

平成 21 年 1 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590482
 研究課題名（和文）バイオインフォマティクスに基づく B 型インフルエンザウイルス変異機序の基盤的解析
 研究課題名（英文）Basic analysis on the mechanism of antigenic change in influenza B viruses using bioinformatics
 研究代表者
 信澤 枝里 (NOBUSAWA ERI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：90183904

研究成果の概要：ランダム変異導入法により B 型インフルエンザウイルス (B/Kanagwa/73) HA の一アミノ酸変異 HA を作製した。301 変異 HA のうち 69% の変異が許容され、これは A 型ウイルス HA の約 1.5 倍に相当する。2 系統に分岐後の B 型ウイルス HA (BHA) も同程度の許容性を示した。また、分岐前後 BHA 上の同一変異の 96% でその影響が一致した。BHA はアミノ酸変異に対する許容性が高く変異の蓄積による構造的変化が少ないため、分岐前後の BHA 間でアミノ酸変異の機能への影響にほぼ差がないことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス、血球凝集素、変異許容性、

1. 研究開始当初の背景

B 型インフルエンザウイルスはヒトを自然宿主とし、A 型ウイルスとともにヒトの間で流行を繰り返す。B 型ウイルスも A 型ウイルス同様、連続抗原変異をおこすが、ワクチンの効果が低い、感染後の抗体価の上昇が悪いなど宿主の免疫応答が A 型に対する応答とは異なり、それが流行制御を難しくしている。BHA の主要抗原、HA は抗原性の異なる二系統 (Yamagata 系統、Victoria 系統) に分岐し

交互に流行を繰り返している。また HA の進化系統樹は A 型 HA (AHA) では主幹が存在するが B 型 HA (BHA) では多分岐を形成し、異なる系統が交互に流行を繰り返し、明らかにその存在形態が異なる。しかし、この違いが、HA 蛋白質自身のアミノ酸変異に対する許容性の違いによるのか否かは、明らかにされていない。これまで、BHA の抗原変異に関する研究は、分離株やモノクローナル変異株の解析を中心に行われてきた。しかし、分離株の解

析だけでは、HA自身のアミノ酸変異に対する許容性に関する情報は得られない。以前、我々は部位特異的変異BHAを作製し、その機能解析(レセプター結合能、膜融合能)を行った。しかし、機能領域のみを解析しても、BHA全体のアミノ酸変異に対する許容性に関する情報は得られていない。

2. 研究の目的

BHAに系統的にアミノ酸変異を導入することで[BHAの構造と機能の基盤的解析]を行い、B型ウイルスの変異メカニズムの基盤となるBHAの構造的特徴を明確にし、制御が難しいB型ウイルスの流行制御に貢献することを目的とした。また、BHAはその結晶構造が明らかにされていない(申請当時)。そのため、機能に影響するアミノ酸部位の情報が少ない。任意のアミノ酸変異が機能に及ぼす影響を調べることで、より多くの機能関連領域に関する情報を得ることが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 変異HAの作製

分岐前 B/kanagawa/73 株 HA(KNG73HA)、分岐後 Yamagata 系統 B/Aichi/29/99 株 HA(YamAI99HA)、Victoria 系統 B.Aichi/28/99 株 HA (VicAI99HA) の各 cDNA を RT-PCR 法により作製し、発現ベクターにクローニングする。

(2) ランダム変異の導入

PCR based random mutation 法により、下記の要領で行った。

上記各 HAcDNA (1ng)、HA をはさむベクター側配列のプライマー(20pmol)、精度の低い Taq polymerase を用いて PCR を行う。PCR 産物を、発現ベクター(pME18S)にリクローニング後、バクテリアの形質転換に用いる。合計約 2000 個のバクテリアのコロニーから DNA を抽出し HA 遺伝子の塩基配列を決定した。本研究で用いた条件では、1 アミノ酸変異導入効率約 20~30%であった。機能解析は主に 1 アミノ酸変異 HA を対象に行い、2 アミノ酸変異 HA、3 アミノ酸変異 HA の一部に関しても、変異の影響の独立性を確認するため機能解析を行った。

(3) 部位特異的突然変異法

Overlapping PCR 法により、1. の cDNA を用いて、必要に応じて部位特異的にアミノ酸変異の導入を行った。

(4) 機能解析

レセプター結合能:

上記 2、3 で作製した変異 HA cDNA を、Cos 細胞に transfection し、細胞上に発現した各変異 HA のヒト赤血球吸着能を検討した。インフルエンザウイルスのレセプターはシア

ル酸で、赤血球上にはシアリル糖鎖が多数存在する。そのため、赤血球吸着反応(HAD 反応)は、HA のレセプター結合能の推定に広く使われている。HA 発現細胞に、1%ヒト赤血球を吸着させ、室温で 30 分放置後、PBS で細胞を洗浄し非特異的に吸着した血球を除く。その後、吸着血球を溶血させ溶出したヘモグロビンの吸光度(540nm)から吸着血球量を推定し、レセプター結合能とした。

膜融合能:

COS 細胞上で発現している HA に対しては、TPCK トリプシン処理(37度、15分)により、活性化を行う。また、ヒト赤血球には、蛍光プローブ(カルセイン及び R18)を血球内及び膜上に導入する。蛍光標識赤血球を HA 発現 COS 細胞に吸着後、酸性条件にし、膜融合能を検討する。膜融合能は、顕微鏡下で判定する。

(5) 再構成系によるウイルスの作製

KNG73 の全遺伝子とポリメラーゼおよび核タンパク質をそれぞれ RNA 合成用ベクター、蛋白質発現用ベクターにクローニングする。12 種類のプラスミド DNA を 293T 細胞に transfection し、ウイルスを回収した(詳細は、Neumann et al. PNAS '99 による)。この系を用いてレセプター結合領域近傍に変異が生じている変異 HA を持つ変異ウイルスの作製を試みた。ウイルスが回収された場合は、その増殖能(HA 価と pfu)を測定した。

(6) 赤血球上のシアリル糖鎖配列の決定

ヒト及びニワトリ赤血球を溶血、乾燥、脱脂後、グリコペプチダーゼにより糖鎖を分離。液体クロマトグラフィー、TOFMAS による、糖鎖分画の分離、シアリル糖鎖配列の決定(末端シアリル酸の 2-3linked sialic acid, 2-6linked sialic acid の同定を含む)

4. 研究成果

(1) 変異 HA の HAD 能: PCR based random mutation 法により作製した変異 HA を COS 細胞上で発現させ、その HAD 能を測定した。KNG73HA の OD は 0.6~0.8 で、OD 値 0.2 以上をポジティブ変異、0.2 以下をネガティブ変異とした。

(2) KNG73HA の変異が生物学的機能に及ぼす影響

BHA の変異許容性

ランダム変異 HA 中に、301 個の 1 アミノ酸変異 HA を同定した。それぞれを Cos 細胞上で発現させ、その HAD 能を測定した。その結果、HAD 能を許容する変異の割合[許容性 = 許容変異数 / 全変異数 %]は HA1 領域で 62%、HA2 領域で 83%となった。これは、既に報告されている AHA の許容性の約 1.5 倍である。

HA2 領域の類似性は BHA 間で高い (98-99%) ため、許容性が制限されると考えられるが、HA2 領域の変異に対する許容性は高く、保存されているアミノ酸配列が必ずしも機能にとって重要ではないことを示唆した。HAD のほか、膜融合能への変異の影響も調べた結果、fusion peptide 内の変異以外では、機能に影響を及ぼす変異は同定されず、膜融合に関する機能領域は、レセプター結合領域に比べ、限局していることが示唆された。

一方、同一部位に異なる変異が生じている変異 HA では、約 86% で変異の影響は一致していた。この結果は、アミノ酸の種類より変異の生じた位置の方が、機能への影響が大きいことを示唆している。

変異導入部位

本研究で得られた変異 HA のうちポジティブ変異は HA 全体に分布し、偏りは見られなかった。一方、ネガティブ変異の大半は、HA タンパク質の内部に分布した。このうち、33 部位 (HA1)、73 部位 (HA2) のアミノ酸残基は、よく保存されている。これは、保存されているアミノ酸残基が必ずしも negative selection を受けているとは限らないことを示す。

(3) 糖鎖付加部位の HAD 能への影響

KNG73HA の糖鎖付加部位は 7 部位にあり、このうち 3 部位の変異は許容され、異なる 3 部位の変異は非許容であった。残りの一部位には変異は生じていなかった。BHA が二系統に分岐後さらに 194 番に新たな糖鎖付加部位が生じている。これまで、BHA は発現系で単独発現させる際、HAD 能の発現には、あらかじめシアリダーゼ処理により HA 上のシアル酸を除去する必要があった。しかし、分岐後 BHA では、この 194 番の糖鎖部位付加の結果、HAD 能発現にシアリダーゼの前処理を必要としなくなっている。

変異の影響をさらに詳しく検討するため、分岐後 BHA (YamA199HA, VicA199HA) に対しても、KNG73HA と同様の手法により、一アミノ酸変異 HA を作製し、変異の HAD 能への影響を調べた。

各糖鎖付加部位のうち 163 番の Asn は抗原領域の 160 ループ中にあり、近傍ではアミノ酸の挿入欠失が頻繁に起きる。163 部位の変異は許容変異であるが、そのアミノ酸は、約 1000 の配列間でよく保存されている。これは、この位置の糖鎖が、機能にとって重要というより、抗体の攻撃を免れるために重要であることを示している。

194 番の糖鎖に関しては、分岐後 HA では HAD の発現にシアリダーゼ処理を必要としないが、194 番の糖鎖付加部位を欠失するとシアリダーゼ要求性となる。この結果は、194

番の糖鎖と他の糖鎖あるいはレセプターとの相互作用が、シアリダーゼ依存性に影響していることを示していた。

一方 194 番への糖鎖付加は、2-3 シアル酸との結合に影響するとの報告があるが、本研究では、ヒト血球、ニワトリ血球に対する HAD 能の違いは見られなかった (我々は、以前ヒト血球、ニワトリ血球上の 2-3 シアル酸の割合に差があることを報告している。)

(4) レセプター結合領域内のアミノ酸変異

最近決定された BHA のレセプター結合領域の構造は、AHA の構造によく類似しており、190 helix, 240 loop, 140 loop とこの領域の底部と背面を形成するアミノ酸からなる。この領域内でよく保存されているアミノ酸の変異の大半は、ネガティブ変異だった。このうち、95F は、AHA の 98Y に相当するアミノ酸だが、BHA の結晶構造上では、レセプターとの間で水素結合等の結合は見られない。しかし、このアミノ酸の変異は HAD 能を著しく低下させることから、レセプターとの間で何らかの相互作用をしていることが示唆される。

レセプター結合領域周辺に変異を導入した HA を持つウイルスの生存率、増殖能を検討した。ウイルス回収の有無は、in vitro の結果をほぼ反映していた。レセプターとの直接相互作用が確認されている残基に変異が生じた HA を持つウイルスの大半は回収不能であった。95F に変異が生じた HA を持つウイルスは、plaque size が 1 mm 以下と小さいものの回収され、wild type とほぼ同程度の増殖能を示した。同様の現象は、AHA でも観察されており、98Y に変異が生じたウイルスが結合能が低いもののウイルスとしては回収されている。

一方、結合領域背面のアミノ酸でレセプターとの直接結合が観察されない部位に変異を持つウイルスは回収が可能で、回収ウイルスの増殖能も野生株とほぼ同じであった。

(5) レセプター結合特異性

これまで、レセプター結合能に関しては、BHA は 2?6 特異性が高いとされていた。しかし、本研究で HAD 能を検討した際、ニワトリ血球、ヒト血球に対する結合能に差が出る変異 BHA が存在した。我々は、以前ヒト血球では、ニワトリ血球に比べ 2?6 シアル酸が多いことを報告しているが、変異 BHA の中には、ヒト血球より、ニワトリ血球に高い親和性を示す HA が同定された。

我々は以前、H3HA のレセプター結合特異性を検討した際、ニワトリ血球とヒト血球上のシアル糖鎖で、末端のシアル酸結合に拘わらずシアル酸以下の糖鎖構造の差がレセプター特異性に影響していることを示した。し

かし、その際はニワトリ血球とヒト血球上の糖鎖構造の詳細な解析は行っていない。本研究では、変異 BHA で両血球に対する結合能に差が生じている原因を探る一手段として、血球上のシアル糖鎖の配列の決定を試みた。そのため、糖タンパク質から糖鎖を分離後、シアル糖鎖をシアル酸の数に応じてモノシアル糖鎖、ジシアル糖鎖、トリシアル糖鎖に分離し、各々の構造を決定し比較した。その結果、両血球内の各シアル糖鎖の分布には、かなり違いがあった。2-6 シアル糖鎖で、解析したモノシアル、ジシアル糖鎖のうち 2-6 シアル糖鎖の大半は、両血球に存在したが、ヒト血球の 2-6 シアル糖鎖の約 30% は、モノシアル糖鎖上に分布していた。また、ジシアル糖鎖の中には、ニワトリ血球のみに存在する 2-6 シアル糖鎖も存在した。ニワトリ血球に対し、親和性の高かった変異 HA は、このような 2-6 シアル糖鎖に対しより親和性を示したか、ヒト血球には存在しない、あるいは少ない 2-3 シアル糖鎖に対し、親和性が増加した可能性がある。このような変異 HA に関しては、アミノ酸変異による HA のレセプター結合領域近傍の構造的変化が、シアル酸に続く糖鎖構造との間の相互作用に影響を及ぼしたと考えられる。

(6) 抗原領域におけるアミノ酸変異の影響

BHA の抗原領域は、AHA のそれと類似しており、120 loop, 150 loop, 160 loop, 190helix からなる。抗原領域は一般的に HA 分子表面に位置するアミノ酸残基から構成されており、アミノ酸変異に対して寛容であると考えられる。しかし、ランダム変異 HA の中には、この領域に変異を持つ 13 個のネガティブ変異 HA が同定されている。2007 年に決定された結晶構造によると、ネガティブ変異の位置の大半が、分子内あるいは、窪み、他の残基の下に位置していた。これは、抗原領域内の残基でも、変異により機能を阻害する場合があります、このような残基は抗原エピトープにはなり得ないことを示している。

(7) 野外株 HA 主幹上のアミノ酸変異部位に生じた変異の影響

ランダム変異のうち、2 系統の流行ウイルス BHA (1973~2006 年) 系統樹の主幹を形成する 30 部位に生じた変異は、すべてポジティブ変異だった。これは約 30 年の間に BHA 上に蓄積されたアミノ酸変異は KNG73HA 以降のウイルス HA の変異の影響を左右しないことを示唆する。一方、AHA では、同様の 26 部位のうち 4 部位で変異の影響が異なっていた。

(8) 2 系統上のアミノ酸変異の影響

HA 上のアミノ酸変異の蓄積は、機能と構造

との関係に影響する可能性がある。実際、AHA では、30 年離れたウイルス HA 間で変異の影響が異なる部位が、調べた変異のうち 25% 存在した。一方、BHA で分岐前 KNG73HA と 2 系統分岐後 BHA で、同様のことを調べると同一部位、同一変異が機能におよぼす影響は、調べた変異のうち約 4% でのみ異なった。この結果は、BHA では構造に余裕がありアミノ酸変異の蓄積が機能発現にほとんど影響しない可能性を示唆している。

さらに主幹上の変異部位は、2 系統間で共通の部位が多く、その大半が抗原領域内に位置する。この結果は、2 系統への分岐後、各系統 HA 上でのアミノ酸変異の蓄積は、抗原構造を大きく変えることはなく、抗原領域内の同一部位での変異を可能にしていることを示す。

また、AHA 同様、BHA 両系統ともに同一部位で繰り返し変異が生じる現象がみられ、抗原領域内でも比較的限られたアミノ酸部位に変異が起きている。同一エピトープ内の残基でも抗体との結合能に強弱があることを我々は H3AHA のモノクローナル変異株を用いて報告している。AHA と同様、BHA の同一抗原領域内で繰り返し変異が生じる部位は、アミノ酸の種類の影響はあるものの、抗体との結合に強く関わる部位と考えられる。

分岐後 2 系統 BHA 間で、構造が類似していることは、YamA199HA, VicA199HA 間で、149, 169, 230, 252 部位のアミノ酸は、交換が可能であることから推測される。

このように BHA では、アミノ酸変異に対する許容性が AHA (H3HA) に比べ高く、構造的に安定で、変異の蓄積が抗原構造に影響を与えることは少なく、比較的安定した抗原構造を維持し得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 } (計 2 件)

Yano T, Nobusawa E, Nagy A, Nakajima S, Nakajima K. Effects of single-point amino acid substitutions on the structure and function neuraminidase proteins in influenza A virus. *Microbiol Immunol.* 2008 52(4):216-23. 査読あり

Nakajima S, Nakajima K, Nobusawa E, Zhao J, Tanaka S, Fukuzawa K. Comparison of epitope structures of H3HAs through protein modeling of influenza A virus

hemagglutinin: mechanism for selection of antigenic variants in the presence of a monoclonal antibody. Microbiol Immunol. 2007; 51(12):1179-87.

査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

信澤枝里、「B型インフルエンザウイルスHA上のアミノ酸変異の蓄積」日本ウイルス学会、2008.10.26. 岡山コンベンションセンタ
ー

6. 研究組織

(1)研究代表者

信澤 枝里

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90183904

(2)研究分担者

(3)連携研究者