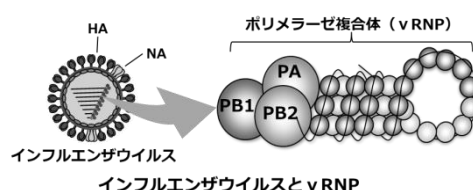


鳥インフルエンザウイルスの宿主適応メカニズムの解明

京都府立医科大学 医学研究科 博士研究員
荒井 泰葉

【背景と目的】

インフルエンザウイルスは歴史的に数十年単位で世界的な大流行(パンデミック)を繰り返している。全てのパンデミックウイルスは元来、鳥インフルエンザウイルスを起源としている。鳥インフルエンザウイルスによる宿主域の障壁突破は、鳥インフルエンザウイルスとヒト宿主間の不適合性により制限されているが、表面蛋白質(HA)によるヒト型レセプター親和性能の獲得やヒト細胞における効率的なウイルス複製能の獲得などにより、ヒトに感染し易いウイルスへ変化することが知られている(Rogers *et al.*, Nature 1983)。インフルエンザウイルスは4つのウイルス蛋白質(PB2, PB1, PA 及び NP)からなるポリメラーゼ複合体とウイルス RNA から構成される最小複製単位の vRNP を保有する(右図)。このうち PB2 蛋白質における E627K 変異(627番目のアミノ酸残基がグルタミン酸からリシンに変化)は、鳥インフルエンザウイルスがヒト感染に際して高頻度に獲得する代表的なヒト適応化マーカーである。多くのパンデミックウイルスは当該領域に 627K を保有している。また、鳥インフルエンザウイルスは PB2-E627K を獲得することで、ヒト細胞内でのウイルス複製能を顕著に高めると報告されている (Hatta *et al.*, Science 2001)。アジア地域では、H5N1 ウイルス感染患者体内において散発的に PB2-E627K が選択されていたと報告がある。



H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス(以下 H5N1 ウイルス)は、濃厚接触によってトリからヒトに伝播して重篤な呼吸器疾患と極めて高い致死率(約60%)を引き起こすことから、公衆衛生上の重要な懸案事項である。現在 H5N1 ウイルスは、アジアと中近東において広範な流行域を獲得しており、当該地域において多くのヒト感染例が継続的に報告されている。興味深いことに、H5N1 アジア流行株とは異なり、エジプトで蔓延する H5N1 ウイルス(clade 2.2 ウイルス)は代表的なヒト適応変異である PB2-627K を鳥類間での伝播の過程で獲得している特徴がある。また近年、エジプトは全世界の H5N1 ウイルスによるヒト感染例の 67% が報告されている特異な地域であり、同地域から H5N1 由来パンデミックが発生する潜在性が高いと指摘されている。これまで申請者は、エジプトで流行する H5N1 ウイルスが感染患者内で獲得したポリメラーゼ領域の変異に着目し、変異がポリメラーゼ活性やヒト呼吸器細胞内でのウイルス複製に与える効果を多角的に評価することで、新規のヒト適応変異を複数同定してきた経緯がある(Arai *et al.*, PLoS Pathog 2016)。当該変異群は、PB2-627K と協調的に働くことでヒト呼吸器細胞とマウス肺中でのウイルス複製能をさらに高めたことから、clade 2.2 ウイルスが徐々にヒト適応性を獲得していることを示唆した。

本研究では、H5N1 アジア流行株とは対照的にエジプトの clade 2.2 ウイルスが鳥宿主において PB2-627K を維持する特徴的な進化動態に着目し、clade 2.2 ウイルスが鳥宿主内で PB2-627K を維持する分子機序を解明することを切り口に鳥インフルエンザウイルスの宿主適応メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【研究成果】

・相補変異による PB2-627K 変異維持への効果評価

まず、clade 2.2 ウイルスが進化発生の過程において、鳥個体内で PB2-627K を維持するために必要な相補変異を獲得している可能性を考慮し解析を実施した。具体的には、H5N1 ウイルスが初めて確認された 1996 年から 2011 年までに分離された全ての H5N1 ウイルスの内部遺伝子配列を網羅的にマセゲノム解析した。さらに clade 2.2 ウイルスが独自に系統発生する際に PB2-627K と同時に獲得した変異群を探索することで、合計 22 種類の相補変異を同定した。リバーシジェネティクス法によって、これらの変異を back mutation として導入した組み換え clade 2.2 ウイルスを作成した。当該ウイルスを鳥細胞に感染させ、ウイルス力価ピーク時の培養上清を回収して新しい細胞に感染させるウイルス継代を 30 回実施した。各継代時の培養上清からウイルス RNA を抽出して PB2 領域の遺伝子解析を実施し、PB2-627 位のアミノ酸種の変化を確認した。同定した変異群の中に鳥宿主における PB2-627K の維持に必要な相補変異が含まれる場合、back mutation させた変異ウイルスは、鳥細胞での継代過程において PB2-627K を維持できないため、PB2-K627E または異なる相補変異を獲得すると予想された。しかしながら、30 回継代後、全ての変異ウイルスにおいて PB2-K627E を検出できなかった。これらの知見は、clade 2.2 ウイルスが系統発生に同期して PB2-627K と共に獲得した変異は、少なくとも単変異としては野外での PB2-627K 維持に関与しないことを示唆した。即ち、PB2-627K を鳥で例外的に維持する

clade2.2 ウイルスとPB2-627E を鳥で永続的に維持するアジア流行ウイルスの間の相違は、より複雑な遺伝的背景の違いによって生み出されている可能性が推察された。以上の結果を踏まえ、次に、両ウイルスが鳥細胞での複製において相互作用または利用する遺伝子制御機構や細胞機能の差異を検知することを切り口として、関連する分子機序を明らかにすることを試みた。

・ウイルスポリメラーゼ蛋白質に直接結合することで相互作用する因子の探索

リバースジェネティクス法によって、PB2 タンパク質に Flag-tag を付加しても複製能が阻害されない clade2.2 ウイルス(PB2-627K)とアジア流行ウイルス(PB2-627E)を作出した。同様に、Flag-tag を付加した clade2.2 変異体(PB2-K627E)及びアジア流行変異体(PB2-E627K)を作出して解析対象に加えた。当該ウイルスを鳥細胞に感染させ、感染細胞のライセートに対して抗 Tag 抗体による免疫沈降を実施し、SDS-PAGE 後に銀染色することでポリメラーゼ複合体に結合する細胞因子群を検出した。その結果、Clade2.2 ウイルス(PB2-627K)とアジア流行ウイルス(PB2-627E)間で異なるバンドパターンが確認された。さらに、clade2.2 ウイルス(PB2-627K)と clade2.2 変異体(PB2-627E)間、及びアジア流行ウイルス(PB2-627E)とアジア流行変異体(PB2-627K)間においても、異なるバンドパターンが確認された。以上の結果は、各ウイルスが鳥細胞内で異なる細胞因子群と相互作用または利用を介して複製している可能性に加えて、PB2-627 位の変異が宿主因子群との相互作用を規定している可能性を示唆した。さらに、差異の見られたバンド群(宿主因子群)に対して質量解析を実施することで、野生型ウイルスでは結合可能であるが変異ウイルスとしては結合性が顕著に低下する宿主因子が幾つか検出された。現在、これらの宿主因子群とウイルス蛋白質との結合ドメイン探索を推進している状況にある。

・鳥体内での新型ウイルス出現予測及びヒトへの病原性解析

エジプトでは現在、PB2-627K を特徴的に保持する H5N1 ウイルス(clade 2.2)に加えて、H9N2 亜型鳥インフルエンザウイルス(以下 H9N2 ウイルス)が家禽で検出されている。同地域では、H9N2 ウイルスによるヒト感染例も報告されており、同時流行する両ウイルスが遺伝子交雑(リアソータント)することで新型ウイルスとなる可能性が指摘されている。そこで、H5N1 ウイルスと H9N2 ウイルス間の遺伝子互換性と交雑ウイルスの病原性を先駆的に評価する目的で、H5N1 ウイルスと H9N2 ウイルスの内部遺伝子(6 遺伝子分節)をリバースジェネティクス法によって人工的に交雑させたウイルスを合計 63(2^6-1)種類作出してウイルス複製能を解析した。その結果、全ての交雑ウイルスが一定の複製能を保持すると共に、幾つかの交雑ウイルスは両ウイルス親株と比較して、ヒト細胞においてより高いウイルス複製能とより高いマウス病原性を示した。以上の結果は、現在エジプトで同時流行する H5N1 ウイルスと H9N2 ウイルスが遺伝子交雑した場合、交雑ウイルスがヒトを含む哺乳類に高いウイルス複製能と病原性を獲得することで、社会公衆衛生に対して重大なリスクとなる可能性を提起した。エジプトにおける H5N1-H9N2 交雑ウイルス出現の高い潜在性とその防疫監視の重要性を強調した本研究成果を 2018 年 6 月にイタリアで開催された Negative Strand Virus meeting において報告した。また、同成果は 2019 年 1 月に米国専門誌に掲載された(参考文献: Arai *et al.*, J Virol 2019)。当該研究は、エジプトダマンフル大学獣医学部との国際共同研究であり、鳥インフルエンザに対する現地調査に参加することで、同国におけるパンデミックウイルス出現の監視を継続して推進している。



現地研究機関での実験の様子(左)及び共同研究者との集合写真(右)

・アジア流行 H5N1 ウイルスの変異獲得によるヒト適応性獲得機構評価

中東地域に加えて、東南アジアは H5N1 ウイルスによるヒト感染例が断続的に報告されている地域である。本研究では、中東域と並んで H5N1 ウイルス進化の hot-spot である東南アジアで流行する H5N1 ウイルスがヒト感染患者内で獲得した変異を網羅的に探索することで、過去に報告されていない新規のヒト適応性変異群を同定した。多くの変異は、PB2-627ドメインの近傍に位置しており、東南アジアで流行する H5N1 ウイルスは、PB2-627K 変異に加えて当該ドメインにおける変異を獲得することでヒト適応性を獲得する傾向にあることが示された。当該変異群は、エジプトに特異的な clade2.2 ウイルスがヒト感染患者内で獲得する変異群(Arai *et al.*, PLoS Pathog 2016)が位置するドメインと異なる領域に属することから、概に PB2-627K を保有する clade2.2 ウイルスと PB2-627E を保有するアジア流行ウイルスは、それぞれ異なるヒト適応進化を遂げる可能性が示唆された。これらの研究成果は、2018 年 8 月に英国科学誌に掲載された(参考文献: Arai *et al.*, Sci Rep 2018)。当該研究は、長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点およびベトナム国立衛生疫学研究所との国際共同研究である。

最後に、本研究にご支援を賜りました公益財団法人日本科学協会に深く感謝致します。