

パンデミックインフルエンザウイルス NA の酸性安定性と ウイルス増殖に及ぼす影響

静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士後期課程 2 年 紅林佑希

インフルエンザウイルスは数十年に一度、世界規模の大流行を引き起こし、社会的、経済的に多大な被害を与えてきた。特に、1918 年に発生したスペインかぜ (H1N1 型) は、人類史上最大の被害を与えた世界規模の大流行 (パンデミック) インフルエンザウイルスとして知られている。このウイルスの性質を調査することは、パンデミックウイルスの高い病原性や感染性の機構を理解する上で重要である。

本研究ではスペインかぜインフルエンザウイルスの N1 亜型ノイラミニダーゼ (NA) に注目した。NA はホモ四量体構造のウイルス表面糖タンパク質で、細胞膜表面や糖タンパク質上に存在する糖鎖のシアル酸を脱離させる酵素である。この酵素活性は、ウイルスの結合受容体であるシアル酸を脱離させて感染細胞表面からの新生ウイルスの遊離を促進させる。そのため、インフルエンザウイルスの NA の至適 pH は一般的に pH 6 付近の中性領域にある。過去の報告よりスペインかぜの NA が病原性の増大に寄与することを示唆するデータがいくつか示されているが、その分子機構は未だ明らかになっていない。本研究では、スペインかぜ NA がウイルスの増殖性や病原性にどのように寄与するのかを明らかにすることを目的とした。

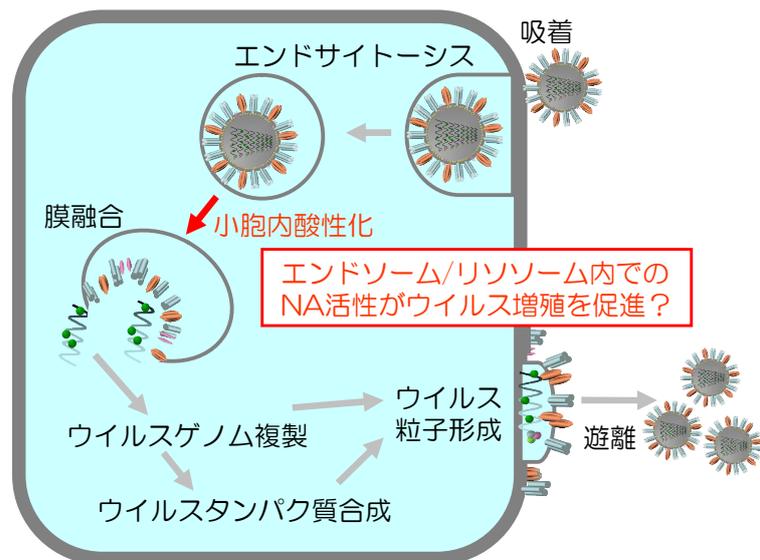
過去のパンデミックウイルスの NA は通常季節性 (エピデミック) ウイルスと異なり pH 4~5 の酸性条件下でも高い酵素活性を維持する特徴的な性質を有している。この性質を「NA の酸性安定性」と呼んでいる。本研究で、スペインかぜの NA もこの酸性安定性を有することが判明した。スペインかぜの NA の酸性安定性を決定するアミノ酸残基を同定するため、酸性安定性を示したスペインかぜの NA と安定性を示さなかったウイルス (A/USSR/92/1977 H1N1 株) の NA の間でキメラ NA を作製し、酸性安定性を決定するアミノ酸配列の領域 (426~457 番、以降 USSR 株 NA のアミノ酸番号) を絞り込んだ。その領域内の五つのアミノ酸残基の相違に基づいて、NA に遺伝子変異を導入した。スペインかぜの NA の 435 と 455 番目のアミノ酸残基を USSR 株の NA と同じアミノ酸残基に置換させると酸性安定性が消失した。また、USSR 株の NA の 430、435 および 455 番目のアミノ酸残基をスペインかぜの NA と同じアミノ酸残基に置換させると、USSR 株の NA がスペインかぜの NA と同程度の酸性安定性を獲得した。これらの NA の 430 と 435 番目のアミノ酸残基は、酵素活性部位の近傍であり、NA 構造の維持に重要と言われるカルシウムイオンの結合部位の近傍でもあった。455 番目のアミノ酸残基は、NA のホモ四量体構造のサブユニット間会合部位を構成する残基の一つであった。本研究で同定された三つのアミノ酸残基は酵素活性中心で直接的に基質と作用するのではなく、NA の活性部位やホモ四量体の立体構造に影響を与えることで酸性安定性の獲得に寄与しているものと考えられる。

次に NA の酸性安定性がウイルス増殖に及ぼす影響について検討した。酸性安定性

を示さなかった USSR 株の NA を持つウイルスを作製した。さらにこの NA に上記三つのアミノ酸残基を置換させることで酸性安定性を獲得させた NA を持つウイルスも作製した。この 2 株のウイルスは NA 以外同じ遺伝子であり、NA の酸性安定性が異なることを確認した。NA の酸性安定性を獲得したウイルスは、酸性安定性を持たない NA のウイルスと比較して、感染細胞からの新生ウイルス産生量が感染 24 時間後で約 11 倍に増加した。スペインかぜに見られる NA の酸性安定性は、ウイルスの増殖性を促進させる働きを持つことが判明した。

NA の酸性安定性がウイルス増殖を促進する機構は未だ不明だが、この酸性安定性による違いが特に pH 4~5 の弱酸性領域で顕著に見られることから、細胞内での弱酸性環境が強く関与するものと考えられる。インフルエンザウイルスは細胞表面に吸着するとエンドサイトーシスを介して細胞内へ侵入する。ウイルスを含むエンドソーム/リソソーム内が弱酸性となることで、ウイルス膜と細胞膜は融合し、ウイルスゲノムは細胞内へ放出される。このエンドソーム/リソソーム内の pH は NA の酸性安定性において顕著に差が認められる pH と近似していることから、酸性環境で安定に維持される NA の活性がエンドソーム/リソソーム内で何らかの機能を発揮することでウイルスの増殖を増大させるのではないかと仮説を立て現在研究を進めている (図参照)。

また、当研究室では NA の酸性安定性とその増殖促進効果を亜型の異なる香港型ウイルス (N2 亜型) や 2009 年の新型ウイルス (N1 亜型) といった他のパンデミックウイルスでも見出している。NA の酸性安定性の分子機構を明らかにしていくことで、今後パンデミックウイルスの発生機構や病原性の解明に繋がる結果が得られるものと期待している。



ウイルス複製における酸性に安定なNAの作用機構予想図

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

2) Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Shunsaku Takahashi, Maiko Takano, Takashi Agarikuchi, Tsubasa Sato, Yukino Matsuda, Akira Minami, Hiroaki Kanazawa, Yuko Uchida, Takehiko Saito, Yoshihiro Kawaoka, Toshihiro Yamada, Fumihiko Kawamori, Robin Thomson, Mark von Itzstein and Takashi Suzuki: Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells. *Scientific Reports*, 4, 4877 (2014)