

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580441

研究課題名(和文)鳥インフルエンザウイルスの増殖能を決定するアミノ酸変異の解析

研究課題名(英文)Amino acid mutations associated with growth ability of avian influenza viruses

研究代表者

山田 博司(Yamada, Hiroshi)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：30343304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：鳥由来のインフルエンザウイルスH8N4、H10N2、H12N5型を、MDCK細胞で高い増殖能を有するワクチン用の種ウイルスにするための目的で、初代培養株と30代以上の継代株で100倍以上も増殖能に差のある3種類の変異ウイルス株を得た。これらの遺伝子の塩基配列を解析したところ、3種類全てで、PB2とHA分節に変異が確認された。PB2の変異はウイルスのポリメラーゼ活性を高め、HAの変異はウイルスの細胞内侵入後の膜融合活性を高めることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We incubated three avian influenza viruses, H8N4, H10N2, and H12N5, in MDCK canine cells and got each mutated virus which had the ability to grow over 100-times better than parental one. We analyzed all nucleotide sequences of parental and mutated viruses. By making reassortants between parental and mutated viruses, it was found that PB2 and HA was responsible for increased growth ability. All three viruses had mutations in PB2 and HA. By making reassortants with a single mutation found in PB2 and HA, we identified mutations associated increased growth ability. A mutation in PB2 increased viral polymerase activity. Mutations in HA increased viral fusion activity after endocytosis.

研究分野：インフルエンザウイルス

キーワード：鳥インフルエンザウイルス 増殖能

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 1997年に高病原性鳥インフルエンザ H5N1 が人に感染し、死者が出てから、世界的に H5N1 株の世界的流行が警戒されている。しかし、2009年には、H1N1 豚インフルエンザが世界的に大流行し、今後流行するインフルエンザウイルスの型を予測することは困難である。そのため、将来どのような型のインフルエンザウイルスが流行してもただちに対応できるように、ワクチン製造のための種ウイルスを整備することが重要である。

(2) 現行のインフルエンザワクチンの製造方法では、有精鶏卵に感染させることによりウイルス大量培養させ、精製したウイルスから抗原作製を行っている。しかし、高病原性鳥インフルエンザウイルスは有精鶏卵での致死性が高く、十分量のウイルス増殖が見込めない。さらに 2009年のインフルエンザパンデミックに見られたように季節性インフルエンザ用ワクチン製造中にパンデミックが発生した場合、十分量の有精鶏卵が得られず、ワクチン供給不足に陥る危険性も懸念される。よって、ワクチンの安定供給のために有精鶏卵に代わり、培養細胞を用いたワクチン作製方法の検討が世界中で検討されている。

### 2. 研究の目的

申請者は、新たなパンデミックに即応しうるワクチン製造の確立を目指すために、鳥由来のインフルエンザウイルスを、MDCK 細胞で高い増殖能を有するワクチン用の種ウイルスにするための条件検討を行っている。その研究の中で、初代培養株と 30 代以上の継代株で 100 倍以上も増殖能に差のある H8N4, H10N2, H12N5 型の 3 種類のウイルス株を得た。そこで本研究では、各株において、初代および 30 代継代後のそれぞれのウイルス株の全塩基配列を比較検討する。そして、その結果を基に MDCK 細胞への継代培養により高い増殖能に変化する責任遺伝子の同定を試みると共に、その分子生物学的メカニズムについて解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) H8N4, H10N2, H12N5 の 3 種類のトリインフルエンザウイルスについて、MDCK 細胞で継代を重ねて高い増殖能を獲得した変異ウイルスの増殖能増強のメカニズムを解析する。そのために、変異ウイルス及び初代ウイルスの全ゲノム塩基配列を決定し、その配列の相違について比較検討を行う。次いで、リバーシジェネティクス法によりアミノ酸を点変異させた組換えウイルスを作製することによって、高い増殖能を獲得したその責任遺伝子を検索する。

(2) 次に、該当する全ての責任遺伝子について、ウイルス増殖のどの過程での変化により増強されたのか、該当する遺伝子により産生されるタンパクのアミノ酸変異が各種活

性にどのような変化を与え、それが増殖能の増強にどのように関与するのか等を明らかにする。また、上記増殖能増強に係る遺伝子変異によるウイルス抗原性の変異の是非について検討を行う。

### 4. 研究成果

(1) 鳥由来のインフルエンザウイルス H8N4, H10N2, H12N5 型を、MDCK 細胞で高い増殖能を有するワクチン用の種ウイルスにするための目的で、初代培養株と 30 代以上の継代株で 100 倍以上も増殖能に差のある 3 種類の変異ウイルス株を得た。

(2) 初めに、これらの 3 種類の鳥インフルエンザウイルスについて、初代ウイルスと変異ウイルスの全塩基配列を決定した。次に、初代ウイルスの 8 本のゲノム分節のうち、1 分節のみを高い増殖能を獲得した変異ウイルス由来の分節に置換したりアソータントを作製し、増殖能を検討したところ、H8N4, H10N2, H12N5 型の 3 種類全てで、PB2 分節と HA 分節を入れ替えたリアソータントについて、MDCK 細胞における増殖能が増強した。逆に、変異ウイルスの 8 本のゲノム分節のうち、1 分節のみを初代ウイルス由来の分節に置換したりアソータントを作製し、増殖能を検討したところ、3 種類全てで、PB2 分節と HA 分節を入れ替えたリアソータントについて、MDCK 細胞における増殖能が減少した。PB2 分節について塩基配列を決定したところ、627 番目のグルタミン酸がリシンに変異していた。HA 分節についても、数個のアミノ酸変異を同定した。

(3) 次に、H8N4, H10N2, H12N5 型の 3 種類全てについて、PB2 と HA 分節において、変異ウイルスと初代ウイルスとの比較によって明らかとなった全てのアミノ酸変異について、リバーシジェネティクス法により一つずつの変異を持った組換えウイルスを作製し、MDCK 細胞でのウイルス増殖能を測定した。PB2 の E627K 変異については、H8N4, H10N2, H12N5 型の 3 種類全てで、初代ウイルスの増殖能が増強された。HA については、H8N4, H10N2, H12N5 型の 3 種で、計 9 個の変異が確認でき、そのうちの 4 個のアミノ酸変異が初代ウイルスの増殖能を高めた。これらの変異のうち 3 個は HA2 領域にあり、ウイルスの細胞内侵入後の膜融合活性を高めることを確認した。

### 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 4 件)

Yamada H, Nagao C, Haredy AM, Mori Y, Mizuguchi K, Yamanishi K, Okamoto S.  
Dextran sulfate-resistant A/Puerto

Rico/8/34 influenza virus is associated with the emergence of specific mutations in the neuraminidase glycoprotein. *Antiviral Research*, 111, 69-77, 2014. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.09.002. 査読有

Haredy AM, Yamada H, Sakoda Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Omasa T, Mori Y, Kida H, Okamoto S, Okuno Y, Yamanishi K. Neuraminidase gene homology contributes to the protective activity of influenza vaccines prepared from the influenza virus library. *Journal of General Virology*, 95, 2365-2371, 2014. DOI: 10.1099/vir.0.067488-0. 査読有

Haredy AM, Takenaka N, Yamada H, Sakoda Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Omasa T, Ohtake H, Mori Y, Kida H, Yamanishi K, Okamoto S. An MDCK cell culture-derived formalin-inactivated influenza virus whole-virion vaccine from an influenza virus library confers cross-protective immunity by intranasal administration in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20, 998-1007, 2013. DOI: 10.1128/CVI.00024-13. 査読有

Yamada H, Moriishi E, Haredy AM, Takenaka N, Mori Y, Yamanishi K, Okamoto S. Influenza virus neuraminidase contributes to the dextran sulfate-dependent suppressive replication of some influenza A virus strains. *Antiviral Research*, 96, 344-352, 2012. DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.09.012. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

山田博司、Ahmad M. Haredy、森康子、山西弘一、岡本成史 : Dextran sulfate によるインフルエンザウイルス増殖の阻害と NA 活性抑制との関連性、第 61 回日本ウイルス学

会学術集会、平成 25 年 11 月、兵庫県神戸市

Ahmad M. Haredy、山田博司、迫田義博、森 康子、喜田 宏、山西弘一、岡本成史 : NA subtype impact on influenza intranasal inactivated whole virion vaccine、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、平成 25 年 11 月、兵庫県神戸市

山田博司、Ahmad M. Haredy、森康子、山西弘一、岡本成史 : Dextran sulfate による PR8 NA の機能阻害の解析、第 27 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、平成 25 年 6 月、北海道札幌市

Ahmad M. Haredy、山田博司、迫田義博、森 康子、喜田 宏、山西弘一、岡本成史 : Impact of heterologous NA on inactivated whole virion vaccine、第 27 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、平成 25 年 6 月、北海道札幌市

山田博司、森康子、山西弘一、岡本成史 : Dextran sulfate によるインフルエンザウイルス増殖の阻害と NA 活性抑制との関連性、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、平成 24 年 11 月、大阪府大阪市

岡本成史、竹中延之、迫田義博、岡松正敏、山本直樹、Ahmad M. Haredy、山田博司、森康子、喜田 宏、山西弘一 : パンデミックインフルエンザの発生に即応した、ワクチン製造用種ウイルス株の作出 インフルエンザウイルスライブラリーの利用、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、平成 24 年 11 月、大阪府大阪市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 博司 (YAMADA Hiroshi)  
独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤  
研究部・研究員  
研究者番号：30343304

(2) 研究分担者

岡本 成史 (OKAMOTO Shigefumi)  
独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤  
研究部・プロジェクトリーダー  
研究者番号：50311759  
(平成25年8月23日 削除)