

## 論文の内容の要旨

論文題目

### **Identification of amino acid mutations that support the adaptation of highly pathogenic H5N1 influenza A viruses to humans**

(H5N1 高病原性鳥インフルエンザのヒトへの適応に関するアミノ酸変異の同定)

氏名 山地玲奈

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス（以下、H5N1 ウイルス）のヒト感染例が世界で初めて報告されたのは、1997年の香港である。その後、香港ではすべての家禽の殺処分を行うことで、ヒトへの感染の拡大を抑えることに成功したが、H5N1 ウイルスは野生水禽を介して徐々に東南アジアへと広まった。2005年4月に発生した Qinghai lake における野鳥の H5N1 ウイルス感染アウトブレイクを契機に、H5N1 ウイルスは世界各地へと流行を拡大させ、それに伴いヒト感染例も世界中で散発している。WHOによると、H5N1 ウイルスのヒトへの感染例は、2015年1月現在までに、15か国から694症例、うち死亡が402症例と報告されている。しかし、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトからヒトへの伝播は、感染者への濃厚接触があった場合に限られている。

H5N1 ウイルスが効率よくヒトヒト感染するには様々な要素が関与していると考えられている。まず、ウイルスが飛沫核・空気伝播すること、ヒトの呼吸器細胞でよく増殖すること、そして感染宿主に集団免疫がないことなどである。したがって H5N1 ウイルスがヒトの呼吸器細胞で増えやすくなるような変異を獲得した場合、効率よくヒトからヒトへ感染する可能性がある。ヒトへの適応に必要なアミノ酸変異を特定し、見識を蓄積することは、将来分離される H5N1 ウイルスのリスクを評価し、パンデミックに対する対策を講じる際に重要である。現在までに H5N1 ウイルスの哺乳動物への適応に必要なアミノ酸変異は、多々報告されている。ウイルスポリメラーゼの構成成分である PB2、PB1、PA は、哺乳類におけるウイルスの病原性、ウイルスの増殖性の決定因子として重要である。中でも、PB2 627K, 591R/Q はヒトを含む哺乳動物細胞において、ウイルス増殖能を上昇させ、哺乳類における病原性を高めることが知られている。本研究では、鳥とヒトから分離された H5N1 ウイルスを元に、組み換えウイルス・変異ウイルスを作製することで、H5N1 ウイルスがヒト肺胞細胞(A549)で効率よく増えるのに必要なアミノ酸変異を同定しようと試みた。

2010年に Vietnam でヒトから分離された7株の H5N1 ウイルス: A/Vietnam/UT36285/2010 (36285)、A/Vietnam/UT36282/2010 (36282)、A/Vietnam/UT36236/2010 (36236)、A/Vietnam/HN31676DH/2009 (31676)、A/Vietnam/UT31641 II/2008 (31641)、A/Vietnam/UT31604 I /2009 (31604)、A/Vietnam/UT36250 I /2010 (36250)のヒト肺胞上皮細胞(A549細胞)における増殖を観察した。いずれの株も効率よく増殖した。この7株のうち、36285は、哺乳動物における効率よい増殖に関わる既知のアミノ酸変異を持たないにも関わらず、A549細胞においてよく増殖したことから、現在までに報告のない新しいアミノ酸変異を有する可能性があること示唆された。また、36285に遺伝的に近縁の2株の鳥分離 H5N1 ウイルス: A/wild bird/Anhui/82/2005 (Wb/AH82-RG)、A/chicken/Vietnam/TY31/2005

(Ck/TY31-RG) の A549 細胞における増殖をヒト分離株 36285 と比較したところ、鳥分離株は 36285 に比して低い増殖性を示した。これらの結果より、ヒト分離株 36285 と鳥分離株 Ck/TY31-RG, Wb/AH82-RG をそれぞれ一対一対応で比較し 2 株間の A549 細胞における増殖の差に関わるアミノ酸変異を特定しようと試みた。

## 1. ヒト分離株 36285 と鳥分離株 Wb/AH82-RG の比較

### 1) 2 株間の A549 細胞における増殖の差には、PB2 が最も関与している。

36285-RG と Wb/AH82-RG 間の A549 細胞における増殖の差に関わるセグメントを特定するため、6 株の組み換えウイルスを作製し、A549 細胞における増殖を比較した。PB2、PB1、PA、NP にヒト分離株遺伝子を使用した組み換えウイルスは、Wb/AH82-RG と比較してよく増殖するようになった。PB2、PB1、PA、NP の中でどのセグメントが 2 株間の差に寄与しているかを判断するため、更なる組み換えウイルスを作製し増殖を比較した。その結果、36285 由来の PB2 遺伝子が、36285-RG と Wb/AH82-RG 間の A549 細胞における増殖の差に関わっていることを示した。

### 2) PB2-249G, 339M, 309D が 36285-RG と Wb/AH82-RG の増殖の差に関与する。

36285 と Wb/AH82 間の PB2 におけるアミノ酸の違いは 21 か所であった。PB2 がコードするアミノ酸のうち、どのアミノ酸が 2 株間の増殖の差に関わっているか特定するため、36285 と Wb/AH82 の PB2 遺伝子を元にした PB2 キメラウイルスの A549 細胞における増殖を比較した。その結果、PB2 221-345 番目のアミノ酸が 36285-RG と Wb/AH82-RG の増殖の差に寄与していることを示した。

PB2 221-345 番目のアミノ酸配列のうち、36285 と Wb/AH82 間の違いは 249、339、309 番目の 3 か所であった。そこで Wb/AH82-RG を元に、その PB2 の 249、309、339 番目のアミノ酸を 1 箇所または複数箇所、36285 由来のアミノ酸に置換した 7 種類の PB2 変異ウイルスを作製し、A549 細胞における増殖を比較した。249G、339M の 2 か所を導入した変異ウイルス、309D 単独で導入した変異ウイルスは Wb/AH82-RG と比較しよく増えるようになった。以上の結果より、PB2-249G、339M、309D が 36285-RG と Wb/AH82-RG の増殖の差に関与することが示された。

## 2. ヒト分離株 36285 と鳥分離株 Ck/TY31-RG の比較

### 1) 2 株間の A549 細胞における増殖の差には、36285 由来の PA、NS が関与している。

36285-RG と Ck/TY31-RG 間の A549 細胞における増殖の差に関わるセグメントを特定するため、組み換えウイルスを作製し、A549 細胞における増殖を比較した。PB2、PB1、PA、NP にヒト分離株遺伝子を使用した組み換えウイルス、M、NS にヒト分離株遺伝子を使用した組み換えウイルスは、Ck/TY31-RG と比較してよく増殖するようになった。PB2、PB1、PA、NP の中でどのセグメントが 2 株間の増殖の差に寄与しているか、また M、NS のどちらが 2 株間の増殖の差に関与しているかを明らかにするため、更なる組み換えウイルスを作製し増殖を比較した。その結果、36285 由来の PA、NS 遺伝子が、特に 2 株間の増殖の差に関与していることを明らかにした。

### 2) PA V44I, V127A, C241Y, A343T, I573V は Ck/TY31-RG の A549 における増殖を増強させる。

PA における、36285-RG と Ck/TY31-RG 間のアミノ酸配列の違いは 26 か所であった。これら 26 か所のアミノ酸配列のうち、36285-RG にはあるが、データベース上の H5N1 ウイルスでは稀な 9 か所のアミノ酸配列 44I、85A、127A、231T、241Y、305F、343T、401K、573V に注目した。36285 の PA 遺

伝子を元に、44、85、127、231、241、305、343、401、573 番目のアミノ酸を 1 カ所ずつ Ck/TY31 由来の配列に置換した PA 変異ウイルスを作製し、A49 における増殖を比較した。その結果、44、127、241、343、573 番目のアミノ酸を鳥分離株由来に置換すると増殖性がやや低下した。また逆に、Ck/TY31 由来の PA 遺伝子を元に V44I、V127A、C241Y、A343T、I573V それぞれ 1 カ所ずつまたは 5 か所変異を入れた PA 変異ウイルスを作製し、Ck/TY31-RG との増殖を比較した。その結果、5 か所変異を入れたウイルスは PA に 36285 を用いた組み換えウイルスと同等の増殖を示した。以上の結果より、PA V44I、V127A、C241Y、A343T、I573V が 36285-RG と Ck/TY31-RG の増殖の差に関与していることを示した。

3) PA V44I, V127A, C241Y, A343T, I573V はマウスにおける病原性を上昇させる。

36285-RG と Ck/TY31-RG の各 MLD<sub>50</sub> は 10<sup>1.5</sup>PFU/ml, >10<sup>5</sup>PFU/ml であり著しい病原性の差を認めた。特筆すべきことに、PA のアミノ酸に V44I、V127A、C241Y、A343T、I573V の変異を入れた PA 変異ウイルスの MLD<sub>50</sub> は 10<sup>2.75</sup>PFU/ml、と PA の 5 つのアミノ酸変異が哺乳類における病原性に大きく関与することを示した

以上の研究より、高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスがヒト肺胞細胞で増えやすくなることに関与する変異を同定した。同定した PB2、PA のアミノ酸変異のうち、PB2 249G、339M、PA 241Y、573V はヒト季節性インフルエンザウイルスで高く保存されている配列であり、ヒトへの適応に関わる何らかのメカニズムを持つ可能性があると考えられる。