

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659069

研究課題名(和文)高病原性トリインフルエンザウイルス新規侵入経路の解明：高病原性の新解釈

研究課題名(英文)New entry pathway of highly pathogenic avian influenza virus without sialic acid .

研究代表者

櫻井 陽 (SAKURAI, Akira)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：40546628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：高病原性トリインフルエンザウイルスH5N1亜型(HPAI H5N1)は、その高い致死率を始めとして他の亜型とは大きく性質が異なっている。従って、HPAI H5N1特異的な現象を解明していくことは、その高病原性を理解するうえで非常に重要な情報となりうる。インフルエンザウイルスはシアル酸をレセプターとして細胞内に侵入する。ところが、HPAI H5N1ではシアル酸依存的な侵入経路を阻害しても高率に細胞内にウイルスが侵入する所見を得た。これは高病原性のウイルスが、シアル酸レセプター以外の異なる機序で特異的に細胞へ侵入することを示唆している。本研究では、この新規経路の解明を行った。

研究成果の概要(英文)：Highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus was characterized by the high pathogenicity and unique organ tropism for infected avian and mammalian. Here we show a new internalized pathway of HPAI H5N1 virus without 2-3 linked sialic acids on the cell surface. We revealed that HPAI H5N1 virus but not low pathogenic avian influenza (LPAI) H5N1 virus could infect in cells treated with neuraminidase for removing sialic acid on the cell surface, and the infected cells generated viral particles with intact infectivity. We then identified the multi-basic sequence (MBS) of HPAI H5N1 as a kind of cell penetrating peptides (CPPs) which is known to have an ability of penetrating cellular membrane. GFP fused with MBS could internalize into several kinds of cells, and specific antibody against MBS prevented the fusion protein from internalizing.

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：環境薬学

キーワード：高病原性トリインフルエンザウイルス インフルエンザ 病原性

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスの引き起こす定期的なパンデミックは、公衆衛生における大きな問題である。近年ではヒトを含む哺乳類に感染する、非常に致死性の高い高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 亜型が世界中の野鳥に蔓延しており、このウイルスを基にパンデミック株が発生した場合、人類は未曾有の大損害を被る可能性もある。

2009年に発生した、ブタ由来新型インフルエンザウイルスの世界的大流行(パンデミック)は世界を大きな混乱に陥れた。幸運なことに、このパンデミックウイルスは比較的低病原性であったため、被害はあまり大きなものにはならなかった。しかし、2003年以降に世界中のトリの間で拡散しつづけている高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 亜型の恐怖が取り払われたわけではない。それどころか、H5N1 亜型がパンデミックを引き起こすことの現実性が再認識された。

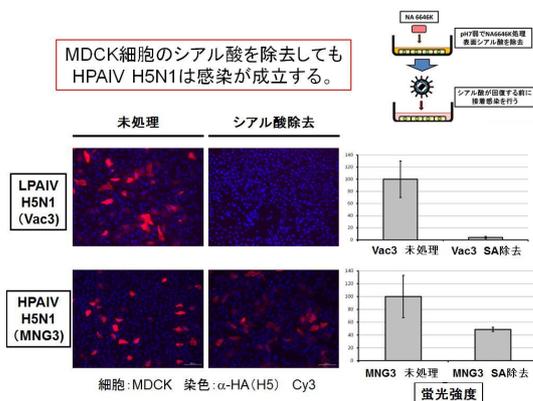
2. 研究の目的

高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 亜型は、その高い致死率を始めとして他の亜型とは大きく性質が異なっている。これまでの研究で、通常のシアル酸依存的な侵入経路に加えて、H5 亜型特異的なアミノ酸配列により、新規の侵入経路を示唆する所見、およびこの配列の変異により培養細胞での侵入能正常化の知見を得た。本研究では、これらの所見をもとに、このアミノ酸配列に関して H5N1 亜型特異的な新規侵入経路を解明するとともに、そのアミノ酸配列特異的な中和抗体作製を目指す。

3. 研究の方法

本研究は高病原性への新たなアプローチとして、ウイルス学的にも医学的に高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 亜型は、その高い致死率を始めとして他の亜型とは大きく性質が異なっている。

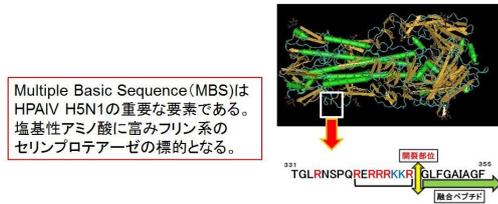
これまでの研究で、通常のシアル酸依存的な侵入経路に加えて、H5 亜型特異的なアミノ酸配列により、新規の侵入経路を示唆する所見、およびこの配列の変異により培養細胞での侵入能正常化の知見を得た。



本研究では、これらの所見をもとに、このアミノ酸配列に関して H5N1 亜型特異的な新規侵入経路を解明するとともに、そのアミノ酸配列特異的な中和抗体作製を目指す。も非常に重要な意義を持っている。また新規の治療法への標的部としてもその意味合いは非常に大きい。

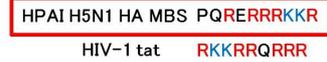
4. 研究成果

1) 新規侵入経路に關与するウイルス遺伝子領域、アミノ酸配列の特定 2) その領域がどのようなメカニズムで細胞に侵入に關与するかの検証 3) その領域を抗体等で阻害することでウイルス増殖に与える影響の評価、の3項目をまず検討した。

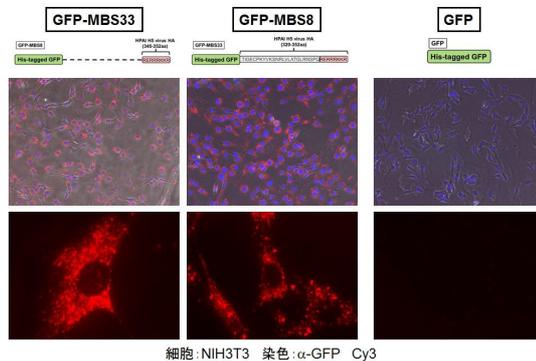


CELL PENETRATING PEPTIDE (CPP)

1988年にHIV-1のTatタンパクの配列の一部だけで細胞へ取り込まれることが発見された。この機能を有するタンパク群をCPPと称する。

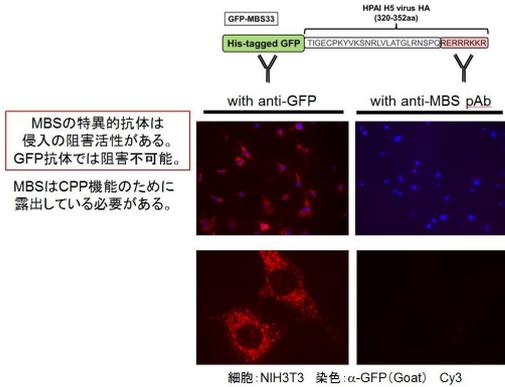


遺伝子領域、アミノ酸配列の特定に関しては既にその領域の同定に成功した。この領域は精製タンパクレベルでもその機能が維持されているアミノ酸領域であり、ウイルスレベルでの実験を含め検討が終了している。またその領域の配列から既知の非ウイルスタイプの細胞侵入経路との相同性を確認し、その経路と非常に類似した侵入パターンであることを確認した。一方で、H5N1由来配列に特異的なパターンも発見しており、今後の発展が期待される。

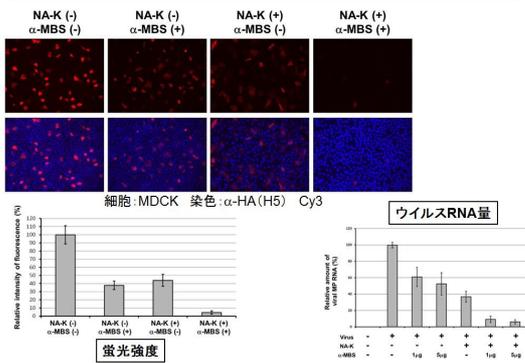


領域阻害による影響はラビットのモノクローナル抗体による実験により阻害の確認ができた。阻害効果は融合タンパクに対しても確認できたが、ウイルスに対しても阻害が可能であった。NA で処理をした細胞に高病原性 H5N1 を感染させると、得意抗体で阻害し

た場合に限り、侵入が感染に阻害された。

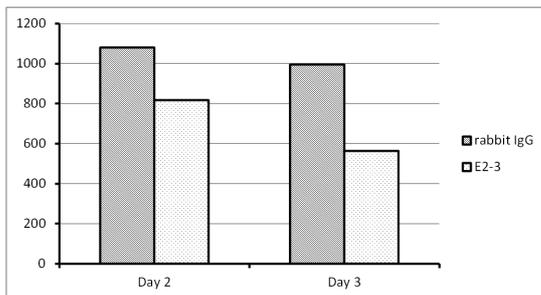


シアル酸とCPPの両方阻害で感染をほぼ阻害できる。



ラビットのモノクローナル抗体 E2-3 でウイルスを処理し、マウスに感染を行った。感染後2及び3日後にマウスの肺を洗浄し、洗浄液に含まれるウイルス量を測定した。

その結果、抗体の処理によってウイルスの増殖性にある程度の阻害の影響が見られた。完全に阻害することが出来ない理由は、ウイルスがCPP依存経路以外に通常のシアル酸依存経路を使用することが可能だからと考えられる。



5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

Akira Sakurai, Katsuyoshi Takayama, Namiko Nomura, Tsubasa Munakata, Naoki Yamamoto, Tsuruki Tamura, Jitsuho Yamada, Masako Hashimoto, Kazuhiko Kuwahara, Yoshihiro Sakoda, Yoshihiko Suda, Yukuharu Kobayashi, Nobuo Sakaguchi, Hiroshi Kida,

Michinori Kohara, Futoshi Shibasaki
Broad-Spectrum Detection of H5 Subtype Influenza A Viruses with a New Fluorescent Immunochromatography System
PLoS one, Nov 8 (11), e76753 2013
査読有

Dong J, Sakurai A, Nomura N, Park EY, Shibasaki F, Ueda H
Isolation of recombinant phage antibodies targeting the hemagglutinin cleavage site of highly pathogenic avian influenza virus
PLoS One. Apr 5, 8(4): e61158. 2013
doi:10.1371/journal.pone.0061158
査読有

櫻井 陽, 野村 奈美子, 細川 幸生, 橋本 麻紗子, 芝崎 太, 原 光彦, 関谷 紀貴 田中 理子
高感度蛍光イムノクロマト法の開発とインフルエンザウイルス検出への応用
東京都福祉保健医療学会誌 2013年 Vol.24 1-4
査読なし

Sakurai A, Shibasaki F
Updated Values for Molecular Diagnosis for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Viruses. Aug; 4(8), 1235-1257. 2012;
doi:10.3390/v4081235
査読有

Sakurai A, Nomura N, Nanba R, Sinkai T, Iwaki T, Obayashi T, Hashimoto K, Hasegawa M, Sakoda Y, Naito A, Morizane Y, Hosaka M, Tsuboi K, Kida H, Kai A, Shibasaki F
Rapid typing of influenza viruses using super high-speed quantitative real-time PCR.
J Virol Methods. Dec;178(1-2):75-81. 2011
査読有

〔学会発表〕(計3件)
3rd IGAKUKEN International Symposium on Control of Influenza virus and Hepatitis 東京
Development of new diagnosis systems for detecting influenza viruses
Akira Sakurai
2013年2月15日

第8回東京都福祉保健医療学会 東京
高感度蛍光イムノクロマト法の開発とインフルエンザウイルス検出への応用
櫻井 陽, 野村 奈美子, 細川 幸生, 橋本 麻紗子, 芝崎 太, 原 光彦, 関谷 紀貴 田中 理子
2012年12月21日

第 60 回日本ウイルス学会総会

大阪

高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1
亜型における新規侵入経路の発見

櫻井 陽 (協力研究者： 芝崎 太 川島
育夫 梶原直樹 野村 奈美子 橋本 麻
紗子)

2012 年 11 月 13 日 ~ 15 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 陽 (SAKURAI, Akira)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学研究分野・研究員

研究者番号：40546628