[課程―２]

審査の結果の要旨

氏名　　小澤　真

本研究は、インフルエンザパンデミックの発生に備え、A 型インフルエンザに対する治療薬の新たな標的の同定を目的としたウイルス蛋白質の性状解析、ならびに効率的なワクチン製造を目的とした、新たなウイルス合成技術の開発を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. A 型インフルエンザウイルスの vRNA は、感染細胞の核内において、vRNP を基本単位として転写・複製される。vRNP の最も主要な構成蛋白質である NP が有する２つ核移行シグナル（NLS）のアミノ酸残基に変異を導入したところ、NP の細胞内局在の変化から、2 つの NLS のうち、一方（NLS1）は NP の核内移行に、他方（NLS2）は核小体移行に重要であることがわかった。また、NLS1 の変異が、vRNA 転写や感染性ウイルス様粒子の形成に与える影響は限られたものであったのに対し、NLS2 の変異は vRNA 転写を著しく抑制した。さらに、NP RNA 分節のパッケージングシグナル（RNA 分節がウイルス粒子内に効率よく取り込まれるために必要な塩基配列）を同定し、NP RNA 分節両末端の非翻訳領域とそれに隣接する翻訳領域、特に 3'側の翻訳領域 60 塩基と 5'側の翻訳領域 120 塩基が、NP RNA 分節の粒子内取り込みに重要な役割を果たしていることを明らかにした。そしてこの結果をもとに、3'側パッケージングシグナルと蛋白質翻訳領域を分離した、組換え NP RNA 分節を有するウイルスを作出し、各 NLS の変異がウイルス増殖に与える影響を調べた結果、効率の良いウイルス増殖には、NP の有する 2 つの NLS が協調して働く必要があり、特に NLS2 は、ウイルス増殖に不可欠であることが示された。

2. WHO が A 型インフルエンザウイルスのリバースジェネティクス法（クローン化 cDNA をコードしたプラスミドを細胞へ導入し、ウイルスを人工合成する技術）によるワクチンシードウイルスの作製に推奨している Vero 細胞は、プラスミド導入効率が低いため、時としてワクチン候補株の作製が困難な場合がある。Vero 細胞への遺伝子導入効率が高く、遺伝子治療などを含めた幅広い臨床応用実績を誇る非増殖型アデノウイルスベクター（AdV）の遺伝子に、翻訳領域を GFP 遺伝子に置換したレポーターvRNA の発現ユニットを挿入したところ、AdV 感染 Vero 細胞内において、効率的な vRNA 転写・複製が見られた。この結果を受けて、A 型インフルエンザウイルスの分節化した 8 種類の RNA 遺伝子を発現する AdV を各々作製し、4 種類の蛋白質発現 AdV と共に Vero 細胞へ感染させたところ、培養上清中に約 10^4 pfu/ml の A 型インフルエンザウイルスが産生された。さらに、vRNA の発現ユニットを RNA ポリメラーゼⅡプロモーター制御下にコードさせることで、vRNA と mRNA の両方を発現する AdV 作製した。全 8 分節に

対応した vRNA-mRNA 共発現 AdV を各々Vero 細胞へ感染させたところ、培養上清中には約 10^5 pfu/ml の A 型インフルエンザウイルスが産生された。並行して行った 12 種類のプラスミド導入による従来法、ならびに最近報告された、転写ユニットを連結した 3 種類のプラスミド導入する方法で産生されたウイルス力価が、それぞれ約 10、10^4 pfu/ml であったことから、今回確立した vRNA-mRNA 共発現 AdV によるリバースジェネティクス法は、Vero 細胞におけるウイルス産生効率が、従来法より 1 万倍以上高いことが示された。

以上、本論文は、NP の性状解析から NP の核小体移行がウイルス増殖に重要であることを、また、アデノウイルスベクターを応用することで Vero 細胞における効率的なウイルスの人工合成が可能であることを明らかにした。本研究は、抗ウイルス薬の新たな標的として NP の核小体移行を見出すと共に、ワクチンシードウイルスの効率的な作製方法を提示しており、これらの知見は、パンデミック対策のみならず、インフルエンザ予防・治療手段の発展に貢献するものであることから、学位の授与に値するものと考えられる。