in strict accordance with the animal experimentation guidelines of the National Institute of Infectious Diseases. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the institute (permit numbers 113066-II, 313008-II, and 13-09).

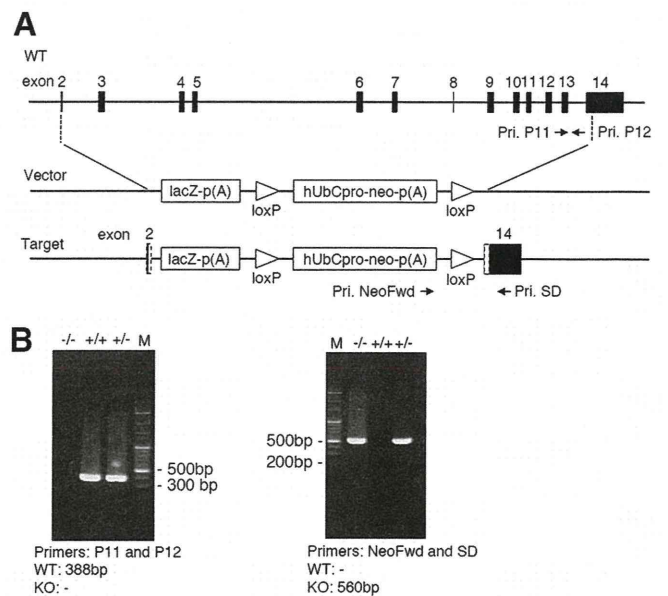
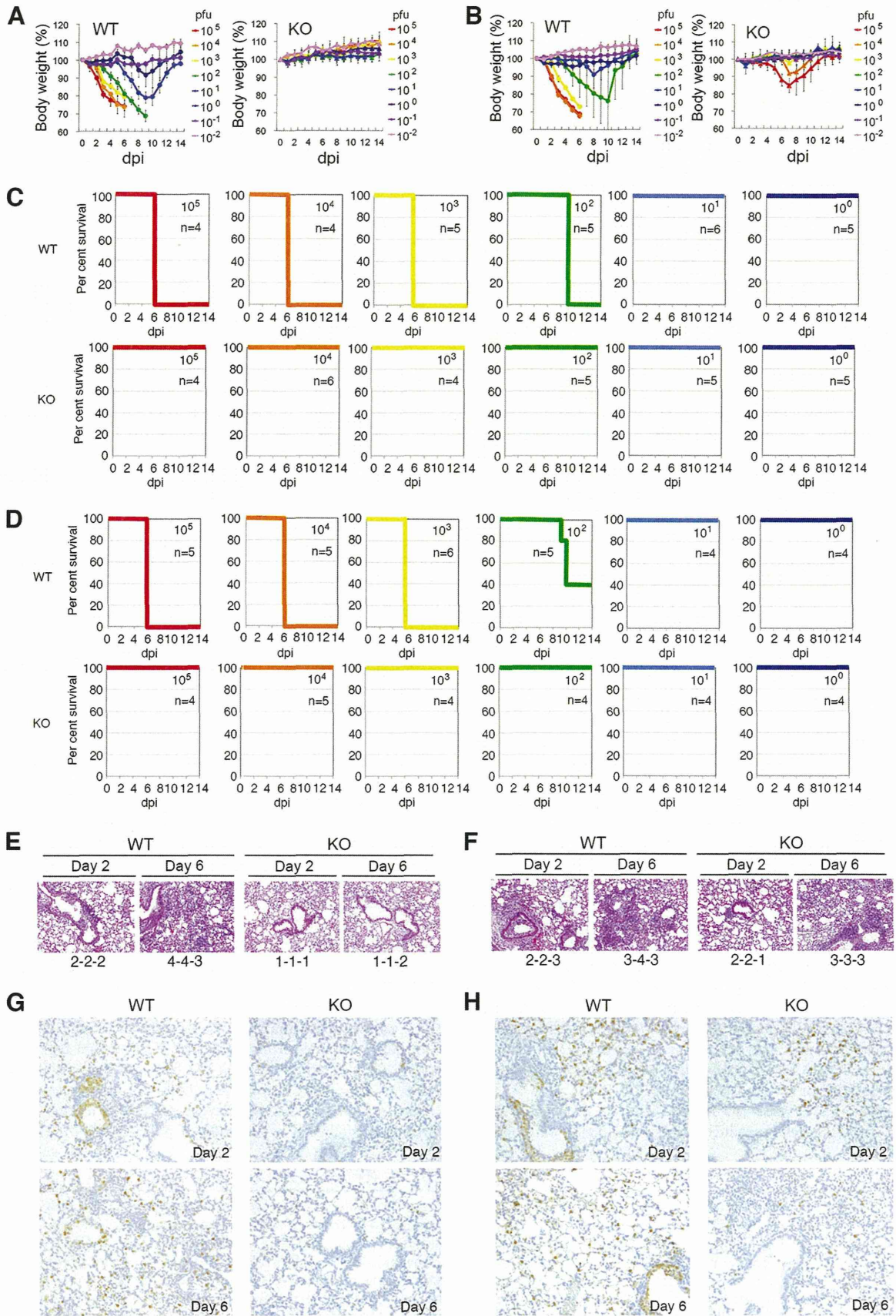


FIG 2 Structure of the targeted TMPRSS2 gene. (A) TMPRSS2 KO mice possess an allele [Tmprss2^{tm1(KOMP)V1cE}] with an ablating deletion of the TMPRSS2 gene, which was replaced by the *lacZ* gene (VelociGene KOMP definitive null allele design). (B) The genotype was analyzed by VelociGene KOMP allele PCR genotyping strategies using primers NeoFwd and SD and a previously reported method using primers P11 and P12 (25).

TABLE 1 Transcriptome analysis of lungs from WT and TMPRSS2 KO mice for TTSPs

Gene	RPKM			
	Lungs		Bronchi	
	WT	KO	WT	KO
TTSPs				
Tmprss2	2.43	0.59 ^a	3.62	0.51 ^a
Tmprss3	0.00	0.00	0.21	0.00
Tmprss4	0.54	0.64	0.61	0.40
Tmprss5	0.05	0.21	1.61	0.38
Tmprss6	0.01	0.00	0.02	0.05
Tmprss7	0.39	0.00	0.01	0.03
Tmprss9	0.00	0.00	0.03	0.02
Tmprss11a	0.17	0.00	0.42	0.13
Tmprss11bnl	0.32	0.00	0.00	0.00
Tmprss11c	0.09	0.32	0.00	0.00
Tmprss11d	0.53	0.00	0.00	0.00
Tmprss11e	0.07	0.00	0.00	0.00
Tmprss11f	0.03	0.00	0.00	0.00
Tmprss11g	0.01	0.02	0.00	0.00
Tmprss12	0.00	0.00	0.00	0.00
Tmprss13	0.03	0.00	2.22	1.46
Tmprss15	0.01	0.02	0.11	0.07
Hpn	0.00	0.00	2.23	3.11
Lrp4	9.43	15.75	1.77	2.23
St14	0.35	4.35	12.96	13.74
Internal controls				
Gapdh	31.06	86.26	441.28	794.44
Actb	264.31	491.48	308.25	296.38

^a Detected reads were mapped to exon 14 in the Tmprss2 coding sequence remaining in the TMPRSS2 KO mouse genome.



Plasmids. A mouse TMPRSS2 (mTMPRSS2) expression plasmid, pTarget-mTMPRSS2, was generated by inserting the mTMPRSS2 cDNA obtained from a C57BL/6 mouse. The human TMPRSS2 (hTMPRSS2) expression plasmid pcDNA-TMPRSS2 was reported previously (11). IAV HA expression plasmids pCAGGS-H1, -H3, -H5, and -H7 were generated by inserting cDNAs of the HA-coding region from mouse-adapted (MA) A/California/04/09 (MA-CA04[H1N1]) (17), MA-A/Guizhou-X (MA-GZX[H3N2]) (18), A/Vietnam/1194/04 (VN1194[H5N1]) (19), and A/Anhui/1/2013 (Anhui1[H7N9]) (20), respectively.

Cells and viruses. MDCK, HeLa, and 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS). HeLa cells were transfected with pTarget-mTMPRSS2 or pcDNA-TMPRSS2, and Geneticin-resistant stable clones (HeLa/mTMPRSS2 and HeLa/hTMPRSS2, respectively) were selected in the presence of 1.0 mg/ml of Geneticin (G418; Nacalai Tesque). MA-CA04[H1N1] was generated by reverse genetics as reported previously (17). MA-GZX[H3N2], VN1194[H5N1], and Anhui1[H7N9] were reported previously (18–20).

Structural modeling of hTMPRSS2 and mTMPRSS2. No known structures of mTMPRSS2 or hTMPRSS2 are available. Therefore, three-dimensional structural models of hTMPRSS2 and mTMPRSS2 were generated by a homology modeling method using several protease structures as the templates. The I-TASSER modeling server (21) was used for modeling. The X-ray structure most similar to both TMPRSS2 models was the human transmembrane serine protease hepsin (PDB accession number 1Z8G). The models were refined by energy minimization using Swiss-PdbViewer (22) and finally evaluated by PROCHECK (23) and Verify3D (24).

Cell fusion assay. HeLa/mTMPRSS2, HeLa/hTMPRSS2, and parental HeLa cells were transfected with an HA-expressing plasmid (pCAGGS-H1, -H3, -H5, or -H7) by using X-tremeGENE HP DNA transfection reagent (Roche). At 2 days posttransfection, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and treated with prewarmed low-pH buffer (145 mM NaCl, 20 mM sodium citrate [pH 5.3]) for 2 min. The low-pH buffer was then replaced with DMEM–5% FCS, and the cells were incubated at 37°C for 3 h. Cell-cell fusion was analyzed by immunofluorescence staining using anti-IAV rabbit serum against H7, anti-IAV goat serum against H3, and HA-specific rabbit monoclonal antibodies (clone 327 for H1 and clone 89 for H5) coupled with Alexa Fluor 488- or 549-conjugated secondary antibodies. The nuclear DNA was stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Pulse labeling and immunoprecipitation. Monolayers of 293T cells were transfected with an HA-expressing plasmid (pCAGGS-H1, -H3, -H5, or -H7) alone or together with a TMPRSS2-expressing plasmid (pTarget-mTMPRSS2 or pcDNA-TMPRSS2). At 20 h posttransfection, the cells were cultured in methionine-cysteine-deficient medium for 1 h and then pulse labeled with [³⁵S]methionine-cysteine by using EasyTag EXPRESS3535S protein labeling mix (PerkinElmer) for 1 h. The cells in some wells were treated with 1 μg/ml acetylated trypsin (Sigma) for 1 h, as a trypsin-activated HA control, and all cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer. Polypeptides in the cell lysates were immunoprecipitated with anti-IAV rabbit sera against H3 and H7 (Sino Biological Inc.) and HA-specific rabbit monoclonal antibodies (clone 327 for H1 and clone 89 for H5) and analyzed by SDS-PAGE.

Generation of TMPRSS2 KO mice. TMPRSS2 gene KO C57BL/6 embryonic stem (ES) cells (product number VG13341) were obtained

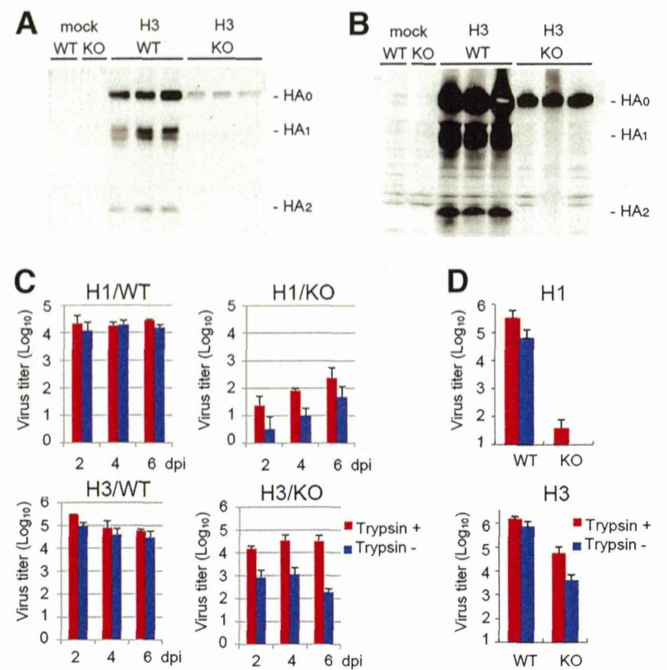


FIG 4 Proteolytic activation of IAVs *in vivo*. (A and B) WT and TMPRSS2 KO mice were intranasally inoculated with PBS (mock) ($n = 1$) or MA-GZX[H3N2] ($n = 3$). Lung lavage fluids (A) and lung homogenates (B) were collected at 6 dpi, and HA was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Each lane corresponds to data from an individual mouse. (C and D) WT and TMPRSS2 KO mice were intranasally inoculated with MA-CA04[H1N1] ($n = 3$) or MA-GZX[H3N2] ($n = 3$). Lung lavage fluids at 2, 4, and 6 dpi (C) and lung homogenates at 2 dpi (D) were either untreated (Trypsin $-$) or treated with trypsin (Trypsin $+$) and used for virus titration. Error bars represent standard deviations.

from the Knockout Mouse Project (KOMP) Repository (UC Davis). The ES cells possessed the allele [Tmprss2^{tm1(KOMP)VICg}] with an ablating deletion of the TMPRSS2 gene, which was replaced by the *lacZ* gene (VelociGene KOMP definitive null allele design). The ES cells were injected into C57BL/6 mouse blastocysts, and chimeric mice in a complete C57BL/6 genetic background were generated. Male chimeric mice were selected by VelociGene KOMP allele PCR genotyping strategies by using primers NeoFwd and SD and a previously reported method using primers P11 and P12 (25) and mated with normal female C57BL/6 mice to generate C57BL/6 mice with a heterozygous genotype of the TMPRSS2 gene (TMPRSS2^{+/-}). TMPRSS2 KO mice with a homologous genotype (TMPRSS2^{-/-}) were obtained by crossing male and female TMPRSS2^{+/-} C57BL/6 mice.

Transcriptome analysis. The bronchi and right middle lobes of the lung were obtained from uninfected healthy wild-type (WT) and KO (TMPRSS2^{-/-}) mice (6-week-old females). Total RNA was prepared from ~50 mg of the bronchi or right middle lobes treated with RNAlater (Life Technologies), using a RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion), followed by selection of poly(A) mRNA using a FastTrack

FIG 3 Role of TMPRSS2 in H1N1 and H3N2 IAV pathogenicity. (A and B) WT and TMPRSS2 KO mice were intranasally inoculated with different doses of MA-CA04[H1N1] (A) or MA-GZX[H3N2] (B) ($n = 4$ to 7). Body weights were measured daily. Error bars represent standard deviations. (C and D) Survival curves of IAV-infected mice. WT and TMPRSS2 KO mice were challenged with different doses of MA-CA04[H1N1] (C) or MA-GZX[H3N2] (D). For each experimental group, 4 to 6 mice were used. (E to H) Histopathological findings in the lungs of WT and TMPRSS2 KO mice infected with MA-CA04[H1N1] (E and G) or MA-GZX[H3N2] (F and H). Data obtained by hematoxylin and eosin staining (magnification, $\times 10$) (E and F) and immunohistochemistry for the IAV nucleocapsid protein (magnification, $\times 10$) (G and H) are shown. The inflammation scores of individual mice ($n = 3$) are shown at the bottom of each panel (E and F): 0, no apparent changes; 1, minimal changes or bronchiolitis; 2, bronchiolitis and/or slight alveolitis; 3, mild alveolitis with neutrophils, monocytes/macrophages, or lymphocytes; 4, moderate alveolitis.