

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780272

研究課題名 (和文) インフルエンザウイルスの抗原変異に伴う立体構造変化の解析

研究課題名 (英文) Structural bioinformatics analysis of antigenic changes in 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・特任助教

研究者番号：10374240

研究成果の概要 (和文)：

インフルエンザの流行を効率よく制御するためには、抗原変異の機序を理解し、予測することが必要である。本研究では、インフルエンザウイルスの主要抗原であるヘマグルチニン (HA) の立体構造に焦点をあて、構造バイオインフォマティクス的手法により、抗原変異に伴う HA の抗原構造の変遷を解析した。また結果に基づき、パンデミック 2009(H1N1)ウイルスの抗原変異に伴う今後のアミノ酸置換を予測した。

研究成果の概要 (英文)：

The hemagglutinin (HA) of influenza A viruses undergoes antigenic changes to escape from antibody-mediated immune pressure. In order to control for influenza, it is important to understand the patterns of amino acid substitutions in the past and then to predict possible antigenic changes of the HA molecules in future. In this study, we analyzed the change of HA antigenic structures in the evolutionary process of influenza viruses in the human population, by using structural bioinformatics approach. Based on the results, we predicted possible amino acid substitutions that might be associated with future antigenic change of 2009 H1N1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010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：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。カモ等の間で保存されていたウイルスが、種の壁を越え人に馴化すると、新型インフルエンザが起こる。さらに、人の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、季節性インフルエンザとして流行を繰り返す。インフルエンザの流行を効率よく予防するためには、抗原性の合ったワクチンを先回りして準備する技術が必要とされる。

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、ウイルス中和抗体の標的となる。HA 上の抗体結合領域のアミノ酸に変異が蓄積すると、新たな抗原構造を持ったエスケープ変異株が出現する。このようにアミノ酸置換により HA の抗原性は変化するが、一方で HA の司る機能は保持されなければならない。これまで、HA の抗原変異についての研究は系統樹を用いたアミノ酸置換解析や抗原変異株ウイルスの性状解析が中心に行われてきた。しかしながら、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した知見が必要である。本研究では、構造バイオインフォマティクス的手法を用いて、抗原変異に伴う HA の抗原構造の変化を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗原変異に伴う抗原構造の経時変化解析

- ① DB 解析によるアミノ酸変異履歴の作成
インフルエンザウイルスが、人間で流行を始めてから、抗原変異に伴いどのようにアミノ酸変化を遂げてきたのかを調べ、アミノ酸位置における残基の変遷を時系列で図式化した。
 - ② 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。
 - ③ 抗原構造の変遷
 - ②で作成した立体構造を時系列に並べ、①のアミノ酸変異履歴と比較し、対応関係を調べた。
- (2) 抗原変異に伴う糖鎖付加パターンの解析
- ① 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 (Asn-X-Ser/Thr) となる部位を配列から抽出した。
 - ② 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
配列から抽出した糖鎖付加候補部位が、HA の 3 次構造上で、どのような位置にあるのか確認した。
- (3) 新型インフルエンザ (2009H1N1pdm) ウイルスの抗原変異予測
上記で得られた過去の抗原変異パターンから、2009H1N1 pdm ウイルスの抗原変異の予測を試みた

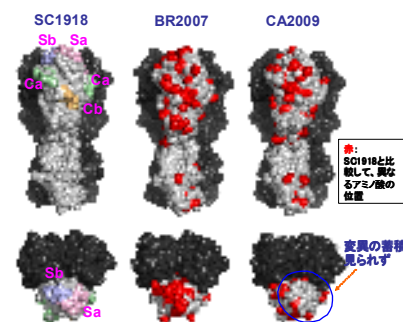
4. 研究成果

2009 年にパンデミックを起こした 2009H1N1 pdm ウイルスの HA (CA2009) は、1918 年のパンデミックウイルスの HA (SC1918) と非常によく似た抗原領域を持っていることを発見し、論文や学会等で報告した。また、抗原構造の類似性に基づき、今

後の抗原変異により起こりそうなアミノ酸置換を予測をした (PloS One 2010)。以下に結果の概要を示す。

(1) 2009H1N1pdm ウイルスの抗原構造の解析

H1 亜型の HA 蛋白質は、4 つの異なる抗原領域 (Sa、Sb、Ca、Cb) を持つことが知られている。本研究では、はじめ CA2009、SC1918 および 2008-2010 年シーズンのソ連型 H1N1 のワクチン株の HA (BR2007) の構造をホモロジーモデリング法により構築し、抗原領域の構造を比較した。HA 間で異なるアミノ酸残基を、ホモロジーモデリングにより得られた構造上で比較した。その結果、BR2007 ではすべての抗原領域にまたがってアミノ酸変異が認められたのに対し、CA2009 は SC1918 と似た抗原構造を持つことが分かった。特に、Sa および Sb 領域に変異の蓄積は見られなかった (下図)。



配列解析の結果、Sa 領域では 13 個中 12 個、Sb 領域では 12 個中 10 個のアミノ酸が、CA2009 と SC1918 で一致していることが分かった (下表)。

抗原領域におけるアミノ酸の一致度

Antigenic site	No. of amino acids identical to SC1918	
	BR2007	CA2009
Sa	8/13	12/13
Sb	4/12	10/12
Ca	13/19	13/19
Cb	2/6	5/6

この結果から、今後 2009H1N1 ウイルスのヒトでの流行に伴い、抗体の選択圧力によって、HA の Sa および Sb 領域にアミノ酸変異が蓄積する可能性が示唆された。

(2) 抗原変異に伴う N 結合型糖鎖付加

次に、抗原部位上の N 結合型糖鎖付加に伴う抗原変異の可能性について解析した。研究代表者らは、過去にヒト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、すでに報告している

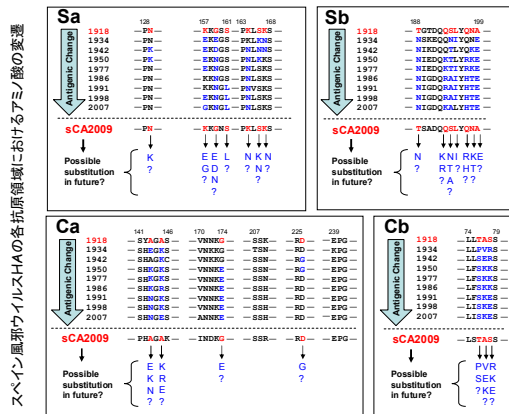
(Virology, 2008)。本研究では、2009H1N1pdmウイルスのHA塩基配列データから、抗原決定基が集中しているHA球状部領域を取り出し、N結合型糖鎖付加のコンセンサス配列 (sequon: N-X-S/T, X is not P) を探索した。さらに、1塩基、2塩基および3塩基変異でsequonとなるモチーフ (それぞれ Cand1、Cand2およびCand3) を糖鎖付加ポテンシャルとして、同様に探索した。



その結果、CA2009の球状部領域には、SC1918と同じ位置にsequonがただ1つ存在していた。一方、季節性インフルエンザとして流行していたBR2007の糖鎖の数は、抗原変異に伴い、1918年の出現時よりも増えていた。CA2009およびSC1918の遺伝子解析の結果、季節性H1N1ウイルスが、ヒトで流行する間に獲得したsequonは全て、1918H1N1ウイルスのHA遺伝子配列上のCand1、Cand2およびCand3に由来していたこと、ならびにこれらの部位は、2009H1N1pdmウイルスのHA塩基配列上で完全に保存されていたことが明らかになった。したがって、2009H1N1pdmウイルスがヒトの間で長期間流行した場合、1918H1N1ウイルスの流行開始当初と同様の糖鎖付加変異が起こる可能性が予想された。

(3) 2009H1N1 pdmウイルスの抗原変異の予測

上記の結果から、ヒト集団間で2009H1N1pdmウイルスは、1918H1N1ウイルスと同様の抗体で選択されると仮定した。その場合、2009H1N1pdmウイルスでも、1918H1N1ウイルスと同様の領域に変異が蓄積し、同様の抗原変異が起こる可能性が予想される。DB解析により、1918H1N1ウイルスが、ヒトの間で流行を始めてから、抗原変異に伴いどのようにアミノ酸変化を遂げてきたのかを調べ、各アミノ酸位置における残基の変遷を時系列で図式化した。



スペイン型新ウイルスHAの各抗原領域におけるアミノ酸の変遷

その結果、実際に1918 H1N1ウイルスと同様のアミノ酸変異が起きている2009H1N1pdmウイルスの変異体が、すでに分離されていることが分かった。また、糖鎖付加を伴う抗原変異についても、1918H1N1ウイルスの流行開始当初と同様の部位に、糖鎖付加が起きている変異体が確認された。

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10件)

- ① Simulundu E, Ishii A, Igarashi M, Mweene A, Suzuki Y, Hang'ombe B, Namangala B, Moonga L, Manzoor R, Ito K, Nakamura I, Sawa H, Sugimoto C, Kida H, Simukonda C, Chansa W, Chulu J, Takada A, Characterization of influenza A viruses isolated from wild waterfowls in Zambia, *J Gen Virol.*, 査読有, 2011, in press
- ② Usami K, Matsuno K, Igarashi M, Denda-Nagai K, Takada A, Irimura T, Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin., *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 407, 2011, 74-78.
- ③ Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H, Takada A, Prediction of the antigenic changes of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin., *Influenza and other respiratory viruses*, 査読有, 5 (supple. 1), 2011, 402-404.
- ④ Uchida Y, Kanehira K, Mase M, Takemae N, Watanabe C, Ito T, Igarashi M, Ito K, Takada A, Sakoda Y, Okamatsu M, Yamamoto Y, Nakamura K, Kida H, Hiromoto Y, Tsuda T, Saito T, Genetic characterization and susceptibility on poultry and mammal of H7N6 subtype avian influenza virus isolated in Japan in 2009., *Vet Microbiol.*, 査読有, 147(1-2), 2011, 1-10.
- ⑤ Yoshii K, Igarashi M, Ito K, Kariwa H, Holbrook MR, Takashima I, Construction of an infectious cDNA clone for Omsk Hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5., *Virus Research*, 査読有, 155(1), 2010, 61-68.
- ⑥ Nakayama E, Yokoyama A, Miyamoto H, Igarashi M, Kishida N, Matsuno K, Marzi A, Feldmann H, Ito K, Saijo M,

Takada A, Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies., *Clinical and Vaccine Immunology*, 査読有, 17(11), 2010, 1723-1728.

- ⑦ Hasebe R, Suzuki T, Makino Y, Igarashi M, Yamanouchi S, Maeda A, Horiuchi M, Sawa H, Kimura T, Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein., *BMC Microbiol.*, 査読有, 10(1), 2010, 165
- ⑧ Matsuno K, Kishida N, Usami K, Igarashi M, Yoshida R, Nakayama E, Shimojima M, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y, Takada A, *J. Virol.*, Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains., 査読有, 84(10), 2010, 5140-5147.
- ⑨ Watanabe Y, Hiraoka W, Igarashi M, Ito K, Shimoyama Y, Horiuchi M, Yamamori T, Yasui H, Kuwabara M, Inagaki F, Inanam O, A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein., *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 394(3), 2010, 522-528.
- ⑩ Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H, Takada A, Predicting the Antigenic Structure of the Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus Hemagglutinin., *PLoS One*, 査読有, 5 (1) , 2010, e8553.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 吉田玲子他, パンデミックインフルエンザ A ウイルス (H1N1) ヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体の性状解析, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 10 月 8 日, 徳島 (徳島県郷土文化会館)
- ② 中山絵里他, フィロウイルス種特異抗体検出 ELISA 法の開発, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 10 月 8 日, 徳島 (徳島県郷土文化会館)
- ③ 五十嵐学他, H3N2 インフルエンザウイルス HA に付加された糖鎖は周辺エピトープを覆い隠していたか? ~糖鎖付加部位周辺アミノ酸残基の多様性変化の解析~, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 10 月 8 日, 徳島 (徳島県郷土文化会館)
- ④ Igarashi M 他, Prediction of the Antigenic Change of the Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus Hemagglutinin, Options for the Control of Influenza VII, 2010 年 9 月 6 日, China (Hong Kong SAR)
- ⑤ Ito K 他, Prediction of Antigenic Structure of Hemagglutinin of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus, 14th International Negative Strand Virus Meeting, 2010 年 6 月 23 日, Belgium (Bruges)
- ⑥ 高田礼人他, インフルエンザウイルスの抗原変異予測と亜型間交差感染防御, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 28 日, 岡山 (就実大学)
- ⑦ 五十嵐学他, ホモロジーモデリング法による新型 H1N1 インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの抗原構造の解析, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 26 日, 東京 (都市センターホテル)
- ⑧ 伊藤公人他, インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの MDS 解析と変異予測への応用, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 26 日, 東京 (都市センターホテル)
- ⑨ 内田裕子他, 愛知県でウズラから分離された H7N6 亜型鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 26 日, 東京 (都市センターホテル)
- ⑩ 宇佐美克明他, MGL/CD301 を介するエボラウイルス感染増強に関わる表層糖蛋白質の構造的特徴, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸 (ポートアイランド)
- ⑪ 稲波修他, マウスプリオンタンパク質ヒスチジン 186 周辺の銅イオン結合部位に関する構造解析第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009 年 9 月 25 日, 鳥取 (とりぎん文化会館)
- ⑫ 伊藤公人他, インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの進化解析と変異予測への応用, 第 11 回日本進化学会大会, 2009 年 9 月 3 日, 札幌 (北海道大学)
- ⑬ 五十嵐学他, 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第, 第 23 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 2009 年 7 月 3 日, 東京 (東京大学医科学研究所)
- ⑭ 吉田玲子他, インフルエンザウイルス HA 亜型間交差中和活性を有するモノクローナル抗体, 第 23 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 2009 年 7 月 3 日, 東京 (東京大学医科学研究所)

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・特任助教

研究者番号：10374240