

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780223
 研究課題名（和文） 計算科学的手法を用いたインフルエンザウイルスヘマグルチニンの構造変化解析
 研究課題名（英文） A comprehensive computational analysis of antigenic properties of influenza virus hemagglutinin
 研究代表者
 五十嵐 学（IGARASHI MANABU）
 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員
 研究者番号：10374240

研究成果の概要：

ヒトに馴化したインフルエンザウイルスは、抗原性を毎年少しずつ変化させて、ヒトの免疫機構を巧みに回避し、流行を繰り返す。もし、この変異の過程を予測することが出来れば、インフルエンザを先回りして制御することが出来る。本研究では、計算科学的手法を用いてヒトインフルエンザウイルスの抗原変異に伴う抗原構造の変遷を解析し、将来いずれかの HA 亜型の鳥インフルエンザウイルスがヒトの新型インフルエンザウイルスとして出現した場合の予測方法を検討した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：人畜共通感染症

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスはカモ等の水禽類を自然宿主とする人獣共通感染症病原体である。近年、世界各地で流行している高病原性鳥インフルエンザウイルスが、宿主の壁を越え、新型インフルエンザとして人の間で流行することが懸念されている。人に馴化したインフルエンザウイルスは、抗原性を毎年少しずつ変化させて、人の免疫機構を巧みに回避し、流行を繰り返す。もし、この抗原変異の過程を予測することが出来れば、インフ

ルエンザを先回りして制御することが出来る。

2. 研究の目的

HA はインフルエンザウイルスの表面糖蛋白質であり、宿主体内ではウイルス中和抗体の主要な標的となっている。HA 上の抗体結合領域にアミノ酸変異が起きると、HA と抗体との相互作用が弱くなり、新たな抗原構造を持ったエスケープ変異株が出現する。この抗原変異に関する研究は、これまで、一次配

列上でのアミノ酸置換解析や抗原変異株ウイルスの性状について中心に行われてきた。しかし、ウイルスの抗原性の変化をより詳細に理解するためには、蛋白質の立体構造を考慮することも必要である。インフルエンザウイルスは変異速度が速く、変異株が多様なため、変異株ごとの立体構造を実験で決定するのは極めて困難である。本研究では、計算科学的手法を用いて、インフルエンザウイルスの抗原変異に伴う抗原構造の変遷をアミノ酸変化と立体構造の変化から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アミノ酸変異履歴の作成

DB 解析によるアミノ酸変異履歴の作成
人インフルエンザウイルス H1N1、H2N2、H3N2 が、人の間で流行を始めてから、抗原変異に伴ってどのようにアミノ酸変化を遂げてきたのかを調べた。

変異株の HA 蛋白質の構造構築

ホモロジーモデリング法を用いて、それらの変異株の HA 蛋白質構造を構築した。

(2) 抗原変異に伴う抗原構造の経時変化

ホモロジーモデルに対する静電ポテンシャル計算

変異による HA の荷電状態の変遷を調べるため、作成したホモロジーモデルに対して、ポアソンボルツマン方程式により、静電ポテンシャル計算を行った。

配列解析による等電点計算

HA 蛋白質全体の電荷の変遷を調べるため、全配列について網羅的に等電点計算を行った。

(3) 抗原変異に伴う糖鎖付加パターンの抽出 配列解析による糖鎖付加部位の変遷履歴の作成

抗原変異に伴って、N-結合型糖鎖付加モチーフ (Asn-X-Ser/Thr) がどのように変遷して来たのかを塩基配列から抽出し、糖鎖付加部位の変遷を時系列図で表す

配列解析による糖鎖付加部位の候補となるモチーフの抽出

遺伝子の 1 塩基変異で N-結合型糖鎖付加モチーフとなる部位を配列から抽出し、糖鎖付加部位の予測方法を開発した。

配列から抽出した糖鎖付加候補部位の 3 次構造上での評価

PDB の DB 探索研究の結果から HA の 3 次構造上での様な場所に糖鎖が付加しやすいかを評価した。

蛋白質間結合シミュレーションのテスト計算を行った。

(4) 新型インフルエンザウイルスが人の間で流行した場合の抗原変異の予測モデルを検討

得られた過去の抗原変異パターンを、現在新型インフルエンザとして、人の間での流行が懸念されている鳥インフルエンザウイルスに当てはめ、抗原変異の予測モデルを検討した。

4. 研究成果

インフルエンザウイルスは糖鎖 (N-グリカン) を獲得する変異によって、抗原構造を効率よく変化させ、宿主の免疫圧を回避していることが知られているが、ここでは抗原変異に伴う糖鎖付加のパターンを調べた。申請者は、これまで過去に人の間で流行したインフルエンザウイルスの HA 遺伝子配列を大規模に解析し、抗原変異に伴う糖鎖付加部位の変遷を明らかにし、論文や学会等で報告した (Virology, 2008)。以下に結果の概要を示す。

(1) ヒトインフルエンザウイルス HA の N 型糖鎖付加部位の変遷

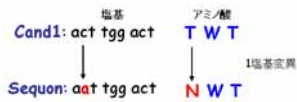
はじめに、過去にヒトの間で流行した 3 つの亜型のインフルエンザウイルス (H1N1、H2N2、H3N2) の HA 遺伝子を大規模に解析し、N 型糖鎖付加のコンセンサス配列 (sequon: Asn-Xaa-Ser/Thr, Xaa は Pro 以外) の数の変遷を調べた。

H3N2 ウイルスは 1968 年に出現以来、現在まで約 40 年間ヒトで流行を続けている間に、HA 球状頭部の sequon の数が増えていた。H1N1 ウイルスも、1918 年のパンデミック時の感染者から検出されたプロトタイプ株 (A/South Carolina/1/18) より、HA 球状頭部の sequon の数は多かった。しかしながら、ヒトの間で約 11 年間だけで流行を終えてしまった H2N2 ウイルスは、H3N2 や H1N1 ウイルスと異なり、HA 球状頭部の sequon の数は変化していなかった。

(2) 鳥インフルエンザウイルス HA の N 型糖鎖付加ポテンシャル

上の結果から、過去にパンデミックを起こしたインフルエンザウイルスがヒトの間で持続的に流行するために、抗原変異に伴い HA へ新たな糖鎖を獲得することが重要だったという仮説が浮かび上がってきた。そこで、将来いずれかの HA 亜型の鳥インフルエンザウイルスがヒトの新型インフルエンザウイルスとして出現すると仮定し、全ての HA 亜型の鳥インフルエンザウイルスについて、HA 遺伝子の塩基配列上に潜在する糖鎖付加ポテンシャルを解析した。

塩基配列上 1~3 塩基置換で sequon となるコドン (図の数を糖鎖付加ポテンシャルと定義し、1 塩基、2 塩基および 3 塩基変異で sequon となる 9 塩基のモチーフ配列をそれぞれ Cand1、Cand2、および Cand3 と名付けた。



インフルエンザウイルス HA 遺伝子上に潜在する糖鎖付加ポテンシャル

つづいて、自然宿主であるカモ目およびチドリ目に属する野性の水禽類から分離されたインフルエンザウイルス株について、全 16HA 亜型の HA 遺伝子中の sequon、Cand1、Cand2 の数を調べ、その数を比較した。sequon の数は HA 亜型間で相違は認められなかったが、Cand1 および Cand2 の数は亜型によって有意に異なっていた。この結果は、自然宿主で保持されているインフルエンザウイルスが、宿主の壁を越え、新型インフルエンザウイルスとしてヒトの間で流行した場合、新たな糖鎖を獲得する能力は HA 亜型により大きく異なる可能性を示唆した。

H2 亜型の HA 遺伝子は、H1 や H3 亜型と比べて Cand1 および Cand2 の数が少なく、糖鎖付加のポテンシャルは低かった。これはパンデミック時のプロトタイプ株でも同様の傾向を示した。上述した H2N2 ウイルスが 11 年間で、ヒトの間での流行を終えてしまった理由は複数考えられているが、我々の解析結果では H2 亜型の HA 遺伝子は糖鎖を獲得するポテンシャルが H3 および H1 亜型の HA と比べて低かったことから、1957 年に H2N2 ウイルスがパンデミックを起こした時点ですでにヒトの間で長期間流行する能力が低かった可能性が示された。

家禽類で流行している HA 亜型について

1997 年に香港で H5N1 ウイルスのヒトへの感染例がはじめて報告されて以来、H5N1、H7N7、H7N3、H9N2 亜型など家禽で流行しているインフルエンザウイルスが鳥からヒトへ直接伝播した例が多数報告され、これらの鳥インフルエンザウイルスがヒトの新型ウイルスとして出現することが危惧されている。我々の解析結果は、H5 および H9 亜型の HA 遺伝子の Cand1 の数は、H1 や H3 亜型と同程度であった。さらに Cand2 の数は、H5 亜型では H1 亜型よりも多く H3 亜型と同程度、H9 亜型も H1 亜型と同程度であった。したがって、もし H5 や H9 亜型のウイルスが将来ヒトの間で流行をはじめたら、過去のパンデミックウイルスよりも糖鎖を獲得する能力は高いかもしれないことが示唆された。一方、H7 亜型では、Cand1 および Cand2 の数は、ともに H2 亜型よりも少なかったことから、H7 亜型のウイルスがヒトの間で流行をはじめた場合、糖鎖を獲得しつつ抗原変異する能力は低いかもしれない。

HA 蛋白質の立体構造上の Cand1 の位置
最後に、H1、H2、H3、H5、H7、H9 亜型に

ついて、Cand1 の HA 立体構造上の位置を調べた。遺伝子配列解析から得られた結果と同様に、H2 亜型の HA 球状頭部では、分子表面に存在する Cand1 の数は H3、H5、H9 亜型よりも少なかった。また、鳥の H5 および H9 亜型では、過去にパンデミックを起こした H1N1、H2N2、H3N2 ウイルスのプロトタイプ株よりも表面に存在する Cand1 の数は多く、H7 亜型ではその数はもっとも少なかった。これらの結果より HA 分子表面に露出している Cand1 の数も亜型によって異なることを確認した。

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 6 件)

Reiko Yoshida, Manabu Igarashi, Hiroichi Ozaki, Noriko Kishida, Daisuke Tomabechi, Hiroshi Kida, Kimihito Ito, Ayato Takada, Cross-Protective Potential of a Novel Monoclonal Antibody Directed against Antigenic Site B of the Hemagglutinin of Influenza A Viruses, *PLoS Pathog*, 2009, 5(3), e1000350. (査読有)

五十嵐学、伊藤公人、高田礼人、バイオインフォマティクスを用いたインフルエンザウイルスヘマグルチニンの糖鎖付加ポテンシャルの予測、*Glycomicrobiology*, 2009 (査読無)

Manabu Igarashi, Kimihito Ito, Hiroshi Kida, and Ayato Takada, Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin, *Virology*, 2008, 376, 323-329. (査読有)

Reiko Yoshida, Manabu Igarashi, Hiroshi Kida, and Ayato Takada, Heterosubtypic Cross-Neutralization of Influenza A Viruses by a Novel Hemagglutination-Inhibiting Monoclonal Antibody, *Options for the control of influenza VI*, 2008, 255-256. (査読有)

Manabu Igarashi, Kimihito Ito, Hiroshi Kida, and Ayato Takada, Genetically destined potentials for N-linked glycosylation associated with antigenic changes of influenza virus hemagglutinin, *Options for the control of influenza VI*, 2008, 405-407. (査読有)

Noriko Kishida, Manabu Igarashi, Norikazu Isoda, Kenji Minari,

Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, and Ayato Takada, Identification of the Molecular Determinants Required for Duck H9N2 Influenza Virus Replication in Chickens, *Options for the control of influenza VI*, 2008, 549-550. (査読有)

[学会発表](計9件)

五十嵐学他, インフルエンザウイルス HA 遺伝子の塩基配列上に潜在する糖鎖付加ポテンシャルの解析, 第 56 回日本ウイルス学術集会, 2008 年 10 月 26 日, 岡山(岡山コンベンションセンター)

Manabu Igarashi 他, Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin, Taiwan-Japan AI Prevention and Control Conference, 2008 年 5 月 2 日, Taiwan (行政院農業委員会家畜衛生試験所)

Manabu Igarashi 他, Genetically destined potentials for N-linked glycosylation associated with antigenic changes of influenza virus hemagglutinin, *Options for the Control of Influenza VI*, 2007 年 6 月 18 日, Canada (Metro Toronto Convention Centre)

Reiko Yoshida 他, Heterosubtypic Cross-Neutralization of Influenza A Viruses by a Novel Hemagglutination-Inhibiting Monoclonal Antibody, *Options for the Control of Influenza VI*, 2007 年 6 月 18 日, Canada (Metro Toronto Convention Centre)

Noriko Kishida 他, Identification of the Molecular Determinants Required for Duck H9N2 Influenza Virus Replication in Chickens, *Options for the Control of Influenza VI*, 2007 年 6 月 18 日, Canada (Metro Toronto Convention Centre)

谷口剛他, アイテム集合間の相関変化検出によるインフルエンザウイルス遺伝子データの解析, 第 21 回人工知能学会全国大会, 2007 年 6 月 22 日, 宮崎(ワールドコンベンションセンターサミット)

山田晋弥他, H5N1 インフルエンザウイルスの電荷依存的なヒト型レセプター認識, 第 55 回日本ウイルス学術集会, 2007 年 10 月 22 日, 札幌(札幌コンベンションセンター)

梶原将大他, 動物インフルエンザのグローバルサーベイランスと全ての亜型ウ

イルスライブラリーの構築, 第 55 回日本ウイルス学術集会, 2007 年 10 月 23 日, 札幌(札幌コンベンションセンター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 学 (IGARASHI MANABU)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員

研究者番号: 10374240

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし