

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013年 3月 11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 鈴木康夫  ④
所属機関名：中部大学
所属部署名：生命健康科学部 職名：教授
所在地：愛知県春日井市松本町 1200
電 話：0568-51-6391 内線：直通

1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

鳥インフルエンザウイルスのヒト適応変異におけるウイルスヘマグルチニンおよび受容体破壊酵素（ノイラミニダーゼ）の役割に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 鈴木康夫

職名： 教授

所属機関名： 中部大学

部署名： 生命健康
科学部

中国側研究者氏名： 郭 潮潭

職名： 所長

所属機関名： 浙江省医学科学院

部署名： 生物工程
研究所

4. 当該研究における発表論文等

現在、投稿準備中

Chao-Tan Guo, Keming Xu, Wengjun Song, Zhoujing He, C.Y. Cheung, Hoang Thuy Long, Honglin Chen, J.S.M. Peiris, Yasuo Suzuki, and Yi Guan: Receptor Binding Profile of H5N1 Influenza Virus Correlates with Glycosylation of Hemagglutinin and Length of Neuraminidase Stalk. *J. Biochem.*, to be submitted.

鳥インフルエンザウイルスのヒト適応変異におけるウイルスヘマグルチニン および受容体破壊酵素（ノイラミニダーゼ）の役割に関する研究

研究者氏名	教授 鈴木 康夫
日本所属機関	中部大学生命健康科学部
中国研究者氏名	所長 郭 潮潭
中国所属機関	中国浙江省医学科学院 生物工程研究所

要 旨

1) 現在流行している高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1 亜型、以下 H5N1）の多くは、ノイラミニダーゼ（NA）スパイクの stalk 部位に約 20 アミノ酸が欠落する変異が生じていた。2) HA 上のレセプター結合ポケット近傍の 169 番目のアミノ酸には常に糖鎖が付加していた。3) 158 糖鎖無/NA stalk 長の H5N1 は、主として、ヒト型レセプター（Neu5Ac α 2-6Gal）への結合性を示し、HA 158 糖鎖有/NA stalk 短の H5N1 は、鳥型レセプター（Neu5Ac α 2-3Gal）への結合性を、HA 158 糖鎖無/NA stalk 短の H5N1 は、鳥型（Neu5Ac α 2-3Gal）およびヒト型レセプター（Neu5Ac α 2-6Gal）の両者への結合性を示すことを見出した。4) さらに、自然界分離ウイルスと同様に人工的変異ウイルスでも上記の法則性が成り立つことを確認した。

以上により、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1 亜型）のヒト細胞受容体結合性獲得におけるレセプター破壊酵素（NA）の全く新しい役割の一端を明らかにすることが出来た。

Key Words インフルエンザウイルス、レセプター、ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ、受容体破壊酵素、変異

緒 言：

A 型インフルエンザウイルスの自然宿主は、カモなどの野生水鳥である。ウイルスは、これらの体内では、低病原性で、水鳥を殺さず、水鳥腸管の細胞膜にあるシアロ糖鎖へ結合して、感染・増殖し、糞と共に湖水中へ排出され、それを飲んだ他の水鳥に感染が広がっていく（1-5）。水鳥の砂嚢は、酸性があまり強くなく、飲み込まれたウイルスは速やかに消化管へと運ばれ、体内に長く留まらず、抗体による圧力もあまり受けないので、変異の速度が遅いとされている。このようにして、大量のインフルエンザウイルスは、水鳥の渡りとともに、世界中に拡散する。1997 年に香港で発生し、ニワトリからヒトへ伝播した H5N1 ウイルスは、100 万羽を越すニワトリを殺すことにより一時的に流行は終息したが、再び 2003 年、中国福建省でヒトへの伝播が発生し、その後、世界各国へ広がっている。2010 年以降、最もヒトへの伝播が多い国はエジプト、インドネシア、カンボジア、中国である。現在、H5N1 は、様々な動物（ブタ、野鳥、ネコ科の動物、イヌ、アライグマなど）（6）へも宿主域を拡げている。

H5N1 を含む全ての A 型インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン（HA、3 量体）およびノイラミニダーゼ（NA、4 量体）スパイクを持つ（図 1）。両者は糖タンパク質で、宿主由来の *N*-型糖鎖が感染過程で付加される。これらの糖鎖は、HA、NA の生物学的活性発現や、HA、NA の 3 次構造の維持に重要である。さらに、付加された糖鎖は宿主由来であるため、ウイルスが宿主の免疫監視機構から逃れる上で重要な働きをしていると考えられている。HA は、ウイルスが宿主細胞のレセプターシアロ糖鎖へ特異的に結合する上で必須の役割を担っている。HA には α 2-6（ヒト型レセプター）、 α 2-3（鳥型レセプター）シアロ糖鎖レセプターへ結合できる主要（1 番目）レセプター結合ポケットと α 2-3（鳥型レセプター）のみしか結合で

きない 2 番目のレセプター結合ポケットが存在する。一方、NA は、ウイルスが出芽により宿主細胞膜から遊離する上で必須の役割を果たす

(1-4)。近年、NA はウイルスの感染初期過程にも関わり、ウイルスの感染細胞内増殖とも深く関わる事が明らかとなっている (7)。我々は、これまでに、下記の点を明らかにしてきた。1) 鳥インフルエンザウイルスとヒトインフルエンザウイルスでは明らかにレセプター認識特異性が異なる (3)。2) これまで H5N1 感染患者 (中国、タイ、ベトナム、インドネシア、エジプトなど) から分離されたウイルスの中でヒト型レセプターへの結合性を獲得した変異株を見出した (1, 5, 6, 8, 9)。鳥間で速やかに伝播する鳥インフルエンザウイルス (H5N1 を含む) は、宿主細胞膜の「シアル酸 α 2-3 ガラクトース含有糖鎖: Sia α 2-3Gal β 1-, 以後 α 2-3 と

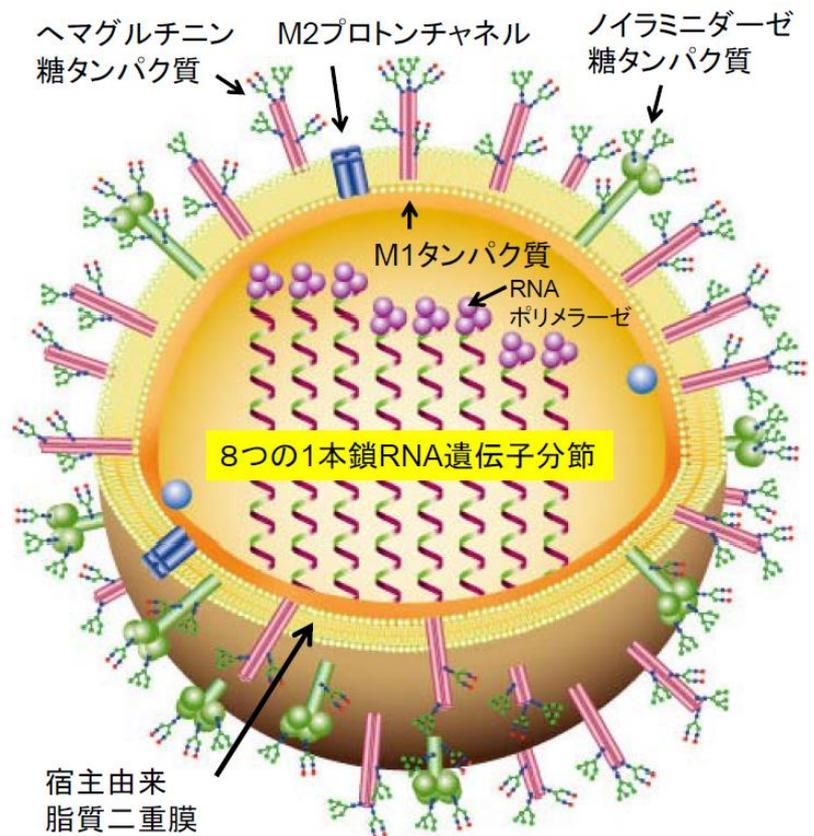


図1 インフルエンザウイルスの構造模式図

略」 (鳥型レセプターと呼ぶ) に優先的に結合する (1-5)。一方、ヒト間で流行する、例えば季節性のヒトインフルエンザウイルスは、「シアル酸 α 2-6 ガラクトース含有糖鎖: Sia α 2-6Gal β 1-, α 2-6 と略」 (ヒト型レセプター) に優先的に結合する (8, 9)。

対象と方法：

インフルエンザウイルスは発育鶏卵またはMDCK細胞で培養した。ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼの任意のアミノ酸置換は、リバーシジェネティクスの手法により行った。

結果：

(1) 自然界で分離された H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異におけるウイルス NA の役割
今回、自然界から分離された H5N1 ウイルスの HA 内 158 番目の Asn における糖鎖付加の有無、さらに、NA の stalk(軸) 部位における連続した 20 アミノ酸配列の欠失の有無が、H5N1 ウイルスのヒト型および鳥型レセプターへの結合性に深く関わることを見出した。香港大が所有するヒトおよび鳥 (カモ、ガチョウ、ウズラ、キジ、grey heron, Bar head goose) から分離された天然の H5N1 ウイルス (全 55 株) について、HA および NA 遺伝子、それによるアミノ酸配列、さらにレセプターシアロ糖鎖 (α 2-3, α 2-6) への結合特異性を調べた。その結果、H5N1 ウイルスは、

- 1) 主にヒト型レセプターシアロ糖鎖 (α 2-6) に優先的に結合するウイルス群 (グループ I, 7 株), 2) 鳥型、ヒト型レセプターシアロ糖鎖の両者に結合するウイルス群 (グループ II, 24 株)
- 3) 鳥型レセプターシアロ糖鎖 (α 2-3) へ優先的に結合するウイルス群 (グループ III, 24 株)

が存在することを見出した。

さらに、これらの3つのグループは、下記の特徴によって分類され得ることを見出した。

- 1) グループ I に属する H5N1 (ヒト型レセプターへ優先的に結合できるウイルス) は、158 番目の Asn に *N*-型糖鎖が付加されていない。また、NA の Stalk に連続した 20 アミノ酸欠失が無く正常の長さである。
- 2) グループ II に属する H5N1 (ヒトおよび鳥型レセプターの両者へ結合できるウイルス) はレセプター結合ポケットと近傍にある 158 番目の Asn に *N*-型糖鎖が付加されていない。しかし、NA の Stalk に 20 アミノ酸欠失があり、短くなっている。
- 3) グループ III に属する H5N1 (鳥型レセプターへ優先的に結合できるウイルス) は 158 番目の Asn に *N*-型糖鎖が付加されている。また、NA の Stalk に 20 アミノ酸欠失があり、短くなっている。

また、第一のレセプター結合ポケットの近傍には 158 番目の他に 169 番目の Asn にも *N*-型糖鎖が付加されているが、天然から分離された全ての H5N1 は 169 番目の糖鎖付加を持っており、糖鎖付加の有無は 158 番目の Asn に限られることが判明した。

自然界で分離された H5N1 ウイルスの HA 分子内 Asn158 のグルコシル化の有無、および NA 分子の長短により、H5N1 ウイルスの宿主レセプターへの結合特異性が変わることは、これまで知られておらず、初の観察である。

(2) 自然界で分離された H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異におけるウイルス HA および NA の役割の証明

自然界で分離された H5N1 における HA 分子内 Asn158 の糖鎖付加の有無、NA 分子の stalk (軸) 部分の連続 20 アミノ酸欠失の有無 (NA 分子の長短) の組み合わせが、ヒト型レセプターへの結合性変異獲得に重要であることをさらに証明するために、リバーシジェネティクス手法により、8 種類の人工ウイルス (① Asn158-, Asn169-, NA 完全長; ② Asn158-, Asn169+, NA 完全長; ③ Asn158+, Asn169-, NA 完全長; ④ Asn158-, Asn169-, NA 短; Asn158-, Asn169+, ⑤ NA 完全長 Asn158-, Asn169+, NA 短; ⑥ Asn158+, Asn169-, NA 短; ⑦ Asn158+, Asn169+, NA 短; ⑧ Asn158+, Asn169+, NA 完全長) (+, -は糖鎖付加の有無を示す) を作成し、レセプター結合特異性を調べた。その結果、自然界で分離されたウイルスを用いた結果を再現出来ることが判明した。すなわち、② Asn158 の糖鎖付加なし、NA stalk 完全長のウイルスはヒト型レセプターへ優先的に結合し、⑤ Asn158 の糖鎖付加なし、NA stalk 短のウイルスは鳥およびヒト型レセプターの両方へ結合、さらに⑦ Asn158 糖鎖付加あり、NA stalk 短のウイルスは、鳥型レセプターへ優先的に結合した。また、HA 分子内 Asn169 の糖鎖付加の有無は結果に影響を及ぼさないことも確認された。以上により、自然界で分離された H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異におけるウイルス HA および NA の役割が再現性良く証明された。

考 察 :

以上、本研究により、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) のヘマグルチニン HA 分子内 Asn158 の糖鎖付加の有無、および NA 分子内 stalk (軸) 部位の連続 20 アミノ酸欠失の有無が、H5N1 ウイルスの鳥型レセプター ($\alpha 2-3$) 結合特異性からヒト型レセプター ($\alpha 2-6$) 結合特異性へのフェノタイプ変異をもたらすことが初めて明らかとなった。これまで、H5N1 を含むインフルエンザウイルスのレセプター結合特異性は、HA 分子内アミノ酸置換のみによるとされていたが、今回、NA stalk のアミノ酸欠失という NA の構造、機能にも関わることを初めて明らかにした。現在、流行している H5N1 の多くは⑤および⑦のタイプであり、今のところ②のヒト型レセプターへ優先的に結合出来る変異ウイルスは分離されていない。今後は、自然界における②タイプの H5N1 ウイルスの出現を監視することが重要である。

参考文献 :

- 1) Suzuki, Y. : *Chang Gung Med. J.*, 32, 258-263 (2009).

- 2) Sriwilaijaroen, N., Suzuki, Y. : Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc. Japan Academy Ser. B, Physical and biological Sciences* 88 (6) 226-249 (2012).
- 3) Suzuki, Y.: Sialobiology of influenza -Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses- *Biol. Pham. Bull.*, 28 (3) 399-408 (2005).
- 4) Suzuki, Y.: Highly pathogenic avian influenza. *J. Disaster Res.*, 6 (4), 398-403 (2011).
- 5) Watanabe, Y. *et al.*: Acquisition of Human-Type Receptor Binding Specificity by New H5N1 Influenza Virus Sublineages during Their Emergence in Birds in Egypt. *PLoS Pathogens*, 7, issue 5, e-1002068 (2011).
- 6) Nidom, C.A. *et al.*: Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 1515-1523 (2010).
- 7) Suzuki, T. *et al.*: Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. *J. Virol.*, 79, 11705-11715 (2005).
- 8) Auewarakul, P. *et al.*: An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J. Virol.*, 81, 9950-9955 (2007)
- 9) Le, Q.M. *et al.*: Isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature*, 437, 1108 (2005).

謝辞

本研究は、財団法人日中医学協会の助成を受けたものであり、ここに深く感謝の意を表します。

作成日：2013年 3月5日