

1. インフルエンザウイルスの抗原変異と バイオインフォマティクス

伊藤 公人

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・バイオインフォマティクス部門
科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業・さきがけ

毎年世界中で季節性インフルエンザが流行し、高熱、急性肺炎等の重篤な疾病を引き起こしている。インフルエンザの予防にはワクチン接種が有効であるが、人の免疫圧による選択淘汰を受け、ウイルスの抗原性が変化し続けるため、流行しているウイルスの抗原性に合わせてワクチン株を更新しなければならない。本総説では、最新の知見を含め、バイオインフォマティクスをワクチン株選定や抗原変異予測に活用する研究事例を概説する。

1. はじめに

人に感染するインフルエンザウイルスには、A、BおよびC型がある。このうちA型ウイルスは人を含む哺乳動物と鳥に感染する人獣共通感染症病原体であり、有史以来、人や家畜・家畜に甚大な被害を与えてきた¹⁾。A型インフルエンザウイルスはカモ等の野生水禽に由来する^{2,3,4)}。これまでに野生水禽のウイルスから、抗原性の異なるヘマグルチニン (HA) タンパク質 16 亜型 (H1 ~ H16) およびノイラミニダーゼ (NA) タンパク質 9 亜型 (N1 ~ N9) が見つかっており、これらの組み合わせにより、144 通りの亜型の組み合わせの A 型ウイルスが存在すると考えられている⁵⁾。

自然界に保持されている A 型ウイルスが家禽と家畜での流行を経て人に感染し効率的に増殖するとインフルエンザの世界的大流行 (パンデミック) を引き起こす (図 1)。

20 世紀においては、三つの亜型の A 型ウイルスが新型インフルエンザウイルスとして出現し、世界中で膨大な数の死者を出した (1918 年 H1N1: スペインかぜ, 1957 年 H2N2: アジアかぜ, 1968 年 H3N2: 香港かぜ)。また、2009 年には、ブタ由来遺伝子を持つ H1N1 ウイルスが人の集団に侵入し、南北アメリカ大陸から流行が始まり世界的大流行へと発展した^{6,7)}。

インフルエンザの予防にはワクチン接種が有効であるが、人の免疫圧による選択淘汰を受け、ウイルスの抗原性が変化するので、ワクチン製造株を年々変更する必要がある^{8,9,10,11)}。現行の不活化ワクチンは、主に中和抗体の標的である HA に対する血中抗体の産生を誘導する。しかし、年々 HA の抗原領域にアミノ酸置換が蓄積し、抗原性の变化したウイルスが現れ、季節性インフルエンザが流行する (図 1)。季節性インフルエンザは、毎年、日本だけで数千名以上を死亡させ、数百名以上に脳症、多臓器不全を起こしており、季節性インフルエンザ対策は重要な課題として依然残されたままである。

季節性インフルエンザをワクチンでコントロールするためには、流行するウイルスの抗原性に合った株をワクチン株として選定する必要がある¹²⁾。ワクチン株の選定は、新しい抗原変異株が流行する数ヶ月前に行う必要がある¹³⁾。流行するウイルスの抗原性に合ったワクチン株を先回りして予測することが重要となる^{9,14)}。

本総説では、バイオインフォマティクスを情報科学、統計科学および計算科学を分子生物学に応用するための学問と位置づけ、バイオインフォマティクスをインフルエンザウイルスのワクチン株選定や抗原変異予測に活用する研究

連絡先

〒001-0020

北海道札幌市北区北 20 条西 10 丁目人獣共通感染症リサーチセンター

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・バイオインフォマティクス部門

TEL: 011-706-9504

FAX: 011-706-7310

E-mail: itok@czc.hokudai.ac.jp

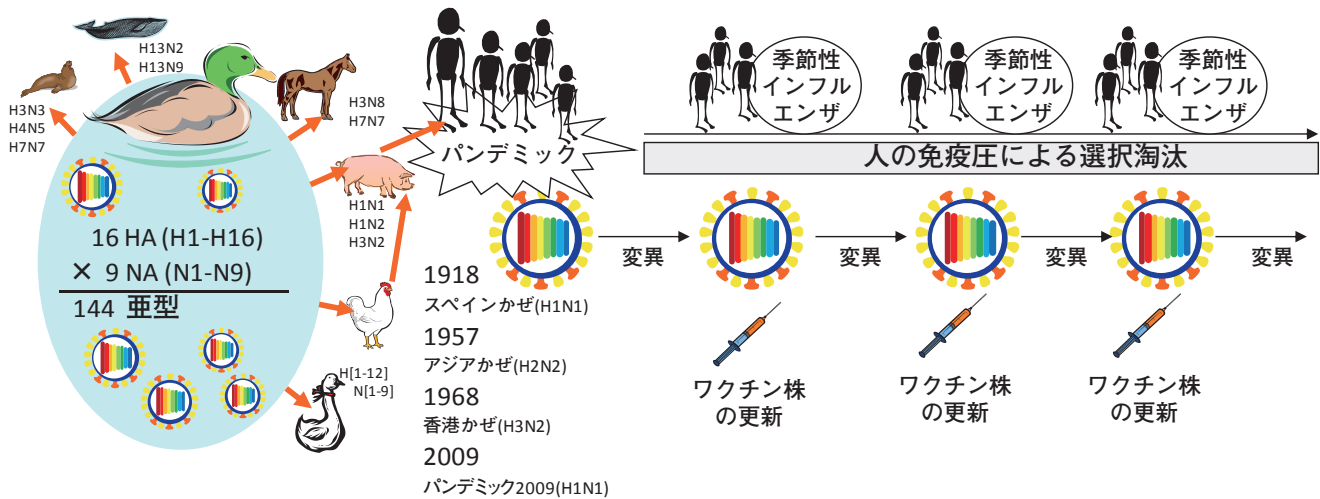


図1 パンデミックインフルエンザと季節性インフルエンザ

自然界に保持されているウイルスが家禽・家畜での流行を経て人に感染し効率的に増殖すると世界的な大流行（パンデミック）を引き起こす。インフルエンザの予防にはワクチン接種が有効であるが、人の免疫圧による選択淘汰を受け、ウイルスの抗原性が頻繁に変化するため、流行しているウイルスの抗原性に合わせてワクチン株を更新しなければならない。

を概説したい。次節で、バイオインフォマティクス活用の先駆的研究を紹介し、3節で抗原地図法について概説する。4節では進化系統解析について述べ、5節で遺伝子配列の大規模解析による変異予測の研究事例を紹介し、6節でまとめを述べる。

2. バイオインフォマティクス活用の歴史

インフルエンザワクチン株の選定にバイオインフォマティクスを活用した研究の歴史は意外に旧く、LeeとTaurasoらの研究^{15, 16)}にさかのぼる。彼らの研究は1968年にNature誌に「Numerical Taxonomy and Influenza B Virus」として掲載され、その後、論文「A Method for the Formulation of Influenza Virus Vaccine using Numerical Taxonomy」が同年のWHO広報誌に掲載されている。「バイオインフォマティクス」という語が使われ始めたのは、1978年であり¹⁷⁾、Leeらの論文に「バイオインフォマティクス」という語が現れることはない。しかし、ウイルスを用いた実験の成績を情報科学的手法によって解析する方法論は、現在のバイオインフォマティクスや計算生物学のそれと同じであり、ウイルス学にバイオインフォマティクスを活用した先駆的研究といえよう。

Leeらは、米国のWHO国際インフルエンザセンターで得られたB型およびA/H2N2亜型のウイルス株の赤血球凝集阻止（HI）試験の成績を数量分類学（Numerical Taxonomy）および主成分分析（Principal Component Analysis）により解析した。数量分類学とは、数値計算を用いて対象を分類するクラスター分析手法であり¹⁸⁾、主

成分分析とは、変数同士の相関を用いてデータの骨子を抽出する手法である¹⁹⁾。Leeらの方法では、まず、同じ抗血清を用いたときのHI値の相関を株間で測る。二つのウイルス株について、HI値の相関係数が大きいことは株間の抗原性が近いことを意味し、すべての抗血清に対するHI値が等しいときに相関係数はその最大値1.0をとる。逆に、HI値の相関が低いことは株間で抗原性が異なることを意味する。次に、算出された相関係数から数量化分類学によりクラスター分析を行い、株間での抗原性の近さを表す樹形図を作成する。また、相関係数を主成分分析で解析し、得られる上位主成分を用いて散布図上にウイルス株を点として配置する。主成分分析を用いる事により、HI値の相関が高い、つまり、抗原性が似ているウイルス株同士が近くに配置した図を作成する事ができる。図2にH2N2インフルエンザウイルスとニワトリ抗血清を用いたHI試験のデータを視覚化した例を示す。当時流行していた株のほとんどが散布図右側に配置されて大きなクラスターを形成していることが判る。また、当時ワクチン株として用いられていたA/Japan/305/1957株やA/Taiwan/1/1964株は、散布図の左下と左上にそれぞれ配置され、ワクチン株の抗原性が流行しているウイルスの抗原性に合っていないことが観測できる。Leeらの研究の引用件数は10件程度と少なく、実際にどの程度ワクチン株選定に活用されたかは不明である。しかし、コンピュータにデータやプログラムをパンチカードで入力していた時代背景を考えると、ウイルス学分野にコンピュータを導入した革新的研究であったと推察される。

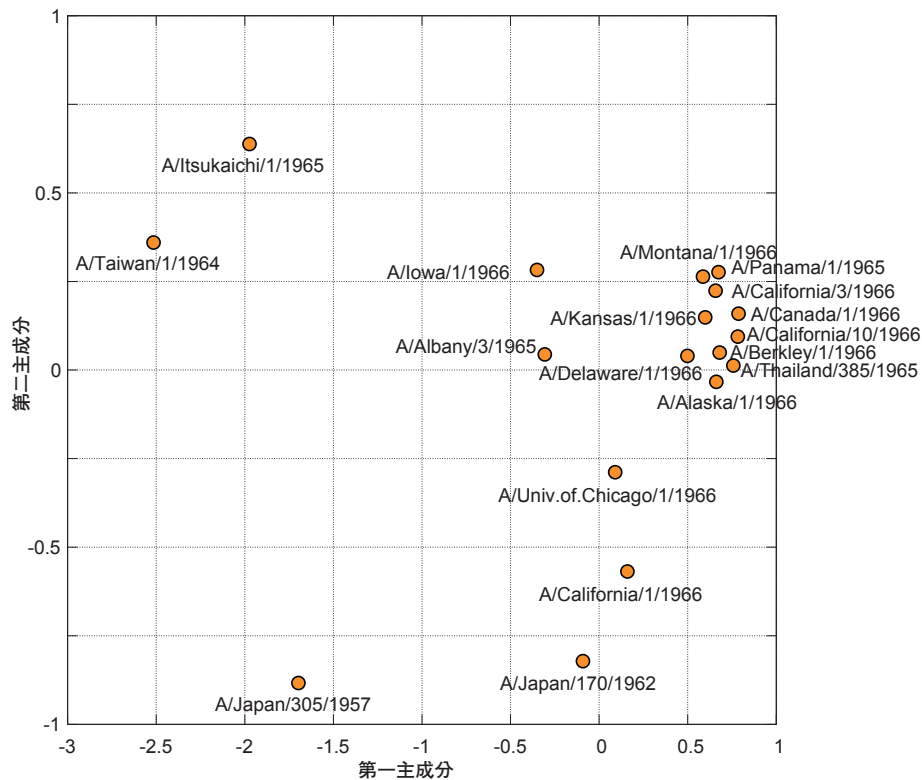


図2 H2N2 ウイルスを用いた HI 試験データの視覚化

Lee らが 1968 年に提案した手法で、H2N2 ウイルスの HI 試験データを視覚化した。図中の丸はウイルス株を表し、抗原性が似ている株が近く配置されている。当時流行していた株のほとんどが散布図右側に配置されて比較的大きなクラスターを形成していることが判る。また、当時ワクチン株として用いられていた A/Japan/305/1957 株と A/Taiwan/1/1964 株は、散布図左下と左上にそれぞれに配置されており、ワクチン株の抗原性が流行しているウイルスの抗原性に合っていないことが容易に観測できる。図は、Lee らの提案手法と論文中的数据を用いて筆者が再現した。Lee ら 1968 年の論文では三次元で視覚化した散布図が、数量分類学で得られた樹形図と共に掲載されている。

3. 抗原地図法

Lee らの論文発表から 33 年後の 2001 年、Lapedes らは、論文「The geometry of shape space: Application to influenza」を *Journal of Theoretical Biology* 誌で発表した²⁰⁾。この論文で彼らは、H3N2 ウイルスを用いた HI 試験のデータ解析に、多次元尺度構成法 (Multi-Dimensional Scaling; MDS) を導入した。MDS 法とは、対象間の相違度に基づいて対象物を空間上の点に配置する解析手法であり、対象間の相違度を点間の距離として表すことができる^{21, 22)}。理論免疫学の分野では 1970 年代後半から、抗原抗体反応の数理モデルとして Shape Space という概念モデルが提案され、獲得免疫による生体防御機構の理論的研究に用いられてきた^{23, 24)}。Lapedes らの研究では、ウイルス株と抗血清の両方を空間上に配置し、MDS 法を用いて、ウイルス株と抗血清の間の距離を HI 試験から得られる抗原性の違いに対応させることにより、抗体と抗原の反応性を表

す空間 (Shape Space) をかなり正確に構築できることを世界で初めて明らかにした²⁰⁾。

Smith らは、Lapedes らと同様の手法を用いて、過去に流行した H3N2 ウイルス株の大量の HI 試験のデータを解析し、1968 年から 2003 年までにこのウイルスに起こった抗原変異を二次元の地図として視覚化した²⁵⁾。Lapedes らの方法では、HI 値の大小の順序を非計量 MDS 法²¹⁾ で解析した後に HI 値の値から計量 MDS 法²⁶⁾ で配置を精密化していたのに対し、Smith ら方法では最初から HI 値の値を計量 MDS 法で解析する点で異なるが、両手法の基本的アイデアは同じである。しかし、Lapedes らは人が見ることができない五次元空間で正確な地図を作成したことに対し、Smith ら正確性を少しだけ犠牲にすることにより、抗原性の違いを俯瞰できる二次元の地図を作成できることを示した点で、実用性が決定的に異なる。Smith らによって開発された、地図を作成して抗原性の違いを俯瞰する方法を抗原地図法 (Antigenic Cartography) といい、この

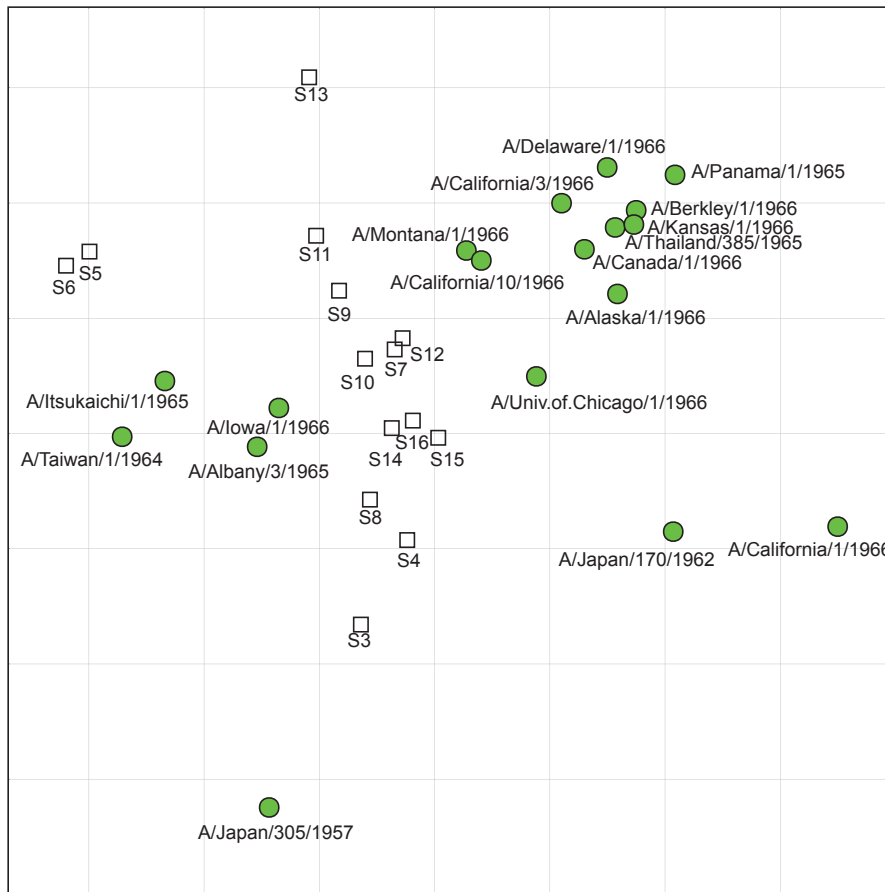


図3 H2N2 ウイルスを用いた HI 試験のデータから得られる抗原地図

Lee ら論文に掲載されている H2N2 ウイルスの HI 試験データを Smith らの手法で解析した。図中の丸はウイルス株を表し、四角は抗血清を表す。ウイルス株と抗血清の間の距離は HI 価を表し、グリッドの間隔は 1280 の HI 価に相当する。HI 価が 640 であるウイルス株と抗血清は約 2 グリッド分、HI 価が 320 であるもの同士は約 3 グリッド分、HI 価が 160 であるもの同士は約 4 グリッド分の距離に配置されている。つまり、1 グリッド以内のウイルス株同士は、HI 価の減少が 2 倍以下、2 グリッド以内のウイルス株同士は、HI 価の減少が 4 倍以下であると考えて良い。Lee らの結果と同様に、当時流行していた株が大きなクラスターを形成し、当時ワクチン株として用いられていた A/Japan/305/1957 株や A/Taiwan/1/1964 株は、流行していたウイルスの抗原性に合っていないことを観測できる。解析および図の作成には、Smith らが Web 上で公開しているプログラムを利用した (<http://www.antigenic-cartography.org/>)。

方法で作成される地図を抗原地図(Antigenic Map)という。

図3に1968年のLeeらの論文と同じデータをSmithらの方法で解析した抗原地図を示す。Leeらの結果と同様に、当時流行していた株が比較的大きなクラスターを形成し、当時ワクチン株として用いられていたA/Japan/305/1957株やA/Taiwan/1/1964株は、流行しているウイルスの抗原性に合っていないことを観測できる。

2004年にSmithらの論文がScience誌に掲載されて以来、抗原地図法は様々なインフルエンザウイルスの解析に応用されている。これまでに、H3N2ブタインフルエンザウイルスの抗原地図²⁷⁾、H5N1鳥インフルエンザウイルスの抗原地図²⁸⁾およびH1N1パンデミック2009インフルエンザウイルスの抗原地図²⁹⁾が作成され、WHOが推

奨するインフルエンザワクチン株の選定のプロセスにも活用されている^{30,31)}。また、抗原地図法は、用途がインフルエンザウイルスに限定されないため、C型肝炎ウイルスやHIV、マラリア原虫など、抗原性が変化する病原体の解析に広く応用でき³⁰⁾、2008年の台湾でエンテロウイルス71型が流行した際に、その抗原性の解析に利用された³²⁾。

4. インフルエンザウイルスの進化系統解析

A型インフルエンザウイルスは、8本に分節化されたマイナス鎖RNAを粒子内部に持ち、これらのRNA上に11種類のウイルスタンパク質がコードされている³³⁾。1982年にA/PR/8/34株のウイルスゲノムの解読が完了し³³⁾、様々な地域で様々な宿主から分離されたウイルス株の遺伝

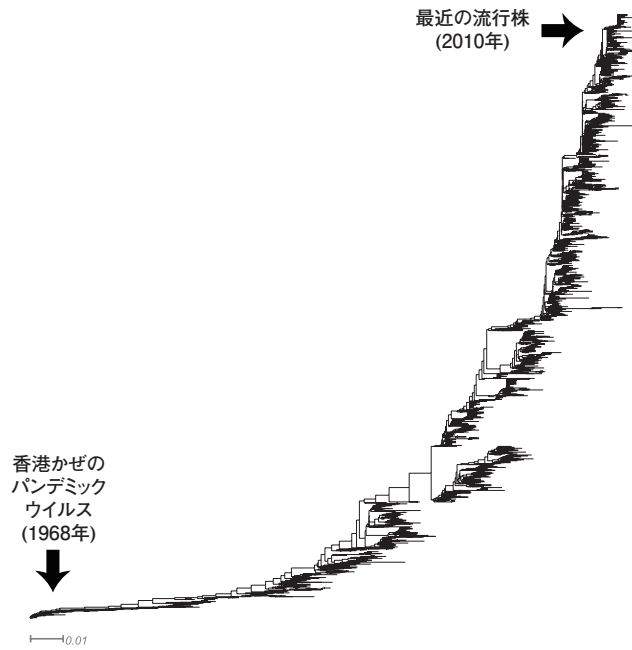


図4 人のH3N2ウイルスのHA塩基配列を用いて作成した進化系統樹

幹は1968年のパンデミック株から最近の流行株まで連続しており、房における進化はその先端で止まっている。この樹形は、ある流行株から派生した変異ウイルスの中から、常に一種類のウイルスが選択されて次の流行株となることを意味し、季節性インフルエンザの流行におけるウイルスの進化を特徴付けている。

子の塩基配列が網羅的に解析されている³⁴⁾。これらの遺伝子情報はこれまで主に進化系統解析に用いられ、ウイルスの伝播経路の解明、宿主に特異的な遺伝子系統の同定、RNA分節遺伝子再集合の研究に活用されてきた^{4, 35, 36, 37, 38)}。

人のH3N2ウイルスのHA遺伝子を用いて進化系統解析を行うと、図4に示すような1本の長い幹とそれから伸びる複数の短い房で構成される進化系統樹が得られる³⁹⁾。幹は1968年のパンデミック株から最近の流行株まで連続しており、房における進化はその先端で止まっている。この樹形は、ある流行株から派生した変異ウイルスの中から、常に一種類のウイルスが選択されて次の流行株となることを意味し、季節性インフルエンザの流行におけるウイルスの進化を特徴付けている^{39, 40, 41, 42, 43, 44)}。この樹形がサボテンに似ていることから、その進化はCactus-like Evolutionと呼ばれる^{11, 39)}。インフルエンザの流行では、抗原性が異なる二つ以上のウイルス株が同時に流行することが知られている^{42, 45, 46)}。しかし、進化系統樹の幹が一本になることは、常に一種類のウイルス株が世界中でほぼ同時に選択淘汰されて流行を続けていることを示すものと考えられる。

進化系統樹の幹が一本になる詳細なメカニズムは未解明であるが、最も流行したウイルスとの交差免疫が原因で他の流行株は子孫ウイルスが残るチャンスがほとんどないとするモデルが有力視されている^{47, 48, 49, 50)}。

また近年、インフルエンザウイルスの進化系統樹から、季節性インフルエンザにおけるウイルスの地理的伝播の傾向を調査する研究が進んでいる。Fitch⁴¹⁾、Plotkin⁵¹⁾、Russel⁵²⁾、Sata⁵³⁾、Bedford⁵⁴⁾らの解析により、新しい流行株は東アジア・東南アジアで最初に出現する傾向にあることが示されている。この伝播モデルはSource-Sinkモデルとよばれ⁵⁵⁾、東アジア・東南アジアで流行しているウイルスをワクチン株として利用することが有用であると提案されている。

5. 塩基配列データの大規模解析と変異予測への応用

過去に人で流行したインフルエンザウイルスの遺伝子データを大規模に解析することにより、ウイルス進化の特徴を捉えることができる。まず、HA分子において正の淘汰が起こっている位置を検出する試みから紹介したい。

大量の遺伝子塩基配列から進化系統樹を作成し、翻訳領域の各コドンで起こった同義置換と非同義置換の速度を比較すると、正（または負）の選択淘汰が働いているアミノ酸部位を知ることができる^{41, 56, 57, 58, 59)}。Bushらは人で流行したH3N2インフルエンザウイルスの遺伝子データを用いて、HA上で正の淘汰が起こるアミノ酸部位18箇所を推定した⁶⁰⁾。これらの部位のHA立体構造における位置を図5に示す。同時期にSuzukiらもHA上で正の淘汰が起こるアミノ酸部位を推定しており⁵⁷⁾、同義置換と非同

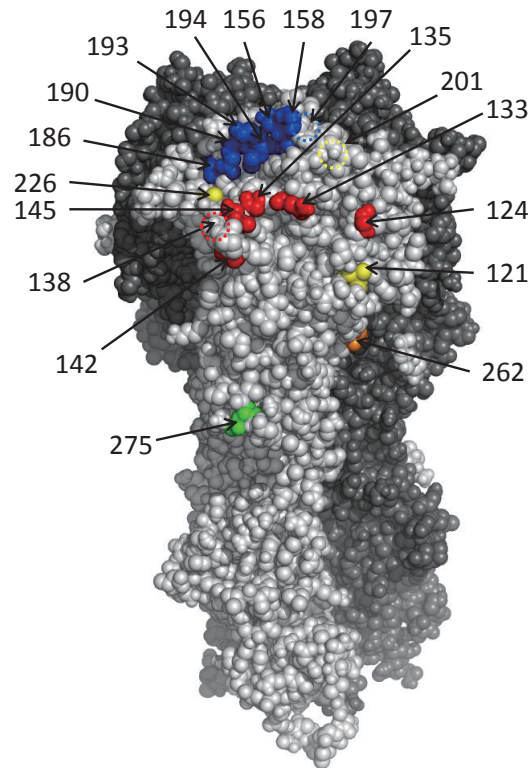


図5 H3N2 インフルエンザウイルスのHA上で正の淘汰が検出された位置

大量の遺伝子配列を用いて翻訳領域の各コドンで起こった同義置換と非同義置換の速度を比較すると、正の選択淘汰が働いているアミノ酸部位を推定することができる。HAの立体構造上に、Bushらの研究で正の淘汰が検出された18箇所(121, 124, 133, 135, 138, 142, 145, 156, 158, 186, 190, 193, 194, 197, 201, 226, 262, 275)を示す。正の淘汰が検出された部位はすべてのH3亜型HAの抗原領域A～Eのいずれかに属している。抗原領域A, B, C, D, Eに含まれていた正の淘汰の検出部位を、それぞれ赤, 青, 緑, 黄, 橙で表示した。この角度からの描画で見えていない部位(138, 197, 201)はその位置を点線で示した。視点を変えて描画するといずれの部位もHA表面に露出していることが判る。

義置換が起こる確率が全ての部位で一定である場合、12箇所では両者の研究に共通して正の淘汰が検出される。あるアミノ酸部位に正の淘汰が働くとは、その位置のアミノ酸が別のアミノ酸に置き換わった株が選択されやすいことを意味する。逆に負の淘汰が働くとき、その部位のアミノ酸置換を持つ株は選択されづらいことを意味する。Bushらの研究で正の淘汰が検出された18箇所(121, 124, 133, 135, 138, 142, 145, 156, 158, 186, 190, 193, 194, 197, 201, 226, 262, 275)はすべてH3亜型HAの抗原領域A, B, C, D, Eのいずれか^{10, 59)}に属しており、このことは、各抗原領域に正の淘汰が働き、抗原性が変化したウイルス株が選択されることを示している。

Bushらは、HAで正の淘汰が検出された18箇所のアミノ酸部位が今後も頻繁に他のアミノ酸残基に置換されていくと考え、翌年に流行する株の系統を予測する手法を提案し、1999年にScience誌に発表した⁶¹⁾。論文執筆時に翌年の流行株を知ることができないため、Bushらは1986年

から1997年までの11シーズンについて、翌年の以降の株を隠して予測を行い、予測された流行株を実際の流行株と比較する方法でその予測精度を評価した。このように過去に遡って予測精度を評価する方法を遡及試験(Retrospective Test)という。1986年から1997年までのインフルエンザシーズンについて、提案手法を用いて遡及試験を行った結果、11シーズン中9シーズンにおいて、適切な系統のウイルス株が予測できている。実際は、変異するアミノ酸部位は時代と共に変わっており⁶²⁾、この18箇所を指標にして、現在のH3N2ウイルスの流行株を予測しても同様な精度で結果を得ることはできない。しかし、バイオインフォマティクスを用いた変異予測法とその評価方法を示した重要な研究であることに間違いはない。

3節で紹介したMDS法を用いてHAのアミノ酸配列を解析する試みも始まっている。Heらは、HAのアミノ酸配列をMDS法で解析し、得られた図からカーネル密度推定⁶³⁾を行うことで、まだ主流になっていないが将来主流

表1 H3N2 亜型インフルエンザウイルスの変異予測試験の結果

年	予測された流行株	予測されたアミノ酸置換	実際のアミノ酸置換
1998	CY006243 A/New York/508/1997	K62E T121N G124S V144I K156Q E158K V196A I236L N276K	K62E T121N G124S V144I K156Q E158K V196A N276K
1999	AF533722 A/Tucuman/V425/1998	G129E Y137S L194I V223I	R57Q Y137S D172E
2000	CY002368 A/New York/325/1999	R109K I144N T192I D271N	G5V Q33H K92T T192I D271N
2001	CY008804 A/Canterbury/85/2000	V5G H33Q R50G T92K I144N T167A S199P S247C N271D P273S	V5G H33Q T92K I144N N271D
2002	EU857032 A/Hong Kong/ CUHK51431/2001	S46F R50G E83K S186G V202I W222R G225D	A106V N144D S186G
2003	DQ114505 A/Stockholm/25/2002	L25I R50G H75Q E83K V106A A131T D144N H155T V202I W222R G225D V226I S227P	L25I R50G H75Q E83K V106A A131T D144N H155T Q156H V202I W222R G225D
2004	EU501294 A/NARA/64/2003	I25V Y159F S189N S227P	K145N Y159F S189N V226I S227P
2005	EF566166 A/Christchurch/263/2004	K83R D291G	—
2006	EU501748 A/Okinawa/18/2005	S193F D225N I274F G275C	S193F D225N
2007	EU502295 A/Nepal/NP-HC90997- ORIGINAL/2006	Q1S N6I T128A R142G K173E	G50E K140I
2008	CY022882 A/USA/AF1028/2007	Q33R T48I D85G K207R	K173Q
2009	CY037799 A/Ohio/UR07-0035/2008	L3F K83N T128I L157S Q173N K276N A304S	K158N
2010	GQ902809 A/Thailand/CU-B110/2009	E62K K92Q N144K P162Q N189K R261Q	(未評価)

になる可能性がある新しいクラスターを検出できることを示した⁶⁴⁾。

また、著者らの研究グループでは、H3N2 ウイルス 2600 株の HA アミノ酸配列について、株間で異なるアミノ酸の個数を数え、これを MDS 法によって解析した結果、HA は MDS で構築した三次元空間で一定の曲率をもつ曲線に沿って進化していることを観測した。MDS 空間における曲線上の進化は、同じの位置のアミノ酸が複数回置換していることを意味し、曲率が一定であることからウイルスの分離年の差と HA 上で異なるアミノ酸置換の数の関係に規則性があることが示唆された。HA アミノ酸配列の各位置における置換速度がガンマ分布に従うと仮定すると、この関係をよく回帰でき、回帰から得られたガンマ分布のパラメータを利用して、過去 12 年に溯ってそれぞれ翌年のアミノ酸置換を予測する遡及試験を行った (表 1)。1997 年から 2008 年の各年に対し、予測結果と実際に翌年起こっ

たアミノ酸置換を比較したところ、実際に起こったアミノ酸置換の約 70% を予測でき、本手法で予測したうちの 45% のアミノ酸置換が実際に翌年起こることを確認した (論文投稿中)。今後の課題として、提案手法では変異が起きるタイミングを的確に予測できないことが挙げられる。例えば、2002 年には、R50G, E83K, V202I, W222R, G225D といったアミノ酸置換を持つ株が主流となることが予測された。しかし、実際にはこのような株は 2002 年には主流にならず、次の 2003 年になってはじめて主流となっている。表 1 の下線に示すこのようなタイミングのずれは、予測が的中する年としない年がある原因となっている。

これまでバイオインフォマティクスを活用した抗原変異予測の研究では、主に A 香港型 (H3N2) ウイルスが対象とされてきた。今後、H1N1 パンデミック 2009 ウイルスが季節性インフルエンザとして流行を続けると考えられ、このウイルスの抗原性がどのように変化していくかを予測

することが喫緊の課題となっている。著者らの研究グループでは、H1N1 パンデミック 2009 ウイルスの HA の三次元立体構造モデルをホモロジーモデリング法により構築し、1918 年のパンデミック (H1N1) ウイルスのそれと比較することにより今後のアミノ酸置換を予測した⁶⁵⁾。HA の構造は、特に抗原領域 Sa と Sb において、1918 年の H1N1 ウイルスのそれらと酷似しており、1918 年のウイルスは、出現後、Sa と Sb が人の中和抗体の標的となり、この領域にアミノ酸置換を持つウイルスが人の免疫圧により選択されたことから、2009 年のパンデミック (H1N1) ウイルスにおいても、今後、これらの箇所と同様のアミノ酸置換が起こることが予測された。現在、流行中の H1N1 ウイルスのアミノ酸配列を調べた結果、予測された通りのアミノ酸置換を持つ株が、既に分離され始めており、このような変異株が次の流行を引き起こすものと考えている。

6. おわりに

近年の分子生物学の飛躍的發展により、多くの生物種のゲノムが解読されている。ゲノムデータの増加に伴いバイオインフォマティクス分野の研究が急速に進展し、様々な解析理論が開発されている。従来の進化解析では、現在、地球上に存在する生物種の遺伝子情報から、過去に遡る方向で進化が研究されてきた。しかし、ウイルスの変異予測では、時々刻々と進化し続けるウイルス遺伝子をリアルタイムに解析し、過去から現在、そして未来に向かって進化の過程を研究しなければならない。

インフルエンザウイルスは、医学、疫学、獣医学等の分野で旧くから広く研究されている。しかし、将来、流行するウイルスの抗原性を高い精度で予測する技術は未だ存在しない。冒頭で述べたように季節性インフルエンザの対策こそが重要であり、この問題に対する社会的ニーズはますます高まっている。過去にこのウイルスで起こった変異を詳細に解析し、データに基づいて将来の変異を予測することが一つの重要な方法論であろう。研究にあたっては、予測された変異と、実際に流行した株の持つ変異を比較し、予測精度を検証することが必須である。実用化に向けては、リバーシジェネティクス⁶⁶⁾等を活用して実際に変異ウイルスを作出し、その性状を解析してワクチン株としての有用性を評価することも必要となる。本稿では触れなかったが、構造生物学を変異予測に活用しようとする研究^{67, 68, 69)}や感染モデルとウイルス進化を融合する研究⁴⁹⁾も進んでいる。今後、ウイルス学、免疫学、疫学、構造生物学、進化学、情報科学、計算科学、統計科学、数学等の様々な研究者が分野の垣根を超えて新たな学問分野を創成し、一丸となって本課題に取り組むことが重要である。

本総説では、バイオインフォマティクスをインフルエンザウイルスのワクチン株選定や抗原変異予測に活用しようとする研究事例を概説した。本稿が、情報科学の導入に興

味があるウイルス学者やウイルス学に興味がある情報科学者にとって今後の研究の一助となれば幸いである。冒頭で、バイオインフォマティクスの活用は 1968 年頃から始まっていたことを紹介したが、実際に研究が盛んになったのは 2000 年前後であり、まだ新しい研究領域と言える。今後、様々な学問領域の研究者が、それぞれの専門知識や基盤技術を活用し、新たなウイルス学研究が展開されていくことを確信している。

謝辞

本総説の執筆にあたって、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの喜田宏センター長、高田礼人教授、五十嵐学特任助教、同大学院獣医学研究科の迫田義博准教授に多くのご助言を頂きました。また、本総説で紹介した研究および調査の一部は、文部科学省「感染症研究国際ネットワーク推進プログラム」、「科学研究費補助金・基盤研究 B」および科学技術振興機構「戦略的創造研究事業・さきがけ」の一環として実施しました。

参考文献

- 1) Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y (2007) Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1691-1740.
- 2) Kida H, Yanagawa R, Matsuoka Y: Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infection and Immunity* 30: 547-553, 1980.
- 3) Kida H, Shortridge KF, Webster RG: Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* 162: 160-166, 1988.
- 4) Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179, 1992.
- 5) Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, et al.: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79: 2814-2822, 2005.
- 6) Neumann G, Noda T, Kawaoka Y: Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459: 931-939, 2009.
- 7) Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, et al.: Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *New Eng J Med* 360: 2616-2625, 2009.
- 8) Laver WG, Air GM, Webster RG: Mechanism of antigenic drift in influenza virus: Amino acid sequence changes in an antigenically active region of Hong-Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin. *J Mol Biol* 145: 339-361, 1981.
- 9) Both GW, Sleight MJ, Cox NJ, Kendal AP: Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: Multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol* 48:

- 52-60, 1983.
- 10) Wilson IA, Cox NJ: Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu Rev Immunol* 8: 737-771, 1990.
 - 11) Cox NJ, Bender CA: The molecular epidemiology of influenza viruses. *Semin Virol* 6: 359-370, 1995.
 - 12) de Jong JC, Beyer WEP, Palache AM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME: Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A(H3N2) virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J Med Virol* 61: 94-99, 2000.
 - 13) Treanor J: Weathering the influenza vaccine crisis. *N Engl J Med* 351: 2037-2040, 2004.
 - 14) Webster RG, Laver WG: Determination of the number of nonoverlapping 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.
 - 15) Lee AM, Tauraso NM: A method for the formulation of influenza virus vaccine using numerical taxonomy. *B World Health Organ* 39: 261-270, 1968.
 - 16) Lee AM: Numerical taxonomy and influenza B virus. *Nature* 217: 620-622, 1968.
 - 17) Hogeweg P: The roots of bioinformatics in theoretical biology. *PLoS Comput Biol* 7: -, 2011.
 - 18) Sokal RR, Sneath PHA: Principles of numerical taxonomy. Principles of numerical taxonomy, 1963.
 - 19) Pearson K: On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos Mag* 2: 559-572, 1901.
 - 20) Lapedes A, Farber R: The geometry of shape space: application to influenza. *J Theor Biol* 212: 57-69, 2001.
 - 21) Kruskal J: Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* 29: 115-129, 1964.
 - 22) Kruskal JB: Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 29: 1-27, 1964.
 - 23) Perelson AS, Oster GF: Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J Theor Biol* 81: 645-670, 1979.
 - 24) Smith DJ, Forrest S, Hightower RR, Perelson AS: Deriving shape space parameters from immunological data. *J Theor Biol* 189: 141-150, 1997.
 - 25) Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, et al.: Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305: 371-376, 2004.
 - 26) Borg I, Groenen PJF: Modern multidimensional scaling: Theory and applications, 2005. New York: Springer.
 - 27) de Jong JC, Smith DJ, Lapedes AS, Donatelli I, Campitelli L, et al.: Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *J Virol* 81: 4315-4322, 2007.
 - 28) Fouchier RAM (2008) Antigenic cartography of H5 viruses. Joint fourteenth annual meetings of the National Laboratories for avian influenza and newcastle disease of European Union member states 2008. Brussels, Belgium.
 - 29) Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, et al.: Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325: 197-201, 2009.
 - 30) Enserink M: Mapmaker for the world of influenza. *Science* 320: 310-311, 2008.
 - 31) WHO: Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2010-2011 northern hemisphere influenza season. *Weekly Epidemiological Record* 5, 2010.
 - 32) Huang SW, Hsu YW, Smith DJ, Kiang D, Tsai HP, et al.: Reemergence of enterovirus 71 in Taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008. *J Clin Microbiol* 47: 3653-3662, 2009.
 - 33) Palese P, Shaw ML (2007) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1647-1689.
 - 34) Bao Y, Bolotov P, Dernovoy D, Kiryutin B, Zaslavsky L, et al.: The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information. *J Virol* 82: 596-601, 2008.
 - 35) Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG: Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63: 4603-4608, 1989.
 - 36) Treanor JJ, Snyder MH, London WT, Murphy BR: The B allele of the NS gene of avian influenza viruses, but not the A allele, attenuates a human influenza A virus for squirrel monkeys. *Virology* 171: 1-9, 1989.
 - 37) Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG: Evolutionary analysis of the influenza A virus M-gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol* 65: 5491-5498, 1991.
 - 38) Kawaoka Y, Gorman OT, Ito T, Wells K, Donis RO, et al.: Influence of host species on the evolution of the nonstructural (NS) gene of influenza A viruses. *Virus Research* 55: 143-156, 1998.
 - 39) Fitch WM, Leiter JME, Li XQ, Palese P: Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4270-4274, 1991.
 - 40) Buonagurio DA, Nakada S, Parvin JD, Krystal M, Palese P, et al.: Evolution of human influenza A viruses over 50 years: rapid, uniform rate of change in NS gene. *Science* 232: 980-982, 1986.
 - 41) Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox NJ: Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7712-7718, 1997.
 - 42) Nelson MI, Simonsen L, Viboud C, Miller MA, Taylor J, et al.: Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza A virus. *PLoS Pathog* 2: 1144-1151, 2006.
 - 43) Wolf YI, Viboud C, Holmes EC, Koonin EV, Lipman DJ: Long intervals of stasis punctuated by bursts of positive selection in the seasonal evolution of influenza A virus. *Biol Direct* 1: 34, 2006.

- 44) Nelson MI, Holmes EC: The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 8: 196-205, 2007.
- 45) Holmes EC, Ghedin E, Miller N, Taylor J, Bao YM, et al.: Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS Biol* 3: 1579-1589, 2005.
- 46) Lavenu A, Leruez-Ville M, Chaix ML, Boelle PY, Rogez S, et al.: Detailed analysis of the genetic evolution of influenza virus during the course of an epidemic. *Epidemiol Infect* 134: 514-520, 2006.
- 47) Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM: Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 422: 428-433, 2003.
- 48) Andreasen V, Sasaki A: Shaping the phylogenetic tree of influenza by cross-immunity. *Theor Popul Biol* 70: 164-173, 2006.
- 49) Koelle K, Cobey S, Grenfell B, Pascual M: Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in humans. *Science* 314: 1898-1903, 2006.
- 50) Pybus OG, Rambaut A: Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat Rev Genet* 10: 540-550, 2009.
- 51) Plotkin JB, Dushoff J, Levin SA: Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6263-6268, 2002.
- 52) Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, et al.: The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science* 320: 340-346, 2008.
- 53) Sata K, Hirata K, Ito K, Kuboyama T: Discovering networks for global propagation of influenza A (H3N2) viruses by clustering. *Lect Notes Comput Sc* 5712: 490-497, 2009.
- 54) Bedford T, Cobey S, Beerli P, Pascual M: Global migration dynamics underlie evolution and persistence of human influenza A (H3N2). *Plos Pathogens* 6: -, 2010.
- 55) Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, et al.: The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* 453: 615-U612, 2008.
- 56) Li WH, Wu CI, Luo CC: A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol* 2: 150-174, 1985.
- 57) Suzuki Y, Gojobori T: A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Mol Biol Evol* 16: 1315-1328, 1999.
- 58) Yang ZH: Maximum likelihood estimation on large phylogenies and analysis of adaptive evolution in human influenza virus A. *J Mol Evol* 51: 423-432, 2000.
- 59) Suzuki Y: Three-dimensional window analysis for detecting positive selection at structural regions of proteins. *Mol Biol Evol* 21: 2352-2359, 2004.
- 60) Bush RM, Fitch WM, Bender CA, Cox NJ: Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. *Mol Biol Evol* 16: 1457-1465, 1999.
- 61) Bush RM, Bender CA, Subbarao K, Cox NJ, Fitch WM: Predicting the evolution of human influenza A. *Science* 286: 1921-1925, 1999.
- 62) Blackburne BP, Hay AJ, Goldstein RA: Changing selective pressure during antigenic changes in human influenza H3. *PLoS Pathog* 4: e1000058, 2008.
- 63) Everitt B, Hothorn T (2011) Cluster Analysis. An Introduction to Applied Multivariate Analysis with R: Springer New York. pp. 163-200.
- 64) He J, Deem MW: Low-dimensional clustering detects incipient dominant influenza strain clusters. *Protein Eng Des Sel* 23: 935-946, 2010.
- 65) Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H, et al.: Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One* 5: -, 2010.
- 66) Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, et al.: Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9345-9350, 1999.
- 67) Zhou RH, Das P, Royyuru AK: Single mutation induced H3N2 hemagglutinin antibody neutralization: a free energy perturbation study. *J Phys Chem B* 112: 15813-15820, 2008.
- 68) Takematsu K, Fukuzawa K, Omagari K, Nakajima S, Nakajima K, et al.: Possibility of mutation prediction of influenza hemagglutinin by combination of hemadsorption experiment and quantum chemical calculation for antibody binding. *J Phys Chem B* 113: 4991-4994, 2009.
- 69) Pan K, Deem MW: Predicting fixation tendencies of the H3N2 influenza virus by free energy calculation. *J Chem Theory Comput*: (in printing), 2011.

Bioinformatics technologies for the analysis of antigenic evolution of influenza viruses

Kimihito ITO

Department of Bioinformatics, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control
PRESTO, Japan Science and Technology Agency

Human influenza viruses mutate from time to time, causing annual epidemics worldwide. The strong immune pressure in the human population selects a new variant every year, and the antigenic change is one of the primary reasons why vaccination is not a perfect measure to control seasonal influenza. Thus prediction of antigenic change of influenza A virus has been one of the major public health goals. In this review bioinformatics technologies that have been developed to achieve this goal were summarized.

