

インフルエンザウイルス蛋白質の機能的構造変化解析系の構築と変化予測

研究分担者 佐藤裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長）

研究協力者 横山勝（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）

研究要旨

インフルエンザウイルスのサーベイランスとワクチン株選定に役立つ新技術の基盤構築を目的とする。コンピュータのシミュレーション技術を用いて、流行株やワクチン原株の重要な性質変化につながる変異を迅速に予測する方法を研究する。初年度は、研究代表者らと共同で、ワクチン株製造過程で生じる赤血球凝集素（HA）蛋白質の抗原性変化を解析した。赤血球凝集抑制（HI）反応試験により、2009年A香港型（H3N2）とB型のワクチン株のHAは、ワクチン原株のHAと抗原性が異なることが示唆された。HA遺伝子の配列比較により、ワクチン株HAに生じたアミノ酸変化を特定した。ホモロジーモデリング法により、原株とワクチン株HAの分子構造モデルを構築し、比較した。A/H3N2型とB型のいずれも、ワクチン株HAの感染受容体結合ポケット周辺、すなわち主要中和エピトープ領域に変化が生じていた。A/H3N2型では2カ所のアミノ酸置換によるポケット近傍の形状や生化学的性質の変化、B型では糖鎖の欠落によるポケット近傍の立体障害の消失が予測された。2009年A香港型とB型のワクチン原株は、鶏卵培養での馴化の過程で受容体結合ポケット周辺の変異を獲得して抗原性が変化するリスクがあることがわかった。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスのHA蛋白質は、ウイルスの感染に必須の構造蛋白質である。中和抗体の標的で、ワクチンの主要成分となる。HAに生じる変異の種類や位置によっては抗原性や抗体感受性が変化し、ワクチンの有効性が低下しうる。さらには、ウイルスの感染受容体指向性が変化することで細胞指向性や宿主指向性が変化し、高病原性のウイルスが発生しうる。このため、HAの性質変化をもたらす変異を把握することは、ウイルスのサーベイランスとワクチン株選定を効果的に実施する際に極めて重要となる。

未報告の変異が検出されても、その生物学的影響を迅速に把握することは難しい。HAの構造解析情報は、HAの性質変化を理解するための重要な手がかりを与える。しかし、実験による構造解析は、長期間を要する。このため、サーベイランスとワクチン株選定を効果的に進める際に不可欠な迅速性を欠く。

我々は、迅速性の観点から、コンピュータを用いたシミュレーション技術に着目した。この技術は、既に工学や物理化学の分野では、研究を効果的に進めるために不可欠となっている。この技術を生命科学に応用できれば、解析の迅速性が達成できる。そこで本研究で

は、コンピュータのシミュレーションデータと実験データを組み合わせ、ウイルスの性質変化をもたらす変異を迅速に予測する方法を研究する。

B. 研究方法

HA の性質変化をもたらす変異を迅速に予測するには、HA の構造・機能・進化の統合的な解析が必要と考えられる。そこで本研究では、以下の情報生物学、分子進化学、*in silico* 構造解析の手法を組み合わせ解析する。班員の解析データと照合しながら、予測の検証や解析法の改良を進める。

(1) HA の変異の解析

- ・進化系統：近隣接合法など
- ・多様性：エントロピー解析
- ・正の選択圧：同義・非同義置換の解析
- ・共変異：相互情報量解析

(2) HA の構造・機能・進化解析

- ・変異 HA の立体構造：ホモロジーモデリング法
- ・HA の機能解析：分子動力学法
- ・HA の相互作用表面：1D3D プロファイリング比較解析法（産総研生命情報工学研究センターの藤博幸博士との共同で進める）

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

(1) 2009年A香港型 (H3N2) およびB型ワクチン株のHAの抗原性変化

2009年のA香港型 (H3N2) ワクチン原株 (A/Victoria/210/2009 E2/E1) で誘導される抗体は、直近のA香港型流行株の赤血球凝集反応を阻害した。同様に、2009年のB型ワクチン原株 (B/Brisbane/60 MDCKx/1) で誘導される抗体は、直近のB型流行株の赤血球凝集反応を阻害した。しかし、孵化鶏卵での増殖能の優れたワクチン株 (A香港型：A/Victoria/210/2009

(X-187) Ex/E2、B型：B/Brisbane/60 E4/E4) で誘導される抗体は、共に流行株の赤血球凝集阻害効果が低下していた。これらの結果から、2009年A香港型とB型ワクチン株は、ワクチン原株とは抗原性が異なることが示唆された。

(2) A香港型ワクチン株HAの変化 (図1)

原株とワクチン株のHA遺伝子の配列比較により、ワクチン株に特徴的な変化が2カ所認められた。1つは228番目のアミノ酸で、セリンがスレオニンに置換していた (S228T)。他の1つは156番目のアミノ酸の変化で、原株ではアスパラギンとヒスチジンが混在していたが (N/H156)、ワクチン株ではヒスチジンのみが検出された (H156)。

H3N2型HAの結晶構造情報を基に、ホモロジーモデリング法により2009年のA香港型ワクチン原株とワクチン株のHAの分子モデルを構築した。ワクチン株で見出された2種類の変異は、共に感染受容体結合部位の周辺に位置することがわかった。

(2) B型ワクチン株HAの変化 (図2)

原株とワクチン株のHA遺伝子の配列比較により、ワクチン株に特徴的な変化が1カ所認められた。すなわち、ワクチン株HAでは、アスパラギン酸型の糖鎖付加部位 (197-199) の197番目のアミノ酸が、アスパラギンからセリンに変異していた (N197S)。B型HAの結晶構造情報を基に、ホモロジーモデリング法により2009年の原株とワクチン株のHAの分子モデルを構築した。その結果、糖鎖付加部位は、HAの感染受容体結合ポケット周辺部に位置することがわかった。

D. 考察

(1) インフルエンザワクチン株 HA 変異の構造生物学的意義

現行のワクチン製造では、ワクチン抗原の安定供給のために孵化鶏卵での増殖能の優れた株を選ぶ。このため、鶏卵培養の過程で、鶏卵細胞での感染・増殖能に優れた変異株がワク

チン株として選択される可能性がある。HA 配列と構造の解析により、2009 年の A 香港型 (H3N2) と B 型のワクチン原株は、いずれも、HA の結合ポケット周辺に特徴的な変異を獲得していることがわかった。A 香港型ワクチン株 HA の 2 つの変異 (N156H と S228T) は、HA の結合ポケット近傍の側鎖の変化につながり、結合ポケットの形状や生化学的性質が変わる。一方、B 型ワクチン株 HA の変異 (N197S) は、HA の結合ポケット近傍の糖鎖の消失につながり、結合ポケットの露出度を高める。これらの変異は、共に鶏卵細胞の感染受容体への親和性を高める効果をもつ可能性が高い。

これらの変異は、同時に HA の抗原性の変化につながりうる。HA の結合ポケット周辺は、受容体相互作用表面の構造形成に関わる。ウイルスの感染性発現に必須の役割を果たすため、中和抗体の標的となる。抗原性も高く、実際、結合ポケット周辺領域は、主要中和エピトープとして報告されている。今回見出された変異は、全て結合ポケット周辺に位置していた。このため、受容体結合表面の構造が変化し、抗原性が変わった可能性が高い。

(2) 鶏卵培養によるワクチン原株 HA の抗原性変化のしくみ

これらの結果から、鶏卵培養による HA の抗原性変化に関して次のシナリオが推察される。2009 年のヒト由来ワクチン原株を鶏卵で継代する間に、HA 結合ポケット周辺に変異をもち、鶏卵細胞の感染受容体への親和性が高まった鶏卵高増殖性ウイルス (ワクチン株) が優先的に増殖して原株と入れ替わった。この株の HA は、変異により結合ポケットの周辺構造と生化学的性質が変化しており、中和エピトープ領域の免疫原性が原株と異なる。このため、ワクチン株で誘導される抗体は、流行株の感染抑制効果が低い可能性がある。

(3) 課題

今回見出された変異により、鶏卵細胞の感

染受容体への親和性が高まるかどうかの確認は今後の課題として残された。ヒトやトリの感染受容体の糖鎖部分を結合基質として用いた結合シミュレーションで基質特異性の変化を予測し、実験で検証する予定でいる。

ワクチン原株の鶏卵培養による抗原性の変化は、ワクチンの有効性の低下に繋がる。今後のワクチン株選定においては、鶏卵培養や細胞培養によるワクチン原株の抗原性変化のリスクを事前に知ることが極めて重要になる。

E. 結論

ワクチン株製造過程で生じる HA 蛋白質の変化を構造レベルで解析した。2009 年の A 香港型と B 型のワクチン原株の HA は、鶏卵での馴化の過程で受容体結合ポケット周辺の変異を獲得して抗原性が変化するリスクがあることがわかった。今後のワクチン株選定においては、鶏卵培養や細胞培養によるワクチン原株の抗原性変化のリスクを事前に検討することが極めて重要になる。一方、サーベイランスにおいても、流行株の抗原性や病原性変化につながる HA の変異の種類を迅速に把握することが重要となる。そこで次年度以降は、研究班で収集した国内流行株やワクチン原株の HA 配列情報等を基に、構造情報を取り入れて、流行株やワクチン原株 HA の変化の方向性を解析する予定でいる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1. 高下 恵美、江島 美穂、藤崎 誠一郎、金 南希、岸田 典子、徐 紅、菅原 裕美、伊東 玲子、土井 輝子、本村 和嗣、佐藤 彩、佐藤 裕徳、氏家 誠、小渕 正次、田代 真人、小田切 孝人、全国 地方衛生研究所：2009/10シーズンにおける抗インフルエンザ薬剤耐性pandemic A/H1N1 株の検出と新規薬剤ペラミビルに対する交叉耐性。第

58回日本ウイルス学会学術集会。2010年11月7-9日(日・火)、東京。

2. 岸田 典子、徐 紅、高下 恵美、藤崎 誠一郎、菅原 裕美、伊東 玲子、土井 輝子、江島 美穂、金 南希、本村 和嗣、佐藤 彩、佐藤 裕徳、網 康至、須崎 百合子、小口 晃央、山崎 秀司、藤田 信之、小淵 正次、氏家 誠、田代 真人、小田切 孝人、全国地方衛生研究所：2009/10シーズンのイン

フルエンザ流行株と平成22年度のワクチン株。第58回日本ウイルス学会学術集会。2010年11月7-9日(日・火)、東京。

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

図1. A/H3N2ワクチン原株とワクチン株のHA蛋白質の分子モデル

ホモロジーモデリング法により構築

● Mixture of 156N and 156H

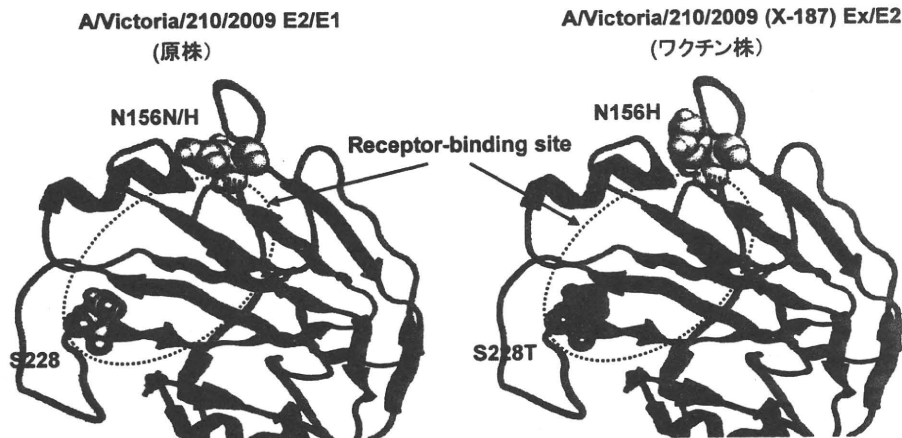
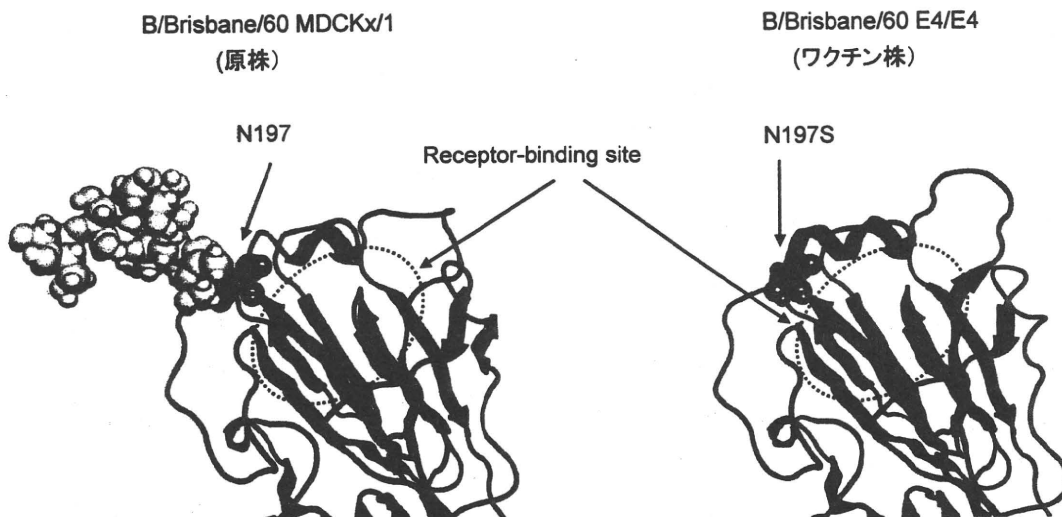


図2. B ワクチン原株とワクチン株のHA蛋白質の分子モデル

ホモロジーモデリング法により構築

● N-linked glycan



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍	なし
雑誌	なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneeda Y, Shirabe K, Ichiyama T.	Characteristics of pandemic H1N1 influenza viral infection in atopic individuals - Pandemic H1N1 influenza reveals "occult" asthma	Pediatric Allergy and Immunology			(印刷中)
Hasegawa, S., Matsushige, T., Inoue, H., Shirabe, K., Fukano, R., Ichiyama, T.	Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy	Cytokine			(印刷中)
駒込理佳、井上真紀、長野秀樹、工藤伸一、岡野素彦	北海道におけるパンデミック (H1N1) 2009 インフルエンザについて - 2009/10シーズン -	北海道立衛生研究所報	60	57-60	2010年
喜屋武向子、平良勝也ほか13名.	2009/10シーズン夏季のインフルエンザ検出状況 - 沖縄県.	病原微生物検出情報	31(10)	297	2010年
安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、藤浦明、皆川洋子	小学校集団発生から分離されたB型インフルエンザウイルス (Victoria系統) - 愛知県	病原微生物検出情報	31(6)	173	2010年
川上千春 百木智子 七種美和子 宇宿秀三 野口有三 池淵 守	B型インフルエンザウイルス (Victoria系統) の局地的流行 - 横浜市	病原微生物検出情報	32(2)	47	2011年
Matsuzaki Y, Mizuta K, Takashita E, Okamoto M, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Nagai Y, Nishimura H.	Comparison of virus isolation using the Vero E6 cell line with real-time RT-PCR assay for the detection of human metapneumovirus.	BMC Infect.Dis.	10	170	2010

Shiino T, Okabe N, Yasui Y, Sunagawa T, Ujike M, Obuchi M, Kishida N, Xu H, Takashita E, Anraku A, Ito R, Doi T, Ejima M, Sugawara H, Horikawa H, Yamazaki S, Kato Y, Oguchi A, Fujita N, Odagiri T, Tashiro M, Watanabe H.	Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm, May-September, 2009: temporal and spatial spreading profile of the viruses in Japan.	PLoS One	5	e11057	2010
Okamoto M, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Hongo S, Nishimura H, Matsuzaki Y.	Longitudinal course of human metapneumovirus antibody titers and reinfection in healthy adults.	J.Med.Virol.	82	2092-2096	2010
高下恵美	インフルエンザワクチンの検定について	インフルエンザ	11	276-280	2010
Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S.	Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle.	J.Virol.	85	1322-1329	2011
Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kagayama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, N., Tashiro, M., Odagiri, T. and the Working Group for Influenza Virus Surveillance in Japan	Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) during 2007-2009 influenza seasons, Japan.	Emerg. Infect. Dis.	16	926-935	2010
Shiino, T., Okabe, N., Yasui, Y., Sunagawa, T., Ujike, M., Obuchi, M., Kishida, N., Xu, H., Takashita, E., Anraku, A., Ito, R., Doi, T., Ejima, M., Sugawara, H., Horikawa, H., Yamazaki, S., Kato, Y., Oguchi, A., Fujita, N., Odagiri, T., Tashiro, M. and Watanabe, H.	Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm, May-September, 2009: temporal and spatial spreading profile of the viruses in Japan.	PloS One	10	e11057	2010

<p>Ujike, M., Ejima, M., Anraku, A., Shimabukuro, K., Obuchi, M., Kishida, N., Hong, X., Takashita, E., Fujisaki, S., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Oguchi, A., Fujita, N., Tashiro, M., Odagiri, T. and the Influenza Virus Surveillance Group in Japan</p>	<p>Monitoring and characterization of Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009-1010.</p>	<p>Emerg. Infect. Dis.</p>	<p>in press (DOI: 10.3201/eid1703.101188)</p>	<p>2011</p>
---	---	----------------------------	---	-------------

