

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790352

研究課題名(和文) 新型インフルエンザウイルス出現のメカニズム解析

研究課題名(英文) The mechanism by which pandemic influenza A viruses emerge

研究代表者

山田 晋弥 (YAMADA SHINYA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：90466839

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスの感染は、ヘマグルチニン[HA]がレセプターと結合して始まる。ヒトのウイルスは主にヒト型レセプターを認識し、鳥のウイルスは鳥型レセプターを認識する。このレセプター特異性の違いが宿主域を大きく左右する。1968年のヒト社会での出現以降、ヒト H3N2 ウイルスの HA 蛋白質表面の正電荷は、年々蓄積しており、レセプター認識が電荷に依存したものに变化していた。更に、ヒト分離 H5N1 ウイルスも塩基性アミノ酸への置換が多く、株でみられ、塩濃度に依存した結合力でヒト型レセプター結合を行っていた。つまり、H5N1 ウイルスも季節性の H3N2 ウイルスと似たヒトへの適応をする可能性が示唆された。更に、表面電荷シミュレーションとヒト型レセプター結合との相関がみられたことから HA の表面電荷の解析もウイルスのヒトへの適応を研究する上で重要なアプローチであることが分かった。さらにヒト型レセプターを認識する H5N1 ウイルスのヒトの正常気管支細胞での増殖性を調べたところ、HA 蛋白質の 182 番目のアミノ酸などに変異が起こると顕著にヒトの気管支上皮細胞で増殖性が上がることが明らかになった。しかしながら、どの H5N1 ウイルスにおいてもフェレットにおける効率的な伝播は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：The host range restriction of influenza viruses is partly attributable to receptor specificity: most avian influenza A viruses preferentially bind to the sialic acid- α 2,3-galactose (SA α 2,3Gal) linkage on sialyloligosaccharides, whereas human viruses bind to SA α 2,6Gal. In this study, we found the positive charge of hemagglutinin(HA) of human H3N2 viruses has been increasing year by year since they emerged in humans in 1968, resulting in the electrostatic interaction with SA α 2,6Gal, whereas there is no surface charge changes of HA proteins of avian H3N2 viruses. We also found some H5N1 viruses isolated from humans possessing mutations: substitution to basic amino acids, recognized SA α 2,6Gal in the charge dependent manner. These results suggested that charge dependent recognition of human-type receptors is one of the mechanism by which influenza viruses adapt to humans. Moreover, computational simulation of the surface charge of HA proteins appears to be available for the understanding of interaction between HA proteins and receptors. Among mutations unique to human isolates, amino acid substitution at position 182 especially increased the replicative ability of H5N1 viruses in normal human bronchus epithelial cells. However, none of H5N1 viruses tested in this study showed efficient transmission in ferret model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：新型インフルエンザ、レセプター認識

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスの感染は、ヘマグルチニン[HA]がレセプターと結合して始まる。そのレセプターとしてシアル酸を有する糖たんぱく質や糖脂質を認識するが、例えば、カモのウイルスはシアル酸がガラクトースに $\alpha 2, 3$ 結合したもの(SA $\alpha 2, 3$ Gal)を主に認識し、ヒトのウイルスは $\alpha 2, 6$ 結合したもの(SA $\alpha 2, 6$ Gal)を主に認識する。このレセプター特異性の違いが宿主域を大きく左右する。レセプター特異性に一致してカモにおける主要な増殖部位である腸管には主にSA $\alpha 2, 3$ Galが存在していることが知られている。更に、我々はヒトインフルエンザウイルスのヒトにおける主要な増殖部位である上部気道には、主にSA $\alpha 2, 6$ Galが存在し、深部(細気管支や肺胞)にはSA $\alpha 2, 3$ Galが多く存在していることを報告した。それ故、1997年に香港にて、SA $\alpha 2, 3$ Galのみを認識するH5N1鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染したのも、呼吸気道下部において感染が起こったものと考えられる。しかし、ヒトの間で効率よく伝播するためには飛沫による拡散、つまり上部気道で効率的に増殖することが重要である。そのためには、上部気道に多く発現しているSA $\alpha 2, 6$ Galとの結合が重要であると考えられる。2003年以降、鳥インフルエンザの流行は拡大し、ヒトへの感染例は年々増加しているが、それだけ、ヒトへの適応に関与する変異を起こしたパンデミックウイルスの出現が起こる可能性が高まりつつあるといえる。実際に、2003年に香港でヒトに感染したH5N1ウイルスは、鳥類から分離されたH5N1ウイルスにはないヒト特有のアミノ酸変異を有し、かつSA $\alpha 2, 3$ GalおよびSA $\alpha 2, 6$ Gal両方に親和性を持つことが我々の研究により明らかになっている。

パンデミックウイルスの出現が危惧される昨今、H5N1鳥インフルエンザウイルスは、

どの程度ヒトに感染しやすくなっているかを解析し、また、どのようなメカニズムで、ヒトに感染しやすくなるのかを解明することは急務であり、パンデミックウイルス出現に対する事前策を講じる上で重要な課題といえる。

ヒト分離H5N1ウイルスのヒト型レセプターを認識する多くの株のHAで、レセプター結合部位周辺における塩基性アミノ酸への置換がみられた。一方、季節性のヒトH3N2ウイルスのHAタンパク質の変遷を解析したところ、1968年のヒト社会での出現以降、蛋白質表面の正電荷が蓄積しており、それは鳥のH3N2には見られない特徴であった(図1)。これらのことから、インフルエンザウイルスのヒトへの適応の1つにHAの表面正電荷の増強による静電相互作用によるヒト型レセプターの認識の可能性が示唆された。

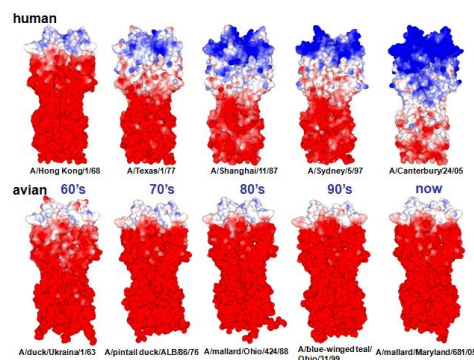


図1. H3N2ウイルスHAの電荷の変遷

2. 研究の目的

過去ヒトにおいてパンデミックを起こした H3N2 ウイルスヒトへの適応を解析し、さらに H5N1 ウイルスのヒトへの適応メカニズムの解明を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 各ウイルスのレセプター特異性を **solid-phase binding assay** (ヒト型および、鳥型のレセプターアナログ分子と、ウイルスとの結合性を解析する実験系) を用いて解析する。その際、塩濃度を変えて測定することで、結合力が静電相互作用に基づいた結合力であるか否か調べる。

(2) H5N1 ウイルスについては、タンパク質構造解析ソフトを用いて、HA 蛋白質の表面電荷をシミュレーションし、正電荷の増強に関与しうる変異を選別する。選別した変異を有するウイルスをリバースジェネティクス法で作製し、上記(1)の方法でレセプター特異性を解析する。

(3) ヒトの正常気管支上皮細胞での増殖性とレセプター特異性との関係を調べる。各ウイルスのヒトの正常気管支上皮細胞および鶏由来の細胞での増殖性を比較し、レセプター特異性とヒト気管支上皮細胞での増殖性との関係を調べる。

(4) ヒト型レセプターを認識する H5N1 ウイルスの伝播性の解析。ヒト型レセプターを認識する H5N1 ウイルスの伝播性を解析するために、インフルエンザウイルスの研究において確立された実験動物であるフェレットを用い、ウイルスの伝播性を調べる。ウイルスをフェレットに感染させ、一日後に、感染させていないフェレットを感染フェレットの隣のケージに置き、10日間、鼻洗浄液を回収し、ウイルスの有無を調べる。(この系では、2頭のフェレットは直接接触できないが、エアロゾルは行き来できる状態にあり、飛沫感染の有無をしらべることができる)。

4. 研究成果

(1) 1968年のヒト社会での出現以降、蛋白質表面の正電荷が蓄積しており、それは鳥の H3N2 には見られない特徴であった(前述)。そこで鳥のウイルスや 1968年当初と、近年のヒト分離株のレセプター結合において質的な違いがあるのか否かを調べた。1968年の株や鳥分離株は塩濃度に依存しない結合力でレセプターと結合していたが、近年のヒト分離株は塩濃度に依存していた。つまり、ヒト社会で出現したのち、さらにヒトに適応する過程で、レセプター

認識が電荷に依存したものに变化したことが示唆された。

(2) ヒト分離 H5N1 ウイルスの HA の変異を調べたところ、鳥分離株には見られないヒト分離株特有のアミノ酸変異が多数見受けられた。そこで、レセプター特異性を解析したところ、数株がヒト型レセプターと結合することができ、それらの多くの株で塩基性アミノ酸への置換がみられた。そこで、塩濃度に依存的な結合力であるか否か調べたところ、塩濃度に依存的であったことから、静電相互作用によるヒト型レセプターとの結合を行っている可能性が示唆された。

次に、タンパク質構造解析ソフトを用いて、H5HA 蛋白質に変異が起きた時の表面電荷をシミュレーションし、正電荷の増強に関与しうる変異を特定し、特定した変異を有するウイルスをリバースジェネティクス法で作製した。それらのウイルスのレセプター特異性の解析を行ったところ、正電荷の増強された HA の多くがヒト型レセプターと結合するようになっており、さらに、それらの変異の位置は、ヒト H3N2 ウイルスで塩基性置換が集積してきた位置と酷似していた。これらの成績から、H5N1 ウイルスも季節性の H3N2 ウイルスと似たヒトへの適応をする可能性が示唆された。

(3) 表面電荷とレセプター結合との関係の一般化を図るために、ヒト型レセプターを認識しない株の HA の表面電荷パターンを、ヒト型レセプターを認識する株の表面電荷パターンと一致させることで(図2)、ヒト型レセプターを認識できるようになるか否か調べた。その結果、表面電荷を一致させることで、類似のヒト型レセプターを認識パターンを示すようになった(図3)。このことから、ヒトへの適応の際のレセプター認識の変化を考察する上で、HA の表面電荷を解析することも重要なアプローチであることが分かった。

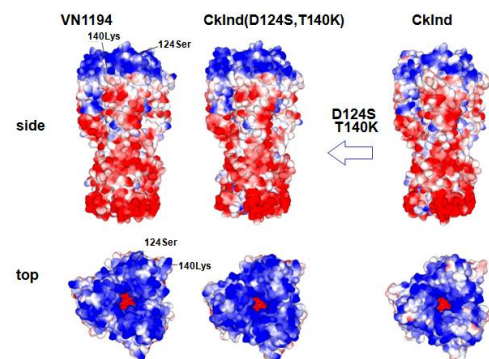


図 2. HA の表面電荷のシミュレーション

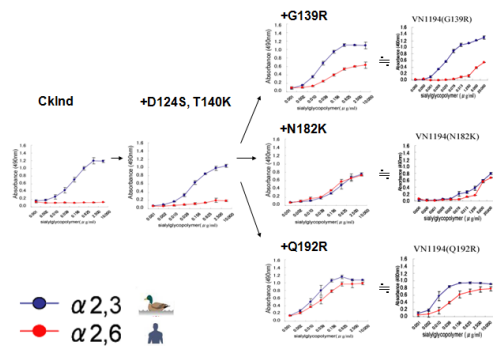


図 3. シミュレーションに基づき作製したHAを有するウイルスのレセプター特異性解析

(4) ヒト型レセプターを認識するようになったことで H5N1 ウイルスがヒトの正常気管支細胞でよく増殖するようになったか否かについて調べた。その結果、鶏由来の細胞では増殖性に差がなかったが、HA 蛋白質の 182 番目のアミノ酸などに変異が起こると顕著にヒトの気管支上皮細胞で増殖性が上がることが明らかになった (図 4)。

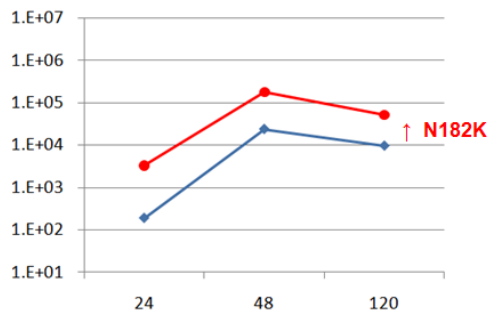


図 4. ヒト型レセプターを認識する H5N1 ウイルスの増殖性解析

(5) 次に、ヒト型レセプターを認識する H5N1 ウイルスがフェレットで伝播するか否かについて解析を行った。電荷依存性的および電荷非依存的にヒト型レセプターを認識する株、ヒト型レセプターを認識しない株をそれぞれ、フェレットに感染させ、非感染のフェレットに伝播するか否か調べた。その結果、コントロールとして用いた新型 H1N1 ウイルスを感染させたフェレットはくしゃみを起こし、フェレット間での効率のよい伝播が確認されたが、H5N1 ウイルスでは、フェレット間での伝播が起らなかった。鼻洗浄液に存在するウイルス量を調べたところ、一部の H5N1 ウイルスでは高い量のウイルスが検出されたことから、くしゃみを起こすか否かも伝播に

おける重要な要因であることが推測された。

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 8 件)

1. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, et.al., In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 査読有 2009 460(7258):1021-5.
2. Takano R, Nidom CA, Kiso M, Muramoto Y, Yamada S, Sakai-Tagawa Y, Macken C, Kawaoka Y. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003-2007. *Virology*. 査読有 2009 390(1):13-21.
3. Takano R, Nidom CA, Kiso M, Muramoto Y, Yamada S, Shinya K, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y. A comparison of the pathogenicity of avian and swine H5N1 influenza viruses in Indonesia. *Arch Virol*. 査読有 2009;154(4):677-81.
4. Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, Ozawa M, Kakugawa S, Shimojima M, Yamada S, Neumann G, Kawaoka Y. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol*. 査読有 2009 83(9):4153-62.
5. Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Kiso M, Kida H, Takada A, Nidom CA, Mai le Q, Yamada S, Imai H, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y, Horimoto T. Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine*. 査読有 2008 26(50):6398-404.
6. Murakami S, Horimoto T, Mai le Q, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Iwata A, Kawaoka Y. Establishment of canine RNA polymerase I-driven reverse genetics for influenza A

virus: its application for H5N1 vaccine production. J Virol. 査読有 2008 82(21):10502-9.

7. Murakami S, Horimoto T, Yamada S, Kakugawa S, Goto H, Kawaoka Y. Establishment of canine RNA polymerase I-driven reverse genetics for influenza A virus: its application for H5N1 vaccine production. J Virol. 査読有 2008 82(3):1605-9

〔学会発表〕（計 1 件）

- ①第 56 回日本ウイルス学会、学術集会 口頭発表

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 晋弥 (YAMADA SHINYA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：90466839

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：