

平成 28 年 4 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460581

研究課題名(和文) A型インフルエンザウイルスの宿主特異性の分子機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms involved in the host range restriction of influenza A viruses

研究代表者

今井 正樹 (Imai, Masaki)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30333363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：鳥インフルエンザウイルスがヒトに効率よく感染するためには、そのヘマグルチニン(HA)蛋白質のレセプター特異性が鳥型からヒト型に変化する必要がある。本研究では、ヒト型レセプターを認識するのに必要な変異がH1、H2及びH3亜型の鳥ウイルスHA蛋白質の安定性に影響するのかどうかを調べた。その結果、H1亜型では、レセプター特異性変換変異がHAの安定性をわずかではあるが低下させることがわかった。一方、H2及びH3亜型では、HAの安定性にほとんど影響しないことがわかった。このことは、H2及びH3亜型の鳥ウイルスがヒト型レセプターを認識するのに必要な変異を獲得しやすい特性を有していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：A change in the receptor binding properties of the hemagglutinin (HA) of avian influenza viruses is a critical step in their adaptation to human hosts. Indeed, the 1918 H1N1, 1957 H2N2, and 1968 H3N2 pandemic strains all exhibited human-type receptor-binding preference despite the fact that the HAs of these viruses were derived from avian species. To understand the mechanisms by which influenza viruses adapt to the human host, we analyzed the stability of HA proteins from H1, H2, and H3 avian influenza viruses, which possess mutations that confer human-type receptor recognition. We observed that mutations conferring human-type receptor recognition decreased slightly the HA protein stability of H1 avian virus, but not affect the HA stability of H2 and H3 avian viruses. These results suggest that H2 and H3 avian influenza viruses may be relatively easily able to acquire the mutation(s) necessary to confer human-type receptor recognition

研究分野：ウイルス学

キーワード：鳥インフルエンザウイルス ヘマグルチニン(HA)蛋白質 安定性 レセプター特異性 膜融合活性 感染性

1. 研究開始当初の背景

20世紀における3度の新型インフルエンザの世界的大流行では、鳥由来のインフルエンザウイルスがヒトに適応したウイルスに変化して出現し、大きな健康被害とそれに伴う社会経済活動の停滞をもたらされた。鳥インフルエンザウイルスは、一般にヒトに感染することはない。また一部の亜型(H5、H7、H9)の鳥インフルエンザウイルスはヒトに感染することはあっても、ヒトからヒトへ効率よく伝播する能力は持っていない。だが、鳥インフルエンザウイルスがヒトに適応し、ヒトの間で容易に感染する新型ウイルスに変化したら、ほとんどの人々は新型ウイルスに対する免疫がないため、インフルエンザの世界的大流行が起こる。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスは、その粒子表面に存在するHA蛋白質を使って宿主細胞表面のレセプターに結合し、感染を開始する。ヒトの間で流行している季節性ウイルスのHAはヒト気道上皮に存在するヒト型レセプターを主に認識するのに対し、鳥ウイルスのHAは鳥腸管上皮の鳥型レセプターを主に認識する。したがって、鳥ウイルスが季節性ウイルスのように、ヒトからヒトに容易に伝播するためには、ヒト型レセプターに結合するためのアミノ酸変異を獲得する必要がある。実際、20世紀にパンデミックを引き起こしたスペイン風邪(H1N1)、アジア風邪(H2N2)、香港風邪(H3N2)ウイルスの各HA遺伝子は、鳥ウイルスが起源であるにも関わらず、それらのHA蛋白質はヒト型レセプターを認識できるよう変化していた。

インフルエンザウイルスは感染個体から別の非感染個体に感染伝播するまでの間、HA蛋白質の構造と活性を維持する必要がある。近年、H5N1鳥ウイルスのHA蛋白質にヒト型レセプターとの結合に必要なアミノ酸変

異を導入すると、HAの安定性が大きく低下することが示された。このことは、ヒト型レセプターへの結合性変異を持つH5HA蛋白質は宿主細胞外の環境下で失活しやすいことを示唆している。では、過去にパンデミックを起こしたHA亜型もH5亜型と同様に、レセプター結合特異性を変換させる変異をHAに加えると、その安定性は変化するのだろうか？本研究では、レセプター特異性に関わるアミノ酸変異がH1、H2及びH3鳥ウイルス由来のそれぞれのHA蛋白質の性状に影響するのかどうかを調べた。

3. 研究の方法

(1) レセプター特異性を変換させる変異がHA蛋白質の膜融合活性に及ぼす影響の解析：H1亜型のHAは190番目と225番目のアミノ酸に、H2及びH3亜型のHAは226番目と228番目のアミノ酸に変異が入ると、レセプター特異性が変わる。これら変異を入れたHA蛋白質を発現する細胞を作出した。HA発現細胞を弱酸性液(pH5.1~5.8)で処理するとHAの膜融合活性によって細胞同士が融合して、多核巨細胞が形成される。ヒト型レセプターに結合する変異HA発現細胞と鳥型レセプターに結合する野生型HA発現細胞との間で、多核巨細胞の形成に必要な酸性pH値に違いがあるのかどうかを調べた。

(2) ヒト型レセプターを認識するための変異を入れたHA蛋白質を持つPB2欠損非増殖型ウイルスを人工的に作出した。変異ウイルスはPB2蛋白質発現MDCK細胞を用いて培養した後、ショ糖クッション遠心法により精製した。精製ウイルス粒子を所定の時間(0.5時間、1時間、2時間、4時間、8時間、16時間)と温度(50℃)で処理した後、感染価を測定することにより、変異HA蛋白質の熱に対する安定性を調べた。

4. 研究成果

(1) レセプター特異性を変換させる変異が HA 蛋白質の膜融合活性に及ぼす影響の解析: ヒト型レセプターを認識する変異 HA 蛋白質を発現する細胞と、鳥型レセプターを認識する野生型 HA 蛋白質を発現する細胞との間で、多核巨細胞の形成に必要な酸性 pH 値に違いがあるのかどうかを調べた。

H1 亜型: 野生型 HA を発現する細胞では、pH5.4 以下から多核巨細胞の形成が観察された。一方、ヒト型レセプターを認識する変異 HA を発現する細胞では、pH5.5 以下から多核巨細胞の形成が観察された。

H2 亜型: H1 亜型と同様の成績が得られた。

H3 亜型: 野生型 HA 発現細胞では pH5.5 以下から多核巨細胞の形成が観察され、変異 HA 発現細胞では pH5.6 以下から多核巨細胞の形成が観察された。

解析した 3 種類の HA 亜型においては、変異 HA 蛋白質が膜融合を惹起するのに必要な pH 値は、野生型 HA 蛋白質のそれとほぼ同じであることがわかった。

(2) レセプター特異性を変換させる変異がウイルスの感感性に及ぼす影響の解析: ヒト型レセプターを認識する変異 HA 蛋白質と、鳥型レセプターを認識する野生型 HA 蛋白質との間で、熱に対する安定性に違いがあるのかどうかを調べた (図 1)。

H1 亜型: 鳥型レセプターを認識する野生型ウイルスとヒト型レセプターを認識する変異ウイルスは、いずれも 4 時間の熱処理によって感染性を失った。しかし、1 時間あるいは 2 時間熱処理した変異ウイルスの感染価は、同様の処理をした野生型ウイルスのそれと比較して僅かに低かった。

H2 亜型: 野生型ウイルスと変異ウイルスは、いずれも 8 時間の熱処理によって感染性を失った。しかし、2 時間あるいは 4 時間熱処理した変異ウイルスの感染価は、同様の処理をした野生型ウイルスのそれと比

較して有意に高かった。

H3 亜型: 野生型ウイルスと変異ウイルスは、いずれも 8 時間の熱処理によって感染性を失った。どの熱処理時間においても変異ウイルスの感染価は野生型ウイルスのそれとほぼ同じであった。

H1 亜型の鳥ウイルスでは、HA 蛋白質にヒト型レセプターとの結合に必要な変異を導入すると、安定性が僅かに低下することが示唆された。一方、H2 及び H3 亜型の鳥ウイルスでは、レセプター特異性変換変異はそれらの HA 蛋白質の安定性に影響を及ぼさないことが示唆された。

以上の成績は、H2 及び H3 亜型の鳥インフルエンザウイルスがヒト型レセプターを認識するのに必要な変異を獲得しやすい特性を有していることを示唆している。

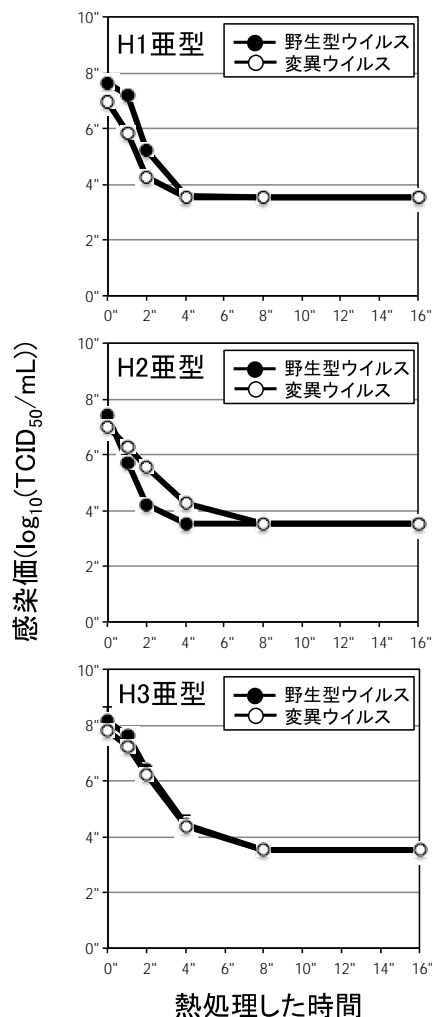


図1. ウイルスを50°Cの熱で処理した後、感染価を測定した。

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 10 件)

1. Hanson A, Imai M, Hatta M, McBride R, Imai H, Taft A, Zhong G, Watanabe T, Suzuki Y, Neumann G, Paulson JC, Kawaoka Y. Identification of Stabilizing Mutations in an H5 HA Influenza Virus Protein. **J Virol** 90:2981-2992. (2015)
2. Ping J, Lopes TJ, Nidom C, Ghedin E, Macken C, Fitch A, Imai M, Maher E, Neumann G & Kawaoka Y. Development of high-yield influenza A virus vaccine viruses. **Nat. Commun.** 6:8148 (2015)
3. Herfst S, Imai M, Kawaoka Y & Fouchier RA. Avian influenza virus transmission to mammals. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 385:137-155 (2014)
4. Fan S, Hatta M, Kim JH, Halfmann P, Imai M, Macken CA, Le MQ, Nguyen T, Neumann G & Kawaoka Y. Novel residues in avian influenza virus PB2 protein affect virulence in mammalian hosts. **Nat. Commun.** 5:5021 (2014)
5. Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ & Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. **Cell Host Microbe.** 15:692-705 (2014)
6. Imai M, Herfst S, Sorrell EM, Schrauwen EJ, Linster M, De Graaf M, Fouchier RA & Kawaoka Y. Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals. **Virus Res.** 178:15-20 (2013)
7. Wilker PR, Dinis JM, Starrett G, Imai M, Hatta M, Nelson CW, O'Connor DH, Hughes AL, Neumann G, Kawaoka Y & Friedrich TC. Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses. **Nat. Commun.** 4:2636 (2013)
8. Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, 他 45 名. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. **Nature** 501: 551-555 (2013)
9. Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M & Odagiri T. Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and

post-pandemic periods in Japan. **Influenza Other Respi. Viruses** 7:1390-1399 (2013)

10. Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama M, Sato H, Tashiro M & Odagiri T. Mutations at the monomer-monomer interface away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. **J. Infect. Chemother.** 19:891-895 (2013)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 今井正樹 中国で発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)について 第 47 回日本ウイルス学会北海道支部会夏季シンポジウム、北海道奈井江町、7 月(2013)
2. 小林知也、今井正樹、内藤郁慶、松山州徳、村上賢二 北東北地方のコウモリから検出されたベータコロナウイルス遺伝子の解析 第 157 回日本獣医学会、札幌市、9 月(2014)

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 正樹 (IMAI MASAKI)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：30333363