
鳥インフルエンザウイルス酵素活性の pH 依存的性状の解析

静岡県立大学大学院薬学研究院生化学講座・准教授 高橋 忠伸

■ 目的

2013 年以降、中国で H7N9 型鳥インフルエンザ A 型ウイルス (IAV) の人への感染例が多く報告されている。人へ伝播した鳥 IAV が人-人間で感染拡大し、新型 IAV として世界規模の大流行 (パンデミック) を起こす可能性がある。助成者は、IAV 表面糖タンパク質のノイラミニダーゼ (NA) のシアリダーゼ活性に、pH 依存的な性状「酸性安定性」を発見した。NA の酸性安定性とは pH4 ~ 5 の酸性条件においてシアリダーゼ活性を安定に維持する性状で、大部分の鳥 IAV に見られる性状である。人季節性 IAV にはこの性状は見られず、人-人間の感染伝播に適応するためにはこの性状の消失が必要と考えられる。そこで、H7N9 型鳥 IAV の NA のシアリダーゼ活性の酸性安定性について解析し、その分子機構やその性状がウイルスに与える影響を明らかにする。また、酸性安定性以外の NA の性状として、シアル酸分子種に対する基質特異性を効率的に測定する方法を開発し、鳥 IAV を含めた IAV の NA の性状解析に役立てる。

■ 方法

NA 遺伝子を発現させた人胎児腎由来 293T 細胞を pH3 ~ 8 の各 pH で 37°C、10 分間処理後、市販の蛍光基質 4-methylumbelliferyl *N*-acetylneuraminic acid (4MU-Neu5Ac) を使用してシアリダーゼ活性を測定し、至適 pH と酸性安定性を比較した。また、水溶性蛍光基質 4-methylumbelliferone (4MU) に *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) を結合させて蛍光性をオフ制御した 4MU-*N*-glycolylneuraminic acid (4MU-Neu5Gc) を作製し、主要シアル酸分子種の *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) と Neu5Gc に対する IAV の NA の基質特異性を簡便迅速に測定する方法を開発した。

■ 結果および考察

人に感染した H7N9 型鳥 IAV と鴨の IAV の N9 型 NA を発現させた細胞でシアリダーゼ活性の pH プロファイルを比較した。H7N9 型 IAV の NA の一部と鴨 IAV の NA では pH4 ~ 8 まで高い活性が維持されており、特に pH4 と 6 に高い二峰性のピークが見られた。もう一方の H7N9 型 NA は pH4 のみが高く、他の pH では中性付近でも低いシアリダーゼ活性を示した。pH4 ~ 5 の酸性条件におけるシアリダーゼ活性の維持能である酸性安定性について、今回試験した NA はすべて pH4 をピークに高い活性が検出され、一般的な鳥 IAV の NA で見られる酸性安定性を有していた。一方、H7N9 型 IAV の一部では、中性領域の活性が著しく低下している点で他の IAV の NA の性状とは異なっていた。この性状を決める NA のアミノ酸置換を同定した。また 4MU-Neu5Ac と 4MU-Neu5Gc を使用することで、主要シアル酸分子種 Neu5Ac を基準にして Neu5Gc に対する NA の基質特異性を簡便迅速に測定できた。

■ 結語

一部の N9 型 NA に、中性条件でシアリダーゼ活性が低下する新しい性状を発見した。今後、酸性安定性と共に、この中性条件における性状がウイルスの感染や増殖にどのように関わるのかを解析していく。また、酸性安定性以外のウイルス NA の性状解析について、シアル酸分子種に対する基質特異性を簡便迅速に測定する方法を用いて、NA の基質特異性の視点からも調査していく。