

氏名（本籍）	森 幸太郎（神奈川県）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7510 号
学位授与年月	平成 27 年 6 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	インフルエンザウイルスにおけるウイルス集団多様化機構

主査	筑波大学教授	医学博士	久武 幸司
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	斎藤 慎二
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	松坂 賢
副査	筑波大学助教	博士（理学）	水野 智亮

論文の内容の要旨

（目的）

RNA ウイルスのポリメラーゼはウイルスゲノム複製時の変異導入頻度が極めて高い。このため、同じ環境下で増殖しても、遺伝的に異なる特徴を示すウイルスが低い比率で集団として生存し続ける。このウイルス集団の不均一性という概念は **Quasispecies** と呼ばれる。**Quasispecies** の多様化がインフルエンザウイルスの流行に重要であるとされているが、その詳細な機構については明らかにされていない。本研究では、**Quasispecies** の形成の基盤となるウイルスポリメラーゼの高変異導入の分子機構、および **Quasispecies** の拡大を引き起こす機構の解明をおこなった。

（対象と方法）

1) ウイルスポリメラーゼの高変異導入の分子機構：細胞内での変異導入率を調べるため、**256**塩基目にストップコドンが入った変異 **EGFP** 遺伝子を組込んだモデルウイルスゲノムを作製した。このウイルスと、ウイルスゲノム複製に必須な遺伝子を細胞内に導入し、ウイルスポリメラーゼによる復帰変異を **EGFP** シグナルとして検出できる実験系を構築した。

2) **Quasispecies** の多様化機構：インフルエンザウイルスゲノムの異なる分節に温度感受性変異を持つ **ts1** 株および **ts53** 株を **MDCK** 細胞に共感染させた。非許容温度にて、タミフル存在下および非存在下にて感染を進行させ、各培養上清から得られたウイルスの温度感受性を調べた。また、ウイルスポリメラーゼによって導入された変異ゲノムもウイルス集団に維持されるかを検討するため、次世代シーケンサーを用いてウイルス集団内の変異蓄積頻度を測定した。

（結果）

1) 感染細胞内で **vRNP** と相互作用し、ウイルスゲノムの転写、複製への関与が報告されている 3 種

類のウイルス因子、M1、NS1 及び NS2 が複製忠実度に関与するかどうかを検討したが、EGFP 陽性細胞出現頻度の変化は観察されなかった。次に、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ中で複製忠実度に関与するアミノ酸部位の同定を試み、PB1 Y82C 変異体が単離された。Y82C では、野生型と比べて約 3 倍の頻度で EGFP 陽性細胞が出現した。

2) 非許容温度で ts53 株と ts1 株の共感染をおこない、子孫ウイルスの温度感受性を調べたところ、タミフル非存在下では野生株のみしか観察されなかったのに対し、タミフル存在下では野生株のみでなく ts 株も観察された。また、次世代シーケンサーを用いてウイルスゲノム配列の多様性を調べた結果、タミフル非存在下ではウイルス集団への変異の蓄積数に顕著な増加は観察されなかったが、タミフル存在下ではミスセンス変異の顕著な蓄積が観察された。

(考察)

1) ウイルス因子の発現に依存した複製忠実度の変化が観察されなかったことから、インフルエンザウイルスの低い複製忠実度はポリメラーゼ自身の性質によるものであることが示唆された。PB1 Y82C 変異体は、野生型と比べて約 3 倍の頻度で EGFP 陽性細胞が観察されたこと、および EGFP mRNA の合成量に影響しなかったことから、複製忠実度が低い変異体であることが示唆された。PB1 の Y82 は基質ヌクレオチドの結合領域ではなく、vRNA および cRNA 両方の結合に関与する領域内に存在している。したがって、この変異部位は塩基の直接的な取り込みではなく、RNA 鋳型との相互作用に影響を与えていることが推測される。

2) タミフル存在下では、ウイルスポリメラーゼによって導入された変異の蓄積が促進されたことから、cell-to-cell 感染では劣勢変異がウイルス集団内に維持され、Quasispecies の多様化に寄与することが示唆された。タミフル存在下で ts 株の共感染をおこなったところ野生株のみでなく ts 株も観察された。これより、タミフル存在下では致死変異株は野生株との共感染により野生株由来のウイルス因子に相補され、致死変異株のゲノムが野生株のゲノムとともに選択を受けずに隣接した細胞に伝播されることが示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、インフルエンザウイルスの低い複製忠実度はポリメラーゼ自身の性質によるもので、その基質結合領域以外の部位が複製忠実度に影響を及ぼすことを示した。また、インフルエンザウイルスの変異は、タミフル存在下で cell-to-cell 感染を介してウイルス集団内に維持され、Quasispecies が多様化することも明らかにした。インフルエンザウイルスの変異体が生成する機構のみならず、タミフルが変異体の伝播にいかに関与を及ぼすかを明らかにし、ウイルスの環境応答や薬剤耐性化、進化に新たな知見を与えた点で、本研究は高く評価できる。

平成 27 年 4 月 30 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。