

氏名（本籍）	Nguyen Trong Binh（ベトナム）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7024 号		
学位授与年月	平成26年 3月25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	Genetic analyses of the function of PB1 subunit of the influenza virus RNA-dependent RNA polymerase (インフルエンザウイルス RNA 依存 RNA ポリメラーゼ PB1 サブユニットの遺伝学的機能解析)		
主査	筑波大学教授	獣医学博士	八神 健一
副査	筑波大学准教授	博士（薬学）	鈴木 裕之
副査	筑波大学准教授	博士（人間・環境学）	森川 一也
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	松坂 賢

論文の内容の要旨

(目的)

インフルエンザウイルスのゲノムは、ヌクレオプロテイン (vRNP) とウイルス RNA ポリメラーゼのサブユニットである PB1, PB2 および PA が複合体を形成し、これがウイルスゲノムの複製や転写を制御すると考えられている。各サブユニットの相互作用や機能について研究は進められているが、未解明な点が多い。本研究では、逆遺伝学的な手法で作製した変異ウイルスおよび順遺伝学的な手法により分離したリバビリン抵抗性 PB1 変異体を用いて、PB1 サブユニットの遺伝学的機能解析を行った。

(対象と方法)

A 型インフルエンザウイルスおよび B 型インフルエンザウイルス間で高度に保存されている PB1 の N 末端領域（アミノ酸残基 1-50）の中で、A 型および B 型インフルエンザウイルス間で異なる部位（アミノ酸残基 16, 27 および 44）に変異を起こした変異ウイルスを作製し、ウイルスゲノムの複製および転写活性を分子生物学的に解析した。また、RNA 合成を阻害し RNA ウイルスに変異を誘導するリバビリンを用いてリバビリン抵抗性の PB1 変異株を分離し、その性状を解析した。

(結果)

まず、逆遺伝学的な手法により、A 型インフルエンザウイルス PB1 遺伝子の N 末端領域のアミノ酸

残基 16 に存在するアスパラギンを B 型インフルエンザウイルスの同領域にあるアラニンに変換した変異ウイルス (N16A)、同様にアミノ酸残基 27 のアスパラギン酸をバリンに変換した変異ウイルス (D27V) および同 44 のアスパラギンをイソロイシンに変換した変異ウイルス (N44I) を作製した。これらの変異ウイルスの感染細胞において、ウイルス mRNA, cRNA, vRNA を定量的 RT-PCR で解析することにより RNA ポリメラーゼ活性を検討したところ、これらの RNAs は D27A で有意に増加し、N44I で有意に低下した。また、各部位を別のアミノ酸に変換した変異ウイルスを用いて同様の検討を行った結果、アミノ酸残基 16 に存在する非荷電性アミノ酸がウイルスポリメラーゼ活性に必要なこと、同 27 に存在する非荷電性アミノ酸が RNA 合成活性を亢進させること、同 44 に存在する親水性アミノ酸がウイルス RNA 合成活性に重要であることが示唆された。次に、PB1 領域にランダム変異を起こしたプラスミドライブラリーを作製し、それらを 293T 細胞に導入しリバビリン存在下でウイルス RNA 合成活性をもつリバビリン抵抗性の PB1 変異体 (D27N mutant) を得た。この変異体はアミノ酸残基 27 のアスパラギン酸がアスパラギンに変換されており、この変異体のウイルスポリメラーゼ活性はプリン合成阻害剤である MTX 存在下でも変動しなかった。これらのことから、アミノ酸残基 27 に存在するアスパラギンがリバビリン抵抗性に深く関与することが示唆された。

(考察)

本研究において、逆遺伝学的手法によりインフルエンザウイルス PB1 遺伝子の N 末端のアミノ酸残基 16, 27 および 44 に変異を誘導した変異ウイルスを作製し、RNA 合成活性を比較検討することにより、同 27 および 44 に存在するアミノ酸がウイルス複製過程に重要であり、転写過程には影響しないことを明らかにした。さらにリバビリン抵抗性 PB1 変異体を分離し、その解析により同 27 のアスパラギンへの置換がリバビリン抵抗性に深く関与することを示した。アミノ酸残基 27 および 44 は PB1 の構造に影響を及ぼし、その結果、cRNA プロモーターに結合する PB1 の結合活性に影響することが考えられる。

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 PB1 遺伝子のプロモーター結合部位に存在する保存性領域の中で A 型および B 型インフルエンザウイルス間で異なるアミノ酸残基に注目し、それらの変異ウイルスを作製しウイルス RNA 合成活性を比較することで、ウイルス複製や転写活性に重要な機能をもつアミノ酸を特定した。インフルエンザウイルスの複製機構の解明やその応用による抗ウイルス薬の開発につながる新知見が得られており、優れた研究である。

平成 25 年 12 月 25 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。