

H1N1型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼタンパク質の酸性安定性を決定する分子機構とこの性質が関わるウイルス増殖促進機構およびパンデミック発生機構に関する研究

静岡県立大学 薬学部 助教 高橋 忠伸

事業の概要

インフルエンザA型ウイルスは人畜共通感染症の病原体であり、ヒト、ブタ、トリなどの幅広い宿主域と極めて強い感染力を特徴とする。20世紀に発生した1918、1957、1968、1977年の新型ヒトウイルスの世界的大流行（パンデミック）はそれぞれ、スペイン風邪、アジア風邪、ホンコン風邪、ロシア風邪と呼ばれている。これらに代表されるパンデミック株の分子機構を理解することは、流行予測・予防、抗ウイルス薬の開発に大きく貢献し、乳幼児から高齢者までを含めた全年齢層の健康・長寿の礎になるものと考えられる。ウイルス表面に存在する2つの主要スパイク糖タンパク質、ヘマグルチニン(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)は、パンデミックに決定的な役割を果たすと言われている。ウイルスはこれらの糖タンパク質の抗原性によりHAは1~16、NAは1~9の亜型に分類される。申請者らは、アジア風邪(H2N2)、ホンコン風邪(H3N2)に分類されるすべてのパンデミックウイルス株NAのウイルスレセプター破壊酵素(シアリダーゼ)活性が、pH 4.0~5.0の酸性条件で、他の小規模流行(エピデミック)株と比べて顕著な安定性を有することを発見した(J. Biochem 130, 27-282, 2001; FEBS Lett. 543, 71-75, 2003)。また、このNAの酸性安定性がウイルスの系統進化に関与すること(FEBS Lett. 557, 228-232, 2004)、ウイルスの感染初期エンドサイトーシス過程に作用して子ウイルス増殖を亢進させることを明らかにしてきた(J. Virol. 79, 11705-11715, 2005)。これは、感染後期(感染細胞表面からの子ウイルス飛散)のみに機能すると言われてきたNAの新たな機能の発見に値する。そこで、本研究は、パンデミックの中でも深刻な被害を与えたスペイン風邪のN1型NAや2009年に発生したブタウイルス由来新型H1N1ウイルスのNAの酸性安定性の調査とその分子機構の解明を行い、NAの酸性安定性に基いたウイルス増殖性への関与の検討や感染初期過程のNAの新規機能の詳細を明らかにすることを目的とした。また、ロシア型H1N1ヒトウイルスのNAやトリ由来ウイルスのNAの酸性安定性の調査も実施した。

事業の成果

1 スペイン風邪NA

スペイン風邪は1918年に発生したH1N1型ウイルスとして、5000万人に死をもたらしたと言われている人類史上に類を見ない甚大な被害を与えたパンデミックウイルスである。このウイルスは、通常のインフルエンザウイルスに比べて高い増殖性や病毒性を有していたことが報告されている。しかしながら、高病原性トリウイルスの高い病毒性を引き起こす因子(HAの解列部位の塩基性アミノ酸の繰り返し配列)はスペイン風邪HAにおいて認められず、スペイン風邪の高い病毒性の発現機構は現

在まで不明のままである。インフルエンザA型ウイルスの8本の分節状ウイルス遺伝子の中でスペイン風邪のPB1、HA、NA遺伝子はそのウイルスの高い病毒性に関与することが示唆されている（Proc. Natl. Acad. USA 105, 3064-3069, 2008）。本研究はほとんど研究が成されていないスペイン風邪NAに焦点を当て、研究代表者が発見した酸性安定性と呼ばれる性質に基づいて遂行した。

1 - 1 スペイン風邪NAは酸性安定性を示す

スペイン風邪のNA遺伝子をヒト胎児腎臓293T細胞に発現させて、そのシアリダーゼ活性の酸性安定性（pH 4.0、5.0、6.0で処理後のシアリダーゼ活性）を測定した。スペイン風邪NAは、過去に報告したパンデミックウイルスのアジア風邪やホンコン風邪のN2型NAと同様に、顕著な酸性安定性を示すことを発見した（pH 4.0および5.0において高い活性が見られた）。一方、1991年と2002年のAロシア型H1N1のNAのシアリダーゼ活性に酸性安定性は見られなかった。これは、過去に報告した大部分のN2型エピデミックウイルスのNAに酸性安定性が見られないことと一致する。また、1977年に発生したロシア風邪（H1N1）のNAに酸性安定性は見られなかった（pH 4.0および5.0において活性はほとんど見られなかった）。これは他のパンデミックウイルス（スペイン風邪、アジア風邪、ホンコン風邪）とは異なる結果であった。ロシア風邪は、他のパンデミックのようにヒトウイルスとトリウウイルスの遺伝子交雑体として発生したのではなく、1950年代のヒトH1N1ウイルスが永久凍土に保存され、地球温暖化とともに融解した凍土から再興したものであると言われている。つまり、ロシア風邪は1950年代のエピデミックウイルスと性質上は同じものであると予想されることから、そのNAにおいても一般的なエピデミックウイルスと同様に酸性安定性が見られないものと考えられる。発生機構が例外的なロシア風邪を除いて、ウイルス遺伝子間の交雑によりパンデミックを引き起こしたと言われている新型ウイルスのNAはすべてにおいて高い酸性安定性を保持していた。パンデミック候補株の予測の一つの評価基準として、NAの酸性安定性の測定が利用できるものと思われる。また、スペイン風邪はその遺伝子配列の解析からトリウウイルスに由来するものと考えられている。スペイン風邪NAは遺伝子配列とともにタンパク質の性状レベル（酸性安定性）においても、トリウウイルスNAから由来することを支持する結果であった。

1 - 2 スペイン風邪NAの酸性安定性の分子機構（アミノ酸残基の同定）

スペイン風邪NA（酸性に安定）とロシア風邪A/USSR/92/77株のNA（酸性に不安定）の間で作製した6個のキメラNA遺伝子から、スペイン風邪NAのアミノ酸428～457番の領域が酸性安定性を決定するために重要であることが判明した。さらに、このアミノ酸領域内において両NA間でアミノ酸残基が異なる部位に対して、スペイン風邪NAは7つ、USSR株NAは8つの遺伝子変異導入体を作製した。最終的に、スペイン風邪NAはアミノ酸435番目のスレオニン残基の挿入と455番目のグリシンからアスパラギンへの変異により酸性安定性を消失すること、さらにUSSR株NAは435番目のスレオニン残基の欠失と430番目のアルギニンからグルタミンへの変異、455番目のアスパラギンからグリシンへの変異により酸性安定性を獲得することが判明した。アミノ酸430番目は活性部位の近傍、435番目はカルシウムイオン結

合部位（NA立体構造の安定化に機能すると言われている）の近傍、455番目はサブユニット間の会合部位（NAはホモ四量体構造）に位置していた。これらのアミノ酸部位の変化は、NAの活性部位およびNAの全体構造（四量体構造）に大きく影響し、酸性安定性を劇的に変化させたものと考えられる。

1 - 3 N1型NAの酸性安定性はウイルス増殖を促進する

ホンコン風邪のN2型NAの酸性安定性はウイルス増殖を促進することを報告してきた。そこで、N1型NAの酸性安定性がウイルス増殖に関与するのかどうかを検討した。USSR株N1型NAに435番目のスレオニン残基の欠失と430番目のアルギニンからグルタミンへの変異、455番目のアスパラギンからグリシンへの変異を導入することにより酸性安定性を獲得させた。リバーシジェネティクス法を用いて、H1N1型A/WSN/33株にUSSR株のNA遺伝子とその変異遺伝子を導入し、NAの酸性安定性を改変させたインフルエンザA型ウイルスを作製した。ウイルスをイヌ腎臓MDCK細胞に感染させて寒天培地を重層することにより、ウイルス増殖の様子を視覚的にとらえたフォーカス（感染細胞の集団を免疫染色したもの）の大きさは、酸性安定性を示すNAを有するウイルスにおいて有意に増加していた。また、感染細胞からの子ウイルス感染価を経時的に測定した時も、酸性安定性を示すNAを有するウイルスは有意に高い増殖性（高い子ウイルス感染価）を示した。スペイン風邪N1型NAにおいても見られるシアリダーゼ活性の酸性安定性は、ウイルス増殖を促進する機能があることが判明した。NAの酸性安定性はスペイン風邪の高い増殖性（パンデミックを促進する一つの要因）に寄与する一つの因子であるものと思われる。また、スペイン風邪ウイルスの高い病毒性にも関与しているのかもしれない。

参考文献： Takahashi T, et al. PloS ONE 5, e15556 (2010)

2 スペイン風邪以外のロシア型H1N1ヒトウイルスNAは酸性安定性を示さず、一方一般的な大部分のトリウイルスNAはトリの種類に依存せず酸性安定性を示す

スペイン風邪以外のロシア型H1N1ヒトウイルスNA遺伝子を293T細胞に発現させて、シアリダーゼ活性の酸性安定性を測定した。1933～2009年までに分離されたロシア型11株のNAに顕著な酸性安定性は認められず、エピデミック株のN2型NAと同様にエピデミック株のN1型NAも酸性安定性を示さないことが分かった。H1N1型ヒトウイルスでスペイン風邪NAのみが高い酸性安定性を示す独特な性質を持つことが再認識された。ヒトウイルスのN1型NAは分子系統的に、1918年のスペイン風邪NAの高い酸性安定性は1933年までに消失し、その後、現在のロシア型H1N1ウイルスNAまで受け継がれていた。N2型NAと同様に、N1型NAもヒトでの安定した持続流行（エピデミック）にNAの酸性安定性を消失させた方が都合が良かったものと思われる。

様々な亜型のカモやニワトリなどのトリウイルスNA遺伝子11個の中で10個に高い酸性安定性が見られた。強毒性トリウイルス以外で現在までに調べられてきたすべてのカモウイルスNAに高い酸性安定性が見られることが分かっていた。今回、カモ以外のトリウイルスでも同様な性質が見られることが判明した。カモに代表される水鳥がインフルエンザA型ウイルスの自然宿主と言われている。カモウイルスはカモに経口摂取され、酸性下の砂嚢を経由して腸管で増殖する。大部分のトリウイルス

NAに見られる高い酸性安定性は腸管に感染するための性質として必要であるのかもしれない（例えば、腸管で感染する際にNAの活性が維持されている必要があるなど）。調査した株の中で、七面鳥のウイルス1株のみが酸性安定性を示さなかった。陸鳥のトリウイルスは水鳥ウイルスと異なり呼吸器に感染する。そのため、陸鳥のウイルスにNAの酸性安定性を必要としないヒト様のウイルスNAの性質を示す株が存在することが考えられる。このようなNAはヒトへの伝播に関与するかもしれない。

NAの酸性安定性を5～60分間の経時的に測定した。一般的なトリウイルスは酸性条件下60分後においてもその安定性は顕著に維持されていた。しかしながら、スペイン風邪NAは経時的に酸性安定性が減少していった。スペイン風邪NAは高い酸性安定性を示すものの、酸性処理の経時変化においてはトリウイルスよりも低い安定性を示すことが判明した。スペイン風邪NAの酸性安定性はヒト様ウイルスNAとして適応していく段階にあったものと思われる。

3 プタ由来新型H1N1ウイルスNA

2009年の3月にブタインフルエンザウイルス由来の新型H1N1ウイルスのパンデミックが発生した。新型H1N1ウイルスNA遺伝子は、1979年にトリウイルスがブタへ伝播した時のNA遺伝子に由来している。新型H1N1ウイルスのNAも過去のパンデミック株と同様に酸性安定性を示すことが予想される。そこで新型H1N1ウイルスのNAの酸性安定性を調査することを目的に、NA遺伝子を293T細胞に発現させて、そのシアリダーゼ活性の酸性安定性を測定した。

3 - 1 新型H1N1ウイルスNAは一般的なヒトウイルスよりも高い酸性安定性を示すものがある

アミノ酸配列上で完全な一致が見られない5つの新型H1N1ウイルスNAで酸性安定性を調査した。5つのNAの中で3つのNAにおいて、スペイン風邪NAほどではないが他の一般的なH1N1型ヒトウイルスと比較してやや高い酸性安定性（pH 4.0でやや活性が見られ、pH 5.0で高い活性が見られた）が見られた。新型H1N1ウイルスNAの中には、過去のパンデミックであるスペイン風邪、アジア風邪、ホンコン風邪NAほど顕著に高い酸性安定性を示すわけではないが、明らかに一般的なエピソード株よりも高い酸性安定性を示すものが存在することが判明した。

3 - 2 新型H1N1ウイルスNAの酸性安定性の分子機構（アミノ酸残基の同定）

酸性安定性が異なる新型H1N1ウイルスNAの間でアミノ酸配列を比較すると、106番目と248番目のアミノ酸残基が共通して異なることが分かった。そこで、酸性安定性を示さない新型H1N1ウイルスA/California/04/09株のNAの106番目バリンをイソロイシンへ、248番目アスパラギンをアスパラギン酸へ変異を導入したものを作製した。これら2つの変異を導入した時、やや高い酸性安定性（pH 4.0でやや活性が見られ、pH 5.0で高い活性が見られた）が見られた。248番のアミノ酸残基は酵素活性部位とカルシウムイオン結合部位の近傍に、106番目はサブユニット間の会合部位の近傍に位置していた。N2型NAやスペイン風邪NAと同様に、新型H1N1ウイルスNAにおいても活性部位、カルシウムイオン結合部位、サブユニット間の会合部位の近傍のアミノ酸残基が酸性安定性に大きく影響することが示された。

3 - 3 新型H1N1ウイルスNAの酸性安定性はウイルス増殖を促進する

やや高い酸性安定性を示すように改変した変異NAを導入した新型H1N1ウイルスA/California/04/09株を作製して、酸性安定性を示さない野生型A/California/04/09株の増殖性と比較した。新型H1N1ウイルスをMDCK細胞に感染させて寒天培地を重層し、ウイルスを増殖させた。酸性安定性を示すNAを有するウイルスは、酸性安定性を示さないNAを有するウイルスに比較して有意に大きなブランク（ウイルス感染が周囲の細胞に拡大することによる細胞集団の脱落）やフォーカスを形成した。MDCK細胞へウイルス感染後、経時的に子ウイルス価を測定した時、新型H1N1ウイルスにおいてもN1およびN2型NAと同様に、酸性安定性を示すNAを有するウイルスで有意に高い増殖性が見られた。新型H1N1ウイルスの一部のNAで見られるやや高い酸性安定性がパンデミックの一つの要因として寄与していたものと思われる（論文投稿準備中）。

4 今後

NAの酸性安定性がウイルス増殖を促進する機構はウイルス感染初期過程に存在することが分かっており、その機構の詳細な解明は抗ウイルス薬開発の新規作用部位として利用できる。ウイルス初期感染過程（細胞侵入過程）におけるNAの関与を調べる系の確立を目的に、ウイルス様粒子に検出用の酵素を導入した系（*J. Virol. Meth.* 163, 336-343, 2010）によるウイルスエントリーアッセイの構築を試みたが、ウイルス様粒子が十分に生成できず、さらなる条件検討が必要と思われる。また、NAの酸性安定性が異なるウイルス間で、感染細胞内のシグナルの違いを探索していくことも重要な課題である。近年、N1型NAを有する高病原性H5N1型トリウイルスのヒトへの感染が多く報告されている。その一つの要因としてNAの性状について着目し、高病原性トリウイルスNAが酸性安定性において、トリウイルス様の性状を示すのか、またヒトウイルス様の性状を示すのかを明らかにすることを目的として、そのNAの酸性安定性の調査を実施していきたい。

発表論文（下線は研究代表者）

1. Tadanobu Takahashi, Yuuki Kurebayashi, Kumiko Ikeya, Takashi Mizuno, Keijo Fukushima, Hiroko Kawamoto, Yoshihiro Kawaoka, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki. The Low-pH Stability Discovered in Neuraminidase of 1918 Pandemic Influenza A Virus Enhances Virus Replication. *PLoS ONE* 5, e15556, 2010.

学会発表

1. 高橋忠伸、紅林佑希、池谷久美子、川本浩子、河岡義裕、鈴木康夫、鈴木 隆：パンデミックインフルエンザウイルスに見出されたノイラミニダーゼの機能 日本薬学会第130年会シンポジウム（岡山）プログラム集 p. 86、2010年3月28日（シンポジスト口頭発表）
2. 紅林佑希、高橋忠伸、池谷久美子、河岡義裕、鈴木康夫、鈴木 隆：“スペインかぜ”インフルエンザウイルスN1型ノイラミニダーゼ糖タンパク質のシアリダーゼ活

性のlow-pH安定性を規定する分子機構の解明

日本薬学会第130年会（岡山）、要旨集3 p 83、2010年3月28日（一般口頭発表28SG-pm02）

3. 紅林佑希、高橋忠伸、福島圭穰、河岡義裕、鈴木康夫、鈴木隆：“スペインかぜ”インフルエンザウイルスN1型ノイラミニダーゼのlow-pH安定性とウイルス増殖に及ぼす影響
第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）抄録集 p. 217、2010年11月8日
4. 紅林佑希、高橋忠伸、池谷久美子、水野高嗣、福島圭穰、河岡義裕、鈴木康夫、鈴木隆：“スペインかぜ”インフルエンザウイルスN1型ノイラミニダーゼのlow-pH安定性とウイルス増殖に及ぼす影響
平成22年度日本薬学会東海支部例会（静岡市）講演要旨集p. 104、2010年11月28日
5. Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Kumiko Ikeya, Takashi Mizuno, Keijo Fukushima, Yoshihiro Kawaoka, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki: The Low-pH Stability Discovered in Neuraminidase of 1918 Pandemic Influenza A Virus Enhances Virus Replication.
第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会（神戸）プログラム、p.127、2010年12月7日

メディア報道

1. 鈴木 隆、高橋忠伸：スペイン風邪ウイルス カモインフルとタンパク質類似
静岡新聞（朝刊）（2010年12月9日掲載）
2. 鈴木 隆、高橋忠伸：スペイン風邪ウイルス 増殖高めるタンパク質確認
中日新聞（朝刊）（2010年12月8日掲載）