

インフルエンザウイルスの生き延び戦略にヘムアグルチニン(HA)の糖鎖はいかなる意義を持つか?

徳永 博俊

川崎医科大学 微生物学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 ヒトのA型インフルエンザH3N2亜型(いわゆる香港型)ウイルスは、1968年に人間界に出現以来、今日まで流行を繰り返してきた。その間、ヘムアグルチニン(HA)の抗原性が徐々に変化すると共に、HA頭部の糖鎖数も徐々に増加し、出現当時は2本であったのが今世紀初めには7本になっている。HA頭部にはウイルスの主要抗原部があるため、糖鎖数が増加することによって抗原部が覆い隠されて、免疫系の攻撃から逃れやすくなるのではないかと推測されてきた。本研究では、この可能性を検証するため、2001年に分離されたインフルエンザA/Okayama/6/01(H3N2)ウイルスのHAを起点として、遺伝子工学的に糖鎖結合モチーフを順次(時代を遡って)除いたHAを作製し、リバーシジェネティクスによりこれらのHAを組み込んだウイルスを作製して、実験を行った。オリジナルのHAを持つウイルス(H3-0)および糖鎖結合部を1~3個減じたHAを持つウイルス(H3-1, H3-2, H3-3)を同じ感染価に揃えてそれぞれマウスに経鼻接種し、1カ月間観察後に採血して、血清中の中和抗体価を調べた。それぞれのウイルス接種により産生された抗体は、接種に用いたウイルスに対して高い中和抗体価(中央値1:4621~1:6132)を示した。糖鎖数の異なるウイルスに対する中和活性、即ち交叉反応性を調べると、H3-1とH3-2の間では互いに交叉して抗原性の違いが見られなかったが、H3-0とH3-1間およびH3-2とH3-3間では抗原性の違いがはっきりと認められた。これらの結果からインフルエンザウイルスのHA頭部の糖鎖付加は宿主の免疫機能からの逃避に役立つことが示されたが、同時にまた、付加のみならず糖鎖の減少もまた抗体の中和活性を減ずること、糖鎖の付加部位によってその効果は大きく異なることも明らかになった。本研究によって得られた知見を基に、ニューヨーク市における過去のインフルエンザ流行パターンについても解析を行った。

(平成21年10月5日受理)

キーワード: インフルエンザウイルス, HA, 糖鎖付加, リバーシジェネティクス, 中和抗体, 免疫原性

緒言

ヒトのA型インフルエンザH3N2亜型(いわゆる香港型)ウイルスは、1968年に人間界に出現以来、今日まで流行を繰り返してきた。その間、ヘムアグルチニン(HA)の抗原性が徐々

に変化すると共に、HA頭部の糖鎖数も徐々に増加し、出現当時は2本であったのが今世紀初めには7本になっている(図1)。HA頭部にはウイルスのレセプター結合ポケットが存在するため、この近傍の糖鎖の数が増加すると、そ

別刷請求先
徳永博俊
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学 微生物学

電話: 086 (462) 1111
ファックス: 086 (462) 1199
Eメール: tokusan@med.kawasaki-m.ac.jp

れがレセプター結合の立体障害となって、ウイルスの結合能力が低下することが知られている¹⁻⁴⁾。それにもかかわらず糖鎖数が増加してきたのはウイルスにとって何らかの利点があるためと考えられる。その利点として、インフルエンザウイルスはHAの主要抗原部を糖鎖で覆うことによって、抗体の作用を逃れてヒトに再感染を起こして流行を繰り返す、即ち、インフルエンザウイルスが人間界で生き延びるための戦略の一つとして糖鎖を利用している可能性が推測されている。Skehelらは、あるモノクローナル抗体の中和活性はHAに糖鎖が付加すると無効になることを見出し、糖鎖がインフルエンザの中和に関するエピトープの一つを覆うと報告している⁵⁾。Abeらは、1968年分離ウイルス A/Aichi/2/68(H3N2)のHAに糖鎖結合部位を順次追加した変異HAを作り、それをベクターで発現させて、A/Aichi/2/68(H3N2)を認識するヒト血清を用いてHAタンパクを免疫沈降法で回収する際、糖鎖付加数が多くなるに

つれて回収率が悪くなることを見出しており、糖鎖の付加により抗体への反応性が低下すると報告している²⁾。これらの報告は、糖鎖によって、ある特定のエピトープが覆われることを示している。しかし、インフルエンザウイルスの感染によって誘導された中和抗体（ポリクローナルと考えられる）が、糖鎖の有無によりどれくらい影響されるのか、免疫から逃れるのの一つの糖鎖の付加がどれくらい役立っているのか、実験的に検証した例は未だない。本研究では、2001年分離インフルエンザウイルス A/Okayama/6/01(H3N2)株のHAを起点として、時代を遡って順次、HA頭部の糖鎖結合モチーフを除いた変異HA（図1参照）を作製し、リバースジェネティクス的手法によってこれらのHAをウイルスに組み込み、それをマウスに経鼻接種した。それぞれのウイルス初感染マウスではいかなる中和活性を持った抗体が産生されるのかを解析し、HA頭部の糖鎖の付加が、宿主の免疫（抗体の作用）から逃れて、ウイルスが感染を果たすために、実際にどれくらい役立つのかを調べた。

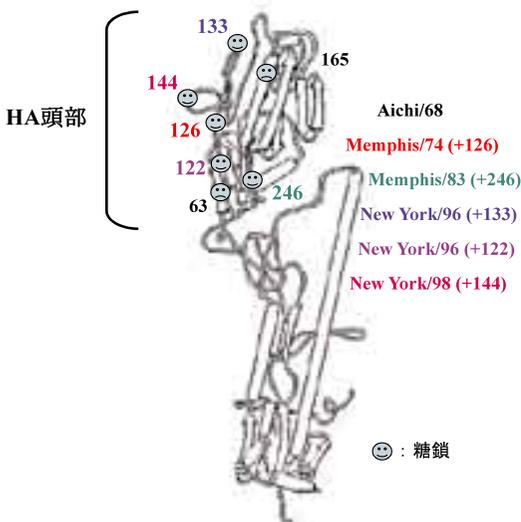


図1 HA頭部糖鎖付加部位の推移。Wilsonら¹⁵⁾によって明らかにされたHA頭部（モノマー）の3次元モデルに糖鎖付加部位を記入した。付加の起きた時代を代表するインフルエンザウイルスの分離地と分離年および新たに生じた糖鎖結合部位を（ ）内に記載した。ウイルスの正式名称はそれぞれ A/Memphis/101/1974(H3N2), A/Memphis/33/1983(H3N2), A/New York/563/1996(H3N2), A/New York/249/1998(H3N2)である。

材料と方法

糖鎖結合部位を順次除いた変異HAの作製

川崎医科大学小児科寺田喜平博士の採取した臨床材料より本研究室で分離されたインフルエンザウイルス A/Okayama/6/01(H3N2)（以下、H3/Okayamaと略記）のcDNAをpcDNAにサブクローニングしたもの⁴⁾を出発材料にして、HAのN-glycosylation site（糖鎖付加モチーフ：Asn-X-Thr or Asn-X-Ser）を改変するためのprimer setを用いたPCRによって、図2に記載した変異を導入した。ウイルス増殖中にrevertant（変異の逆戻り）が発生する確率を下げるために2ヌクレオチドの変異を導入し、変異HAの全シークエンスを調べて、期待される個所以外に変異の入っていないことを確認した。糖鎖結合モチーフは#144, #122, #133, #246, #126の順番で除去した。

変異 HA を持ったウイルスの作製

H3/Okayama 由来の変異を導入した HA の cDNA を、東京大学の河岡義裕教授らが開発したリバーシジェネティクスの技法⁶⁾に従い、pPol I RNA 合成ベクターにサブクローニングして、河岡教授より分与された A/WSN/33(H1N1) の RNA 合成セット pPol I-PA(WSN), pPol I-PB1(WSN), pPol I-PB2(WSN), pPol I-NP(WSN), pPol I-NA(WSN), pPol I-M(WSN), pPol

I-NS(WSN) および WSN タンパク質合成セット pcAG-PA(WSN), pcAG-PB1(WSN), pcAG-PB2(WSN), pcAG-NP(WSN) と共に、6-well プラスティック・プレート (Sumitomo Bakelite, Japan) に培養した約 1×10^6 個の 293T 細胞にトランスフェクションしてウイルスを作製した (図 3 参照). RNA 合成ベクターはそれぞれ 0.1 μ g, タンパク質合成ベクターは 1 μ g ずつ用いて、トランスフェクション操作は TransIT-293 (Minus

A/Okayama/01 (H3-0)のHA (頭部糖鎖 7 本)	63	122	126	133	144	165	246
	Asn-Cys-Thr	Asn-Glu-Ser	Asn-Trp-Thr	Asn-Gly-Thr	Asn-Lys-Ser	Asn-Val-Thr	Asn-Cys-Thr
H3-1 (糖鎖 6 本)					Asn-Lys-Ala		
H3-2 (糖鎖 5 本)		Ala-Glu-Ser			Asn-Lys-Ala		
H3-3 (糖鎖 4 本)		Ala-Glu-Ser		Asn-Gly-Ala	Asn-Lys-Ala		
H3-4 (糖鎖 3 本)		Ala-Glu-Ser		Asn-Gly-Ala	Asn-Lys-Ala		Asn-Cys-Ala
H3-5 (糖鎖 2 本)		Ala-Glu-Ser	Ala-Trp-Thr	Asn-Gly-Ala	Asn-Lys-Ala		Asn-Cys-Ala

図 2 糖鎖結合モチーフを除去するためのアミノ酸変異の導入. 時代を遡って糖鎖結合モチーフを順次 (-144, -122, -133, -246, -126の順に) 除去した.

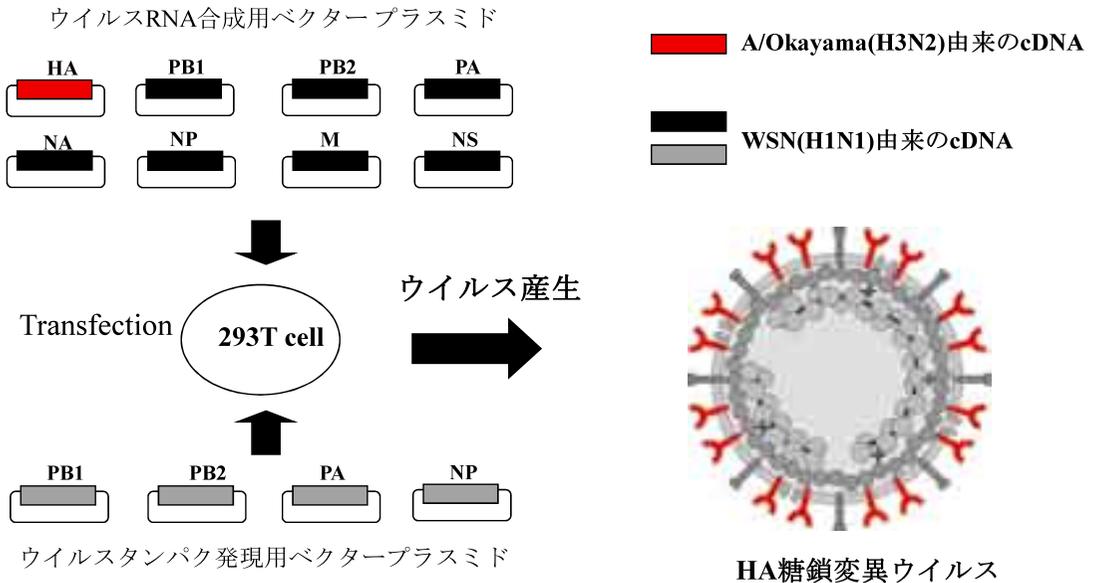


図 3 リバーシジェネティクスによる HA 糖鎖変異ウイルスの作製. 糖鎖数の異なるウイルスを作製するため、インフルエンザ A/Okayama/6/01(H3N2) ウイルスのオリジナル HA とその糖鎖を減少させた変異 HA の遺伝子を組込んだ RNA 合成ベクターを、A/WSN/33(H1N1) ウイルスの遺伝子を組み込んだ RNA 合成ベクターとタンパク質発現ベクターと共に 293T 細胞にトランスフェクトさせた.

Bio, USA) を用いて行った。Opti-MEM 培地 (Gibco, USA) で37°C, 48時間培養後に、産生されたウイルスを293T細胞ごと回収した。トランスフェクションに使用した293T細胞は河岡教授より分与された。

作製した変異ウイルスの増殖と保存

293T細胞にウイルスRNA合成およびタンパク質合成ベクターをトランスフェクトして産生されたウイルスを1 μ g/mlのアセチル化トリプシン (Sigma, USA) 存在下に一度Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞 (大阪府立公衆衛生研究所加瀬哲男博士より分与) で増殖させ、プラーク法で感染価を測定した。感染細胞の培養液を3000rpm, 10分間遠心してcell debrisを除き、その上清を19,000rp, 90分遠心してウイルスを回収した。ウイルスは感染価を10の5乗PFU/ μ lに揃えて、1%マンナン (mannan from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁後、0.5ml/tubeに分注して-80°Cに凍結保存した。

ウイルス感染価の測定

ウイルスの感染価は12-wellのプレート (Sumitomo Bakelite, Japan) に準備したMDCK細胞に、希釈したウイルス液を接種し、1 μ g/mlのアセチル化トリプシンを含んだ0.65%アガロース (Seakem, Cambrex Bio Science, USA) 重層培地下で37°C, 2日間培養後、感染細胞を免疫染色により検出した。免疫染色の一次抗体はWSN感染マウス血清を用い、二次抗体はビオチン標識抗マウスIgG (Sigma) を用い、ABC (avidin-biotinylated peroxidase complex) 法で増感して、DAB (diaminobenzidine) 反応液 (Sigma) で発色させた。

ウイルスの感染実験および抗ウイルス血清の採取

それぞれのウイルス液 (感染価10⁵PFU/ μ l, 1%マンナンを含むPBSに懸濁) を-80°Cのフリーザーより取り出し、マウス (c57BL/10SnSlc, ♀, 3週齢) をセボフルランで麻酔後に20 μ lを経

鼻接種した。ウイルスを接種されたマウスは対照群マウスとともに、毎日、体重を測定し、4週間経過を観察した後に、麻酔後、心臓より全採血して、血清を採取した。

マウス血清の中和抗体価の測定

プラーク reduction 法で中和抗体価を測定した。12-wellのプレートに準備したMDCK単層培養細胞にwellあたり約100個のプラークを形成するようにウイルス液を希釈して使用した。マウスの血清を段階的に希釈し、そこに一定量のウイルス液を混合し、室温で30分間反応させた。

マウス血清中には β -インヒビターとして知られるマンノース結合レクチン (MBL) が豊富に存在するため、ヒトのA型インフルエンザウイルスの感染は非特異的に阻害されてしまう⁷⁾。MBLの阻害作用を中和して、特異抗体を検出するため、マウス血清は0.2Mのマンノースを含むPBSで希釈した。

ウイルスと希釈血清の混合液をMDCK細胞に接種し、37°Cで1時間培養後に、接種液を除去して、1 μ g/mlのアセチルトリプシンを含むアガロース重層培地下で48時間培養した後、形成されたプラーク数を免疫染色後に計測した。プラーク形成を50%阻止する血清希釈倍数をReed-Münch法⁸⁾で算出して中和抗体価とした。

マウス血清の中和抗体価のデータはWelchのt検定による有意差検定を行った。

本研究は川崎医科大学組換えDNA実験安全委員会の承認 (川換06-11) と川崎医科大学動物実験委員会の承認 (承認番号07-012) 及び遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認について文部科学大臣確認 (19校文科振第17号) を受けている。

結果

リバーズジェネティクスによる変異ウイルスの作製

2001年に分離されたインフルエンザウイルスA/Okayama/6/01(H3N2)のHAを起点として、

時代を遡って順次、糖鎖結合モチーフを除去した変異 HA を作製した。HA 頭部のこれらの糖鎖結合モチーフには実際に糖鎖が結合していることを、Abe らは HA のタンパク質発現系を用いた実験では確認している²⁾。結合モチーフの消失によって糖鎖数が減少した HA でも感染性ウイルス粒子の形成ができるかどうか調べるため、トランスフェクトした293T 細胞の培養液中のウイルス感染価を測定した(表1)。その結果、HA の糖鎖結合部位を5つ除去した場合には、感染性のあるウイルスは全く産生されないことが分った。以下、オリジナルの HA を持つウイルスを H3-0、そこからそれぞれ1, 2, 3, 4 個の糖鎖結合部位を除いたウイルスを H3-1, H3-2, H3-3, H3-4 と略記する。それぞれのウイ

ルスを一たび MDCK 培養細胞系で増殖させて、マウスの感染実験用のウイルスを調製した。その際、H3-4ウイルスは MDCK 細胞で極めて増殖能が低く、マウスの感染実験に使用できるだけのウイルス量が得られなかったため、マウスの感染実験には H3-0, H3-1, H3-2, H3-3 の4種のウイルスを用いた。

ウイルス感染マウスの体重変化

マウスにヒトの A 型インフルエンザウイルスを感染させるためには、マンナンをウイルスと同時に経鼻接種すればマウス呼吸器中の MBP が中和されてウイルスの感染が成立することが報告されているので⁷⁾、それに従って、感染実験を行った。

1%マンナンを含むウイルス液20 μl をマウスに経鼻接種し、マウスの体重を毎日測定した。接種後1週間のマウスの体重変化を図4に示した。ウイルスを含まない1%マンナン PBS を経鼻接種した対照マウス群と比較して、ウイルス接種群では体重減少を示した個体も観察されたが、多くのマウスでは、有意な体重減少は観

表1 リバースジェネティクスで産生されたウイルスの感染価

	ウイルス感染価
H3-0	1.3×10^6 PFU/ml
H3-1	2.7×10^4 PFU/ml
H3-2	1.8×10^4 PFU/ml
H3-3	2.0×10^4 PFU/ml
H3-4	4.6×10^2 PFU/ml

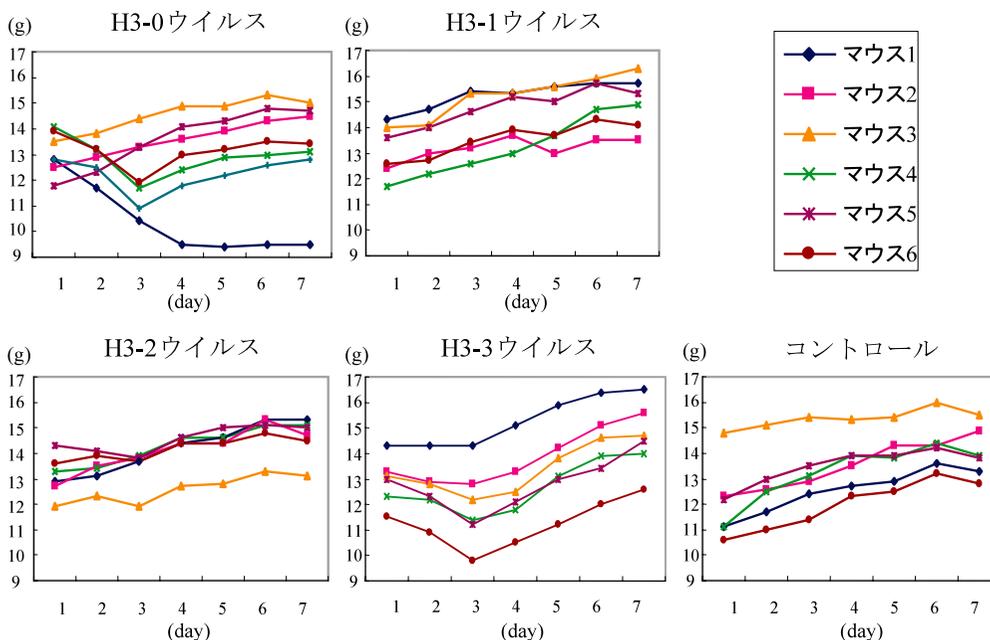


図4 ウイルス接種マウスの体重変化。3週齢、雌の C57/BL6マウスにそれぞれのウイルスを経鼻接種し、体重変化を毎日測定した。(図にはウイルス接種後1週間までを表記)

察されなかった。

中和抗体価の検討

ウイルス接種後4週間経過を観察した後に血清を採取して、材料と方法に記載した手順に従って血清中のウイルス中和抗体価を測定した。ウイルス接種マウスの体重変化と得られた血清のウイルス中和抗体価の間に相関関係は認められなかった(図表なし)。

中和抗体価をウイルス側に注目してまとめた成績を図5に示した。H3-0ウイルスに対する中和抗体価(中央値)はH3-0を接種したマウスの血清(即ち homologous antiserum)では1:6,132と高値を示したが、H3-1, H3-2, H3-3ウイルスを接種したマウスから得た血清(即ち heterologous antiserum)のH3-0ウイルスに対する中和抗体価は有意差を持って低値であった。H3-1ウイルスに対する homologous 抗血清(H3-1抗血清)の中和抗体価は1:5,848と高値

であり、H3-0抗血清、H3-3抗血清の中和抗体価は有意差を持って低値であった。しかしH3-2抗血清はH3-1ウイルスに対しても高い中和抗体価を示し、H3-1抗血清との間に有意差は認められなかった。同様に、H3-2ウイルスに対するH3-2抗血清の中和抗体価は1:5,902と高値で、H3-0抗血清、H3-3抗血清の中和抗体価は有意差を持って低値であった一方で、H3-1抗血清の中和抗体価との有意差は認められなかった。H3-3ウイルスに対して homologous なH3-3抗血清の中和抗体価は1:4,621と高値で、heterologous なH3-0, H3-1, H3-2抗血清では有意差を持って低値であった。

以上の成績をまとめると、糖鎖1本の付加で、中和抗体の作用(あるいは産生)が大きく影響されることが明らかになったが、同時にまた、糖鎖1本の除去によっても大きく左右されることが分かった。糖鎖付加あるいは除去の影響は、均一ではなく、糖鎖の場所によって大きく異なる

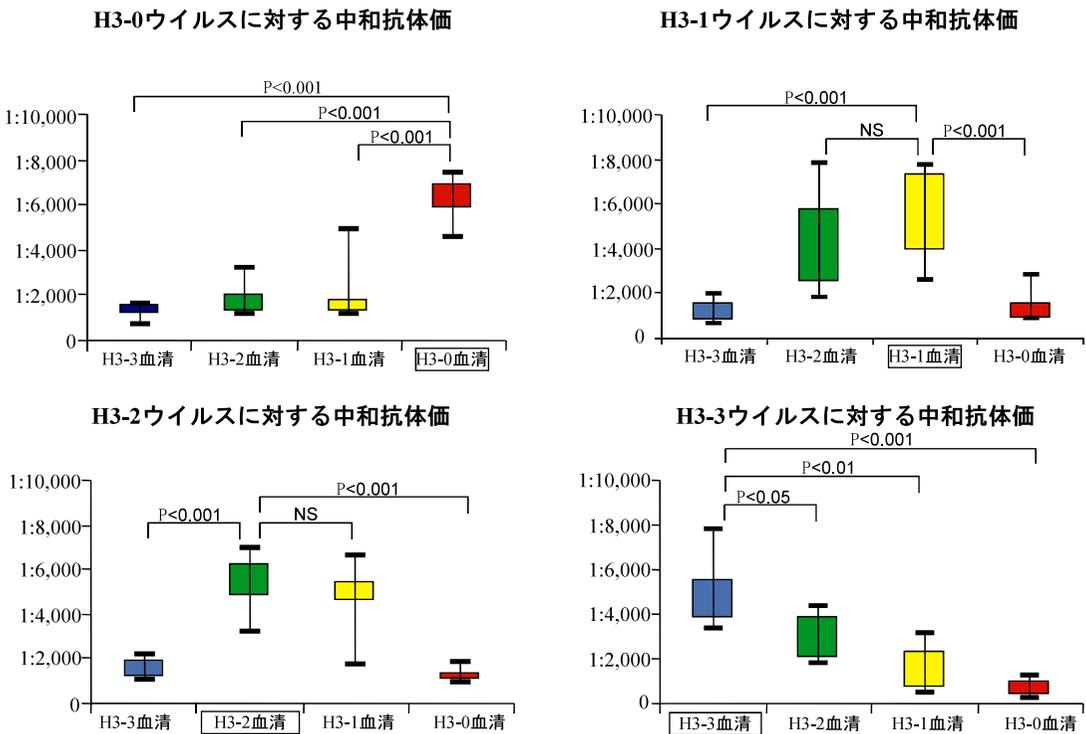


図5 各ウイルスに対するマウス抗血清の中和抗体価。四角の枠で囲んであるのは homologous ウイルスに対する抗血清である。例えば、H3-0抗血清はH3-0ウイルスを接種されたマウスから回収された血清である。

ることも明らかとなった。

考察

インフルエンザウイルスは非常に変異しやすいウイルスであり、HAのアミノ酸変化を伴う遺伝子変異は 3.6×10^{-3} 変異/ヌクレオチド/年のスピードで起こると言われている⁹⁾。HAの頭部には主要抗原部位が存在し、インフルエンザ感染に対する宿主の防御反応もHAに対する中和抗体の産生が主となる。抗体が産生されれば同じウイルスには二度と感染しないことから、ウイルスは生き延びていくためにHAの抗原性を変化させる必要がある。このような遺伝子の点変異に伴う抗原性の変化を antigen drift とい¹⁰⁾、一方、2009年春に出現したH1N1新型インフルエンザはこれとは全く異なる機構によるもので、antigen shift とよばれている¹¹⁾。H3N2ウイルスは1968年に人間界に出現以来、インフルエンザ流行の主流を担ってきたが、今後も流行を続けるのか、それとも新型ウイルスに駆逐されるのか、予断を許さない状況にある。

H3N2ウイルスは今日までHAの antigen drift

を繰り返しながら、HA頭部の糖鎖数を徐々に増加させてきたが、それが免疫の攻撃から逃れて流行を繰り返すのにどれくらい寄与し得るかを検証するために本研究は成された。今回作製した変異ウイルスはそれぞれHA頭部の糖鎖結合部位以外のアミノ酸組成は全く同一であるにもかかわらず、感染マウスで産生された抗体の中和活性は糖鎖の付加によって大きく減ぜられた。即ち、インフルエンザウイルスのHA頭部の糖鎖付加は宿主の免疫系からの逃避に役立ち得ることが示された。同時にまた、付加のみならず糖鎖の減少も抗体の中和活性を減ずることも明らかになった。さらに今回の実験では、H3-1とH3-2間では抗原性（あるいは免疫原生）の違いが認められず、H3-0とH3-1間およびH3-2とH3-3間では抗原性（免疫原生）の違いがはっきりと認められたことより、糖鎖の付加部位によって抗原性に与える影響には大きな差があることも判明した。

ウイルスの亜型は異なるが、Tsuchiyaらは、H2N2亜型(いわゆるアジア風邪)インフルエンザウイルスが比較的短命の内に人間界から姿を

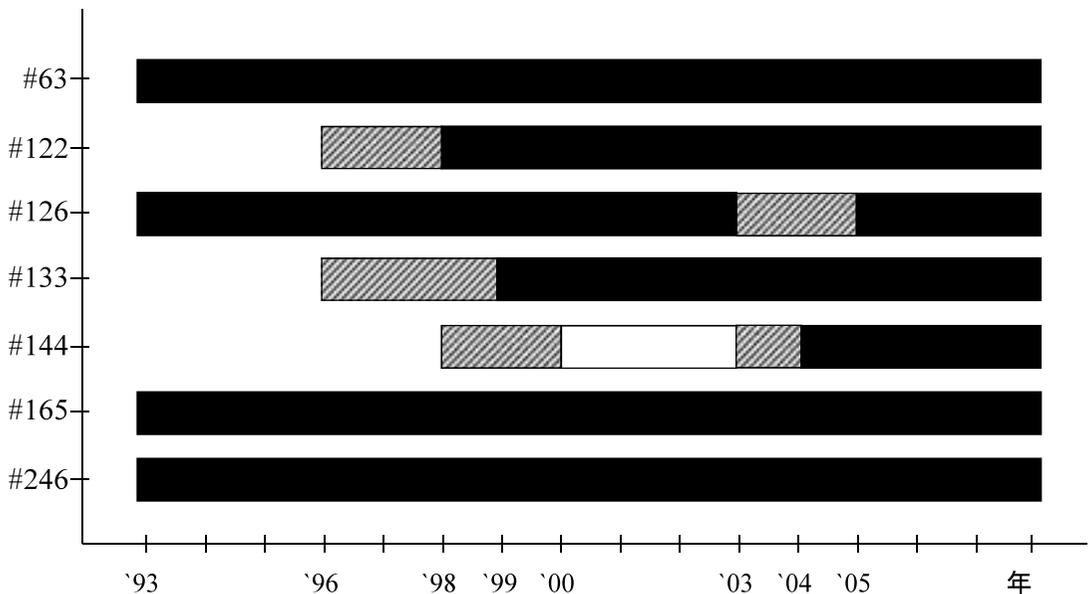


図6 ニューヨーク市におけるH3N2亜型インフルエンザウイルスのHA頭部の糖鎖付加部位の時代変遷。黒塗り帯は分離ウイルス株の90%以上に、斜線帯は10~90%に、白塗り帯は10%以下に、それぞれの位置に糖鎖付加部位があることを表している。

消した理由について、HA 頭部への糖鎖の付加が起きなかったためではないかと推測している。彼らは H2N2 ウイルスに対するモノクローナル抗体を用いて *in vitro* で escape mutant (即ち、用いたモノクローナル抗体に抵抗性のウイルス) を分離して、アミノ酸配列を調べたところ、多くの escape mutant で糖鎖付加部位が 1 つ追加されていることを見出している¹²⁾。しかし現実には、つまり H2N2 ウイルスが人間界で流行していた 1957~1967 年の間には、糖鎖付加部位の増加は起きなかった。その原因について、Tsuchiya らは、H2N2 ウイルスの HA では糖鎖数の増加がレセプター結合能と膜融合能を共に低下させるため、ヒトで増殖する上でそれが不利になって糖鎖の増加が起きなかったと考えている¹³⁾。

最後に、本研究で得られた知見に基づいて、H3N2 ウイルス流行の時代推移と HA 頭部の糖鎖付加部位の変遷について概観したい。インフルエンザ流行の時代変遷を調べる上で、分離ウイルス株のシーケンス・データの豊富さから、ニューヨーク市が最も適していると考えられる。Influenza Virus Resource Database¹⁴⁾ に載っているニューヨーク市で分離・同定されたすべての H3N2 亜型ヒトインフルエンザウイルスの HA 頭部の糖鎖付加部位を調べ、その時代推移を図 6 にまとめた。1993 年以前のデータは数が少ないため、年次別のデータは 1993 年以降から表した。大局的に見ると糖鎖数は徐々に増加しているが、そのパターンは必ずしも増加一途ではなく、糖鎖によって違いが見られる。1996 年より #122 と #133 にペアで糖鎖が付加されたウイルスの流行が始まり、次第にそれが主流になって行った。本研究で得られた成績 (図 5) では、#122 の糖鎖の単独除去では抗原性の差は観察されず (H3-1 と H3-2 の違い)、#122 と #133 の糖鎖がペアで除去されて初めて抗原性の差が見られた。#122 のすぐ近く (#126) にも糖鎖結合部位があるため、#122 の糖鎖の有無は抗原性にあまり影響しないのかも知れない。ちなみに #126 については 2003 年から糖鎖を欠いたウイルスの流行が 2 年ほど起きて、再

び糖鎖付加ウイルスが主流となっている。最も興味深いのは #144 の推移である。1998 年から #144 糖鎖付加ウイルスの流行が始まったが、2000 年には糖鎖なしのウイルスに取って代われ、2003 年から再び糖鎖付きに戻り、2004 年からはそれが流行の主流となった。以上の成績から、H3N2 ウイルスの流行はアミノ酸変異による主要抗原部の構造変化以外にも、糖鎖の付加や脱落によっても起きる可能性が示唆された。

今日まで H3N2 ウイルスは糖鎖数を増減させながら流行を繰り返してきたが、最終的には糖鎖が減少したウイルスは淘汰され、糖鎖数は徐々に増加している。タンパク質に結合した糖鎖は、タンパク質の高次構造を保ち、タンパク質を安定化させるのに役立つと考えられている。そのため、糖鎖の多い HA では、antigen shift (即ち構造変化) が起きても、それが分子構造全体に及ぼすネガティブな効果を糖鎖が補う可能性が高くなり、その分、変異のキャパシティ (許容度) も大きくなると推測される。今後、H3N2 ウイルスは糖鎖の付加も含め、さらに変異を繰り返しながら、流行を続けるのか、それとも新型ウイルスに場所を譲って人間界から消滅するのか、監視と研究を続ける必要がある。

謝 辞

本研究を行うに当たり、ご指導とご協力をいただいた川崎医科大学微生物学教室の大内正信教授、藤井豊准教授、雑賀康子研究補助員、医用生物センターの小郷哲主任技術員そしてリバースジェネティクス用のベクターおよび WSN ウイルス作製セットを分与いただいた東京大学医科学研究所の河岡義裕教授に深謝いたします。

本研究は基礎研究推進事業 (NIBIO) ならびに川崎医科大学プロジェクト研究費 (17-405M, 18-405, 19-408M) の援助を受けて行われた。

引用文献

- 1) Ohuchi M, Ohuchi R, Feldmann A, Klenk HD: Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J Virol* 71: 8377-8384, 1997
- 2) Abe Y, Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Muraki Y, Hongo S: Effect of the addition of oligosaccharides on

- the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J Virol* 78: 9605-9611, 2004
- 3) Mishin VP, Novikov D, Hayden FG, Gubareva LV: Effect of hemagglutinin glycosylation on influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors. *J Virol* 79: 12416-12424, 2005
 - 4) Asaoka N, Tanaka Y, Sakai T, Fujii Y, Ohuchi R, Ohuchi M: Low growth ability of recent clinical isolates in MDCK cells is due to their low receptor binding affinities. *Microb Infect* 8: 511-519, 2006
 - 5) Skehel JJ, Stevens DJ, Daniels RS, Douglas AR, Knossow M, Wilson IA, Wiley DC: A carbohydrate side chain on hemagglutinin of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1779-1783, 1984
 - 6) Neumann G, Watanabe T, Ito H, *et al.*: Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9345-9350, 1999
 - 7) Anders EM, Hartley CA, Jackson DC: Bovine and mouse serum β inhibitors of influenza A viruses are mannose-binding lectins. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4485-4489, 1990
 - 8) Reed LJ, Muench H: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer J Hygiene* 27: 493-497, 1938
 - 9) Gojobori T, Moriyama EN, Kimura M: Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 10015-10018, 1990
 - 10) Wiley DC, Skehel JJ: The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56: 365-395, 1987
 - 11) Neumann G, Noda T, Kawaoka Y: Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459: 931-939, 2009
 - 12) Tsuchiya E, Sugawara K, Hongo S, Matsuzaki Y, Muraki Y, Li ZN, Nakamura K: Antigen structure of the haemagglutinin of human influenza A/H2N2 virus. *J Gen Virol* 82: 2475-2484, 2001
 - 13) Tsuchiya E, Sugawara K, Hongo S, Matsuzaki Y, Muraki Y, Li ZN, Nakamura K: Effect of addition of new oligosaccharide chains to the globular head of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin on the intracellular transport and biological activities of the molecule. *J Gen Virol* 83: 1137-1146, 2002
 - 14) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/> (2009.9.29)
 - 15) Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC: Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 182: 366-373, 1981

Increases in hemagglutinin (HA) sugar chains may contribute to the survival of influenza viruses among humans ?

Hirotohi TOKUNAGA

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT Since it emerged in 1968, the human influenza A virus H3N2 subtype (so-called Hong Kong type) has undergone repeated antigenic mutations with resulting epidemics. As well, the number of sugar chains (oligosaccharides) in the globular region of hemagglutinin (HA) has gradually increased. It has been speculated that this increase in oligosaccharides may have contributed to the survival of this virus among humans. This could be because the sugar chains cover the major antigenic site of HA and so the virus escapes any attack from the host's immune system. However this concept has not been examined experimentally.

The present study investigated this concept by reverse genetics and experimental infections in mice. The glycosylation sites of HA of A/Okayama/06/01 were removed by mutagenesis

retrospective deconstruction, one after another. Through reverse genetics, mutant viruses were generated. Mice were intranasally infected with the original (H3-0) and mutant viruses in which the 1 to 3 glycosylation sites were removed (named H3-1, H3-2 and H3-3, respectively). One month after infection, sera were collected from infected mice and the cross reactivity of the neutralizing antibodies in the sera were assayed using various combinations of sera and viruses.

H3-1 and H3-2 were highly cross-reactive, whereas H3-0 and H3-3 were clearly distinguished from H3-1 and H3-2, respectively. Both the addition and the deletion of a glycosylation site reduced cross reactivity. The present study indicated that oligosaccharides may be convenient tools for modifying immunogenicity, thereby helping an escape from immune recognition. This report also discussed an influenza epidemic pattern in New York City from this point of view.

(Accepted on October 5, 2009)

Key words : influenza virus, hemagglutinin, sugar chains, reverse genetics, neutralizing antibody, immunogenicity

Corresponding author

Hirotohi Tokunaga

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192 Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : tokusan@med.kawasaki-m.ac.jp