

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780305

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスと抗体の相互作用の解析と抗原変異予測への応用

研究課題名(英文) A computational study on the intermolecular interaction between influenza virus hemagglutinin and a monoclonal antibody

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

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)とそのモノクローナル抗体(mAb)に焦点をあて、ウイルスがmAbからエスケープする際に起こるHA上のアミノ酸置換の特徴を明らかにすることを目的とした。具体的には、アミノ酸置換に伴うHA-mAb複合体の相互作用変化、およびHAの機能や構造安定性への影響を分子シミュレーション等の計算科学的手法により解析し、実際にエスケープ変異株で観測されるアミノ酸と比較した。

研究成果の概要(英文)：Influenza A virus is a zoonotic pathogen that is transmitted from animals to humans. This virus has two surface glycoproteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase. The HA of human influenza virus is the major target of antibodies that neutralize viral infectivity. Some amino acid substitutions in the antigenic epitope on the HA could decrease the interaction between HA and antibodies, leading to generate the antigenic variants with a novel antigenic structure of HA. To understand how amino acid substitutions affect the changes of the HA antigenic structure, we computationally analyzed the three-dimensional structures of HA in complex with monoclonal antibody.

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：インフルエンザ ウイルス 計算科学 分子動力学 抗体

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。抗原性の合ったワクチンを先回りして準備する技術が確立できれば、インフルエンザの流行をより効果的に予防することが可能となる。そこで申請者は、将来の抗原変異を予測する手法を開発している。

インフルエンザウイルスの表面糖蛋白質である HA は、ウイルス中和抗体の主要な標的である。HA の抗体結合領域(エピトープ)上のアミノ酸に変異が起こると、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。また、HA は 宿主細胞表面にある糖鎖レセプターと結合する、宿主細胞のエンドソーム膜とウイルス膜を融合させる、という2つの機能を司る。したがって、ウイルスは HA の抗原性を変化させる一方で、これらの機能を保持しなければならない。

これまで、HA の抗原変異について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の研究が中心に行われてきた。申請者はこれまで、過去に起きた抗原変異の特徴について着目し、研究を行ってきた。はじめに、過去にヒトの間で流行したウイルスの 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た (Igarashi M, *Virology* 2008)。また同様の大規模解析から、昨年パンデミックを起こした新型インフルエンザウイルスが、ヒトでの流行において将来起こり得るアミノ酸置換を予測した (Igarashi M, *PLoS One* 2010)。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さらに必要である。例えば、抗体と HA がどのように分子間相互作用をし、どのアミノ酸が置換すると抗体との相互作用が弱くなるのか、エスケープ変異後のアミノ酸置換は HA の立体構造(部分構造、レセプターとの相互作用、構造全体の安定性等)にどのような影響を及ぼしているのか、これらを総合してどのようなアミノ酸が実際の変異株で選択されてくるのか等、疑問が多く残されている。

Nakajima らは、1968年と1997年に分離された H3N2 インフルエンザウイルスの HA にランダムに点変異を導入し、アミノ酸変異が許容される部位を調査した (Nakajima K, *J. Virol.* 2003, 2005)。その結果、抗原変異に伴い HA 上にアミノ酸置換が起こると、その周囲のアミノ酸も立体構造上の制約を受け、続いて起こる抗原変異に影響する可能性が示唆された。この点からも蛋白質の立体構造を考慮することの重要性が示された。また、

Zhou らは、H3N2 インフルエンザウイルス HA とモノクローナル抗体 (BH151) の共結晶構造をもとに、HA 上の点変異による結合自由エネルギー変化を、スーパーコンピュータを用いて計算した。自由エネルギー摂動法を用いた計算結果は、実験値をよく再現することが示された (Zhou R, *J. Phys. Chem. B* 2008)。このような計算科学的手法(分子シミュレーション等)は今後、抗原変異予測や抗体医薬設計に応用されるものと期待されている。

2. 研究の目的

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) とそのモノクローナル抗体 (mAb) に焦点をあて、ウイルスが mAb からエスケープする際に起こる HA 上のアミノ酸置換の特徴を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

アミノ酸置換に伴う HA-mAb 複合体の相互作用変化を分子動力学シミュレーション等の計算科学的手法により解析し、実際に *in vitro* の実験で観測されるアミノ酸と比較する (図1)。

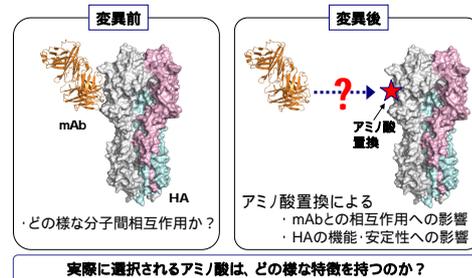


図1 本研究の概念図

HA-mAb 複合体の初期構造

シミュレーションの初期構造にはプロテイン・データ・バンク (PDB) に登録されている HA-mAb 複合体の X 線結晶構造を用いた。本研究では、H3N2 ウイルスと mAb BH151 との共結晶構造 (PDB コード: 1eo8) および mAb S139/1 との共結晶構造 (PDB コード: 4gms) を用いた。変異体のシミュレーションの初期構造は、計算機上で HA に変異を導入し構築した。

HA と mAb との相互作用エネルギーおよび残基間相互作用解析

上記の初期構造をもとに分子動力学シミュレーションならびにフラグメント分子軌道 (FMO) 計算を行った。計算プログラムは、それぞれ AMBER12 および PAICS を用いた。

4. 研究成果

上記、HA-mAb 複合体構造を初期構造として、20 ナノ秒の分子動力学シミュレーションを行った。また、ウイルス学的実験で観測されたエスケープ変異をコンピュータで HA 上

に導入し、同様にシミュレーションを行った。シミュレーション結果から、MM/PBSA 法ならびに MM/GBSA 法により、HA と mAb との結合自由エネルギーを計算した。その結果、本研究で用いた計算系においては、MM/PBSA より MM/GBSA 法の方が実験結果を定性的によく再現することが分かった。また、上記の HA-mAb 複合体とその変異体に対して、FMO 計算を行い、HA と mAb との結合エネルギーを算出した。その結果、本研究で対象とした系においては、FMO 法よりも分子動力学シミュレーションの方が、実験結果を定性的によく再現していた。すなわち、エスケープ変異により HA と mAb との相互作用が弱くなることが確認された。

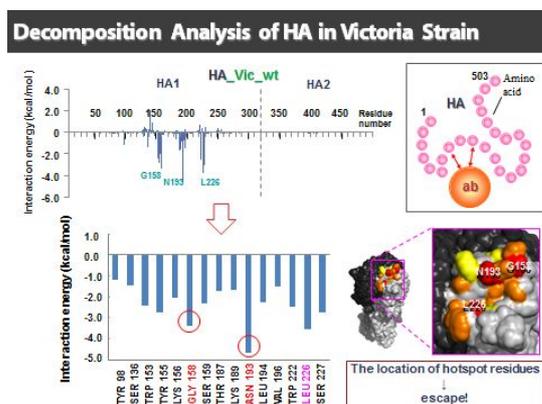


図2 残基間相互作用解析

つづいて、シミュレーション結果から、野生型 HA と mAb との相互作用残基を解析した。その結果、mAb との相互作用に強く寄与している HA 上の残基位置で、エスケープ変異が起きていることが明らかになった (図 2)。さらに変異型 HA と mAb との結合自由エネルギーを計算した結果、mAb との結合が一番弱くなる変異が実際に選択されていた。この解析から、変異したアミノ酸残基そのものだけでなく、変異によって周りアミノ酸残基が影響を受け、HA と mAb との相互作用が弱くなっていることが分かった。

以上の結果から、HA との共結晶構造がある mAb では、エスケープ変異の際に起こるアミノ酸置換を予測できる可能性が示唆された。

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 15 件)

Motohashi Y, Igarashi M, Okamatsu M, Noshi T, Sakoda Y, Yamamoto N, Ito K, Yoshida R, Kida H, Antiviral activity of stachyflin on influenza A viruses of different hemagglutinin subtypes., *Virol J*, 査読有, 10, 2013, 118, DOI: 10.1186/1743-422X-10-118

Yonezawa K, Igarashi M, Ueno K, Takada A, Ito K, Resampling nucleotide sequences with closest-neighbor trimming and its comparison to other methods., *PLoS One*, 査読有, 8 (10), 2013, e57684, DOI: 10.1371/journal.pone.0057684

Kajihara M, Nakayama E, Marzi A, Igarashi M, Feldmann H, Takada A, Novel mutations in Marburg virus glycoprotein associated with viral evasion from antibody-mediated immune pressure., *J Gen Virol*, 査読有, 94(4), 2013, 876-883, DOI: 10.1099/vir.0.049114-0

Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le QM, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y, Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the neuraminidase of subtype H5N1 avian influenza A viruses., *J Infect Dis*, 査読有, 207(1), 2013, 88-97, DOI: 10.1093/infdis/jis633

Ito K, Igarashi M, Miyazaki Y, Murakami T, Iida S, Kida H, Takada A, Gnarled-Trunk Evolutionary Model of Influenza A Virus Hemagglutinin., *PLoS One*, 査読有, 6(10), 2013, e25953, DOI: 10.1371/journal.pone.0025953

Kajihara M, Matsuno K, Simulundu E, Muramatsu M, Noyori O, Manzoor R, Nakayama E, Igarashi M, Tomabechi D, Yoshida R, Okamatsu M, Sakoda Y, Ito K, Kida H, Takada A, An H5N1 highly pathogenic avian influenza virus that invaded Japan through waterfowl migration., *Jpn J Vet Res*, 査読有, 59, 2013, 89-100, <http://hdl.handle.net/2115/47149>

〔学会発表〕(計 39 件)

五十嵐学他：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と亜型間交差反応性抗体との分子間相互作用の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 12 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

石坪江梨花他：第一原理計算を用いたインフルエンザウイルス表面糖タンパク質とマルチターゲット医薬リード天然物との高精度相互作用解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 11 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

米澤弘毅他：近隣剪定法によるウイルス遺伝子配列のリサンプリング、第 7 回日本ゲノム微生物学会年会、2013 年 3 月 8 日、長浜バイオ大学 (滋賀県長浜市)

Ito K 他：A formula on the number of

amino acid substitutions on the hemagglutinin molecules of H3N2 seasonal influenza viruses、15th International Negative Strand Virus Meeting、2013年6月21日、The Palacio de Exposiciones y Congresos (スペイン・グラナダ)

五十嵐学：計算科学的手法を用いたウイルス蛋白質の解析、感染症若手フォーラム2013、2013年3月1日、札幌北広島クラッセホテル(北海道北広島市)

五十嵐学：Characterization of Amino Acid Substitutions on Influenza Virus Surface Proteins: A Computational Structural Biology Research、第35回分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

五十嵐学他：H3N2 インフルエンザウイルスHAへの糖鎖付加と周辺アミノ酸残基にかかる選択圧の経時的変化、第60回日本ウイルス学術集会、2012年11月13日、グランキューブ大阪(大阪府大阪市)

米澤弘毅他：近隣剪定法によるウイルス遺伝子配列のリサンプリング、第60回日本ウイルス学術集会、2012年11月13日、グランキューブ大阪(大阪府大阪市)

Kajihara M 他：A Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) that Invaded Japan through Waterfowl Migration、XV International Union of Microbiological Societies、2011年9月14日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Yoshida R 他：Characterization of Monoclonal Antibodies against the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus Hemagglutinin、XV International Union of Microbiological Societies、2011年9月15日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Igarashi M 他：Dynamics of Sequence Variation in Antigenic Domains and Glycosylation Sites of Hemagglutinin of Human H3N2 Influenza Viruses、XV International Union of Microbiological Societies、2011年9月15日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

五十嵐学：パンデミックインフルエンザ(H1N1)2009 ウイルス・ヘマグルチニンの抗原構造の解析と変異予測への応用、共同利用重点型研究による研究集会「ゲノム多様性と進化の統計数理」、2011年10月25日、統計数理研究所(東京都立川市)

http://www.czc.hokudai.ac.jp/bioinform/members/igarashi/index_j.html

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