

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580432

研究課題名(和文)鳥インフルエンザウイルスの鶏への感染性獲得メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of mechanism for the acquisition of infectivity by avian influenza virus in chickens

研究代表者

高桑 弘樹 (TAKAKUWA, Hiroki)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：20449507

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)：鳥インフルエンザウイルスのニワトリへの感染性の獲得メカニズムを明らかにするため、ニワトリとアヒルから分離されたH3N8亜型ウイルス株の全遺伝子配列の比較を行った。その結果、HA、M2とNS2ウイルス蛋白質に7か所の置換が存在した。その中でも特に3つの置換はHA蛋白質上の表面頭部に位置していた。この結果は、鳥インフルエンザウイルスのニワトリへの感染性にHA蛋白質上のこの3つの置換が関与することを示唆している。今後、このことを明らかにするために、リーバースジェネティクスを用いてニワトリとアヒルのHA遺伝子を組換えたウイルス株による研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：To provide information on the mechanism of acquisition of infectivity by avian influenza virus in chickens, we compared the complete sequences of H3N8 virus isolated from chickens and ducks. Seven amino acid substitutions were detected in the hemagglutinin (HA), matrix 2 (M2), and nonstructural 2 (NS2) proteins. Especially, three substitutions were detected at the position of 128, 137, and 145 on the globular head in the HA protein. These results suggest that these three amino acids in HA protein are related to the infectivity of avian influenza virus in chickens. Further studies using reverse genetics procedures, the HA genes of chicken and duck recombinant avian influenza virus strains were exchanged, are therefore necessary to clarify this issue.

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：鳥インフルエンザウイルス 宿主域 感受性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 豚由来H1N1亜型新型インフルエンザが出現し、ヒトにおいて被害をもたらしているが、H5N1亜型ウイルスによる新型インフルエンザ出現の脅威が去った訳ではなく、今後もその候補の一つと考えられる。その理由として、H5N1亜型鳥インフルエンザウイルスが2003年からアジアに発生し、これが世界の家禽に広がり、野鳥にも浸潤し、ガン、白鳥などの死を引き起こしている。また、このウイルスはこれまで400人近いヒトに感染し、200人以上が死亡している。しかしながら、鳥インフルエンザウイルスの自然宿主は野生水禽であり、野生水禽から家禽類への進入した時点で対策を行うことが出来れば、ヒトへの感染拡大は防げるはずである。

(2) 鳥インフルエンザウイルスは野生水禽においてすべてのHA、NA亜型のウイルスが分離されるのに対して、ニワトリなどの家禽類からは、ごく特定の限られた亜型のウイルスしか分離されない。それは、野生水禽のインフルエンザウイルスは一般的にニワトリには感染できないためである。したがって、野生水禽の間で循環している鳥インフルエンザウイルスが、家禽類に対し感染性、増殖性を獲得するためには、家禽類への適応が必要であるが、それらメカニズムは明らかになっていない。鳥インフルエンザウイルスの水禽類から家禽類への適応のメカニズムを解明することは、鳥インフルエンザウイルスの自然宿主である野生水禽を基として発生する新型インフルエンザや高病原性鳥インフルエンザの出現機構の解明にもつながると予想される。

## 2. 研究の目的

本研究は、野生水禽および家禽類から分離される鳥インフルエンザウイルスが、異なる宿主に対して、異なる感染性、増殖性を示すメカニズムを解析することを目的とする。鳥インフルエンザウイルスの自然宿主である野生水禽からは、すべての鳥インフルエンザウイルスが分離されるのに対し、同じ鳥類であるが家禽類からは特定の亜型の鳥インフルエンザウイルスしか分離されない。このことは、水禽類と家禽類が同じ鳥インフルエンザウイルスに対して異なる感染性、増殖性を示すメカニズムが存在すると考えられる。これらを解明することは、鳥インフルエンザウイルスの宿主域と野生水禽類での存続メカニズムに関する情報が得られることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) ベトナムにおいて、同時期に鶏農場のニワトリから A/chicken/Vietnam/G14/08 (H3N8)株と水禽農場のアヒルから同じH3N8亜型の A/duck/Vietnam/G119/06 (H3N8)株を分離した。通常、野生水禽から分離されるH3N8亜型ウイルスは家禽類には感染できず、ニワトリから分離したウイルス株はニワトリに適応し、感染性、増殖性を獲得したものと考えられる。そこでまず、これらのニワトリから分離された A/chicken/Vietnam/G14/08 (H3N8)株とアヒルから分離された A/duck/Vietnam/G119/06 (H3N8)株と全遺伝子配列の比較解析を行う。さらに、この2株以外の水禽類および家禽類から分離された鳥インフルエンザウイルスの遺伝子配列を遺伝子データベースより入手し、野生水禽およびニワトリ由来の鳥インフルエンザウイルス分離株のアミノ酸配列の比較を行い、ニワトリへの感染性に関与するウイルスタンパク質およびそのタンパク質上の位置の検索を行う。

(2) 次に、遺伝子検索により示唆されたタンパク質およびウイルスタンパク質上の置換により、ニワトリへの感染性を獲得するかを調べるために、A/duck/Vietnam/G119/06 (H3N8)株および A/chicken/Vietnam/G14/08 (H3N8)株のウイルス遺伝子の全長をそれぞれPCR法により増幅し、クローニングプラスミドにクローニングを行い、さらにリバーゼジェネティクスによる人工ウイルス作成のためのプラスミドにそれぞれの遺伝子分節をサブクローニングする。さらに、アヒルおよびニワトリ由来株のそれぞれの遺伝子分節を一部入れ替えた人工ウイルスの作製を試み、培養細胞やニワトリでの感染性、増殖性の比較を行い、どのウイルスタンパク質がニワトリでの感染性、増殖性に重要であるかを明らかにする。さらに、感染性、増殖性に関連すること明らかになったウイルスタンパク質について、A/duck/Vietnam/G119/06 (H3N8)株と A/chicken/Vietnam/G14/08 (H3N8)株との間で異なるアミノ酸についてポイントミューテーションを導入し人工ウイルスを作成し、アイガモおよびニワトリでの増殖性の比較を行い、家禽類での感染性、増殖性に関与するウイルスタンパク質上のアミノ酸を同定、機能解析を行い、どのようなメカニズムでウイルスタンパク質が家禽類での感染、増殖に関わるのかを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ベトナムにおいて、鶏農場のニワトリから A/chicken/Vietnam/G14/08 (H3N8)株を分離した。野生水禽から分離されるH3N8亜型ウイルスは家禽類には感染できず、このウイルスはニワトリに適応し、感染性、増殖性を獲得したものと考えられる。そこで、同時期に水禽農場のアヒルから分離された A/duck/Vietnam/G119/06 (H3N8)株と全遺伝子配列の比較解析を行った。その結果、A/duck/Vietnam/G119/06 (H3N8)株および A/chicken/Vietnam/G14/08 (H3N8)株の間にはウイルスタンパク質全体で67か所のアミノ酸に違いが存在することが判明し、それぞれPB2に5カ所、PB1に6カ所、PB1-F2に5カ所、PAに9カ所、HAに19カ所、NPに2カ所、NAに17カ所、M1に1カ所、M2に1カ所、NS1に1カ所、NS2に1カ所であった。このアミノ酸の違いの全てが、ニワトリへの感染性に関与するとは考えにくい。そこで、他の野生水鳥とニワトリ由来のH3N8亜型の鳥インフルエンザウイルス分離株を加えて、水禽類由来株および家禽類由来株を含めたウイルスタンパク質のアミノ酸配列の比較を行った。その結果、水禽類由来株と家禽類由来株間に共通した違いは、HAタンパク質に5か所(2、57、128、137、145番目)、M2に1か所(10番目)およびNS2に1か所(60番目)に存在した。その中でもHAタンパク質上の表面頭部に位置するHAの抗原領域に3つの相異(128、137、145番目)が認められた(図1)。この領域は、宿主レセプター結合部に近く、また、HAの宿主レセプターへの結合を阻害する物質や、MDCK細胞およびニワトリ卵を用いて継代すると、これらの

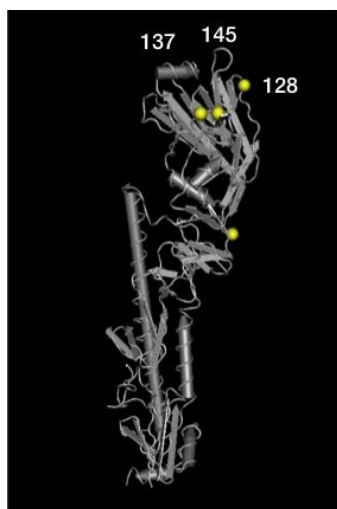


図1 HAの相異部位の立体構造上の位置

アミノ酸に置換が起こることが報告されており、今回の成績からも、これらのアミノ

酸に置換によりニワトリへの宿主レセプターへの特異性が変化し、感染性や増殖性に影響を与えた可能性が高いことが示唆された。

(2) 野生水鳥とニワトリ由来の鳥インフルエンザウイルス分離株の比較により、HA、M2およびNS2上のアミノ酸の置換により、ニワトリへの感染性を獲得した可能性が高いことが示唆された。そこで、ニワトリ分離ウイルス株とアヒル分離ウイルス株の遺伝子分節を入れ替えた遺伝子再集合体を作成し、細胞での増殖性や、アイガモやニワトリを用いた感染実験による感染性の比較を行うため、A/duck/Vietnam/G119/06 (H3N8)株および A/chicken/Vietnam/G14/08 (H3N8)株のそれぞれの全ての遺伝子分節についてクローニングを行い、さらにリバーゼネティクスによる人工ウイルス作成のためのプラスミドにそれぞれの遺伝子分節をサブクローニングした。これらのプラスミドに組み込んだウイルス遺伝子について全塩基配列の決定を行い、ウイルス遺伝子との塩基配列と同一であり、PCR等による変異が導入されていないことを確認した。また、作成したプラスミドをHEK293T細胞に単独で遺伝子導入し、ウイルスタンパク質がそれぞれ細胞中で発現することを確認した。しかし、アヒルのPB1遺伝子をクローニングしたプラスミドはRNAポリメラーゼ複合体を形成させると機能しないことが判明した。そのため、今回の成績からニワトリの感染性に関与しないと考えられるRNAポリメラーゼ複合体を形成に関与するPB2、PB1、PA、NP遺伝子はインフルエンザウイルスの標準株であるPB8株から再クローニングを行い、アヒル分離株及びニワトリ分離株の両方のRNAポリメラーゼ複合体に使用することとした。このPB8株由来のRNAポリメラーゼ複合体が正常に発現、機能することを確認している。また、感染性および増殖性に重要であると考えられるHAタンパク質については、HAタンパク質上のどのアミノ酸置換がニワトリの感染性に関わるのかを明らかにするため、ニワトリとアヒルのHAタンパク質の一部を交換したキメラHAタンパク質を発現するプラスミドを構築し、さらに、既に明らかになっているHAタンパク質上のニワトリから分離されたH3N8亜型ウイルス株と、水禽から分離されたH3N8亜型ウイルス株の相違部位について、それぞれについてポイントミューテーション法により、変異を導入したHA遺伝子分節も作製してある。今後、これらのプラスミドを用いて、ニワトリ由来ウイルスと水禽由来ウイルスの遺伝子分節を入れ替えた遺伝子再集合体を作成し、異なる細胞での増殖性やアイガ

モとニワトリを用いた感染実験による感染性の比較を行う事が可能となり、どの遺伝子分節が感染性や増殖性に影響を与えているかを解析することが可能となった。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

H. Takakuwa, T. Yamashiro, M. Q. Le, L. S. Phuong, H. Ozaki, R. Tsunekuni, T. Usui, H. Ito, M. Morimatsu, Y. Tomioka, T. Yamaguchi, T. Ito, T. Murase, E. Ono, K. Otsuki, Molecular epidemiology of avian influenza viruses circulating among healthy poultry flocks in farms in northern Vietnam., Preventive Veterinary Medicine, 査読有, Vol.103, 2012, pp.192-200

K. Hotta, H. Takakuwa, Q. M. T. Le, S. L. Phuong, T. Murase, E. Ono, T. Ito, K. Otsuki, and T. Yamashiro. Isolation and characterization of H6N1 and H9N2 avian influenza viruses from ducks in hanoi, Vietnam., Virus Research, 査読有, Vol.163, 2012, pp. 448-453

### 〔学会発表〕(計1件)

H. Takakuwa, T. Usui, K. Hotta, M. Q. Le, L. S. Phuong, R. Tsunekuni, H. Ozaki, H. Ito, M. Morimatsu, Y. Tomioka, T. Yamaguchi, T. Ito, T. Murase, E. Ono, T. Yamashiro, K. Otsuki, Molecular epidemiology of avian influenza viruses circulating among healthy duck flocks in farms in northern Vietnam during year 2006-2010, アジアリサーチフォーラム, 2012年1月11-12日, 神戸

### 〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kyoto-su.ac.jp/graduate/g\\_eng/g\\_bio/kyoin/takakuwa.html](http://www.kyoto-su.ac.jp/graduate/g_eng/g_bio/kyoin/takakuwa.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

高桑 弘樹 (TAKAKUWA, Hiroki)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授  
研究者番号：20449507