

博士論文

A 型インフルエンザウイルスが
異なる宿主に馴化する仕組みの研究

神木 春彦

| | |
|---|-------|
| 目次..... | 1-3 |
| 略語..... | 4-8 |
| 序章..... | 9 |
| インフルエンザ..... | 10 |
| インフルエンザウイルス..... | 10 |
| A 型インフルエンザウイルス..... | 11 |
| A 型インフルエンザウイルスの増殖機序..... | 11-14 |
| 動物のインフルエンザウイルス..... | 14-15 |
| 過去のインフルエンザパンデミック..... | 15-16 |
| 今後のインフルエンザパンデミック予想..... | 16-17 |
| インフルエンザウイルスの宿主域を決定する因子..... | 17-20 |
| インフルエンザウイルスの糖鎖レセプター..... | 20 |
| 本研究の目的..... | 21 |
| 図表..... | 22-25 |
| 第一章第一節 H9N2 インフルエンザウイルスのマウスに対する馴化..... | 26 |
| 要旨..... | 27 |
| 背景と目的..... | 28-29 |
| 材料と方法..... | 30-34 |
| 結果..... | 35-38 |
| 考察..... | 39-42 |
| 図表..... | 43-51 |

| | |
|---|------------|
| 第一章第二節 H3N2 イヌインフルエンザウイルスのネコ由来培養細胞への馴化..... | 52 |
| 要旨..... | 53 |
| 背景と目的..... | 54-56 |
| 材料と方法..... | 57-60 |
| 結果..... | 61-63 |
| 考察..... | 64-66 |
| 図表..... | 67-75 |
| 第二章 シアル酸糖鎖をロックアウトした培養細胞によるウイルスのレセプター指向性 | |
| 解析..... | 76 |
| 要旨..... | 77-78 |
| 背景と目的..... | 79-80 |
| 材料と方法..... | 81-86 |
| 結果..... | 87-91 |
| 考察..... | 92-96 |
| 図表..... | 97-117 |
| 第三章第一節 鳥由来ウイルスがヒト型細胞における高い増殖性を獲得するために必要な | |
| 遺伝子変異の探索..... | 118 |
| 要旨..... | 119 |
| 背景と目的..... | 120-121 |
| 材料と方法..... | 122-125 |
| 結果..... | 126-129 |

| | |
|--|---------|
| 考察..... | 130-133 |
| 図表..... | 134-148 |
| 第三章第二節 シアル酸糖鎖を持たない細胞へのウイルス馴化とその性状解析..... | 149 |
| 要旨..... | 150 |
| 背景と目的..... | 151-152 |
| 材料と方法..... | 153-155 |
| 結果..... | 156-159 |
| 考察..... | 160-162 |
| 図表..... | 163-169 |
| 総括..... | 170-174 |
| 引用文献..... | 175-207 |
| 謝辞..... | 208-209 |

略語

| | |
|---------|---|
| ATCC | American type culture collection |
| BSA | bovine serum albumin |
| BSL | biosafety level |
| Cas9 | CRISPR associated protein 9 |
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid |
| CDR | coding region |
| CIV | canine influenza virus |
| CMP | cytidine 5'-monophosphate |
| CPE | cytopathic effect |
| CRFK | Crandell-Rees feline kidney |
| CRISPR | clustered regularly interspaced short palindromic repeat |
| CRM1 | chromosome region maintenance 1 |
| cRNA | complementary ribonucleic acid |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| DMSO | dimethyl sulfoxide |
| DTT | dithiothreitol |
| EDC-HCl | 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid |
| ELISA | enzyme-linked immuno-sorbent assay |
| FBS | fetal bovine serum |
| fcwf-4 | felis catus whole fetus 4 |
| Fuc | fucose |
| G4 | genotype 4 |
| Gal | galactose |

| | |
|---------|---|
| GalNAc | N-Acetylgalactosamine |
| GFP | green fluorescent protein |
| Glc | glucose |
| GlcNAc | N-Acetylglucosamine |
| gRNA | guide ribonucleic acid |
| H3N2v | H3N2 variant virus |
| HA | hemagglutinin |
| HEK293T | human embryonic kidney 293T |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HOBt | 1-hydroxybenzotriazole |
| HRP | horseradish peroxidase |
| iPA-HCl | isopropylamine hydrochloride |
| KO | knockout |
| LB | lysogeny broth |
| M | matrix protein |
| MA | mouse adapted |
| MA-HCl | methylamine hydrochloride |
| MALDI | matrix assisted laser desorption/ionization |
| Man | mannose |
| MA(aq) | methylamine in water |
| MDCK | Madin-Darby canine kidney |
| MEM | Eagle's minimum essential medium |
| MeOH | methanol |
| moi | multiplicity of infection |

| | |
|---------|---|
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MS | mass spectrometry |
| NA | neuraminidase |
| NCR | non-coding region |
| NCS | neuborn calf serum |
| Neu5Ac | N-Acetylneuraminic acid |
| Neu5Gc | N-Glycolylneuraminic acid |
| N-MM | N-methyl-morpholine |
| NP | nucleoprotein |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| NS1 | non-structural protein 1 |
| NS2/NEP | non-structural protein 2/nuclear export protein |
| PA | polymerase acidic |
| PAGE | poly-acrylamide gel electrophoresis |
| PB1 | polymerase basic protein 1 |
| PB2 | polymerase basic protein 2 |
| PBS | phosphate-buffer saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PDB | protein data bank |
| pdm | pandemic |
| PEG | polyethylene glycol |
| PEI | polyethylenimine |
| PFA | paraformaldehyde |
| PFU | plaque forming unit |

| | |
|---------|---|
| polI | polymerase I |
| PVDF | poly vinylidene di-fluoride |
| PyBOP | 1H-benzotriazol-1-yloxytripyrroliddinophosphonium hexafluorophosphate |
| QIT | quadrupole ion trap |
| RB | reaction buffer |
| RNP | ribonucleoprotein |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain reaction |
| SALSA | sialic acid linkage specific alkylamidation |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| SLC35A1 | solute carrier family 35 member A1 |
| SLC35A2 | solute carrier family 35 member A2 |
| SLN | sialyl-N-acetyllactosamine |
| SNA | <i>Sambucus nigra</i> agglutinin |
| ST | sialyltransferase |
| TMB | tetramethylbenzidine |
| TOF | time of flight |
| TPCK | tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone |
| vRNA | viral ribonucleic acid |
| VSV | vesicular stomatitis virus |
| WT | wild type |

序章

インフルエンザ

インフルエンザウイルスの感染を原因とするインフルエンザは、通常の風邪と異なり、呼吸器症状に加え悪寒、高熱、筋肉痛、関節痛などの全身症状を主体とする感染症である。毎年流行を繰り返す季節性インフルエンザによる重症患者数は、世界で年間 300 万から 500 万人に上り、そのうち死亡者数は 29 万から 65 万人と推定されている[1,2]。インフルエンザが流行すると、医療費の増大や生産性の低下などによる経済損失が発生するのみならず、社会的活動の低下をもたらす。また、インフルエンザウイルスは、毎年繰り返される季節性インフルエンザだけでなく、時に世界的な大流行（パンデミック）を起こすことがある。前世紀に起きたパンデミックによる死亡者数は数百万から数千万人に達する[3,4]。パンデミックが発生すると、社会機能が麻痺し社会全体に甚大な影響を及ぼすことは、現在の新型コロナウイルスによるパンデミックからも明らかである

インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスは、エンベロープを持つ分節型のマイナス鎖一本鎖 RNA ウィルスでオルソミクソウイルス科に属し、ウィルスの核タンパク質（NP）とマトリックスタンパク質（M1）の抗原性の違いから、A、B、C、D の四つの型に分類される。A 型インフルエンザウイルスは水禽やヒトなど様々な動物を宿主とし、ヒトへの感染だけでなく家禽や伴侶動物などへの感染も社会的な問題となっている。B 型および C 型インフルエンザウイルスは主にヒトを宿主とする。B 型インフルエンザウイルスは A 型インフルエンザウイルスと共に季節性インフルエンザをひき起こす。C 型インフルエンザウイルスは幼児に感染することが多く症状は比較的軽い。D 型インフルエンザウイルスは、ウシやブタなどの家畜を宿主とし、特に畜産業に多大な影響を及ぼす牛呼吸器病症候群を引き起こす病原体の一つであると考えられている[5,6]。これらのインフルエンザウイルスのうち、ヒトにパンデミックを引き起こすのは A 型インフルエンザウイルスのみである。

A 型インフルエンザウイルス

A 型インフルエンザウイルスは、エンベロープ表面のスパイクタンパク質であるヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の抗原性の違いにより HA は H1 から H18、NA は N1 から N11 の亜型に分類され、H および N 亜型の数字の組合わせ (例えば、H3N2 や H5N8 など) が株名に記載される。H1 から H16 および N1 から N9 の全ての亜型のウイルスは A 型インフルエンザウイルスの自然宿主である水禽類から、H17、H18 および N10、N11 ウイルスはコウモリのみから見つかった [7,8]。ウイルス粒子は、直径約 100 nm の球体または長いフィラメント状構造で、エンベロープは宿主の脂質二重膜に由来する。エンベロープ上には HA タンパク質が NA タンパク質より多く含まれており、イオンチャネル活性を持つ M2 タンパク質も少量存在する (図 1)。M1 タンパク質がエンベロープを裏打ちし、その内側に 8 分節のゲノム RNA が存在する。RNA 分節の長さは 890 から 2341 塩基であり、それぞれ一つまたは二つのタンパク質をコードしている。各 RNA には多数の NP タンパク質と少量の RNA ポリメラーゼタンパク質が会合し、RNP 複合体 (ribonucleoprotein complex) を形成している。

A 型インフルエンザウイルスの増殖機序

吸着

細胞の表面には糖鎖修飾されたタンパク質が多く発現している。A 型インフルエンザウイルスは、宿主細胞の表面にあるシアル酸糖鎖に結合することで感染を始める。ヒト由来ウイルスは、糖鎖先端のガラクトースに $\alpha 2,6$ 結合したシアル酸 (Neu5Ac $\alpha 2,6$ Gal) を強く認識し、鳥由来ウイルスは $\alpha 2,3$ 結合したシアル酸 (Neu5Ac $\alpha 2,3$ Gal) を強く認識し [9]、細胞に感染するためのレセプターとして利用する (図 2)。前者をヒト型レセプター、後者を鳥型レセプターと呼ぶことがある。ヒトの気管上皮細胞には Neu5Ac $\alpha 2,6$ Gal が、水禽類の

腸管の上皮細胞には Neu5Ac α 2,3Gal が多く発現しており[10,11]、ウイルスの細胞指向性はその宿主細胞が発現するレセプターの種類と対応している。ただし、宿主によっては両方のシアル酸糖鎖を発現している細胞（組織）をもつ場合がある。例えば、ブタの呼吸器上皮細胞には両方のシアル酸糖鎖が発現しており、ヒトと鳥インフルエンザウイルスの両者が感染する[12]。また、ヒトの肺の一部の細胞（肺胞Ⅱ型細胞等）は Neu5Ac α 2,3Gal が発現しており、鳥由来ウイルスはそれをレセプターとすることでヒトに感染すると考えられている[11]。一方、ウイルスの細胞に対する結合性は、こういったシアル酸の結合様式だけでなく、糖鎖を構成する糖の種類、糖鎖の長さや分岐の有無、硫酸化やフコシル化の有無などにも影響される[13,14]。そのため、鳥およびヒトインフルエンザウイルスの感染性は、対応する宿主のみに完全に限定されるわけではなく、宿主域を超えた感染もあり得る。

侵入と脱殻

レセプターに吸着したウイルス粒子は、エンドサイトーシスによりエンドソームに取り込まれる（図 3）。初期から後期エンドソームに移行しエンドソーム内 pH が低下すると、HA タンパク質は構造変化を起こす。なお、構造変化が起きるためには気道や消化管に由来するタンパク質分解酵素により HA タンパク質が HA1 と HA2 に開裂されている必要がある（図 4）[15,16]。構造変化に伴い HA2 の N 末端領域にある膜融合ペプチドがエンドソーム膜に挿入されることでエンドソーム膜とエンベロープが融合する。また同時に、M2 イオンチャネルはプロトンをエンベロープ内に流入させ粒子内 pH を下げることにより RNP と M1 タンパク質の結合を緩める。これら一連の機序が進行することで、ウイルスの RNP 複合体が細胞質に放出され脱殻過程が完了する。細胞質に移行した RNP 複合体は、NP とポリメラーゼタンパク質に存在する核移行シグナルの働きにより細胞の核内輸送因子であるインポーチンと結合し核内に輸送される[17]。

転写と複製

ウイルスゲノムの転写と複製は、PB2、PB1、PA タンパク質が形成する RNA ポリメラ

ーゼ複合体によって宿主細胞の核内にて行われる。ウイルスの mRNA 転写は、宿主の mRNA に由来する cap 構造を持ったオリゴ RNA がプライマーとして利用される。PB2 サブユニットが cap を認識し、PA サブユニットのエンドヌクレアーゼ活性により宿主の mRNA が切断され、これをプライマーとしてウイルス RNA (vRNA) を鋳型に mRNA が転写される。その後、ウイルスの mRNA から翻訳された PB2、PB1、PA、NP などのタンパク質は再び核内に移動する。ウイルスゲノムの複製は、まず vRNA を鋳型としてプライマー非依存的に相補的なプラス鎖の RNA (cRNA) が合成され、次に cRNA を鋳型として vRNA が合成される[17]。

粒子組立てと出芽

粗面小胞体上で翻訳された HA、NA、M2 タンパク質は、小胞体からゴルジ体へ輸送される間に糖鎖修飾 (HA と NA のみ) などを受け、HA は三量体、NA と M2 は四量体を形成し、局在シグナルにより細胞膜表面に輸送される。細胞膜にはスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ、周囲の脂質膜よりも流動性が低く安定な構造を有する微小な脂質ラフト領域が存在する。脂質ラフトに親和性がある HA、NA タンパク質は[18,19]クラスター形成が促進されウイルス粒子中へ効率的に取り込まれる[20]。一方、M2 タンパク質は脂質ラフトでクラスターを形成しないためウイルス粒子には少量のみが取り込まれる[21]。

核内で新たに複製された vRNA は、NP および RNA ポリメラーゼと会合し RNP 複合体を形成する。RNP 複合体は M1 タンパク質や核外移行シグナルを持つ NS2/NEP タンパク質の他に、CRM1 など細胞の核外輸送因子と核外輸送複合体を形成することで細胞質へ移行する。その後、RNP 複合体は微小管を介して出芽の場である細胞膜直下へと輸送され、膜貫通スパイクタンパク質および M1 タンパク質とアセンブルし、細胞膜からの出芽により子孫ウイルス粒子を形成する[22]。A 型インフルエンザウイルスは 8 種類の RNA 分節を有しており、粒子形成の際はそれぞれが区別され重複なく取り込まれる。詳細なメカニズムは不明であるが、各分節の翻訳領域末端には異なる配列のパッケージングシグナルが存在

しており[23]、これらが何らかの仕組みで認識されると考えられている。出芽したウイルス粒子の HA タンパク質は、細胞表面または近傍のウイルス粒子表面のシアル酸糖鎖と結合するが、NA タンパク質のシアリダーゼ活性によりこれらの糖鎖からシアル酸を除去することで細胞表面におけるウイルスの凝集を抑制し、ウイルスの遊離を可能とする。これにより、感染性ウイルス粒子が産生される。

動物の A 型インフルエンザウイルス

A 型インフルエンザウイルスは、水禽や家禽を含む鳥類、ヒト、ブタ、ウマ、イヌ、ネコなどの陸生哺乳類、アシカ、クジラなどの海生哺乳類への感染が確認されており宿主域が広い[24]。コウモリ由来ウイルスを除く 16 種の HA 亜型と 9 種の NA 亜型が、自然宿主である水禽類で維持されているが、感染している水禽類は無症状または軽度の症状を示すのみである[25]。水禽類がもつ鳥インフルエンザウイルスが家禽に感染すると呼吸器症状や下痢症状、産卵低下等をひき起こすが、病原性は高くない。しかし、これら低病原性鳥インフルエンザウイルスのうち、H5 および H7 亜型ウイルスの一部は家禽で感染が繰り返されることで高病原性ウイルスに変異する[26]。高病原性ウイルスが感染した家禽は全身性の症状からほぼ 100%死亡する。一方、高病原性ウイルスは水禽類に対しては病原性を示さない場合もあるため、渡り鳥によってウイルスが世界中に拡散される[27,28]。その結果、世界中で依然として H5 や H7 亜型の高病原性鳥インフルエンザが流行している。今年、わが国にも H5N8 高病原性鳥インフルエンザウイルスが侵入し、養鶏業に多大な被害が発生している。通常、鳥インフルエンザウイルスのヒトに対する感染力は低いが、感染した家禽との濃厚接触により稀に感染することがある。例えば、H5N1 鳥ウイルスはこれまでに 880 名以上に感染し 460 名以上が死亡しており、H7N9 鳥ウイルスは 1,500 名以上に感染し 600 名以上が死亡している。その他の H5、H6、H7、H9、H10 亜型の鳥インフルエンザウイルスもヒトに対する偶発的な感染が報告されている[29-34]。

ブタに定着しているブタインフルエンザでは症状がほとんど見られない。むしろ、こういった不顕性感染の多さがパンデミックウイルス発生の母体になる可能性を高めることになると推測される。ウマインフルエンザは H3N8 亜型のウマインフルエンザウイルスにより引き起こされる。呼吸器症状が中心であるが伝染力が強く競馬の開催が中止になった例もある。イヌインフルエンザは H3N8 ウマ由来ウイルスや H3N2 鳥由来ウイルスがイヌに感染し米国や韓国で流行した。米国のネコには H7N2 鳥ウイルスが感染し広がった。感染したネコからヒトへの伝播も報告されている[35-39]。

過去のインフルエンザパンデミック

これまで報告されている鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染は偶発的であり、ヒトからヒトに効率よく伝播するような変異ウイルスの出現は見られていない[40]。しかし A 型インフルエンザウイルスは極めて変異しやすいウイルスである。ウイルスの RNA ポリメラーゼには修復機構が存在しないため突然変異が生じやすいことに加え、分節状のゲノムを有するため異なるウイルスが同一の細胞に感染した場合には遺伝子交雑体が生じやすい。これら複合的に作用した結果、予想しないようなパンデミックウイルスが突然誕生することも十分あり得る。前世紀以降、インフルエンザパンデミックは 4 回発生した。1918 年の H1N1 ウイルスによる史上最大規模のスペイン風邪パンデミックでは戦時下で医療技術も低かったため数千万人が死亡したとされ、その原因は鳥由来ウイルスがブタを介した変異により生じたウイルスと考えられている[41,42]。1957 年の H2N2 ウイルスによるアジア風邪パンデミックはヒト由来 H1N1 ウイルスと鳥由来 H2N2 ウイルスの遺伝子交雑体により、1968 年の H3N2 ウイルスによる香港風邪パンデミックはヒト由来 H2N2 ウイルスおよび鳥由来 H3 ウイルスの遺伝子交雑体を原因として発生したとされる[43,44]。直近のインフルエンザパンデミックは H1N1 亜型ウイルスによって 2009 年に発生したが、その原因は鳥、ヒト、ブタ由来ウイルスがブタ体内において遺伝子交雑を起こして発生したウイルスで

あった[45]。パンデミックを起こし得るウイルスの条件として、大部分のヒトがそのウイルスに対し免疫学的にナイーブであることが挙げられる。2009 年まで H1N1 亜型の季節性ウイルス（ソ連型ウイルス）がヒト社会に定着していたが、パンデミックをひき起こした A(H1N1)pdm09 ウイルスは同じ亜型であるにもかかわらず大流行した。その原因は、抗原性がソ連型ウイルスとは異なるブタウイルス由来の H1 を有していたことである[46,47]。現在は、ソ連型ウイルスにとってかわった A(H1N1)pdm09 ウイルスの子孫と、香港風邪ウイルスの子孫である H3N2 ウイルス（香港型ウイルス）が季節性インフルエンザとし毎年流行している[48]。

以上のように、過去のパンデミックの発生にはいずれもヒト以外の動物が保有するインフルエンザウイルスが関係していた。動物由来のウイルスは新たな抗原性を有するスパイクタンパク質やその他の遺伝子の供給源となることでパンデミック株の出現に関与する。

今後のインフルエンザパンデミック予測

次のパンデミックを引き起こすウイルス亜型を予測するのは困難である。前述したように、ヒトに対する感染件数が多くまた死亡率も高い H5N1 および H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスが有力な候補であるとされるが[49,50]、現在ではそれらウイルスのヒトに対する感染はほとんど確認されていない。現在世界中の家禽で流行が見られている H5N6 鳥由来ウイルスのヒトへの感染が少数報告されているものの[51]、今年わが国に侵入した H5N8 鳥インフルエンザウイルスを含め、その他の H5 や H7 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染は近年報告されていない。しかし、実験的には H5 鳥インフルエンザウイルスは HA タンパク質に数アミノ酸の変異を獲得するだけで、病原性を維持したままフェレット間での飛沫感染が可能になることや[52,53]、ヒトから分離された H7N9 ウイルスには変異を獲得せずともフェレット間での伝播能を有する株が存在すること[54]などの報告があるため、今後の突然変異や遺伝子交雑によって H5 や H7 亜型によるパンデミックウ

ウイルスが出現する可能性は否定できない。

H5、H7 亜型以外の鳥インフルエンザウイルスにもパンデミック株となる潜在性がある。例えば、低病原性の H9N2 鳥ウイルスはアジア諸国を中心に家禽での感染が広がっているが[55,56]、ヒトへの感染が確認されており[33]、未馴化でも哺乳類で高い増殖性や病原性を示す株が存在する[57,58]。加えて、哺乳類体内での増殖能を既に獲得しているイヌやブタのインフルエンザウイルスにも注意が必要である。伴侶動物のインフルエンザウイルスはヒトと密接に関係するため、ヒトウイルスと遺伝子交雑した変異ウイルスが出現する潜在性がある[59]。また、ブタ由来ウイルスは 2009 年の H1 ウイルスのように、再び新たなパンデミックを引き起こす可能性がある。現在では収束しているが、2012 年には米国でブタ由来 H3N2 ウイルス (H3N2v) が 300 名以上に感染し、限定的ながらヒトからヒトへの感染も認められ、ワクチン候補株を作出するなどの対策が取られた[60]。また、この 10 年間に少数ながら、ブタ由来 H1N1 ウイルス (H1N1v、H1N1-G4) や H1N2 ウイルス (H1N2v) のヒトに対する感染も報告されている[61,62]。

以上のように、鳥や哺乳類のインフルエンザウイルスは全て、亜型に関係なくパンデミックウイルスの起源となる潜在性があると考えられ、特にその潜在性が高いと認識される亜型や宿主の感染状況については監視を怠らないことが重要である。そのためには、こういったウイルスのゲノム変異を監視対象とすべきかを共有し、ヒトにとって危険性を有すると考えられる株を摘発する体制の確立が必要である。

A 型インフルエンザウイルスの宿主域を決定する因子

A 型インフルエンザウイルスは水禽類を自然宿主とするが、種の壁を越えてヒト、ブタ、ウマ、イヌなどに定着した固有のウイルス種が存在する[63]。インフルエンザウイルスが異なる宿主に適応すること、すなわち新たな宿主の体内における高い増殖能や新たな宿主間での伝播能を獲得することを馴化という。種の壁は宿主に特異的な様々な因子によって形

成されており、ウイルスは遺伝子変異を獲得することによって新しい宿主に馴化する。鳥インフルエンザウイルスがヒトに馴化するためには、複数の遺伝子変異の獲得が必要であると考えられており、特に HA タンパク質と RNA ポリメラーゼ遺伝子の変異が重要であることから盛んに研究され、多くの知見が蓄積されている[40]。インフルエンザウイルスは宿主の細胞に吸着して感染を始める。吸着に関与するのはウイルスの HA タンパク質と細胞表面のシアル酸糖鎖である。動物ごとにシアル酸糖鎖の種類と発現する場所に違いがあり、これが種の壁を形成する。前述したように、ヒトのインフルエンザウイルスはガラクトースにシアル酸が α 2,6 結合したシアル酸糖鎖（ヒト型レセプター）に結合し、鳥のウイルスは α 2,3 結合したシアル酸糖鎖（鳥型レセプター）に優先的に結合する。ヒトの鼻甲介、軟口蓋、気管など呼吸器上部の上皮細胞にはヒト型レセプターが多く発現しており、肺など呼吸器下部の一部の細胞にはヒト型に加え鳥型レセプターも発現している[11]。そのため、ヒトのインフルエンザウイルスは呼吸器上部に感染できるが、鳥のウイルスは濃厚接触などにより呼吸器下部まで至らないと感染しにくいとされる。ブタやフェレットの呼吸器もヒトと類似したレセプター分布であるが[12,64]、ゴリラやチンパンジー、マウスの呼吸器上部には鳥型レセプターが優勢に発現している[65]。伴侶動物ではイヌ、ネコ共に鳥型レセプターが呼吸器全体において優勢に発現しており[38,66]、ハムスターでは鼻甲介においてヒト型レセプターが優勢、それ以外では両方のレセプターが発現している[67]。鳥型レセプターを優先的に認識するウイルスがヒトに馴化するためには、HA タンパク質のヘッド領域に存在するレセプター結合部位あるいはその近傍に変異を獲得し、ヒト型レセプターを強く認識できるようになることがその第一条件であると考えられる。

宿主体内の pH 環境の違いも種の壁を形成する。インフルエンザウイルスは HA タンパク質が開裂されることで増殖に必須な膜融合活性を発現するが、そのためには細胞のエンドソーム内の酸性環境下において HA タンパク質は不可逆的な構造変化を起こすことが必要である。ウイルスが宿主細胞で効率的に増殖するためには、この構造変化のタイミングが

重要である。例えば、ヒトの上部気道は酸性環境であり pH は約 5.5 であるが、鳥由来ウイルスは pH 5.6 以上で構造変化を起こす株が多いため、ヒトの粘膜細胞には感染しにくい [68]。そのため、鳥ウイルスがヒトに馴化するためには、HA タンパク質が構造変化を起こす pH が低下するように、主にそのストーク領域に変異を獲得する必要がある。

RNA ポリメラーゼタンパク質は、ウイルスゲノムの転写、複製に関与する宿主の細胞内因子と相互作用する。そのため、鳥インフルエンザウイルスがヒトに馴化する際には、こういったヒトの細胞に特異的な宿主因子に適応する必要がある。RNA ポリメラーゼを形成するサブユニットである PB2 タンパク質の 627 番目のアミノ酸がグルタミン酸 (E) からリジン (K) になる変異 (PB2-E627K) は鳥由来ウイルスが哺乳類細胞において RNA ポリメラーゼ活性を発揮するために重要であることが広く知られている [69,70]。PB2-E627K 変異により、vRNP と哺乳類の核内輸送因子インポーチン $\alpha 7$ との結合性が上がることで vRNP が効率よく核内へ輸送されること [71]、vRNA 産生を促進する宿主因子であるヒトの ANP32A を利用できるようになること [72]、さらに、鳥由来ウイルスの RNA ポリメラーゼ活性を阻害するヒトの DDX17 との相互作用が減弱されること [73]などが知られる。

また、ウイルスの温度感受性も鳥インフルエンザウイルスがヒトへ馴化するために重要である。特に、RNA ポリメラーゼの活性は温度環境により変化する。ヒトインフルエンザウイルスの増殖の場であるヒトの呼吸器上部は約 32°Cであるのに対し、鳥インフルエンザウイルスが増殖する鳥の腸管は 40 から 42°Cである [74,75]。したがって、鳥インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは 32°C付近において活性が低い。PB2-E627K などの変異を獲得すると、低温での RNA ポリメラーゼ活性が高くなり、変異ウイルスは上部気道の細胞で効率よく増殖できるようになる [76,77]。ヒトの上部気道細胞における効率の良い増殖性を獲得することは、咳やくしゃみなどを介したヒトからヒトへの感染につながるため、パンデミックウイルスの出現に必須な条件の一つであると考えられている。

以上のように、鳥由来ウイルスが異なる動物に馴化するためには、様々な要因によって形

成される種の壁を、変異の獲得により乗り越える必要がある。よって、鳥インフルエンザウイルスがヒトに馴化する際に必要な遺伝子変異を同定し、その知見を蓄積することは重要である。これらの情報により、パンデミックを起こし得るウイルスを事前に摘発できるようになることが期待できる。

A 型インフルエンザウイルスの糖鎖レセプター

真核生物が合成するタンパク質の半数以上は糖鎖修飾を受ける糖タンパク質であると推測されている[78]。糖鎖は生体内において、タンパク質の可溶性や安定性の規定、不正な立体構造を有するタンパク質の分解[79]、サイトカインとの結合によるシグナル伝達など[80]、様々な役割を果たす。糖タンパク質を修飾する糖鎖には主に N 結合型と O 結合型がある。N 結合型糖鎖は N-X-S/T (X は P 以外のアミノ酸) からなるアミノ酸配列の N 残基に結合し、O 結合型糖鎖は S または T 残基に結合する。糖鎖の先端（非還元末端）はシアル酸などによってキャッピングされている場合がある。シアル酸とはノイラミン酸修飾体の総称で、そのうち N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) は様々な生物種に存在しており、N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) はヒトには微量しか存在しないがブタやウマなどに存在する[81]。哺乳類においては Neu5Ac および Neu5Gc が一般的であるが、その他にも様々な分子種が知られている[82]。シアル酸は細胞表面を覆う糖鎖の先端にあり、かつ負に帯電しているため様々なウイルスの細胞への吸着に関与する。例えば、ヒトパラインフルエンザウイルスやムンプスウイルス、一部の型のヒトアデノウイルスは Neu5Ac を有するシアル酸糖鎖に結合する[83-86]。また、C 型および D 型インフルエンザウイルスやブタトロウイルスは 9 位の水酸基がアセチル化されたシアル酸をレセプターとする[87,88]。結合様式、分岐の有無、単糖組成など糖鎖を構成する条件は多岐にわたるため、糖鎖の構造および糖鎖が作り出す細胞表面の環境は非常に複雑である。そのため、核酸やタンパク質に比べて研究が遅れているとされる。しかし、現在では簡便なゲノム（遺伝子）編集技術が確立され、糖鎖

合成に関わる酵素の性質を調べることができる。また、質量分析法の進歩により糖鎖の構造をより詳細に調べることが可能となっている。

本研究の目的

動物の A 型インフルエンザウイルスは、突然変異や遺伝子交雑による変異を獲得することでヒトに馴化し、パンデミックを発生させる潜在性をもつ。ヒトからヒトに感染する病原性の高い変異ウイルスが出現した場合、迅速に公衆衛生上の措置を執り、変異ウイルスの拡散によるパンデミックの発生を防ぐことが重要であるが、どの亜型のどのような株がヒトでパンデミックを引き起こすのかを予想することは困難である。これまでの研究から、鳥由来ウイルスの哺乳類馴化に関与する遺伝子変異に関する知見が蓄積されており、現時点ではこれらの情報を基にウイルスの監視がなされている。しかしながら、インフルエンザウイルスの進化速度は速く、予想しないようなウイルスが様々な宿主動物に広がっていくことは避けられないであろう。したがって、ウイルスが異なる宿主に馴化するために重要な遺伝子変異に関する情報を継続的に蓄積し、これに基づいてサーベイランス体制を強化することが、今後のパンデミックの発生を事前に防ぐために不可欠であると考えられる。本研究ではこの考えの下、鳥インフルエンザウイルスを含む動物由来ウイルスが、異なる宿主に馴化するために必要な新たな変異を探索し、馴化が起こる分子機構の解明を目的とする。さらに、異なる宿主への馴化に特に重要とされるウイルスのレセプター指向性の詳細な解析を可能にする、既存の方法とは仕組みの異なる高感度かつ簡便な新規解析手法の確立を目的とした。

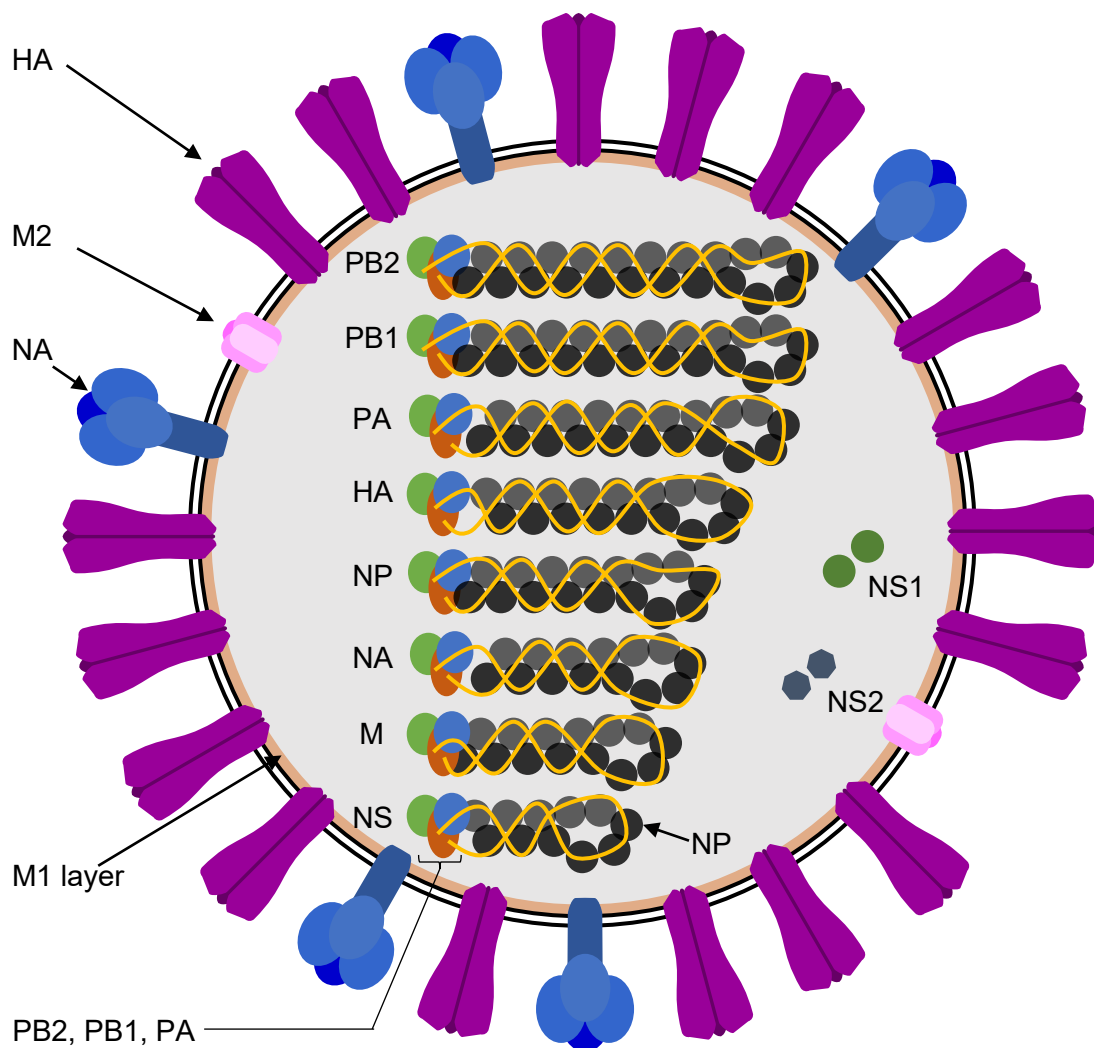


図1. A型インフルエンザウイルスの構造

ウイルス粒子の表面には糖タンパク質のHAおよびNAが突出し、イオンチャネル活性を有するM2タンパク質も存在する。M1タンパク質はエンベロープを裏打ちする。NPタンパク質は数珠状に連なってウイルスの各分節RNAと結合し、さらにPB2、PB1、PAサブユニットからなるウイルスポリメラーゼと複合体を形成する（RNP複合体）。免疫応答の抑制や、ウイルスmRNAの翻訳促進など様々な機能を有するNS1および、RNP複合体の核外輸送などに関わるNS2タンパク質もウイルス粒子内に存在する。なお、図中オレンジ色の線はウイルスのRNAを示す。

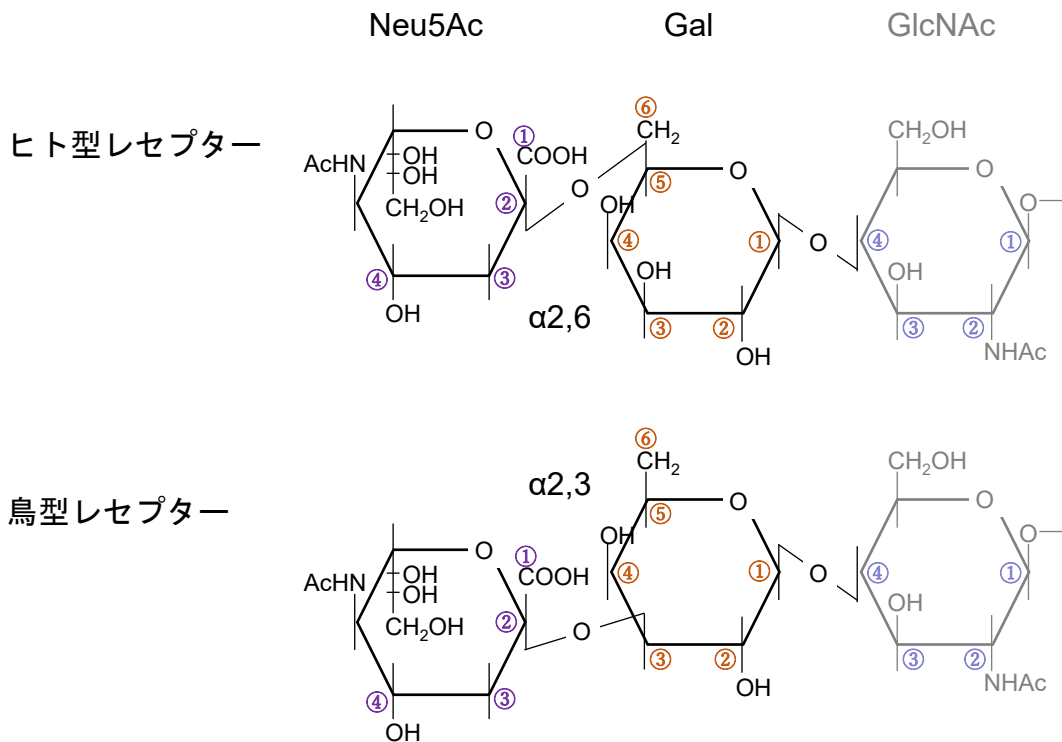


図2. シアル酸のガラクトースに対する結合様式

上図はガラクトース（Gal）にシアル酸（Neu5Ac）が α 2,6結合した構造を、下図は α 2,3結合した構造を表す。N型糖鎖の場合GalはN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）に結合している場合が多い。糖の平面構造に対しグリコシド結合の形成方向が下側なら α 結合、上側なら β 結合と呼ぶ。丸で囲まれた数字は各糖の炭素原子の番号を示す。上図はNeu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAcで、下図はNeu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAcである。

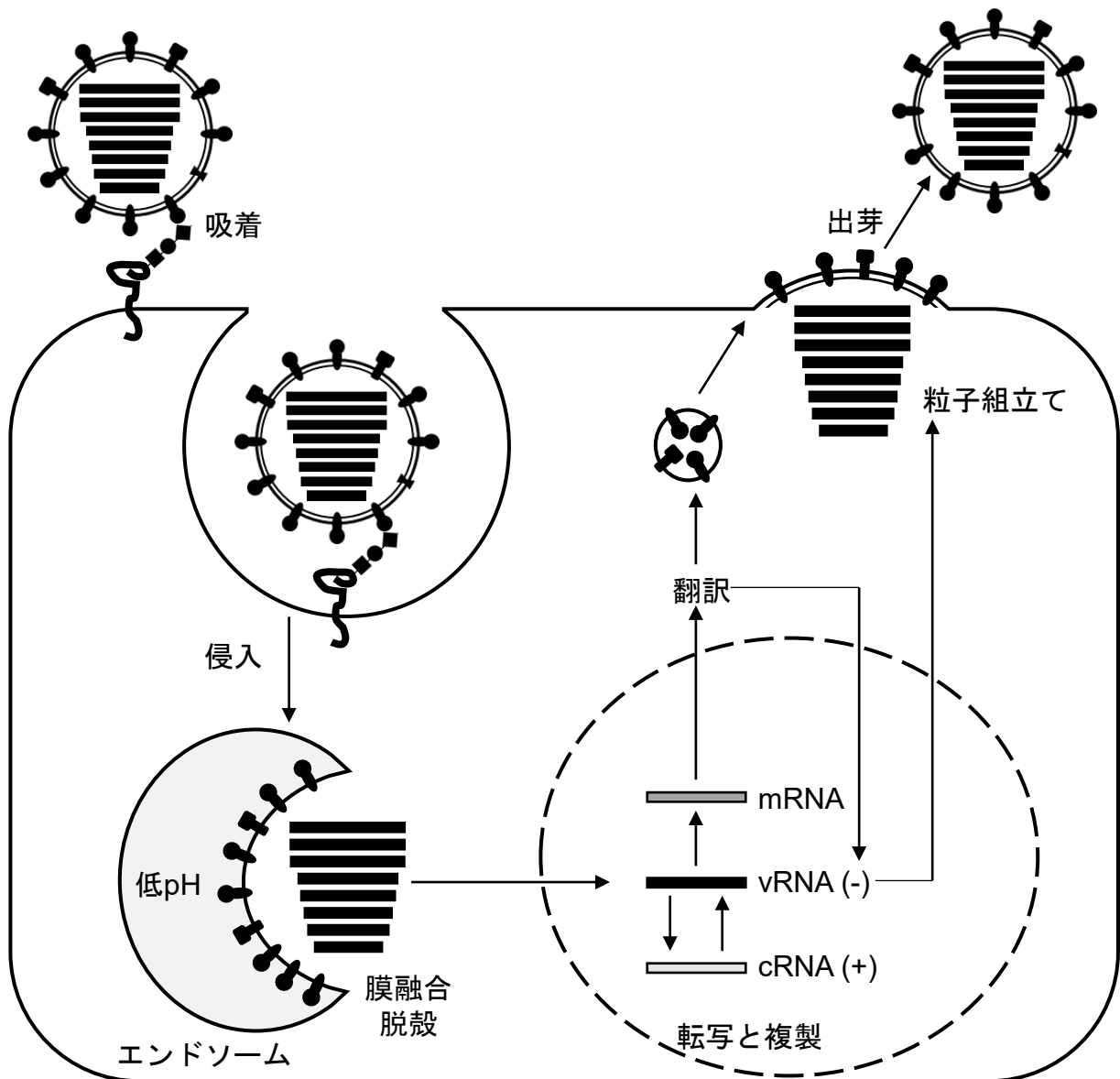


図3. A型インフルエンザウイルスの増殖機序

ウイルスは細胞表面に吸着した後、エンドサイトーシスにより細胞内に侵入する。エンドソームの低pHによりHAタンパク質が構造変化しエンドソーム膜とエンベロープが融合する。これによって、ウイルスのRNP複合体が細胞質に放出される。RNP複合体は核内に移行しmRNAが合成され、ウイルスのタンパク質が翻訳される。そのうちHAやNAなどは細胞膜に移行し、ポリメラーゼタンパク質やNPなどは核内に移行する。vRNAはcRNAを鋳型として合成され、ポリメラーゼタンパク質やNPと結合しRNP複合体となって、細胞膜直下の粒子組み立てが起こる位置まで移動する。その後、形成されたウイルス粒子は細胞から出芽する。

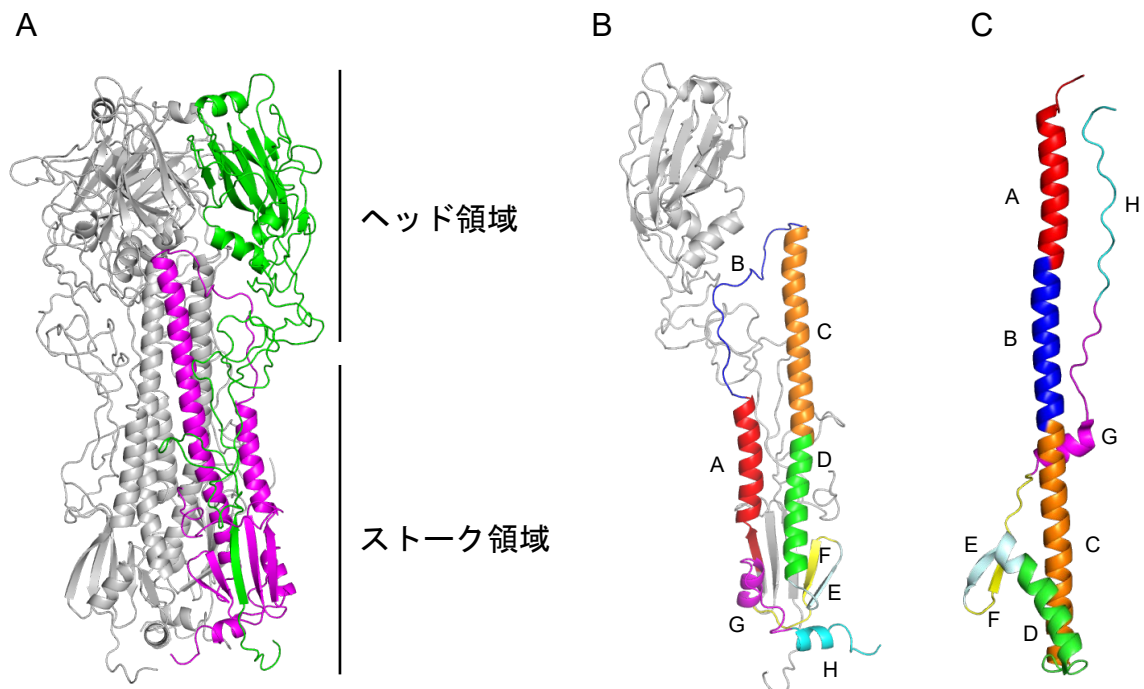


図4. HAタンパク質の立体構造

(A) H3亜型由来HAタンパク質三量体の構造 (PDB; 1HGG)。レセプター結合部位を有するヘッド領域と、膜貫通ドメインを有するストーク領域の位置を示した。HA1は緑で、HA2はマゼンタで表した。(B) 構造変化前のHA2 (PDB; 1HGG) と (C) 低pHにより構造変化を起こした後のHA2 (PDB; 1QU1)。HA2のアミノ酸配列を区切り、アミノ酸番号が小さい方から順にAからHの領域を設定し異なる色で表した。

第一章第一節

H9N2 インフルエンザウイルスの マウスに対する馴化

要旨

H9N2 亜型の A 型鳥インフルエンザウイルスは、世界中の家禽に拡がっている。近年、家禽から分離される H9N2 鳥インフルエンザウイルスの一部は、ヒト型レセプターを認識できること、およびヒトに対する散発的な感染が報告されていることから、パンデミックを引き起こすおそれがあると考えられている。本章本節では、H9N2 ウイルスの哺乳類馴化に必要な遺伝子変異を同定する目的で、マウス馴化株を作出し全ゲノムを解析したところ、PB2、PB1、PA、HA 分節に変異が見つかった。これらの変異の中には、哺乳類馴化を起す変異としてこれまで報告されていない PB1-K577E 変異が含まれていた。リバーシジェネティクス法で構築した PB1-K577E 変異を持つウイルスは、野生型ウイルスに比べマウスの鼻甲介における増殖能が上がっており、高い病原性を示した。さらに、同変異によりヒト由来培養細胞におけるウイルスの RNA ポリメラーゼ活性が低温環境下において上昇した。これらの結果から、PB1-K577E 変異は、H9N2 ウイルスのマウスに対する病原性を規定することが明らかとなり、この変異が哺乳類馴化の指標として、ウイルスサーベイランスに貢献し得ることが示された。

1. 背景と目的

A 型鳥インフルエンザウイルスの自然宿主は水禽類であるが、時折家禽に感染し病気を起こす。鳥インフルエンザウイルスは偶発的に哺乳類にも感染するが、哺乳類間で伝播することはほとんどない。しかし、ごく稀に鳥由来ウイルスは種の壁を越え、新しい宿主に適応して新たな系統を形成する。これまで H1、H2、H3、H5、H6、H7、H9、H10 亜型のウイルスでヒトへの感染が報告されており [29-34]、そのうち H1、H2、H3 亜型のウイルスがヒト社会に固有の季節性インフルエンザウイルスとして定着した。これまでの研究から、鳥由来ウイルスの哺乳類馴化には、ウイルス表面タンパク質である HA とウイルス RNA ポリメラーゼにおける変異が決定的に重要であることが明らかになっている [40,52]。しかし、異なる種への馴化が起きる詳細な仕組みは明らかになっていない。

H9N2 鳥インフルエンザウイルスは、1966 年に米国の七面鳥から初めて分離され [89]、それ以来世界中で見つかっている。H9N2 ウイルスが感染した家禽は体重減少や産卵数の低下といった症状を示すため、畜産業界における経済的損失の原因となる [90,91]。また H9N2 ウイルスは、ヒトに対する広範囲の感染が 1997 年以降報告されている高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスや 2013 年以降に中国で多くの感染者を出した H7N9 鳥インフルエンザウイルスなどにゲノム分節の一部を提供したことが報告されている [32,34,92]。

1999 年香港にて、H9N2 鳥インフルエンザウイルスのヒトに対する感染が初めて報告された [33]。その後、同様な感染が中国、バングラデシュ、エジプトでも確認された [33,93,94]。さらに、血清学的調査によって H9N2 ウイルスのヒト感染は、アジア、中東、アフリカ、北米でも起きていることが明らかとなり [55]、H9N2 ウイルスがヒトにパンデミックを起こす可能性について公衆衛生上の懸念が高まっている。ヒトへの感染に加えて、H9N2 鳥ウイルスのブタ [95]、イヌ [96]、ネコ [97]、霊長類 [98] に対する自然感染も報告されている。実験

条件下において、H9N2 鳥由来ウイルスは、未馴化でもマウスへ感染し、株によっては致死性であることも知られている [58,90]。最近の H9N2 ウイルスが種を超えた感染を起こす仕組みの一つとして、ヒト型レセプターを認識することが挙げられる。同ウイルスの HA タンパク質は、226 番目アミノ酸がロイシンである場合が多く [99]、このことがヒト型レセプターへの結合を可能としている [9]。また、226 番目のロイシンは、H9N2 ウイルスのフェレット間における接触感染に重要であることも知られる [100]。以上の理由から、H9N2 ウイルスはヒトに馴化する潜在性が高いと考えられ、ヒトは H9 亜型の HA に対して免疫学的にナイーブであることを考えると、H9N2 ウイルスがヒト馴化に必要な変異を獲得しパンデミックを引き起こす可能性は高いと思われる。しかし、H9 亜型の鳥インフルエンザウイルスがヒトなどの哺乳類に馴化する分子機構の詳細はわかっていない。そこで本章本節では、マウス馴化 H9N2 ウイルスを作成し、同ウイルスが獲得した哺乳類馴化に関わる遺伝子変異を解析した。

2. 材料と方法

2.1. 細胞とウイルス

イヌ腎臓由来 MDCK 細胞 (ATCC; CCL-34) は 5% 仔ウシ血清 (NCS) を加えた MEM 培地で、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞 (RCB2202) およびニワトリ線維芽細胞由来 DF-1 細胞 (ATCC; CRL-12203) はそれぞれ 10% および 5% ウシ胎児血清 (FBS) を加えた DMEM 培地を用いて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養、継代した。A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) ウイルス (HK1073) は 10 日齢発育鶏卵を用いて 37°C で増殖させ、漿尿液中のウイルスを -80°C に保存した。

2.2. ウイルスのマウス馴化

0.3% ウシ血清アルブミン (BSA) を加えた MEM 培地 (MEM/BSA 培地) で HK1073 ウイルスを含む漿尿液を 10 倍希釈し、50 μ L をセボフルラン (Maruishi Pharmaceutical, Osaka, Japan) で麻酔した 6 週齢雌の BALB/c マウス (Japan SLC, Shizuoka, Japan) 3 匹に経鼻接種した。接種 3 日後、安楽死させたマウスから肺を採材し、2% ペニシリン、ストレプトマイシン入り PBS を加え、TissueLyser II (QIAGEN, Tokyo, Japan) で肺組織を破碎し、20% 乳剤を作った。肺乳剤を遠心し、上清 50 μ L を別のマウス 3 匹に経鼻接種した。これを繰り返して、10 回継代後のウイルスをマウス馴化ウイルス (MA: mouse adapted) として実験を進めた (図 1-1-1)。

2.3. シーケンス解析

野生型 (HK1073) ウイルスを含む鶏卵の漿尿液および馴化ウイルスを含むマウスの肺乳剤から全 RNA を抽出し、ウイルスのゲノム分節 3' 末端に存在する保存領域に結合するプライマー (AGCRAAAGCAGG) を用いて、ウイルス RNA を逆転写した。その後、各分節ゲ

ノムに特異的なプライマーを用いて PCR し[101]、PCR 産物を Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) で精製した。ウイルスゲノムの塩基配列は、分節特異的なプライマーを用いてサンガーシーケンス (Applied biosystems 3170xl; Life technologies, Tokyo, Japan) により決定した。

2.4. リバーシジェネティクス法によるウイルス作出

HK1073 およびマウス馴化ウイルスから得たゲノム分節の cDNA を、RNA 発現プラスミド pHH21 に挿入した。また、野生型および変異を有する PB2、PB1、PA、NP 分節の翻訳領域を、分節特異的なプライマーを用いて逆転写 PCR (RT-PCR) し、タンパク質発現プラスミド pCAGGS に挿入した。インサートを挿入したプラスミドで大腸菌 DH5 α を形質転換した後、アンピシリンを加えた LB 寒天培地に塗菌し、室温または 37°C で培養した。大腸菌からプラスミドを精製し、分節特異的なプライマーを用いて全てのプラスミドをシーケンスすることで、インサートの配列が正しいことを確認した。

野生型および変異 HK1073 ウイルスを、過去の報告に従って人工的に作出した[102]。ウイルス RNA 発現プラスミドおよびタンパク質発現プラスミドをトランスフェクション試薬 (TransIT-293; Mirus Bio, WI, USA) と混合し、室温で 15 分間インキュベートした後、HEK293T 細胞に添加した。細胞は Opti-MEM 培地 (Life technologies/GIBCO, Gland Island, NY, USA) で培養し、トランスフェクト 48 時間後に上清中のウイルスを MDCK 細胞に感染させた。MDCK 細胞を 1 μ g/mL TPCK トリプシン (Worthington, Lakewood, NJ, USA) 添加 MEM/BSA 培地で維持し、感染 48 時間後の培養上清から細胞残渣を除いた後、-80°C で保存した。

2.5. マウスへの感染実験

ウイルスのマウスに対する病原性を評価するため、6 週齢雌の BALB/c マウスをセボフ

ルランで麻酔し、1匹当たり 1×10^5 PFU の野生型または変異 HK1073 ウイルスを、50 μ L の MEM/BSA 培地に懸濁し経鼻接種にて感染させた。その後 14 日間にわたって、マウスの体重と死亡率を記録した。25%以上の体重減少を示したマウスは安楽死させた。また、生体内におけるウイルスの増殖性を評価するため、1匹当たり 1×10^5 PFU の野生型または変異 HK1073 ウイルスを経鼻感染させた。感染 3 日後に肺と鼻甲介を採材し、2%ペニシリン、ストレプトマイシン入り PBS を加え、TissueLyser II にて乳剤化した。その後、MDCK 細胞を用いたプラークアッセイにより乳剤上清のウイルス力価を測った。

2.6. プラークアッセイ

コンフルエントの MDCK 細胞を MEM/BSA 培地で洗浄し、10 倍段階希釈したウイルス液を加え、37°C で 60 分間インキュベートした。ウイルス液を除き細胞を洗浄した後、1% アガロースおよび 1 μ g/mL の TPCK トリプシンを含む MEM/BSA 培地を重層した。細胞を 37°C で 48 時間インキュベートし、固定、染色した後プラークの数を数えた。

2.7. ルシフェラーゼアッセイによる RNA ポリメラーゼ活性測定

ルシフェラーゼアッセイには、研究室で過去に作られたレポータープラスミド pPolI-NP(0)luc(0)および pPolGG-NP(0)luc(0)プラスミドを用いた[103]。これらはそれぞれ、ヒトまたはニワトリ由来 PolI プロモーター下流に PR8 株の NP 分節が挿入されたプラスミドから NP 翻訳領域を除き、3'および 5'非翻訳領域の間にホタルルシフェラーゼ (luc2) 遺伝子を搭載した構造をしている。また、トランスフェクション効率を標準化する内在コントロールとして、ウミシイタケルシフェラーゼを発現する pRL-null プラスミド (Promega, Tokyo, Japan) を準備した。野生型 PB2、PB1、PA、NP または PB1-K577E、PB2-E627K 変異タンパク質を発現する pCAGGS プラスミドと pRL-null プラスミドを pPolI-NP(0)luc(0)または pPolGG-NP(0)luc(0)プラスミドと共に、PEI (Polysciences, Warrington, PA, USA) を

用いてそれぞれヒト由来 HEK293T またはニワトリ由来 DF-1 細胞にトランスフェクトした。33°Cまたは 37°Cで 24 時間培養した後、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) で細胞を溶解し、ホタルルシフェラーゼの活性を ARVO X2 microplate luminometer (PerkinElmer Japan, Kanagawa, Japan) を用いて測定した。また、標準化のためウミシイタケルシフェラーゼの活性も測った。トリプリケイトの実験を独立して 3 回実施した。

2.8. ウェスタンブロッティング

野生型 HA を持つウイルス、および HA1-N132D または HA1-N198S の変異 HA を持つウイルスを MDCK 細胞に $\text{moi}=1$ で感染させ、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TPCK トリプシンを加えた MEM/BSA 培地で 12 時間培養した。その後、Tris-HCl 溶解液 (20 mM Tris-HCl pH7.6, 100 mM NaCl, 30 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA) を加え、氷上 10 分間の条件で細胞を溶かし、一部の細胞溶解液には PNGase F (New England Biolabs Japan, Tokyo, Japan) を作用させ、脱グリコシル化した。そして、細胞溶解液に 0.05 M の DTT と 2×SDS-PAGE sample buffer (100 mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 25 mM EDTA, 0.04% bromophenol blue) を加え、98°Cで 5 分間加熱した。調整したサンプルを SDS-PAGE し、PVDF 膜に転写した。膜を 5%スキムミルクでブロッキングした後、HK1073 に対するマウス抗血清を加えてインキュベートし、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を添加した。その後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を反応させ、ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) で解析した。

2.9. 統計解析

ルシフェラーゼ活性、マウス体内におけるウイルス力価、ウイルス感染マウスの体重変化および死亡率は両側検定の Student's t-test または Log-rank test によって解析し、p 値が

0.05 未満の場合を統計学的に有意とした。

2.10. 倫理規定

マウスへの感染実験は東京大学における動物実験実施規則に則り、東京大学農学生命科学研究科動物実験委員会の許可の下（承認番号 P17-107）、ABSL2/P2A の実験室で実施した。

3. 結果

3.1. H9N2 インフルエンザウイルスのマウス馴化

H9N2 ウイルスが哺乳類に馴化する分子機構を調べるため、マウス馴化ウイルスを解析した。野生型ウイルス HK1073 を 3 匹のマウスに経鼻接種し、3 日後に肺を採材した。肺組織を破碎し、異なるマウスに接種することを繰り返して、10 回の継代を行った。これにより、3 系統のマウス馴化 (MA) H9N2 ウイルスを得た。6 回継代以降のウイルスを感染させたマウスではいずれの系統でも、運動量の低下や毛の逆立ち、身を寄せ合っとうづくまるなど臨床兆候が観察された。10 回継代後のウイルスを HK-MA1、HK-MA2、HK-MA3 と名付けてその後の実験に用いた。

3.2. マウス馴化ウイルスのシーケンス解析

馴化ウイルスが獲得したアミノ酸変異を同定するため、野生型および HK-MA1、-2、-3 ウイルスの全ゲノムをシーケンスした(表 1-1-1)。HK-MA1 と HK-MA2 が獲得した PB2-E627K および PA-T97I 変異は、他の亜型の鳥インフルエンザウイルスが哺乳類馴化する際に重要であると報告されている[104-108]。一方、HK-MA3 は PB2-E627K 変異を持たないにもかかわらずマウスに馴化し、哺乳類馴化に関係する変異としてこれまでに報告のない PB1-K577E 変異を有していた。HA1-N132D および全ての馴化ウイルスが獲得した HA1-N198S/T といった変異は、N 型糖鎖が結合し得る位置に存在した。

3.3. マウス馴化に重要な変異の同定

H9N2 ウイルスのマウス馴化に重要な変異を同定するため、まずリバーシジェネティクス法により野生型ウイルスおよび、PB1-K577E または PB2-E627K の変異を有する変異ウイルスを人工的に作出し、それぞれ rWT、rPB1-K577E、rPB2-E627K と名付けた。そして

各ウイルスをマウスに 10^5 PFU 経鼻接種し、死亡率と体重変化を観察した (図 1-1-2A, B)。rWT を接種したマウスは体重減少を示したものの、全ての個体が 14 日にわたって生存した。しかし、rPB1-K577E および rPB2-E627K を接種したマウスはそれぞれ 100% ($p < 0.01$, Log-rank test による rWT との比較) および 75% ($p < 0.05$) の死亡率を示した。rPB2-E627K を接種したマウスのうち一個体のみが、20%の体重減少を示した後に回復した。

野生型および変異ウイルスの生体内における増殖能を評価するため、マウスに 10^5 PFU のウイルスを経鼻接種し、感染 3 日後の肺と鼻甲介におけるウイルス力価を測った (図 1-1-2C, D)。肺におけるウイルス力価に有意な差はみられなかったが、鼻甲介においては変異を持つ rPB1-K577E および rPB2-E627K が rWT と比べて有意に高い力価を示した。これらのデータから、PB1-K577E 変異は PB2-E627K 変異と同様、マウスに対する病原性を上げることが示された。

HA に見つかった変異のマウスに対する病原性を評価するため、リバーシジェネティクス法により HA1-N132D または HA1-N198S の変異ウイルスを作出し、それぞれ rHA1-N132D および rHA1-N198S と名付けた。そして、 10^5 PFU の rWT および変異ウイルスをマウスに接種し死亡率と体重変化を観察した (図 1-1-3A, B)。rWT および rHA1-N132D を接種したマウスは全ての個体が生存したものの、rHA1-N132D 接種群は rWT 接種群と比べて有意な体重減少を示した。一方、rHA1-N198S 接種群の半数は感染 8 日以内に死亡した。実験に用いたマウスの数が少なかったため死亡率に有意差はつかなかったが、rHA1-N198S 接種群は rWT 接種群と比べ有意な体重減少を示した。これらのデータから、HA1-N132D と HA1-N198S の両者はマウスへの病原性に関係し、後者の方がより大きな影響を持つことが示された。

さらに、HA1-N198S と PB1-K577E の両変異を持つ HK-MA3 と同じ遺伝子型のウイルス (rHA1-N198S/PB1-K577E) を作出し、その病原性を評価した (図 1-1-3A, B)。このウイルスを接種したマウスは全個体が 5 日以内に死亡した。PB1-K577E 変異だけの場合と比

べて死亡までの期間が短くなっており、これら PB1 と HA の変異は、相加的にマウスへの病原性を上げる可能性があるといえる。

3.4. RNA ポリメラーゼ活性の評価

PB1-K577E 変異が、ウイルス RNA ポリメラーゼ活性に影響を与えるかどうか調べるため、哺乳類の下部および上部気道に対応する 37°C および 33°C にて、哺乳類と鳥由来細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った[109]。ヒト細胞において鳥インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼ活性を上げることが既に知られている PB2-E627K 変異と同様[104–107]、PB1-K577E 変異も 37°C のヒト由来 HEK293T 細胞においてポリメラーゼ活性を野生型と比べて約 10 倍高めた (図 1-1-4A)。さらに 33°C では、ウイルスのポリメラーゼ活性は PB1-K577E 変異によって野生型の約 30 倍、PB2-E627K 変異によって約 300 倍上昇した (図 1-1-4B)。一方、37°C の DF-1 細胞においては、野生型および変異タンパク質のポリメラーゼ活性に有意な差はなかった (図 1-1-4C)。これらのデータから、PB1-K577E 変異は哺乳類細胞におけるウイルス RNA ポリメラーゼの活性に重要で、このことが HK-MA3 ウイルスのマウスに対する高い病原性をもたらしたと考えられた。

3.5. 変異 HA タンパク質の脱グリコシル化

野生型 HA タンパク質の 132 番および 198 番アミノ酸はアスパラギン (N) であり、N 型糖鎖修飾モチーフを形成している。そのため、馴化ウイルスが獲得した HA1-N132D および HA1-N198S/T 変異により N 型糖鎖の欠損が起きた可能性を考えた。変異によって HA タンパク質が脱グリコシル化したかをウエスタンブロッティング解析で調べた。まず、rHA1-N132D および rHA1-N198S の MDCK 細胞における増殖性が低く明瞭な泳動像が得られる HA タンパク質が準備できなかったため、これらの変異に加え PB2-E627K 変異を持つウイルス (rHA1-N132D/PB2-E627K および rHA1-N198S/PB2-E627K) をリバースジェ

ネティクス法により作出した。そして、これらの変異ウイルスと野生型 HA を持つウイルスである rPB2-E627K を MDCK 細胞に感染させた。37°C で 12 時間培養した後、細胞を溶解し、一部の細胞溶解液には PNGase F を作用させて N 型糖鎖を除去した。その後、H9N2 ウイルスに対するマウス抗血清を用いて細胞溶解液をウエスタンブロッティングした（図 1-1-5）。PNGase F 処理後の HA0 は、全てのサンプルにおいて同一の分子量を示し、糖鎖が除かれた形態であることがわかる。一方、非処理サンプルの HA1-N132D または N198S 変異を有する HA は、野生型 HA と比べて移動距離が長く、分子量の低下が示された。以上の結果から、HA1-N132D および HA1-N198S の変異により、これらの位置に存在する糖鎖が欠損したことが示唆された。

4. 考察

H9N2 鳥インフルエンザウイルスにはパンデミックを起こす潜在性を有する株が報告されており、同ウイルスの家禽に対する世界的な感染拡大と、ヒトに対する散発的な伝播は、公衆衛生上懸念すべき事態である。ウイルスがパンデミック株となるためには、ヒト馴化を起こす遺伝子変異の獲得が必要である。しかし、H9N2 ウイルスが哺乳類馴化する分子生物学的な仕組みは十分に解明されていない。本研究では、マウス馴化 H9N2 ウイルスの解析によりこれまでに報告のない PB1-K577E 変異を同定し、同変異がマウスへの病原性上昇に関わることを明らかにした。このことは、PB1-K577E 変異が鳥インフルエンザウイルスの哺乳類馴化に重要であることを示唆する。

ほとんどの鳥インフルエンザウイルスは、未馴化の場合マウスに病原性を示すことはない。しかし、HK1073 ウイルスの rWT は感染マウスの体重を減少させ、ある程度の病原性を示した (図 1-1-2A, B)。その理由として、今回用いた HK1073 ウイルスは、H9N2 鳥インフルエンザウイルスではあるがヒトから分離された株であり、NS1 タンパク質の 42 番目アミノ酸がセリンであることと、M1 タンパク質 215 番目アミノ酸がアラニンであることが考えられる。これらのアミノ酸は、H5N1 鳥インフルエンザウイルスのマウスに対する病原性上昇に関する残基であることが報告されている[110,111]。

マウスへの馴化実験で得られた 3 系統の MA ウイルスのうちの 2 系統 (HK-MA1 および -MA2) は、PB2-E627K 変異を獲得していた。多くの先行研究により、PB2-E627K 変異は、鳥インフルエンザウイルスの哺乳類体内における増殖能を上げ、哺乳類への病原性を高めることが示されている[104-107]。この変異は、ウイルスゲノムの哺乳類細胞核内への輸送効率を高めるなどの効果に加え、哺乳類細胞においてウイルスのポリメラーゼ活性を上げることも知られており、哺乳類馴化に重要な因子であるとされる。本研究によって、PB1-K577E 変異は PB2-E627K 変異とは独立に H9N2 ウイルスのマウスに対する病原性と (図

1-1-2)、ヒト由来培養細胞におけるウイルスポリメラーゼ活性を上げること(図 1-1-4A, B)が示された。このことは、PB1-K577E 変異が PB2-E627K 変異と同様、鳥由来ウイルスのヒト馴化に重要であることを示唆する。実際、PB1-K577E の変異により低温環境のヒト由来細胞におけるポリメラーゼ活性が著しく上昇しているため(図 1-1-4B)、同変異を持つウイルスは、パンデミックウイルス株に見られる特徴であるヒト上部気道での増殖能を獲得している可能性がある。

先行研究では、ヒト由来 H3N2 ウイルスの研究室株 A/Hong Kong/1/68 をマウスで継代することにより PB1-K577E 変異を有するウイルスが選択されている[112]。しかし、この変異が、鳥ウイルスの哺乳類馴化に関係しているという報告は本研究が初めてである。自然界から分離されたウイルスの PB1-K577E 変異の保有状況を調べるため、NCBI データベース(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=database>)に存在するウイルスのゲノム配列を解析したところ、PB1 の 577 位に E を持つ H9N2 ウイルスは分離されていないばかりか、この位置に E を持つウイルスは他の亜型の哺乳類分離株においてさえ非常に稀であることが明らかになった(表 1-1-2)。つまり、PB1-K577E を持つ H9N2 ウイルスは自然環境においては容易に選択されない可能性がある。PB1-K577E 変異のみで H9N2 ウイルスの病原性が著しく上昇したという今回の結果は、RNA ポリメラーゼ複合体が鳥由来ウイルスの哺乳類への馴化に重要であることを示す新たな知見であるといえる。

PB1-K577E 変異が哺乳類細胞においてウイルス RNA ポリメラーゼの活性を上げる分子機構は不明である。感染細胞の核内において、PB1 サブユニットは PA と複合体を形成し、さらに PB2 と結合することで RNA ポリメラーゼ機能を発揮する。PB1 の 506 から 659 番目のアミノ酸は、PB2 との相互作用に関わることが知られているため[113]、577 番の変異は PB2 との結合性に影響を与えた可能性がある。A 型インフルエンザウイルスのポリメラーゼの立体構造によると、PB1 の 573 から 582 番アミノ酸が形成する α ヘリックスと PB2

の 93 から 102 番アミノ酸が形成する α ヘリックスおよび PB2-73D は相互作用することがわかる。特に、PB1-575S と PB2-101R、および PB1-578R と PB2-73D の間に強い極性結合の存在が推測される[114] (図 1-1-6A,B)。PB1 の 577 番目のアミノ酸は、PB2 と直接的に極性結合を形成しているわけではないが、K577E 変異によって PB1 の α ヘリックスが構造変化し、PB2 の α ヘリックスに対する結合性を変化させた可能性がある。この変化によって、哺乳類細胞におけるポリメラーゼ活性が変わり、さらには PB2-E627K 変異と同様、低温環境への適応につながったことが考えられる[115]。

また、PB1-K577E 変異により、PB1 サブユニットとそれに結合する宿主因子の相互作用が変化することによって、ポリメラーゼ活性が上昇した可能性もある。三次元構造において、PB1 の 564 から 577 番アミノ酸はポケット様の構造を形成していると推測され (図 1-1-6B)、何らかの宿主因子との結合に関わっていることが考えられる。PB1-K577E 変異は、負に帯電する K から正に帯電する E への変化であるため、この部位における電荷の環境が大きく変わり、その結果、宿主因子との結合性も変化した可能性がある。PB2-E627K や PB2-D701N といった変異は、インボーチン α など種に特異的な宿主因子との結合性の変化を通じて、鳥インフルエンザウイルスの哺乳類馴化に寄与することが知られている[116]。ただし、ウイルスポリメラーゼの三次元構造から、PB1 の 577 番アミノ酸は PB2 の 627 や 701 番アミノ酸とは反対側にあるため (図 1-1-6C)、PB1 と相互作用する可能性のある宿主因子は PB2 と相互作用する因子とは異なると考えられる。いずれにせよ、PB1-K577E 変異によるポリメラーゼ活性上昇の仕組みを解明するためには、PB1 と相互作用する宿主因子の同定や PB1-K577E 変異に伴うポリメラーゼの構造変化など、より詳細な研究が必要である。

HK-MA2 ウイルスが獲得した PA-T97I 変異は、H5N1 鳥インフルエンザウイルスの哺乳類細胞におけるポリメラーゼ活性を上げ、マウスに対する病原性を高めることが知られている[117]。さらに、同変異は PB2-E627K 変異と組み合わせることで H6N1 鳥由来ウイル

スのマウスに対する病原性を高め、より多様な臓器における増殖を可能とする[108]。実際に本実験においても、PA-T97I の変異を持つ HK-MA2 ウイルスはマウスに対する病原性を獲得した。したがって、PA-T97I 変異も H9N2 ウイルスの哺乳類馴化に重要であると考えられる。

HK-MA ウイルスが獲得した HA1-N132D および HA1-N198S 変異により N 型糖鎖が欠損する (図 1-1-5)。HA1-N198T 変異は HK-MA1 および MA2 ウイルスから見つかっており、過去の研究によって同変異を有する H9N2 ウイルスは 198 番目アミノ酸に結合する N 型糖鎖を欠損すること、および 198N の野生型ウイルスと比べヒト型レセプターへの結合性が高く、マウスにも高い病原性を示すことが報告されている[118,119]。本実験によって HA1-N198S 変異もマウスに対する病原性を上げることが示され (図 1-1-3)、198 番目アミノ酸の糖鎖欠損や、それに伴うレセプター結合性の変化が H9N2 ウイルスのマウス馴化に重要であることが示唆された。HA タンパク質の 132 番目および 198 番目アミノ酸はレセプター結合部位から同じくらいの距離に存在する[120](図 1-1-7B)。そのため、HA1-N132D 変異に伴う 132 番アミノ酸の糖鎖の欠損は、198 番アミノ酸の糖鎖欠損と同様、レセプター結合性を変化させた可能性がある。しかし、HA1-N132D 変異による病原性の上昇はごくわずかであったことを考えると (図 1-1-3)、同変異によるレセプター結合性の変化は、HA1-N198S/T 変異による程の影響はないと推測される。

本章本節では、マウス馴化 H9N2 ウイルスに見つかった PB1-K577E 変異を解析し、同変異が鳥インフルエンザウイルスの哺乳類馴化に重要である可能性を示した。この研究成果は、RNA ポリメラーゼの機能解析に貢献するだけでなく、パンデミックリスク評価のための鳥インフルエンザウイルスのサーベイランスにも貢献し得る。

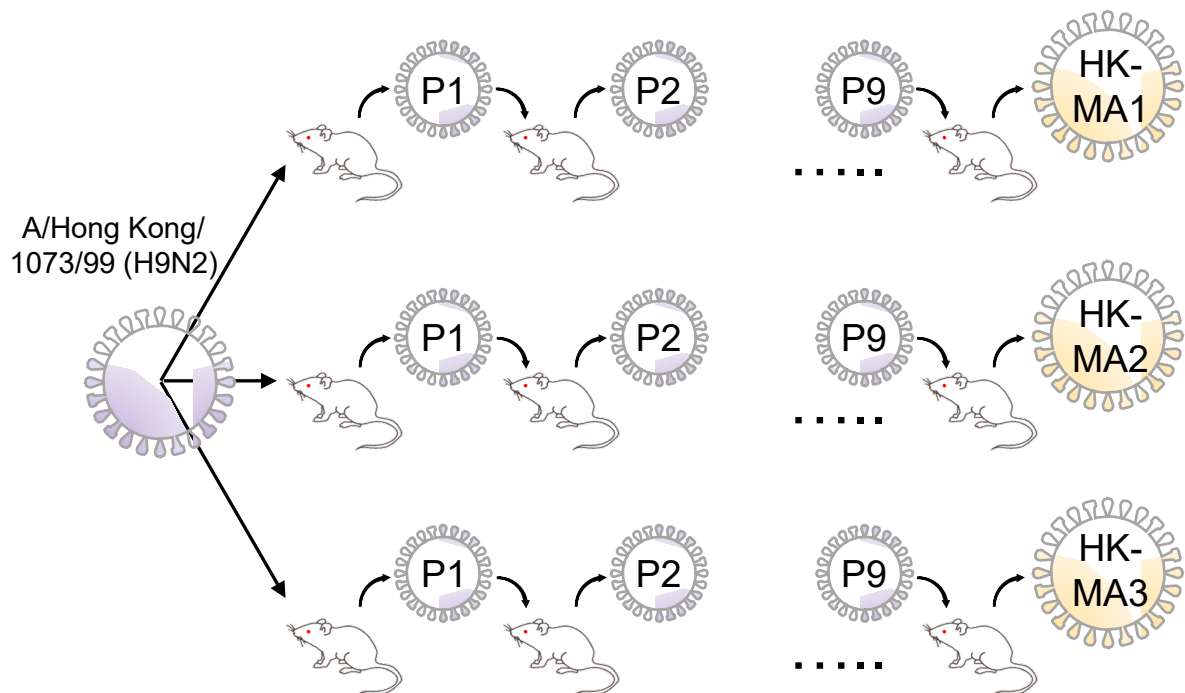


図1-1-1. マウス馴化ウイルス作製の概要

親株A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) を3匹のBALB/cマウスに経鼻感染させた。感染3日後にマウスの肺を採材し、20%肺乳剤を作った。乳剤上清から50 μ Lのウイルス液をとり、新しく準備した別のマウス3匹にそれぞれ経鼻感染させた。この操作を9回繰り返すことで、マウスに対する病原性を持つHK-MA1, 2, 3ウイルスを作製した。

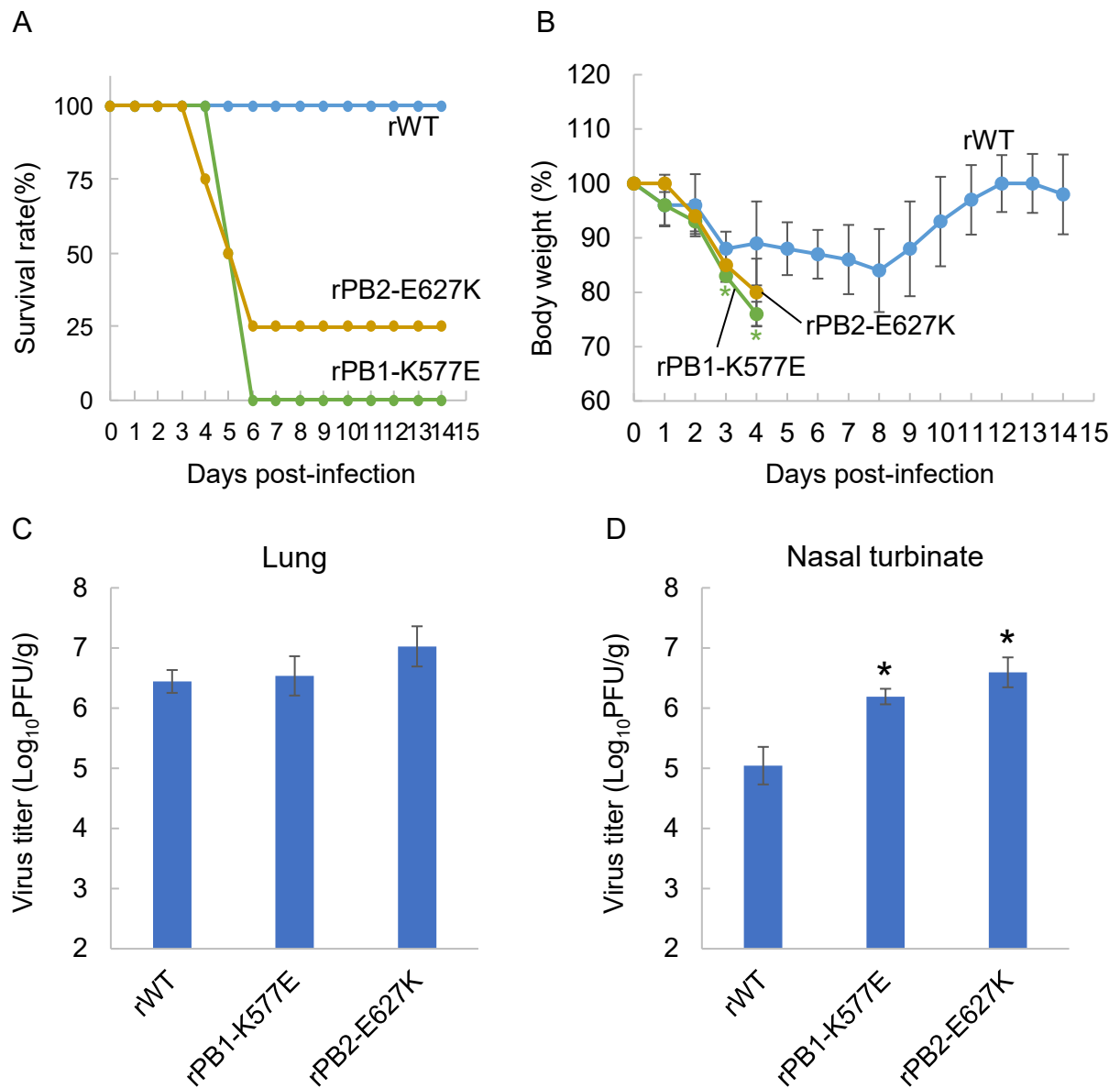


図1-1-2. ポリメラーゼに変異を有するウイルスのマウスに対する病原性

6週齢、雌のBALB/cマウスに 10^5 PFUの野生型 (rWT) または変異 (rPB1-K577EおよびrPB2-E627K) ウイルスを経鼻接種した (各群n=4)。14日にわたりウイルスを接種したマウスの (A) 死亡率および (B) 体重変化を記録した。25%以上の体重減少を示したマウスは安楽死した。アスタリスク (*) は変異ウイルス接種マウスの体重が野生型のマウスと比べて有意に変化していることを示す ($p < 0.05$, Student's *t*-test, 両側検定)。rWT、rPB1-K577E、rPB2-E627Kウイルスを接種したマウスの感染三日後における (C) 肺および (D) 鼻甲介のウイルス力価を測った (各群n=4)。乳剤中のウイルス力価はMDCK細胞を用いたプラークアッセイによって測り、PFU/g \pm 標準偏差として表した。アスタリスクは (*) ウイルスの増殖性がrWTに比べて上がっていることを示す ($p < 0.05$, Student's *t*-test, 両側検定)。

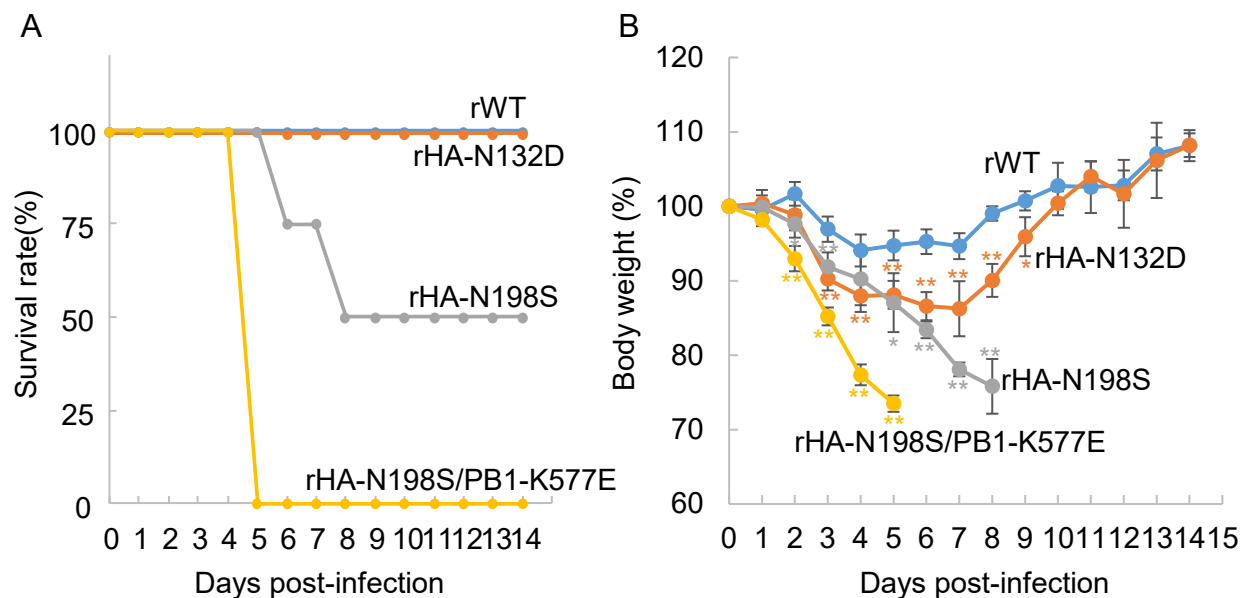


図1-1-3. HAに変異を有するウイルスのマウスに対する病原性

6週齢、雌のBALB/cマウスに 10^5 PFUの野生型 (rWT)、一変異 (rHA-N132DおよびrHA-N198N) または二変異 (rHA-N198S/PB1-K577E) ウイルスを経鼻接種した (各群n=4)。

14日にわたりウイルスを接種したマウスの (A) 死亡率および (B) 体重変化を記録した。

25%以上の体重減少を示したマウスは安楽死した。アスタリスク (* or **) は変異ウイルス接種マウスの体重が野生型のマウスと比べて有意に変化していることを示す ($p < 0.05$ or $p < 0.01$, Student's *t*-test, 両側検定)。

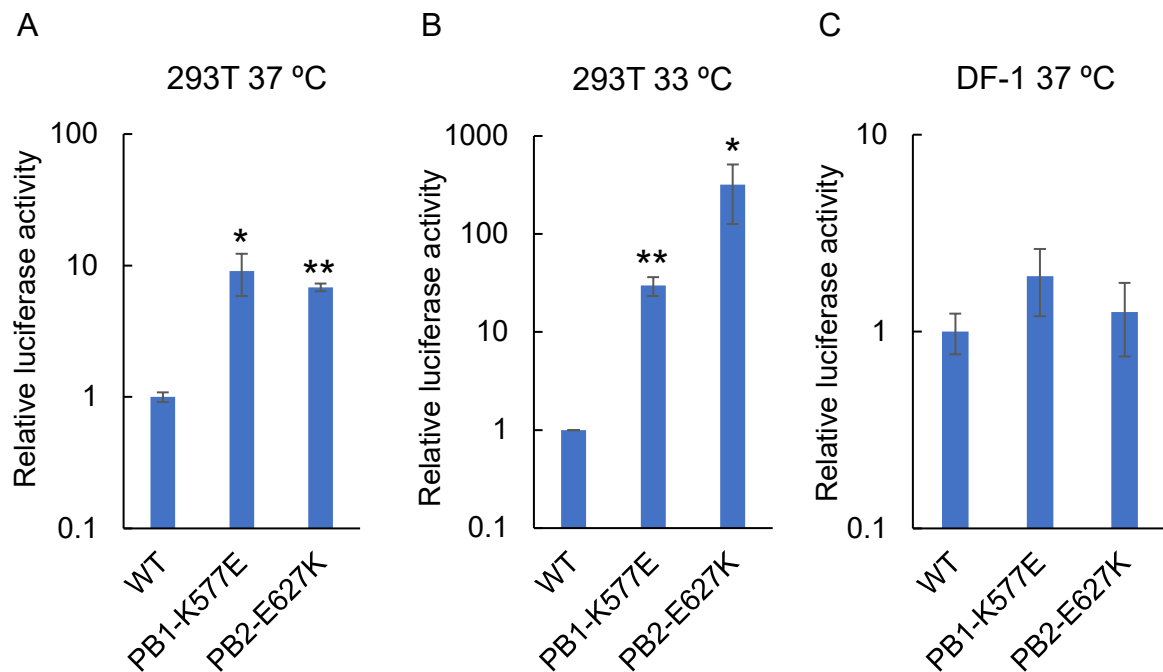


図1-1-4. PB1-K577E変異によるポリメラーゼ活性の変化

ルシフェラーゼアッセイによりウイルスポリメラーゼの活性を測った。野生型PB2またはPB2-E627K、野生型PB1またはPB1-K577Eタンパク質発現プラスミドを、PA、NPのタンパク質発現プラスミドおよびレポータープラスミドと共に、ヒト由来293T細胞またはニワトリ由来DF-1細胞にトランスフェクトした。レポータープラスミドはヒトまたはニワトリのRNAPolIIプロモーター下流に存在するウイルスゲノムにホタルルシフェラーゼの遺伝子が挿入された構造をしている。野生型ポリメラーゼの活性をコントロールとした。トランスフェクト24時間後の細胞溶解液をdua-luciferaseアッセイにより解析した。ウイルスRNAポリメラーゼによって発現したホタルルシフェラーゼの活性を内在コントロールであるウミシイタケルシフェラーゼの活性で標準化し、さらに野生型ポリメラーゼの活性を用いて標準化した。

(A) 37°C、(B) 33°Cで培養したHEK293T細胞および(C) 37°Cで培養したDF-1細胞における相対的ポリメラーゼ活性を、3回の独立した実験の平均値と標準偏差により示した。野生型と比べてポリメラーゼ活性が優位に上がっていることは、アスタリスク (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) によって示した (Student's *t*-test, 両側検定)。

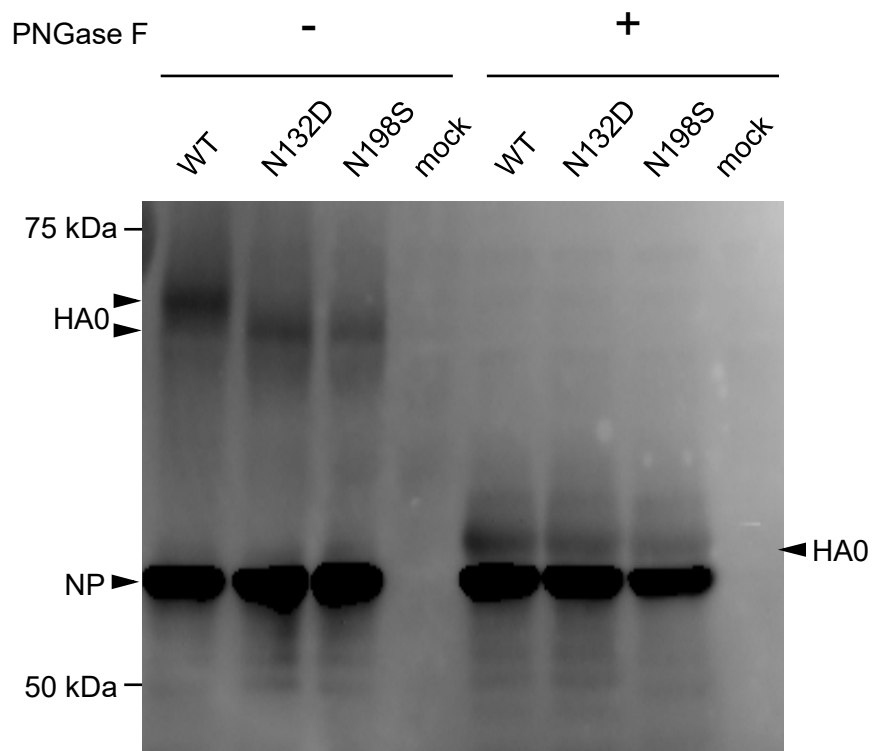


図1-1-5. 変異によるHAタンパク質の脱グリコシル化

野生型HAまたは変異HA（N132DまたはN198S）を持つウイルスをリバースジェネティクス法で作製し、MDCK細胞に感染させ、37°Cで12時間培養した。感染および非感染細胞からタンパク質を抽出し、その一部をPNGase Fで処理した。サンプルを8%のSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF膜に転写した。その後、H9N2ウイルスに対するマウスのポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング解析した。HA0とNPを矢頭で示した。

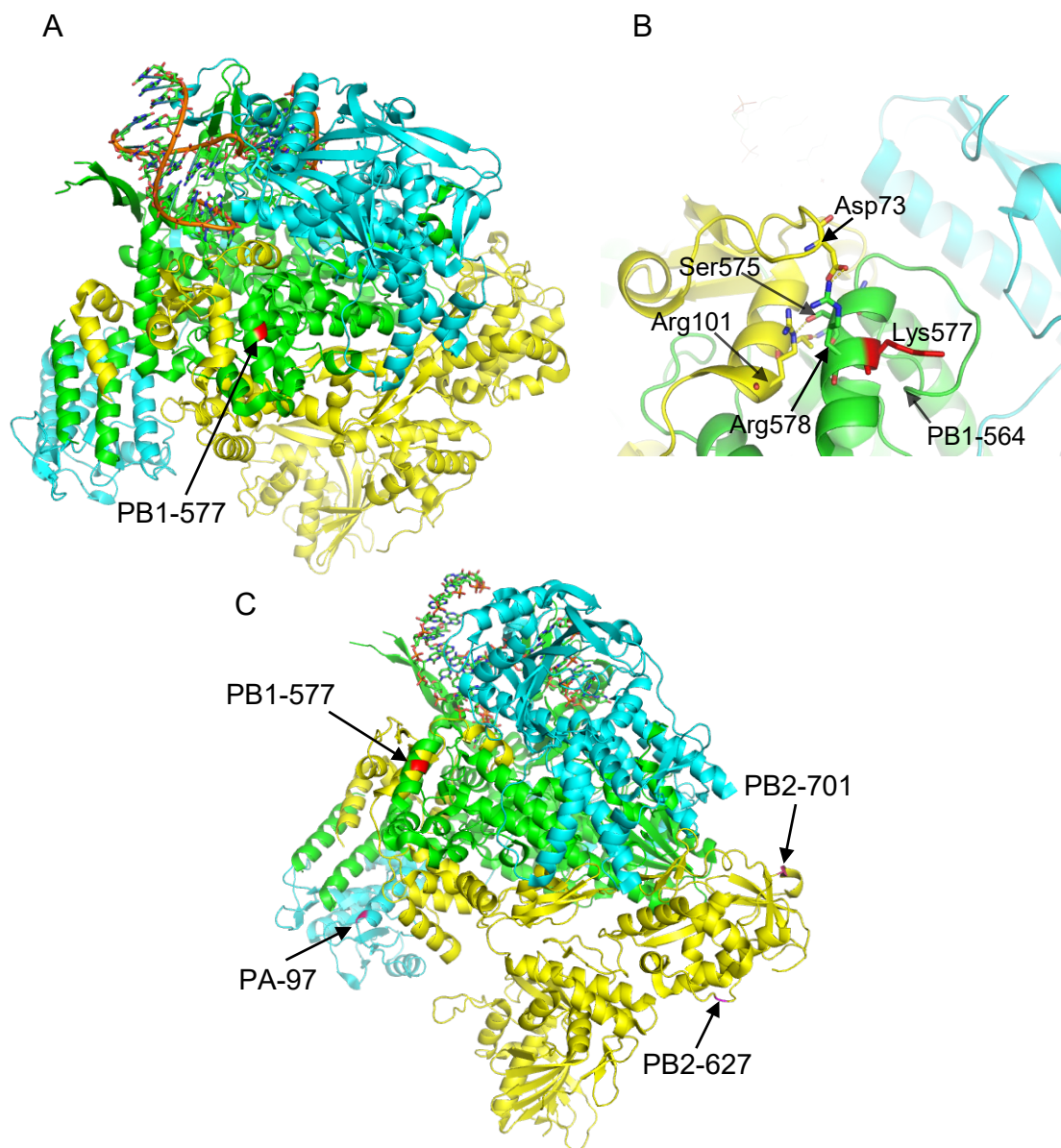


図1-1-6. ウイルスポリメラーゼ複合体の三次元構造 (PDB: 4WSB)

PB2、PB1、PAサブユニットはそれぞれ黄、緑、シアンで示されている。(A) PB1の577番アミノ酸を赤で示した。(B) PB1-577近傍の拡大図。PB2-Arg101とPB1-Ser575の間、およびPB2-Asp73とPB1-Arg578の間に極性結合が形成されている。(C) PB1-577、PA-97、PB2-627および哺乳類馴化に重要とされるPB2-701のアミノ酸の位置を示した。

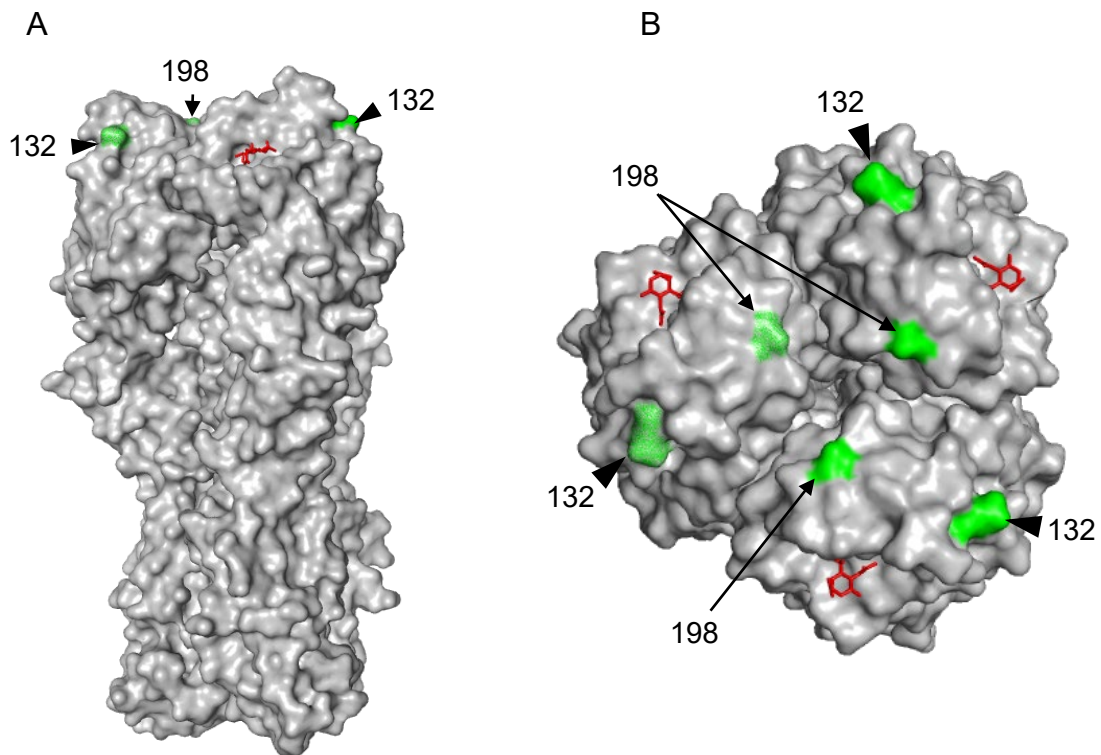


図1-1-7. HAの三次元構造 (PDB: 1JSH)

H9N2ウイルス由来HAタンパク質三量体の (A) 横方向からの視点図と (B) 上方向からの視点図。HA1の132および198番目アミノ酸を緑で表した。鳥型レセプター類似体LSTa (LS-tetrasaccharide a: Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc) 先端のシアル酸を赤で表した。

表1-1-1. 馴化ウイルスが獲得したアミノ酸変異

| Virus | Protein | Mutation |
|--------------|----------------|-----------------|
| HK-MA1 | HA1 | N132D * |
| | | I196M * |
| | | N198T * |
| | PB2 | E627K |
| HK-MA2 | HA1 | N198T * |
| | PB2 | E627K |
| | PA | T97I |
| HK-MA3 | HA1 | N198S * |
| | PB1 | K577E |

* H3 numbering.

表1-1-2. 鳥、ヒト、ブタ由来インフルエンザウイルスのPB1-577番アミノ酸

| Subtype | Avian | Human | Swine |
|---------|---------------|-----------------|---------------|
| H9N2 | K (1277/1283) | K (13/13) | K (21/22) |
| | R (6/1283) | | Q (1/22) |
| H1N1 | K (475/484) | K (9249/9273) | K (1965/2017) |
| | R (8/484) | R (16/9273) | R (29/2017) |
| | E (1/484) | N (6/9273) | N (19/2017) |
| | | Q (1/9273) | T (3/2017) |
| | | M (1/9273) | Q (1/2017) |
| H3N2 | K (304/306) | K (12138/12164) | K (1938/1944) |
| | R (2/306) | R (19/12164) | R (6/1944) |
| | | Q (2/12164) | |
| | | T (2/12164) | |
| | | N (2/12164) | |
| | | E (1/12164) | |
| H5N1 | K (1791/1853) | K (183/185) | K (25/26) |
| | R (61/1853) | R (2/185) | R (1/26) |
| | E (1/1853) | | |
| H7N9 | K (575/576) | K (92/92) | |
| | E (1/576) | | |

第一章第二節

H3N2 イヌインフルエンザウイルスの ネコ由来培養細胞への馴化

要旨

H3N2 イヌインフルエンザウイルスはアジアと北米の国々に拡がっている。ウイルスがイヌへの感染を繰り返すうち、稀ながらネコに対して感染することがある。仮にこのイヌウイルスがネコでも流行するようになれば、伴侶動物とヒトとの密接な関係性ゆえに、ウイルスのヒトに対する散発的感染の危険性が高まる。また同時に、パンデミックを起こす危険性を有す変異株出現の契機にもなり得る。その潜在性を評価するため、本章本節では、H3N2ウイルスがイヌからネコへ種を超えて感染するために必要な遺伝子変異を探索することを目的とした。ネコ由来 CRFK 細胞に馴化したイヌインフルエンザウイルスを解析したところ、様々なゲノム分節に変異が見つかった。そのうち、HA1-K299R、HA2-T107I、NA-L35R、M2-W41C 変異はそれぞれ個別に CRFK 細胞でのウイルス増殖性を上げた。これらの変異は組み合わせることで、CRFK 細胞だけでなくネコ由来 fcwf-4 細胞におけるウイルスの増殖性も上げた。HA1-K299R および HA2-T107I 変異はウイルスの熱安定性を上げることが明らかになり、さらに HA2-T107I 変異に関しては膜融合の pH 閾値を上げることも示された。以上の結果から、HA1-K299R および HA2-T107I を始めとする本実験で同定された変異が、H3N2 イヌインフルエンザウイルスのネコ馴化に重要であると考えられた。

1. 背景と目的

元来、水禽類を自然宿主とする A 型インフルエンザウイルスは、時に家禽にも伝播して病気を起こすが[24]、さらに変異を獲得することでヒトやブタ、ウマといった哺乳類にも伝播する。そして、特定の亜型のウイルスはそれら宿主動物に適応し、常在化している[121]。一方、イヌやネコに対する感染は昔から散発的に報告されているものの[122-127]、これらの伴侶動物は哺乳類の中でもインフルエンザウイルスに罹りにくいとされてきた[128]。しかし、近年 H3N8 および N3N2 亜型のイヌインフルエンザウイルス (CIV: canine influenza virus) が出現し、イヌに常在化した。H3N8 CIV は、2004 年に米国フロリダ州のレース用 그레이ハウンドから初めて検出され、研究の結果、近隣のウマから H3N8 ウマインフルエンザウイルスが直接伝播して、イヌ間で流行したことが明らかになった[37]。H3N2 CIV は 2007 年に韓国で初めて報告され、その由来は H3N2 鳥インフルエンザウイルスであることが明らかになった[38]。その後の疫学的研究から、同亜型の CIV は 2007 年以前から韓国や中国南部に存在していたことも示された[129,130]。2012 年には H3N2 CIV がタイのイヌから分離され[131]、ウイルスがアジア諸国のイヌ社会に侵入していることがわかった。2015 年には米国シカゴの動物保護施設で H3N2 CIV の集団感染が発生し、アジアから保護のために輸入したイヌの中に感染個体が含まれていたことが原因であると推測された[132]。それ以来、米国では H3N2 および H3N8 亜型 CIV の感染が全国的に拡大した[133]。2014 年以降は、H3 亜型だけでなく鳥由来 H5N1、H5N2、H6N1、H9N2 ウイルスが、アジア諸国の呼吸器症状を示すイヌから分離されている[96,134,135]。また 2013 年から 2015 年にかけて中国南部では、ブタ由来 H1N1 ウイルスのイヌへの感染が報告されており、同ウイルスが H3N2 亜型の CIV と共感染した結果、H1N1、H1N2、H3N2 のリアソータントウイルス (遺伝子交雑体) が発生した[136]。以上のように、イヌに対するインフルエンザウイルスの伝播が、近年相次いで報告されている。

ヒトや鳥由来インフルエンザウイルスの一部の株はネコに感染可能である。H3N2 ヒト季節性ウイルスは、ネコに感染することが血清学的調査で示されており[137,138]、また、2009年のヒトパンデミック由来ウイルス(H1N1pdm)はネコに感染し、死に至る重篤な臨床症状を引き起こすことが報告されている[139]。高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスは、家ネコに自然感染し重篤な症状を起こした[140]。また、2016年には米国で低病原性 H7N2 鳥インフルエンザウイルスが動物保護施設のネコ群に感染し、さらに診察をした獣医師がネコ経由でウイルスに感染して、軽度の呼吸器症状を示した[39]。実験条件下では、ヒト由来 H2N2 ウイルス、アザラシ由来 H7N7 ウイルス、鳥由来 H7N3 ウイルスなど様々なウイルスが家ネコに感染可能なことが報告されている[128,141,142]。

最近、韓国の二か所の動物保護施設で、H3N2 亜型の CIV がイヌと同じ場所に収容されていたネコに伝播した。ウイルスに感染したネコは重度の呼吸器症状を呈し、各施設におけるネコの死亡率はそれぞれ 21.7%および 40%であった[143,144]。また、H3N2 CIV のネコへの感染は中国でも報告されている[136]。

A 型インフルエンザウイルスの種を超えた感染には突然変異と遺伝子交雑が極めて重要であり、それによって新しい宿主に適応したウイルスによる新たな進化系統集団が形成される。例えば、H3N8 CIV は、H3N8 ウマインフルエンザウイルスの遺伝子変異によって発生し[37]、ヒトの H1N1pdm ウイルスは鳥、ヒト、ブタ由来ウイルスの遺伝子交雑およびヒト馴化を起こす遺伝子変異の獲得によって出現したとされる[45]。伴侶動物とヒトは共に生活しているため、伴侶動物のインフルエンザウイルスはヒト馴化に必要な遺伝子変異を獲得する、あるいはヒトの季節性ウイルスと遺伝子交雑を起こす可能性がありパンデミック株になる潜在性が高いと考えられる。実際に、H3N2 CIV と H1N1pdm ウイルスの遺伝子交雑がイヌの体内で発生している[59]。仮に、CIV がネコに馴化しネコの集団内で拡散すると、ウイルスのヒトに対する伝播機会が増え、公衆衛生上の問題になり得る。しかし、H3N2 CIV がネコに馴化する分子基盤はわかっていない。

本章本節では、H3N2 CIV をネコ由来培養細胞に馴化させることで生じる遺伝子変異を解析することにより、H3N2 CIV がイヌからネコへ種間伝播するメカニズムとその潜在性について評価した。

2. 材料と方法

2.1. 細胞とウイルス

イヌ腎臓由来 MDCK 細胞は 5% NCS を加えた MEM 培地で、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞およびネコ胎児由来 fcwf-4 細胞は 10% FBS を加えた DMEM 培地で、ネコ腎臓由来 CRFK 細胞は 5% FBS を加えた DMEM 培地を用いて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養、継代した。A/canine/Madison/5/2015 (H3N2) ウイルスは、ウィスコンシン大学獣医学部の Kathy Toohey-Kurth 博士から分与いただき、MDCK 細胞で増殖させ培養上清中のウイルスを-80°Cで凍結保存した。

2.2. プラークアッセイ

12well 培養プレートに播種した MDCK 単層細胞を MEM/BSA 培地で洗浄し、段階希釈したウイルス液を加え、37°Cで 60 分インキュベートした。ウイルス液を除き、細胞を洗浄した後、1%アガロースおよび 1 µg/mL の TPCK トリプシン (Worthington, Lakewood, NJ, USA) を添加した MEM/BSA 培地を重層した。感染細胞を 37°Cで 36 時間培養した後、染色液 (0.1%クリスタルバイオレット、20%メタノール) で細胞を染め、プラーク数を数えた。

2.3. H3N2 イヌインフルエンザウイルスの CRFK 細胞への馴化

3 枚の 35 mm 培養プレートに播種した CRFK 細胞に、野生型 A/canine/Madison/5/2015 (H3N2) ウイルスのストック (3.5×10^7 PFU/mL) を 1000 倍希釈して作製したウイルス液 100 µL を感染させ、0.3% BSA と 0.3 µg/mL の TPCK トリプシンを加えた DMEM 培地で維持した。感染 48 時間後に培養上清を回収し、遠心により細胞残渣を除いてストックした。その後、100 倍希釈した培養上清 100 µL を新しく準備した 3 枚の CRFK 細胞プレート

に感染させることを繰り返し、ウイルスを細胞に馴化させた。10 回継代後のウイルスを CRFK 馴化 (CA: CRFK-adapted) ウイルスとして、その後の実験に用いた。

2.4. シーケンス解析

野生型および CA ウイルスの RNA を ISOGEN-LS (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) により培養上清から抽出した。ウイルスのゲノム分節 3'末端に存在する保存領域に結合するプライマー (AGCRAAAGCAGG) と RevTraAce (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いてウイルス RNA を逆転写した。作製した cDNA を鋳型として各分節に特異的なプライマーを用いて PCR した[101]。PCR 産物は Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) で精製し、分節特異的なプライマーを用いてサンガーシーケンス (Applied biosystems 3170xl; Life technologies, Tokyo, Japan) により塩基配列を決定した。

2.5. リバースジェネティクス法

野生型および CA ウイルスから得たゲノム分節の cDNA を、RNA 発現プラスミド pHH21 に挿入した[102]。また、実験室株 A/WSN/33 由来の PB2、PB1、PA、NP 分節の翻訳領域を、分節特異的なプライマーで RT-PCR し、タンパク質発現プラスミド pCAGGS に挿入した。これらのプラスミドを用いて大腸菌 DH5 α を形質転換し、アンピシリンを添加した LB 寒天培地に塗菌し 37°C で培養した。大腸菌から各プラスミドを抽出した後、シーケンスによりインサートの配列が正しいことを確認した。

野生型および変異ウイルスを、過去の報告に従い人工的に作出した[102]。ウイルス RNA 発現プラスミドおよび PB2、PB1、PA、NP タンパク質発現プラスミドをトランスフェクション試薬 (TransIT-293; Mirus Bio, WI, USA) と混合し、室温で 15 分間インキュベートした後、HEK293T 細胞に添加した。細胞は Opti-MEM 培地 (Life technologies/GIBCO, Gland Island, NY, USA) で維持し、トランスフェクト 48 時間後に上清中のウイルスを MDCK 細

胞に感染させた。MDCK 細胞を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TPCK トリプシン添加 MEM/BSA 培地で維持し、感染 48 時間後の培養上清から細胞残渣を除いた後、 -80°C で保存した。

2.6. ウイルスの増殖性評価

MDCK 細胞には $\text{moi}=0.001$ のウイルスを感染させ、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TPCK トリプシンを加えた MEM/BSA 培地で維持した。CRFK 細胞および fcwf-4 細胞には $\text{moi}=0.01$ のウイルスを感染させ、それぞれ 0.3 または 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TPCK トリプシンを加えた DMEM/BSA 培地で維持した。12 時間ごとに培養上清を回収し、プラークアッセイによってウイルス力価を測った。

2.7. ウイルスの膜融合試験

過去の報告を参考にして膜融合試験を行った[145]。野生型および HA1-K299R または HA2-T107I 変異を持つウイルスの RNA を鋳型として、HA 分節の翻訳領域を RT-PCR し、タンパク質発現プラスミド pCAGGS に挿入した。プラスミドを大腸菌から精製した後、シーケンスによりインサートの配列が正しいことを確認した。野生型および変異 HA (HA1-K299R または HA2-T107I) 発現プラスミドを蛍光タンパク質発現プラスミド (pcDNA3.1-Venus) と共に PEI (Polysciences, Warrington, PA, USA) を用いて、MDCK 細胞にトランスフェクトし、細胞を 37°C で 24 時間培養した。その後、 Mg^{2+} と Ca^{2+} を含む PBS (PBS+) で細胞を 2 回洗浄し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TPCK トリプシンを含む PBS+ で 37°C 、5 分間処理して HA タンパク質を開裂させた。そして、4% NCS を含む PBS+ の添加によりトリプシンを不活化した。膜融合を惹起するため、クエン酸で pH を調節した PBS+ を細胞に 1 分間作用させた後、増殖培地を加えて 37°C で 60 分間インキュベートした。細胞の膜融合は蛍光顕微鏡 (Axio Vert.A1; ZEISS, Oberkochen, Germany) によって観察した。

2.8. ウイルスの熱安定性試験

過去の報告を参考にして熱安定性試験を行った[146]。野生型および HA1-K299R または HA2-T107I 変異を持つウイルスを 4×10^6 PFU/mL に希釈し、6 本のチューブに 180 μ L ずつ分注した。チューブを 42°C で 0、15、30、60、90、120 分間加熱し、加熱後は直ちに氷上で冷却した。その後、プラークアッセイにより感染性ウイルスの力価を測った。

2.9. バイオセーフティー

組換えウイルス等を用いた遺伝子組換え実験は、東京大学遺伝子組換え生物等の使用等実施規則に則り、東京大学農学生命科学研究科遺伝子組換え生物等委員会の許可の下、BSL2/P2 の実験室で実施した。

3. 結果

3.1. H3N2 亜型 CIV の CRFK 細胞への馴化

H3N2 CIV をネコ由来 CRFK 細胞で 2 日ごとに 10 回継代し、3 系統の馴化株を作製した。4 回継代以降のウイルスを感染させた細胞では明瞭な CPE が観察されるようになり、9 回継代以降のウイルスを感染させた場合、ほとんどの細胞が死亡した。そのため、10 回継代後の 3 系統のウイルスを CRFK 細胞馴化ウイルスとして、それぞれ Mad-CA1、-CA2、-CA3 (Mad-CA: Madison-CRFK-adapted) と名付け、その後の実験に用いた。まず、野生型および馴化ウイルスの CRFK 細胞における増殖性を比較した (図 1-2-1)。その結果、Mad-CA ウイルスは全ての時点において野生型ウイルスよりも有意に高い増殖性を示し、これら 3 系統のウイルスがネコ由来細胞に馴化していることが明らかになった。

3.2. CRFK 細胞馴化 CIV のシーケンス解析

Mad-CA ウイルスが獲得したアミノ酸変異を同定するため、全てのゲノム分節をシーケンスし、野生型ウイルスの配列と比較した (表 1-2-1)。その結果、HA、NP、NA、M 分節に変異が見つかった。なお、ポリメラーゼ遺伝子はウイルスが種間伝播する際に変異を獲得しやすいとされるが、予想外にも PB2、PB1、PA 分節に変異は生じていなかった。本研究では、エンベロープタンパク質に同定された HA1-K299R、HA2-T107I、NA-L35R、M2-W41C の変異に注目して実験を進めることにした。

3.3. CIV の CRFK 馴化に重要な遺伝子変異の探索

Mad-CA ウイルスに見つかった変異が CRFK 細胞におけるウイルスの増殖性に与える影響を調べるため、リバーシジェネティクス法によって、野生型ウイルス、一つの変異を持つウイルス (HA1-K299R, HA2-T107I, NA-L35R, M2-W41C)、二つの変異を持つウイルス

(HA1-K299R/NA-L35R, HA1-K299R/M2-W41C)、三つの変異を持つウイルス (HA1-K299R/NA-L35R/M2-W41C) を作出し、それぞれ rWT、rHA1-K299R、rHA2-T107I、rNA-L35R、rM2-W41C、rHA1-K299R/NA-L35R、rHA1-K299R/M2-W41C、rHA1-K299R/NA-L35R/M2-W41C と名付けた。これらのウイルスを CRFK 細胞に感染させ、増殖性を調べた。単独の変異のみを持つ 4 種類のウイルスは、ほとんどの時点で rWT より有意に高い力価を示した。特に、HA1-K299R や HA2-T107I の変異は NA-L35R や M2-W41C の変異よりもウイルス力価を高いレベルで上昇させた (図 1-2-2A)。また、変異を 2 つまたは 3 つ有するウイルスは、単独の変異のみを持つウイルスに比べて高い力価を示し、変異同士が相加的にウイルスの増殖性を上げる可能性が示された (図 1-2-2B)。これらの結果から、各変異は異なった仕組みで CRFK 細胞におけるウイルスの増殖性を上げており、それぞれが CIV の CRFK 細胞馴化に関与していることが示唆された。

3.4. HA の変異による膜融合活性の変化

HA1 の 299 番目のアミノ酸と HA2 の 107 番目のアミノ酸は、HA タンパク質のストーク領域あるいはその近傍に存在している。そのため、これらの変異によって HA の膜融合活性に影響が生じたのではないかと考えた。そこで、MDCK 細胞に野生型または変異 HA 発現プラスミドを Venus 発現プラスミドと共にトランスフェクトし、膜融合試験を行った。トランスフェクトから 24 時間後、細胞に様々な酸性 pH の緩衝液を作用させ、蛍光顕微鏡で膜融合を観察した (図 1-2-3)。pH が 5.8 以上の場合、野生型および変異 HA 発現細胞のいずれにおいても膜融合した細胞はみられなかった。一方、pH が 5.0、5.2、5.4 の場合は全ての HA 発現細胞において膜融合した細胞が観察された。pH 5.6 では、HA2-T107I の変異 HA を発現する細胞にのみ膜融合した細胞が観察された。以上の結果から、HA2-T107I 変異は、HA が膜融合を起こす pH の閾値を上げることが示された。

3.5. HA の変異による熱安定性の変化

HA1-K299R および HA2-T107I の変異が CRFK 細胞におけるウイルスの増殖性を上げる仕組みを考察するために、HA 変異ウイルスの熱安定性を評価した。ウイルスを希釈し、42°C で 0、15、30、60、90、120 分間加熱した後、感染性ウイルスの力価を測った。その結果、変異ウイルスでは rWT と比べて、力価の低下が緩やかであった (図 1-2-4)。このことから、HA1-K299R と HA2-T107I の両変異が CIV の熱安定性を上げることで、CRFK 細胞におけるウイルスの増殖性を上げた可能性がある。

3.6. 変異ウイルスのイヌおよびネコ由来培養細胞における増殖性評価

変異によってイヌ由来細胞におけるウイルスの増殖性が変わったかどうか調べるため、ウイルスの MDCK 細胞における増殖性を評価した。HA1-K299R および HA2-T107I の変異ウイルスは、いくつかの時点において rWT よりも高い力価を示したが、力価の差はわずかであった。NA-L35R および M2-W41C の変異ウイルスは rWT と類似した増殖性を示した (図 1-2-5A)。複数の変異を持つウイルスの増殖性からも、同様の傾向が確認された (図 1-2-5B)。以上の結果から、CIV が CRFK 細胞へ馴化するために重要な変異は、イヌ由来培養細胞におけるウイルス増殖性にほとんど影響を与えないことがわかった。

次に、変異によって他のネコ由来培養細胞におけるウイルスの増殖性が変わるかどうか調べるため、ウイルスのネコ胎児由来マクロファージ様 fcwf-4 細胞における増殖性を評価した。HA1-K299R および HA2-T107I 変異を持つ全てのウイルスは、CRFK 細胞の場合と同様、rWT に比べて高い増殖性を示した。一方、NA-L35R や M2-W41C 変異を単独で持つウイルスは、rWT と同等の増殖性を示した (図 1-2-5C)。ただし、NA-L35R の変異は HA1-K299R 変異と組合わさることで、相加的にウイルスの増殖性を上げた (図 1-2-5D)。以上の結果から、HA1-K299R および HA2-T107I 変異が、CIV のネコ由来培養細胞への馴化に重要であることが示唆された。

4. 考察

近年、CIV がアジア各国や米国に蔓延しており、イヌ由来ウイルスが直接または中間宿主を介してヒトに感染し、新たなパンデミックを引き起こすのではないかとという公衆衛生上の懸念が生じている[136]。ネコはイヌと同じく伴侶動物としてヒトと密接な関係にあること、また実際に、H3N2 CIV はネコに伝播し得ることから[143,144]、CIV に起因するパンデミックウイルスの出現を担う中間宿主になり得ると憂慮される。CIV がネコに馴化してネコの集団内で拡がれば、ネコだけでなくイヌにも感染できるため、ウイルスのヒトに対する感染機会が増えることになる。しかし、H3N2 CIV がネコに馴化する潜在性やその分子基盤はわかっていない。そこで本章本節では、ネコ由来 CRFK 細胞を用いて H3N2 CIV の馴化実験を実施することでこの課題に取り組んだ。その結果、HA1-K299R および HA2-T107I 変異が、膜融合の pH 閾値やウイルスの熱安定性を変化させることによって、ネコ由来細胞における CIV の増殖性を上げることを明らかにした。さらに、NA-L35R および M2-W41C 変異も、HA の変異ほどではないにせよ CIV のネコ由来培養細胞における増殖性を上げることがわかった。

2010 年に韓国の二か所の動物保護施設で、CIV がイヌからネコに直接伝播したことが報告された[143,144]。一方の保護施設に関する解析によると、ネコから分離された CIV には保護犬で蔓延していたウイルスと比べ 18 か所のアミノ酸変異が同定され、そのうち HA には HA1-S107P および HA1-S116G の二変異のみが生じており、これらが CIV のネコ馴化に重要である可能性が示された[143]。一方、本研究で同定した変異はこれらのアミノ酸変異と一致するものはなかったが、HA1-K299R 変異についてはこれら 2 つの HA1 の変異と同様、HA ヘッド領域の最下部に存在する (図 1-2-6A)。詳細は不明であるが、これらの HA1 変異は同じような機序で CIV のネコ馴化に関与している可能性がある。

HA タンパク質の膜融合活性の pH 閾値やウイルス熱安定性の変化は、H1N1、H5N2、

H9N2 ウイルスにおいて、培養細胞や異なる動物種への馴化に関与することが既に知られている[147,148,149]。興味深いことに、他の H3 亜型 (X-31 株) HA タンパク質の HA1-K299G/E 変異は膜融合を起こす pH 閾値を上げることが報告されているが[150]、本研究で見られた HA1-K299R 変異は膜融合の至適 pH に影響を与えなかった (図 1-2-3)。一方で、同変異はウイルスの熱安定性を上げることがわかった (図 1-2-4)。H3 亜型 HA タンパク質の 299 番目のアミノ酸であるリジン (K) は負電荷をもつ HA2-69E と極性結合を形成しており[15] (図 1-2-6B)、それがより大きい正電荷を持つアルギニン (R) へ変異した結果、極性結合が強まり、変異ウイルスの熱安定性が上昇した可能性がある。

HA2-T107I の変異は、膜融合の至適 pH とウイルス熱安定性の両方を上げた。先行研究により、HA2 の 39 番から 55 番目のアミノ酸により形成される α ヘリックスと HA2 の 107 番目周辺のアミノ酸との間の極性結合が、膜融合の至適 pH に大きく影響することが知られている[148,149,150]。したがって、HA2-T107I 変異により HA2-51K との間に存在した極性結合が消失し (図 1-2-6C)、膜融合の pH 閾値が広がったものと考えられる。なお、変異によって熱安定性が上がった原因についてはさらなる解析が必要である。

NA タンパク質の膜貫通領域に存在する 31 番から 35 番目のアミノ酸は、細胞膜の脂質ラフトとの相互作用に関与する[154]。そのため、馴化株が獲得した NA-L35R 変異によって脂質ラフトとの親和性が変わった可能性がある。脂質ラフトはウイルスが細胞膜から出芽する場として重要であることが示唆されており、NA-L35R 変異によりウイルス粒子に取り込まれる NA タンパク質の量が変化した可能性がある。エンベロープ上の NA 量の変化は、ウイルスの HA-NA 機能バランスを変化させ、それがネコ由来細胞での高いウイルス増殖をもたらす結果になったのかもしれない。

M2 タンパク質は、エンベロープを貫通するイオンチャネルであり、エンドソームの酸性 pH によって活性化される[155]。37 番目アミノ酸のヒスチジン (H) と 41 番目のトリプトファン (W) は、M2 タンパク質の機能発現に重要であるため保存性が高い (表 1-2-2、図

1-2-7)。これらアミノ酸の間に形成されるカチオン- π 相互作用は、M2 のプロトン選択的イオンチャネル活性を司り、特に M2-41W 残基は酸性になったウイルス粒子内からプロトンの流出を防ぐゲートキーパーの役割を果たす[153,154,155]。W41C 変異を持つ M2 は、ウイルス粒子外部の pH が高い場合においても高い膜コンダクタンスを示すことで、プロトンをウイルス粒子内に流入させることが先行研究で示されている[158]。今回の研究で、膜融合の pH 閾値を上げる HA2-T107I 変異が生じたことを考えると、HA タンパク質や M2 タンパク質の変異によってエンドソームの pH 環境に適応することが、CIV のネコ細胞への馴化に重要であると考えられる。

本研究では、H3N2 亜型 CIV のネコ由来培養細胞への馴化に必要な変異を複数同定し、その分子機構について明らかにした。今後、ネコを用いた感染実験により、馴化ウイルスがネコに高い増殖性や病原性を示すのかを評価する必要があるものの、本研究の成果は、H3N2 CIV が種間伝播するメカニズムの解明や、そのパンデミックリスク評価等に貢献すると考えられる。

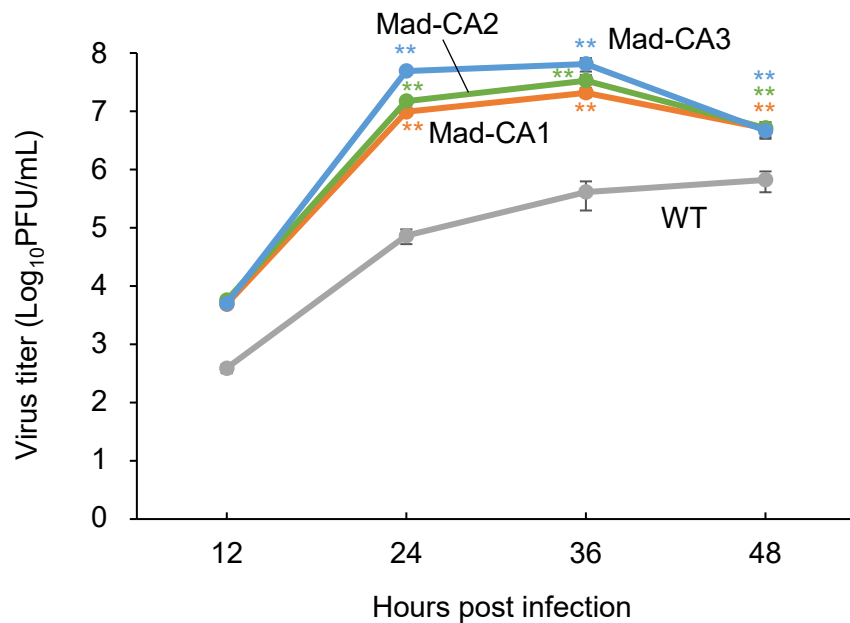


図1-2-1. CRFK細胞馴化ウイルスのCRFK細胞における増殖性

野生型 (WT) およびCRFK細胞馴化ウイルス (Mad-CA1, -CA2, -CA3) をCRFK細胞に moi=0.01で感染させ、培養上清を12時間ごとに回収し、上清中のウイルス力価をブランクアッセイにより測った。独立した3回の試行から得られた平均値と標準偏差を示した。アスタリスク (**) は野生型ウイルスと馴化ウイルスの増殖性に有意な差があったことを示す (p<0.01, Student's *t*-test, 両側検定)。

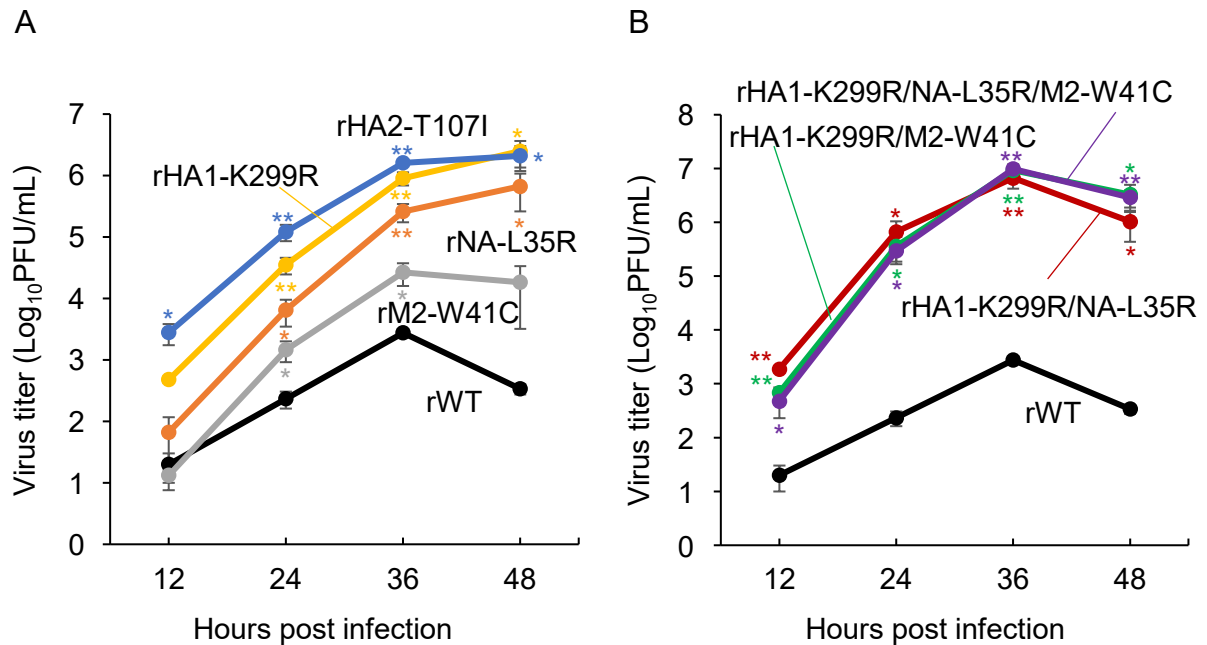


図1-2-2. リバースジェネティクス法で作製した変異ウイルスのCRFK細胞における増殖性

(A) 一つの変異を持つウイルス (rHA1-K299R, rHA2-T107I, rNA-L35R, rM2-W41C) と (B) 複数の変異を持つウイルス (rHA1-K299R/NA-L35R, rHA1-K299R/M2-W41C, rHA1-K299R/NA-L35R/M2-W41C) および野生型ウイルス (rWT) をCRFK細胞にmoi=0.01で感染させた。感染後12時間ごとに培養上清を回収し上清中のウイルス力価をブラックアッセイによって測った。独立した3回の試行から得られたデータの平均値と標準偏差を示した。アスタリスクは野生型と変異ウイルスの増殖性に有意な差があったことを示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's t -test, 両側検定)。

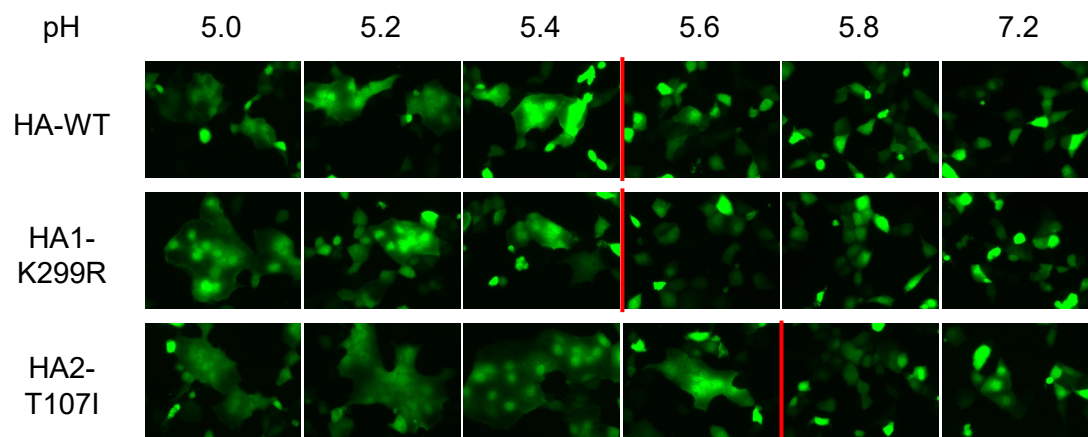


図1-2-3. HAが膜融合を起こすpH閾値の遺伝子変異による変化

変異HA（HA1-K299R, HA2-T107I）または野生型HA発現プラスミドを蛍光タンパク質 Venus発現プラスミドと共にMDCK細胞へトランスフェクトした。クエン酸で調整した様々なpHのPBS+で細胞を処理した後、蛍光顕微鏡で観察した。細胞膜の融合が起きている像と起きていない像の境界を赤線で示した。独立した3回の試験を行い、典型的なデータを示した。

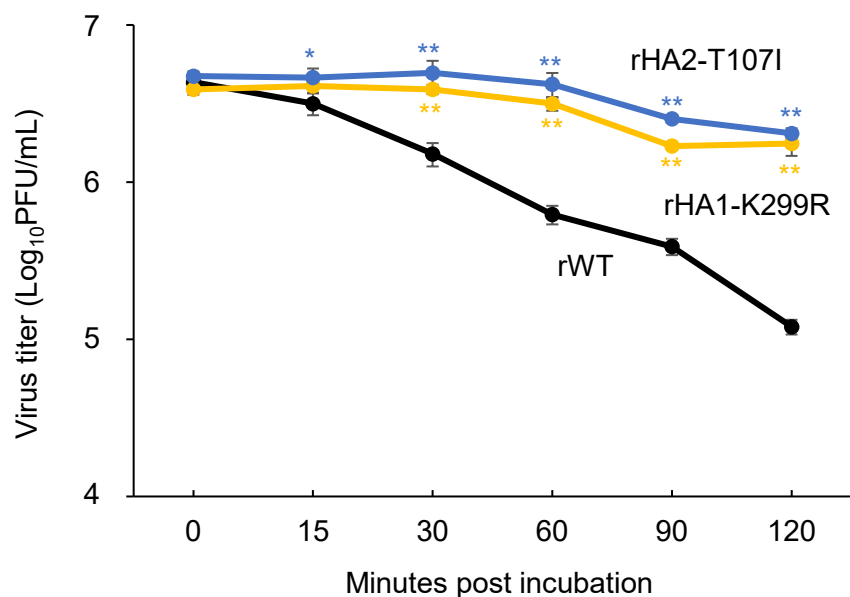


図1-2-4. 変異ウイルスの熱安定性

変異ウイルス（rHA1-K299R, rHA2-T107I）および野生型ウイルス（rWT）を 4×10^6 PFU/mLに希釈し、チューブに分注した。ウイルス液入りのチューブを42°Cで0、15、30、60、90、120分間インキュベートし、ウイルス力価をプラークアッセイにより測った。独立した3回の実験から得られたデータの平均値と標準偏差を示した。アスタリスクは変異ウイルスと野生型ウイルスの力価に有意な差があることを示す（* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's t -test, 両側検定）。

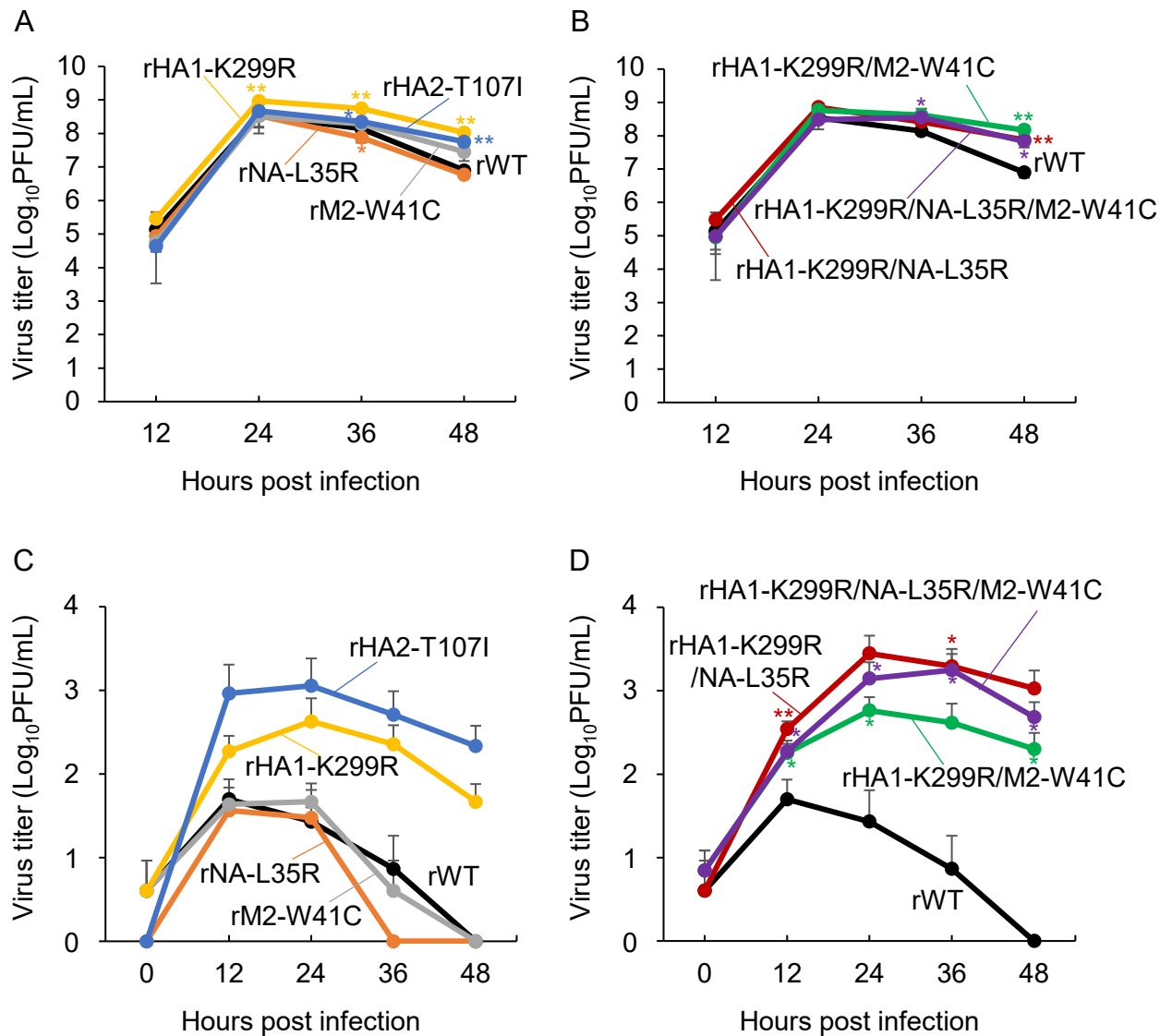


図1-2-5. 変異ウイルスのMDCK細胞およびfcwf-4細胞における増殖性

一つの変異を持つウイルス（rHA1-K299R, rHA2-T107I, rNA-L35R, rM2-W41S）、複数の変異を持つウイルス（rHA1-K299R/NA-L35R, rHA1-K299R/M2-W41C, rHA1-K299R/NA-L35R/M2-W41C）および野生型ウイルス（rWT）を（A）（B）MDCK細胞（moi=0.001）または（C）（D）fcwf-4細胞（moi=0.01）にそれぞれ感染させた。感染12時間ごとに細胞の上清を回収し、プラークアッセイによってウイルスの力価を測った。独立した3回の試行から得られたデータの平均値と標準偏差を示した。アスタリスクは野生型と変異ウイルスの増殖性に有意な差があったことを示す（* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's t -test, 両側検定）。

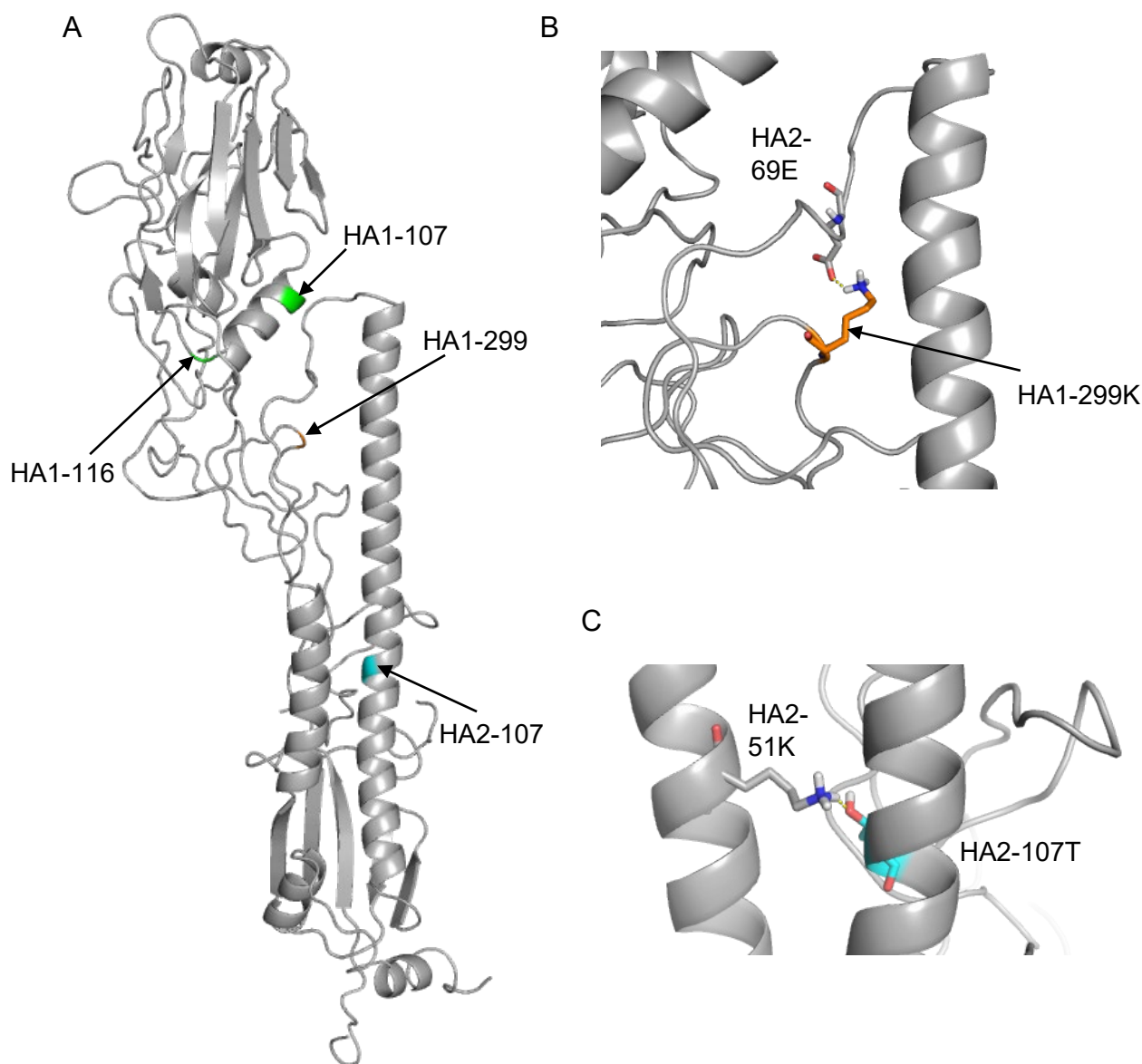


図1-2-6. H3亜型HAタンパク質の三次元構造

A/Aichi/2/1968 (H3N2) のHAタンパク質 (PDB: 1HGG) の立体構造。(A) CIVのCRFK細胞馴化で変異が生じたHA1-299番およびHA2-107番目アミノ酸の位置は、それぞれオレンジ、シアンで示されている。ネコから分離されたCIVはHA1-107番および116番目アミノ酸に変異を獲得しており[143]、それらの位置は緑色で示されている。(B) HA1-299番アミノ酸周辺の拡大図。HA1-299KとHA2-69Eの間に極性結合が形成されている。(C) HA2-107番アミノ酸周辺の拡大図。HA2-107TとHA2-51Kの間に極性結合が形成されている。

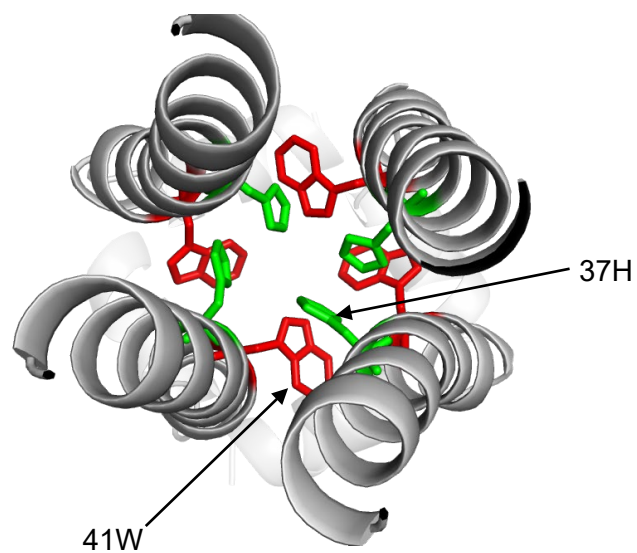


図1-2-7. M2タンパク質の三次元構造

A/Udorn/1972 (H3N2) のM2タンパク質四量体 (PDB: 2RLF) の立体構造。37Hと41Wはカチオン- π 相互作用しておりそれぞれ緑と赤で示されている。

表1-2-1. CAウイルスが獲得したアミノ酸変異

| Virus | Segment | | | | | | |
|-----------|---------|---------|-----|-----|----|-------|-------|
| | HA | | NP | | NA | M | |
| | HA1-299 | HA2-107 | 289 | 309 | 35 | M1-15 | M2-41 |
| Wild-type | K | T | Y | N | L | I | W |
| Mad-CA1 | K | I | C | N | R | I | C |
| Mad-CA2 | R | T | Y | N | R | T | C |
| Mad-CA3 | R | T | Y | S | R | I | C |

表1-2-2. 鳥、ヒト、ブタ由来ウイルスのM2の37番および41番目アミノ酸の種類

| Host | Subtype | Amino acid position in M2 | |
|-------|---------|---|--------------------------------|
| | | 37 | 41 |
| Avian | H1N1 | H (526/526) | W (526/526) |
| | H3N2 | H (277/277) | W (277/277) |
| | H5N1 | H (1872/1872) | W (1872/1872) |
| | H7N9 | H (667/667) | W (666/667) R (1/667) |
| Human | H1N1 | H (16662/16664) P (1/16664) Y (1/16664) | W (16663/16664) R (1/16664) |
| | H3N2 | H (21945/21947) P (1/21947) R (1/21947) | W (21947/21947) |
| | H5N1 | H (181/181) | W (181/181) |
| | H7N9 | H (118/118) | W (118/118) |
| | | | |
| Swine | H1N1 | H (3816/3816) | W (3816/3816) |
| | H3N2 | H (3001/3001) | W (3001/3001) |
| | H5N1 | H (20/20) | W (20/20) |
| | H7N9 | H (2/2) | W (2/2) |

引用文献

1. World Health Organization (WHO). Influenza (Seasonal). Available online: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (accessed on Dec 16, 2020).
2. World Health Organization (WHO). Up to 650 000 people die of respiratory diseases linked to seasonal flu each year. Available online: <https://www.who.int/news/item/13-12-2017-up-to-650-000-people-die-of-respiratory-diseases-linked-to-seasonal-flu-each-year> (accessed on Dec 16, 2020).
3. Viboud, C.; Simonsen, L.; Fuentes, R.; Flores, J.; Miller, M.A.; Chowell, G. Global mortality impact of the 1957–1959 influenza pandemic. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213*, 738–745.
4. World Health Organization (WHO). Pandemic Influenza Risk Management WHO Interim Guidance. Available online: https://www.sarinet.org/sites/default/files/media/Guidelines/who_pandemic_influenza_risk_management_interim_guidance_2013.pdf (accessed on Dec 16, 2020)
5. Hause, B.M.; Ducatez, M.; Collin, E.A.; Ran, Z.; Liu, R.; Sheng, Z.; Armien, A.; Kaplan, B.; Chakravarty, S.; Hoppe, A.D.; et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003176.
6. Murakami, S.; Sato, R.; Ishida, H.; Katayama, M.; Takenaka-Uema, A.; Horimoto, T. Influenza D virus of new phylogenetic lineage, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 168–171.
7. Subbarao, K. The critical interspecies transmission barrier at the animal-human interface. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2019**, *4*.
8. Tong, S.; Li, Y.; Rivaller, P.; Conrardy, C.; Alvarez Castillo, D.A.; Chen, L.M.; Recuenco,

- S.; Ellison, J.A.; Davis, C.T.; York, I.A.; et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 4269–4274.
9. Connor, R.J.; Kawaoka, Y.; Webster, R.G.; Paulson, J.C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **1994**, *205*, 17–23.
 10. Van Riel, D.; Munster, V.J.; De Wit, E.; Rimmelzwaan, G.F.; Fouchier, R.A.M.; Osterhaus, A.D.M.E.; Kuiken, T. H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. *Science*. **2006**, *312*, 399.
 11. Shinya, K.; Ebina, M.; Yamada, S.; Ono, M.; Kasai, N.; Kawaoka, Y. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* **2006**, *440*, 435–436.
 12. Nelli, R.K.; Kuchipudi, S. V.; White, G.A.; Perez, B.B.; Dunham, S.P.; Chang, K.C. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet. Res.* **2010**, *6*, 4.
 13. Childs, R.A.; Palma, A.S.; Wharton, S.; Matrosovich, T.; Liu, Y.; Chai, W.; Campanero-Rhodes, M.A.; Zhang, Y.; Eickmann, M.; Kiso, M.; et al. Receptor-binding specificity of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 797–799.
 14. Ji, Y.; White, Y.J.; Hadden, J.A.; Grant, O.C.; Woods, R.J. New insights into influenza A specificity: an evolution of paradigms. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *44*, 219–231.
 15. Sauter, N.K.; Hanson, J.E.; Glick, G.D.; Brown, J.H.; Crowther, R.L.; Park, S.J.; Skehel, J.J.; Wiley, D.C. Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and x-ray crystallography. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9609–9621.
 16. Chen, J.; Skehel, J.J.; Wiley, D.C. N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA2 subunit to form an N cap that terminates the triple-

- stranded coiled coil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 8967–8972.
17. Dou, D.; Revol, R.; Östbye, H.; Wang, H.; Daniels, R. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1.
 18. Scheiffele, P.; Roth, M.G.; Simons, K. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* **1997**, *16*, 5501–5508.
 19. Kundu, A.; Avalos, R.T.; Sanderson, C.M.; Nayak, D.P. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Virol.* **1996**, *70*, 6508–6515.
 20. Takeda, M.; Leser, G.P.; Russell, C.J.; Lamb, R.A. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 14610–14617.
 21. Leser, G.P.; Lamb, R.A. Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: A quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology* **2005**, *342*, 215–227.
 22. Cros, J.F.; Palese, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: Influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* **2003**, *95*, 3–12.
 23. Fujii, Y.; Goto, H.; Watanabe, T.; Yoshida, T.; Kawaoka, Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 2002–2007.
 24. Webster, R.G.; Bean, W.J.; Gorman, O.T.; Chambers, T.M.; Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 152–79.
 25. Yoon, S.W.; Webby, R.J.; Webster, R.G. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2014**, *385*, 359–375.

26. Pantin-Jackwood, M.J.; Swayne, D.E. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.* **2009**, *28*, 113-136.
27. Chen, H.; Smith, G.J.D.; Zhang, S.Y.; Qin, K.; Wang, J.; Li, K.S.; Webster, R.G.; Peiris, J.S.M.; Guan, Y. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* **2005**, *436*, 191-192.
28. Liu, J.; Xiao, H.; Lei, F.; Zhu, Q.; Qin, K.; Zhang, X.W.; Zhang, X.L.; Zhao, D.; Wang, G.; Feng, Y.; et al. Epidemiology: Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*. **2005**, *309*, 1206.
29. Yuen, K.Y.; Chan, P.K.S.; Peiris, M.; Tsang, D.N.C.; Que, T.L.; Shortridge, K.; Cheung, P.T.; To, W.K.; Ho, E.T.F.; Sung, R.; et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* **1998**, *351*, 467-471.
30. Claas, E.C.J.; Osterhaus, A.D.M.E.; Van Beek, R.; De Jong, J.C.; Rimmelzwaan, G.F.; Senne, D.A.; Krauss, S.; Shortridge, K.F.; Webster, R.G. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* **1998**, *351*, 472-477.
31. Yuan, J.; Zhang, L.; Kan, X.; Jiang, L.; Yang, J.; Guo, Z.; Ren, Q. Origin and molecular characteristics of a novel 2013 avian influenza A (H6N1) virus causing human infection in Taiwan. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *57*, 1367-1368.
32. Gao, R.; Cao, B.; Hu, Y.; Feng, Z.; Wang, D.; Hu, W.; Chen, J.; Jie, Z.; Qiu, H.; Xu, K.; et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 1888-1897.
33. Peiris, M.; Yuen, K.; Leung, C.; Chan, K.; Ip, P.; Lai, R.; Orr, W.; Shortridge, K. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* **1999**, *354*, 916-917.
34. Chen, H.; Yuan, H.; Gao, R.; Zhang, J.; Wang, D.; Xiong, Y.; Fan, G.; Yang, F.; Li, X.; Zhou, J.; et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian

- influenza A H10N8 virus infection: A descriptive study. *Lancet* **2014**, *383*, 714–721.
35. Takemae, N.; Shobugawa, Y.; Nguyen, P.T.; Nguyen, T.; Nguyen, T.N.; To, T.L.; Thai, P.D.; Nguyen, T.D.; Nguyen, D.T.; Nguyen, D.K.; et al. Effect of herd size on subclinical infection of swine in Vietnam with influenza A viruses. *BMC Vet. Res.* **2016**, *12*, 227.
 36. Yamanaka, T.; Niwa, H.; Tsujimura, K.; Kondo, T.; Matsumura, T. Epidemic of equine influenza among vaccinated racehorses in Japan in 2007. *J. Vet. Med. Sci.* **2008**, *70*, 623–625.
 37. Crawford, P.C.; Dubovi, E.J.; Castleman, W.L.; Stephenson, I.; Gibbs, E.P.J.; Chen, L.; Smith, C.; Hill, R.C.; Ferro, P.; Pompey, J.; et al. Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science*. **2005**, *310*, 482–485.
 38. Song, D.; Kang, B.; Lee, C.; Jung, K.; Ha, G.; Kang, D.; Park, S.; Park, B.; Oh, J. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 741–746.
 39. Belser, J.A.; Pulit-Penaloza, J.A.; Sun, X.; Brock, N.; Pappas, C.; Creager, H.M.; Zeng, H.; Tumpey, T.M.; Maines, T.R. A novel A(H7N2) influenza virus isolated from a veterinarian caring for cats in a New York City animal shelter causes mild disease and transmits poorly in the ferret model. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00672.
 40. Manz, B.; Schwemmle, M.; Brunotte, L. Adaptation of avian influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier. *J. Virol.* **2013**, *87*, 7200–7209.
 41. Taubenberger, J.K.; Reid, A.H.; Lourens, R.M.; Wang, R.; Jin, G.; Fanning, T.G. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* **2005**, *437*, 889–893.
 42. Morens, D.M.; Taubenberger, J.K.; Fauci, A.S. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 225–229.

43. Belshe, R.B. The Origins of Pandemic Influenza — Lessons from the 1918 Virus. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 2209–2211.
44. Kawaoka, Y.; Krauss, S.; Webster, R.G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* **1989**, *63*, 4603-4608.
45. Neumann, G.; Noda, T.; Kawaoka, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **2009**, *459*, 931–939.
46. Garten, R.J.; Davis, C.T.; Russell, C.A.; Shu, B.; Lindstrom, S.; Balish, A.; Sessions, W.M.; Xu, X.; Skepner, E.; Deyde, V.; et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. **2009**, *325*, 197–201.
47. Smith, G.J.D.; Vijaykrishna, D.; Bahl, J.; Lycett, S.J.; Worobey, M.; Pybus, O.G.; Ma, S.K.; Cheung, C.L.; Raghwani, J.; Bhatt, S.; et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **2009**, *459*, 1122–1125.
48. World Health Organization (WHO). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season.
https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201402_recommendation.pdf?ua=1 (accessed on Jan 11, 2021).
49. Iuliano, A.D.; Jang, Y.; Jones, J.; Davis, ; C Todd; David, ; Wentworth, E.; Uyeki, T.M.; Roguski, K.; Thompson, M.G.; Gubareva, L.; et al. Morbidity and mortality weekly report increase in human infections with avian influenza A(H7N9) virus during the fifth epidemic-China, October 2016-February 2017. *Morb Mortal Wkly. Rep.* **2017**, *66*, 245-255.
50. World Health Organization (WHO). Influenza at the human-animal interface. Available online:

- https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_09_12_2020.pdf?ua=1 (accessed on Jan 11, 2021).
51. Yang, L.; Zhao, X.; Li, X.; Bo, H.; Li, D.; Liu, J.; Wang, D. Case report for human infection with a highly pathogenic avian influenza A(H5N6) virus in Beijing, China 2019. *Biosaf. Heal.* **2020**, *2*, 49–52.
 52. Imai, M.; Watanabe, T.; Hatta, M.; Das, S.C.; Ozawa, M.; Shinya, K.; Zhong, G.; Hanson, A.; Katsura, H.; Watanabe, S.; et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* **2012**, *486*, 420–428.
 53. Herfst, S.; Schrauwen, E.J.A.; Linster, M.; Chutinimitkul, S.; De Wit, E.; Munster, V.J.; Sorrell, E.M.; Bestebroer, T.M.; Burke, D.F.; Smith, D.J.; et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*. **2012**, *336*, 1534–1541.
 54. Imai, M.; Watanabe, T.; Kiso, M.; Nakajima, N.; Yamayoshi, S.; Iwatsuki-Horimoto, K.; Hatta, M.; Yamada, S.; Ito, M.; Sakai-Tagawa, Y.; et al. A highly pathogenic avian H7N9 influenza virus isolated from a human is lethal in some ferrets infected via respiratory droplets. *Cell Host Microbe* **2017**, *22*, 615–626.
 55. Khan, S.U.; Anderson, B.D.; Heil, G.L.; Liang, S.; Gray, G.C. A systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of influenza A(H9N2) infection among humans. *J. Infect. Dis.* **2015**, *212*, 562–569.
 56. Li, X.; Shi, J.; Guo, J.; Deng, G.; Zhang, Q.; Wang, J.; He, X.; Wang, K.; Chen, J.; Li, Y.; et al. Genetics, receptor binding property, and transmissibility in mammals of naturally isolated H9N2 avian influenza viruses. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004508.
 57. Cong, Y.L.; Pu, J.; Liu, Q.F.; Wang, S.; Zhang, G.Z.; Zhang, X.L.; Fan, W.X.; Brown, E.G.; Liu, J.H. Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in

- China. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 2035–2041.
58. Choi, Y.K.; Ozaki, H.; Webby, R.J.; Webster, R.G.; Peiris, J.S.; Poon, L.; Butt, C.; Leung, Y.H.C.; Guan, Y. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. *J. Virol.* **2004**, *78*, 8609–8614.
 59. Song, D.; Moon, H.-J.; An, D.-J.; Jeoung, H.-Y.; Kim, H.; Yeom, M.-J.; Hong, M.; Nam, J.-H.; Park, S.-J.; Park, B.-K.; et al. A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 551–554.
 60. Jhung, M.A.; Epperson, S.; Biggerstaff, M.; Allen, D.; Balish, A.; Barnes, N.; Beaudoin, A.; Berman, L.; Bidol, S.; Blanton, L.; et al. Outbreak of variant influenza A(H3N2) virus in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *57*, 1703–1712.
 61. Sun, H.; Xiao, Y.; Liu, J.; Wang, D.; Li, F.; Wang, C.; Li, C.; Zhu, J.; Song, J.; Sun, H.; et al. Prevalent Eurasian avian-like H1N1 swine influenza virus with 2009 pandemic viral genes facilitating human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 17204–17210.
 62. Resende, P.C.; Born, P.S.; Matos, A.R.; Motta, F.C.; Caetano, B.C.; Debur, M. do C.; Riediger, I.N.; Brown, D.; Siqueira, M.M. Whole-genome characterization of a novel human influenza A(H1N2) virus variant, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 152–154.
 63. Borkenhagen, L.K.; Salman, M.D.; Ma, M.J.; Gray, G.C. Animal influenza virus infections in humans: A commentary. *Int. J. Infect. Dis.* **2019**, *88*, 113–119.
 64. Xu, Q.; Wang, W.; Cheng, X.; Zengel, J.; Jin, H. Influenza H1N1 A/Solomon Island/3/06 virus receptor binding specificity correlates with virus pathogenicity, antigenicity, and immunogenicity in ferrets. *J. Virol.* **2010**, *84*, 4936–4945.
 65. Gagneux, P.; Cheriyan, M.; Hurtado-Ziola, N.; Brinkman Van Der Linden, E.C.M.;

- Anderson, D.; McClure, H.; Varki, A.; Varki, N.M. Human-specific regulation of α 2-6-linked sialic acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48245–48250.
66. Hatta, M.; Zhong, G.; Gao, Y.; Nakajima, N.; Fan, S.; Chiba, S.; Deering, K.M.; Ito, M.; Imai, M.; Kiso, M.; et al. Characterization of a feline influenza A(H7N2) virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 75–86.
 67. Iwatsuki-Horimoto, K.; Nakajima, N.; Ichiko, Y.; Sakai-Tagawa, Y.; Noda, T.; Hasegawa, H.; Kawaoka, Y. Syrian hamster as an animal model for the study of human influenza virus infection. *J. Virol.* **2017**, *92*, e01693-17.
 68. Russell, C.J.; Hu, M.; Okda, F.A. Influenza hemagglutinin protein stability, activation, and pandemic risk. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 841–853.
 69. Subbarao, K.; Klimov, A.; Katz, J.; Regnery, H.; Lim, W.; Hall, H.; Perdue, M.; Swayne, D.; Bender, C.; Huang, J.; et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science.* **1998**, *279*, 393–396.
 70. Subbarao, E.K.; London, W.; Murphy, B.R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol.* **1993**, *67*, 1761–1764.
 71. Hudjetz, B.; Gabriel, G. Human-like PB2 627K influenza virus polymerase activity is regulated by importin- α 1 and - α 7. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002488.
 72. Long, J.S.; Giotis, E.S.; Moncorgé, O.; Frise, R.; Mistry, B.; James, J.; Morisson, M.; Iqbal, M.; Vignal, A.; Skinner, M.A.; et al. Species difference in ANP32A underlies influenza A virus polymerase host restriction. *Nature* **2016**, *529*, 101–104.
 73. Bortz, E.; Westera, L.; Maamary, J.; Steel, J.; Albrecht, R.A.; Manicassamy, B.; Chase, G.; Martínez-Sobrido, L.; Schwemmle, M.; García-Sastrea, A. Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins. *MBio* **2011**, *2*, e00151-11.

74. McFadden, E.R.; Pichurko, B.M.; Bowman, H.F.; Ingenito, E.; Burns, S.; Dowling, N.; Solway, J. Thermal mapping of the airways in humans. *J. Appl. Physiol.* **1985**, *58*, 564–570.
75. Shoham, D.; Jahangir, A.; Ruenphet, S.; Takehara, K. Persistence of avian influenza viruses in various artificially frozen environmental water types. *Influenza Res. Treat.* **2012**, *2012*, 1–11.
76. Massin, P.; Werf, S. Van Der; Naffakh, N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *Society* **2001**, *75*, 5398–5404.
77. Labadie, K.; Dos Santos Afonso, E.; Rameix-Welti, M.A.; van der Werf, S.; Naffakh, N. Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology* **2007**, *362*, 271–282.
78. Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1999**, *1473*, 4–8.
79. Kamiya, Y.; Satoh, T.; Kato, K. Molecular and structural basis for N-glycan-dependent determination of glycoprotein fates in cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2012**, *1820*, 1327–1337.
80. Yamashita, K.; Fukushima, K. The carbohydrate recognition by cytokines modulates their physiological activities. *Glycoconjugate J.* **2004**, *21*, 31–34.
81. Broszeit, F.; Tzarum, N.; Zhu, X.; Nemanichvili, N.; Eggink, D.; Leenders, T.; Li, Z.; Liu, L.; Wolfert, M.A.; Papanikolaou, A.; et al. N-glycolylneuraminic acid as a receptor for influenza A viruses. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 3284–3294.
82. Varki, A.; Diaz, S. The release and purification of sialic acids from glycoconjugates:

- Methods to minimize the loss and migration of O-acetyl groups. *Anal. Biochem.* **1984**, *137*, 236–247.
83. Fukushima, K.; Takahashi, T.; Ito, S.; Takaguchi, M.; Takano, M.; Kurebayashi, Y.; Oishi, K.; Minami, A.; Kato, T.; Park, E.Y.; et al. Terminal sialic acid linkages determine different cell infectivities of human parainfluenza virus type 1 and type 3. *Virology* **2014**, *464–465*, 424–431.
 84. Kubota, M.; Takeuchi, K.; Watanabe, S.; Ohno, S.; Matsuoka, R.; Kohda, D.; Nakakita, S.I.; Hiramatsu, H.; Suzuki, Y.; Nakayama, T.; et al. Trisaccharide containing α 2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 11579–11584.
 85. Baker, A.T.; Mundy, R.M.; Davies, J.A.; Rizkallah, P.J.; Parker, A.L. Human adenovirus type 26 uses sialic acid-bearing glycans as a primary cell entry receptor. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaax3567.
 86. Arnberg, N.; Edlund, K.; Kidd, A.H.; Wadell, G. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J. Virol.* **2000**, *74*, 42–48.
 87. Song, H.; Qi, J.; Khedri, Z.; Diaz, S.; Yu, H.; Chen, X.; Varki, A.; Shi, Y.; Gao, G.F. An open receptor-binding cavity of hemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein from newly-identified influenza D virus: Basis for its broad cell tropism. *PLOS Pathog.* **2016**, *12*, e1005411.
 88. Langereis, M.A.; Bakkers, M.J.G.; Deng, L.; Padler-Karavani, V.; Vervoort, S.J.; Hulswit, R.J.G.; van Vliet, A.L.W.; Gerwig, G.J.; de Poot, S.A.H.; Boot, W.; et al. Complexity and diversity of the mammalian sialome revealed by nidovirus virolectins. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 1966–1978.
 89. Homme, P.J.; Easterday, B.C. Avian influenza virus infections. III. Antibody response by

- turkeys to influenza A/turkey/Wisconsin/1966 virus. *Avian Dis.* **1970**, *14*, 277.
90. Guo, Y.J.; Krauss, S.; Senne, D.A.; Mo, I.P.; Lo, K.S.; Xiong, X.P.; Norwood, M.; Shortridge, K.F.; Webster, R.G.; Guan, Y. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology* **2000**, *267*, 279–288.
 91. Xu, K.M.; Li, K.S.; Smith, G.J.D.; Li, J.W.; Tai, H.; Zhang, J.X.; Webster, R.G.; Peiris, J.S.M.; Chen, H.; Guan, Y. Evolution and molecular epidemiology of H9N2 influenza A viruses from quail in Southern China, 2000 to 2005. *J. Virol.* **2007**, *81*, 2635–2645.
 92. Guan, Y.; Shortridge, K.F.; Krauss, S.; Webster, R.G. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9363–9367.
 93. International Centre for Diarrhoeal Disease Research, B. of T.P.R. of B. Outbreak of mild respiratory disease caused by H5N1 and H9N2 infections among young children in Dhaka, Bangladesh, *Health. Sci. Bull.* **2011**, *9*, 5-12.
 94. World Health Organization (WHO) Influenza at the human-animal interface. **2015**.
 95. Peiris, J.S.M.; Guan, Y.; Markwell, D.; Ghose, P.; Webster, R.G.; Shortridge, K.F. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in Southeastern China: Potential for genetic reassortment? *J. Virol.* **2001**, *75*, 9679–9686.
 96. Sun, X.; Xu, X.; Liu, Q.; Liang, D.; Li, C.; He, Q.; Jiang, J.; Cui, Y.; Li, J.; Zheng, L.; et al. Evidence of avian-like H9N2 influenza A virus among dogs in Guangxi, China. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *20*, 471–475.
 97. Zhang, K.; Zhang, Z.; Yu, Z.; Li, L.; Cheng, K.; Wang, T.; Huang, G.; Yang, S.; Zhao, Y.; Feng, N.; et al. Domestic cats and dogs are susceptible to H9N2 avian influenza virus.

Virus Res. **2013**, *175*, 52–57.

98. Zhang, K.; Xu, W.; Zhang, Z.; Wang, T.; Sang, X.; Cheng, K.; Yu, Z.; Zheng, X.; Wang, H.; Zhao, Y.; et al. Experimental infection of non-human primates with avian influenza virus (H9N2). *Arch. Virol.* **2013**, *158*, 2127–2134.
99. Matrosovich, M.N.; Krauss, S.; Webster, R.G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* **2001**, *281*, 156–162.
100. Wan, H.; Sorrell, E.M.; Song, H.; Hossain, M.J.; Ramirez-Nieto, G.; Monne, I.; Stevens, J.; Cattoli, G.; Capua, I.; Chen, L.-M.; et al. Replication and transmission of H9N2 influenza viruses in ferrets: Evaluation of pandemic potential. *PLoS One* **2008**, *3*, e2923.
101. Hoffmann, E.; Stech, J.; Guan, Y.; Webster, R.G.; Perez, D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* **2001**, *146*, 2275–2289.
102. Neumann, G.; Watanabe, T.; Ito, H.; Watanabe, S.; Goto, H.; Gao, P.; Hughes, M.; Perez, D.R.; Donis, R.; Hoffmann, E.; et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9345–9350.
103. Murakami, S.; Horimoto, T.; Yamada, S.; Kakugawa, S.; Goto, H.; Kawaoka, Y. Establishment of canine RNA polymerase I-driven reverse genetics for influenza A virus: Its application for H5N1 vaccine production. *J. Virol.* **2008**, *82*, 1605–1609.
104. Kim, J.H.; Hatta, M.; Watanabe, S.; Neumann, G.; Watanabe, T.; Kawaoka, Y. Role of host-specific amino acids in the pathogenicity of avian H5N1 influenza viruses in mice. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 1284–1289.
105. Munster, V.J.; de Wit, E.; van Riel, D.; Beyer, W.E.P.; Rimmelzwaan, G.F.; Osterhaus, A.D.M.E.; Kuiken, T.; Fouchier, R.A.M. The molecular basis of the pathogenicity of the Dutch highly pathogenic human influenza A H7N7 viruses. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 258–265.

106. Park, K.J.; Song, M.-S.; Kim, E.-H.; Kwon, H.; Baek, Y.H.; Choi, E.; Park, S.-J.; Kim, S.M.; Kim, Y.; Choi, W.-S.; et al. Molecular characterization of mammalian-adapted Korean-type avian H9N2 virus and evaluation of its virulence in mice. *J. Microbiol.* **2015**, *53*, 570–577.
107. Hatta, M.; Gao, P.; Halfmann, P.; Kawaoka, Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science.* **2001**, *293*, 1840–1842.
108. Cheng, K.; Yu, Z.; Chai, H.; Sun, W.; Xin, Y.; Zhang, Q.; Huang, J.; Zhang, K.; Li, X.; Yang, S.; et al. PB2-E627K and PA-T97I substitutions enhance polymerase activity and confer a virulent phenotype to an H6N1 avian influenza virus in mice. *Virology* **2014**, *468*, 207–213.
109. Le, Q.M.; Sakai-Tagawa, Y.; Ozawa, M.; Ito, M.; Kawaoka, Y. Selection of H5N1 influenza virus PB2 during replication in humans. *J. Virol.* **2009**, *83*, 5278–5281.
110. Jiao, P.; Tian, G.; Li, Y.; Deng, G.; Jiang, Y.; Liu, C.; Liu, W.; Bu, Z.; Kawaoka, Y.; Chen, H. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J. Virol.* **2008**, *82*, 1146–1154.
111. Fan, S.; Deng, G.; Song, J.; Tian, G.; Suo, Y.; Jiang, Y.; Guan, Y.; Bu, Z.; Kawaoka, Y.; Chen, H. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology* **2009**, *384*, 28–32.
112. Ping, J.; Keleta, L.; Forbes, N.E.; Dankar, S.; Stecho, W.; Tyler, S.; Zhou, Y.; Babiuk, L.; Weingartl, H.; Halpin, R.A.; et al. Genomic and protein structural maps of adaptive evolution of human influenza a virus to increased virulence in the mouse. *PLoS One* **2011**, *6*, e21740.
113. González, S.; Zürcher, T.; Ortín, J. Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a

- model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4456–4463.
114. Reich, S.; Guigligay, D.; Pflug, A.; Malet, H.; Berger, I.; Crépin, T.; Hart, D.; Lunardi, T.; Nanao, M.; Ruigrok, R.W.H.; et al. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. *Nature* **2014**, *516*, 361–366.
 115. Hatta, M.; Hatta, Y.; Kim, J.H.; Watanabe, S.; Shinya, K.; Nguyen, T.; Lien, P.S.; Le, Q.M.; Kawaoka, Y. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e133.
 116. Gabriel, G.; Klingel, K.; Otte, A.; Thiele, S.; Hudjetz, B.; Arman-Kalcek, G.; Sauter, M.; Schmidt, T.; Rother, F.; Baumgarte, S.; et al. Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 156.
 117. Song, M.-S.; Pascua, P.N.Q.; Lee, J.H.; Baek, Y.H.; Lee, O.-J.; Kim, C.-J.; Kim, H.; Webby, R.J.; Webster, R.G.; Choi, Y.K. The polymerase acidic protein gene of influenza A virus contributes to pathogenicity in a mouse model. *J. Virol.* **2009**, *83*, 12325–12335.
 118. Kaverin, N. V.; Rudneva, I.A.; Ilyushina, N.A.; Lipatov, A.S.; Krauss, S.; Webster, R.G. Structural differences among hemagglutinins of influenza A virus subtypes are reflected in their antigenic architecture: analysis of H9 escape mutants. *J. Virol.* **2004**, *78*, 240–249.
 119. Ilyushina, N.A.; Rudneva, I.A.; Khlenkov, A.M.; Timofeeva, T.A.; Krylov, P.S.; Webster, R.G.; Kaverin, N. V. Readaptation of a low-virulence influenza H9 escape mutant in mice: the role of changes in hemagglutinin as revealed by site-specific mutagenesis. *Arch. Virol.* **2010**, *155*, 107–110.
 120. Ha, Y.; Stevens, D.J.; Skehel, J.J.; Wiley, D.C. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 11181–11186.
 121. Joseph, U.; Su, Y.C.F.; Vijaykrishna, D.; Smith, G.J.D. The ecology and adaptive

- evolution of influenza A interspecies transmission. *Influenza Other Respi. Viruses* **2017**, *11*, 74–84.
122. Songserm, T.; Amonsin, A.; Jam-on, R.; Sae-Heng, N.; Pariyothorn, N.; Payungporn, S.; Theamboonlers, A.; Chutinimitkul, S.; Thanawongnuwech, R.; Poovorawan, Y. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1744–1747.
 123. Dundon, W.G.; De Benedictis, P.; Viale, E.; Capua, I. Serologic evidence of pandemic (H1N1) 2009 infection in dogs, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 2019–2021.
 124. Kuiken, T.; Rimmelzwaan, G.; van Riel, D.; van Amerongen, G.; Baars, M.; Fouchier, R.; Osterhaus, A. Avian H5N1 influenza in cats. *Science*. **2004**, *306*, 241–241.
 125. ProMED-mail Available online: <http://www.promedmail.org/> (accessed on Mar 7, 2019).
 126. Horimoto, T.; Gen, F.; Murakami, S.; Iwatsuki-Horimoto, K.; Kato, K.; Hisasue, M.; Sakaguchi, M.; Nidom, C.A.; Kawaoka, Y. Cats as a potential source of emerging influenza virus infections. *Viol. Sin.* **2015**, *30*, 221–223.
 127. Horimoto, T.; Gen, F.; Murakami, S.; Iwatsuki-Horimoto, K.; Kato, K.; Akashi, H.; Hisasue, M.; Sakaguchi, M.; Kawaoka, Y.; Maeda, K. Serological evidence of infection of dogs with human influenza viruses in Japan. *Vet. Rec.* **2014**, *174*, 96.2-96.
 128. Hinshaw, V.S.; Webster, R.G.; Easterday, B.C.; Bean, W.J. Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect. Immun.* **1981**, *34*, 354–61.
 129. Li, S.; Shi, Z.; Jiao, P.; Zhang, G.; Zhong, Z.; Tian, W.; Long, L.-P.; Cai, Z.; Zhu, X.; Liao, M.; et al. Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China. *Infect. Genet. Evol.* **2010**, *10*, 1286–1288.
 130. Lee, Y.-N.; Lee, D.-H.; Lee, H.-J.J.; Park, J.-K.; Yuk, S.-S.; Sung, H.-J.; Park, H.-M.; Lee, J.-B.; Park, S.-Y.; Choi, I.-S.; et al. Evidence of H3N2 canine influenza virus infection before 2007. *Vet. Rec.* **2012**, *171*, 477.1-477.

131. Bunpapong, N.; Nonthabenjawan, N.; Chaiwong, S.; Tangwangvivat, R.; Boonyapisitsopa, S.; Jairak, W.; Tuanudom, R.; Prakairungnamthip, D.; Suradhat, S.; Thanawongnuwech, R.; et al. Genetic characterization of canine influenza A virus (H3N2) in Thailand. *Virus Genes* **2014**, *48*, 56–63.
132. Newbury, S.; Godhardt-Cooper, J.; Poulsen, K.P.; Cigel, F.; Balanoff, L.; Toohey-Kurth, K. Prolonged intermittent virus shedding during an outbreak of canine influenza A H3N2 virus infection in dogs in three Chicago area shelters: 16 cases (March to May 2015). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2016**, *248*, 1022–1026.
133. Voorhees, I.E.H.; Glaser, A.L.; Toohey-Kurth, K.; Newbury, S.; Dalziel, B.D.; Dubovi, E.J.; Poulsen, K.; Leutenegger, C.; Willgert, K.J.E.; Brisbane-Cohen, L.; et al. Spread of canine influenza A(H3N2) virus, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1950–1957.
134. Lin, H.-T.; Wang, C.-H.; Chueh, L.-L.; Su, B.-L.; Wang, L.-C. Influenza A(H6N1) virus in dogs, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 2154–2157.
135. Guang-jian, Z.; Zong-shuai, L.; Yan-li, Z.; Shi-jin, J.; Zhi-jing, X. Genetic characterization of a novel influenza A virus H5N2 isolated from a dog in China. *Vet. Microbiol.* **2012**, *155*, 409–416.
136. Chen, Y.; Trovão, N.S.; Wang, G.; Zhao, W.; He, P.; Zhou, H.; Mo, Y.; Wei, Z.; Ouyang, K.; Huang, W.; et al. Emergence and evolution of novel reassortant influenza A viruses in canines in Southern China. *MBio* **2018**, *9*, e00909-18.
137. Zhang, X.; Shen, Y.; Du, L.; Wang, R.; Jiang, B.; Sun, H.; Pu, J.; Lin, D.; Wang, M.; Liu, J.; et al. Serological survey of canine H3N2, pandemic H1N1/09, and human seasonal H3N2 influenza viruses in cats in northern China, 2010–2014. *Viol. J.* **2015**, *12*, 50.
138. Ali, A.; Daniels, J.B.; Zhang, Y.; Rodriguez-Palacios, A.; Hayes-Ozello, K.; Mathes, L.; Lee, C.-W. Pandemic and seasonal human influenza virus infections in domestic cats:

- prevalence, association with respiratory disease, and seasonality patterns. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 4101–4105.
139. Fiorentini, L.; Taddei, R.; Moreno, A.; Gelmetti, D.; Barbieri, I.; De Marco, M.A.; Tosi, G.; Cordioli, P.; Massi, P. Influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus outbreak in a cat colony in Italy. *Zoonoses Public Health* **2011**, *58*, 573–581.
 140. Songserm, T.; Amonsin, A.; Jam-on, R.; Sae-Heng, N.; Meemak, N.; Pariyothorn, N.; Payungporn, S.; Theamboonlers, A.; Poovorawan, Y. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 681–683.
 141. Paniker, C.K.; Nair, C.M. Infection with A2 Hong Kong influenza virus in domestic cats. *Bull. World Health Organ.* **1970**, *43*, 859–862.
 142. Paniker, C.K.; Nair, C.M. Experimental infection of animals with influenzavirus types A and B. *Bull. World Health Organ.* **1972**, *47*, 461–463.
 143. Jeoung, H.-Y.; Lim, S.-I.; Shin, B.-H.; Lim, J.-A.; Song, J.-Y.; Song, D.-S.; Kang, B.-K.; Moon, H.-J.; An, D.-J. A novel canine influenza H3N2 virus isolated from cats in an animal shelter. *Vet. Microbiol.* **2013**, *165*, 281–286.
 144. Song, D.S.; An, D.J.; Moon, H.J.; Yeom, M.J.; Jeong, H.Y.; Jeong, W.S.; Park, S.J.; Kim, H.K.; Han, S.Y.; Oh, J.S.; et al. Interspecies transmission of the canine influenza H3N2 virus to domestic cats in South Korea, 2010. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2350–2355.
 145. Murakami, S.; Horimoto, T.; Ito, M.; Takano, R.; Katsura, H.; Shimojima, M.; Kawaoka, Y. Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *J. Virol.* **2012**, *86*, 1405–1410.
 146. Hanson, A.; Imai, M.; Hatta, M.; McBride, R.; Imai, H.; Taft, A.; Zhong, G.; Watanabe, T.; Suzuki, Y.; Neumann, G.; et al. Identification of stabilizing mutations in an H5

- hemagglutinin influenza virus protein. *J. Virol.* **2015**, *90*, 2981–2992.
147. Bourret, V.; Lyall, J.; Frost, S.D.W.; Teillaud, A.; Smith, C.A.; Leclaire, S.; Fu, J.; Gandon, S.; Guérin, J.-L.; Tiley, L.S. Adaptation of avian influenza virus to a swine host. *Virus Evol.* **2017**, *3*, vex007.
 148. Zaraket, H.; Bridges, O.A.; Russell, C.J. The pH of activation of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus replication and pathogenesis in mice. *J. Virol.* **2013**, *87*, 4826–4834.
 149. Sang, X.; Wang, A.; Ding, J.; Kong, H.; Gao, X.; Li, L.; Chai, T.; Li, Y.; Zhang, K.; Wang, C.; et al. Adaptation of H9N2 AIV in guinea pigs enables efficient transmission by direct contact and inefficient transmission by respiratory droplets. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–13.
 150. Rachakonda, P.S.; Veit, M.; Korte, T.; Ludwig, K.; Böttcher, C.; Huang, Q.; Schmidt, M.F.G.; Herrmann, A. The relevance of salt bridges for the stability of the influenza virus hemagglutinin. *FASEB J.* **2007**, *21*, 995–1002.
 151. Thoennes, S.; Li, Z.-N.; Lee, B.-J.; Langley, W.A.; Skehel, J.J.; Russell, R.J.; Steinhauer, D.A. Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion. *Virology* **2008**, *370*, 403–414.
 152. Daniels, R.S.; Downie, J.C.; Hay, A.J.; Knossow, M.; Skehel, J.J.; Wang, M.L.; Wiley, D.C. Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell* **1985**, *40*, 431–439.
 153. Reed, M.L.; Yen, H.-L.; DuBois, R.M.; Bridges, O.A.; Salomon, R.; Webster, R.G.; Russell, C.J. Amino acid residues in the fusion peptide pocket regulate the pH of activation of the H5N1 influenza virus hemagglutinin protein. *J. Virol.* **2009**, *83*, 3568–3580.
 154. Barman, S.; Nayak, D.P. Analysis of the transmembrane domain of influenza virus

- neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association. *J. Virol.* **2000**, *74*, 6538–6545.
155. Wang, C.; Lamb, R.A.; Pinto, L.H. Activation of the M2 ion channel of influenza virus: a role for the transmembrane domain histidine residue. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1363–1371.
 156. Schnell, J.R.; Chou, J.J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* **2008**, *451*, 591–595.
 157. Venkataraman, P.; Lamb, R.A.; Pinto, L.H. Chemical rescue of histidine selectivity filter mutants of the M2 ion channel of influenza A virus. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 21463–21472.
 158. Tang, Y.; Zaitseva, F.; Lamb, R.A.; Pinto, L.H. The Gate of the Influenza Virus M₂ Proton channel is formed by a single tryptophan residue. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39880–39886.
 159. Rogers, G.N.; Paulson, J.C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* **1983**, *127*, 361–373.
 160. Gambaryan, A.S.; Matrosovich, M.N. A solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity. *J. Virol. Methods* **1992**, *39*, 111–123.
 161. Stevens, J.; Blixt, O.; Paulson, J.C.; Wilson, I.A. Glycan microarray technologies: Tools to survey host specificity of influenza viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 857–864.
 162. Paulson, J.C.; Rogers, G.N.; Carroll, S.M.; Higa, H.H.; Pritchett, T.; Milks, G.; Sabesan, S. Selection of influenza virus variants based on sialyloligosaccharide receptor specificity. *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 797–805.
 163. Takahashi, T.; Takano, M.; Kurebayashi, Y.; Masuda, M.; Kawagishi, S.; Takaguchi, M.; Yamanaka, T.; Minami, A.; Otsubo, T.; Ikeda, K.; et al. N-glycolylneuraminic acid on

- human epithelial cells prevents entry of influenza A viruses that possess N-glycolylneuraminic acid binding ability. *J. Virol.* **2014**, *88*, 8445–8456.
164. Martinez-Duncker, I.; Dupré, T.; Piller, V.; Piller, F.; Candelier, J.J.; Trichet, C.; Tchernia, G.; Oriol, R.; Mollicone, R. Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Blood* **2005**, *105*, 2671–2676.
 165. Takashima, S.; Tsuji, S. Functional diversity of mammalian sialyltransferases. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2011**, *23*, 178–193.
 166. Takashima, S.; Tsuji, S.; Tsujimoto, M. Comparison of the enzymatic properties of mouse β -galactoside α 2,6-sialyltransferases, ST6Gal I and II. *J Biochem* **2003**, *134*, 287–296.
 167. Kamiki, H.; Matsugo, H.; Kobayashi, T.; Ishida, H.; Takenaka-Uema, A.; Murakami, S.; Horimoto, T. A PB1-K577E mutation in H9N2 influenza virus increases polymerase activity and pathogenicity in mice. *Viruses* **2018**, *10*, 653.
 168. Sanjana, N.E.; Shalem, O.; Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 783–784.
 169. Shimojima, M.; Ikeda, Y.; Kawaoka, Y. The mechanism of Axl-mediated ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 259–263.
 170. Hidari, K.I.P.J.; Yamaguchi, M.; Ueno, F.; Abe, T.; Yoshida, K.; Suzuki, T. Influenza virus utilizes N-linked sialoglycans as receptors in A549 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *436*, 394–399.
 171. Nishikaze, T.; Tsumoto, H.; Sekiya, S.; Iwamoto, S.; Miura, Y.; Tanaka, K. Differentiation of sialyl linkage isomers by one-pot sialic acid derivatization for mass spectrometry-based glycan profiling. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 2353–2360.

172. Hiono, T.; Matsuda, A.; Wagatsuma, T.; Okamatsu, M.; Sakoda, Y.; Kuno, A. Lectin microarray analyses reveal host cell-specific glycan profiles of the hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology* **2019**, *527*, 132–140.
173. Matrosovich, M.N.; Gambaryan, A.S. Solid-phase assays of receptor-binding specificity. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *865*, 71–94.
174. Yang, H.; Carney, P.J.; Chang, J.C.; Guo, Z.; Villanueva, J.M.; Stevens, J. Structure and receptor binding preferences of recombinant human A(H3N2) virus hemagglutinins. *Virology* **2015**, *477*, 18–31.
175. Chu, V.C.; Whittaker, G.R. Influenza virus entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 18153–18158.
176. Geisler, C.; Jarvis, D.L. Letter to the glyco-forum: Effective glycoanalysis with *Maackia amurensis* lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* **2011**, *21*, 988–993.
177. Bradley, K.C.; Jones, C.A.; Tompkins, S.M.; Tripp, R.A.; Russell, R.J.; Gramer, M.R.; Heimbürg-Molinaro, J.; Smith, D.F.; Cummings, R.D.; Steinhauer, D.A. Comparison of the receptor binding properties of contemporary swine isolates and early human pandemic H1N1 isolates (Novel 2009 H1N1). *Virology* **2011**, *413*, 169–182.
178. Stevens, J.; Blixt, O.; Glaser, L.; Taubenberger, J.K.; Palese, P.; Paulson, J.C.; Wilson, I.A. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 1143–1155.
179. Song, H.; Qi, J.; Xiao, H.; Bi, Y.; Zhang, W.; Xu, Y.; Wang, F.; Shi, Y.; Gao, G.F. Avian-to-human receptor-binding adaptation by influenza A virus hemagglutinin H4. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 1201–1214.

180. Eriksson, P.; Lindskog, C.; Engholm, E.; Blixt, O.; Waldenström, J.; Munster, V.; Lundkvist, Å.; Olsen, B.; Jourdain, E.; Ellström, P. Characterization of avian influenza virus attachment patterns to human and pig tissues. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–9.
181. Wang, F.; Qi, J.; Bi, Y.; Zhang, W.; Wang, M.; Zhang, B.; Wang, M.; Liu, J.; Yan, J.; Shi, Y.; et al. Adaptation of avian influenza A (H6N1) virus from avian to human receptor-binding preference. *EMBO J.* **2015**, *34*, 1661–1673.
182. El-Shesheny, R.; Franks, J.; Marathe, B.M.; Hasan, M.K.; Feeroz, M.M.; Krauss, S.; Vogel, P.; McKenzie, P.; Webby, R.J.; Webster, R.G. Genetic characterization and pathogenic potential of H10 avian influenza viruses isolated from live poultry markets in Bangladesh. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12.
183. Yamada, S.; Suzuki, Y.; Suzuki, T.; Le, M.Q.; Nidom, C.A.; Sakai-Tagawa, Y.; Muramoto, Y.; Ito, M.; Kiso, M.; Horimoto, T.; et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **2006**, *444*, 378–382.
184. Bateman, A.C.; Karamanska, R.; Busch, M.G.; Dell, A.; Olsen, C.W.; Haslam, S.M. Glycan analysis and influenza A virus infection of primary swine respiratory epithelial cells: The importance of NeuAc α 2-6 glycans. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 34016–34026.
185. Chandrasekaran, A.; Srinivasan, A.; Raman, R.; Viswanathan, K.; Raguram, S.; Tumpey, T.M.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 107–113.
186. Walther, T.; Karamanska, R.; Chan, R.W.Y.; Chan, M.C.W.; Jia, N.; Air, G.; Hopton, C.; Wong, M.P.; Dell, A.; Malik Peiris, J.S.; et al. Glycomic analysis of human respiratory tract tissues and correlation with influenza virus infection. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003223.

187. Jia, N.; Byrd-Leotis, L.; Matsumoto, Y.; Gao, C.; Wein, A.N.; Lobby, J.L.; Kohlmeier, J.E.; Steinhauer, D.A.; Cummings, R.D. The human lung glycome reveals novel glycan ligands for influenza A virus. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5320.
188. Byrd-Leotis, L.; Jia, N.; Dutta, S.; Trost, J.F.; Gao, C.; Cummings, S.F.; Braulke, T.; Müller-Loennies, S.; Heimbürg-Molinari, J.; Steinhauer, D.A.; et al. Influenza binds phosphorylated glycans from human lung. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaav2554.
189. Wang, Y.F.; Chang, C.F.; Tsai, H.P.; Chi, C.Y.; Su, I.J.; Wang, J.R. Glycan-binding preferences and genetic evolution of human seasonal influenza A (H3N2) viruses during 1999-2007 in Taiwan. *PLoS One* **2018**, *13*, e0196727.
190. Byrd-Leotis, L.; Liu, R.; Bradley, K.C.; Lasanajak, Y.; Cummings, S.F.; Song, X.; Heimbürg-Molinari, J.; Galloway, S.E.; Culhane, M.R.; Smith, D.F.; et al. Shotgun glycomics of pig lung identifies natural endogenous receptors for influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 2241–2250.
191. Bradley, K.C.; Galloway, S.E.; Lasanajak, Y.; Song, X.; Heimbürg-Molinari, J.; Yu, H.; Chen, X.; Talekar, G.R.; Smith, D.F.; Cummings, R.D.; et al. Analysis of influenza virus hemagglutinin receptor binding mutants with limited receptor recognition properties and conditional replication characteristics. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12387–12398.
192. Hensley, S.E.; Das, S.R.; Bailey, A.L.; Schmidt, L.M.; Hickman, H.D.; Jayaraman, A.; Viswanathan, K.; Raman, R.; Sasisekharan, R.; Bennink, J.R.; et al. Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift. *Science.* **2009**, *326*, 734–736.
193. de Vries, R.P.; de Vries, E.; Martinez-Romero, C.; McBride, R.; van Kuppeveld, F.J.; Rottier, P.J.M.; Garcia-Sastre, A.; Paulson, J.C.; de Haan, C.A.M. Evolution of the hemagglutinin protein of the new pandemic H1N1 influenza virus: Maintaining optimal

- receptor binding by compensatory substitutions. *J. Virol.* **2013**, *87*, 13868–13877.
194. Nobusawa, E.; Ishihara, H.; Morishita, T.; Sato, K.; Nakajima, K. Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): A single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. *Virology* **2000**, *278*, 587–596.
 195. Lin, Y.P.; Xiong, X.; Wharton, S.A.; Martin, S.R.; Coombs, P.J.; Vachieri, S.G.; Christodoulou, E.; Walker, P.A.; Liu, J.; Skehel, J.J.; et al. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 21474–21479.
 196. Lu, B.; Zhou, H.; Chan, W.; Kemble, G.; Jin, H. Single amino acid substitutions in the hemagglutinin of influenza A/Singapore/21/04 (H3N2) increase virus growth in embryonated chicken eggs. *Vaccine* **2006**, *24*, 6691–6693.
 197. Chambers, B.S.; Li, Y.; Hodinka, R.L.; Hensley, S.E. Recent H3N2 influenza virus clinical isolates rapidly acquire hemagglutinin or neuraminidase mutations when propagated for antigenic analyses. *J. Virol.* **2014**, *88*, 10986–10989.
 198. Ding, Y.O.; Barr, I.G.; Mosse, J.A.; Laurie, K.L. MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 2189–2194.
 199. Peng, W.; de Vries, R.P.; Grant, O.C.; Thompson, A.J.; McBride, R.; Tsogtbaatar, B.; Lee, P.S.; Razi, N.; Wilson, I.A.; Woods, R.J.; et al. Recent H3N2 viruses have evolved specificity for extended, branched human-type receptors, conferring potential for increased avidity. *Cell Host Microbe* **2017**, *21*, 23–34.
 200. Londrigan, S.L.; Turville, S.G.; Tate, M.D.; Deng, Y.-M.; Brooks, A.G.; Reading, P.C. N-linked glycosylation facilitates sialic acid-independent attachment and entry of influenza

- A viruses into cells expressing DC-SIGN or L-SIGN. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2990–3000.
201. Gillespie, L.; Roosendahl, P.; Ng, W.C.; Brooks, A.G.; Reading, P.C.; Londrigan, S.L. Endocytic function is critical for influenza A virus infection via DC-SIGN and L-SIGN. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11.
 202. Karakus, U.; Thamamongood, T.; Ciminski, K.; Ran, W.; Günther, S.C.; Pohl, M.O.; Eletto, D.; Jeney, C.; Hoffmann, D.; Reiche, S.; et al. MHC class II proteins mediate cross-species entry of bat influenza viruses. *Nature* **2019**, *567*, 109–112.
 203. Giotis, E.S.; Carnell, G.; Young, E.F.; Ghanny, S.; Soteropoulos, P.; Wang, L.F.; Barclay, W.S.; Skinner, M.A.; Temperton, N. Entry of the bat influenza H17N10 virus into mammalian cells is enabled by the MHC class II HLA-DR receptor. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 2035–2038.
 204. de Graaf, M.; Fouchier, R.A.M. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* **2014**, *33*, 823–841.
 205. Shi, Y.; Wu, Y.; Zhang, W.; Qi, J.; Gao, G.F. Enabling the “host jump”: Structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 822–831.
 206. Xiong, X.; Martin, S.R.; Haire, L.F.; Wharton, S.A.; Daniels, R.S.; Bennett, M.S.; McCauley, J.W.; Collins, P.J.; Walker, P.A.; Skehel, J.J.; et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans. *Nature* **2013**, *499*, 496–499.
 207. Taubenberger, J.K.; Reid, A.H.; Janczewski, T.A.; Fanning, T.G. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **2001**, *356*, 1829–1839.
 208. Xiong, X.; Coombs, P.J.; Martin, S.R.; Liu, J.; Xiao, H.; McCauley, J.W.; Locher, K.;

- Walker, P.A.; Collins, P.J.; Kawaoka, Y.; et al. Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus. *Nature* **2013**, *497*, 392–396.
209. Pappas, C.; Viswanathan, K.; Chandrasekaran, A.; Raman, R.; Katz, J.M.; Sasisekharan, R.; Tumpey, T.M. Receptor specificity and transmission of H2N2 subtype viruses isolated from the pandemic of 1957. *PLoS One* **2010**, *5*, e11158.
 210. Chen, L.M.; Blixt, O.; Stevens, J.; Lipatov, A.S.; Davis, C.T.; Collins, B.E.; Cox, N.J.; Paulson, J.C.; Donis, R.O. In vitro evolution of H5N1 avian influenza virus toward human-type receptor specificity. *Virology* **2012**, *422*, 105–113.
 211. Shichinohe, S.; Okamatsu, M.; Sakoda, Y.; Kida, H. Selection of H3 avian influenza viruses with SA α 2,6Gal receptor specificity in pigs. *Virology* **2013**, *444*, 404–408.
 212. Tsung-Ning Huang, D.; Lu, C.-Y.; Chi, Y.-H.; Li, W.-L.; Chang, L.-Y.; Lai, M.-J.; Chen, J.-S.; Hsu, W.-M.; Huang, L.-M. Adaptation of influenza A (H7N9) virus in primary human airway epithelial cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1-10.
 213. Lu, X.; Qi, J.; Shi, Y.; Wang, M.; Smith, D.F.; Heimbürg-Molinaro, J.; Zhang, Y.; Paulson, J.C.; Xiao, H.; Gao, G.F. Structure and receptor binding specificity of hemagglutinin H13 from avian influenza A virus H13N6. *J. Virol.* **2013**, *87*, 9077–9085.
 214. Zhang, H.; De Vries, R.P.; Tzarum, N.; Zhu, X.; Yu, W.; McBride, R.; Paulson, J.C.; Wilson, I.A. A human-infecting H10N8 influenza virus retains a strong preference for avian-type receptors. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 377–384.
 215. Victor, S.T.; Watanabe, S.; Katsura, H.; Ozawa, M.; Kawaoka, Y. A replication-incompetent PB2-Knockout influenza A virus vaccine vector. *J. Virol.* **2012**, *86*, 4123–4128.
 216. Yang, H.; Carney, P.J.; Chang, J.C.; Villanueva, J.M.; Stevens, J. Structure and receptor binding preferences of recombinant hemagglutinins from avian and human H6 and H10

- influenza A virus subtypes. *J. Virol.* **2015**, *89*, 4612–4623.
217. Zou, S.; Zhang, Y.; Li, X.; Bo, H.; Wei, H.; Dong, L.; Yang, L.; Dong, J.; Liu, J.; Shu, Y.; et al. Molecular characterization and receptor binding specificity of H9N2 avian influenza viruses based on poultry-related environmental surveillance in China between 2013 and 2016. *Virology* **2019**, *529*, 135–143.
 218. Xu, Y.; Peng, R.; Zhang, W.; Qi, J.; Song, H.; Liu, S.; Wang, H.; Wang, M.; Xiao, H.; Fu, L.; et al. Avian-to-human receptor-binding adaptation of avian H7N9 influenza virus hemagglutinin. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 2217–2228.
 219. Wang, W.; Lu, B.; Zhou, H.; Suguitan, A.L.; Cheng, X.; Subbarao, K.; Kemble, G.; Jin, H. Glycosylation at 158N of the hemagglutinin protein and receptor binding specificity synergistically affect the antigenicity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 A/Vietnam/1203/2004 vaccine virus in ferrets. *J. Virol.* **2010**, *84*, 6570–6577.
 220. Zhang, Y.; Zhang, Q.; Gao, Y.; He, X.; Kong, H.; Jiang, Y.; Guan, Y.; Xia, X.; Shu, Y.; Kawaoka, Y.; et al. Key molecular factors in hemagglutinin and PB2 contribute to efficient transmission of the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *J. Virol.* **2012**, *86*, 9666–9674.
 221. Robertson, J.S.; Nicolson, C.; Harvey, R.; Johnson, R.; Major, D.; Guilfoyle, K.; Roseby, S.; Newman, R.; Collin, R.; Wallis, C.; et al. The development of vaccine viruses against pandemic A(H1N1) influenza. *Vaccine* **2011**, *29*, 1836–1843.
 222. Carbone, V.; Schneider, E.; Rockman, S.; Baker, M.; Huang, J.; Ong, C.; Cooper, M.; Yuriev, E.; Li, J.; Velkov, T. Molecular characterisation of the haemagglutinin glycan-binding specificity of egg-adapted vaccine strains of the pandemic 2009 H1N1 swine influenza A virus. *Molecules* **2015**, *20*, 10415–10434.
 223. Eggink, D.; Spronken, M.; van der Woude, R.; Buzink, J.; Broszeit, F.; McBride, R.;

- Pawestri, H.A.; Setiawaty, V.; Paulson, J.C.; Boons, G.-J.; et al. Phenotypic effects of substitutions within the receptor binding site of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus observed during human infection. *J. Virol.* **2020**, *94*, 195–215.
224. Sun, H.; Pu, J.; Wei, Y.; Sun, Y.; Hu, J.; Liu, L.; Xu, G.; Gao, W.; Li, C.; Zhang, X.; et al. Highly pathogenic avian influenza H5N6 viruses exhibit enhanced affinity for human type sialic acid receptor and in-contact transmission in model ferrets. *J. Virol.* **2016**, *90*, 6235–6243.
225. Shi, Y.; Zhang, W.; Wang, F.; Qi, J.; Wu, Y.; Song, H.; Gao, F.; Bi, Y.; Zhang, Y.; Fan, Z.; et al. Structures and receptor binding of hemagglutinins from human-infecting H7N9 influenza viruses. *Science*. **2013**, *342*, 243–247.
226. Kikutani, Y.; Okamatsu, M.; Nishihara, S.; Takase - Yoden, S.; Hiono, T.; Vries, R.P.; McBride, R.; Matsuno, K.; Kida, H.; Sakoda, Y. E190V substitution of H6 hemagglutinin is one of key factors for binding to sulfated sialylated glycan receptor and infection to chickens. *Microbiol. Immunol.* **2020**, *64*, 304–312.
227. Gambaryan, A.S.; Tuzikov, A.B.; Pazynina, G. V.; Desheva, J.A.; Bovin, N. V.; Matrosovich, M.N.; Klimov, A.I. 6-sulfo sialyl Lewis X is the common receptor determinant recognized by H5, H6, H7 and H9 influenza viruses of terrestrial poultry. *Virol. J.* **2008**, *5*, 1–10.
228. Shi, W.; Shi, Y.; Wu, Y.; Liu, D.; Gao, G.F. Origin and molecular characterization of the human-infecting H6N1 influenza virus in Taiwan. *Protein Cell* **2013**, *4*, 846–853.
229. Vries, R.P.; Tzarum, N.; Peng, W.; Thompson, A.J.; Ambepitiya Wickramasinghe, I.N.; Pena, A.T.T.; van Breemen, M.J.; Bouwman, K.M.; Zhu, X.; McBride, R.; et al. A single mutation in Taiwanese H6N1 influenza hemagglutinin switches binding to human-type receptors. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1314–1325.

230. Tzarum, N.; De Vries, R.P.; Zhu, X.; Yu, W.; McBride, R.; Paulson, J.C.; Wilson, I.A.
Structure and receptor binding of the hemagglutinin from a human H6N1 influenza virus.
Cell Host Microbe **2015**, *17*, 369–376.
231. Dhiman, N.; Jacobson, R.M.; Poland, G.A. Measles virus receptors: SLAM and CD46.
Rev. Med. Virol. **2004**, *14*, 217–229.
232. Arii, J.; Goto, H.; Suenaga, T.; Oyama, M.; Kozuka-Hata, H.; Imai, T.; Minowa, A.;
Akashi, H.; Arase, H.; Kawaoka, Y.; et al. Non-muscle myosin IIA is a functional entry
receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* **2010**, *467*, 859–862.
233. Stray, S.J.; Cummings, R.D.; Air, G.M. Influenza virus infection of desialylated cells.
Glycobiology **2000**, *10*, 649–658.
234. Song, Z. Roles of the nucleotide sugar transporters (SLC35 family) in health and disease.
Mol. Aspects Med. **2013**, *34*, 590–600.
235. Nakamura-Tsuruta, S.; Kominami, J.; Kuno, A.; Hirabayashi, J. Evidence that *Agaricus*
bisporus agglutinin (ABA) has dual sugar-binding specificity. *Biochem. Biophys. Res.*
Commun. **2006**, *347*, 215–220.
236. Long, J.S.; Mistry, B.; Haslam, S.M.; Barclay, W.S. Host and viral determinants of
influenza A virus species specificity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 67–81.
237. Singanayagam, A.; Zambon, M.; Barclay, W.S. Influenza virus with increased pH of
hemagglutinin activation has improved replication in cell culture but at the cost of
infectivity in human airway epithelium. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00058-19.
238. Kamiki, H.; Matsugo, H.; Ishida, H.; Kobayashi-Kitamura, T.; Sekine, W.; Takenaka-
Uema, A.; Murakami, S.; Horimoto, T. Adaptation of H3N2 canine influenza virus to
feline cell culture. *PLoS One* **2019**, *14*, e0223507.
239. Han, J.; Perez, J.T.; Chen, C.; Li, Y.; Benitez, A.; Kandasamy, M.; Lee, Y.; Andrade, J.;

- tenOever, B.; Manicassamy, B. Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors essential for influenza virus replication. *Cell Rep.* **2018**, *23*, 596–607.
240. Tobita, K.; Sugiura, A.; Enomoto, C.; Furuyama, M. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Microbiol. Immunol.* **1975**, *162*, 9–14.
 241. Li, W.; Moore, M.J.; Vaslieva, N.; Sui, J.; Wong, S.K.; Berne, M.A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J.L.; Luzuriaga, K.; Greeneugh, T.C.; et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **2003**, *426*, 450–454.
 242. Carette, J.E.; Raaben, M.; Wong, A.C.; Herbert, A.S.; Obernosterer, G.; Mulherkar, N.; Kuehne, A.I.; Kranzusch, P.J.; Griffin, A.M.; Ruthel, G.; et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **2011**, *477*, 340–343.
 243. Orchard, R.C.; Wilen, C.B.; Doench, J.G.; Baldridge, M.T.; McCune, B.T.; Lee, Y.C.J.; Lee, S.; Pruett-Miller, S.M.; Nelson, C.A.; Fremont, D.H.; et al. Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. *Science*. **2016**, *353*, 933–936.
 244. Matrosovich, M.; Tuzikov, A.; Bovin, N.; Gambaryan, A.; Klimov, A.; Castrucci, M.R.; Donatelli, I.; Kawaoka, Y. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* **2000**, *74*, 8502–8512.
 245. Imai, M.; Kawaoka, Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. *Curr. Opin. Virol.* **2012**, *2*, 160–167.
 246. Chutinimitkul, S.; Herfst, S.; Steel, J.; Lowen, A.C.; Ye, J.; van Riel, D.; Schrauwen, E.J.A.; Bestebroer, T.M.; Koel, B.; Burke, D.F.; et al. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding. *J. Virol.* **2010**, *84*, 11802–11813.

247. Eng, C.; Tong, J.; Tan, T. Predicting zoonotic risk of influenza A viruses from host tropism protein signature using random forest. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1135.
248. Qiang, X.; Kou, Z. Scoring amino acid mutation to predict pandemic risk of avian influenza virus. *BMC Bioinformatics* **2019**, *20*, 288.
249. World Health Organization (WHO). Influenza at the human-animal interface. Available online:
https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_08_05_2020.pdf?ua=1 (accessed on Jan 8, 2021).