

### 3. H5N1 鳥インフルエンザウイルス HA の宿主適応機構

渡邊 洋平, 大道寺 智, 中屋 隆明

京都府立医科大学大学院医学研究科感染病態学

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例は、1997年に初めて報告されて以来、現在まで世界各地で増え続けている。H5N1 ウイルスは、アジアや北東アフリカなど地理的に異なる地域で鳥類における感染流行域を形成し、その継続的なウイルス伝播によって遺伝子的多様性を獲得している。これまでに報告された鳥-ヒト感染例は散発的であるものの、実験動物を用いた感染試験では変異した H5N1 が哺乳動物において飛沫感染する可能性が指摘されている。今後、繰り返される鳥-ヒト間伝播によってヒト適応性を獲得した変異ウイルスが選択される可能性があるが、H5N1 ウイルスのヒト適応化機構の詳細は、感染患者体内におけるウイルスの適応動態を含めて未だ不明な点が多い。

本稿では、ウイルス粒子を構成する糖タンパク質であるヘマグルチニン (HA) に焦点を当て、筆者らの成果を含めた最近の解析によって明らかにされつつある H5N1 ウイルス HA の宿主適応性の分子メカニズムを紹介する。

#### はじめに

近年の格安航空網の急速な発達により、世界中の人々がこれまでにない規模で地理的に遠く離れた地域を往来するようになった。新興感染症が国境を越えて急速に感染拡大するリスクは高まっていると言える。ウイルス感染症では、最近、MERS やエボラウイルス感染症が世界規模の公衆衛生にとって重大な懸案事項となっている。一方で、鳥インフルエンザウイルス感染症は、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス (以下、H5N1 ウイルス) が 1997 年にヒトに感染して以来、発生地域において深刻な社会問題となっている。近年では H7N9, H6N1, H10N8, H9N2 亜型などに属する鳥インフルエンザウイルスが鳥からヒト

に直接感染する事例が相次いで報告されており<sup>1,2)</sup>、鳥インフルエンザ感染症は引き続き注意深い監視が必要な新興ウイルス感染症である。これまでのヒト感染事例は、鳥-ヒト間の偶発的なウイルス伝播が原因であり、ウイルスは未だ十分なヒト適応性を獲得していない状況にある。一方で、インフルエンザウイルスは分節型 RNA ウイルスであることから、遺伝子変異の蓄積とリアソータント (再集合) によって、急速に宿主適応性を獲得する可能性がある。インフルエンザウイルスの宿主適応機構は、未だその詳細が不明な点が多い。本総説では、H5N1 亜型ウイルスについて、現在の蔓延状況と宿主域の広がりを概説すると共に、ウイルスの宿主適応に重要な役割を果たすウイルス粒子スパイクタンパク質であるヘマグルチニン (Hemagglutinin: HA) に焦点を当て、近年明らかになりつつある宿主適応機構を筆者らが明らかにした知見を含めて紹介する。

#### 連絡先

〒 602-8566

京都府京都市上京区河原町通広小路 上 梶井町 465

京都府立医科大学大学院医学研究科感染病態学

TEL: 075-251-5326

FAX: 075-251-5328

E-mail: nabe@koto.kpu-m.ac.jp

daidoji@koto.kpu-m.ac.jp

tnakaya@koto.kpu-m.ac.jp

#### H5N1 ウイルスの進化動態

アジア・アフリカ大陸で現在蔓延している H5N1 亜型ウイルスは、1996 年頃に中国で出現した<sup>3)</sup>。H5N1 ウイルスは、その後、2003 年に東南アジア地域、2006 年にヨーロッパ・アフリカ地域に感染拡大し、現在までに、中国、インドネシア、ベトナム、エジプトにおいて、鳥類において継続的な感染を繰り返す感染流行域を獲得している<sup>4)</sup>。当該地域では、感染鳥との濃厚接触によるヒト感染事例が継続

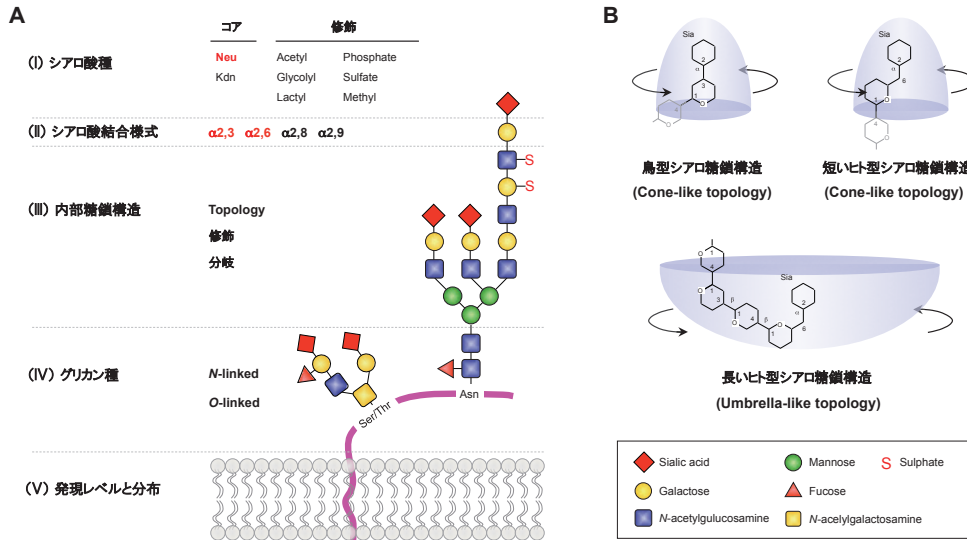


図1 インフルエンザウイルスが認識するシアロ糖鎖構造

(A) 生体で発現するシアロ糖鎖構造. インフルエンザウイルスは, 末端に存在するシアル酸 (I) のガラクトースへの結合様式 (II) に加えて, 内部糖鎖構造の修飾や分岐を含む topology (III) を認識していることがわかりつつある. また, ウイルス感染性は, シアロ糖鎖が発現するグリカン種 (IV) および発現レベルと分布 (V) に大きく影響を受ける. (B) HA がヒト適応性を獲得するために必要なシアロ糖鎖構造モデル. ヒトの上部呼吸器上皮に対する結合性を獲得するためには, 優勢に発現する長いヒト型シアロ糖鎖に特徴的な umbrella-like topology を認識するように変化する必要があると考えられている. (Watanabe *et al.*, Trends Microbiol. 2012 より一部改変)

的に報告されている. 現在までに, 累計で 844 人が感染し, 死亡率は 53% である (WHO による報告, 2015 年 11 月 13 日). H5N1 ウイルス感染者は, これまで東南アジアを中心に報告されていたが, 2014 年以降, 特にエジプトにおいて感染者数が急増しており, 国別の累計感染者数が最多となった. 異なる地域における H5N1 ウイルス定着化は, ウイルス系統発生の多様化を誘発し, 現在までに clade0-9 に属するウイルスが分類されている<sup>5)</sup>. これらの遺伝的多様化に伴い, 抗原性や感染性などのウイルス性状が異なる様々なウイルスが出現している<sup>6)</sup>.

このような状況にあって, 遺伝学・ウイルス学的に多様化した H5N1 ウイルスが, ヒトやブタなどの異なる宿主に伝播する機会が増加している. 特に, エジプトで流行する clade 2.2.1 ウイルスは, 哺乳細胞での増殖性を高める PB2-627K 変異 (RNA ポリメラーゼの一つである PB2 タンパク質のアミノ酸変異) を共通して獲得している特徴がある<sup>7)</sup>. clade 2.2.1 ウイルスは, ヒトで伝播するインフルエンザウイルスに特徴的な HA の構造的特性を最も多く獲得していると報告されている<sup>8)</sup>. 現在, エジプトでは, 遺伝子的に, または抗原性の異なるウイルス群が同時流行する<sup>9, 10)</sup> と同時に, 2009 年以降, 全世界の約 65% のヒト感染事例が報告されている (WHO による報告, 2015 年 11 月 13 日). そのため, エジプトは, H5N1 ウイルス進化動態の hot spot の 1 つであると現在認識されている<sup>4)</sup>.

HA の構造と機能

HA はインフルエンザウイルス粒子表面にノイラミダーゼ (Neuraminidase : NA) や M2 タンパク質と共に発現している. 細胞内で非開裂型の HA0 として合成された後, 宿主由来の切断酵素によって HA1 と HA2 に開裂することで機能タンパク質として成熟する. 宿主細胞およびウイルス粒子の膜表面においてホモ 3 量体を形成し, その主な機能は宿主細胞表面への吸着とウイルス膜-細胞膜間の融合である<sup>11)</sup>. HA は構造的に globular head 領域と stalk 領域に分類される. 標的細胞表面へのウイルス吸着は, globular head 領域に存在するレセプター結合ドメインと標的細胞表面に発現するレセプター分子の特異的結合によって起こる<sup>12)</sup>. ウイルス粒子は, その後, 主にエンドサイトーシスによってエンドゾームに取り込まれる. endosomal pH 値は, 後期エンドゾームに移行するに従い徐々に低下するが, ある閾値を超えて pH 値が低下すると HA 構造変化が誘導されて, 折りたたまれていた HA2 領域の膜融合ドメインが宿主細胞表面に突き刺さって膜融合が起こる<sup>13)</sup>.

レセプター糖鎖結合親和性と宿主域

インフルエンザウイルスは細胞表面に発現するシアロ糖鎖をレセプターとする<sup>14-16)</sup>. シアロ糖鎖は, 生体内にお

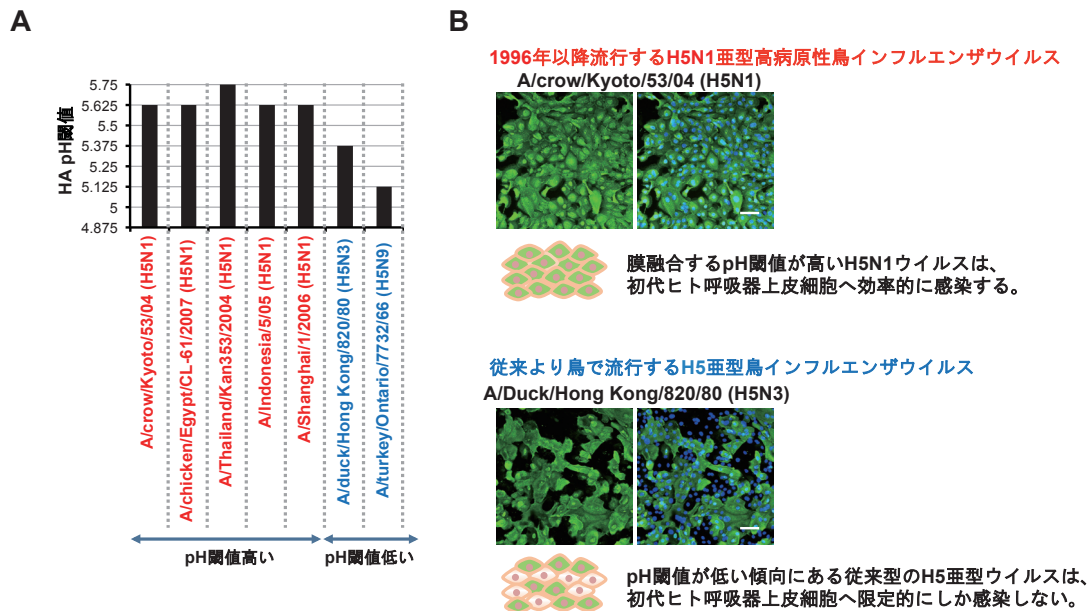


図2 鳥インフルエンザウイルスのHA構造変化におけるpH閾値と感染との関係

(A) 近年アジア・アフリカ地域を中心に流行しているH5N1ウイルス(2004-2007年分離株)のHA構造変化におけるpH閾値は、従来型のH5型鳥インフルエンザウイルスと比較して高い傾向を示す。(B) H5N1ウイルス(2004年分離株)(上)と従来型のH5型鳥インフルエンザウイルス(1980年分離株)(下)を高いMOIで初代ヒト呼吸器上皮細胞に感染させると、H5N1ウイルスは有意に高い感染性を示す(ウイルス抗原:緑,細胞核の対比染色:青,スケールバー:100 $\mu$ m)。(Daidoji et al., J Biol Chem. 2015より一部改変して掲載。Copyright© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology)

いて、シアロ糖鎖含有糖タンパク質(N-グリカン、O-グリカン)やスフィンゴ糖脂質(ガングリオシド)などの複合糖質として主に発現される。シアロ酸の分子種は自然界で50以上確認されており、一般にN-グリカンやO-グリカンの末端に位置する<sup>14)</sup>。その分子種はHAとの結合性に影響するが、中でもN-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac)とN-グリコリルノイミラン酸(Neu5Gc)がHAとの結合に重要である<sup>16)</sup>(図1A)。インフルエンザウイルスが結合するシアロ糖鎖の最小単位は、シアロ糖鎖末端配列として一般的な3つの糖鎖配列であるNeu5Ac $\alpha$ 2,3(6)Gal $\beta$ 1-4GlcNAcである。特に、インフルエンザウイルスは、Neu5Ac $\alpha$ 2,3(6)Gal $\beta$ 結合様式を識別して結合する(図1A)。

季節性インフルエンザウイルスはヒト上部呼吸器上皮に発現するNeu5Ac $\alpha$ 2,6Galをもつ糖鎖(ヒト型シアロ糖鎖)に優先的に結合する<sup>17)</sup>のに対し、鳥インフルエンザウイルスは鳥腸管上皮に発現するNeu5Ac $\alpha$ 2,3Galをもつ糖鎖(鳥型シアロ糖鎖)に優先的に結合する<sup>6)</sup>。このことは、種の壁として作用する。鳥型シアロ糖鎖結合親和性からヒト型シアロ糖鎖結合親和性への変化は、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応性変異獲得の最初の過程として重要である<sup>18-20)</sup>。1918年のスペイン風邪(H1N1)、1957年のアジア風邪(H2N2)、1968年の香港風邪(H3N2)、2009年

のH1N1pdm09を引き起こしたパンデミックウイルスは、ヒト以外の動物種に由来しているにも関わらず、全てヒト型レセプター特異性を獲得していた。また、過去のパンデミック発生のごく初期に、両親和性ウイルスの出現が確認されている<sup>19)</sup>。ブタ呼吸器上皮と同様に、陸生家禽の呼吸器上皮にはヒト型シアロ糖鎖と鳥型シアロ糖鎖の両方が発現している<sup>21-24)</sup>。当該種において、鳥インフルエンザウイルス感染が繰り返されることで、鳥からヒトへの適応性変異が導入される可能性がある。これまでに、H5N1ウイルス流行地域であるエジプトにおいて、継続的な鳥類間伝播の過程における両親和性H5N1ウイルス群の出現が報告されている<sup>25)</sup>。また、同じくH5N1ウイルス流行地域であるインドネシアにおいて、ブタから両親和性H5N1ウイルスが孤発性に分離されている<sup>26)</sup>。ヒト生体内では、下部呼吸器上皮においてヒト型シアロ糖鎖と鳥型シアロ糖鎖の両方が発現している<sup>27,28)</sup>。これらのシアロ糖鎖発現分布は、鳥型シアロ糖鎖結合親和性を示すH5N1ウイルスが濃厚接触によってヒト下部呼吸器に感染し、重度の肺炎や呼吸器障害を引き起こす1つの要因である。これまでに、H5N1ウイルス感染患者の臨床サンプルを遺伝子解析した研究において、感染者体内で選択されたと推定される多様なHA遺伝子変異が検出されている<sup>29)</sup>。また、ベトナムとタイにおいて、感染患者から分離されたH5N1ウイルス

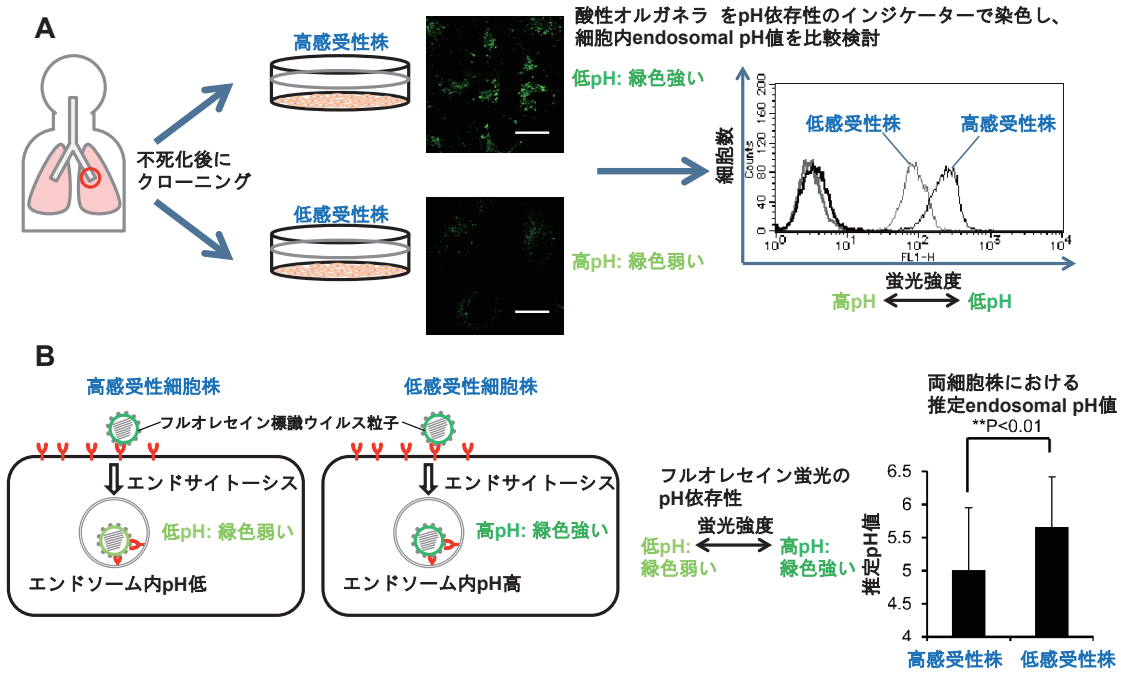


図3 初代ヒト呼吸器上皮細胞より作成した細胞株のエンドソーム内 pH の検討

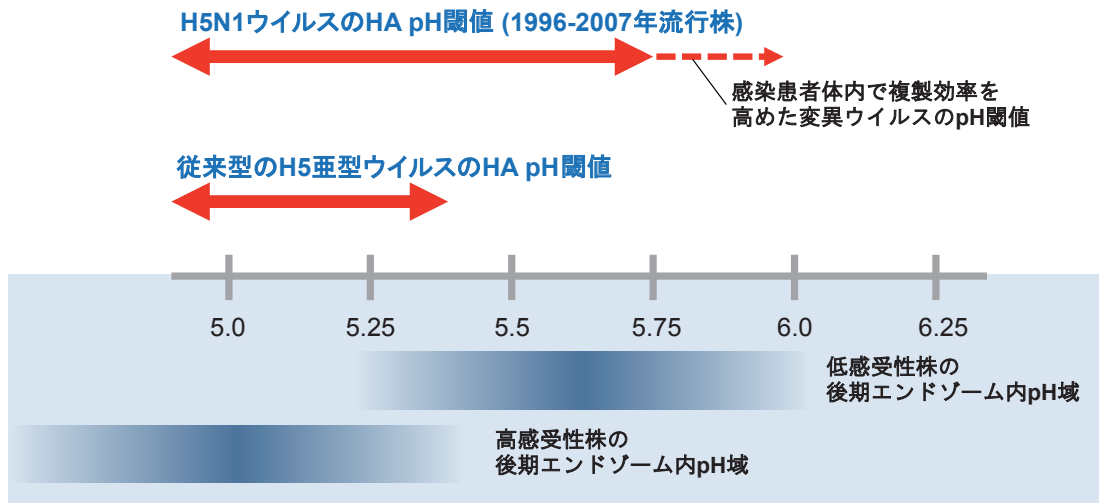
(A) 初代ヒト細気道上皮細胞より不死化細胞株を樹立すると、従来から流行する H5 亜型鳥インフルエンザウイルス感染に対する高感受性株と低感受性株が得られた。両細胞株の細胞内酸性オルガネラ（エンドソーム / ライソソーム）を pH 依存性のインジケーターで染色後、フローサイトメーターで測定すると、両者に差が認められる。高感受性株では低感受性株と比較して、その pH 域が低い傾向を示す。スケールバー：20 μm。 (B) フルオレセインの輝度が pH 依存性に变化する性質を利用し、フルオレセイン標識ウイルス粒子を細胞に感染させ、エンドソーム内の pH 域について比較検討すると、上記 (A) と同様の傾向が認められる。一方で、標識ウイルス粒子を感染後、既知の pH の calibration buffer で細胞を処理することで、pH 値と標識ウイルス粒子の輝度との間で検量線を作成し、エンドソーム内 pH の推定値（半定量値）を求めた。（Daidoji *et al.*, J Biol Chem. 2015 より一部改変して掲載。Copyright© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology）

株が両親和性を獲得していた<sup>30, 31)</sup>。これらの知見は、H5N1 ウイルスが、感染患者体内において、ヒト型シアロ糖鎖結合親和性を獲得する可能性を示している。

HA の膜融合活性と宿主域

シアロ糖鎖と結合したウイルス粒子は、上述のようにエンドサイトーシスにより宿主細胞に侵入し<sup>13, 32-36)</sup>、エンドソーム内の pH 低下により HA が構造変化を起こすことで、ウイルス膜 - エンドソーム膜の膜融合によりウイルスゲノムが放出されて感染が成立する<sup>37-40)</sup>。HA 膜融合を引き起こす pH 閾値がインフルエンザウイルスの亜型やウイルス株間で異なることは古くから知られている<sup>41-43)</sup>。筆者らは、この pH 依存的な HA の構造変化に着目し、インフルエンザウイルスの HA の pH 感受性について解析をおこなった。その結果、様々なインフルエンザウイルス株の中で、H5N1 ウイルス（2004-2007 年分離株）の膜融合を起こす pH 閾値は比較的高く、一方で鳥において従来から流行していた H5 亜型鳥インフルエンザウイルスの pH 閾値は、同 H5N1 ウイルスと比較して低い傾向にあった<sup>44)</sup>（図

2A)。近年、インフルエンザウイルスの pH 閾値の相違が感染性に影響することが明らかとなりつつある。膜融合する pH 閾値の高いインフルエンザウイルスは、pH 閾値の低いウイルスと比較して、わずかな endosomal pH 値の低下により膜融合するために、より効率的にウイルス感染を成立させると考えられる。実際、pH 閾値の高い H5N1 ウイルス（2004 年分離株を使用）と pH 閾値が相対的に低い H5N3（1980 年分離株）ウイルスを初代ヒト細気道上皮細胞に感染させると、どちらのウイルスも同様のシアロ糖鎖結合親和性を示すにも関わらず、膜融合する pH 閾値の相違に一致して異なる感染性が観察された。具体的には、pH 閾値の高い H5N1 ウイルスの感染効率は、pH 閾値が相対的に低い従来型の H5 亜型鳥インフルエンザウイルスよりも、顕著に高い傾向を示した<sup>44)</sup>（図 2B)。また pH 閾値の高い H5N1 ウイルスの HA（ヒト感染発生年より約 10 年以内の分離株を使用）を pH 閾値が相対的に低い H5N3（1980 年分離株）ウイルスに導入した組み換えウイルスを作出して、ヒト細気道上皮細胞をもとに樹立した不死化細胞株へ感染実験をおこなったところ、親株の H5N3 ウイル



**図4 H5 亜型鳥インフルエンザウイルスが膜融合を起こす pH 閾値と細胞内 endosomal pH 域の相関性**

高感受性株、低感受性株における細胞内後期エンドソームの pH 値は均一的ではなく、図 3A に見られるようにある値をピークに前後にばらつき（ゆらぎ）があるものと推測される。低感受性細胞でも、部分的に従来型の H5 亜型鳥インフルエンザウイルスが感染するのはそのためだと考えられる。（Daidoji *et al.*, J Biol Chem. 2015 より引用）

とと比較して顕著に高い感染性を示した<sup>40)</sup>。一方で、両ウイルス間で異なる開裂部位の塩基配列は感染性に影響しなかった。つまり上記 H5N3 ウイルスに対し、H5N1 ウイルスの開裂部位のアミノ酸配列を導入した組換えウイルスの感染性は親株の H5N3 ウイルスと同程度であった<sup>40)</sup>。これらの結果は、H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト呼吸器上皮細胞に対する感染性が、pH 感受性の違いによる影響を受けることを示唆する。また、膜融合する pH 閾値が他の亜型と比較して高い傾向にある H7 亜型鳥インフルエンザウイルスにおいてもヒト感染事例が報告されている事実とも一致しており興味深い。

一方で、HA タンパク質の pH 感受性の高さは酸に対する脆弱性（構造変化）と関係し、自然環境中におけるウイルス安定性には不都合と推測される。また H5N1 ウイルスがヒトに感染する場合、ウイルスは鼻咽頭を通過した後、主な感染部位である下部呼吸器まで到達しなければならない。その際、鼻粘膜の pH 環境（pH 5.5 - 6.9）<sup>45, 46)</sup> を考慮すると、H5N1 ウイルスが下気道で感染するには、やや低い pH 環境下にある鼻粘膜を通過した後も、感染性を保持することが不可欠となる。このことは、H5N1 ウイルスがヒトに感染する際に、より多量のウイルス粒子が必要であることを示唆しており、ウイルスの鳥-ヒト間伝播が濃厚接触によって引き起こされていることと一致している。筆者らは、ヒト呼吸器上皮が、endosomal pH 値が異なる細胞集団で構成されている可能性を見出した。初代ヒト細気管支由来上皮細胞に SV40 Large T 抗原遺伝子を導入することで樹立した不死化細胞株のインフルエンザウイルス感染に対する感受性を評価すると、特に従来型の H5 亜型

鳥インフルエンザウイルスに対して高感受性株と低感受性株の 2 つに分類された<sup>44)</sup>（図 3）。H5N1 ウイルスと従来型の鳥インフルエンザウイルスでは、上記のように膜融合する pH 閾値に相違がある。そこで、高感受性および低感受性細胞株の endosomal pH 値を評価したところ、両細胞間で酸性オルガネラ（エンドソーム / ライソソーム）の pH 域に相違があることが明らかとなった（図 3A）。具体的には、高感受性細胞株の pH 域は、低感受性細胞株と比較して低い傾向にあった。この傾向は（感染細胞内で）ウイルス粒子が存在するオルガネラの pH 値を測定しても同様であった（図 3B）。これらの結果は、H5N1 ウイルスおよび従来型の H5 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト呼吸器上皮に対する感染性が、HA タンパク質の膜融合を起こす pH 閾値と宿主細胞におけるオルガネラの pH 域のバランスによっても規定される可能性を示している<sup>44)</sup>（図 4）。H5N1 ウイルスは、膜融合を起こす pH 閾値がどちらの感受性細胞株における endosomal pH 域よりも高く、両細胞株に容易に感染したと考えられる。また、両細胞株における酸性オルガネラの pH 域は部分的に重複しており（図 3A, 図 4）、このことが、膜融合を起こす pH 閾値が比較的低い従来型の H5 亜型鳥インフルエンザウイルスに対し、低感受性細胞株が一部感受性を示す原因と推察される。

同じ呼吸器上皮細胞の中に、なぜ endosomal pH 域が異なる細胞が混在するのか、またそれぞれの細胞のオルガネラにおける pH 値を決めるメカニズムについては、今後の検討課題である。

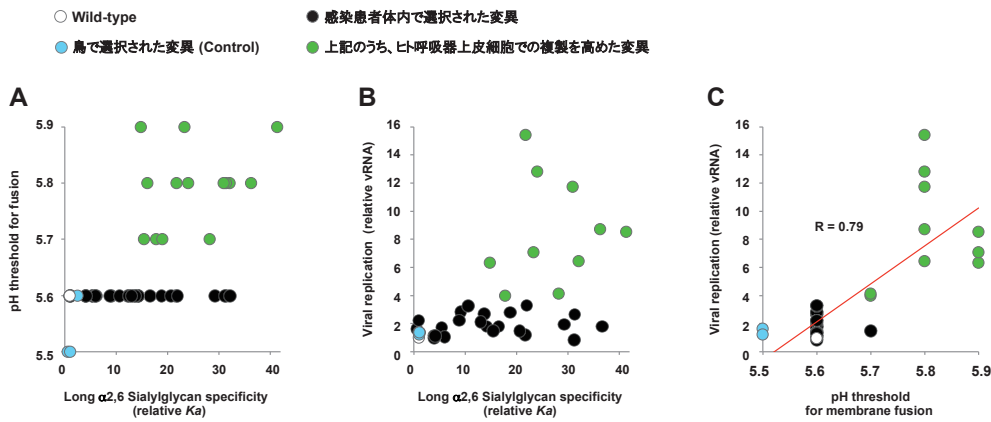


図5 H5N1 ウイルス感染患者体内で選択された HA 変異動態

エジプトにおける感染患者体内で選択された HA 変異がタンパク質機能特性とウイルス増殖性の変化に与える影響を散布図で示す。(A) 変異により変化した長いヒト型シアロ糖鎖結合特異性 (X 軸) と膜融合を起こす pH 閾値 (Y 軸) の関連性。(B) 変異により変化した長いヒト型シアロ糖鎖結合特異性 (X 軸) と初代ヒト細気道上皮細胞におけるウイルス増殖性 (Y 軸) の関連性。(C) 変異により変化した膜融合を起こす pH 閾値 (X 軸) と初代ヒト細気道上皮細胞におけるウイルス増殖性 (Y 軸) の関連性。ヒト型シアロ糖鎖結合特異性を高めた HA 変異の中で、膜融合を起こす pH 閾値が同時に高く変化した変異ウイルスのみがヒト呼吸器上皮細胞でより効率的に増殖した。(Watanabe *et al.*, MBio. 2015 より転載)

### 感染患者体内における H5 HA のヒト適応化機構

H5N1 ウイルスが感染患者体内で獲得するヒト適応化分子機構の詳細はこれまで不明であった。フェレットでの継代により飛沫伝播する H5N1 ウイルスを作成した研究では、予想より遥かに少ない HA 変異の導入によってウイルスが飛沫伝播能を獲得した<sup>47, 48)</sup>。これらの結果は、H5N1 ウイルス感染患者体内において、急速に HA 変異が選択されることでウイルスがヒト適応性を獲得する可能性を示している。筆者らは、ヒト感染事例が報告されてから約 10 年を経た 2006-2010 年にエジプトで分離されたヒト由来 H5N1 ウイルス (clade 2.2.1) が感染患者体内で獲得する HA 変異を網羅的に探索した。さらに、探索により同定した変異をリバースジェネティクス法によって、clade 2.2.1 ウイルスに属する A/duck/Egypt/D1Br/2007 に導入した H5N1 ウイルスが獲得するウイルス性状を解析した<sup>49)</sup>。その結果、ほとんどの HA 変異がヒト型シアロ糖鎖親和性を高める効果を示した (図 5)。Lactosamine (LN: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) repeat 数が異なる sialylglycopolymer を用いた solid-phase receptor binding assay によって、変異がシアロ糖鎖結合親和性に与える効果を解析したところ、その効果はより長いヒト型シアロ糖鎖に対して顕著であった ( $\alpha 2,6\text{SLN1} < \alpha 2,6\text{SLN2} < \alpha 2,6\text{SLN3}$ )。近年の mass spectrometry 解析によって、ヒト呼吸器上皮には、末端 2 糖の結合様式 (Neu5Ac  $\alpha$ 2,3(6)Gal $\beta$ ) 以外に、分岐、長さや修飾が異なる多様なシアロ糖鎖が発現しており、特に複数の LN repeat の分岐構造をもつ長いシアロ糖鎖が優勢に存在していることが明らかとなった<sup>50, 51)</sup>。Chandrasekaran らは、

シアロ糖鎖-HA 共結晶解析によって、H5N1 ウイルスの HA がヒト上部呼吸器に発現するヒト型シアロ糖鎖に結合する適応性を獲得するためには、Neu5Ac  $\alpha$ 2,6Gal 認識に加えて、長いヒト型シアロ糖鎖に特徴的な umbrella-like topology を認識する変化が必要であると予測している<sup>50)</sup> (図 1B)。対照的に、HA と鳥型シアロ糖鎖または短いヒト型シアロ糖鎖との結合には、両糖鎖に共通する cone-like topology の認識が必要である。これらの知見は、H5N1 ウイルスが、ヒト生体内において、より長いヒト型シアロ糖鎖結合親和性を高めるように急速に変化することを示唆している。また、インフルエンザウイルスが、Neu5Ac  $\alpha$ 2,6Gal や LN repeat に加えて、フコシル化などの修飾基を認識すると最近報告されている<sup>52-54)</sup>。インフルエンザウイルスが、生体内で発現するより複雑なシアロ糖鎖構造を特異的に認識している可能性がある<sup>6)</sup> (図 1A)。

一方で、筆者らの解析において、ヒト型シアロ糖鎖結合親和性を獲得した変異ウイルス群を初代ヒト呼吸器上皮細胞に感染させると、一部のウイルスのみがより効率的に増殖した<sup>49)</sup>。このことは、H5N1 ウイルスのヒト呼吸器細胞に対する感染性が、ヒト型シアロ糖鎖結合親和性のみで規定されないことを示唆する。そこで、HA のもう一つの機能である膜融合活性に着目して解析すると、ヒト呼吸器上皮細胞において効率的に増殖した全ての変異ウイルスが、膜融合を起こす pH 閾値を高く変化させていた (図 4, 図 5)。HA 膜融合を起こす pH 閾値は、上記のようにウイルスの亜型や株間で異なり、H3 や H1 亜型に属する HA

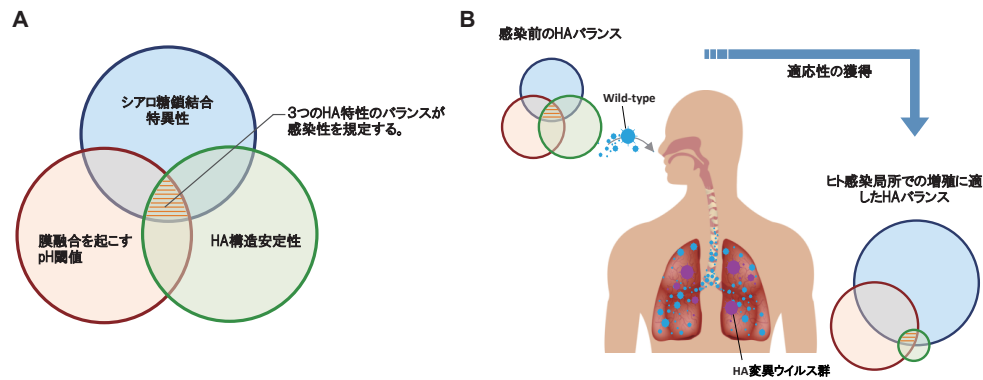


図6 H5N1 ウイルス HA の宿主適応機構の概要

(A) インフルエンザウイルスの感染性は、少なくとも3つのHA特性（シアロ糖鎖結合特異性・膜融合を引き起こすpH閾値・HA構造安定性）のバランスによって規定される。インフルエンザウイルスは、これらのHA特性のバランスを至適化することで宿主適応すると考えられる。(B) 感染患者体内におけるH5N1ウイルスHAのヒト適応化機構のイメージ図。感染患者体内で選択されたHA変異ウイルス群の中で、感染局所でのウイルス増殖性に有利なHA変異体の特性は、ヒト型シアロ糖鎖結合親和性の獲得と膜融合を引き起こすpH閾値の上昇であった。一方で、膜融合を起こすpH閾値上昇はHA構造の不安定化を伴うことから、代償性に外環境におけるウイルス感染性や飛沫伝播性を低下させる。このように、生体局所におけるインフルエンザウイルス感染性と個体間の飛沫伝播性は異なるHA特性のバランス変化であると推定される。

の膜融合に必要なpH閾値は低く、H5やH7亜型に属するHAのpH閾値が高い傾向にある<sup>43)</sup>。また、鳥インフルエンザウイルスの感染性が、ウイルス株間で異なるHA膜融合活性と関連すると報告されている<sup>41)</sup>。一方で、宿主細胞のendosomal pH値は細胞ごとに異なり、細胞種によってはlate endosomal pH域がHA構造変化を誘起する程に低下しないことが最近明らかとなっている。例えば、Vero細胞のendosomal pH域は、MDCK細胞と比べて高く、効率的な膜融合が阻害されることで、一部のウイルス株において増殖性の低下が報告されている<sup>55)</sup>。インフルエンザウイルスは、その宿主適応過程において、標的細胞内で効率的に膜融合するようにpH閾値を至適化させる可能性がある。上記のように2峰性となる初代ヒト細気管支由来上皮細胞において、一方の細胞集団のendosomal pH域(図3, 図4)はMDCK細胞と比べて高い<sup>44)</sup>。また、初代ヒト気管支上皮細胞におけるA/Vietnam/1203/2004 (clade 1)の増殖性が、膜融合するpH閾値をわずかに低下させるHA変異を導入することで著しく低下したと報告されている<sup>56)</sup>。一方で、pH閾値変化が変異ウイルスの増殖性に与える効果には若干ばらつきが報告されているが<sup>55-58)</sup>、解析に用いられたウイルス株間の膜融合するpH閾値や遺伝子的素因の相違が原因と考えられる。H5N1ウイルスがヒト呼吸器上皮細胞で効率的に増殖するためには、ヒト型シアロ糖鎖結合親和性の獲得と同時に、より僅かなpH変化で膜融合を引き起こすHA構造の不安定性を獲得する必要があると考えられる。

筆者らの解析では、感染患者体内で選択されたHA変異

のほとんどがヒト型シアロ糖鎖結合特異性を高めたのに対し、膜融合を引き起こすpH閾値を高めた変異数は限定的であった<sup>49)</sup>。また、膜融合を起こすpH閾値変化は、常にヒト型シアロ糖鎖結合親和性の上昇と同期した。すなわち、pH閾値変化は、ヒト型シアロ糖鎖結合親和性を獲得するために選択されたアミノ酸置換が、HA構造安定性に与える付随的な効果を反映していると考えられる。これらの結果は、ヒト生体内において、H5N1ウイルスがヒト型シアロ糖鎖結合親和性を高める選択圧を一義的に受けることを示している。一方で、シアロ糖鎖結合親和性の獲得とHA構造不安定化の同期的変化は、H5N1ウイルスがヒト呼吸器上皮で効率的に増殖するための特性と考えられるが、同様のHA特性変化が飛沫伝播するH5N1ウイルスを作出する際にフェレット適応過程でも観察されている<sup>46, 47, 59)</sup>。HA膜融合を起こすpH閾値とHA構造安定性が負の相関関係にあることは古くから報告されている<sup>60, 61)</sup>。これらの知見は、H5N1ウイルスが、感染患者体内において、HA特性(シアロ糖鎖結合特異性・膜融合を起こすpH閾値・HA構造安定性)のバランスを至適化することで、急速にヒト適応性を獲得する可能性を示している(図6A)。また、季節性インフルエンザウイルスのマウス馴化過程において、シアロ糖鎖結合親和性変化とHA膜融合を起こすpH閾値の同期的変化が確認されている<sup>62-64)</sup>。そのため、広範な亜型に属するインフルエンザウイルスが、HA特性のバランスを至適化させることで、宿主適応する可能性がある。

HAの構造的安定性は、インフルエンザウイルスの環境安定性と関係しており、飛沫伝播性を決定する重要な要素

の1つと考えられている<sup>65-67)</sup>。H5N1 ウイルスをフェレットで継代した研究では、HA 構造を安定化させる変異が付加されることが、ウイルスの飛沫伝播能獲得に重要であったと報告されている<sup>47, 59, 66, 68)</sup>。一方で、H5N1 ウイルス感染患者体内で選択された HA 変異体の中で、ヒト呼吸器での効率的なウイルス複製に寄与した HA 特性は、上記のように、ヒト型シアロ糖鎖結合親和性の獲得に加えて、膜融合を起こす pH 閾値の上昇であり、言い換えると HA 構造の不安定化であった。HA 構造不安定化は、野外でのウイルス感染性の維持には不利である。また、上記のように鼻咽頭腔は分泌物によりやや低 pH 条件下にある<sup>46)</sup>。そのため、過度の HA 構造不安定化は、鼻粘膜腔を通過する際に HA 構造変化によってウイルス感染性を消失させ、新たな個体への感染に不都合であると考えられる。すなわち、感染患者体内における HA 構造不安定化は、感染局所環境において H5N1 ウイルスがより効率的に増殖するための代償性変化とも言える (図 6B)。これらの知見は、インフルエンザウイルスの標的細胞への感染性と個体間の飛沫伝播性が同義的ではないことを示唆している<sup>67)</sup>。しかしながら、感染患者体内において生体局所感染性を高める変異ウイルスが出現することは、H5N1 ウイルス感染患者の重症化メカニズムの一つである可能性がある。

#### 宿主適応性過程における Minor variants の役割

最近のメタゲノム解析において、感染個体においてわずか数%の minor variants がインフルエンザウイルスの飛沫感染源になりえると報告されている<sup>69)</sup>。このことは、生体内で出現する minor variants が、インフルエンザウイルスの適応過程や進化動態に果たす役割の重要性を示している。一方で、筆者らの解析を含むこれまでの研究は、主に (ウイルスサンプルに含まれる) major variant を対象としており、感染個体において、minor variants がどのような頻度と規模で出現しているか不明な点が多く残されている。臨床サンプルを用いたメタゲノム解析は、生体内でのウイルス遺伝子多様性の詳細な評価に有用である<sup>70, 71)</sup>。感染患者由来材料を用いたメタゲノム解析は、インフルエンザウイルスの宿主適応動態をより正確に理解するために、今後極めて重要なアプローチとなると考えられる。

#### おわりに

本稿で触れることはなかったが、HA は宿主免疫応答の主たる標的であり、抗原性は種間を超えたインフルエンザウイルスの伝播にも重要な意味を持つ。2009年に発生した豚インフルエンザ由来の H1N1 ウイルス (H1N1pdm09) は、それまでヒトで流行していた季節性 (ソ連型) H1N1 と同じ血清型であるものの、その抗原性が大きく異なっていたため<sup>72)</sup>、パンデミックを引き起こしたと考えられる。さらに糖鎖修飾のパターンも抗原性および個体間伝播性に

大きな影響を与えることが報告されている<sup>67)</sup>。また、筆者らはこれまでに H5N1 の HA が感染細胞においてアポトーシスを誘導すること、さらにその細胞傷害性は (由来する) 宿主動物により大きく異なることを報告してきた<sup>73, 74)</sup>。病原性の変化は宿主適応を議論する上で重要な因子の一つと考えられるが、その詳細については紙面の都合上割愛する。

#### 参考文献

- 1) Garcia-Sastre, A., and M. Schmolke. Avian influenza A H10N8—a virus on the verge? *Lancet* 383:676-677, 2014.
- 2) To, K. K., A. K. Tsang, J. F. Chan, V. C. Cheng, H. Chen, and K. Y. Yuen. Emergence in China of human disease due to avian influenza A(H10N8)—cause for concern? *J Infect* 68:205-215, 2014.
- 3) Vijaykrishna, D., J. Bahl, S. Riley, L. Duan, J. X. Zhang, H. Chen, J. S. Peiris, G. J. Smith, and Y. Guan. Evolutionary dynamics and emergence of panzootic H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathog* 4:e1000161, 2008.
- 4) Watanabe, Y., M. S. Ibrahim, and K. Ikuta. Evolution and control of H5N1. A better understanding of the evolution and diversity of H5N1 flu virus and its host species in endemic areas could inform more efficient vaccination and control strategies. *EMBO Rep* 14:117-122, 2013.
- 5) Suarez, D. L. Avian influenza: our current understanding. *Anim Health Res Rev* 11:19-33, 2010.
- 6) Watanabe, Y., M. S. Ibrahim, Y. Suzuki, and K. Ikuta. The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). *Trends Microbiol* 20:11-20, 2012.
- 7) Neumann, G., C. A. Macken, A. I. Karasin, R. A. Fouchier, and Y. Kawaoka. Egyptian H5N1 influenza viruses—cause for concern? *PLoS Pathog* 8:e1002932, 2012.
- 8) Tharakaraman, K., R. Raman, K. Viswanathan, N. W. Stebbins, A. Jayaraman, A. Krishnan, V. Sasisekharan, and R. Sasisekharan. Structural determinants for naturally evolving H5N1 hemagglutinin to switch its receptor specificity. *Cell* 153:1475-1485, 2013.
- 9) Watanabe, Y., M. S. Ibrahim, H. F. Ellakany, H. S. Abd El-Hamid, and K. Ikuta. Genetic diversification of H5N1 highly pathogenic avian influenza A virus during replication in wild ducks. *J Gen Virol* 92:2105-2110, 2011.
- 10) Watanabe, Y., M. S. Ibrahim, H. F. Ellakany, N. Kawashita, T. Daidoji, T. Takagi, T. Yasunaga, T. Nakaya, and K. Ikuta. Antigenic analysis of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 sublineages co-circulating in Egypt. *J Gen Virol* 93:2215-2226, 2012.
- 11) Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers, and Y. Kawaoka. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56:152-179, 1992.
- 12) Imai, M., and Y. Kawaoka. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. *Curr Opin Virol* 2:160-167, 2012.
- 13) Skehel, J. J., and D. C. Wiley. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemag-



- glutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531-569, 2000.
- 14) Cohen, M., and A. Varki. The sialome—far more than the sum of its parts. *OMICS* 14:455-464, 2010.
  - 15) Rogers, G. N., and J. C. Paulson. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127:361-373, 1983.
  - 16) Suzuki, Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28:399-408, 2005.
  - 17) Couceiro, J. N., J. C. Paulson, and L. G. Baum. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* 29:155-165, 1993.
  - 18) Connor, R. J., Y. Kawaoka, R. G. Webster, and J. C. Paulson. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205:17-23, 1994.
  - 19) Matrosovich, M., A. Tuzikov, N. Bovin, A. Gambaryan, A. Klimov, M. R. Castrucci, I. Donatelli, and Y. Kawaoka. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 74:8502-8512, 2000.
  - 20) Tumpey, T. M., T. R. Maines, N. Van Hoeven, L. Glaser, A. Solorzano, C. Pappas, N. J. Cox, D. E. Swayne, P. Palese, J. M. Katz, and A. Garcia-Sastre. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* 315:655-659, 2007.
  - 21) Ito, T., J. N. Couceiro, S. Kelm, L. G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J. C. Paulson, R. G. Webster, and Y. Kawaoka. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72:7367-7373, 1998.
  - 22) Kimble, B., G. R. Nieto, and D. R. Perez. Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. *Virol J* 7:365, 2010.
  - 23) Kuchipudi, S. V., R. Nelli, G. A. White, M. Bain, K. C. Chang, and S. Dunham. Differences in influenza virus receptors in chickens and ducks: Implications for interspecies transmission. *J Mol Genet Med* 3:143-151, 2009.
  - 24) Yamada, S., K. Shinya, A. Takada, T. Ito, T. Suzuki, Y. Suzuki, Q. M. Le, M. Ebina, N. Kasai, H. Kida, T. Horimoto, P. Rivaller, L. M. Chen, R. O. Donis, and Y. Kawaoka. Adaptation of a duck influenza A virus in quail. *J Virol* 86:1411-1420, 2012.
  - 25) Watanabe, Y., M. S. Ibrahim, H. F. Ellakany, N. Kawashita, R. Mizuike, H. Hiramatsu, N. Sriwilaijaroen, T. Takagi, Y. Suzuki, and K. Ikuta. Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathog* 7:e1002068, 2011.
  - 26) Nidom, C. A., R. Takano, S. Yamada, Y. Sakai-Tagawa, S. Daulay, D. Aswadi, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Shinya, K. Iwatsuki-Horimoto, Y. Muramoto, and Y. Kawaoka. Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 16:1515-1523, 2010.
  - 27) Shinya, K., M. Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai, and Y. Kawaoka. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440:435-436, 2006.
  - 28) van Riel, D., V. J. Munster, E. de Wit, G. F. Rimmelzwaan, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and T. Kuiken. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science* 312:399, 2006.
  - 29) Kongchanagul, A., O. Suptawiwat, P. Kanrai, M. Uiprasertkul, P. Puthavathana, and P. Auewarakul. Positive selection at the receptor-binding site of haemagglutinin H5 in viral sequences derived from human tissues. *J Gen Virol* 89:1805-1810, 2008.
  - 30) Auewarakul, P., O. Suptawiwat, A. Kongchanagul, C. Sangma, Y. Suzuki, K. Ungchusak, S. Louisirrotchanakul, H. Lerdsamran, P. Pooruk, A. Thitithanyanont, C. Pittayawonganon, C. T. Guo, H. Hiramatsu, W. Jampangern, S. Chunsutthiwat, and P. Puthavathana. An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J Virol* 81:9950-9955, 2007.
  - 31) Yamada, S., Y. Suzuki, T. Suzuki, M. Q. Le, C. A. Nidom, Y. Sakai-Tagawa, Y. Muramoto, M. Ito, M. Kiso, T. Horimoto, K. Shinya, T. Sawada, M. Kiso, T. Usui, T. Murata, Y. Lin, A. Hay, L. F. Haire, D. J. Stevens, R. J. Russell, S. J. Gamblin, J. J. Skehel, and Y. Kawaoka. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444:378-382, 2006.
  - 32) Bullough, P. A., F. M. Hughson, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371:37-43, 1994.
  - 33) Daniels, R. S., J. C. Downie, A. J. Hay, M. Knossow, J. J. Skehel, M. L. Wang, and D. C. Wiley. Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell* 40:431-439, 1985.
  - 34) Dutch, R. E., T. S. Jardetzky, and R. A. Lamb. Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis. *Biosci Rep* 20:597-612, 2000.
  - 35) Schibli, D. J., and W. Weissenhorn. Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion. *Mol Membr Biol* 21:361-371, 2004.
  - 36) Wiley, D. C., and J. J. Skehel. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56:365-394, 1987.
  - 37) Lakadamyali, M., M. J. Rust, and X. Zhuang. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* 6:929-936, 2004.
  - 38) Pelkmans, L., and A. Helenius. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 15:414-422, 2003.
  - 39) Sieczkarski, S. B., and G. R. Whittaker. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic* 4:333-343, 2003.
  - 40) Yoshimura, A., and S. Ohnishi. Uncoating of influenza virus in endosomes. *J Virol* 51:497-504, 1984.

- 41) DuBois, R. M., H. Zaraket, M. Reddivari, R. J. Heath, S. W. White, and C. J. Russell. Acid stability of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity. *PLoS Pathog* 7:e1002398, 2011.
- 42) Galloway, S. E., M. L. Reed, C. J. Russell, and D. A. Steinhauer. Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation. *PLoS Pathog* 9:e1003151, 2013.
- 43) Scholtissek, C. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. *Vaccine* 3:215-218, 1985.
- 44) Daidoji, T., Y. Watanabe, M. S. Ibrahim, M. Yasugi, H. Maruyama, T. Masuda, F. Arai, T. Ohba, A. Honda, K. Ikuta, and T. Nakaya. Avian Influenza Virus Infection of Immortalized Human Respiratory Epithelial Cells Depends upon a Delicate Balance between Hemagglutinin Acid Stability and Endosomal pH. *J Biol Chem* 290:10627-10642, 2015.
- 45) Fischer, H., and J. H. Widdicombe. Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. *J Membr Biol* 211:139-150, 2006.
- 46) Washington, N., R. J. Steele, S. J. Jackson, D. Bush, J. Mason, D. A. Gill, K. Pitt, and D. A. Rawlins. Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. *Int J Pharm* 198:139-146, 2000.
- 47) Imai, M., T. Watanabe, M. Hatta, S. C. Das, M. Ozawa, K. Shinya, G. Zhong, A. Hanson, H. Katsura, S. Watanabe, C. Li, E. Kawakami, S. Yamada, M. Kiso, Y. Suzuki, E. A. Maher, G. Neumann, and Y. Kawaoka. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 486:420-428, 2012.
- 48) Palese, P., and T. T. Wang. H5N1 influenza viruses: facts, not fear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2211-2213, 2012.
- 49) Watanabe, Y., Y. Arai, T. Daidoji, N. Kawashita, M. S. Ibrahim, D. El-Gendy Eel, H. Hiramatsu, R. Kubota-Koketsu, T. Takagi, T. Murata, K. Takahashi, Y. Okuno, T. Nakaya, Y. Suzuki, and K. Ikuta. Characterization of H5N1 influenza virus variants with hemagglutinin mutations isolated from patients. *MBio* 6:e00081-15, 2015.
- 50) Chandrasekaran, A., A. Srinivasan, R. Raman, K. Viswanathan, S. Raguram, T. M. Tumpey, V. Sasisekharan, and R. Sasisekharan. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat Biotechnol* 26:107-113, 2008.
- 51) Walther, T., R. Karamanska, R. W. Chan, M. C. Chan, N. Jia, G. Air, C. Hopton, M. P. Wong, A. Dell, J. S. Malik Peiris, S. M. Haslam, and J. M. Nicholls. Glycomic analysis of human respiratory tract tissues and correlation with influenza virus infection. *PLoS Pathog* 9:e1003223, 2013.
- 52) Gambaryan, A. S., T. Y. Matrosovich, J. Philipp, V. J. Munster, R. A. Fouchier, G. Cattoli, I. Capua, S. L. Krauss, R. G. Webster, J. Banks, N. V. Bovin, H. D. Klenk, and M. N. Matrosovich. Receptor-binding profiles of H7 subtype influenza viruses in different host species. *J Virol* 86:4370-4379, 2012.
- 53) Heider, A., L. Mochalova, T. Harder, A. Tuzikov, N. Bovin, T. Wolff, M. Matrosovich, and B. Schweiger. Alterations in hemagglutinin receptor-binding specificity accompany the emergence of highly pathogenic avian influenza viruses. *J Virol* 89:5395-5405, 2015.
- 54) Hiono, T., M. Okamatsu, S. Nishihara, S. Takase-Yoden, Y. Sakoda, and H. Kida. A chicken influenza virus recognizes fucosylated alpha2,3 sialoglycan receptors on the epithelial cells lining upper respiratory tracts of chickens. *Virology* 456-457:131-138, 2014.
- 55) Murakami, S., T. Horimoto, M. Ito, R. Takano, H. Katsura, M. Shimojima, and Y. Kawaoka. Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *J Virol* 86:1405-1410, 2012.
- 56) Krenn, B. M., A. Egorov, E. Romanovskaya-Romanko, M. Wolschek, S. Nakowitsch, T. Ruthsatz, B. Kiefmann, A. Morokutti, J. Humer, J. Geiler, J. Cinatl, M. Michaelis, N. Wressnigg, S. Sturlan, B. Ferko, O. V. Batishchev, A. V. Indenbom, R. Zhu, M. Kastner, P. Hinterdorfer, O. Kiselev, T. Muster, and J. Romanova. Single HA2 mutation increases the infectivity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 intranasal influenza vaccine candidate lacking NS1. *PLoS One* 6:e18577, 2011.
- 57) Cotter, C. R., H. Jin, and Z. Chen. A single amino acid in the stalk region of the H1N1pdm influenza virus HA protein affects viral fusion, stability and infectivity. *PLoS Pathog* 10:e1003831, 2014.
- 58) Zaraket, H., O. A. Bridges, S. Duan, T. Baranovich, S. W. Yoon, M. L. Reed, R. Salomon, R. J. Webby, R. G. Webster, and C. J. Russell. Increased acid stability of the hemagglutinin protein enhances H5N1 influenza virus growth in the upper respiratory tract but is insufficient for transmission in ferrets. *J Virol* 87:9911-9922, 2013.
- 59) Linster, M., S. van Boheemen, M. de Graaf, E. J. Schrauwen, P. Lexmond, B. Manz, T. M. Bestebroer, J. Baumann, D. van Riel, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus, M. Matrosovich, R. A. Fouchier, and S. Herfst. Identification, Characterization, and Natural Selection of Mutations Driving Airborne Transmission of A/H5N1 Virus. *Cell* 157:329-339, 2014.
- 60) Carr, C. M., C. Chaudhry, and P. S. Kim. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14306-14313, 1997.
- 61) Haywood, A. M., and B. P. Boyer. Time and temperature dependence of influenza virus membrane fusion at neutral pH. *J Gen Virol* 67 ( Pt 12):2813-2817, 1986.
- 62) Brown, E. G., H. Liu, L. C. Kit, S. Baird, and M. Nesrallah. Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: identification of functional themes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6883-6888, 2001.
- 63) Keleta, L., A. Ibricevic, N. V. Bovin, S. L. Brody, and E.

- G. Brown. Experimental evolution of human influenza virus H3 hemagglutinin in the mouse lung identifies adaptive regions in HA1 and HA2. *J Virol* 82:11599-11608, 2008.
- 64) Ping, J., L. Keleta, N. E. Forbes, S. Dankar, W. Stecho, S. Tyler, Y. Zhou, L. Babiuk, H. Weingartl, R. A. Halpin, A. Boyne, J. Bera, J. Hostetler, N. B. Fedorova, K. Proudfoot, D. A. Katzel, T. B. Stockwell, E. Ghedin, D. J. Spiro, and E. G. Brown. Genomic and protein structural maps of adaptive evolution of human influenza A virus to increased virulence in the mouse. *PLoS One* 6:e21740, 2011.
- 65) de Graaf, M., and R. A. Fouchier. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J* 33:823-841, 2014.
- 66) Imai, M., S. Herfst, E. M. Sorrell, E. J. Schrauwen, M. Linster, M. De Graaf, R. A. Fouchier, and Y. Kawaoka. Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals. *Virus Res* 178:15-20, 2013.
- 67) Miller, M. S., and P. Palese. Peering into the crystal ball: influenza pandemics and vaccine efficacy. *Cell* 157:294-299, 2014.
- 68) Herfst, S., E. J. Schrauwen, M. Linster, S. Chutinimitkul, E. de Wit, V. J. Munster, E. M. Sorrell, T. M. Bestebroer, D. F. Burke, D. J. Smith, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* 336:1534-1541, 2012.
- 69) Wilker, P. R., J. M. Dinis, G. Starrett, M. Imai, M. Hatta, C. W. Nelson, D. H. O'Connor, A. L. Hughes, G. Neumann, Y. Kawaoka, and T. C. Friedrich. Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses. *Nat Commun* 4:2636, 2013.
- 70) Fisher, R. G., D. M. Smith, B. Murrell, R. Slabbert, B. M. Kirby, C. Edson, M. F. Cotton, R. H. Haubrich, S. L. Kosakovsky Pond, and G. U. Van Zyl. Next generation sequencing improves detection of drug resistance mutations in infants after PMTCT failure. *J Clin Virol* 62:48-53, 2015.
- 71) Yasugi, M., S. Nakamura, T. Daidoji, N. Kawashita, R. Ramadhany, C. S. Yang, T. Yasunaga, T. Iida, T. Horii, K. Ikuta, K. Takahashi, and T. Nakaya. Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009 and 2010. *PLoS One* 7:e30946, 2012.
- 72) Greenbaum, J. A., M. F. Kotturi, Y. Kim, C. Oseroff, K. Vaughan, N. Salimi, R. Vita, J. Ponomarenko, R. H. Scheuermann, A. Sette, and B. Peters. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20365-20370, 2009.
- 73) Ueda, M., T. Daidoji, A. Du, C. S. Yang, M. S. Ibrahim, K. Ikuta, and T. Nakaya. Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus induces extracellular Ca<sup>2+</sup> influx, leading to apoptosis in avian cells. *J Virol* 84:3068-3078, 2010.
- 74) Daidoji, T., T. Koma, A. Du, C. S. Yang, M. Ueda, K. Ikuta, and T. Nakaya. H5N1 avian influenza virus induces apoptotic cell death in mammalian airway epithelial cells. *J Virol* 82:11294-11307, 2008.

# **Host-adaptive mechanism of H5N1 avian influenza virus hemagglutinin**

**Yohei WATANABE, Tomo DAIDOJI, Takaaki NAKAYA**

Department of Infectious Diseases, Kyoto Prefectural University of Medicine  
465 Kawaramachi-hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

The H5N1 subtype is a highly pathogenic avian influenza virus currently circulating in birds in parts of Asia and northeast Africa, which has caused fatal human infections since 1997. Continuous circulation of the virus in endemic areas has allowed genetically diverse viruses to emerge, increasing the risk of H5N1 human infection. Although human infections with H5N1 have to date been limited, experimental evidence of the aerosol transmission of mutated viruses in a mammalian infection model has revealed the pandemic potential of H5N1 virus. One of the most important viral factors for host-adaptation of influenza virus is hemagglutinin (HA), which is the principal antigen on the viral surface and is responsible for viral binding to host receptors as well as endosomal membrane fusion. Our recent reports suggest that a fine balance of the HA properties, including receptor binding specificity and pH stability, is crucial for replication in human respiratory epithelia. This review provides an overview of current knowledge on the host-adaptive mechanism of H5N1 virus HA.