

News Release



令和2年8月17日

各報道機関文教担当記者 殿

高速AFMを用いてインフルエンザHAタンパク質がエキソソームに融合する瞬間を直接観察することに成功！

金沢大学ナノ生命科学研究所のキイシャン・リン特任助教とナノ生命科学研究所／新学術創成研究機構のリチャード・ウォング教授らの共同研究グループは、高速原子間力顕微鏡（HS-AFM）（※1）により、ヒトインフルエンザAヘマグルチニン（HA）の分子ナノ動態と、HAがエキソソーム（※2）と相互作用する瞬間のナノ動態を可視化することに成功しました。

HAは、インフルエンザAウイルス（IAV）の中で最も注意すべき病原性因子の1つであり、宿主との親和性、感染力、伝染性、およびパンデミックを起こすリスクは、HAの特性に依存しています。HAは、IAVが宿主細胞に感染する際に、極めて重要な役割を果たすと考えられてきましたが、感染過程でHAが経時的に起こす構造変化のメカニズムの詳細は、明らかにされていませんでした。

本研究では、HS-AFMを用いて、pHが中性の溶液中では楕円体だったHAが、酸性の溶液中では立体構造が変化することを発見し、HAとエキソソームの相互作用のナノ分子動態を解明しました。また、HS-AFMによるHAのリアルタイム立体構造変化の可視化により、この変化が「アンケーシング」モデル（※3）であり、HAの中間体がY字型であることを見いだしました。さらに、本研究成果により、HS-AFMイメージングは、少ないサンプル量でも医療診断に使用可能であることが分かり、HS-AFMがウイルス融合タンパク質のナノ分子動態を解析するだけでなく、ウイルス融合タンパク質とその標的となる細胞の膜との相互作用を可視化するための実行可能なツールであることが明らかになりました。将来的にはIAVタンパク質が宿主の核内に侵入する際の、核膜孔複合体（NPC、※4）との相互作用のみならず、他のウイルス構成分子と宿主タンパク質の相互作用も、HS-AFMを用いて視覚化が可能になると考えられます。

これらの知見は将来、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）における感染メカニズムの解明に活用されることが期待されます。

本研究成果は、2020年8月6日（米国東海岸標準時間）に米国科学誌『Nano Letters』のオンライン版に掲載されました。

【研究の背景】

インフルエンザは主要な公衆衛生上の課題であり、多くの国々が多大な社会経済的負担を強いられています。世界保健機関（WHO）の発表では、年間で推定約 10 億人が感染し、そのうち 30 万から 50 万人が死亡するとされています。インフルエンザウイルスは、人間にとって最も脅威的なウイルスだと言えます。

インフルエンザ A ヘマグルチニン（HA）は、インフルエンザ A ウイルス（IAV）の表面抗原の中で、最も注意すべき病原性因子の 1 つであり、宿主との親和性、感染力、伝染性、およびパンデミックを引き起こすかどうかは、HA の特性に依存しています。HA は、IAV の宿主細胞への侵入において極めて重要な役割を果たしていることが示唆されてきましたが、このプロセスがどのように進行しているのかを直接観察した例はこれまでになく、それ故 HA の経時的な構造変化メカニズムの詳細は明らかではありませんでした。

HA は、三量体前駆体（※5）として合成され、その後、宿主プロテアーゼによって切断されて、膜融合に適した形になります。膜融合能を得た HA は、HA1 と HA2 の 2 つの主要サブユニットで構成され、そのうち、HA1 サブユニットには、宿主細胞膜上で発現しているシアル酸結合ガラクトースに結合する受容体結合部位（RBS）を持つ球状ヘッドドメインがあります。そして HA2 サブユニットには、HA トリマーを安定化し、ウイルス膜への HA を固定させる、コイルドコイルのストロークドメインと膜貫通サブドメインが含まれています。

HA2 サブユニットの N 末端にある融合ペプチドは、膜融合に必須の因子であり、HA がその受容体に結合すると、ウイルスはエンドサイトーシス（※6）を介して宿主細胞に入ります。中性環境においては、HA は準安定状態にありますが、酸性エンドソーム環境では容易に誘発されて構造変化を起こし、融合ペプチドが膜に挿入されます。このプロセスは、fusogenic transition（融合性遷移）と呼ばれています。

融合性遷移は、ウイルス膜とエンドソーム膜の融合を仲介するために必要な過程です。インフルエンザの HA タンパク質の作動原理を理解するには、宿主細胞内部の振る舞いに関するナノスケールレベルの時空間的な解析と、これらの状態・機能相関についてのさらなる研究が求められていました。

【研究成果の概要】

本研究では、高速原子間力顕微鏡（HS-AFM）を使用し、HA とエキソソームとの相互作用のナノ分子動態を解明しました。pH が中性の溶液中では楕円体だった HA は、酸性の溶液中ではその立体構造が変化しました。HS-AFM による HA のリアルタイム立体構造変化の可視化により、この変化は「アンケーシング」モデルであり、HA の中間体が Y 字型であることが示唆されました（図 1）。酸性バッファー中の HA とエキソソームの間の相互作用は、エキソソーム表層へ融合ペプチドが挿入されていることを示しており、この後、表層の不安定化、エキソソームの変形や破裂およびエキソソーム内容物の放出へと続きます。対照的に、中性バッファーでは、HA とエキソソーム間相互作用は弱いものでした。

さらに、本研究成果により、HS-AFM イメージングは、少ないサンプル量でも医療診

断に使用可能であることが示されました。すなわち、少量の HA で凝集の問題を克服し、単一の HA 分子に焦点を当てて観察・解析することにより、そのコンフォメーションダイナミクスとして HA の融合性遷移を見いだすことができました (図 2)。加えて、HS-AFM がウイルス融合タンパク質のナノ分子動態を解析するだけでなく、ウイルス融合タンパク質とその標的となる細胞の膜との相互作用を可視化するための実行可能なツールであることを示しました。

【今後の展開】

本研究で得られた知見は、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) における感染メカニズムの解明に活用されることが期待されます。

本研究は、文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI)、日本学術振興会科学研究費助成事業 (17H05874, 17K08655)、小林国際奨学財団、島津科学技術振興財団、金沢大学新学術創成研究機構ユニット研究推進経費、金沢大学超然プロジェクト、金沢大学「新型コロナウイルス感染症対策支援ファンド」研究費の支援を受けて実施されました。

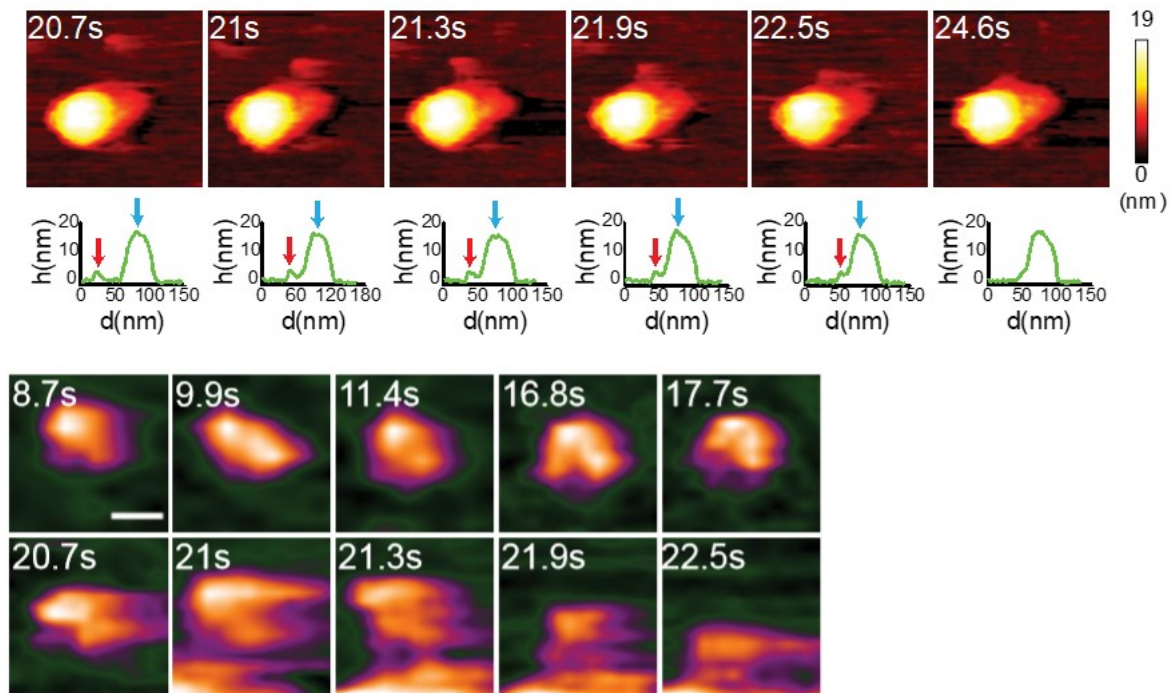


図 1. インフルエンザの HA タンパク質がエクソソーム膜表面に融合する瞬間を、世界で初めて直接観察することに成功した。拡大画像シーケンスは、エクソソームと融合したときの HA タンパク質の構造変化を示す。

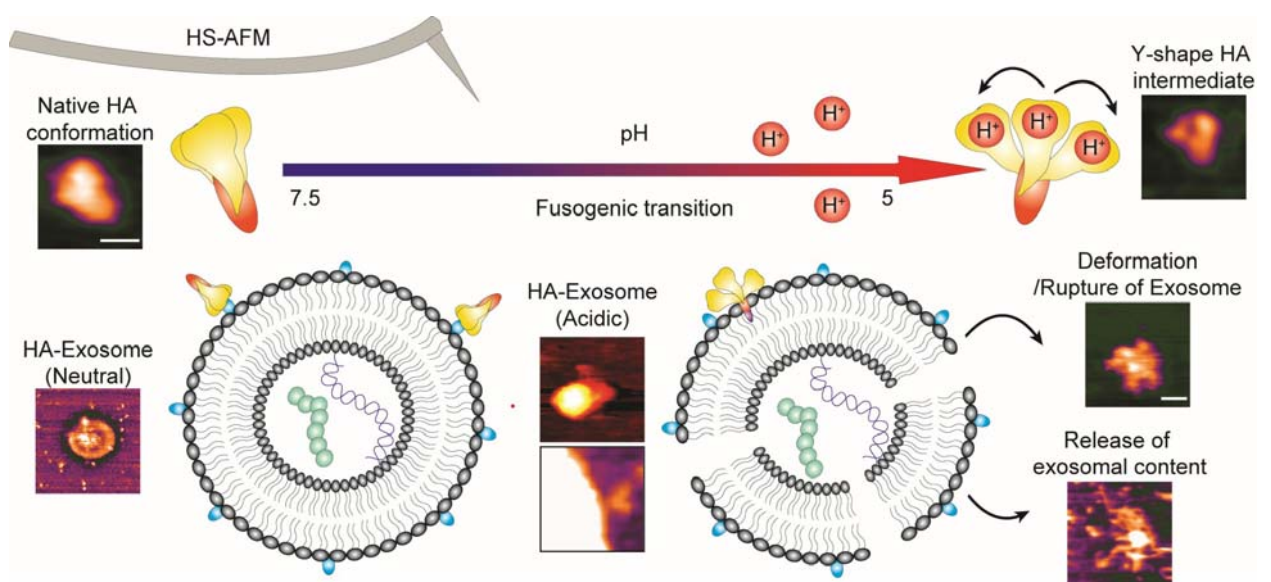


図 2. 概要図：HS-AFM を使用した，HA のネイティブなコンフォメーション，その融合性遷移，および酸性環境でのエクソソームとのリアルタイムでの相互作用の直接的な可視化。HA1 サブユニットのプロトン化は HA1 サブユニットの解離を引き起こし，次に融合ペプチドがエクソソームに挿入され，エクソソームの変形または破裂を引き起こし，エクソソーム内の内容物が漏出する。

【掲載論文】

雑誌名：Nano Letters

論文名：High-speed AFM reveals molecular dynamic of human influenza A hemagglutinin and its interaction with exosomes

(高速 AFM によるヒトインフルエンザ A ヘマグルチニンの分子動態とエキソソームとの相互作用の解明)

著者名：Keesiang Lim, Noriyuki Kodera, Hanbo Wang, Mahmoud Shaaban Mohamed, Masaharu Hazawa, Akiko Kobayashi, Takeshi Yoshida, Rikinari Hanayama, Seiji Yano, Toshio Ando, Richard W. Wong

(キイシヤン・リン¹, 古寺哲幸¹, 王瀚博², マホモド・シャーバノ・モハンメド³, 羽澤勝治^{1,4}, 小林亜紀子⁴, 吉田孟史¹, 華山力成¹, 矢野聖二^{1,5}, 安藤敏夫¹, リチャード・ウォング^{1,4})

1. 金沢大学ナノ生命科学研究所
2. 金沢大学大学院新学術創成研究科融合科学共同専攻博士前期課程
3. 金沢大学新学術創成研究機構 (研究当時)
4. 金沢大学新学術創成研究機構
5. 金沢大学がん進展制御研究所

掲載日時：2020年8月6日 (米国東海岸標準時間) にオンライン版に掲載

DOI：10.1021/acs.nanolett.0c01755

【用語解説】

※1 高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)

探針と試料の間に働く原子間力を基に分子の形状をナノメートル (10^{-9} m) 程度の高い空間分解能で可視化する顕微鏡。溶液中で動いているタンパク質などの生体分子をナノメートルの空間分解能とサブ秒という時間分解能で観察することが可能である。

※2 エキソソーム／細胞外小胞

細胞が分泌する脂質二重膜に覆われた小胞のこと。分泌細胞由来のタンパク質や RNA などの核酸、脂質などを含んでおり、さまざまな細胞間情報伝達を担っている。

※3 「アンケーシング」モデル

インフルエンザウイルスが宿主細胞に感染する際、ヘマグルチニン (HA) が宿主細胞膜に接触し融合する。細胞膜へ接触する際、HA がサブユニット HA1 を解離することにより融合を開始、融合ペプチドを放出し、膜融合活性を持つヘアピン構造の中間体を生

成するモデルを「アンケーシング」モデルという。

※4 核膜孔複合体 (NPC)

細胞核を覆う膜にある穴である核膜孔を構成するタンパク質の集合体。普段は細胞質と核の間の物質輸送を担う。

※5 三量体前駆体

HA はホモ三量体のタンパク質であるが、これらの生合成にはまず1つの前駆体が合成される。この前駆体のこと。後に分裂し、HA1 と HA2 の2つの主要サブユニットが生成される。

※6 エンドサイトーシス

細胞が細胞外の物質を取り込むための方法の一つ。細胞膜が細胞外の物質を取り囲み、その後細胞膜が分離し、その物質を細胞内に取り込む。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学ナノ生命科学研究所／新学術創成研究機構 教授

リチャード・ウォング (Richard Wong)

TEL : 076-264-6250

E-mail : rwong@staff.kanazawa-u.ac.jp

■広報担当

金沢大学総務部広報室

上沼 孝平 (かみぬま たかひら)

TEL : 076-264-5024

E-mail : koho@adm.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室

米田 洋恵 (よねだ ひろえ)

TEL : 076-234-4556

E-mail : nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp