

## 動物由来インフルエンザウイルスのレセプター結合特異性及び次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析に関する研究

研究分担者 白倉 雅之

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

### 研究要旨

現在、主に東南アジアや中近東では高い致死率を伴う高病原性鳥インフルエンザ A (H5N1) ウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。さらに、2013 年に発生した鳥インフルエンザ A (H7N9) ウイルスは、季節に応じて発生と消失を繰り返している。このような背景から、迅速かつ的確にウイルスの詳細な性状解析を実施し、ヒトへの感染リスク評価を実施することは、重要な意義を持つと考えられる。本研究では、動物由来インフルエンザウイルスのリスク評価のため、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。その結果、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析の有用性を示すことが出来た。

### A. 研究目的

現在、主に東南アジアや中近東では高い致死率を伴う高病原性鳥インフルエンザ A (H5N1) ウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。世界保健機関 (WHO) の報告によれば、2017 年 9 月 27 日現在、16 カ国で、860 例の感染者数が確認され、そのうち 454 名が死亡している。さらに、2013 年 3 月に中国で発生した鳥インフルエンザ A (H7N9) ウイルスは、中国さらに他の周辺諸国に拡大している。WHO の報告では、2018 年 3 月 2 日現在、1567 例の感染者数が確認され、そのうち 615 名の死亡例が報告されている。また、鳥インフルエンザ A (H5N6) ウイルスが我が国をはじめ、中国、台湾、韓国などのアジア諸国、またヨーロッパにまで拡大している。これらのウイルスがヒトからヒトへ容易に伝播可能なウイルスに変異し、新型インフルエンザの出現が危惧されている。

インフルエンザウイルスは、HA 蛋白を使って宿主細胞に感染することが可能である。

主細胞表面のレセプターに結合して感染を開始する。HA 蛋白とレセプター分子との結合特異性は、ヒトへの感染リスク評価のため、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を実施した。動物由来インフルエンザウイルスの HA 蛋白はシ

アル酸がガラクトースに  $\alpha 2, 6$  結合した糖鎖 (Neu5Ac  $\alpha 2, 6$ Gal : ヒト型レセプター) を、鳥から分離されたインフルエンザウイルスの HA 蛋白はシアル酸がガラクトースに  $\alpha 2, 3$  結合した糖鎖 (Neu5Ac  $\alpha 2, 3$ Gal : 鳥型レセプター) を、特異的に認識する。それらの HA 蛋白のレセプター認識特異性と一致して、ヒトの上気道ではヒト型レセプターが、鳥ウイルスの主な増殖部位である腸管では鳥型レセプターが、豊富に発現している。このように、HA 蛋白のレセプター認識特異性と宿主が発現するレセプターの種類との相関がインフルエンザウイルスの宿主域を規定していると考えられている。従って、鳥インフルエンザウイルスがヒト上気道細胞に効率良く感染するためには、その HA 蛋白のレセプター特異性が鳥型からヒト型へ変換する必要がある。このようなヒトへの適応変異を早期に検出することが、パンデミック対策の上でも非常に重要となる。また、このような適応変異の起因となり得る既知の遺伝子マーカーを検出することにより、迅速

## B. 研究方法

1) ウイルス:A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)、A/Taiwan/1/2017 (H7N9)を使用した。これらのウイルスを発育鶏卵を用いて増殖させ、七面鳥赤血球 (TRBC) を用いて赤血球凝集 (HA) 価を測定し、ストックした。

2) 全ゲノム解析: ウイルス全ゲノム解析は、次世代シーケンサーを使用して行った。ウイルス培養液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を Multi-segment RT-PCR により増幅後、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) を使用して DNA ライブラリーを調製後、MiSeq (Illumina) にて解析した。得られた塩基配列は、CLC Genomics Workbench を使用して、リファレンス配列との Assemble を行い、コンセンサス配列の作成と変異解析を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果

Multi-segment RT-PCR による増幅後、ウイルス株 A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) 及び A/Taiwan/1/2017 (H7N9) の全ゲノム解析を行った結果、迅速かつ正確にウイルス株の全ゲノムを解析することが出来た。

## D. 考察

次世代シーケンサーによるウイルスの全ゲノム解析を行うためには、ある程度の量のウイルス RNA 量が必要となる。一般的に、継代を行った分離株を用いた解析は可能だが微量サンプルの場合、困難となる場合がある。従って、今回、Multi-segment RT-PCR による増幅法を用いた実験方法の改良によって微量サンプルでも解析が可能であることが示唆された。

## E. 結論

本研究により、動物由来インフルエンザウイルスのヒトへの感染リスク評価実験のひとつとして、次世代シーケンサーを用いたウイルス全ゲノム

解析が可能となった。今後は、次世代シーケンサーを主に使用した動物由来インフルエンザウイルスの全遺伝子解析に応用可能であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015. *Influenza Other Respir Viruses*. 11(5) 399-403 2017
- Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H. Molecular Dynamics Simulation of the Influenza A(H3N2) Hemagglutinin Trimer Reveals the Structural Basis for Adaptive Evolution of the Recent Epidemic Clade 3C.2a. *Front Microbiol*. 8 584 2017
- Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from a Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell Host Microbe*. 22(5) 615-26 2017
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted

influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. (In press)

#### H. 健康危険情報

該当なし

#### 2. 学会発表

- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Yokoyama M, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. Growth capabilities of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir. 6th ESWI Influenza Conference (Riga, Latvia) 2017.9.
- Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Watanabe K, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/2017 season and vaccine viruses for the 2017/18 season. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Kuwahara T, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Takashita E, Takahashi H, Kishida N, Sato A, Ogawa R, Miura H, Akimoto M, Sugawara H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Characterizations of cell-derived and egg-passaged A/Saitama/103/2014 virus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし