

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、レセプター結合特異性実験及び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、合成シアロ糖鎖ポリマーを用いたレセプター結合特異性実験、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、ウイルスが分離された宿主動物によって異なる。ヒトの季節性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。

本研究では、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のため、合成シアロ糖鎖ポリマーを使用してレセプター結合特異性実験とその改良を試みた。さらに、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を実施した。

B. 研究方法

1) ウイルス：中国 CDC より分与された A/Anhui/1/2013 (H7N9)、A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)、台湾 CDC より分与された A/Taiwan/1/2014 (H7N9)、A/Taiwan/1/2017 (H7N9)を使用した。比較対照ウイルス株として、NIBRG-14 (A/Vietnam/1194/2004: H5N1)、A/California/4/2009 (H1N1pdm09)、A/Narita/1/2009 (H1N1pdm09)を使用した。これらのウイルスを発育鶏卵あるいは MDCK 細胞を用いて増殖させ、ニワトリ赤血球 (CRBC) を用いて赤血球凝集 (HA) 価を測定し、ストックした。

2) 遺伝子解析：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 は、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs)、あるいは、Multi-segment RT-PCR により増幅後、NEBNext Ultra RNA 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。

3) レセプター結合特異性実験： $\alpha 2, 3$ または $\alpha 2, 6$ 結合した 2 種類の合成シアロ糖鎖ポリマー (Neu5Ac $\alpha 2$ -3Gal $\beta 1$ -4GlcNAc $\beta 1$ -pAP- α -PGA、Neu5Ac $\alpha 2$ -6Gal $\beta 1$ -4GlcNAc $\beta 1$ -pAP- α -PGA：中部大学 生命健康科学部 鈴木康夫教授

より分与) を用いた Solid-phase binding assay を行った。上記、合成シアロ糖鎖ポリマーを各々、96 well plate にコーティング後、ウイルス培養液 (HA 価 32-64) を吸着させ、抗インフルエンザウイルス NP 抗体を使用した ELISA 法により結合ウイルスを検出した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

比較対照ウイルスとして用いた A/California/4/2009 (H1N1pdm09)、A/Narita/1/2009 (H1N1pdm09) は、ヒト型レセプターである $\alpha 2, 6$ 結合した糖鎖のみに結合性を示した。一方、NIBRG-14 (A/Vietnam/1194/2004: H5N1) は、鳥型レセプターである $\alpha 2, 3$ 結合した糖鎖のみに結合性を示した。この結果は、既に論文等で報告されている結果と一致し、本実験の信頼性が示された。

次に、2013 年、2014 年にヒトから分離された A (H7N9) ウイルスを用いて実験を行った。A/Anhui/1/2013 (H7N9)、A/Taiwan/1/2014 (H7N9) の 2 つのウイルスは、鳥型レセプターである $\alpha 2, 3$ 結合した糖鎖のみならず、ヒト型レセプターである $\alpha 2, 6$ 結合した糖鎖にも結合性を示した。

また、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

今回、解析に用いた A (H7N9) ウイルスの 2 株は、遺伝子解析の結果、HA 遺伝子にヒト型レセプターに親和性を示すアミノ酸変異である Q226L (H3 numbering) を有していた。さらに、Q226L に加えてヒト型レセプターへの結合能を高める別の変異 (G186V: H3 numbering) をも有

していた。しかしながら、レセプター結合特異性実験の結果から、依然として、鳥型レセプターに対して強い結合性を示した。このことは、このウイルスがヒト型レセプターに優先的に結合するためには、これらのアミノ酸変異に加えて、レセプター結合特異性を変換させる別の変異が必要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のための方法の一つとして、ウイルスのレセプター結合特異性を簡便に調べることが可能となった。さらに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、主に鳥インフルエンザウイルスを中心とした動物由来インフルエンザウイルスの遺伝子解析、抗原性解析に加え、レセプター結合特異性を加えた継続的なサーベイランスの実施が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of a large cluster (outbreak) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 59(5), 2607-17, 2015
- Aina A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro M, Asanuma H, Host adaptation and the alteration of viral properties of the first influenza A/H1N1pdm09 virus isolated in Japan., *PLoS ONE*, 10(6), e0130208, 2015
- Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E., Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain., *Vaccine*, 34(3), 328-33, 2016
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69(1), 83-6, 2016
- Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Kishida N, Shirakura M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T., Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets., *Vet. Microbiol.*, 183, 30-36, 2016
- Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T., Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014., *Emerging Infectious Diseases.*, 22(3), 557-9, 2016
- Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T., Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014., *Emerging Infectious Diseases.*, 22(3), 557-9, 2016
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T,

- Shimazu Y, Shimomura T, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir due to a dual H275Y/G147R substitution, Japan, March 2016., *Euro surveill.*, 21(24), 2016
- 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
 - 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
 - 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)
- ## 2. 学会発表
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T; The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season. 第63回日本ウイルス学会. 2015年11月. 福岡.
 - 高下恵美, 小川理恵, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 白倉雅之, 岸田典子, 桑原朋子, 菅原裕美, 佐藤彩, 三浦秀佳, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況. 第47回日本小児感染症学会. 2015年10月. 福島.
 - Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013-2014 Influenza Season in Japan. 4th isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2015. Texas, USA.

- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2015/2016 season and vaccine viruses for the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
- 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 (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 (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 (大阪) 2017年10月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし