

学位論文題名

Molecular Analyses of Structure-Function of the Influenza Virus Hemagglutinin

（インフルエンザウイルスヘマグルチニンの構造－機能の分子解析）

学位論文内容の要旨

インフルエンザAウイルスはヒトを含む哺乳動物および鳥類に広く分布する。インフルエンザAウイルスは、そのエンベロープ表面のヘマグルチニン（HA）およびノイラミニダーゼ（NA）糖蛋白の抗原特異性によって、それぞれH1～H15およびN1～N9の亜型に分けられる。ウイルスを構成する蛋白の中で、HAは感染防御の鍵であり、抗原変異の主演である。HAはまた新型ウイルスの顔でもある。すなわち、人類が過去数十年間経験していない亜型のHAをもつウイルスが出現したとき、これを新型ウイルスと呼ぶ。1968年の新型インフルエンザウイルスA/Hong Kong/68 (H3N2) のHA遺伝子の導入経路はカモ→アヒル→ブタ→ヒトであることが証明された。1997年に香港で発生したH5N1インフルエンザウイルス事件はH5インフルエンザウイルスがヒトに伝播して強い病原性を発揮する可能性を警告した。H5あるいはH7の強毒型のHAをもつインフルエンザウイルスはニワトリに致死的な感染を引き起こす。強毒型のウイルスがヒトの世界に入れば、人々にはそのHAに対する免疫がないため、インフルエンザの大流行がおこる。従って、H5およびH7HAをもつウイルスによるインフルエンザ発生の予知と流行防止対策を早急に確立しておく必要がある。本論文は、新型ウイルスの出現に備えた予防対策法確立のための研究の一環として、H5およびH7インフルエンザウイルスHAの「構造－機能」を超微形態学、分子生物学および疫学的に解析して得た成績を述べるものである。

インフルエンザウイルスのHAは宿主細胞レセプターへの吸着と膜融合を司る。またHAに対する抗体はウイルスの感染を阻止する。インフルエンザウイルスのHAに対する抗体がウイルスの感染性を中和する機序は、抗HA抗体がウイルスの細胞レセプターへの吸着を阻止するためと考えられていた。ところが、A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) インフルエンザウイルスのHAに対する単クローン抗体の多くが、ウイルスの血球凝集活性を阻止しないが、その感染性を効果的に中和することが判明した。そこで、ウイルスの血球凝集を阻止しない抗HA抗体がウイルスの感染性を中和する機序を明らかにするために、まず、これらの抗体が認識するエピトープのHA分子立体構造における位置を単クローン抗体で選択した抗原変異株のHA分子上で認められた置換アミノ酸

から同定した。その結果、単クローン抗体が認識するエピトープはHA分子の頭頂部、側頭部およびヒンジ部に位置することが判明した。各々の単クローン抗体が結合したHA分子を電子顕微鏡により観察した結果、血球凝集を阻止する抗体はHA頭頂部に、血球凝集を阻止しない抗体はHAの頭側部またはヒンジ部に結合していることが確認された。以上の成績から、抗体によってウイルスの血球凝集が阻止されるか否かは、抗体が結合するエピトープのHA分子上の位置によることが明らかとなった。

次に、異なるエピトープを認識する抗体がHAに結合すると、ウイルスの感染増殖にどのような影響を及ぼすかを解析した。ウイルスをMDCK細胞に接種し、経時的に電子顕微鏡下で観察した。抗体が結合していない対照のウイルスは宿主細胞に吸着し、細胞内に取り込まれ、エンドソームに到達した後、ウイルスエンベロップがエンドソームの膜と融合する像が観察された。ウイルスの血球凝集を阻止する抗体が結合したウイルスは細胞表面に吸着しなかった。一方、ウイルスの血球凝集を阻止しない抗体が結合したウイルスは、対照のウイルスと同様に細胞表面に吸着した。この抗体が結合したウイルスは細胞に取り込まれ、細胞のエンドソームに到達した。しかし、融合像は観察されなかった。従って、ウイルスの血球凝集を阻止しない抗体は、ウイルスの細胞レセプターへの吸着を阻止するのではなく、膜融合過程を干渉するものと推定された。

そこで、ウイルスの血球凝集を阻止しない抗体がウイルスエンベロップとエンドソーム膜との融合を阻止するか否かをデクエンチング法で解析した。蛍光分子R18標識ウイルスをMDCK細胞に接種し、蛍光強度を測定した。抗体が結合していないウイルスを接種した細胞は、蛍光強度の上昇（デクエンチング）が数分後に認められ、その後、蛍光強度は徐々に増大した。一方、血球凝集を阻止しない抗体が結合したウイルスを接種した細胞は、蛍光強度に20分間変化がなく、その上昇は極くわずかにすぎなかった。従って、ウイルスの血球凝集を阻止しない抗体がウイルスの感染性を中和する機序は、ウイルスの細胞レセプターへの吸着阻止ではなく、膜融合過程の干渉であることが確認された。以上の成績は、インフルエンザウイルスの抗HA抗体による感染性中和の機序として、ウイルスの宿主細胞への吸着阻止の他に、ウイルスエンベロップとエンドソーム膜との融合阻止が重要であることを示す。

動物とヒトのインフルエンザAウイルス遺伝子の起源はカモのウイルスにあることが明らかにされている。1997年に香港で出現したH5N1インフルエンザウイルスの起源を明らかにするために、日本と中国で渡りガモおよびアヒルから分離されたH5インフルエンザウイルスのHAの抗原性と遺伝子を解析した。単クローン抗体パネルを用いて分離株のHAの抗原性を比較した結果、カモおよびアヒルのインフルエンザウイルスの抗原性はよく保存されていることが判明した。これらのウイルスのHA遺伝子を進化系統解析した結果、北海道で渡りガモから分離された2株は1997年に香港でニワトリとヒトから分離された強毒株と同一の系統に属することがわかった。日本と中国にカモによって運ばれるインフルエンザウイルスは主にシベリアのカモの営巣湖沼に存続していることが推定されている。従って、1997年に香港でニワトリとヒトに出現したH5インフルエンザウイルスはシベリアに営巣して秋にアジアに飛来するカモのウイルスにその起源があると結論される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 助 教 授 岡 崎 克 則

学 位 論 文 題 名

Molecular Analyses of Structure-Function of the Influenza Virus Hemagglutinin

(インフルエンザウイルスヘマグルチニンの構造－機能の分子解析)

人類が経験していない亜型のヘマグルチニン (HA) をもつ新型インフルエンザAウイルスが出現すれば、人々にはそのHAに対する免疫がないため、インフルエンザの大流行がおこる。1997年に香港で発生したH5N1ウイルス事件はH5HAをもつウイルスがヒトに伝播して強い病原性を発揮する可能性を警告した。特にH5やH7の強毒型のHAをもつ新型ウイルスの出現予知とその流行防止対策を確立しておくことは極めて重要である。本論文はH5およびH7HAの構造－機能と疫学解析成績を述べたものである。

抗HA抗体がウイルスの感染性を中和するのは、ウイルスの細胞レセプターへの吸着を阻止するためと考えられていた。ところが、多くの抗H7HA中和抗体が、ウイルスの血球凝集を阻止しない。そこで、これらの抗体が認識するエピトープのHA分子立体構造における位置を同定した。次に、異なるエピトープに対する単クローン抗体が結合したHA分子を電子顕微鏡で観察し、血球凝集阻止 (HI) 抗体はHA頭頂部に、HIを起こさない抗体はHAの側頭部またはヒンジ部に結合することを明らかにした。HIを起こさない抗体が結合したウイルスは、宿主細胞表面に吸着し、細胞に取り込まれ、エンドソームに到達したが、膜融合は起こらなかった。この知見はデクエンチング法によっても確認された。従って、抗体によるウイルスの感染性中和の機序として、ウイルスの細胞レセプターへの吸着阻止の他に、膜融合過程の干渉が重要であることが判った。

1997年に香港で出現したH5N1インフルエンザウイルスの起源を明らかにするために、日本と中国でカモとアヒルから分離されたH5インフルエンザウイルスのHAの抗原性と遺伝子を解析した。北海道でカモから分離された2株は1997年に香港でニワトリとヒトから分離された強毒株と同じ系統に属することが判った。カモが日本と中国に運ぶイン

フルエンザウイルスはシベリアのカモの営巣湖沼に存続していると推定される。従って、1997年に香港でニワトリとヒトに出現したH5インフルエンザウイルスはシベリアからアジアに飛来するカモのウイルスにその起源があるものと想定される。

以上の成績は、H5およびH7HAをもつインフルエンザウイルスの出現に備えた流行予防対策の確立に貴重な情報を提供するものである。よって、審査員一同は今井正樹氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。