

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

Characterization of the Incorporation Signal for the NS Segment of Influenza Virus

(インフルエンザウイルス NS RNA 分節のパッケージング・シグナルの同定)

指導教官 河岡 義裕 教授

東京大学医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 藤井 健

インフルエンザウイルスは毎年、冬に流行するのみならず、時に新型ウイルス出現による世界的大流行を起こし、多くの人が犠牲になる。また、最近、話題となっている高病原性トリインフルエンザウイルスは、経済的損失もさることながら、直接ヒトに感染し、ヒトからヒトへの伝播力を持つ新型ウイルスが出現する可能性もある。現行のインフルエンザワクチンでは、抗原性が異なるため、新型ウイルスに対する効果は期待できない。従って、新型ウイルスが出現した場合は抗インフルエンザ薬が重要な役割を担う。現在、作用機序の異なるアマンタジンとノイラミニダーゼ阻害薬が抗インフルエンザ薬として認可されている。アマンタジンは A 型インフルエンザウイルスにしか効果がなく、耐性ウイルスが高頻度に出現する。ノイラミニダーゼ阻害薬は、耐性ウイルスが出現しづらいついと言われていたが、必ずしもそうではないことが最近明らかとなった。従って、作用機序の異なる抗インフルエンザ薬開発のためのターゲットを同定するために、インフルエンザウイルス

の増殖過程を明らかにする必要がある。

A 型インフルエンザウイルスの特徴は、そのゲノムとして 8 種類の RNA 分節を持っていることである。しかし、これらの RNA 分節がどのようなメカニズムでウイルス粒子にとりこまれるのかについては未だ充分には解明されていない。これまでに、ウイルス RNA のパッケージング機構に関して 2 つの仮説が提唱されている。一つは 8 種類のウイルス RNA 分節が共通のパッケージング・シグナルを持ち、分節の種類および数に関係なくランダムに粒子内にパッケージングされ、8 種類の RNA が揃ったウイルス粒子が感染性を持つとする説（ランダム説）である。この仮説は、一粒子中に 8 種類以上のウイルス RNA 分節がパッケージングされうることにより支持されている。もう一つは、8 種類のウイルス RNA がそれぞれ固有のパッケージング・シグナルを持ち、一つのウイルス粒子に 8 種類 1 セットでパッケージングされるとする説（選択説）である。選択説は、defective interfering (DI) RNA セグメント(中央部分が欠損したウイルス RNA で、ウイルス増殖を抑制する)が存在すると、DI RNA セグメントが由来した元々のウイルス RNA 分節のパッケージングの効率が低下することから支持されている。それぞれの RNA 分節は非翻訳領域と翻訳領域とに分かれており、NS RNA 分節のウイルス粒子への取り込みには、非翻訳領域のみで十分であると報告されている。しかしながら、最近、NA と HA RNA 分節が効率よくパッケージングされるためには、翻訳領域も必要であると報告された。そこで RNA 分節パッケージングの全容を解明することを目的として、NS RNA 分節のパッケージング・シグナルの解析を行った。

翻訳領域に GFP 遺伝子を挿入した組換え NS RNA (NS-GFP) を発現するプラスミドを各種作製した。これらはそれぞれ異なる長さの NS 翻訳領域を持っている。組換え NS RNA、NS 以外のウイルス RNA、そして 10 種類すべてのウイルス蛋白質を細胞内でプラスミドから発現させて、人工的にウイルス様粒子を作製した。得られたウイルス様粒子を細胞に感染させた後、ウイルス陽性細胞の中で GFP 陽性細胞が占める割合を求めることにより組換え RNA 分節を持つウイルス様粒子の比率を算出した。

翻訳領域を vRNA の 3' と 5' 側に 150 塩基ずつ持つ組換え NS RNA を取り込んだウイルス様粒子は、総感染性ウイルスの約 60% であったが、翻訳領域をもたない組換え NS RNA を持つウイルス様粒子の割合は、約 0.5% であった。一方、3' 側に 150 塩基、5' 側に 30 塩基の翻訳領域を、あるいは 3' 側に 30 塩基、5' 側に 150 塩基の翻訳領域を持つ組換え NS RNA を取り込んだウイルス様粒子の割合はそれぞれ約 30% であった。ところが、翻訳領域を 3' 側だけ 150 塩基もつ組換え NS RNA を取り込んだウイルス様粒子は約 20% であったのに対

して、5'側だけ 150 塩基もつ組換え NS RNA を取り込んだウイルス様粒子は約 2%であった。また、3'側の始めの 30 塩基を除いた組換え NS RNA を取り込んだウイルス様粒子は約 4%であった。さらに、3'側の翻訳領域の始めの 30 塩基内に蛋白質のアミノ酸配列には影響を与えないような突然変異を導入すると、ウイルス増殖能が低下した。以上の成績から、NS RNA 分節がウイルス粒子へ効率良く取り込まれるためには翻訳領域が必要で、3'側の翻訳領域、特に始めの 30 塩基が重要な役割をしていることが示唆された。

次に非翻訳領域のウイルス RNA のパッケージングにおける重要性を明らかにするために、NS RNA 分節の非翻訳領域を欠損させ、そのパッケージング効率を解析した。非翻訳領域を持つ組換え NS RNA を取り込んだウイルス様粒子は、総感染性ウイルスの約 74%であったが、非翻訳領域の 3'と 5'側をもたない組換え NS RNA を持つウイルス様粒子の割合は、約 1.3%であった。一方、5'側の非翻訳領域を欠損した組換え NS RNA を取り込んだウイルス様粒子は約 47%であったのに対して、3'側の非翻訳領域を除いた組換え NS RNA を取り込んだウイルス様粒子は約 5.7%であった。以上の成績は、NS RNA 分節がウイルス粒子へ効率良く取り込まれるためには翻訳領域の一部も必要であるが、非翻訳領域も重要で、特に 3'側の非翻訳領域が重要な役割をしていることが示唆された。

3'側の翻訳領域の始めの 30 塩基内 (27 から 56 番目) でパッケージング効率に影響を与える部分を詳しく調べるため、27-35 番目、36-44 番目、45-53 番目、48-56 番目の 4 つの領域の 9 塩基をすべてアデニンに置換した NS-GFP 分節のパッケージング効率を比較した。36-44 番目、45-53 番目、48-56 番目の塩基をアデニンに置換した NS-GFP 分節のパッケージング効率は、それぞれ 37.8%、42.1%、71.9%であった。一方、27-35 番目の塩基をアデニンに置換した NS-GFP のパッケージング効率は 14.8%と減少したことから、翻訳領域の 27-35 番目の塩基はパッケージングに重要であることが示唆された。

NS RNA 分節のパッケージングに関与する特定の塩基配列を決定するために、パッケージングに必要な領域をランダムな塩基配列に置換し、その中からパッケージングに重要な塩基配列を抽出する方法 (シークエンス・トラップ法) を用いて解析を行った。具体的には、上述の実験で決定した NS-GFP 分節のパッケージングに必要な領域を 2 つの領域 (vRNA の塩基 16-26 番目 (非翻訳領域)、塩基 27-35 番目 (翻訳領域)) に分け、それぞれの塩基をランダムな配列に置き換えた変異 NS-GFP を発現するプラスミドを作製した。また、HA と NS の両方の遺伝子産物 (すなわち、HA、NS1、NS2) を産生する HA-NS タンデム分節を発現するプラスミドを作製した。これらのプラスミドを用いてリバーシ・ジェネティクス法で組

換えウイルスを作製し、MDCK 細胞に感染させ、プラークを形成させた。GFP 陽性プラークからウイルスを回収し、粒子内にトラップされた NS-GFP 分節の塩基配列を調べ、ランダムな配列を導入した領域の塩基配列を解析した。16-26 番目（非翻訳領域）に関しては 12 個、27-35 番目（翻訳領域）に関しては 18 個の GFP 陽性プラークが得られた。これらの NS-GFP 分節のランダム配列を導入した部分を解析した結果、各領域で保存された配列は見られなかった。すなわち、分節が効率よくパッケージングされるためには、特定の塩基配列が重要というのではなく、16-35 番目の全体の配列が重要であることが示唆された。

本研究から、NS RNA 分節の効率のよいパッケージングには 16-35 番目（非翻訳と翻訳領域を含む）の全体の配列が重要であることを明らかになった。これらの塩基配列は NS RNA 分節特有のものであることからインフルエンザウイルスのゲノムは選択的に粒子内に取り込まれていると考えられる。また、NS RNA 分節のパッケージング・シグナルへの変異導入によりウイルス増殖能が低下したことから、ウイルスゲノムのパッケージング機構は抗インフルエンザ薬の標的に成りうるものと考えられた。