

学 位 論 文 題 名

Studies on structure and function of the N8
neuraminidase of influenza A virus

（インフルエンザAウイルスN8ノイラミニダーゼの
構造と機能に関する研究）

学位論文内容の要旨

インフルエンザAウイルスは Orthomyxoviridae に分類され、Nucleoprotein (NP) および Matrix protein (M1) の抗原性の違いによって、インフルエンザBおよびCウイルスと区別される。Hemagglutinin (HA) および Neuraminidase (NA) の抗原特異性に基づきそれぞれ14 HA亜型 (H1-H14) および9 NA亜型 (N1-N9) に細分される。

NAは約5万ドルトンの分子の4量体としてウイルス表面に存在し、糖タンパク質および糖脂質末端のシアル酸の α -ケト酸結合の開裂を触媒する酵素である。NAのウイルスの生活環における役割はいまだ明確ではないが、ウイルスの宿主細胞への接近と子孫ウイルスの細胞からの遊離に関与すると考えられている。N2、N9亜型およびインフルエンザBウイルスのNAの3次元構造が決定され、これらが相似していることが明らかになった。特に、基質との結合に関与する9つのアミノ酸残基ならびに結合の安定化に関わる8つのアミノ酸残基は異なるインフルエンザウイルスの間でも保存されている。このように異なるNAの活性部位の構造が相同であることから、全てのインフルエンザウイルスNAに対する酵素阻害剤の開発が期待されている。

N8NAは馬および鳥類由来のウイルスが持っており、また1900年以前に採取された人血清中にN8NAに対する抗体が検出されること

から、1890年から1918年まではこの亜型のN Aを持つウイルスが人にインフルエンザの流行を起こしていたものと推定される。1989年に中国北東部で流行した馬のインフルエンザをひき起こした A/Eq/Jilin/1/89 株は鳥のH 3 N 8 ウイルスであった。本研究の目的はこのように広く分布するインフルエンザウイルスのN 8 N Aの構造と機能を解析し、他の亜型N Aと比較することである。

1. N 8 N Aの系統進化

1963年以降世界各地で分離された馬および鳥類由来ウイルスのN 8 N A遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を決定し、系統樹解析を行った。その結果、N 8 N A遺伝子は1963年以降馬から分離されている Equine 2 ウイルス、ユーラシア大陸の鳥類由来ウイルスおよび北アメリカ大陸の鳥類由来ウイルスの3系統に分けられた。また、A/Eq/Jilin/1/89 のN A遺伝子はユーラシア大陸の鳥類由来ウイルスの系統に属することが明らかとなった。Equine 2 ウイルスのN A遺伝子の変異速度はH A遺伝子のそれと同様であった。この成績は Equine 2 ウイルスのH AとN A抗原が同じ選択淘汰圧の下で進化したことを示唆している。

N 8 N Aと他の亜型N Aのアミノ酸配列を比較した結果、異なる亜型間でアミノ酸配列の相同率が低い (40-60 %)にもかかわらず、機能の発現に重要なシステイン残基や、基質結合に関与するアミノ酸残基は共通なことが判明した。従って、N 8 N A分子の機能領域の基本的な構成は他の亜型N Aと異ならないものと推定される。

2. N 8 N Aの多量体特異抗原決定基

N 8 N Aの抗原構造を明らかにするため、A/Dk/Ukraine/1/63(H3N8)のN Aに対する単クローン性抗体97株を作出した。その中で66株が酵素活性を阻止(N I)した。遺伝子再集合体 NWS-DK/Ukraine(H1N8)ウイルスをこれらの単クローン性抗体存在下で培養することによって19株の抗原変異株を得た。抗原変異株のN A遺伝子の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した結果、第150、199、344、346、367、399お

よび 400番のアミノ酸が抗原変異と関連していた。異なるアミノ酸が置換した7株の抗原変異ウイルスとの反応性に基づき、66株のNI単クローン性抗体は3群に分類された。第一群は、第344および346アミノ酸の置換に関わる抗体からなり、半数以上がこの群に分類された。この成績は第344および346アミノ酸を含むペプチドループが主要抗原部位であることを示している。第二群は第150番アミノ酸の置換によって、これに結合しなくなる抗体で、このN8-4抗体はさらに第199、367、399および400アミノ酸の置換とも関わることも判明した。これらのアミノ酸残基のNA3次元構造上の位置から、この単クローン性抗体はNA分子4量体の中で二分子の境界部に存在する抗原決定基を認識することが推定された。放射性同位元素標識免疫沈降法（RIP）によって、この抗体は4量体と特異的に反応することが明らかとなった。第三群は第367、399および400アミノ酸の置換に関わる抗体よりなる。この群はさらに、RIP解析により、2つの異なる抗原決定基を認識する抗体から成ることが判明した。

これらの単クローン抗体の中で、第二群の抗体は4量体NAとのみ特異的に反応するので、この抗体を用いることによって、NAの生合成機構に関する多くの情報を得ることができるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 ・ 教 授 清 水 悠紀臣
副 査 教 授 佐 藤 文 昭
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 助教授 喜 田 宏

学 位 論 文 題 名

Studies on structure and function of the N8 neuraminidase of influenza A virus

(インフルエンザAウイルスN8ノイラミニダーゼの
構造と機能に関する研究)

インフルエンザAウイルスのノイラミニダーゼ (NA) は、ウイルスの表面に存在する感染成立に必須な酵素で、細胞への接近と子孫ウイルスの細胞からの遊離に関与すると考えられている。抗原型はN1～N9の9種がある。申請者は人、動物に広く分布するN8亜型ウイルスのノイラミニダーゼの構造と機能について、次のような新知見を得た。

1. 1963年以降、世界各地で分離された馬と鳥類由来のウイルスのN8NAの遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列を決定し、馬から分離される Equine2ウイルス、ユーラシア大陸の鳥類由来ウイルス、北米大陸の鳥類由来ウイルス の3系統に分類した。Equine2ウイルスのNAとHA遺伝子の変異速度は同じことから、HAとNAが同じ選択淘汰圧のもとで進化したことが示された。

N8NAと異なる他亜型のNAのアミノ酸の相同性は低かったが、システイン残基や、基質結合に関与するアミノ酸等の機能発現に重要な構造は共通であった。

2. NAに対する単クローン性抗体存在下で培養、選択した抗原変異ウイルスのNA遺伝子の塩基配列から、アミノ酸配列を推定した結果、抗原変異には150、199、344、346、367、399、400番のアミノ酸が関連していた。種々の変異ウイルスと単クローン性抗体との反応結果から、単クローン性抗体は3群に分類された。第1群は主要抗原決定基と思われる部位と反応する抗体。第2群は4量体とのみ反応する抗体。第3群は367と399-400番アミノ酸を認識する抗体で、この群はさらに分類され得る。このなかで4量体特異的抗体はNAの生合成機構の解明に重要と考えられる。

以上、申請者は馬と鳥類に分布するN8亜型インフルエンザAウイルスのノイラミニ

ダーゼの構造と機能について検討し、ウイルス遺伝子の進化、機能に関わる構造、抗原性と変異について新しい知見を得た。よって審査担当者は、申請者が博士（獣医学）の学位を授与される資格があると認めた。