

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450417

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス亜型間交差反応性抗体の抗原認識機構の計算科学的解析と応用

研究課題名(英文) Computational analysis of a conformational epitope of a broadly neutralizing antibody in influenza A virus hemagglutinin

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・准教授

研究者番号：10374240

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)：インフルエンザウイルスのHA蛋白質は16種類(H1-H16)の亜型に分類される。我々はこれまで、H1、H2、H3、H13およびH16亜型のウイルスに対して中和活性を示すモノクローナル抗体S139/1の作出に成功した。本研究では、計算科学的手法により、S139/1の分子認識機構を詳細に解析した。その結果、S139/1が中和活性を示す株において、S139/1と強く結合するHA上10箇所の残基位置を同定した。また、水素結合解析から、156、158、193番目の残基位置が特に重要であることが明らかになった。実際、これらの位置はS139/1のエスケープ変異実験で観測される変異位置と一致していた。

研究成果の概要(英文)：The HA of influenza A viruses is classified into 16 subtypes (H1-H16). We have previously reported a cross-reactive antibody, designated S139/1, which neutralizes H1, H2, H3, H13, and H16 subtypes. In this study, we characterized the S139/1 recognition sites on different HAs by computational methods such as molecular modeling and dynamics simulations. We investigated the contribution of individual residues on each HA to the interaction with S139/1, and found that amino acids at 10 positions on HA strongly contributed to S139/1 binding as for the strains neutralized by S139/1. Analysis of hydrogen bond interactions emphasized that the residues at positions 156, 158 and 193 were the most important for S139/1 binding. Indeed, amino acid substitutions at these three positions were experimentally observed in the mutant viruses escaping from neutralization by S139/1. Thus, our computational methods identified the amino acid residues critical for the cross-neutralizing activity of S139/1.

研究分野：計算構造生物学

キーワード：インフルエンザ ウイルス 抗体 計算科学 分子動力学 分子モデリング

1. 研究開始当初の背景

A型インフルエンザウイルスは、人を含む哺乳類および鳥類に広く感染する人獣共通感染症病原体である。ウイルス粒子表面のHA蛋白質は、ウイルス中和抗体の主要な標的であり、抗原性の違いから16種類の血清亜型(H1-H16)に分類される。全ての亜型は、インフルエンザウイルスの自然宿主である野生の水禽類が保持している。したがって、どのHA亜型のウイルスも、種の壁を越え、新型インフルエンザの流行を引き起こしても不思議ではない。

現在、ヒトの間ではH1およびH3亜型のウイルスが、季節性インフルエンザとして流行を繰り返している。インフルエンザの予防にはワクチン接種が有効であるが、現行のワクチンは各亜型に対するワクチンを混合したものであり、両方の亜型に効果を示すものではない。また、ウイルスの抗原変異の性質のため、ワクチンの効果は長続きせず、ワクチン株を頻繁に更新しなければならない。このような理由から申請者は、抗原性の異なる多くのウイルスに対応可能な予防・治療法の開発を目指している。

あるHA亜型に対する抗血清は他のHA亜型にはほとんど反応しない。そのため、これまで亜型間で共通する抗体結合領域(エピトープ)はほとんど存在しないと考えられてきた。しかしながら最近、申請者らによる研究(Yoshida R, et al., *PLoS Pathog* 2009)も含め、幅広いHA亜型を認識する抗HA抗体が相次いで報告されている(Ekiert DC, et al., *Science* 2009; Sui J, et al., *Nat Struct Mol Biol* 2009; Corti D, et al., *Science* 2011)。このような亜型間交差反応性を示す抗体は、抗体医薬として新型インフルエンザ発生時の治療に、また共通エピトープは万能ワクチン設計に応用できる可能性を秘めている。

申請者らは、進化系統学的に異なる複数のHA亜型のウイルスに対して中和活性を示すモノクローナル抗体の作出に成功した(Yoshida R, et al., *PLoS Pathog* 2009)。また最近、この抗体とH3亜型のHAとの共結晶構造を解き、そのエピトープ残基を同定した(Lee PS, et al., *PNAS* 2012)。しかしながら、この抗体はH3亜型のHA以外とはどのように相互作用しているのか、共通エピトープはどのような残基で構成されているのか、ウイルスはHA上のどのような位置、どのような特徴を持ったアミノ酸残基が変異し、抗体からエスケープしているのか等、まだ解明すべき点が多い。

HA上のエピトープを原子レベル、残基レベルで解析することは重要である。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。申請者は、計算科学的手法を用いて、この相互作用について解析を行ってきた。その結果、エ

スケープ変異体に見られるHA上のアミノ酸置換は、抗体とHAとの結合自由エネルギーを有意に減少させるアミノ酸残基の変異であることが分かってきた。またLiuらも、HAと抗体の結合に大きく寄与するのは数残基であり、その残基位置とエスケープ変異との関係をバイオインフォマティクス手法により解析し、報告している(Liu Q, et al., *Bioinformatics* 2011)。このようなHAと抗体との分子間相互作用に関する知見は、ウイルスの変異予測や抗体・ワクチン設計において非常に有用である。

2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスHAと亜型間交差反応性抗体の立体構造を基に、計算科学的手法を用いて、HAと抗体との分子間相互作用を解析する。さらに本研究では、既知のHA-抗体複合体構造を鋳型に遺伝子を改変して、抗体の親和性と特異性を操作し、多くのHAを認識する抗体の設計を試みる。

3. 研究の方法

当研究室で作出された亜型間交差反応性抗体S139/1はH1, H2, H3, H13およびH16亜型のウイルスに対して中和活性を示す。またS139/1とH3亜型(A/Victoria/3/75株: Vic株)のHAとの共結晶構造はすでに決定され、プロテイン・データ・バンク(PDB)に登録されている(4GMS.pdb)。

(1) HA-S139/1複合体の初期構造

Vic株のHAとS139/1との結合構造は4GMS.pdbを用いた。また、それ以外のウイルス株のHAとS139/1との結合構造は、分子モデリング法により構築した。

(2) HAとS139/1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、HA-S139/1の結合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。HAとS139/1との結合自由エネルギーはMM/GBSA法により、計算した。計算プログラムには、AMBER14およびAMBER16を用いた。

4. 研究成果

(1) 亜型間交差反応性抗体の共通エピトープの構造的特徴

本研究では、H1, H2, H3, H6, H9およびH13亜型のHAとの分子間相互作用を分子動力学シミュレーションにより解析し、亜型間共通エピトープおよびパラトープの構造的特徴を調べた(表1)。

シミュレーションの初期構造となるHA-S139/1結合構造の構築には、構造重ね合わせ、ホモロジーモデリング、ドッキングシミュレーション等の分子モデリング手法を組み合わせて、検討した。その結果、S139/1構造の存在下でHAのみをホモロジーモデリング法で構築した構造を初期構造としてシミュレーションを行うと、得られる結合自由

表 1. 本研究で用いたウイルス株

Abbreviation	Strain Name	Template Structure	Neutralization
PR8 (H1)	A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	1RU7	×
H1pdm (H1)	A/California/04/2009 (H1N1)	3LZG	×
Adachi (H2)	A/Adachi/2/1957 (H2N2)	3KU5	○
Aichi (H3)	A/Aichi/2/1968 (H3N2)	4GMS	○
Victoria (H3)	A/Victoria/3/1975 (H3N2)	(4GMS) ^a	○
Mass (H6)	A/turkey/Massachusetts/3740/1965 (H6N2)	3HTO	×
W213 (H9)	A/duck/Hong Kong/W213/1997 (H9N2)	1JSD	×
Maryland (H13)	A/gull/Maryland/704/1977 (H13N6)	4KPQ	○

^acrystal structure

エネルギーは実験値と定性的によく一致することが明らかになった。すなわち、中和される株の HA は S139/1 と強く結合し、中和されない株では S139/1 との結合が弱かった。また、HA 上の変異に伴う S139/1 の中和活性能の変化も、コンピュータ上で変異を導入し、シミュレーションをすることにより、定性的によく再現することが分かった。このように、これらの結果から、本研究で考案した分子モデリング、結合自由エネルギー計算のプロトコルの妥当性が確認された (図 1)。

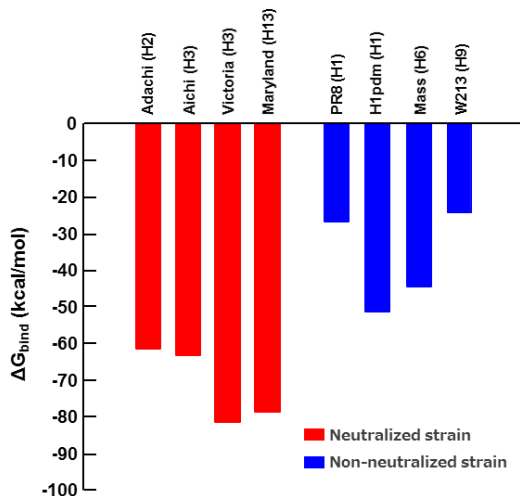


図 1. ウイルス株ごとの結合自由エネルギー

さらに、結合自由エネルギーのエンタルピー項をアミノ酸残基ごとに分解し、分子間相互作用における HA および抗体上の各残基のエネルギー寄与を解析した。その結果、98、136、153、156、158、159、193、194、196、226 番目 (H3 numbering) の残基が、中和される株に共通して強く結合していた。さらに分子間力を詳しく解析した結果、中和される株の HA では、156、158、193 番目のアミノ酸残基が S139/1 と水素結合または塩橋を形成し、結合に非常に重要であることが分かった。実際、S139/1 のエスケープ変異株では、これらの位置に変異が起こることが実験で確認されている。これらの結果は、中和される株としない株および抗体からのエスケープ変異を計算機シミュレーションで予測できる可能性を示唆している。また、中和される株の HA に共通して、156 番目の残基が

S139/1 の HCDR2 と塩橋を形成していることが明らかになった。残基ごとに分割した結合自由エネルギーの主成分分析の結果も、中和される株とされない株の分離に寄与するのは 156 番目の残基であることが示唆された。(2) エスケープ変異後の HA に再結合する抗体設計

分子動力学計算から得られる結合自由エネルギーを指標に、S139/1 の抗原認識能を改変し、S139/1 からエスケープ変異したウイルス株を中和するモノクローナル抗体の分子設計を試みた。上述したように、我々はすでに S139/1 が存在する環境下で、A/Aichi/2/68 (H3N2) ウイルスを培養すると、HA 上 156 番、158 番、193 番目のアミノ酸に変異を持ったウイルスが選択されてくることを報告している。本研究では手始めに、158 番目のアミノ酸置換によりエスケープ変異したウイルス株を中和するモノクローナル抗体の分子設計を試みた。はじめに HA と S139/1 の分子動力学計算の結果から、HA と S139/1 の結合に大きく寄与している抗体 CDR 上の残基位置を同定した。続いて変異 HA と S139/1 の分子動力学計算の結果から、158 番目のアミノ酸置換によって結合に歪みが生じる抗体 CDR 上の残基位置を同定した。これら歪みの生じた残基位置に、計算機上でアミノ酸置換を網羅的に導入し、分子動力学計算により結合自由エネルギー計算を行った。このうちいくつかはエスケープ変異前の HA と S139/1 の結合エネルギーと同程度まで回復した。

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 14 件)

Hiono T, Okamatsu M, Igarashi M, McBride R, Vries RP, Peng W, Paulson JC, Sakoda Y, Kida H. Amino acid residues at positions 222 and 227 of the hemagglutinin together with the neuraminidase determine binding of H5 avian influenza viruses to sialyl Lewis X. *Arch Virol.*, 査読有, 161(2), 2016, 307-316

DOI: 10.1007/s00705-015-2660-3

Furuyama W, Marzi A, Nanbo A, Haddock E, Maruyama J, Miyamoto H, Igarashi M, Yoshida R, Noyori O, Feldmann H, Takada A. Discovery of an antibody for pan-ebolavirus therapy. *Sci Rep.*, 査読有, 6, 2016, 20514

DOI: 10.1038/srep20514

Itoh Y, Shichinohe S, Nakayama M, Igarashi M, Ishii A, Ishigaki H, Ishida H, Kitagawa N, Sasamura T, Shiohara M, Doi M, Tsuchiya H, Nakamura S, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H,

Ogasawara K. Emergence of H7N9 Influenza A Virus Resistant to Neuraminidase Inhibitors in Nonhuman Primates. *Antimicrob Agents Chemother.*, 査読有, 59(8), 2015, 4962-4973

DOI: 10.1128/AAC.00793-15

Igarashi M. Antiviral Drugs Targeting Influenza Virus Surface Proteins: A Computational Structural Biology Approach. *Yakugaku Zasshi.*, 査読無, 135(9), 2015, 1015-1021

DOI: 10.1248/yakushi.15-00175-3

Nao N, Kajihara M, Manzoor R, Maruyama J, Yoshida R, Muramatsu M, Miyamoto H, Igarashi M., Eguchi N, Sato M, Kondoh T, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Takada A. A Single Amino Acid in the M1 Protein Responsible for the Different Pathogenic Potentials of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strains. *PLoS One*, 査読有, 10(9), 2015, e0137989

DOI: 10.1371/journal.pone.0137989

Ozawa M, Matsuu A, Yonezawa K, Igarashi M., Okuya K, Kawabata T, Ito K, Tsukiyama-Kohara K, Taneno A, Deguchi E. Efficient isolation of Swine influenza viruses by age-targeted specimen collection. *J Clin Microbiol.*, 査読有, 53(4), 2015, 1331-1338

DOI: 10.1128/JCM.02941-14

Itoh Y, Yoshida R, Shichinohe S, Higuchi M, Ishigaki H, Nakayama M, Pham VL, Ishida H, Kitano M, Arikata M, Kitagawa N, Mitsuishi Y, Ogasawara K, Tsuchiya H, Hiono T, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Ito M, Quynh Mai L, Kawaoka Y, Miyamoto H, Ishijima M, Igarashi M., Suzuki Y, Takada A. Protective efficacy of passive immunization with monoclonal antibodies in animal models of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection. *PLoS Pathog.*, 査読有, 10(6), 2014, e1004192
DOI: 10.1371/journal.ppat.1004192

[学会発表](計36件)

Nao N 他: A genetic basis for the acquisition of basic amino acid residues at the cleavage site of influenza virus hemagglutinin, 2016年8月25日、シェラトン グランド シカゴホテル(アメリカ・シカゴ)

Hiono T 他: Molecular analysis on receptor-binding of H5 influenza viruses to fucosylated α 2,3 sialosides, 2016年8月25日、シェラトン グラン

ド シカゴホテル(アメリカ・シカゴ)

Igarashi M 他: Computational analysis of a conformational epitope of a broadly neutralizing antibody in influenza A virus hemagglutinin、Options IX for the Control of Influenza, 2016年8月26日、シェラトン グランド シカゴホテル(アメリカ・シカゴ)

五十嵐学: 人獣共通感染症研究における計算科学の活用、第374回CBI学会講演会、2016年7月22日、東京大学(東京都文京区)

五十嵐学 他: Computational analysis of common epitope recognized by a broadly neutralizing antibody against influenza A virus hemagglutinin、第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月23日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

五十嵐学 他: Computational analysis of a conformational epitope of a broadly neutralizing antibody in influenza A virus hemagglutinin、CBI学会2015年大会、2015年10月27日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

五十嵐学: インフルエンザの制御と計算科学、第9回CBI学会FMO研究会、2015年5月13日、東京工業大学キャンパスイノベーションセンター(東京都港区)

[その他]

ホームページ等

<http://www.czc.hokudai.ac.jp/epidemiol/members/igarashi/>

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・准教授

研究者番号: 10374240

(3) 連携研究者

高田礼人 (TAKADA AYATO)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号: 10292062