

4. インフルエンザウイルス血球凝集素(HA)蛋白質における アミノ酸変異の基盤的解析

中島 捷久, 信沢 枝里, 中島 節子

名古屋市立大学大学院医学研究科感染微生物

抗原変異を可能にするアミノ酸変異のありかたそのものを実験的に検討し, HA蛋白質の構造と機能の関係を明らかにするため1アミノ酸変異のタンパク質に及ぼす影響を網羅的に解析した(変異の基盤構造). またアミノ酸変化が加算したことによって基盤構造そのものが変化するが, それがどのような変化なのかを解析した. その成果として1) ランダムに1アミノ酸変異がおこった場合許容される変異は約50%である. 2) アミノ酸変異のHA機能に関する影響はアミノ酸の種類よりは, 変異部位に依存している確立は78%である. 3) アミノ酸一個が付加されるたびに基準HAで許容されていたアミノ酸変異は0.5%の確率で非許容になり, 逆に0.5%の確率で非許容変異が許容変異となる. 4) HAタンパク質はアミノ酸変異の付加によって不可逆的, かつ加算的に構造変化をおこすことが明らかになった.

はじめに

インフルエンザウイルスは抗原変異の激しいウイルスとして知られており, 毎年のようにワクチン株が代えられている. これらはウイルス粒子表面に存在するHAおよびNAの抗原性が変化することによって引き起こされる. 抗原変異の機構および抗原変異に関わるアミノ酸変異を理解し, 予測する事はインフルエンザの流行制御に役立つと考えられ, 多くの検討がなされてきた. 抗原変異ウイルス出現には複数の抗原決定領域にアミノ酸変異が起こっている事が見出されている^{1,2)}. 一個のエピトープ(単一抗体の認識する部位)に対する変異体の出現頻度は約 $1/10^5$ であり^{3,4)}, 二個では $1/10^{10}$ になるが, 二個以上の領域にたいする変異体は実験的には得られていない⁵⁾. 従って, 抗原変異ウイルス(ドリフト株)は連続的に抗原領域に変異が起こった結果と考えられるが, 連続的な変異の内容が問われる.

研究には二つの流れがあり, 一つは抗体産生や抗体からのエスケープの仕方を検討することである. 他の検討は分離されたウイルスHAのアミノ酸変異そのものを研究することである. この二つを概観し, 第三の研究の必要性を本小論では述べることになる.

我々は1992年の流行後の感染ヒト血清の解析⁶⁾, また1998-1999年のA/Sydney/97の感染ヒト血清の解析によって⁷⁾インフルエンザウイルスがヒト集団に侵入した際, 成人はすべての領域に対して抗体を産生しているが, 幼児においては限られた領域(B1領域にたいする抗体)にしか抗体をつくれないことを明らかにした. ここが変異すればドリフト株になるという「鍵」になる領域というものは存在せず, すべての抗原領域に対するアミノ酸変異が起こった時にウイルスはドリフト株となると推定された. 我々は当然まずB1領域の変異が起こるはずと予想したが, 1999年に出現したウイルスA/Panama/2007/99はB1領域にアミノ酸変異は見られなかった. Furrigason等⁸⁾は流行パターンの数学的モデル化において, 非特異的な抗体プレッシャーがインフルエンザウイルスHAの進化パターンに必須であるとしている.

インフルエンザウイルスの抗原変異は能動的にダイナミックに起こっているように考えられがちであったが, 実はウイルスの抗原領域上のアミノ酸変異は受動的であり, 少しでも利点があればそれによしとする, むしろ効率の悪い

連絡先

〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1
名古屋市立大学医学部ウイルス学
TEL : 052-853-8189
FAX : 052-853-3638
E-mail : nakajima@med.nagoya-cu.ac.jp

やり方で起こっている可能性がある。効率の悪いやり方で変異を起こしながら、最終的にはすべての領域に変異が起こりドリフト株となって大きい流行を起こすことができる。インフルエンザウイルスは抗原変異をするから獲得免疫の効果がなくなり流行を繰り返すと解釈するよりは、効率の悪い抗体産生および効率の悪い抗体効果がウイルスに抗原変異を可能にさせているのではないだろうか。

我々は「ヒト血清の解析から次の変異の起点になる抗原領域を絞り、抗原変異に関与する部位を予測する」ことを目指したのであるが、上述の結果からこの方法では変異予測は達成できないと推察された。

抗体変異株や抗体結合 HA の x 線解析等から、抗体-抗原反応には steric hindrance や水素結合が関与している報告^{9, 10)}があるが、系統的な解析はいまだなされていない。

HA 上のアミノ酸変異そのものの研究に関しては、系統樹解析やいくつかの部位に対しての positive-negative 変異の解析が多くなされている^{11, 12, 13, 14, 15, 16)}が、それはほとんど分離株のアミノ酸配列の比較をおこなったものばかりであり、それらの検討からではなんらかの法則性を見出すことはまた困難であると思われた。分離ウイルスで見出されるタンパク質上でのアミノ酸変異は、可能なアミノ酸変異の中から選択されることを意味している。可能なアミノ酸変異はどのようなものであるか、その中からどのような変異が選択され抗原変異ウイルスとして確立するのかが問題にする必要がある。我々は抗原変異をアミノ酸変異の基盤的解析という視点からも検討しようと計画した。

1. インフルエンザウイルス HA 蛋白質におけるアミノ酸変異の基盤的解析とは何か？

インフルエンザ AH3 ウイルスの HA ポリペプチドは一本の木の幹のように 1968 年以降連続的なアミノ酸変異を起こしている。これはウイルスの進化スピードからみて DNA での 200 ~ 300 万年の進化を経時的に追跡できることを意味している。したがってインフルエンザウイルス HA 蛋白質のアミノ酸変異の原則と実際のアミノ酸変異のあり方を検討することは、タンパク質はどのように進化していくのかを考える際のモデルにもなるであろうと期待される。HA の HA1 領域の変異を考える場合には、約 330 個のアミノ酸部位を変異の対象部位とすると変異全般では 20 の 330 乗の変異が可能である。しかしある基準 HA を設ければそこからの変異はまず、1 アミノ酸変異であり、その変異数はたかだか $7 \times 330 = 2310$ である (1 塩基変異でのアミノ酸変異は多くて 7 個)。1 アミノ酸変異のタンパク質に及ぼす影響を網羅的に解析することが基盤構造の静的な解析である。アミノ酸変化が加算したことによって基盤構造そのものが変化するが、それがどのような変化なのかを解析する事が基盤構造の動的解析となる。

A/Aichi/2/68 (H3N2) ウイルスの HA cDNA を PCR

法によって増幅させ、増幅の際にランダムに導入された変異 HA cDNA の中から 1 アミノ酸変異体を選択した。この HA cDNA を発現ベクターに組み込んだ後 COS 細胞に導入し、血球吸着反応によって HA 変異体の機能を測定した。また 1997 年の H3 ウイルスの HA についてもランダムな 1 アミノ酸変異を導入し、HA の機能に及ぼすアミノ酸変異の影響を観測した。A/Aichi/2/68 では 250 個の変異体¹⁷⁾を A/Sydney/5/97 では約 100 個の変異体¹⁸⁾を作成した。アミノ酸配列はタンパク質の構造を一義的に決定するが、構造は一義的なアミノ酸配列を必要としていない。則ち一つの構造の維持は多数のアミノ酸変異を許容している。しかし三次構造が明らかにされているタンパク質においてもどのようなアミノ酸が許容され、どのようなアミノ酸が非許容になるかの一般則は明らかにされていない¹⁹⁾。我々はこのような一般則を HA をモデルにして見つける事により HA の変異予測を可能にすること、また 1 アミノ酸変異が構造に及ぼす影響をすべての配置において情報化でき、アミノ酸変異の蓄積による構造変化を情報化できれば、一次構造から三次構造認識への橋渡しが可能になるという展望をもって行ってきたが、今回は個々のアミノ酸変異に関する意味づけにはふれず、アミノ酸変異の枠組みのみについて論じる。

2. HA 蛋白質の可塑性について

1968 年と 1997 年の HA 蛋白質において、全体のアミノ酸変異のうち 46 ~ 50% の変異が許容変異であった。68 年と 97 年の許容変異の割合が同一であることから、HA 蛋白質のアミノ酸変異の可塑性はウイルス株により変化がない事が示唆された。Guo 等²⁰⁾は 3-methyl adenine DNA glycosylase を用いて、ランダムアミノ酸変異に関する可塑性を酵素活性で検討して、株間に差がない事を示している。この許容変異の割合はタンパク質それ自身の性質であるが、自然界ではさらに選択が働くので許容変異の割合はさらに減少する。一般に遺伝子の変異において、同義置換はアミノ酸の置換に関与しないため、その変異は選択の要因にはならない。選択の要因になるのは非同義置換である。また選択が関与しなければ同義置換と非同義置換の割合は 23% である。したがって自然界でみられる置換のうち非同義置換の 4.3 倍の置換が同義置換として起こった可能性がある。予測される非同義置換数と観測される非同義置換数の比が許容変異の割合となる。同義置換と非同義置換は 43 ~ 50% と観測されることから、許容変異の割合は約 35% と計算される。ヒトの中で生存して変異し続けるウイルス HA 蛋白質はその変異アミノ酸の約 22 - 30% が抗体プレッシャー等によって選別されていることになる。

アミノ酸は大きさや荷電によって類別される、ある部位にアミノ酸変異が入ったとしても、アミノ酸の種類によって、許容、非許容が分かれる可能性がある。ランダム変異

で得られた変異体でも同一部位に複数の種類のアミノ酸変異が入ったものが得られている。その内容を検討すると、78%の変異はアミノ酸の種類ではなく部位がHA蛋白質の機能に関与することが示された¹⁷⁾。NAでも同様な解析を行ったが、66%の変異はアミノ酸の種類よりも部位に関与していた。

3. 基盤的解析からみた抗原領域

抗原領域(図1)とされているアミノ酸配列群において、変異が見られていない部位が点在する。このような部位はたまたま変異がまだ見られていないだけであるのか、変異が許容されていないのかは実験的に調べてみなければわからないのである。図には抗原領域中で観察されたアミノ酸変異部位が(observed:可変部位)の項で示されている。自然界で観察されなかったアミノ酸部位(非可変部位)はバーで示されている。Aichi/68HAの1アミノ酸変異体で非許容変異部位をその下に(less-changeable)として示した。自然界で観察されなかったアミノ酸部位に非許容アミノ酸部位が一致して見られる。1アミノ酸変異体では特定部位に対して多くの場合は1種類のアミノ酸データーしかないのであるが、これはそのための現象なのか、真にこの部位が非許容部位なのか問われる。1)偶然にしては一致しすぎる。2)前述したように、アミノ酸の種類よりもアミ

ノ酸部位の方が78%の割合で機能に関与しているという結果をふまえると、この部位が非許容部位であると推定してよさそうである。さらに抗原領域内で自然界でアミノ酸変異が認められる部位はまたin vitro実験での許容変異としても認識されている。従って、observed positionはまた許容変異部位と一致する。また抗原領域内の許容部位と非許容部位を三次構造上にプロットすると各領域において、非許容部位は許容部位の内側に配置されていることが示された¹⁵⁾。このような抗原領域の微細構造は抗体の結合を考える際に有効である。例えば、H3ウイルスHAに対する単一抗体変異株の解析結果も図1にまとめて示しているが(アンダーラインを引いてあるアミノ酸部位は単一抗体変異HAのアミノ酸変異部位を示している)¹⁸⁾。部位130を除いては、単一抗体変異株のアミノ酸変異部位は許容変異部位に限定している。

4. 基盤構造の変化について

前述したように68年と97年のHA蛋白質上において、許容変異の大きさが同一であり、ランダムなアミノ酸の変異に対応する可塑性の大きさには変化がない事を示された。次に許容変異の質を検討するため、同一部位に同一アミノ酸の変異を部位特異的変異法によって導入した。68年のHAと97年のHAの変異基盤は一致しておらず、68年の

Changeable positions on the antigenic sites

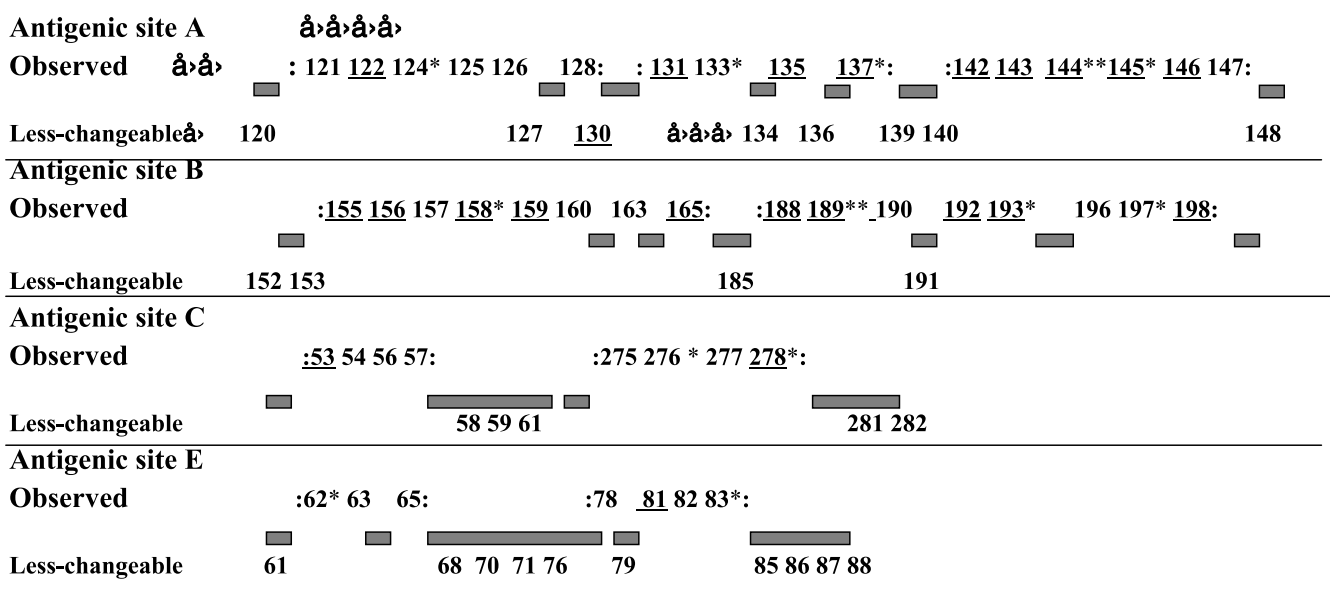


図1 抗原領域内でのアミノ酸変異の性質

アミノ酸部位によっては数度変化しており、*の部位は二度、**の部位は三度変化したことを示している。灰色のバーは自然界で変異がおこらなかった部位である。

表1 抗原領域におけるアミノ酸変異の不一致性について

Class	aa position	A/Aichi/68		A/Sydney/97	
		aa change	Hemadsorption	aa change	Hemadsorption
changeable	53	N to D	positive	D to N	positive
	57	R to Q	positive	R to Q	positive
	65	T to S	positive	T to S	positive
	82*	E to R	positive	T to S	positive
	122	M to S	positive	N to S	positive
	125	F to L	positive	F to L	negative
	126	N to K	negative	N to K	positive
	131*	T to A	positive	A to T	positive
	143*	P to S	positive	S to P	negative
	156*	K to N	negative	Q to N	positive
	190	E to G	negative	D to G	positive
198	A to V	positive	A to V	positive	
less-changeable	58*	I to M	negative	I to M	negative
	61*	F to S	negative	F to S	negative
	70	L to P	negative	L to P	negative
	79	F to S	negative	F to S	negative
	85*	D to E	negative	D to E	positive
	120	F to S	negative	F to S	negative
	130*	V to A	negative	V to A	negative
	134	G to R	negative	G to R	negative
	136	S to N	negative	S to N	negative
	140*	K to E	negative	K to E	positive
	148*	F to L	negative	F to L	negative
	185	P to L	negative	P to L	negative

HA上で許容されていた変異の一部は97年のHA上では非許容になっており、逆に68年のHA上で非許容であった変異の一部が97年のHA上では許容変異に変換しており、不一致率は最低で22%であった。さらに抗原領域についてアミノ酸変異に関する不一致率を検討した結果を表1に示した。アミノ酸変異に関して positive と記されている変異は許容変異, negative は非許容変異を示した。Arosterick 表示は抗原領域での検討を行うために新たに部位特異的変異を導入したものであることを示している。この結果からもわかるように、抗原領域において、可変部位(図1で Observed で示した部位)は大きな不一致率を示すが、非可変部位(図1で less changeable とした部位)と想定した部位にも不一致は認められ、抗原領域での構造変化が示された。これは次の事を意味する、1968年のHAを基準にして、抗原領域に関するすべてのアミノ酸変異を許容、非許容に分類することは可能である。しかし1968年のHA上で可能であったあるアミノ酸変異は1997年のHA上では許容されない。これではアミノ酸変異の予測は原理的に不可能である。しかし、逆の側面もあり、後述するように、10年の範囲では93%の確率で許容、非許容変異は確定されると言えるのでアミノ酸変異予測が93%の確率で可能になる。

5. 基盤構造の変化は加算的である

付加されるアミノ酸変異が均等な力でHA蛋白質に構造的変化を引き起こし、それがランダムに起こっているとすれば、構造的変化(不一致率)の2乗はアミノ酸変異数に比例するが、アミノ酸変異が不均等な力でHA蛋白質に影響を与えるならむしろ不一致率はアミノ酸変異数に比例すると思われる。アミノ酸の種類や部位を考えれば、アミノ酸変異がHA蛋白質に与える影響は均一な力であるはずがない。したがって不一致率はアミノ酸変異数に比例すると仮定して、正しいかどうかを検討した。不一致率22%を(97-68=29)でわると0.7/年となり年間0.7%の割合で許容変異が非許容変異に変化することになる。68年から97年までの変異で非許容変異が使用される割合は $0.7x(1+2+\dots+29)/29$ で約10%、観察された割合は8%である。では97年以降ではどうなっているのか、1997年から2003年までのHAの系藤樹のうち主流の変異に関して、この間のアミノ酸変異が68年のHA蛋白質上で許容変異か非許容変異かを10部位に関して検討したところ、30%が非許容変異であった。計算では $0.7x(30+31+\dots+35)/5=28\%$ で実測値とよく合う。このことから、H3HA蛋白質のアミノ酸変異の性質(アミノ酸変異の基盤構造)は0.7%/年の

割合で変化していることになる。このようなアミノ酸変化に対する不一致性は N2 を用いた検討でも示されている。1967 年の N2 と 1985 年の N2 では不一致率は 3 / 23 (13 %) であり、1967 年の N2 と 2003 年の N2 では 5 / 23 (21 %) であり 約 0.75 % / 年である (未発表)。NA の解析は HA と比べて検討数が半分程度なので、HA と NA の不一致率が同じかどうかを云々することは出来ないが、不一致率がアミノ酸変異について加算的に増加していることは確かであろう。

このようにアミノ酸変異に関する基盤構造はアミノ酸変異の加算によって、変化しその指標が不一致性 (Discordance) である。構造的変異は加算的であると主張すると次のような反論がでる。「HA はある一定内の構造をとり、その構造を越える事ができないのであるから、構造的変化は振動的なものではないか?」。構造的な振動とは RMSD 値 (三次構造の具体的比較 [不一致性とタンパク質の三次構造] を参照) がアミノ酸変異の加算によって振動することである。RMSD 値は A/Aichi/68 の HA からみれば一定値以上には増えない事は予想できるが減少はおこらないであろう。なぜなら一アミノ酸分子の空間上での配座すら可能性としては無限である (空間の一点において分子の回転を考えても、配座は有限である根拠はない)。

6. HA 蛋白質がアミノ酸変異の加算によって構造変化を示す現象

(1) アミノ酸変異の不可逆性

H3HA 上の 143 番目のアミノ酸は 1968 年から 1977 年まではプロリンであり、1978 年以降セリンに変化した。1991 年のウイルス HA 上で 143 番目のセリンをプロリンに変えても、HA の機能は正常であるが、1997 年の HA 上で同様のアミノ酸変化を起こさせると、HA の機能は失われる。このようにアミノ酸変異の蓄積はアミノ酸変異にたいして不可逆的な変化を示す。

(2) ニワトリ血球凝集活性の変化について

1992 年頃より HA 蛋白質が認識するシアル酸含有分子への親和性が変化した。シアル酸一般に対する親和性の変化というよりは、認識のずれが起こったというべきである。92 年以降の分離ウイルスはヒト血球には結合できても、ニワトリ血球には弱い結合しかできない。ニワトリ血球のシアル酸を除去してから、特定のシアル酸分子を血球に導入すると強く結合できる。この変異を誘引したアミノ酸変異は主に 190 番目のアミノ酸であることが確かめられている²¹⁾。しかし A/Aichi/2/68 の 190 番目のアミノ酸を変えただけではニワトリ血球に対する吸着能は変化しないことから、いくつかの変異の積み重ねが必要であると考えられる。H3 型においては変異に必要なアミノ酸変異について、これ以上の解析は行っていないが、H1 型においても類似した現象が見つかっており、我々は 4 個のアミノ酸変異が関与している

ことを報告した (22)。

(3) A/Aichi/2/68 とのキメラタンパク質について

HA 蛋白質の構造のずれはキメラタンパク質作製でもみられる。1992 年のウイルス HA との間で作製可能であった組み合わせのキメラは⁶⁾、97 年のウイルス HA とは作製できなかった⁷⁾。

7. 不一致性とタンパク質の三次構造

不一致性はアミノ酸変異の増加によってタンパク質の構造が不可逆的に変化することを示すものであるが、どのような具体的な構造変化であるかを示してはいない。同一亜型の三次構造データは限られているがそれを用いて解析した。三次構造の定量的比較は root means square difference (RMSD) で測定可能である^{23,24)}。RMSD が近い程、三次構造のずれがなくなる。Protein data bank から得られる 1963 年 (1MQL.pdb)、1968 年 (3HGF.pdb) の H3HA と 1918 年 (1RD8.pdb)、1934 年 (1RU7.pdb) の H1HA の構造を比較すると、アミノ酸配列の相違が 5 と 13 % でそのとき RMSD は 0.54 と 2.78 になる。アミノ酸配列のホモロジーと RMSD は同一亜型においては相関するように見える。しかし、HA の構造は HA としての機能を維持する点からみれば無限に変化が増大するわけではないであろう。亜型間の構造的な相違は H1 と H9 間で最大で 9.72 である。この値まで、変化しつづけられるのか、亜型内ではもっと小さい値以内にまとまってしまうのかはわからない。

8. 不一致性と亜型への分岐

不一致性はアミノ酸変異が加算されてゆくと、それまで、許容変異されたものが、非許容になり、非許容であった変異が許容されるようになることを示すものである。これはアミノ酸変異の順番が異なる A, B が出来たとき、A で許容されるあるアミノ酸変異は B では許容されなくなる場合があることを意味する。したがって A と B はアミノ酸変異のしかたが異なっていくがこれは不可逆的である。いったん A と B ができると、このタンパク質はアミノ酸の加算によって、相関して構造的に離れていくことが推定される。ウイルス間の亜型は遺伝子の変異率によって人為的に決定されているにすぎないが、アミノ酸蓄積による不一致性がタンパク質一般の性質であるとすれば、タンパク質の性質も相関的に分化していることが想定される。HA では H1, H3, H5, H7, H9 亜型の構造が明らかにされている^{25,26,27)} がこれらの亜型が分岐によって分かれてきたものである事が構造的にも明らかにされている。これらの HA の構造を RMSD によって計算すると 2.4-9.72 となる。亜型間には挿入、欠損変異がみられるが、この現象が亜型の分岐にとって必要なかどうかは不明であるが、連続変異によって、構造的相違が示されるのであるから、欠損、挿入が分岐にとって不可欠であるとはいえない。

9. 協調的アミノ酸変異は存在するか？

ある機能の変異について、複数のアミノ酸変異が関係することがありうることは、レセプター結合能のところでも述べた。多くの論文はタンパク質の進化過程において、協調的アミノ酸変異 (covariational amino acid change) の存在を仮定して、どのような変異がそうであるかを同定する方法が種々考えられている^{28, 29)}。変異の蓄積は構造上の歪みを伴うことが予想される。その歪みを次のアミノ酸の変異によってコントロールしている可能性があると考えるのである。任意の HA においてアミノ酸に関する許容性は 50% 程度であるとする我々の実験結果とも矛盾する。

Co-variation についてはどうであろうか？ co-variation は一般的に亜型の構造的な gap を説明するために考えられている。即ち、非許容アミノ酸変化が同時におこることにより、新しい構造的変異をかちとり、別々な亜型が完成するとの考え方である。実際にはどのようなアミノ酸変化がそれに対応するのかは難しい問題である^{28, 29)}。Govindarajan³⁰⁾ はそのような co-variation を否定している。我々は HA や NA の亜型形成においてそのような co-variation variation の可能性を検討した。HA は S-S 結合を壊すようなアミノ酸変異はすべて機能が失われる。それでは S-S 結合は協調的アミノ酸変化の例なるのだろうか？ インフルエンザウイルスのもう一つの糖タンパク質である NA は 1-9 亜型まで知られている。すべての亜型に見られる S-S 結合のうち 3 個に対して S-S 結合を破壊する変異を入れる、あるいはランダムにシステイン変化を導入すると、NA 活性は失われた。NA においては S-S 結合が NA の機能維持に重要である。しかし N2, N6, N7, N8, N9 は他の NA と異なりアミノ酸 175 と 193 の間のシステインによって S-S 結合が存在する。この S-S 結合が分岐の過程で獲得されたとするなら、協調的な変異である可能性があるかどうかを検討した。しかし、193 番目のシステインをグリシンにかえても NA 活性は維持されており、少なくともすべての S-S 結合は協調的アミノ酸変異によるものではない。後から振り返って、協調的な変異と判定することは出来そうであるが、それは結果論であって、タンパク質の変異過程においては、別に協調的変異の必然性はないのではないかと考える。

10. 再び抗原変異について

これまでに HA 蛋白質が構造・機能を維持しながら変異するあり方を検討し、連続的なアミノ酸の蓄積で HA 蛋白質の構造は変化し、分岐しうる事を示したが、最初に述べた。抗原変異の解決からはむしろ遠ざかってしまった。不一致性は蛋白質の進化にとって重要な概念になると思っているが、抗原性の変化を予測するという希望は失われていく感がある。抗原性の変化という点では他の観点も必要になってくる。それは抗体結合に関するアミノ酸変異の寛容

性である。例えば単一抗体 203 は H3HA 上の 143 番目のアミノ酸を認識する。セリンからプロリンに変化すると抗体との結合能が失われる。しかしアラニンやスレオニンへの変化では抗体結合能は維持されている。したがって、抗原変異に関するアミノ酸は、許容、非許容変異のほかに抗体結合に関する寛容性のファクターが加わることになる。セリンをアラニンに変化させた後の HA 構造をシミュレートすると、他のアミノ酸の配座は変化していないが、プロリンへの変化では、他のアミノ酸の配座に影響が出る。寛容性と構造変化の相関性を検討することにより、寛容性に関しては予測可能になるかもしれない。

おわりに

最後に構造・機能を維持するために必要なアミノ酸の保存について述べる。

A 型インフルエンザウイルスの HA 蛋白質はその生物学的機能は共通であるにもかかわらず、抗原性の違いのみで 16 の亜型に分類される。しかも、抗原性を規定する構造的な特徴は抗原領域のみに局在するのではなく、HA の全構造に反映されている。我々は 13 亜型について調べた結果いくつかの保存部位があることが分かった。その特徴は 1) S-S 結合部位の保存、2) β シートや α ヘリックス部位にはあまり保存部位がなく、むしろループ上に保存部位があってループの性状を維持していることである。ループの部分には欠損や挿入が各亜型において見られ、抗原領域にもなっている部分が多く、アミノ酸変異が相対的に多くみられる部位であるが、特定部位が保存されることによってループ構造が維持されている。 α -ヘリックスや β シートは構造がしっかりしているので、その構造を壊さない変異なら許容されるので特別な部位での保存は必要ないのかもしれない。機能ドメインについてみると、シグナルペプチドではアミノ酸配列の保存は認められず、疎水性配列であればよいという制限になっている。同じ疎水性配列が要求される膜貫通ドメインではかなりのアミノ酸配列の保存性が認められる。膜融合ドメインにおいては強い保存性が認められる。膜融合ドメインのアミノ酸は高度に保存されているが HA 蛋白質の発現系を用いた我々の実験ではいくつかのアミノ酸を変えても膜融合活性には影響を与えなかったことから、この高度な保存性がなぜ必要なのかについてはまだ解答が得られていない。HA のもう一つの重要な機能であるレセプター結合能は HA 頭部表面のポケット構造に存在する。このポケット構造の構成アミノ酸は全亜型間で比較すると、HA2 領域の N 末ほど高度には保存されていない。これは、HA の抗原領域の真ん中に存在するこのポケット構造が周囲の抗原領域のアミノ酸変異に対応しながらも、レセプターとの結合に必要な構造を維持してきた結果と考えられる。HA の分岐に関する興味は、なぜ、高病原性をもつ H5 と H7 が普遍的な蛋白質分解酵素であるフリンの認識部位を

HA1 と HA2 の切断部位に持ちうるのかを説明することで
あるが、それは今後の研究課題にしたい。

引用文献

- 1) Wilson IA, Cox NJ. : Structural basis of immune recognition of influenza hemagglutinin. *Annu Rev Immunol* 8: 737-771, 1990.
- 2) Plotkin JB, Dushoff J, Levin SA. : Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6263-6268, 2002.
- 3) Nakajima S, Kendal AP. : Antigenic drift in influenza A/USSR/90/77 (H1N1) variants selected in vitro with monoclonal antibodies. *Virology* 113: 656-662, 1981.
- 4) Webster RG, Laver WG. : Determination of the number of non overlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. *Virology* 104: 139-148, 1980.
- 5) Lambkin R, McLain L, Jones SE, Aldridge AL, Dimmock NJ. : Neutralization escape mutants of type A influenza virus are readily selected by antisera from mice immunized with whole virus: a possible mechanism for antigenic drift. *J Gen Virol* 75: 3493-3502, 1994.
- 6) Nakajima S, Nobusawa E, Nakajima K. : Variation in response among individuals to antigenic sites on the HA protein of human influenza virus may be responsible for the emergence of drift strains in the human population. *Virology* 274: 220-231, 2000.
- 7) Sato K, Morishita T, Nobusawa E, Tonegawa K, Sakae K, Nakajima S, Nakajima K. 2004. : Amino-acid change on the antigenic region B1 of H3 haemagglutinin may be a trigger for the emergence of drift strains of influenza A virus. *Epidemiol Infect* 132: 399-406, 2004.
- 8) Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. : Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 422: 428-433, 2003.
- 9) Bizebard T, B Gigant, P Rigolet, B Rasmussen, O Diat, P Bosecke, S A. Wharton, J J Skehel, and M Knossow. : Structure of influenza viral haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature* 376: 92-94, 1995.
- 10) Fleury D, S A Wharton, J J Skehel, M Knossow, and T Bizebard. : Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization. *Nat. Struct. Biol.* 5: 119-123, 1998.
- 11) Bush R M, C A Bender, K Subbarao, N J Cox, and W M Fitch. : Predicting the evolution of human influenza A. *Science* 286: 1921-1925, 1999.
- 12) Bush R M, C B Smith, N J Cox, and W M Fitch. : Effects of passage history and sampling bias on phylogenetic reconstruction of human influenza A evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6974-6980, 2000.
- 13) Bush R M, W M Fitch, C A Bender, and N J Cox. : Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1457-1465, 1999.
- 14) Fitch W M, R M Bush, C A Bender, and N J Cox. 1997. Longterm trends in the
- 15) Plotkin J B, and J Dushoff. : Codon bias and frequency dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 7152 - 7157, 2003.
- 16) Suzuki Y, and T Gojobori. : A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1315-1328, 1999.
- 17) Nakajima K, Nobusawa E, Tonegawa K, Nakajima S. : Restriction of amino acid change in influenza A virus H3HA: comparison of amino acid changes observed in nature and in vitro. *J Virol* 77: 10088-10098, 2003.
- 18) Nakajima K, Nobusawa E, Nagy A, Nakajima S. : Accumulation of amino acid substitutions promotes irreversible structural changes in the hemagglutinin of human influenza AH3 virus during evolution. *J Virol* 79:6472-6477, 2005.
- 19) Pauline CN and Henikoff S. : Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11:863-87435, 2001.
- 20) Guo HH, Choe J, Loeb LA. : Protein tolerance to random amino acid change. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9205-9210, 2004.
- 21) 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* 278: 587-596 2000.
- 22) Morishita T, Nobusawa E, Nakajima K, Nakajima S. : Studies on the molecular basis for loss of the ability of recent influenza A (H1N1) virus strains to agglutinate chicken erythrocytes. *J Gen Virol* 77: 2499-2506, 1996.
- 23) Ferro DR, Hermans J. : A different best rigid-body molecular fit routine. *Acta Crystallographica* 33: 345-347, 1977.
- 24) Kabsch W. : A discussion of the solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallographica* 34: 827-828, 1978.
- 25) Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. : H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *EMBO J* 21: 865-875, 2002.
- 26) Russell RJ, Gamblin SJ, Haire LF, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, Skehel JJ. : H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology* 325: 287-296, 2004.
- 27) Stevens J, Corper AL, Basler CF, : Taubenberger JK, Palese P, Wilson IA. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 303:1866-1870, 2004.
- 28) Afonnikov DA, Oshepkov DY, Kolchanov NA. : Detection of conserved physico-chemical characteristics of proteins by analyzing clusters of positions with coordinated substitutions. *Bioinformatics* 17:1035-1046, 2001.
- 29) Afonnikov DA, Kolchanov NA. : CRSP: a program for analysis of coordinated substitutions in multiple alignment of protein sequences. *Nucleic Acid Res* 32 :(web-

server issue) W64-8, 2004.
30) Govindarajan, S., J. E. Ness, S. Kim, E. C. Mundorff, J. Minshull, and C. Gustafsson. : Systematic variation of

amino acid substitutions for stringent assessment of pairwise covariation. *J. Mol. Biol.* 328:1061-1069, 2003.

Accumulation of Amino Acid Substitutions Promotes Irreversible Structural Changes in the Hemagglutinin of Human Influenza AH3 Virus during Evolution.

Katsuhisa NAKAJIMA, Eri NOBUSAWA, Setsuko NAKAJIMA

Department of Virology, Medical School, Nagoya City University
1-Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

During protein evolution the amino acid substitutions accumulate with time. However, the effect of accumulation of the amino acid substitutions to structural changes has not been estimated well. We will propose that the discordance of amino acid substitution on the HA protein of influenza A virus is useful for the assessment of structural changes during evolution. Discordance value can be obtained from the experimental data of tolerance or intolerance by introducing site directed mutagenesis at the homologous positions of two HA proteins holding the same amino acid residues. The value of discordance correlated to the number of amino acid differences among proteins. In the H3HA discordance rate was calculated to be 0.45% per one amino acid change. Furthermore, discordance of amino acid substitutions suggests that tolerable amino acid substitutions in different order have a probability of promoting irreversible divergence of the HA protein to different subtypes.