

博士論文

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

石田 大歩

目次.....	1
略語.....	3
序章.....	7
インフルエンザウイルスの分類.....	8
A、B、C型インフルエンザウイルス.....	8
D型インフルエンザウイルスの発見と疫学的解.....	10
D型インフルエンザウイルスの遺伝的および抗原的進化.....	11
D型インフルエンザウイルスのゲノム構造.....	12
D型インフルエンザウイルスのタンパク質.....	13
ウシ呼吸器病症候群.....	15
リバーシジェネティクス法.....	16
図表.....	19
第1章 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の開発.....	25
要旨.....	26
背景と目的.....	27
材料と方法.....	29

結果.....	36
考察.....	43
図表.....	49
第2章および第3章について.....	66
総括.....	67
引用文献.....	70
謝辞.....	93

略語

略語

PB2	polymerase basic 1
PB1	polymerase basic 2
P3	polymerase protein 3
PA	polymerase acidic
HEF	hemagglutinin-esterase-fusion
HA	hemagglutinin
NA	neuraminidase
NP	nucleoprotein
M	matrix protein
NS	non-structural protein
NEP	nuclear export protein
vRNA	viral RNA
vRNP	viral ribonucleoprotein
NC	non coding
BRDC	bovine respiratory disease complex
Mh	<i>Mannheimia haemolytica</i>
Pol I	polymerase I

HEK293T	human embryonic kidney 293T
HRT-18G	human rectal tumor-18G
ST	swine testis
FBS	fetal bovine serum
DMEM	Dullbecco's modified MEM
D/OK	D/swine/Oklahoma/1334/2011
D/660	D/bovine/Oklahoma/660/2013
D/Yama2016	D/bovine/Yamagata/10710/2016
D/Yama2019	D/bovine/Yamagata/1/2019
MEM	minimal essential medium
TPCK	N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
PCR	polymerase chain reaction
CPE	cytopathic effect
MOI	multiplicity of infection
DI	defective interfering particle
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis

PBS	phosphate-buffered saline
RACE	rapid amplification of the cDNA end
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
PFU	plaque forming unit
VLP	virus-like particle
RDE II	receptor-destroying enzyme II
A/Le17	A/Leningrad/134/17/57
A/Le	A/Leningrad/134/57

序章

インフルエンザウイルスの分類

インフルエンザウイルスは、エンベロープを持ち、7本ないし8本に分節化されたマイナス鎖の RNA をゲノムとするオルソミクソウイルス科 (*Orthomyxoviridae*) に属する。インフルエンザウイルスは、ウイルス核タンパク質 (NP) とマトリックスタンパク質 (M1) の抗原性の違いにより、A 型インフルエンザウイルス属 (*Alphainfluenzavirus*)、B 型インフルエンザウイルス属 (*Betainfluenzavirus*)、C 型インフルエンザウイルス属 (*Gammainfluenzavirus*)、D 型インフルエンザウイルス属 (*Deltainfluenzavirus*) に分類される (Hutchinson, 2018)。A 型および B 型インフルエンザウイルスは、ゲノムとしてマイナス鎖の RNA を 8 分節 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、および NS) 有するのに対し、C 型および D 型インフルエンザウイルスは 7 分節 (PB2、PB1、P3、HEF、NP、M、および NS) をゲノムとして保有している (図 1)。

A、B、C 型インフルエンザウイルス

A 型インフルエンザウイルスは、ウイルス表面に存在する糖タンパク質であるヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の抗原性の違いから、HA では H1 から H18、NA では N1 から N11 までの亜型に分類される。このうち H17 と H18、N10 と N11 はコウモリから検出されたウイルス亜型である (Tong et al., 2012, 2013)。それ以外のすべての亜型は、A 型インフルエンザウイルスのレゼルボアである水禽類から分離されている (Olsen et

al., 2006)。これまでにヒトにおいて、持続的で広範囲にわたる流行を起こしてきたのは 3 つの HA 亜型 (H1、H2、および H3) および 2 つの NA 亜型 (N1 および N2) の組み合わせのウイルスだけである (Medina & García-Sastre, 2011)。このようなインフルエンザウイルスの流行は、通常、ヒト集団にとって免疫学的にナイーブな動物由来 A 型インフルエンザウイルスが持ち込まれた場合に起こる (Lakdawala et al., 2015)。現在は、世界中の家禽で流行している H7N9 亜型や H5Nx 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト集団における大流行 (パンデミック) の発生が危惧されている (Gu et al., 2013; Su et al., 2015; Zhang et al., 2017)。

B 型インフルエンザウイルスには亜型は存在しないが、HA の抗原性から Victoria 系統と Yamagata 系統に分類される (Hutchinson, 2018)。B 型インフルエンザウイルスのレゼルボアはヒトであり、ウイルスは上気道と下気道の両方に感染することで、A 型インフルエンザウイルスと同様な症状を引き起こす (P. K. S. Chan et al., 2013; Li et al., 2008)。しかし、A 型インフルエンザウイルスと比べ、B 型インフルエンザウイルスでは HA の多様性が限定的であるため、宿主領域が小さく、進化速度も制限される (Huang et al., 2014)。

C 型インフルエンザウイルスは、ヒトを宿主とし、特に小児において上気道の感染を引き起こすが、ほとんどの場合臨床症状は軽度である (Yoko Matsuzaki et al., 2006)。血清学的研究では、C 型インフルエンザウイルスは世界的に分布し、ほとんどのヒトが幼少時に感染し、ウイルスに対する抗体を獲得していることが報告されている (Salez et al., 2014)。C 型

インフルエンザウイルスの抗原性は、A 型インフルエンザウイルスよりもはるかに安定的で分離された C 型インフルエンザウイルス間では高度な交差反応性が認められる (Y Matsuzaki et al., 2000)。C 型インフルエンザウイルスのゲノムは 7 つの RNA 分節で構成され、A 型および B 型インフルエンザウイルスの HA と NA の両方の機能を併せ持ったヘマグルチニンエステラーゼフュージョン (HEF) タンパク質をコードする分節を有する (Wang & Veit, 2016)。これまでの C 型インフルエンザウイルス分離株は、遺伝的および抗原的に 6 つの系統に分類されるが、異なる系統のウイルス間のリアソートメントが頻繁に起こり、新たに出現したリアソータントウイルスは以前に循環していたものにとって代わり、現在の流行株となっている (Y Matsuzaki et al., 2003)。

D 型インフルエンザウイルスの発見と疫学的解析

D 型インフルエンザウイルスは、2011 年にアメリカのオクラホマ州で呼吸器症状を呈するブタからはじめて分離されたウイルスであり、当初は新しい C 型インフルエンザウイルスとして報告されていた (Hause et al., 2013)。発見後の研究で、C 型インフルエンザウイルスと抗原交差反応性がないことやゲノム分節のリアソートメントが起きないことから新しいウイルス属に分類された (Hause et al., 2014)。また、その後の疫学調査で、ウシにおける血清陽性率が高く、D 型インフルエンザウイルスの本来の宿主であることが明らかにされた (Ferguson et al., 2015; Hause et al., 2014)。さらに、アメリカ (Collin et al., 2015;

Ferguson et al., 2015; Hause et al., 2014)、日本 (Horimoto et al., 2016; Murakami et al., 2016)、中国 (Jiang et al., 2014)、メキシコ (Mitra et al., 2016)、フランス (Ducatez et al., 2015)、イタリア (Chiapponi et al., 2016)、アイルランド (Flynn et al., 2018)、ルクセンブルグ (Snoeck et al., 2018)、アフリカ諸国 (Salem et al., 2017) など、これまでに多くの国々のウシで D 型インフルエンザウイルスの存在が確認されている (図 2)。また、D 型インフルエンザウイルスの抗体がブタ (Ferguson et al., 2018)、ヒツジ (Oliva et al., 2019; Quast et al., 2015)、ヤギ (Oliva et al., 2019; Quast et al., 2015)、ラクダ (Murakami et al., 2019; Salem et al., 2017)、ウマ (Nedland et al., 2018)、およびヒト (White et al., 2016) から検出されている。これらの知見は、D 型インフルエンザウイルスが複数の動物宿主に世界的に分布していることを示唆している。

D 型インフルエンザウイルスの遺伝的および抗原的進化

2011 年以降、6 カ国 (アメリカ、中国、フランス、イタリア、アイルランド、日本) のウシおよびブタから 50 株以上の D 型インフルエンザウイルスの全長のゲノム配列が決定されている。進化系統学および抗原性解析では、少なくとも 4 つのウイルス系統 (D/OK、D/660、D/Yama2016、D/Yama2019) が明らかにされている (図 3)。現在、アメリカとヨーロッパでは、D/OK と D/660 の 2 系統の循環が確認されている。中国、米国およびイタリアで確認されている D/OK 系統は、それぞれ各国にサブ系統があることが示唆されてい

る。D/660 系統も、米国とイタリアにおいて、サブ系統に進化したことを示唆している。一方、日本においては、私たちの研究グループが分離した二つのウイルスがそれぞれ独自の系統 (D/Yama2016、D/Yama2019) に属していることを示している。興味深いことに、この 2 つの系統は日本にしか存在せず、D 型インフルエンザウイルスが地域別に緩やかに進化していることを示唆している。

D 型インフルエンザウイルスのゲノム構造

D 型インフルエンザウイルスは遺伝学的に C 型インフルエンザウイルスに近縁であり、ともにゲノムとしてマイナス鎖の RNA を 7 分節 (PB2、PB1、P3、HEF、NP、M、および NS) 保有している。D 型インフルエンザウイルスの 7 つの RNA 分節の両末端には、非コーディング (NC) 領域が存在し、5'末端側では、最初の 12 ヌクレオチド (5'-AGCAGUAGCAAG-3')、3'末端側では最後の 10 ヌクレオチド (5'-UGCUUAUGCU/C-3') が、7 つのゲノム分節間で共通である (図 4) (Hause et al., 2013)。なお、これまでの D 型インフルエンザウイルスの研究では、HEF、M、NS 分節の 3'最末端塩基はウラシルであるが、PB2、PB1、P3、および NP 分節の 3'末端塩基は 5'末端塩基のアデニンと相補しないシトシンであると報告されていた (Hause et al., 2013)。これらの 5'末端と 3'末端の NC 領域は、部分的な相補性によってパンハンドル構造を形成する。このユニークな構造は、mRNA の転写促進の土台となり、ゲノム複製およびゲノムパッケージングにおいて極めて重要な

役割を果たす (Desselberger et al., 1980; Lee & Seong, 1998; Zheng et al., 1996)。さらに、C 型および D 型インフルエンザウイルスの各ゲノム分節の 5'末端におけるウリジンリッチ領域は、各 mRNA の 3'末端に付加されるポリ A テイルの鋳型として機能する (Desselberger et al., 1980)。

D 型インフルエンザウイルスのタンパク質

C 型および D 型インフルエンザウイルスの各タンパク質の機能の詳細はわかっていない部分が多いが、研究が蓄積されている A 型インフルエンザウイルスにおける知見からそれら機能の推測がなされている (Te Velhuis & Fodor, 2016)。ゲノム分節の大きいサイズ順に、第 1 から第 3 分節はそれぞれ PB2、PB1、および P3 タンパク質を産生し、ウイルス RNA (vRNA) の複製および mRNA 転写を行うヘテロ三量体ポリメラーゼ複合体を構成する。PB1 タンパク質はポリメラーゼ活性部位を、PB2 タンパク質はキャップスナッチングによる転写の開始に必要なキャップ結合領域を、P3 タンパク質はエンドヌクレアーゼ活性部位をそれぞれ有している。P3 タンパク質のエンドヌクレアーゼ活性部位は、D 型インフルエンザウイルスと他の型のウイルスとの間で共通である。D 型インフルエンザウイルスの P3 タンパク質の予測等電点は 6.2 で、A 型および B 型インフルエンザウイルスの PA タンパク質の等電点 (7.2) と C 型インフルエンザウイルスの P3 タンパク質の等電点 (5.2) の間にある (Hause et al., 2013)。第 4 分節からは、ウイルスエンベロープ上の唯一のスパ

イク糖タンパク質である HEF タンパク質が合成される。HEF タンパク質は、C 型インフルエンザウイルスの受容体としても知られている 9-O-アセチル化シアル酸を介して細胞表面に結合する (Song et al., 2016)。第 5 分節は、NP タンパク質を生成し、ウイルス RNA ポリメラーゼ複合体 (PB2、PB1、P3) および vRNA と共にウイルスリボヌクレオタンパク質複合体 (vRNPs) を形成する (Noda & Kawaoka, 2010)。第 6 分節の mRNA はスプライシングされた場合、エンベロープを裏打ちする M1 タンパク質が翻訳される。一方、非スプライシング mRNA からはシグナルペプチドを持った前駆体タンパク質 p42 が翻訳され、その後切断されることで、膜貫通型イオンチャネルである M2 タンパク質が生成される (Hongo et al., 1999; Kesinger et al., 2018)。第 7 分節には、NS1 タンパク質とスプライシングにより転写・翻訳される NS2/NEP タンパク質がコードされている。NS1 タンパク質は、宿主における免疫抑制に関与し、NS2/NEP タンパク質は vRNP の核外輸送に関与する (Krug, 2015; Paterson & Fodor, 2012)。M および NS 分節にコードされているそれぞれ 2 種類のタンパク質の機能解析は、各々のタンパク質あるいはそれらの変異体を発現させ、その性状を評価するといった方法論によるが、これらの手法は他のウイルスタンパク質との相互作用等の因子が含まれない条件下での結果のみを示すものである。精密な解析にはリバースジェネティクスにより変異体を作製し、その表現系を解析する手法が望まれるが、通常のゲノム分節では一方のタンパク質に変異を加えた場合もう片方のタンパク質にも変異が生じてしまうため、M1/M2 タンパク質や NS1/NS2 タンパク質の機能を個別に解析することは困

難である。

ウシ呼吸器病症状候群

D 型インフルエンザウイルスは、ウシ呼吸器病症状候群（bovine respiratory disease complex:BRDC）の原因ウイルスのひとつである（Mitra et al., 2016; Ng et al., 2015）。BRDC は、肥育牛における罹患率と死亡率が高く、アメリカにおけるウシの死亡頭数の 40%以上を占め、深刻な経済的損失を引き起こしている（Hilton, 2014）。BRDC の発生機序としては、まず輸送、群編成、その他環境要因による牛へのストレス感作後、ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス、RS ウイルス、牛パラインフルエンザウイルス 3 型、牛ウイルス性下痢ウイルスなどの呼吸器ウイルスによる一次感染が引き金になる（Martin & Bohac, 1986）。ウイルス感染により気道の抗病性が低下すると鼻腔内で病原性のマンヘミア・ヘモリチカ（*Mannheimia haemolytica*:Mh）が増殖する（Murray et al., 2017）。この Mh が吸気によって肺に移動し、ロイコトキシンを産生することで、肺組織が損傷を受ける（Confer & Ayalew, 2018）。さらにパスツレラ・マルトシダ（*Pasteurella multocida*）、ヒストフィリス・ソムニ（*Histophilus somni*）、アルカノバクテリウム・ピオゲネス（*Arcanobacterium pyogenes*）などの二次および三次的細菌感染が生じることで増悪化し、結果として複雑な混合感染による呼吸器疾病が成立するとされている（Panciera & Confer, 2010）。この BRDC を制御するために、いくつかの既知の原因ウイルスや細菌に対する混合ワクチンが採用されている

が、その有効性は限られている (Fulton, 2009; Hilton, 2014; Theurer et al., 2015)。効果が限定的であることの理由の 1 つに、ワクチンの対象になっていない他の呼吸器病ウイルスが BRDC 発生に関与している可能性があげられる。最近のメタゲノム解析では、BRDC 罹患牛の多くに D 型インフルエンザウイルスが検出されている (Mitra et al., 2016)。したがって、D 型インフルエンザウイルスのワクチンの開発とその利用により、BRDC が制御できる可能性がある。アメリカの研究グループが、D 型インフルエンザウイルス粒子を β -プロピオラクトンで不活化した試作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 (Hause et al., 2017)。したがって、高い効果をもつ感染防御免疫を効率良く誘導するためには、血中への IgG 抗体の誘導にとどまる不活化ワクチンよりも、上部気道に分泌する IgA 抗体を誘導可能な弱毒生ワクチンが必要である。しかし、現在まで D 型インフルエンザウイルスの弱毒株の分離、あるいはウイルスを弱毒化するアミノ酸変異等に関する知見は報告されていない。

リバーシジェネティクス法

リバーシジェネティクス法は、ウイルスのゲノム配列を基にして組換えウイルスを生成する手法であり、任意の変異ウイルスや遺伝子交雑体が作出できる。したがって、この手法は、ウイルス学的基礎研究のみならず、抗ウイルス戦略にアプローチする応用研究にも重要な技術になる。インフルエンザウイルスのリバーシジェネティクスとしては、初期にはヘル

パーウイルスを用いる方法が考案されたが (Enami et al., 1990)、現在ではプラスミドベースのリバースジェネティクス法が主流になっている (Engelhardt, 2013)。A、B、およびC型インフルエンザウイルスのリバースジェネティクスでは、vRNA を細胞内で合成するためにヒト RNA ポリメラーゼ I (PolI) プロモーターおよびマウス PolI ターミネーターを搭載したプラスミド (図 5) と、ウイルス RNA ポリメラーゼタンパク質 (PB2、PB1、および PA/P3) および NP タンパク質を発現するプラスミドを用いる RNA pol I システムが確立された (図 6) (Crescenzo-Chaigne & van der Werf, 2007; Fodor et al., 1999; Jackson et al., 2002; Muraki et al., 2007; Neumann et al., 1999)。これらのプラスミドをトランスフェクトしたヒト細胞内では、全ての vRNA およびウイルス RNA ポリメラーゼが合成される。ウイルス RNA ポリメラーゼは複合体を形成し、それぞれの vRNA のプロモーター領域に結合することで、vRNA 複製反応が進むとともに、誘導された mRNA 転写反応によりすべてのウイルスタンパク質が発現される。その結果、vRNA で形成されるリボヌクレオプロテイン複合体と合成されたウイルス構造タンパク質が細胞膜直下で組合わさることで感染性の組換えウイルスが作出される。この他に、vRNA 合成用の RNA pol I プロモーター配列および mRNA 合成用の RNA polII プロモーター配列を向かい合わせて搭載したプラスミドを用いることで、1 つのウイルス cDNA テンプレートから vRNA と mRNA の両方を同時に合成する Dual-pol システムも報告されている (Hoffmann et al., 2000; Hoffmann et al., 2002; Pachler et al., 2010)。また、合成された vRNA 分節の末端を正確に自己切断するようなり

ボザイムを利用する方法なども報告されている (de Wit et al., 2007)。

A、B、および C 型インフルエンザウイルスのリバーシジェネティクスがすでに報告されている一方で、新規のインフルエンザウイルスである 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は確立されていない。このシステムの確立は、D 型インフルエンザウイルスの分子学的性状の解析などの詳細な基礎研究を可能にするだけでなく、組換えワクチン株の樹立等、疾病管理の改善につながる応用研究にも貢献するものである。新たな BRDC 対策を講じるためにも、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の開発とそれを用いたウイルス学的性状の解析、特にワクチン開発に有用な、ウイルス弱毒化に関する知見の探索は急務である。そこで本研究の第 1 章では、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の確立を目的とし、他の型のインフルエンザウイルスのリバーシジェネティクスでも利用されている RNA pol I システムのプラスミドの構築とウイルス作出実験を行った。第 2 章および第 3 章の研究内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表出来ない。5 年以内に出版予定。

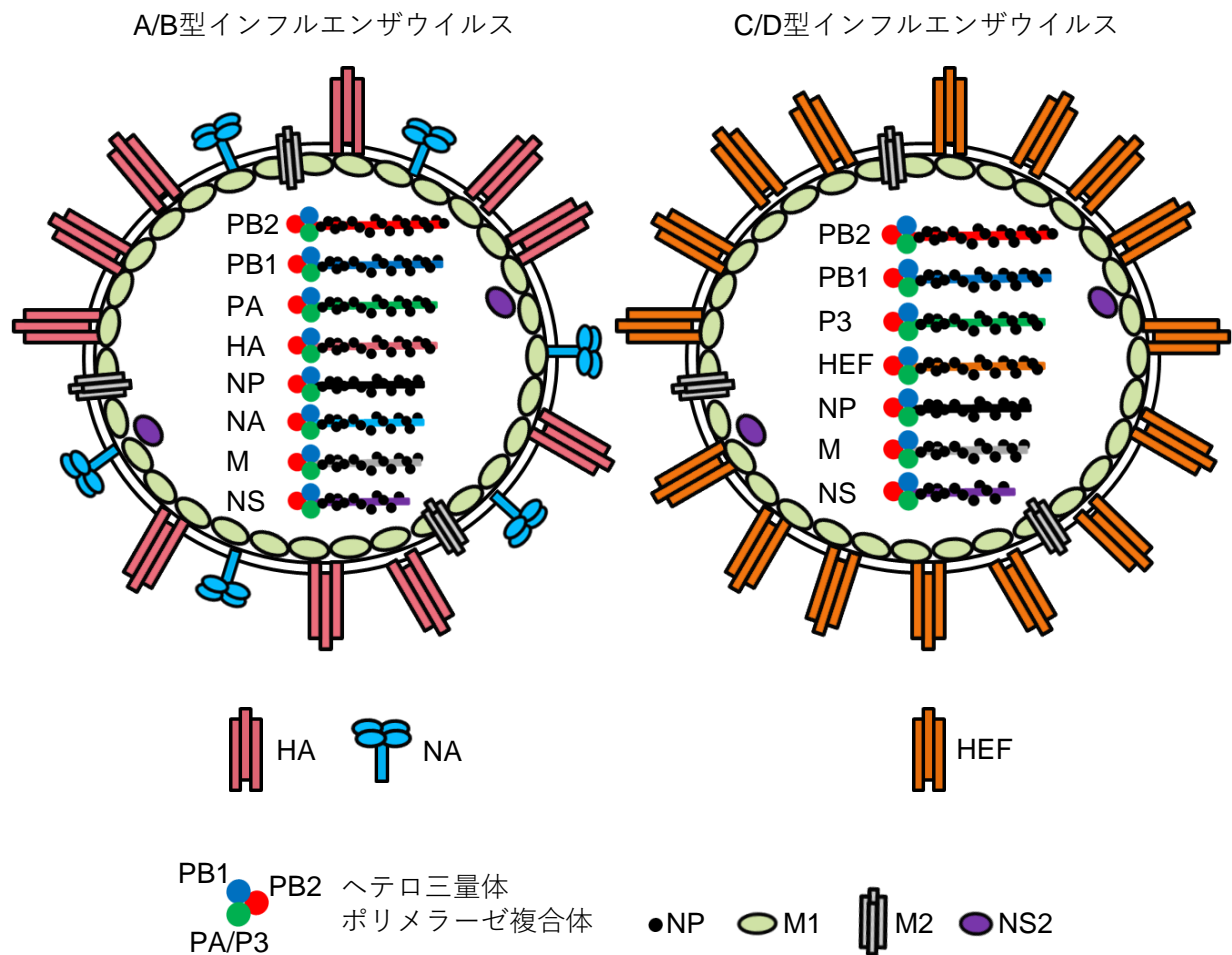


図1 各インフルエンザウイルスの模式図

ウイルス粒子はエンベロープに包まれており、M1タンパク質はエンベロープを裏打ちしている。M2タンパク質は膜貫通型イオンチャネルとして少量存在している。AおよびB型インフルエンザウイルスでは、HAおよびNAタンパク質が、CおよびD型インフルエンザウイルスではHEFタンパク質がエンベロープを貫通しスパイク構造を形成している。ゲノムRNAは、AおよびB型インフルエンザウイルスでは8本、CおよびD型インフルエンザウイルスでは7本の分節に分かれ、NPおよびポリメラーゼ複合体（PB2、PB1およびP3タンパク質）と共にリボヌクレオタンパク質複合体（vRNPs）を形成する。

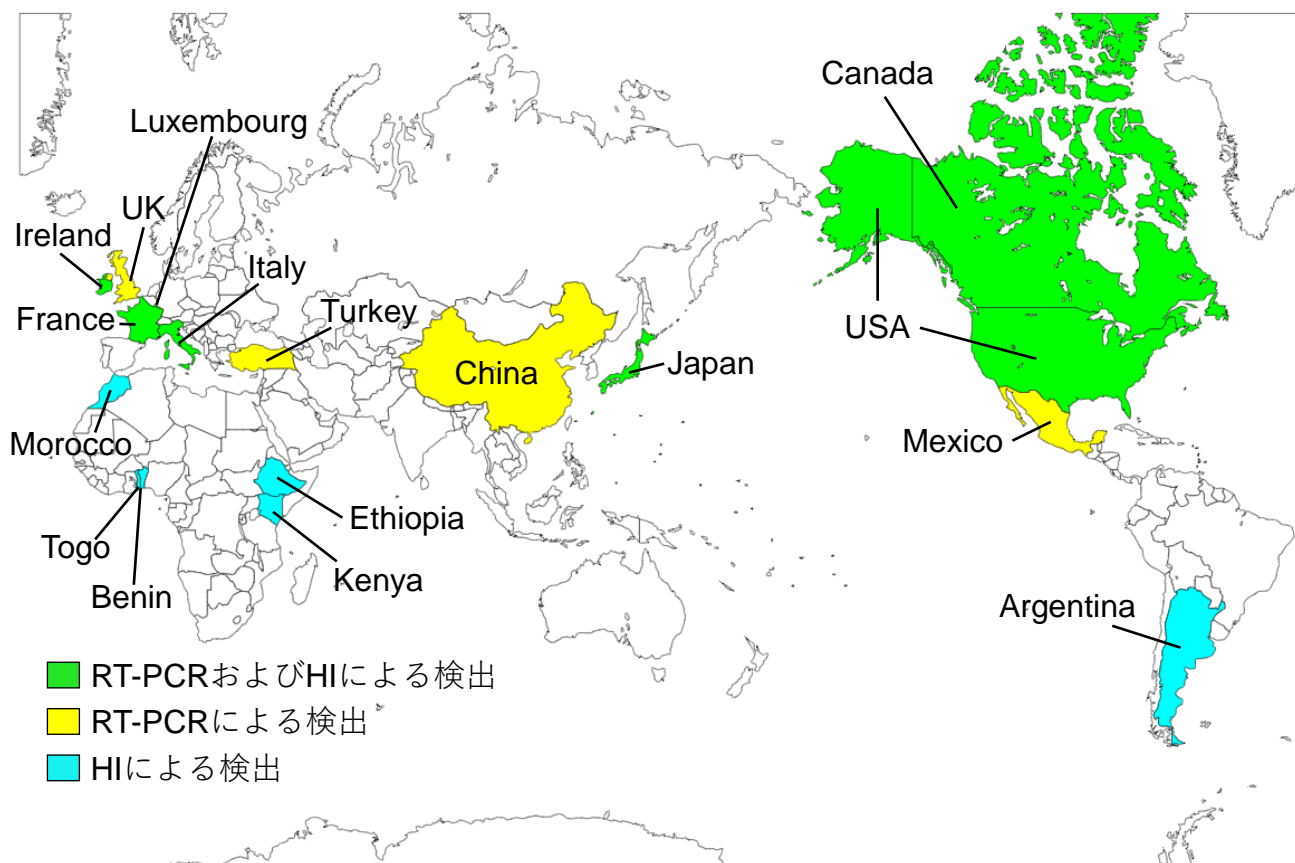


図2 D型インフルエンザウイルスの存在が確認されている国々

D型インフルエンザウイルスの存在が確認されている国々を示す。D型インフルエンザウイルスのRNAがRT-PCRにより検出されている国は黄色、抗D型インフルエンザウイルス抗体がHI試験により検出されている国は水色、両者の方法で検出されている国は緑色で示した。

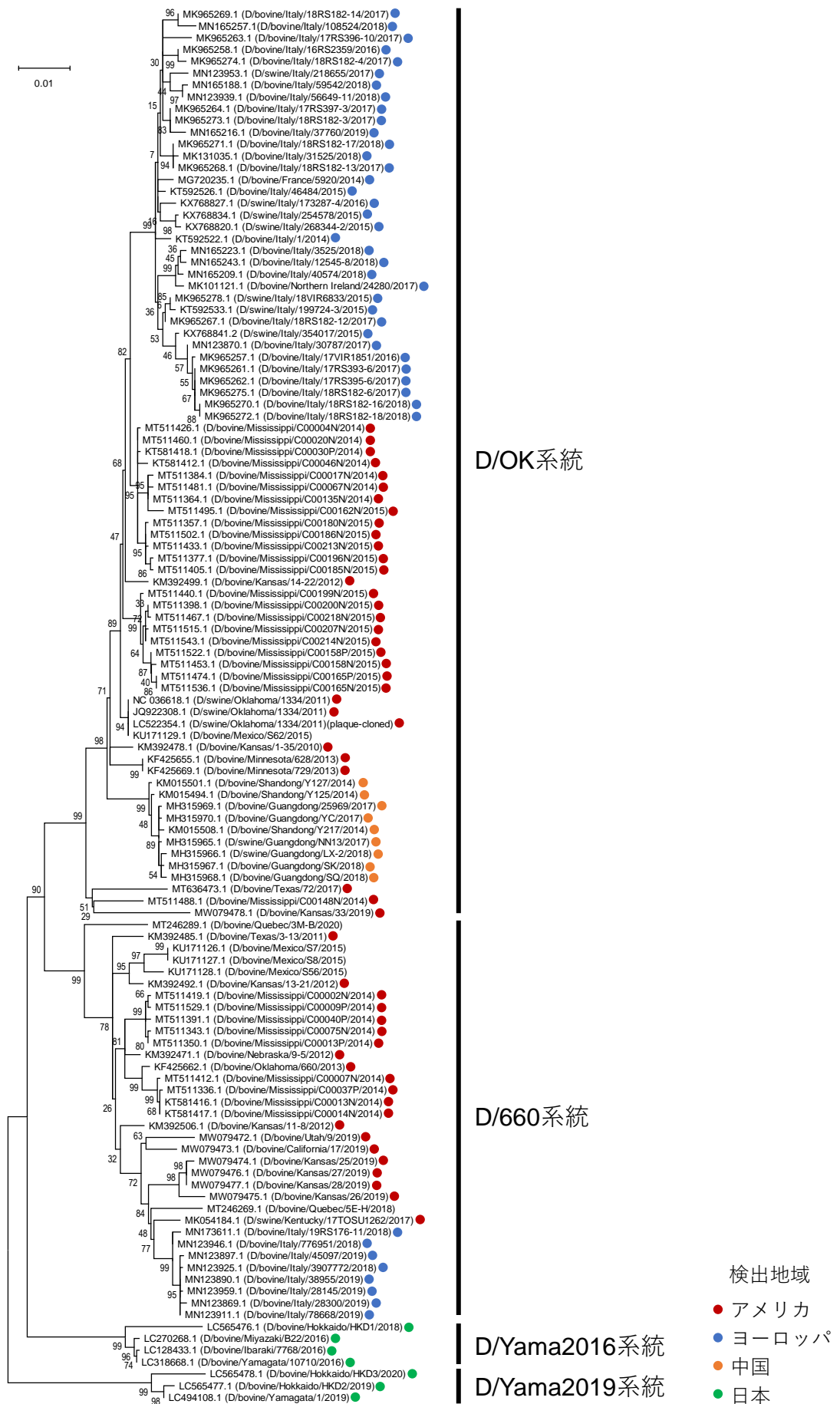


図3 D型インフルエンザウイルスのHEFに関する系統樹

MEGA Xを用い、最尤法 (1000bs) により推定。GenBankに登録されている118個のHEFのシーケンスデータを用いた。

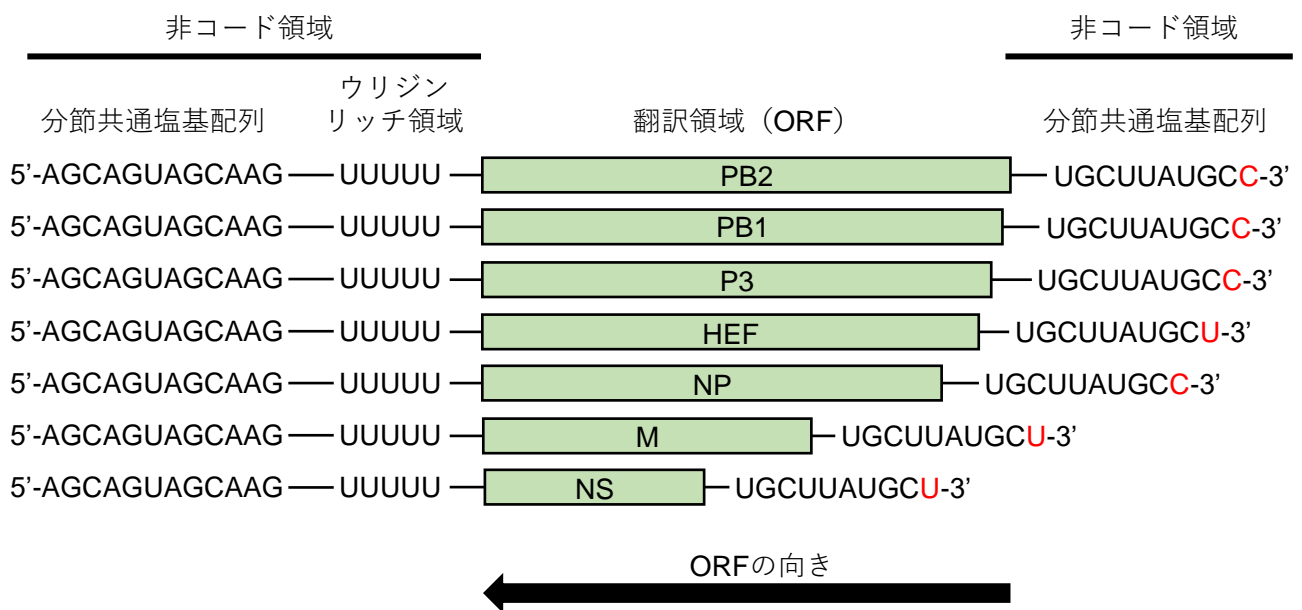


図4 D型インフルエンザウイルスのゲノム構造の模式図

D型インフルエンザウイルスはゲノムとしてマイナス鎖のRNAを7分節保有している。図は各ゲノム分節の模式図を示す。これまでのD型ウイルスの研究では、HEF、M、NS分節の3'最末端塩基はウラシルであるが、PB2、PB1、P3、およびNP分節の3'末端塩基は5'末端塩基のアデニンと相補しないシトシンであると報告されていた (Hause et al., 2013)。

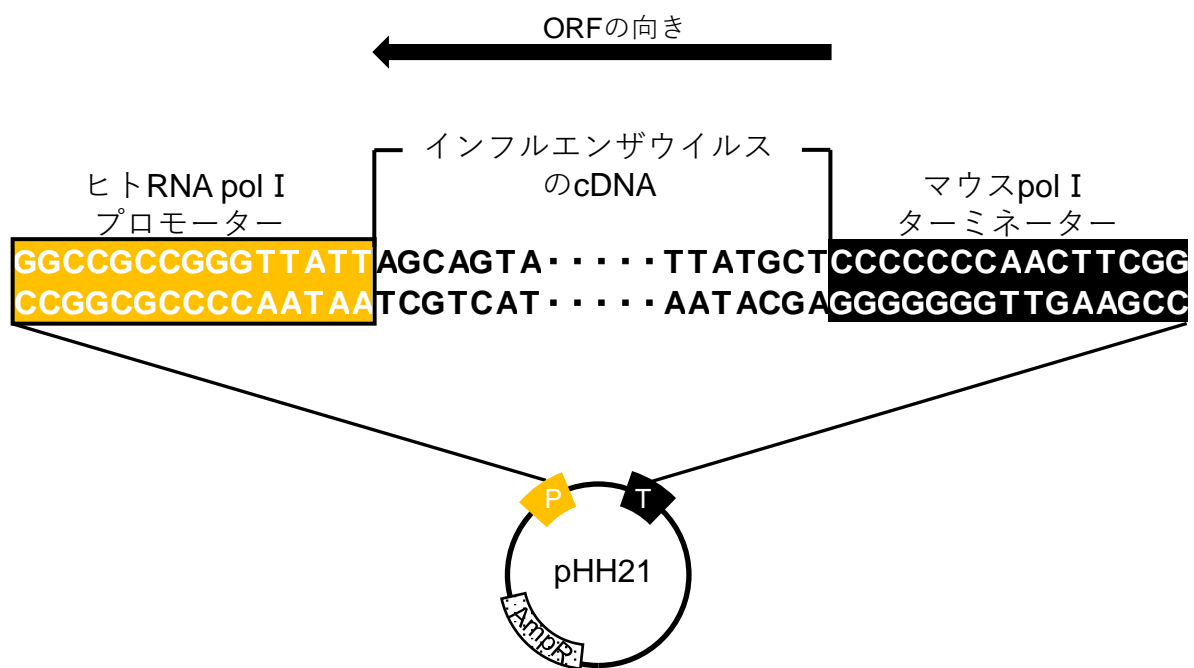


図5 pHH21の概略図

A型インフルエンザウイルスのリバーシジェネティクスで用いられているRNA pol I システムのプラスミドベクターpHH21の概略図を示す (Neumann et al., 1999)。インフルエンザウイルスのcDNAは、ヒトRNA pol I プロモーターに対してORFが逆向きになるようにクローニングされる。形質転換した大腸菌の選別にはアンピシリン耐性遺伝子 (AmpR) が用いられる。

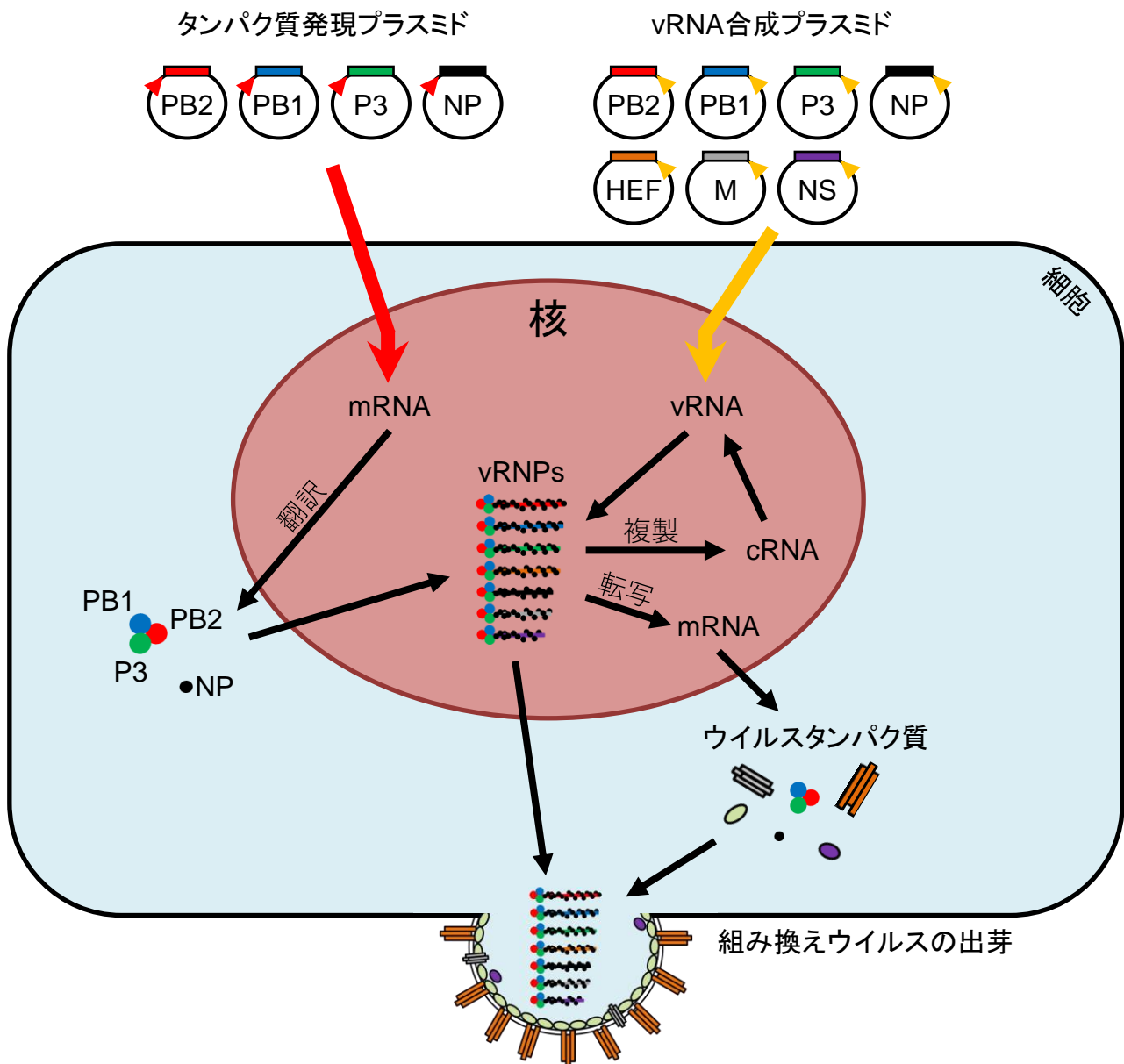


図6 C型インフルエンザウイルスのリバースジェネティクスの原理

vRNAを細胞内で合成する7つのプラスミドと、ウイルスポリメラーゼタンパク質（PB2、PB1、およびPA/P3）およびNPタンパク質を発現するプラスミドを用いるRNA pol I システムのリバースジェネティクスの模式図を示す。これらのプラスミドをトランスフェクトしたヒト細胞内では、全てのvRNAおよびウイルスRNAポリメラーゼが合成される。ウイルスRNAポリメラーゼは複合体を形成し、vRNA複製反応が進むとともに、誘導されたmRNA転写反応によりすべてのウイルスタンパク質が発現される。その結果、vRNAで形成されるリボヌクレオプロテイン複合体（vRNPs）と合成されたウイルス構造タンパク質が細胞膜直下で組合わさることで感染性の組換えウイルスが作出される。

第 1 章

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の開発

要旨

2011 年にアメリカではじめて発見された D 型インフルエンザウイルスは、その後の疫学調査によって畜産業界における経済損失が最も大きいウシ呼吸器病症候群の主要因ウイルスであることがわかった。したがって、その疾病対策のためには詳細なウイルス学的性状解析が重要である。本章では、D 型インフルエンザウイルスの性状解析を行う方法として有用なツールになるリバースジェネティクス法の開発と改良を行った。まず、7 分節のゲノム RNA の 3'末端のヌクレオチドが、他の研究グループの報告と異なり、すべて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 を発現する 7 種類のプラスミドを 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、作出した組換えウイルスの増殖性は、野生型インフルエンザ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、および 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 分節発現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、野生型インフルエンザ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。本研究により、D 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基礎的な解析が可能となった。

背景と目的

D 型インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科のウイルスであり、2011 年にアメリカのオクラホマ州で呼吸器症状を呈するブタからはじめて分離された (Hause et al., 2013)。その後の疫学調査で、ウシにおける血清抗体の陽性率が高く、D 型インフルエンザウイルスの本来の宿主であることが明らかにされた (Ferguson et al., 2015; Hause et al., 2014)。さらに、畜産業界における経済損失が最も大きいウシ呼吸器病症候群 (BRDC) の主要因ウイルスであることがわかったため、その詳細なウイルス学的性状の解析が求められている (Mitra et al., 2016)。

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、ウイルスの分子生物学解析のみならず組換えワクチンウイルスの作出等の疾病管理の方法を開発する上においても必要不可欠な技術である。A、B、および C 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はすでに報告されているが、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は確立されていない (Crescenzo-Chaigne & van der Werf, 2007; Fodor et al., 1999; Hoffmann et al., 2000; Hoffmann et al., 2002; Muraki et al., 2007; Neumann et al., 1999)。A、B、および C 型インフルエンザウイルスのリバーシジェネティクスでは、ウイルス RNA (vRNA) を細胞内で発現するために RNA ポリメラーゼ I (PolI) プロモーターおよびターミネーターを用いたプラスミドを構築し、それらをウイルスポリメ

ラーゼタンパク質 (PB2、PB1、PA/P3) および核タンパク質 NP を発現するプラスミドと共に培養細胞にトランスフェクトすることで、組換えウイルスが作出される (Jackson et al., 2002; Muraki et al., 2007; Neumann et al., 1999)。この他に、向かい合わせた RNA PolII および RNA ポリメラーゼ II (PolII) プロモーターの間にウイルス cDNA を挿入したプラスミドを構築することで、1 つのウイルス cDNA テンプレートから vRNA と mRNA の両方を合成する方法や (E Hoffmann et al., 2000; Erich Hoffmann et al., 2002; Pachler et al., 2010)、ゲノム分節の末端を正確に自己切断するようなりボザイムを用いる方法などが報告されている (de Wit et al., 2007)。本章では、他の型のインフルエンザウイルスのリバーシジェネティクス法でも利用されている RNA PolII システムを活用し、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を目的とした。

材料と方法

細胞とウイルス

ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞、ヒト直腸腫瘍由来 HRT-18G 細胞、およびブタ精巢 ST 細胞は、10%牛胎児血清 (FBS) 添加ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて、37°C の CO₂ インキュベーターで培養、継代した。使用したウイルスのうち、D/swine/Oklahoma/1334/2011 (D/OK) および D/bovine/Nebraska/9-5/2012 は、カンザス州立大学の B. Hause 博士から分与を受けた。また、私たちの研究室が以前に分離した D/bovine/Yamagata/10710/2016 も使用した。これらの D 型インフルエンザウイルスは、0.5 μ g/mL の TPCK-トリプシンを加えた 0.3%BSA 入りイーグル最小必須培地 (MEM) を用いて ST 細胞で増殖させたものを用意し、使用時まで-80°Cで保存した。組換え D 型インフルエンザウイルスを伴う実験は、大臣確認を受けた後に実施した (確認番号: 28 受文科振第 422 号)。

リバーシジェネティクス用プラスミド

vRNA は、ISOGEN-LS (Nippon Gene) を用いて D 型インフルエンザウイルス感染 ST 細胞の培養上清から抽出した。抽出した vRNA は PrimeScript (Takara Bio) を用いて逆転写し、得られた cDNA を PCR によって増幅した。PCR には、プラスミドベクター pHH21

のクローニング部位と重複する 15 塩基を含む各ゲノム分節特異的プライマーセットを用いた (Neumann et al., 1999)。PCR 増幅産物は、FastGene Gel/PCR extraction kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) で精製した後、Gibson assembly master mix (New England BioLabs Japan) を用いて BsmBI 処理 pHH21 にクローニングすることで、pPol-D/OK-PB2、-PB1、-P3、-HEF、-NP、-M、および -NS を構築した。また、vRNA の 3'末端のヌクレオチドをウラシルからシトシンに置換するプライマーを用いて、同様に PCR とクローニングを行うことで、pPolI-D/OK-PB2/C、-PB1/C、-P3/C、および -NP/C を構築した。一方、PB2、PB1、P3、および NP 分節の翻訳領域 (ORF) を pCAGGS のクローニング部位と重複する 15 塩基を含むプライマーを用いた PCR によって増幅した後、Gibson assembly master mix を用いて EcoRI・XhoI 処理 pCAGGS にクローニングすることで、pCAGGS-D/OK-PB2、-PB1、-P3、および -NP を構築した (Niwa et al., 1991)。

リバーシジェネティクス

7 種類の vRNA 合成プラスミドおよび 4 種類のウイルスタンパク質 (PB2、PB1、P3、および NP) 発現プラスミドをそれぞれ $0.2\mu\text{g}$ ずつ加えた Opti-MEM ($200\mu\text{L}$) にトランスフェクション試薬 PEI MAX ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Polysciences) を $11\mu\text{L}$ 混合し、室温で 20 分間インキュベートした。その後、混合液を 6 穴プレートに 60%コンフルエントで播種しておいた HRT-18G 細胞の培養上清に滴下し、 37°C でインキュベートした。トランスフェクシ

ンから 2 日後、培養上清を除去し、細胞を MEM で 2 回洗浄した後、 $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ TPCK-トリプシンを含む 0.3% BSA/MEM を 2mL 添加した。 37°C で 3 日間インキュベーションした後、回収した培養上清を MEM/BSA で 10 倍希釈し、 37°C で 1 時間、ST 細胞と吸着反応させた。感染細胞を MEM で 2 回洗浄した後、 $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ TPCK-トリプシンを含む 0.3% BSA/MEM を 2mL 加え、 37°C でインキュベートした。感染後 2~3 日で培養上清を回収し、ST 細胞を用いたプラークアッセイによりウイルス力価を測定した。ウイルスの作出が認められた感染細胞の培養上清を P1 ウイルスとしてストックし、増殖性等を解析する各実験に用いた。さらに、ST 細胞に再度感染させて得られた P2 ウイルスを精製し、尿素 PAGE およびノーザンブロット解析に使用した。

プラークアッセイ

12 穴プレート上の 100%コンフルエント ST 細胞を 0.3% BSA/MEM で 2 回洗浄後、 0.3% BSA/MEM で 10 倍段階希釈したウイルスをそれぞれ 0.1mL 接種し、 37°C で 1 時間インキュベートした。その後、細胞を 0.3% BSA/MEM で洗浄し、 1% Seakem GTG agarose (Lonza Japan) と $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ TPCK-トリプシンを含む 1mL の 0.3% BSA/MEM で覆い、 37°C で 3 日間培養した。培養後、 0.5mL の 30% ホルマリン・リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) を各ウェルに加え、一晩 4°C で固定した。ホルマリンとアガロース加培地を除去した後、細胞を PBS で洗浄し、室温 15 分間、 0.1% Triton X-100・PBS で透過処理をした。細胞をブロックエ

ース (KAC) でブロッキングした後、一次抗体として抗 D 型インフルエンザウイルス免疫マウス血清を 60 分間反応させた。続いて、ビオチン化抗マウス IgG 抗体 (#B7264;Sigma) を 30 分間反応させた後、 $4\mu\text{g/mL}$ のビオチン化ペルオキシダーゼ (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) と $8\mu\text{g/mL}$ のストレプトアビジン (富士フイルム和光純薬) から成る複合体を 30 分間インキュベートした。標識したプラークは、メーカーの指示に従い DAB peroxidase substrate kit (Vector Laboratories) によって染色した。

赤血球凝集 (HA) 試験

U 底 96 穴マイクロプレートを用い、PBS で感染細胞培養上清の 2 倍段階希釈液を調整した。各希釈液 $50\mu\text{L}$ を 0.7% 七面鳥赤血球 $50\mu\text{L}$ と混合し、室温で 30 分間インキュベート後に、赤血球凝集反応の有無を判定した。HA 価は、完全な凝集を示す最も高い希釈倍率の逆数として決定した。

5'および 3'RACE 法

ウイルスの cDNA の 5'および 3'末端の増幅は、5'/3'RACE kit (2nd Generation; Roche) を改良し、行った。まず、ISOGEN-LS を用いて精製ウイルス粒子から vRNA を抽出した。5'RACE の場合、抽出された RNA は、ゲノム分節特異的プライマーを用いて逆転写した。次に、得られた cDNA の 5'末端に、デオキシヌクレオチド転移酵素 (Roche) を用いてポリ

dA を付加させた。このポリ dA 付加 cDNA を、キットが提供するオリゴ d (T) アンカープライマー (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') の代わりに、私が設計したオリゴ dT アンカープライマー (5'-GACCACGCGTATCGCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') とゲノム分節特異的プライマーによる PCR およびゲノム分節特異プライマーとアンカープライマー (5'-GACCACGCGTATCGATCGCGAC-3') を用いた nested-PCR により増幅した。3'RACE の場合、大腸菌のポリ A ポリメラーゼ (NEB) を用いて、vRNA にポリ A を付加した。このポリ A 付加 RNA は、オリゴ dT アンカープライマーを用いて逆転写し、得られた cDNA をアンカープライマーおよびゲノム分節特異的プライマーを用いた PCR によって増幅した。各増幅産物は、3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies Japan) を用いて塩基配列を決定した。

ウイルス精製

ウイルスを含む ST 細胞の培養上清を低速遠心にかけて細胞残滓を取り除いた後、P19A ローター (Himac) を用い 4°C、40,000×g の超遠心分離によって濃縮した。濃縮したウイルスは PBS (-) に再懸濁し、P32ST ローター (Himac) を用いて 20%、30%、50%、および 60% のスクロース濃度勾配液に重層し、4°C 3 時間、110,000×g で超遠心した。ウイルスが含まれる 30% と 50% のスクロース勾配の界面領域を回収し、P32ST ローターを用いて

4°Cで3時間、110,000×gで再び超遠心分離した。精製されたウイルスのペレットは少量のPBS(-)中に懸濁した。

尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

miRNeasy mini kit (Qiagen) を用い、精製ウイルス粒子から RNA を抽出した。7M の尿素を含む 4%ポリアクリルアミドゲルを用い、100ng の vRNA を電気泳動した。次いで、SYBR Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen) でゲルを染色した。ゲルの撮影にはゲルイメージャー (Printgraph; ATTO) を用いた。

ノーザンブロット解析

ISOGEN あるいは ISOGEN-LS (Nippon Gene) を用いて、精製ウイルス、プラスミドをトランスフェクトした HRT-18G 細胞、またはウイルス感染 HRT-18G 細胞から vRNA を抽出した。ウイルス (10 ng) または細胞内 RNA (1 μg) は変性バッファー (50%のホルムアミドおよび 17.8%のホルマリンを含む 1%MOPS バッファー) 中で変性後、ホルムアルデヒド含有 1.5%変性アガロースゲルで分離し、分子量マーカー (BioDynamics Laboratory) と共にナイロン膜に転写した。biotin-11-UTP (Roche) と T7 RNA expression kit (Promega) を用い、PB2 (ヌクレオチド (nt) 15-1257)、PB1 (nt 26-1260)、P3 (nt 23-1038)、HEF (nt 27-1017)、NP (nt 28-954)、M (nt 29-1220)、NS (nt 29-868) 分節、および

18S rRNA それぞれに特異的なビオチン標識 RNA プローブを合成した。RNA 分節の検出には、ABC kit (Vector Laboratories) および DIG block and wash buffer set (Roche) をメーカーの指示に従って使用した。シグナルは Clarity ECL substrate (Bio-Rad) で検出し、プロット画像は Image Quant LAS 4000mini system (Fujifilm, Tokyo, Japan) によって撮影した。

結果

D 型インフルエンザウイルスのゲノム RNA 分節の 3'末端塩基配列の決定

すべてのインフルエンザウイルスは、各ゲノム分節の 5'と 3'末端領域にそれぞれほぼ相補的な配列を有する。特に、各分節の 5'および 3'最末端塩基は、それぞれアデニン (A) とウラシル (U) であり、A、B、および C 型インフルエンザウイルスでは保存されている。

しかし、これまでの D 型インフルエンザウイルスの研究では、HEF、M、NS 分節の 3'最末端塩基は U であるが、PB2、PB1、P3、および NP 分節の 3'末端塩基は、5'末端塩基の A と相補しないシトシン (C) であると報告されていた (Hause et al., 2013)。これらの報告

を確認するために、3' or 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を用い、

D/swine/Oklahoma/1334/2011 (D/OK) の各分節の 3'および 5'末端領域のシーケンス解析を行った。解析の結果、D 型インフルエンザウイルスの全ゲノム分節の 5'最末端塩基は

A であることが確認された (図 1-1)。しかし、これまでの報告とは異なり、D/OK の全ての

ゲノム分節の 3'末端塩基は U であることがわかった。また、10 個のプラークからそれぞれ

クローニングした D/OK-clone と他の二系統の D 型インフルエンザウイルス株

(D/bovine/Yamagata/10710/2016 と D/bovine/Nebraska/9-5/2012) を用いて同様な解析

を行ったところ、全てのゲノム分節の 3'末端塩基が U であることがわかった。これらのデ

ータは、他の型のインフルエンザウイルスと同様に、D 型インフルエンザウイルスにおいてもすべてのゲノム分節の 3'最末端配列が U であることを示している。

リバースジェネティクスによる組換え D/OK ウイルスの作出

D 型インフルエンザウイルスのリバースジェネティクスの開発に先立ち、ウイルスプラークからの生物学的クローニングにより得られた D/OK-clone のウイルス学的特性を解析した。D/OK-clone の増殖動態とプラーク表現型は、元の D/OK のものと類似していた (図 1-2,1-3)。D/OK-clone のシーケンス解析では、PB2 および P3 分節において同義置換が 2 つ確認され、PB2 分節の 204 番目アミノ酸で非同義置換 (アラニン→スレオニン) が確認された (表 1-1)。

D/OK-clone の 7 つのゲノム分節の cDNA を vRNA 合成用プラスミドにクローニングした (それぞれ pPolI-D/OK-PB2、-PB1、-P3、-HEF、-NP、-M、-NS と呼ぶ)。また、これまでの報告通り、3'最末端塩基に C を有する PB2、PB1、P3、および NP 分節の RNA 合成用プラスミドを作製した (それぞれ pPolI-D/OK-PB2/C、-P3/C、-NP/C と呼ぶ)。さらに、D/OK の PB2、PB1、P3、および NP タンパク質を発現する 4 種のプラスミドを構築した (それぞれ pCAGGS-PB2、-PB1、-P3、-NP と呼ぶ)。私は、これらの vRNA 発現プラスミドを二通りの組み合わせで、リバースジェネティクスに使用した。1 つ目の組み合わせは、pPolI-D/OK-PB2、-PB1、-P3、-HEF、-NP、-M、-NS で構成され、二つ目の組

わせは pPolI-D/OK-PB2/C、-PB1/C、-P3/C、-HEF、-NP/C、-M、-NS で構成される。

次に、各組合せの vRNA 発現プラスミドを $0.2\mu\text{g}$ ずつ、pCAGGS-PB2、PB1、P3、および NP と共に HRT-18G 細胞にトランスフェクトした。5 日間インキュベーションした後、培養上清を ST 細胞で継代し、さらに 2~3 日間インキュベートした。ウイルス作出の可否は、細胞変性効果 (CPE) の観察、および培養上清における HA 試験と RT-PCR により評価した。結果、1 つ目のプラスミドの組合せでウイルス (OK-RG) が作出できたが、2 つ目の組合せではウイルスは作出できなかった。作出された OK-RG のシーケンス解析を行った結果、すべてのゲノム分節の塩基配列に変異はなく、3'最末端塩基が設計通り U であることが確認された。また、逆転写酵素を含まないコントロール PCR では増幅が確認されず、トランスフェクション用プラスミドの混入はなかったことが確認された (図 1-4)。これらのデータは、すべての vRNA の 3'最末端配列塩基が U である場合に限り、リバーシジェネティクスを介して組換え D/OK ウイルスの作出に成功したことを示している。

次に、ST 細胞における D/OK-clone および OK-RG のウイルス増殖性を比較した (図 1-5)。驚くべきことに、二つのウイルスのゲノム配列が同一であったにもかかわらず、OK-RG の増殖性は D/OK-clone よりも 1,000~10,000 倍低かった。また、OK-RG は D/OK-clone よりも小さいプラークを示した (図 1-6)。次に、OK-RG を低い多重感染度 (MOI) で連続継代したところ、6 継代目の培養上清中に大きなプラークを示すウイルスの存在が確認された (図 1-7)。大きなプラークを示すこの継代ウイルスのシーケンス解析を行ったと

ころ、PB2 分節の 55 番目のアミノ酸で突然変異（メチオニン→イソロイシン）が確認された。しかし、この変異を含む組換えウイルス（rP6）をリバースジェネティクスによって作出したところ、rP6 は再び小さなプラークを示した。また、OK-RG が形成した小さなプラークからウイルスをクローニングしたが、大きなプラークを示すクローンを得ることはできなかった（図 1-8）。これらの知見から、作出された OK-RG ウイルス液内には、ウイルス増殖を阻害する未知の因子が存在することが示唆された。

作出したウイルス粒子内のゲノム RNA の解析

OK-RG の増殖が阻害される原因を探るために、まず、プラスミドをトランスフェクトした細胞における vRNA の発現性を確認した。トランスフェクトした細胞から vRNA を抽出し、ノーザンブロット解析により各 RNA 分節の含有量を調べたところ、各プラスミドは等量ずつトランスフェクションに使用されたにもかかわらず、細胞における vRNA 発現の発現量は各分節で異なっていた（図 1-9）。一方、D/OK-clone 感染細胞ではほぼ同量ずつの vRNA が検出された。

次に、D/OK-clone および OK-RG に取り込まれた vRNA 含有量をノーザンブロットにより解析した。組換えウイルスには、それぞれ独立した実験から得られた 3 つのウイルス（OK-RG-1、-2、-3）を用い、比較した（図 1-10）。興味深いことに、OK-RG 精製ウイルス粒子内の PB2、P3、NP 分節の RNA 量は、D/OK-clone 精製ウイルス粒子内より大きく

減少していたのに対し、HEF、M、NS 分節の RNA 量はその減少はわずかであった。一方、PB1 分節の RNA 量は、OK-RG と D/OK-clone でほぼ同等であった。これらの結果は、OK-RG ウイルス粒子内に取り込まれる各分節の vRNA 量が、トランスフェクトされた細胞内における vRNA 量を反映していないことを示唆している。

過去に私たちが行った研究では、7 分節（HA 分節欠損）の A 型インフルエンザウイルスを人工的に作出した際に、ウイルス粒子内に 8 分節目として 18S リボソーム RNA (rRNA) が取り込まれていた (Noda et al., 2018)。そのため、今回も同様に、組換えウイルス粒子内における 18S rRNA の存在を調べたところ、OK-RG ウイルス粒子中には 18S rRNA が含まれていること、さらにその量は D/OK-clone と比較して多いことが判明した (図 1-10)。これらのデータは、OK-RG 粒子内では、vRNA 分節と rRNA が偏って取り込まれていることを示している。この結果は、欠陥干渉粒子 (DI 粒子) のような非感染性粒子がリバーシジェネティクスによって多量に生成されてしまうことを示唆しており、これが OK-RG の増殖性の低下につながっていることが考えられた。この仮説を検証するために、ウイルス粒子内にパッケージ化された RNA 分節の含有量を一括して調べた。精製した OK-RG ウイルス粒子から vRNA を抽出し、尿素-PAGE を介して分離することで、D/OK-clone および OK-RG における vRNA 分節の含有割合を明らかにした (図 1-11)。P3 および NP 分節の vRNA 量は、D/OK-clone よりも OK-RG で少ない一方で、HEF 分節と同じくらいの大き

さに位置する 18S rRNA が、OK-RG 粒子内で多量に検出された。これらのデータは、OK-RG 粒子の形成過程において、vRNA 分節が不均等に取り込まれていることを示唆している。

リバーシジェネティクスによるウイルス作出条件の最適化

ノーザンブロット（図 1-10）と尿素-PAGE（図 1-11）の解析をもとに、各 vRNA 分節を均等にウイルス粒子内に取り込ませるために、リバーシジェネティクスにおけるトランスフェクション条件を再検討した。各 vRNA 合成用プラスミドまたは各タンパク質発現プラスミドの量を調整した 17 のトランスフェクション条件によるウイルス作出を試みた（表 1-2）。ウイルスは全ての条件下で作出されたが、そのほとんどのウイルスのプラークは D/OK-clone のプラークより小さかった（図 1-12）。しかし、#14 の条件下で作出されたウイルス（OK-RG/14）には、大きなプラークを形成するウイルスが多く含まれていた。そこで、この大きなプラークを分離し、ST 細胞に継代したストックウイルス（OK-RG/14p）を作製した。ST 細胞で OK-RG/14 および OK-RG/14p の増殖動態を評価したところ（図 1-13）、OK-RG/14p は、OK-RG/14 の約 10 倍高く、D/OK-clone と同等の力価で増殖し、OK-RG/14p が野生型 D/OK の増殖性状に類似していることが示唆された。また、OK-RG/14p の全ゲノムの塩基配列が、D/OK-clone のものと同一であることも確認した。加えて、親ウイルスの交差汚染の可能性を排除し、かつ#14 のトランスフェクション条件の最適性を確認するために、リバーシジェネティクスを用いて HEF 分節に新しい EcoRI 認識配列を導入す

ることにより、人工的な同義置換を有するウイルス（OK-EcoRI-RGs）を作出した。#12 から#17 の条件下でトランスフェクトを行った結果、#14 条件下で大きなプラーク示すウイルスが多く確認された（図 1-14）。さらに、作出したウイルスの HEF 分節の EcoRI 認識配列の存在も確認できた（図 1-15）。

次に、精製した OK-RG/14p 粒子内に取り込まれた vRNA 各分節量を評価した。ノーザンブロット解析では、OK-RG/14p 粒子内の vRNA 量の割合は D/OK-clone と類似しており、18S rRNA はほとんど検出されなかった（図 1-10）。尿素-PAGE では、OK-RG/14p 粒子においては PB2 および PB1 分節の RNA 量がやや多かったが、その他の RNA 分節の割合は D/OK-clone と類似していた（図 1-11）。同じ手順を用いて、Mock 感染細胞から調製した対照検体中には RNA は検出されなかった。これらの結果は、#14 のトランスフェクション条件では、RNA 分節のバランスのとれたウイルス粒子への取り込みが再現され、そのために OK-RG/14p が D/OK-clone と同様の増殖性を獲得することを示唆している。

考察

組換えウイルスの作出に用いられるリバーシジェネティクスは、インフルエンザウイルスのウイルス学的性状の解析だけでなく、組換えワクチンウイルスの作出など、抗ウイルス戦略の開発においても重要なツールとなる。本章では、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を確立した。

HEK293T 細胞はトランスフェクション効率が高く、また pCAGGS 骨格のプラスミドの複製に必要な T 抗原を発現していることから、ウイルスの作出に適している (Niwa et al., 1991)。そのため、これまでに報告されている A、B、および C 型インフルエンザウイルスのリバーシジェネティクスでは、HEK293T 細胞が利用されてきた (Jackson et al., 2002; Muraki et al., 2007; Neumann et al., 1999)。本研究でも、まずこの細胞株を利用した 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の開発を試みた。その結果、組換え D/OK ウイルスの作出は可能であったが、トランスフェクトされた細胞上清における HA 力価が高いにもかかわらず、その感染性ウイルスの力価 (PFU) は低く、また、組換えウイルスのプラークは親株より小さかった。これらのことから、トランスフェクトされた細胞上清中には非感染性粒子が多量に存在することが示唆された。そこで次に、D 型インフルエンザウイルスの分離に広く使用されている HRT-18G 細胞を用いたリバーシジェネティクスの開発を試みることにした (Hause et al., 2013)。この細胞株は、HEK293T 細胞よりト

ランスフェクション効率がかかなり低い、D 型インフルエンザウイルスの感染感受性が高い。その結果、作出された組換え D/OK ウイルスは、HEK293T 細胞から作出されたウイルスよりも高い PFU/HA 比を示した。これらの知見は、D 型インフルエンザウイルスのリバースジェネティクスで使用する細胞を選択する際、トランスフェクション効率よりも、ウイルス複製能への適性の方がより考慮すべき重要な要因であることを示唆している。したがって、D 型インフルエンザウイルスの本来の宿主であるウシ（あるいはブタ）細胞内で vRNA を合成するようなウシ(あるいはブタ)の RNA PolII 系プラスミドベクターの利用は、組換え D 型インフルエンザウイルスの作出効率を高めることができる可能性があり、その開発を計画している。

A、B、および C 型インフルエンザウイルスでは、それぞれ各 RNA 分節の 5'および 3'最末端塩基はそれぞれアデニン (A) およびウラシル (U) であり、これら 2 つのヌクレオチドを含む両末端領域の相補配列は、ウイルスリボヌクレオタンパク質 (RNP) のパンハンドル構造の形成と、これに続くウイルスゲノムの転写・複製プロモーター構造の形成に関与する (Desselberger et al., 1980; Lee & Seong, 1998; Zheng et al., 1996)。本章では、D/OK の PB2、PB1、P3、および NP 分節の 3'最末端塩基がシトシン (C) であるとするこれまでの報告とは異なり、D 型インフルエンザウイルスのすべての RNA 分節の 3'最末端塩基は U であることを明らかにした (Hause et al., 2013)。今回、3'最末端に C を含む RNA 分節を有する組換え D/OK を作出することはできなかったが、これは元の D/OK が RNA 分節の

3'最末端に C を有している可能性を排除するものではない。研究室におけるウイルスの継代により、すべての RNA 分節の 3'最末端に U を有する D/OK が選択された可能性がある。あるいは、過去に報告された 3'最末端の C は、RACE 法に起因する未知のアーティファクトである可能性もあるが、詳細な方法が記載されていないため判断が難しい。この疑問を解決するためには、他の D 型インフルエンザウイルス分離株における RNA 分節の 3'末端のシーケンス解析データを蓄積する必要がある。

本章では、トランスフェクションに用いる各 vRNA 合成用プラスミドおよび各タンパク質発現用プラスミドの量を微調整することにより、D 型インフルエンザウイルスのリバースジェネティクスの確立に成功した。この調整により、7 種類の vRNA 分節がウイルス粒子中へ適切に取り込まれるようになり、D/OK-clone と同等の増殖性を再現する組換え D/OK の作出が可能になった。興味深いことに、このような親株と同等な増殖性を示す組換え D/OK は、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で行われているような低 MOI による継代やプラークピッキングによる継代などの方法では獲得できなかった。このことから、一度、感染細胞内におけるゲノム分節の不均衡が生じてしまうと非感染性の干渉粒子が連続して生成されることが示唆される。これは、元の D/OK-clone と同一のゲノム配列を有するにもかかわらず、小さなプラークを示す組換え D/OK ウイルスが存在する原因になるかもしれない。この知見は、A 型インフルエンザウイルスと D 型インフルエンザウイルスの間には、粒子への RNA 分節の取り込み機構に本質的な違いがあることを示唆

している。インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングのモデルとしては、ランダム機構あるいは選択的機構の2つのモデルが提唱されている (Hutchinson et al., 2010)。これまで報告されている研究では、A 型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングは選択的機構である可能性が強く支持されている (Chou et al., 2012; Gerber et al., 2014; Hutchinson et al., 2010; Noda et al., 2006)。A 型および B 型インフルエンザウイルスでは、1 つの vRNP を中心に 7 つの vRNP が囲む「1+7」パターンで、ウイルス粒子内に 8 分節の vRNP が取り込まれている (Nakatsu et al., 2016; Noda et al., 2006, 2012)。驚くべきことに、HA 分節を欠損する 7 分節の A 型インフルエンザウイルスを人工的に作出すると、HA 分節の代わりとして rRNA がウイルス粒子内に取り込まれていた (Noda et al., 2018)。さらに興味深いことに、C 型および D 型インフルエンザウイルスは保有するゲノム分節数は 7 であるにも関わらず、ウイルス粒子内には「1+7」パターンの 8 つの vRNP が組み込まれていた (Nakatsu et al., 2018)。これらの知見は、型にかかわらずすべてのインフルエンザウイルスが 8 つの vRNP を粒子中に組み込む可能性を示しており、特に C 型および D 型インフルエンザウイルスにおいては、選択的パッケージング機構に加えて、未知のランダムパッケージング機構が存在していることを示唆している。実際に、A 型インフルエンザウイルスと C 型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構が異なっていることを裏付ける研究がいくつか報告されている。A 型インフルエンザウイルスでは、RNA 分節数が 7 以下のウイルス様粒子 (VLPs) を実験的に作出した場合、その作出効率が 8 種類の RNA 分

節を有する完全なウイルス粒子を作出した場合に比べて低かったのに対し（Fujii et al., 2003; Neumann et al., 2000）、C 型インフルエンザウイルスの実験では、1 つのゲノム分節のみを有する VLPs の方が、7 種類の RNA 分節を有する完全なウイルス粒子を作出するよりも効率良く産生された（Muraki et al., 2004; 2010）。また、等量の各プラスミドを使用するというトランスフェクション条件は、A 型インフルエンザウイルスのリバーシジェネティクスでは標準化されており、特に問題なく親株と同等の増殖性をもつ組換えウイルスが作出される。しかし、私の研究において、これと同様なトランスフェクション条件では作出された OK-RG 粒子内に vRNA 分節と rRNA が不均衡な比率で組み込まれることが示された。これらの知見は、A 型インフルエンザウイルスと D 型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構の相違を示すものである。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においては、ウイルス粒子中に取り込まれるゲノム分節量の不均衡を原因として、トランスフェクトされた細胞から上清へ非感染性粒子が大量に放出されることが、感染性粒子の産生量を妨げている可能性がある。8 分節（A 型と B 型）と 7 分節（C 型と D 型）のインフルエンザウイルスにおけるゲノムパッケージング機構の違いを解明するためには、さらなる研究が必要である。

結論として、本章では、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を世界で初めて確立した。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では、トランスフェクションの条件が作出されたウイルスの増殖効率に影

響を及ぼすと考えられるため、作出されたウイルスの特性を解析する際にはアーティファクトが生じていないかを注意深く確認することが重要である。本章で確立されたリバースジェネティクスは、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。これらの知見は、D 型インフルエンザウイルスの弱毒生ワクチンウイルスの作出を可能にし、BRDC に対する効果的な制御法の開発に貢献すると期待できる。

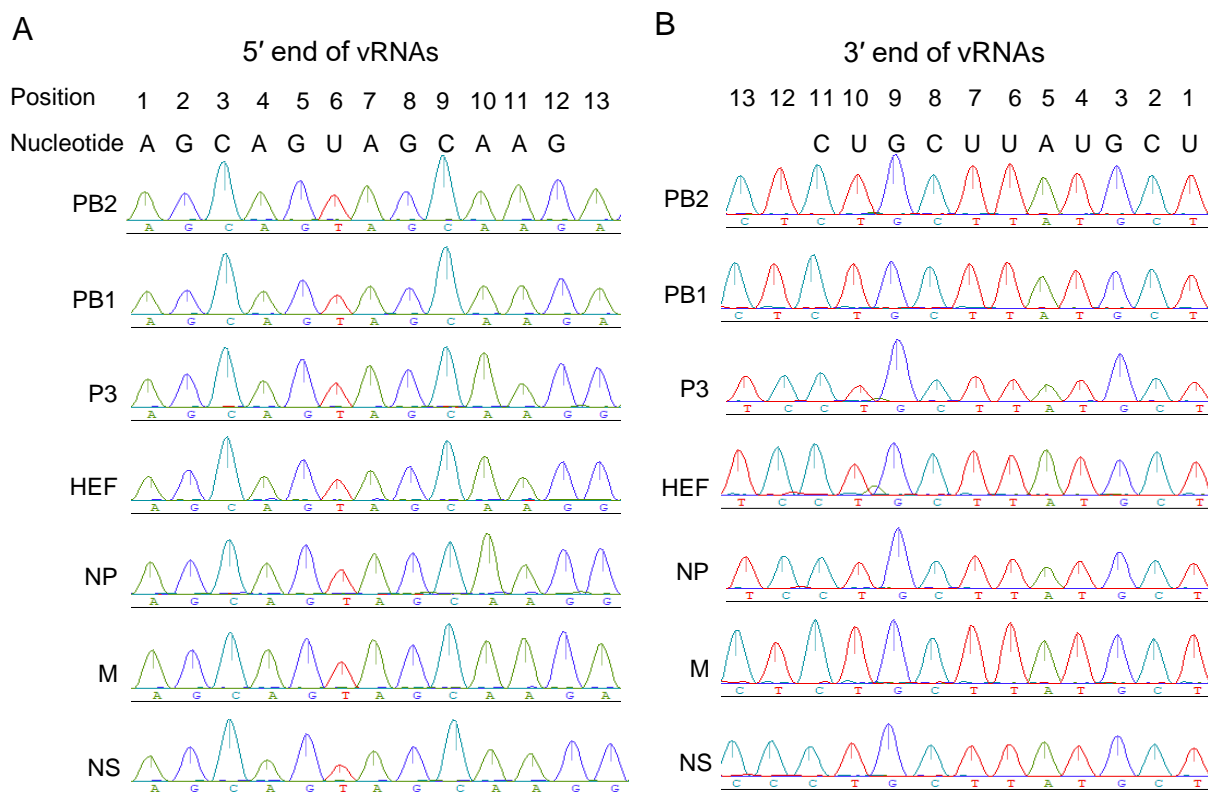


図1-1 D型インフルエンザウイルスのRNA分節の5'および3'末端領域の配列

5'および3'RACE法を用い、D/swine/Oklahoma/1334/2011 (D/OK)のRNA分節の両末端領域の塩基配列を決定した。(A) D/OKのRNA分節の5'末端領域におけるゲノムRNA配列を示し、Positionは5'末端からのヌクレオチドの位置を示す。(B) D/OKのRNA分節の3'末端領域におけるゲノムRNA配列を示し、Positionは3'末端からのヌクレオチドの位置を示す。

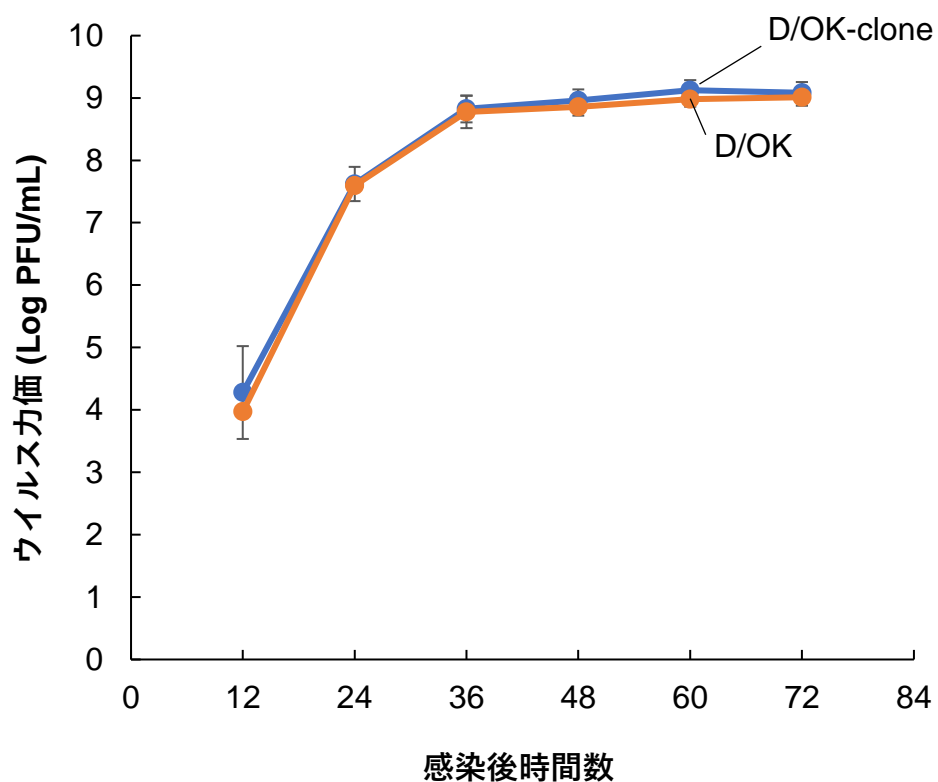


図1-2 クローン化したD/OKの増殖性の評価

クローン化したD/OK (D/OK-clone) の増殖動態をST細胞で調べた。D/OK-cloneとクローン元となったD/OKを、感染多重度 (MOI) 0.01で細胞に接種した。ウイルス力価は、プラークアッセイを用い感染後12時間間隔で測定した。グラフは標準偏差を有する平均力価を示した (n=3)。

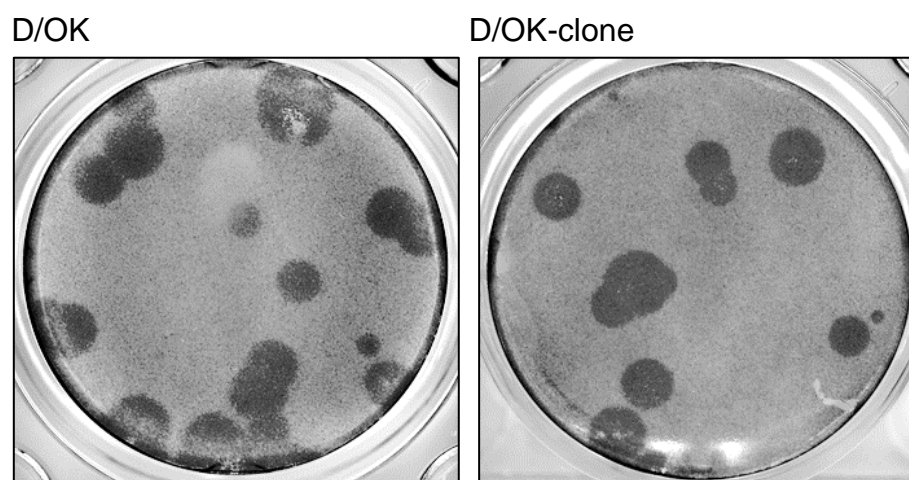


図1-3 D/OK-cloneのプラーク表現型

ST細胞におけるD/OK-cloneのプラーク表現型を示した。プラークは抗D/OKマウスポリクローナル抗体で免疫染色した。

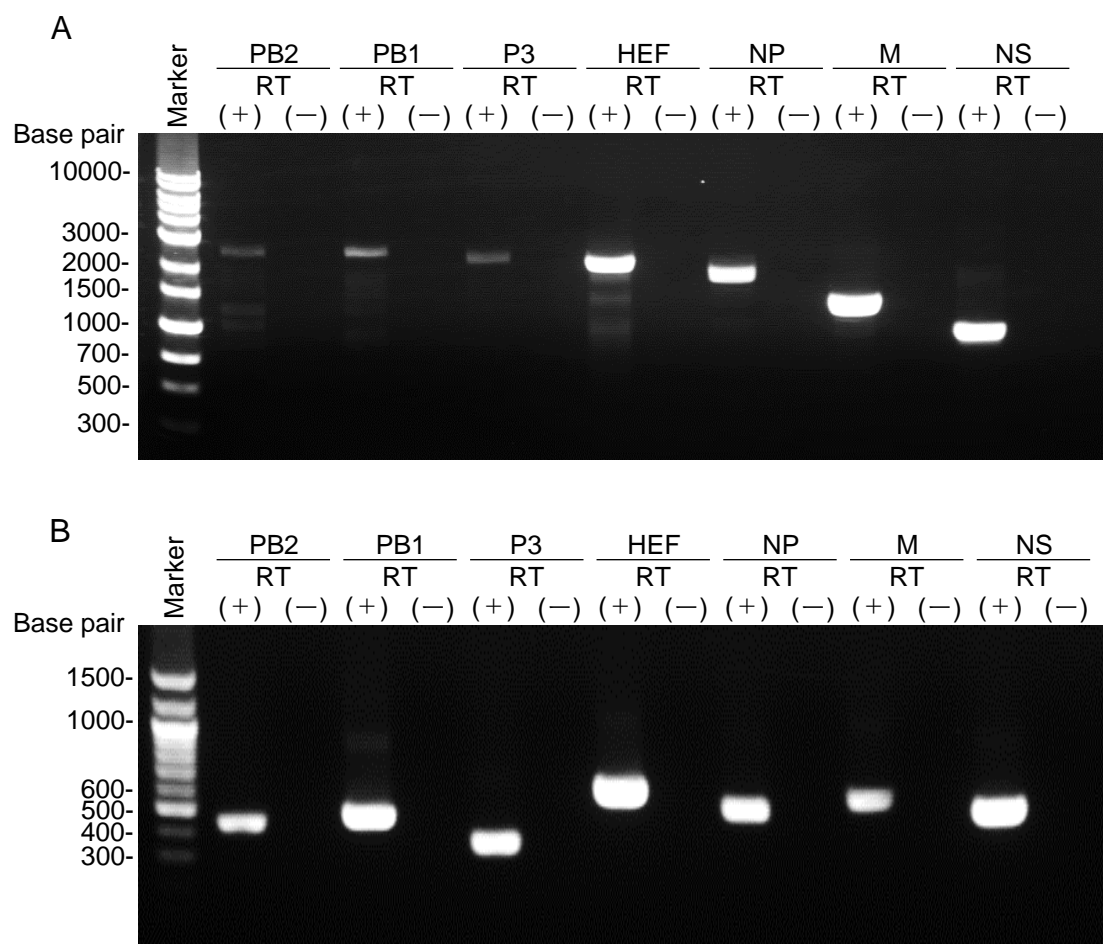


図1-4 D/OK-cloneウイルス液のRT-PCR

RNAは、トランスフェクト後の培養上清を継代したST細胞の培養上清から抽出した。RT-PCRは、(A) ゲノム分節の全長または(B) 各分節の一部を増幅する特異的なプライマーを用い、逆転写酵素(RT)の存在下(+)および非存在下(-)で実施した。PCRの増幅産物は1%アガロースゲルで電気泳動した。

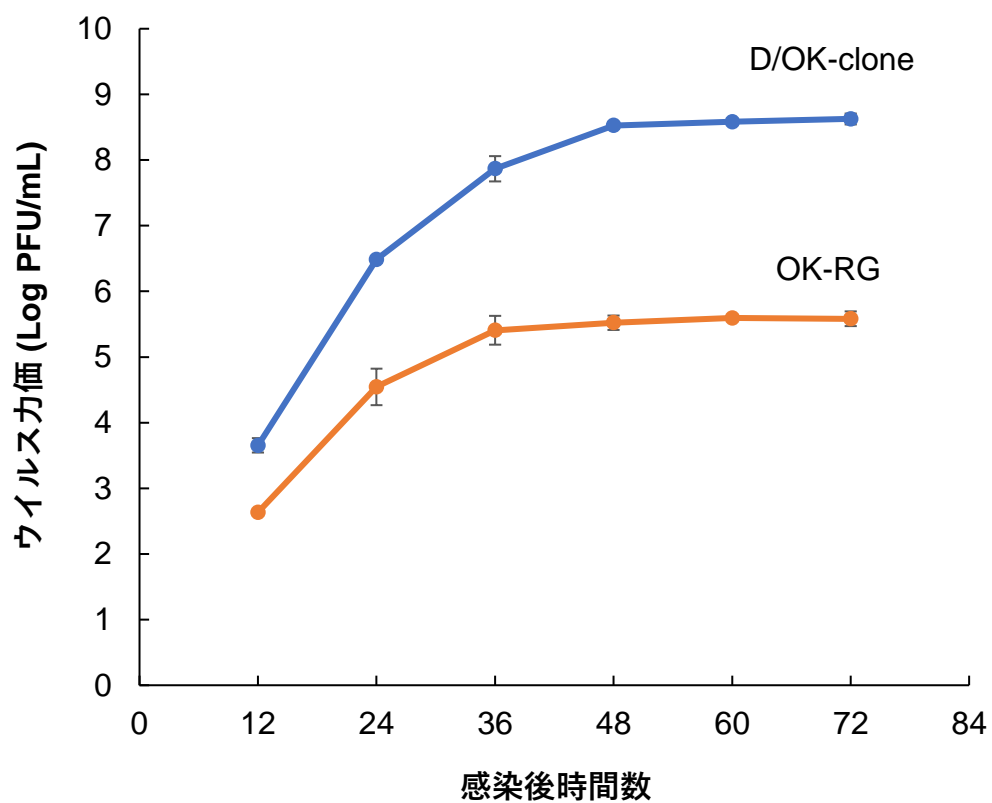


図1-5 作出した組み換えD/OKの増殖性の評価

リバーシジェネティクスにより作出された組換えD/OK (OK-RG) の増殖動態をST細胞で調べた。OK-RGとD/OK-cloneを、感染多重度 (MOI) 0.01で細胞に接種した。ウイルス力価は、プラークアッセイを用い感染後12時間間隔で測定した。グラフは標準偏差を有する平均力価を示した (n=3)。

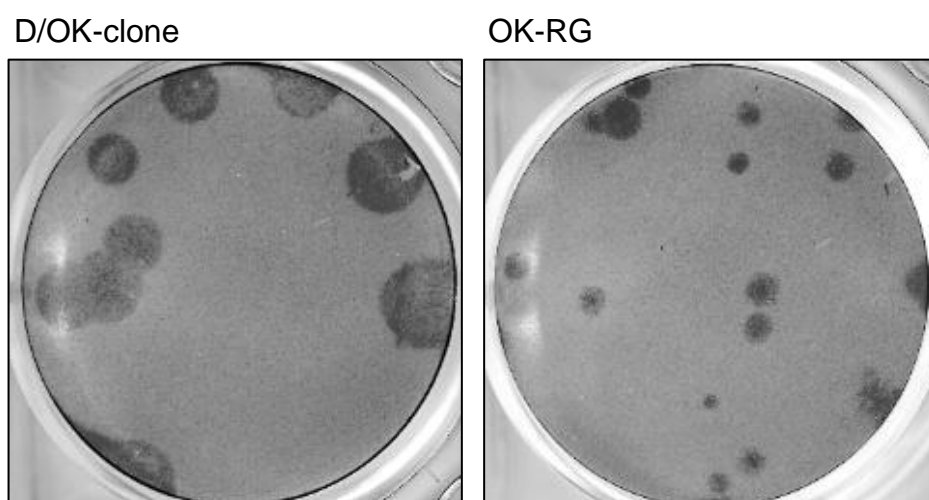


図1-6 OK-RGのプラーク表現型

ST細胞におけるOK-RGのプラーク表現型を示した。プラークは抗D/OKマウスポリクローナル抗体で免疫染色した。

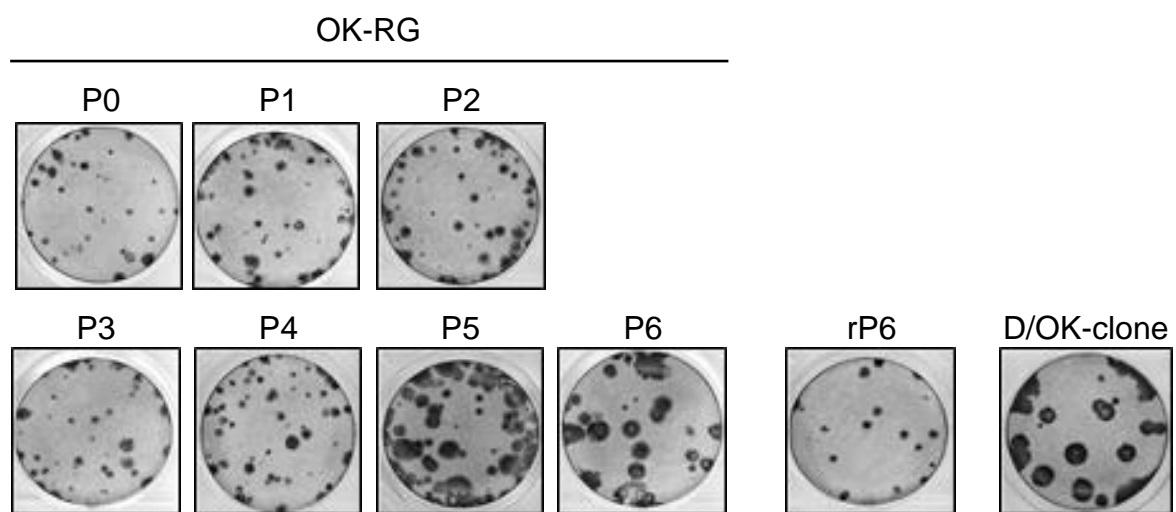


図1-7 OK-RGの連続継代とプラーク表現型

ST細胞上でOK-RGを連続継代し、得られた各ウイルス（P1-P6）のプラーク表現型の変化を示した。また、6継代目の培養上清からvRNAを抽出し、リバーシジェネティクスを用いて作出した6継代目D/OK（rP6）のプラーク表現型を示した。プラークは抗D/OKマウスポリクローナル抗体で免疫染色した。

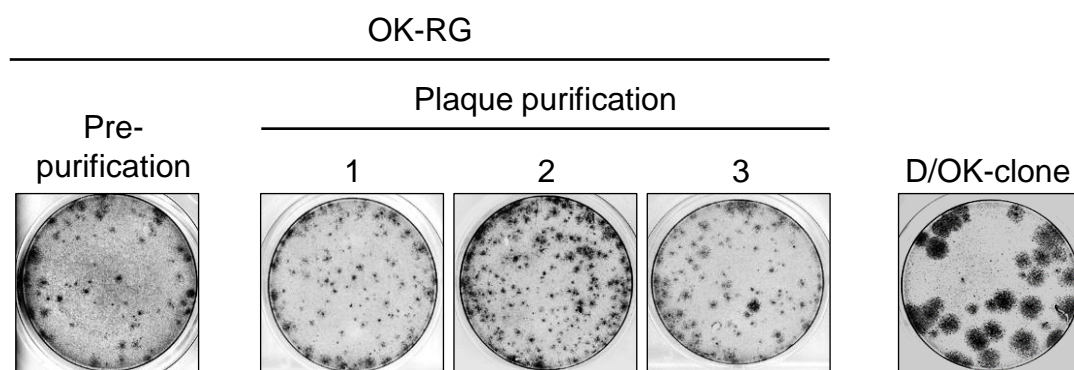


図1-8 OK-RGのプラークピッキングによる精製とプラーク表現型

OK-RGの3つのプラークをそれぞれピックし、ST細胞に継代して得られたウイルスのプラーク表現型を示した。プラークは抗D/OKマウスポリクローナル抗体で免疫染色した。

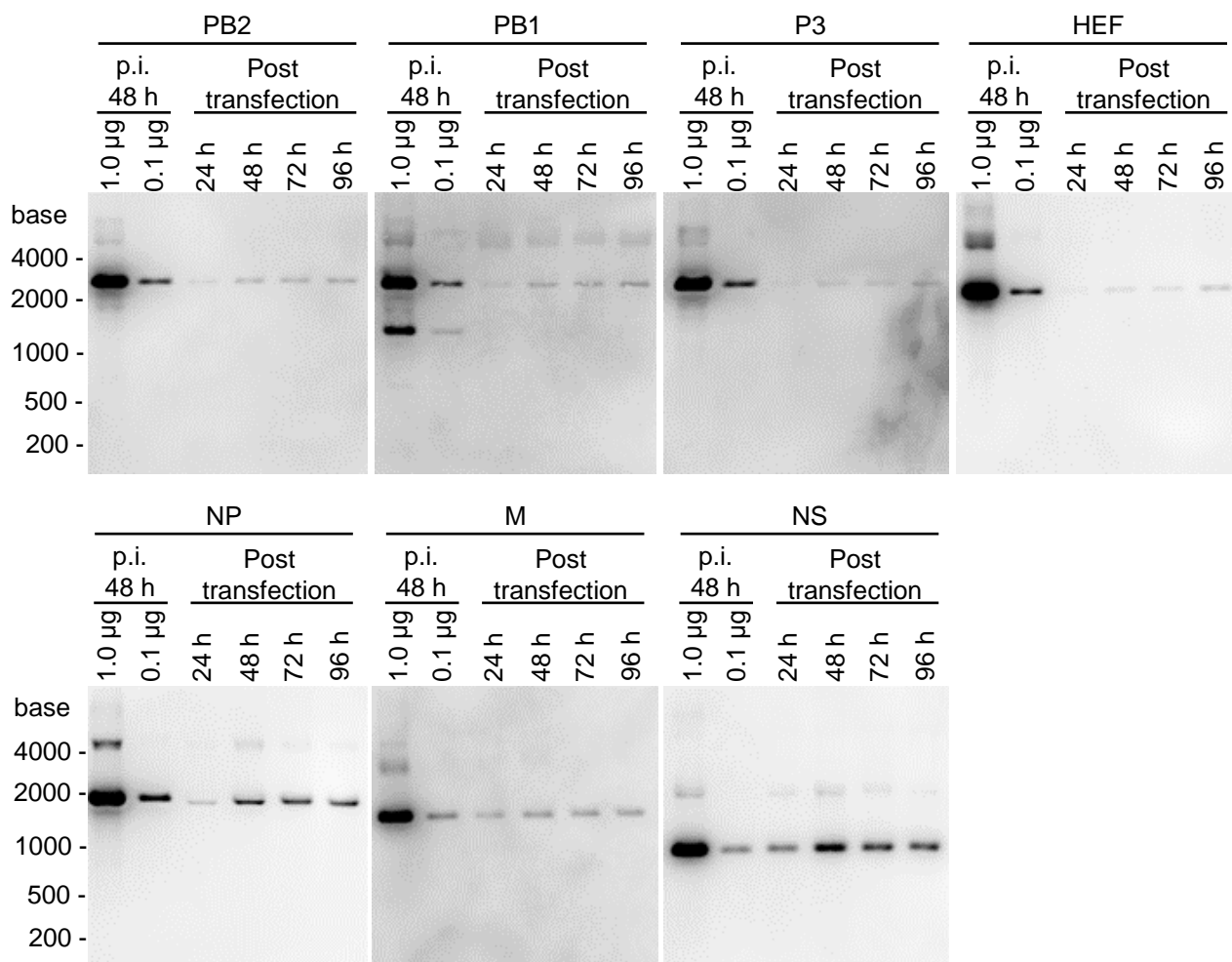


図1-9 プラスミドをトランスフェクトした細胞におけるvRNA

プラスミドをトランスフェクトしたHRT-18G細胞から、24時間間隔で抽出した細胞内のvRNAを、ゲノム分節に特異的なRNAプローブによりノーザンブロット解析した。また、感染後（p.i.）48時間のD/OK-clone感染細胞から抽出したvRNAも同様に調べた。

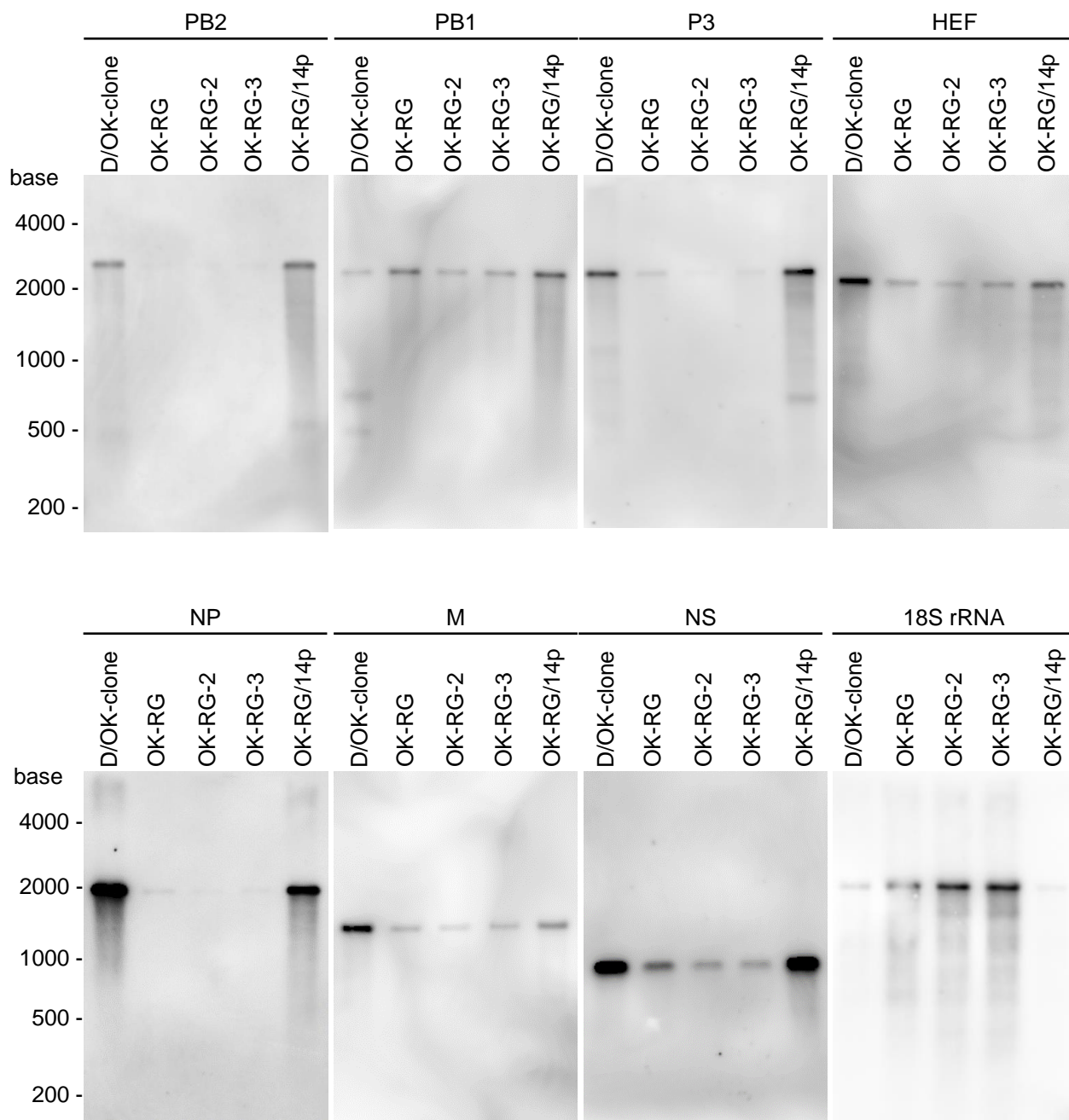


図1-10 OK-RG粒子内のvRNA

D/OK-clone、OK-RG、OK-RG2、OK-RG3、および最適化トランスフェクション条件で作出されたウイルスのプラークから分離したOK-RG/14pの精製ウイルス粒子からvRNAを抽出し、ゲノム分節特異的および18S rRNA特異的RNAプローブを用いてノーザンブロット解析した。

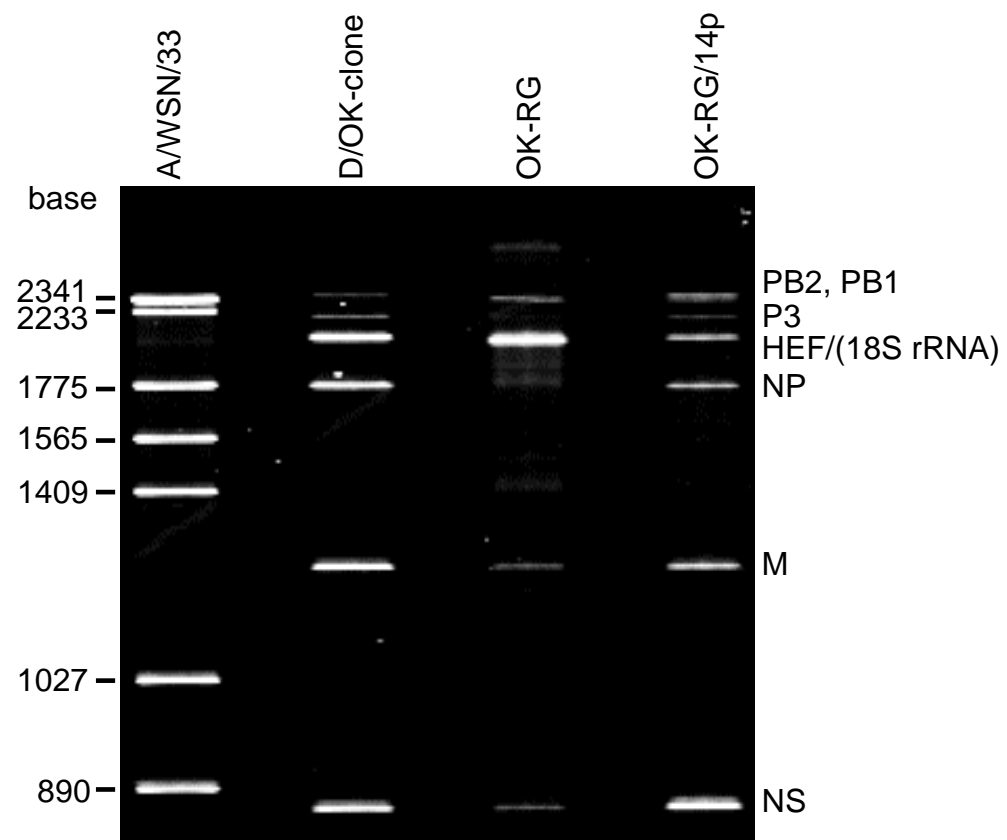


図1-11 尿素-PAGEによるOK-RG粒子内vRNAの解析

D/OK-clone、OK-RGおよびOK-RG/14pの精製ウイルス粒子からRNAを抽出し、4%尿素-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した（20mA、10時間）。泳動のゲルはSYBR Gold nucleic acid gel stainで染色した。

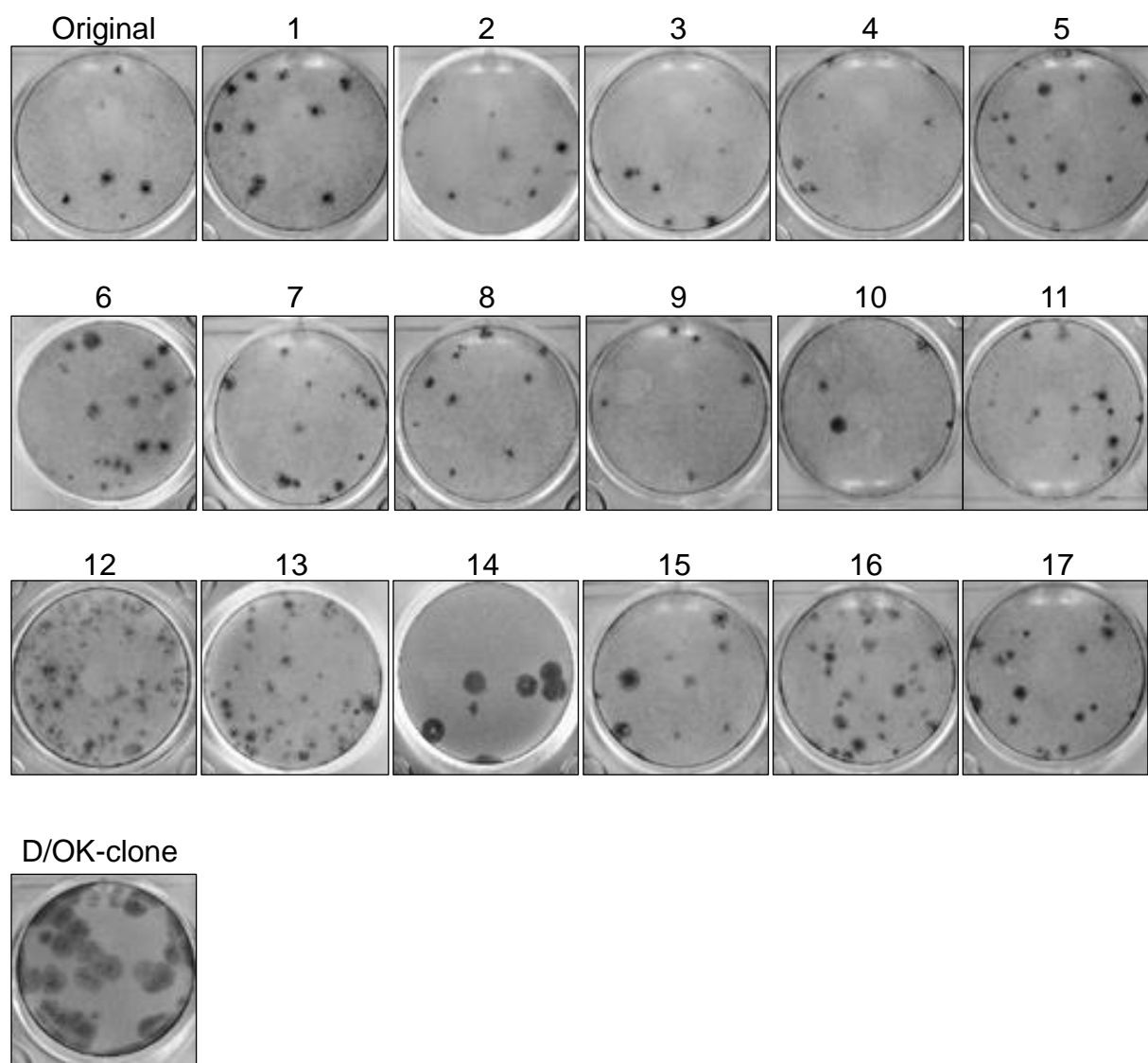


図1-12 異なる条件で作出されたOK-RGのプラーク表現型

異なる18条件（表1-2に示す）で作出されたウイルスのST細胞におけるプラーク表現型を示した。プラークは抗D/OKマウスポリクローナル抗体で免疫染色した。

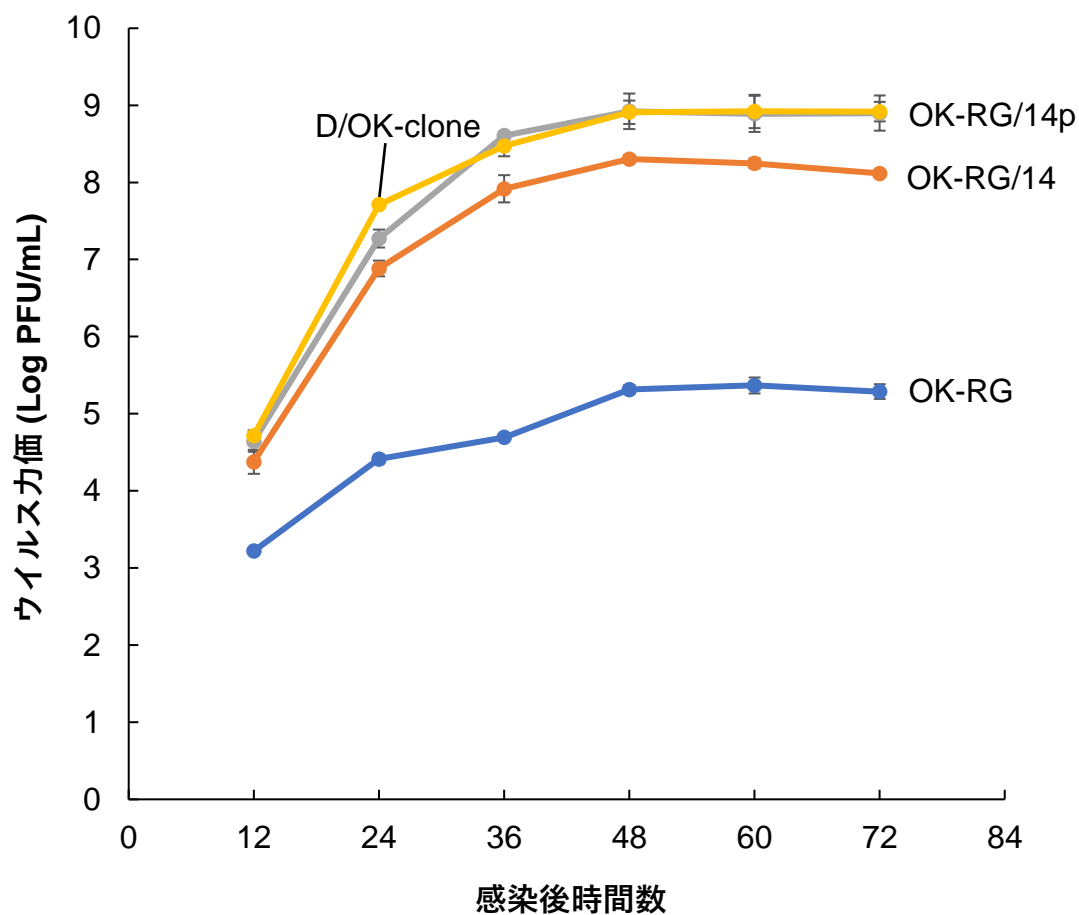


図1-13 条件#14で作出されたOK-RGの増殖性

トランスフェクション条件#14で作出されたOK-RG/14、およびプラーククローニングを経たOK-RG/14pの増殖動態を評価した。OK-RG/14、OK-RG/14p、OK-RG、およびD/OK-cloneは、それぞれMOI = 0.01でST細胞に接種した。ウイルス力価は、プラークアッセイを用い感染後12時間間隔で測定した。グラフは標準偏差を有する平均力価を示した (n = 3)。

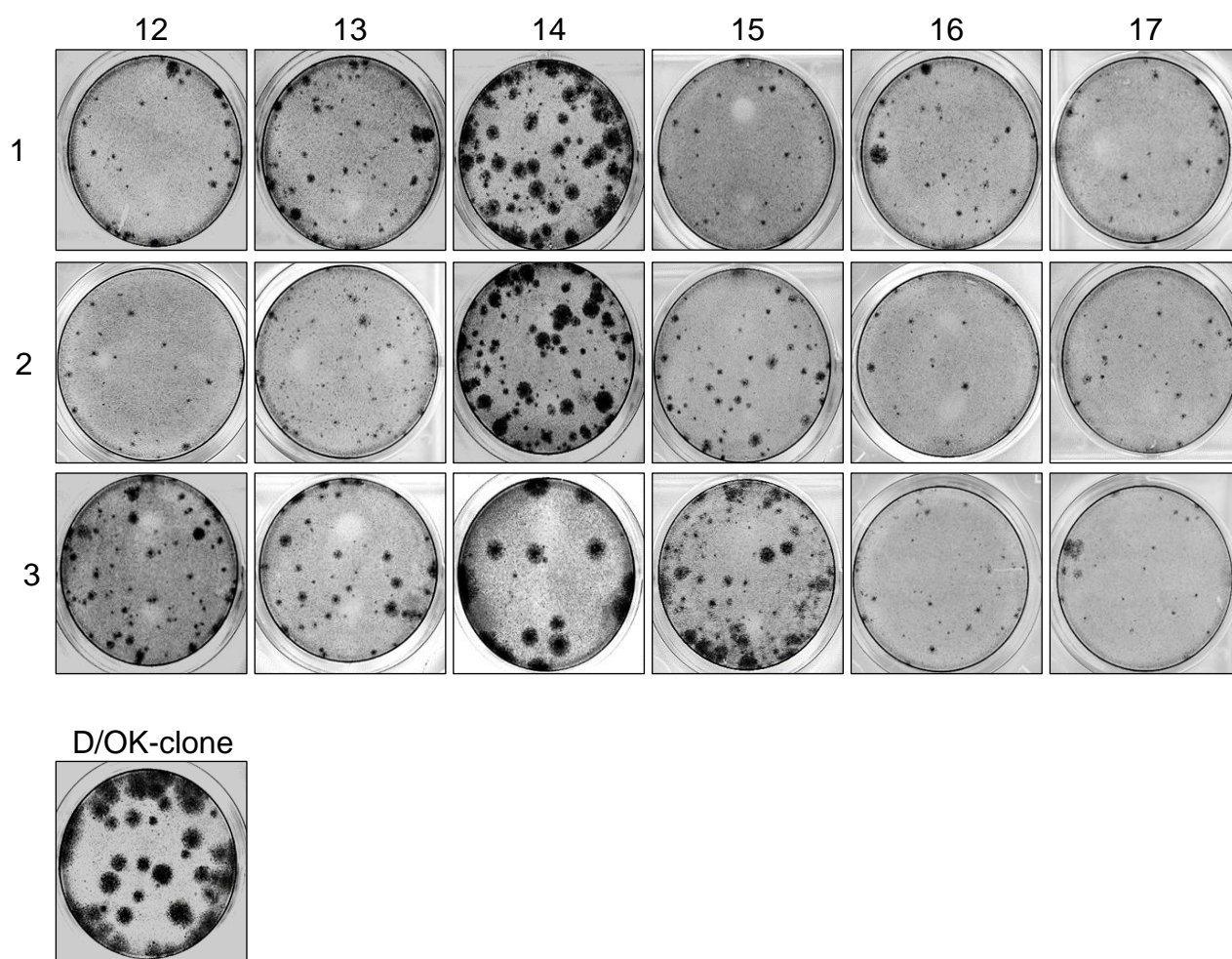


図1-14 トランスフェクション条件#14の再現性の確認

トランスフェクション条件#12-17（表1-2）で作出したD/OK-EcoRI-RGのST細胞におけるプラーク表現型を示した。D/OK-EcoRI-RGは、各条件下で3回ずつ独立して作出した。プラークは抗D/OKマウスポリクローナル抗体で免疫染色した。

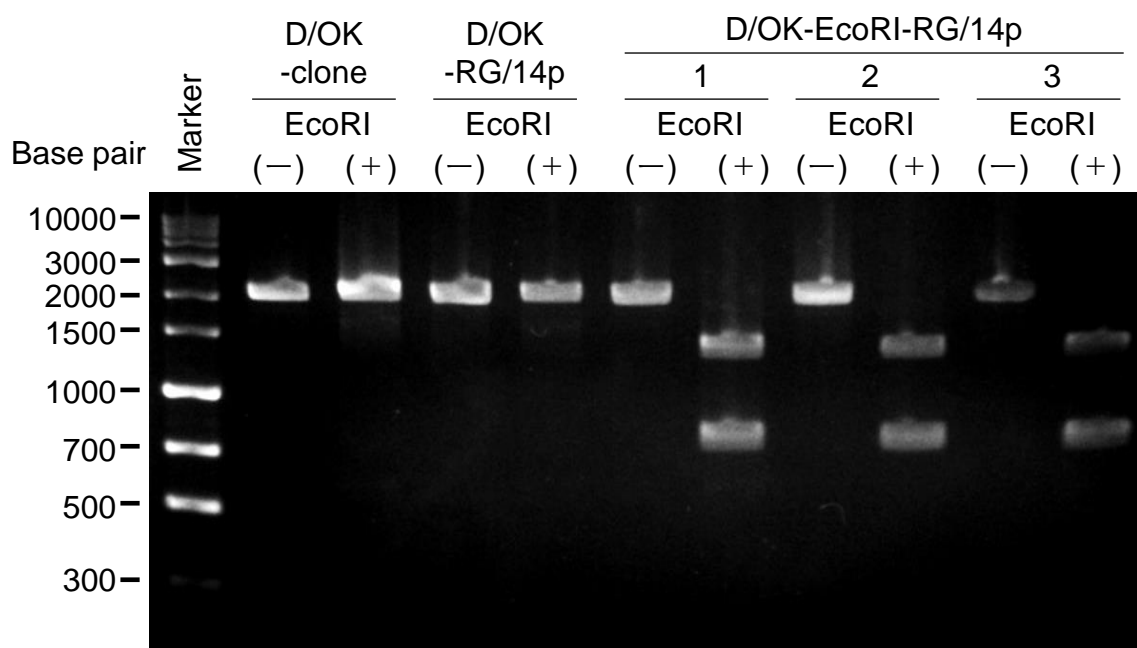


図1-15 トランスフェクション条件#14の再現性の確認

D/OK-clone、D/OK-RG、D/OK-EcoRI-RG/14pのHEF遺伝子の全長2,049bpをRT-PCRによって増幅し、その後、制限酵素EcoRIで処理した。PCR産物にEcoRIサイトが存在する場合、1,307bpと738bpの二つのフラグメントが生成される。

表 1-1 D/swine/Oklahoma/1334/2011 とそのブランククローニングウイルスとの間で観察された塩基配列の違い

分節	アミノ酸 の位置	アミノ酸		塩基配列	
		D/OK ^a	D/OK- clone ^b	D/OK	D/OK-clone
PB2	204	Ala	Thr	GCA	ACA
	601	Ala	Ala	GCG	GCA
P3	520	Val	Val	GTC	GTT

^a D/OK: D/swine/Oklahoma/1334/2011 の野生株

^b D/OK-clone: D/OK を ST 細胞上で連続した 3 回のブランククローニングにして得られたウイルス株

表 1-2 リバーシジェネティクスに用いたトランスフェクション条件

		条件番号 (各プラスミドの使用量(μg))																	
		Original	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
タンパク発現用 プラスミド	PB2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	PB1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	P3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	NP	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
vRNA 合成用 プラスミド	PB2	0.2	0.2	1.0	0.6	0.2	0.2	0.5	1.0	0.6	0.2	0.2	0.5	0.2	1.0	0.6	0.2	0.2	0.5
	PB1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.02	0.02	0.1	0.1	0.1	0.02	0.02	0.2	0.1	0.1	0.1	0.02	0.02
	P3	0.2	0.2	1.0	0.6	0.2	0.2	0.5	1.0	0.6	0.2	0.2	0.5	0.2	1.0	0.6	0.2	0.2	0.5
	HEF	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.02	0.1	0.1	0.1	0.1	0.02	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.02	0.1
	NP	0.2	0.2	1.0	0.6	0.2	0.2	0.5	1.0	0.6	0.2	0.2	0.5	0.2	1.0	0.6	0.2	0.2	0.5
	M	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.02	0.1	0.1	0.1	0.1	0.02	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.02	0.1
	NS	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.02	0.1	0.1	0.1	0.1	0.02	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.02	0.1

第2章および第3章の研究内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表出来ない。5年以内に出版予定。

総括

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 型インフルエンザ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（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 による国内の死産事故発生件数は、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 を制御できる可能性がある。

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遺伝子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、また、それを用いたウイルス学的性状の解析、さらに、ワクチンウイルスの構築につながるウイルスの弱毒化について検討した。

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を行った。まず、野外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、野生型インフルエンザ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、野生型インフルエンザ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、ウイルスの増殖性や病原性、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 章および第 3 章の研究内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表出来ない。5 年以内に出版予定。

引用文献

Aleksandrova, G. I., Garmashova, L. M., Golubev, D. B., Koliak, L. I., & Medvedeva, T. E. (1979). Experience in selecting safe heat-sensitive influenza virus A recombinants. *Voprosy virusologii*, 4, 342–346.

Chan, P. K. S., Chan, M. C. W., Cheung, J. L. K., Lee, N., Leung, T. F., Yeung, A. C. M., Wong, M. C. S., Ngai, K. L. K., Nelson, E. A. S., & Hui, D. S. C. (2013). Influenza B lineage circulation and hospitalization rates in a subtropical city, Hong Kong, 2000-2010. *Clinical Infectious Diseases* 56(5), 677–684.

Chan, W., Zhou, H., Kemble, G., & Jin, H. (2008). The cold adapted and temperature sensitive influenza A/Ann Arbor/6/60 virus, the master donor virus for live attenuated influenza vaccines, has multiple defects in replication at the restrictive temperature. *Virology*, 380(2), 304–311.

Chiapponi, C., Faccini, S., De Mattia, A., Baioni, L., Barbieri, I., Rosignoli, C., Nigrelli, A., & Foni, E. (2016). Detection of influenza D virus among swine and cattle, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 22(2), 352–354.

Chou, Y., Vafabakhsh, R., Doganay, S., Gao, Q., Ha, T., & Palese, P. (2012). One influenza virus particle packages eight unique viral RNAs as shown by FISH analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(23), 9101–9106.

Collin, E. A., Sheng, Z., Lang, Y., Ma, W., Hause, B. M., & Li, F. (2015). Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. *Journal of Virology*, *89*(2), 1036–1042.

Confer, A. W., & Ayalew, S. (2018). Mannheimia haemolytica in bovine respiratory disease: immunogens, potential immunogens, and vaccines. *Animal Health Research Reviews*, *19*(2), 79–99.

Crescenzo-Chaigne, B., & van der Werf, S. (2007). Rescue of influenza C virus from recombinant DNA. *Journal of Virology*, *81*(20), 11282–11289.

de Wit, E., Spronken, M. I. J., Vervaeke, G., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2007). A reverse-genetics system for Influenza A virus using T7 RNA polymerase. *The Journal of General Virology*, *88*(4), 1281–1287.

Desselberger, U., Racaniello, V. R., Zazra, J. J., & Palese, P. (1980). The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene*, 8(3), 315–328.

Ducatez, M. F., Pelletier, C., & Meyer, G. (2015). Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), 368–371.

Enami, M., Luytjes, W., Krystal, M., & Palese, P. (1990). Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(10), 3802–3805.

Engelhardt, O. G. (2013). Many ways to make an influenza virus--review of influenza virus reverse genetics methods. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7(3), 249–256.

Fan, H., Walker, A. P., Carrique, L., Keown, J. R., Serna Martin, I., Karia, D., Sharps, J., Hengrung, N., Pardon, E., Steyaert, J., Grimes, J. M., & Fodor, E. (2019). Structures of influenza A virus RNA polymerase offer insight into viral genome replication. *Nature*,

573(7773), 287–290.

Ferguson, L., Eckard, L., Epperson, W. B., Long, L.-P., Smith, D., Huston, C., Genova, S., Webby, R., & Wan, X.-F. (2015). Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. *Virology*, 486, 28–34.

Ferguson, L., Luo, K., Olivier, A. K., Cunningham, F. L., Blackmon, S., Hanson-Dorr, K., Sun, H., Baroch, J., Lutman, M. W., Quade, B., Epperson, W., Webby, R., DeLiberto, T. J., & Wan, X.-F. (2018). Influenza D virus infection in feral swine populations, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 24(6), 1020–1028.

Flynn, O., Gallagher, C., Mooney, J., Irvine, C., Ducatez, M., Hause, B., McGrath, G., & Ryan, E. (2018). Influenza D virus in cattle, Ireland. *Emerging Infectious Diseases* 24(2), 389–391.

Fodor, E., Devenish, L., Engelhardt, O. G., Palese, P., Brownlee, G. G., & Garcia-Sastre, A. (1999). Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *Journal of Virology*, 73(11), 9679–9682.

Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., & Kawaoka, Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(4), 2002–2007.

Fulton, R. W. (2009). Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Animal Health Research Reviews*, *10*(2), 131–139.

Gerber, M., Isel, C., Moules, V., & Marquet, R. (2014). Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends in Microbiology*, *22*(8), 446–455.

Gu, M., Zhao, G., Zhao, K., Zhong, L., Huang, J., Wan, H., Wang, X., Liu, W., Liu, H., Peng, D., & Liu, X. (2013). Novel variants of clade 2.3.4 highly pathogenic avian influenza A(H5N1) viruses, China. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(12), 2021–2024.

Hause, B. M., Collin, E. A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., Wang, D., Nelson, E. A., & Li, F. (2014). Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio*, *5*(2), e00031-14.

Hause, B. M., Ducatez, M., Collin, E. A., Ran, Z., Liu, R., Sheng, Z., Armien, A., Kaplan, B., Chakravarty, S., Hoppe, A. D., Webby, R. J., Simonson, R. R., & Li, F. (2013). Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathogens*, *9*(2), e1003176.

Hause, B. M., Huntimer, L., Falkenberg, S., Henningson, J., Lechtenberg, K., & Halbur, T. (2017). An inactivated influenza D virus vaccine partially protects cattle from respiratory disease caused by homologous challenge. *Veterinary Microbiology*, *199*, 47–53.

Hilton, W. M. (2014). BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go? *Animal Health Research Reviews*, *15*(2), 120–122.

Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., & Webster, R. G. (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(11), 6108–6113.

Hoffmann, E., Mahmood, K., Yang, C.-F., Webster, R. G., Greenberg, H. B., & Kemble, G.

(2002). Rescue of influenza B virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11411–11416.

Hongo, S., Sugawara, K., Muraki, Y., Matsuzaki, Y., Takashita, E., Kitame, F., & Nakamura, K. (1999). Influenza C virus CM2 protein is produced from a 374-amino-acid protein (P42) by signal peptidase cleavage. *Journal of Virology*, 73(1), 46–50.

Horimoto, T., Takada, A., Fujii, K., Goto, H., Hatta, M., Watanabe, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Tagawa-Sakai, Y., Yamada, S., Ito, H., Ito, T., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Lim, W., Guan, Y., Peiris, M., & Kawaoka, Y. (2006). The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*, 24(17), 3669-76.

Horimoto, T., Hiono, T., Mekata, H., Odagiri, T., Lei, Z., Kobayashi, T., Norimine, J., Inoshima, Y., Hikono, H., Murakami, K., Sato, R., Murakami, H., Sakaguchi, M., Ishii, K., Ando, T., Otomaru, K., Ozawa, M., Sakoda, Y., & Murakami, S. (2016). Nationwide distribution of bovine influenza D virus infection in Japan. *PloS One*, 11(9), e0163828.

Huang, S. S. H., Banner, D., Paquette, S. G., Leon, A. J., Kelvin, A. A., & Kelvin, D. J. (2014). Pathogenic influenza B virus in the ferret model establishes lower respiratory tract infection. *The Journal of General Virology*, 95(10), 2127–2139.

Hutchinson, E. C. (2018). Influenza virus. *Trends in Microbiology*, 26(9), 809–810.

Hutchinson, E. C., von Kirchbach, J. C., Gog, J. R., & Digard, P. (2010). Genome packaging in influenza A virus. *The Journal of General Virology*, 91(2), 313–328.

Isakova-Sivak, I., Chen, L.-M., Bourgeois, M., Matsuoka, Y., Voeten, J. T. M., Heldens, J. G. M., van den Bosch, H., Klimov, A., Rudenko, L., Cox, N. J., & Donis, R. O. (2014). Characterization of reverse genetics-derived cold-adapted master donor virus A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and reassortants with H5N1 surface genes in a mouse model. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(5), 722–731.

Isakova-Sivak, I., Chen, L.-M., Matsuoka, Y., Voeten, J. T. M., Kiseleva, I., Heldens, J. G. M., den Bosch, H. van, Klimov, A., Rudenko, L., Cox, N. J., & Donis, R. O. (2011). Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated

influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology*, 412(2), 297–305.

Jackson, D., Cadman, A., Zurcher, T., & Barclay, W. S. (2002). A reverse genetics approach for recovery of recombinant influenza B viruses entirely from cDNA. *Journal of Virology*, 76(22), 11744–11747.

Jiang, W.-M., Wang, S.-C., Peng, C., Yu, J.-M., Zhuang, Q.-Y., Hou, G.-Y., Liu, S., Li, J.-P., & Chen, J.-M. (2014). Identification of a potential novel type of influenza virus in Bovine in China. *Virus Genes*, 49(3), 493–496.

Kesinger, E., Liu, J., Jensen, A., Chia, C. P., Demers, A., & Moriyama, H. (2018). Influenza D virus M2 protein exhibits ion channel activity in *Xenopus laevis* oocytes. *PloS One*, 13(6), e0199227.

Krug, R. M. (2015). Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Current Opinion in Virology*, 12, 1–6.

Lakdawala, S. S., Jayaraman, A., Halpin, R. A., Lamirande, E. W., Shih, A. R., Stockwell, T.

B., Lin, X., Simenauer, A., Hanson, C. T., Vogel, L., Paskel, M., Minai, M., Moore, I., Orandle, M., Das, S. R., Wentworth, D. E., Sasisekharan, R., & Subbarao, K. (2015). The soft palate is an important site of adaptation for transmissible influenza viruses. *Nature*, 526(7571), 122–125.

Lee, Y. S., & Seong, B. L. (1998). Nucleotides in the panhandle structure of the influenza B virus virion RNA are involved in the specificity between influenza A and B viruses. *The Journal of General Virology*, 79(4), 673–681.

Li, W.-C., Shih, S.-R., Huang, Y.-C., Chen, G.-W., Chang, S.-C., Hsiao, M.-J., Tsao, K.-C., & Lin, T.-Y. (2008). Clinical and genetic characterization of severe influenza B-associated diseases during an outbreak in Taiwan. *Journal of Clinical Virology*, 42(1), 45–51.

Manicassamy, B., Manicassamy, S., Belicha-Villanueva, A., Pisanelli, G., Pulendran, B., & García-Sastre, A. (2010). Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25), 11531–11536.

Martin, S. W., & Bohac, J. G. (1986). The association between serological titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine virus diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus and treatment for respiratory disease in Ontario feedlot calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50(3), 351–358.

Martínez-Sobrido, L., Peersen, O., & Nogales, A. (2018). Temperature sensitive mutations in influenza A viral ribonucleoprotein complex responsible for the attenuation of the live attenuated influenza vaccine. *Viruses*, 10(10).

Matsuzaki, Y, Mizuta, K., Kimura, H., Sugawara, K., Tsuchiya, E., Suzuki, H., Hongo, S., & Nakamura, K. (2000). Characterization of antigenically unique influenza C virus strains isolated in Yamagata and Sendai cities, Japan, during 1992-1993. *The Journal of General Virology*, 81(6), 1447–1452.

Matsuzaki, Y, Mizuta, K., Sugawara, K., Tsuchiya, E., Muraki, Y., Hongo, S., Suzuki, H., & Nishimura, H. (2003). Frequent reassortment among influenza C viruses. *Journal of Virology*, 77(2), 871–881.

Matsuzaki, Yoko, Katsushima, N., Nagai, Y., Shoji, M., Itagaki, T., Sakamoto, M., Kitaoka, S.,

Mizuta, K., & Nishimura, H. (2006). Clinical features of influenza C virus infection in children.

The Journal of Infectious Diseases, 193(9), 1229–1235.

Medina, R. A., & García-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments.

Nature Reviews. Microbiology, 9(8), 590–603.

Mitra, N., Cernicchiaro, N., Torres, S., Li, F., & Hause, B. M. (2016). Metagenomic

characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle

identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. *The Journal of*

General Virology, 97(8), 1771–1784.

Murakami, S., Endoh, M., Kobayashi, T., Takenaka-Uema, A., Chambers, J. K., Uchida, K.,

Nishihara, M., Hause, B., & Horimoto, T. (2016). Influenza D virus infection in herd of cattle,

Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 22(8), 1517–1519.

Murakami, S., Odagiri, T., Melaku, S. K., Bazartseren, B., Ishida, H., Takenaka-Uema, A.,

Muraki, Y., Sentsui, H., & Horimoto, T. (2019). Influenza D virus infection in dromedary

camels, Ethiopia. *Emerging Infectious Diseases*, 25(6), 1224–1226.

Muraki, Y., Furukawa, T., Kohno, Y., Matsuzaki, Y., Takashita, E., Sugawara, K., & Hongo, S. (2010). Influenza C virus NS1 protein upregulates the splicing of viral mRNAs. *Journal of Virology*, 84(4), 1957–1966.

Muraki, Y., Murata, T., Takashita, E., Matsuzaki, Y., Sugawara, K., & Hongo, S. (2007). A mutation on influenza C virus M1 protein affects virion morphology by altering the membrane affinity of the protein. *Journal of Virology*, 81(16), 8766–8773.

Muraki, Y., Washioka, H., Sugawara, K., Matsuzaki, Y., Takashita, E., & Hongo, S. (2004). Identification of an amino acid residue on influenza C virus M1 protein responsible for formation of the cord-like structures of the virus. *The Journal of General Virology*, 85(7), 1885–1893.

Murray, G. M., O'Neill, R. G., Lee, A. M., McElroy, M. C., More, S. J., Monagle, A., Earley, B., & Cassidy, J. P. (2017). The bovine paranasal sinuses: Bacterial flora, epithelial expression of nitric oxide and potential role in the in-herd persistence of respiratory disease pathogens.

PloS One, 12(3), e0173845.

Nakatsu, S., Murakami, S., Shindo, K., Horimoto, T., Sagara, H., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2018). Influenza C and D viruses package eight organized ribonucleoprotein complexes.

Journal of Virology, 92(6), e02084-17

Nakatsu, S., Sagara, H., Sakai-Tagawa, Y., Sugaya, N., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2016). Complete and incomplete genome packaging of influenza A and B viruses. *MBio*, 7(5), e01248-16

Nedland, H., Wollman, J., Sreenivasan, C., Quast, M., Singrey, A., Fawcett, L., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Kaushik, R. S., Wang, D., & Li, F. (2018). Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the midwest United States. *Zoonoses and Public Health*, 65(1), e148–e154.

Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., & Kawaoka, Y. (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 96(16), 9345–9350.

Neumann, G., Watanabe, T., & Kawaoka, Y. (2000). Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *Journal of Virology*, 74(1), 547–551.

Ng, T. F. F., Kondov, N. O., Deng, X., Van Eenennaam, A., Neibergs, H. L., & Delwart, E. (2015). A metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. *Journal of Virology*, 89(10), 5340–5349.

Niwa, H., Yamamura, K., & Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2), 193–199.

Noda, T., & Kawaoka, Y. (2010). Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Reviews in Medical Virology*, 20(6), 380–391.

Noda, T., Murakami, S., Nakatsu, S., Imai, H., Muramoto, Y., Shindo, K., Sagara, H., & Kawaoka, Y. (2018). Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. *Nature Communications*, 9(1), 54.

Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R. H., & Kawaoka, Y. (2006). Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*, 439(7075), 490–492.

Noda, T., Sugita, Y., Aoyama, K., Hirase, A., Kawakami, E., Miyazawa, A., Sagara, H., & Kawaoka, Y. (2012). Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nature Communications*, 3, 639.

Nogales, A., & Martínez-Sobrido, L. (2016). Reverse genetics approaches for the development of influenza vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1),20.

Oliva, J., Eichenbaum, A., Belin, J., Gaudino, M., Guillotin, J., Alzieu, J.-P., Nicollet, P., Brugidou, R., Gueneau, E., Michel, E., Meyer, G., & Ducatez, M. F. (2019). Serological evidence of influenza D virus circulation among cattle and small ruminants in France. *Viruses*, 11(6), 516.

Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier,

R. A. M. (2006). Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 312(5772), 384–388.

Pachler, K., Mayr, J., & Vlasak, R. (2010). A seven plasmid-based system for the rescue of influenza C virus. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 4, 239–246.

Panciera, R. J., & Confer, A. W. (2010). Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 26(2), 191–214.

Paterson, D., & Fodor, E. (2012). Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLoS Pathogens*, 8(12), e1003019.

Peng, Q., Liu, Y., Peng, R., Wang, M., Yang, W., Song, H., Chen, Y., Liu, S., Han, M., Zhang, X., Wang, P., Yan, J., Zhang, B., Qi, J., Deng, T., Gao, G. F., & Shi, Y. (2019). Structural insight into RNA synthesis by influenza D polymerase. *Nature Microbiology*, 4(10), 1750–1759.

Quast, M., Sreenivasan, C., Sexton, G., Nedland, H., Singrey, A., Fawcett, L., Miller, G.,

Lauer, D., Voss, S., Pollock, S., Cunha, C. W., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., & Li, F. (2015). Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants. *Veterinary Microbiology*, 180(3–4), 281–285.

Quinlivan, M., Zamarin, D., García-Sastre, A., Cullinane, A., Chambers, T., & Palese, P. (2005). Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *Journal of Virology*, 79(13), 8431–8439.

Rodriguez, L., Blanco-Lobo, P., Reilly, E. C., Maehigashi, T., Nogales, A., Smith, A., Topham, D. J., Dewhurst, S., Kim, B., & Martínez-Sobrido, L. (2019). Comparative study of the temperature sensitive, cold adapted and attenuated mutations present in the master donor viruses of the two commercial human live attenuated influenza vaccines. *Viruses*, 11(10), 928.

Salem, E., Cook, E. A. J., Lbacha, H. A., Oliva, J., Awoume, F., Aplogan, G. L., Hymann, E. C., Muloi, D., Deem, S. L., Alali, S., Zouagui, Z., Fevre, E. M., Meyer, G., & Ducatez, M. F. (2017). Serologic evidence for influenza C and D virus among ruminants and camelids, Africa, 1991-2015. *Emerging Infectious Diseases*, 23(9), 1556–1559.

Salez, N., Mélade, J., Pascalis, H., Aherfi, S., Dellagi, K., Charrel, R. N., Carrat, F., & de Lamballerie, X. (2014). Influenza C virus high seroprevalence rates observed in 3 different population groups. *The Journal of Infection*, 69(2), 182–189.

Smith, A., Rodriguez, L., El Ghouayel, M., Nogales, A., Chamberlain, J. M., Sortino, K., Reilly, E., Feng, C., Topham, D. J., Martínez-Sobrido, L., & Dewhurst, S. (2020). A live attenuated influenza vaccine elicits enhanced heterologous protection when the internal genes of the vaccine are matched to those of the challenge virus. *Journal of Virology*, 94(4), e01065-19.

Snoeck, C. J., Oliva, J., Pauly, M., Losch, S., Wildschutz, F., Muller, C. P., Hubschen, J. M., & Ducatez, M. F. (2018). Influenza D virus circulation in cattle and swine, Luxembourg, 2012-2016. *Emerging Infectious Diseases* 24(7), 1388–1389.

Song, H., Qi, J., Khedri, Z., Diaz, S., Yu, H., Chen, X., Varki, A., Shi, Y., & Gao, G. F. (2016). An open receptor-binding cavity of hemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein from newly-identified influenza D virus: basis for its road cell tropism. *PLoS Pathogens*, 12(1), e1005411.

Su, S., Bi, Y., Wong, G., Gray, G. C., Gao, G. F., & Li, S. (2015). Epidemiology, evolution,

and recent outbreaks of avian influenza virus in China. *Journal of Virology*, 89(17), 8671–8676.

Schickli, JH., Flandorfer, A., Nakaya, T., Martinez-Sobrido, L., García-Sastre, A., & Palese, P. (2001). Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1416), 1965–1973.

Te Velhuis, A. J. W., & Fodor, E. (2016). Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(8), 479–493.

Theurer, M. E., Larson, R. L., & White, B. J. (2015). Systematic review and meta-analysis of the effectiveness of commercially available vaccines against bovine herpesvirus, bovine viral diarrhea virus, bovine respiratory syncytial virus, and parainfluenza type 3 virus for mitigation of bovine respiratory disease complex in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 246(1), 126–142.

Tong, S., Li, Y., Rivailler, P., Conrardy, C., Castillo, D. A. A., Chen, L.-M., Recuenco, S., Ellison, J. A., Davis, C. T., York, I. A., Turmelle, A. S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao,

Y., Weil, M. R., Tang, K., Rowe, L. A., Sammons, S., & Donis, R. O. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4269–4274.

Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., Chen, L.-M., Johnson, A., Tao, Y., Dreyfus, C., Yu, W., McBride, R., Carney, P. J., Gilbert, A. T., Chang, J., & Donis, R. O. (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003657.

Wang, M., & Veit, M. (2016). Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein of influenza C virus. *Protein & Cell*, 7(1), 28–45.

Wareing, M. D., Watson, J. M., Brooks, M. J., & Tannock, G. A. (2001). Immunogenic and isotype-specific responses to Russian and US cold-adapted influenza vaccine donor strains A/Leningrad/134/17/57, A/Leningrad/134/47/57, and A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) in mice. *Journal of Medical Virology*, 65(1), 171–177.

White, S. K., Ma, W., McDaniel, C. J., Gray, G. C., & Lednicky, J. A. (2016). Serologic

evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle.

Journal of Clinical Virology, 81, 31–33.

Yu, J., Li, F., & Wang, D. (2020). The first decade of research advances in influenza D virus.

The Journal of General Virology. in press.

Zhang, F., Bi, Y., Wang, J., Wong, G., Shi, W., Hu, F., Yang, Y., Yang, L., Deng, X., Jiang, S.,

He, X., Liu, Y., Yin, C., Zhong, N., & Gao, G. F. (2017). Human infections with recently-emerging highly pathogenic H7N9 avian influenza virus in China. *The Journal of Infection*, 75(1), 71–75.

Zhao, L., Xia, H., Huang, J., Zheng, Y., Liu, C., Su, J., & Ping, J. (2020). Features of nuclear export signals of NS2 protein of influenza D virus. *Viruses*, 12(10), e1100.

Zheng, H., Palese, P., & García-Sastre, A. (1996). Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication. *Virology*, 217(1), 242–251.

謝辭

本研究をまとめるにあたり、多くの方のご助力を賜りました。特に、東京大学獣医微生物学研究室の堀本泰介教授には、研究の計画、遂行、論文の執筆まで一貫して、精力的にご指導いただきました。深甚なる感謝を申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、同研究室の村上晋准教授には、多くの助言と非常に手厚くかつ寛大なご指導を頂きました。謹んで感謝いたします。さらに、同研究室の上間亜希子特任助教にも研究のご指導を賜りましたことを感謝申し上げます。

カンザス州立大学の Dr. Ben M. Hause（現ニューポート研究所）には、D/swine/Oklahoma/1334/2011 および D/bovine/Nebraska/9-5/2012 の分与をしていただきました。厚く御礼申し上げます。

東京大学獣医微生物学研究室の皆様には、研究面、生活面の双方において大変お世話になりました。ありがとうございました。

最後に、あらゆる面において支えてくれた家族に心より感謝します。