

論 文 概 要

○ 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

○ 指 導 教 員 川口 敦史

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 助教

(所 属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻

(氏 名) 森 幸太郎

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、環境の変化の際、すみやかに新しい環境へ順応し、ウイルス集団の維持に貢献する機構と考えられている。*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、①*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②*Quasispecies* の拡大を支持する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るよう塩基置換を導入した変異 *EGFP* 遺伝子を組込んだモデルウイルスゲノムと、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り stop コドンに復帰変異が導入された場合 *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は分節化したゲノムを持つため、異なる遺伝子型のウイルスが共感染した場合、遺伝子交雑変異株が産生される。異なる分節に温度感受性変異が導入された *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。

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*ウイルスポリメラーゼの高変異導入の分子機構.* ウイルス因子の中でも特に感染細胞内で 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 M1、NS1、NS2 の複製忠実度への関与を検討したところ、ウイルス因子の発現に依存した *EGFP* 陽性細胞出現頻度の変化は観察されなかった。インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼにおいて複製忠実度に関与するアミノ酸部位の同定を試みたところ、PB1 Y82C 変異体が単離された。Y82C では、野生型と比べて約 3 倍 *EGFP* 陽性細胞の出現頻度が高かった。

②*Quasispecies* の多様化機構. インフルエンザウイルスの感染様式には、細胞外へ遊離したウイルス粒子により感染が伝播される cell-free 感染と、細胞間の接触面でウイルスが伝播する cell-to-cell 感染の二つの様式がある。Cell-to-cell 感染では、cell-free 感染を阻害するタミフル存在下でも局所的に感染拡大するだけでなく、タミフルにより細胞表面に蓄積した子孫ウイルス粒子群の共感染も引き起こすことから、致死変異ウ

ウイルスもウイルス集団に残存し、**Quasispecies** の拡大に寄与することが推測された。そこで、インフルエンザウイルスの **cell-to-cell** 感染が、ウイルス集団への致死変異ウイルスの残存に寄与するかを検討した。*ts53* 株と *ts1* 株の温度感受性変異は異なる分節に導入されているため、遺伝子交雑により野生株が産生される。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が観察されたのに対し、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。**Cell-to-cell** 感染ではウイルスポリメラーゼにより導入される突然変異においてもウイルス集団に蓄積されるか検討するため、次世代シーケンサーを用いてウイルスゲノムの多様性を調べた。その結果、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ウイルスポリメラーゼの高変異導入の分子機構. 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** は、野生型と比べて約 3 倍、**EGFP** 陽性細胞出現頻度の上昇が観察されたこと、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 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、塩基の直接的な取り込みに関わっているのではなく、**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。

②Quasispecies の多様化機構. 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ることで、**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。ウイルス集団に致死変異が維持することで新たな変異が加わる機会が生まれ、ウイルスの環境応答や薬剤耐性化、進化に寄与すると考えられる。

結 論: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、ウイルスポリメラーゼの基質結合領域以外のアミノ酸に複製忠実度に影響を及ぼす領域が存在することが明らかとなった。ウイルスポリメラーゼによって導入された変異はタミフルの添加によりウイルス集団内に維持され、**Quasispecies** が多様化することが明らかとなった。