

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成29年度博士課程 入学
氏 名 石田 大歩
指導教員名 堀本 泰介

論文題目

D型インフルエンザウイルスを作出するリバーシジェネティクスの開発とその応用

D型インフルエンザウイルスは、2011年にアメリカで呼吸器症状を呈するブタから発見された新しいインフルエンザウイルスである。その後の疫学調査によって、D型ウイルスの本来の宿主はウシであり、畜産業界における経済損失が最も大きい牛呼吸器病症候群(Bovine Respiratory Disease Complex:BRDC)の主要因ウイルスであることがわかってきた。現在、BRDCの対策として主要呼吸器病ウイルスに対するワクチンが使用されているが、BRDCによる国内の死廃事故発生件数は、感染性疾病全体の約25%と未だに高く、別の対策法の模索が求められている。一方、D型インフルエンザウイルスは、これまでその存在自体が確認されていなかったため、ワクチンなどの対策は講じられていない。そのため、D型インフルエンザウイルスに対するワクチンの導入によってBRDCを制御出来る可能性がある。

D型インフルエンザウイルスの試作不活化ワクチンの効果をウシで検証した報告によると、その感染防御効果は高くなかった。したがって、呼吸器感染症に対して高い効果が期待される弱毒生ワクチンの開発が望まれる。しかし、D型インフルエンザウイルスを弱毒化するアミノ酸変異等については報告されていない。このようなウイルスの分子生物学的解

析や組換えワクチンウイルスの作出において、人工的にウイルスを作出する技術であるリバーシジェネティクス法は強力なツールと成り得る。そこで本研究では、D 型インフルエンザウイルスを作出するリバーシジェネティクスの開発、さらにそれを用いたウイルス学的性状の解析、特にウイルスの弱毒化につながる知見の探索を行なった。

第 1 章では、D 型インフルエンザウイルスを作出するリバーシジェネティクス法の開発と改良を行った。まず、分離株の詳細なゲノム配列を再検証した結果、ウイルスの 7 分節のゲノム RNA の 3'末端のヌクレオチドが、他の研究グループからの報告と異なり、ウラシルであることを明らかにした。また、この解析に基づいて構築したゲノム RNA を RNA ポリメラーゼ I (PolI) 制御により合成する 7 種類のプラスミドと RNA ポリメラーゼを含むウイルスタンパク質を発現する 4 種類のプラスミドを併せて HRT-18G 細胞にトランスフェクトすることで、組換え D 型インフルエンザウイルスを作出することに成功した。しかし、組換えウイルスの増殖性は、野生型ウイルスと比べ著しく低下していた。そこで、組換えウイルス粒子内の各ゲノム RNA 分節の割合を調べたところ、PB2・P3・NP 分節の割合が低下していることがわかった。この結果に基づき、各ゲノム RNA 分節合成プラスミドの割合を調整しトランスフェクトすることで、野生型ウイルスと同程度の増殖性を示す組換えウイルスの作出に成功し、最適なウイルスの作出条件を確立した。これにより、D 型インフルエンザウイルスのリバーシジェネティクス法が確立され、ウイルスの病原性、増殖性、抗原性等を規定する因子の詳細な基礎解析が可能となった。

第 2 章では、第 1 章で確立したリバーシジェネティクス法により、NS1 と NS2 遺伝子をそれぞれ別の分節（人工 NS1 分節と人工 NS2 分節）にもつ 8 分節の D 型インフルエンザ組換えウイルスを作出し、そのウイルス学的特性を評価した。その結果、8 分節の D 型インフルエンザウイルスが作製できること、しかし、その組換えウイルスは、7 分節の野生型ウイルスよりも著しく増殖性が低下していることがわかった。さらに、8 分節の組換えウイルスをベースとして NS1 あるいは NS2 タンパク質の部分欠損ウイルスの作出を試みることで、各欠損領域のウイルス増殖性への影響を評価した。その結果、NS1 と NS2 タンパク質に N 末端側にある共通領域 (1-63 番目のアミノ酸) が NS1 タンパク質にとっては増殖に必須であるが、NS2 タンパク質にとっては増殖に必須でないことがわかった。これらの成

果は、D 型インフルエンザウイルス粒子には人為的に 8 分節の RNA 分節を搭載できることを明らかにするとともに、バイシストロニックな NS 分節そのものの解析にとどまる従来の方法では不可能であった NS1 タンパク質と NS2 タンパク質の独立した変異体を用いた機能解析が初めて実施された研究成果になる。

第 3 章では、A 型インフルエンザウイルスの高温感受性変異を導入した D 型インフルエンザウイルスを作出し、その温度感受性とワクチン効果を検証した。まず、リバーシジェネティクスを用い、A 型インフルエンザウイルスの高温感受性変異を PB2 および PB1 タンパク質にそれぞれ導入した D 型インフルエンザウイルス (rD/OK-AL) を作出した。rD/OK-AL は 33°C で増殖性を示したが、37°C では増殖することができず、高温感受性を示した。また、rD/OK-AL は、マウスの下部気道臓器での増殖性が確認されず高い安全性を示した。さらに、この免疫マウスに野生型 D/OK で攻撃試験を行ったところ、攻撃後にウイルスは一切検出されず、完全な防御応答を示した。これらの成績は、rD/OK-AL が弱毒生ワクチンの候補株として有用であることを示している。

以上、本研究によって、D 型インフルエンザウイルスを作出する RNA Pol I ベースのリバーシジェネティクス法が世界で初めて確立された。また、本技術を応用し、8 分節 D 型インフルエンザウイルスを作出するシステムを構築した。ゲノム分節数を増やした変異ウイルス粒子の安定した作出は、すべてのウイルスを含めはじめての成果になる。これらの技術は、ウイルスゲノムに任意の変異を導入した組換え D 型インフルエンザウイルスの作出を可能にし、ゲノムのパッケージング機構や病原性を含むウイルス複製の分子機構の解明に役立つと考えられる。また、ゲノム分節の 8 分節化あるいは A 型インフルエンザウイルスの高温感受性変異の導入には、D 型インフルエンザウイルスに弱毒化効果があることを明らかにした。これらの戦略は、単独あるいは組み合わせることで新しいワクチンウイルスの開発等に応用できる可能性がある。総じて、本研究で開発されたリバーシジェネティクス法および弱毒化に関わる知見は、D 型インフルエンザウイルスの基礎研究に多大な貢献をもたらすと共に、それらの知見を基盤とする D 型インフルエンザ生ワクチンの作出などを含め BRDC に対する効果的な制御手段の確立に貢献することが期待できる。