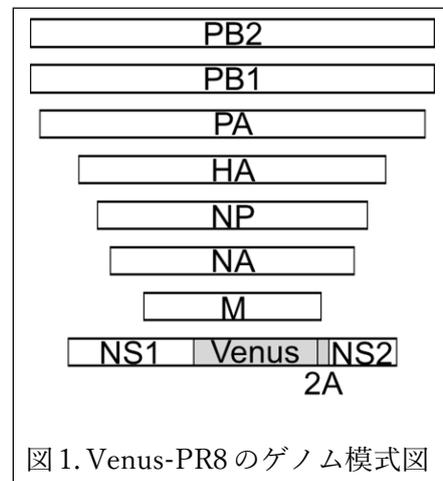


論文の内容の要旨

論文題目 Elucidation of the stabilization mechanism of a foreign gene inserted into the influenza virus genome
(インフルエンザウイルスゲノムに挿入された外来遺伝子の安定化メカニズムの解析)
氏名 古澤 夢梨

【背景と目的】

所属研究室で行われた先行研究において、ウイルス感染細胞を可視化するレポーターインフルエンザウイルスが作出された。インフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/34(PR8、H1N1)株の NS セグメントに蛍光蛋白質 Venus の遺伝子を挿入した WT-Venus-PR8(図 1)では、ウイルスを継代すると Venus の発現が容易に消失してしまう。しかし、ウイルスポリメラーゼを構成する PB2 遺伝子に E712D 変異が生じると Venus の発現が安定して維持されるようになる。そこで本研究では、Venus の発現が消失するメカニズムおよびポリメラーゼのアミノ酸変異によって Venus の発現が安定化するメカニズムの解明を目的として研究を行った。

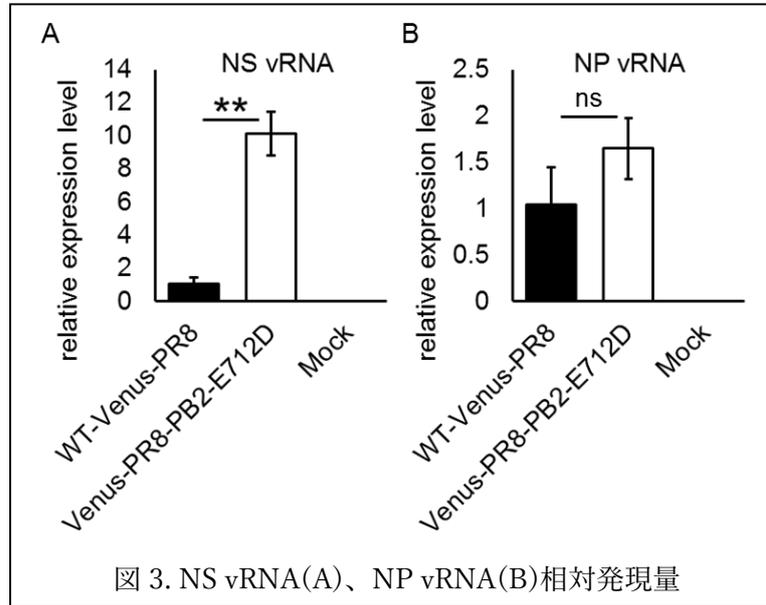
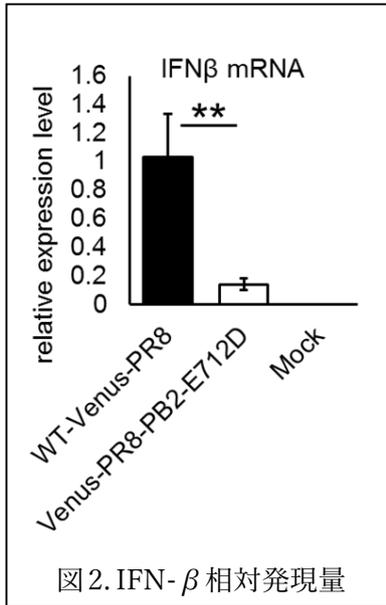


【結果】

1. Venus の挿入による転写/複製効率の変化

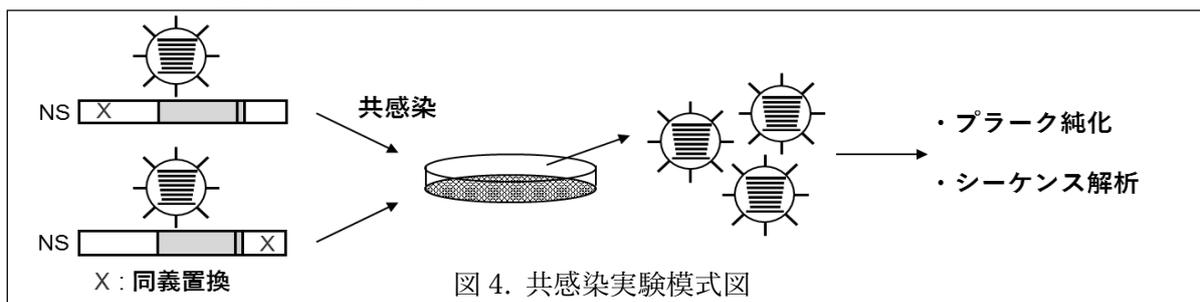
Venus-PR8 において、Venus 遺伝子は NS1 蛋白質と NEP 蛋白質をコードする NS セグメントに挿入されている。NS1 蛋白質は IFN- β の発現抑制など宿主の免疫抑制に重要な蛋白質として知られているが、Venus 遺伝子の挿入によって NS1 の機能が阻害されているのではないかと考えた。そこで、reverse genetics 法によって作製した WT-Venus-PR8 または Venus-PR8-PB2-E712D を MDCK 細胞に感染させ、9 時間後に realtime-PCR 法によって感染細胞中の IFN- β mRNA の発現量を調べた。その結果、WT-Venus-PR8 感染細胞では有意に高い IFN- β の発現が誘導されていることが明らかとなった(図 2)。すなわち、WT-Venus-PR8 では、PB2-E712D 変異株と比べて、NS1 による IFN- β の発現抑制作用が十分に働いていないことが示唆された。そこで次に、ウイルス RNA の発現量を調べた。WT-Venus-PR8 感染細胞では、Venus-PR8-PB2-E712D 感染細胞と比較して NS セグメントの vRNA 量が有意に低いことが分かった(図 3A)。WT-Venus-PR8 において、IFN- β の発現抑制作用が不十分であった原因は、NS1 の発現量が低

いたためであると言える。一方、外来遺伝子を含まない NP セグメントの vRNA 量には有意な差はなかった(図 3B)。以上の結果から、WT-Venus-PR8 では外来遺伝子を含む NS セグメント特異的に転写/複製効率が低下していると考えられる。PB2-E712D 変異株は、NS セグメントの転写/複製効率を回復させることで Venus 遺伝子の安定化をもたらしていることが示唆された。

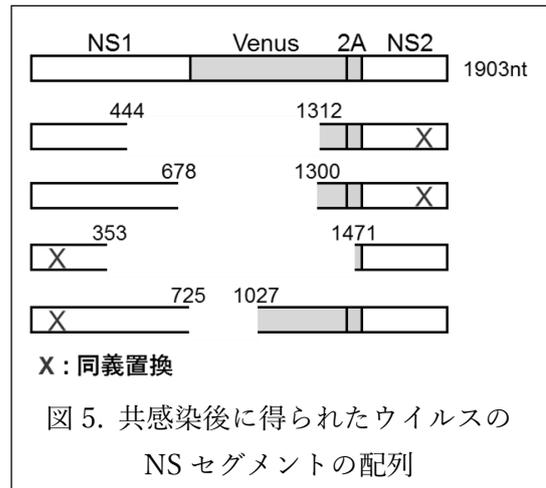


2. 挿入された Venus 遺伝子は internal deletion によって脱落する

Venus の発現が見られなくなった WT-Venus-PR8 の NS セグメントの塩基配列を調べた結果、大きな欠損変異が生じ Venus 遺伝子の大部分が脱落していることが明らかになった。Venus 遺伝子の脱落メカニズムとして、gene recombination と internal deletion が考えられる。gene recombination は、転写/複製反応の途中でウイルスポリメラーゼがテンプレートから解離し別のテンプレートに結合して反応が再開されることで、元のテンプレートとは異なる配列の RNA 産物が生じるという現象である。internal deletion は単一のテンプレート上でポリメラーゼの解離と再結合が起こり、テンプレートの一部の配列が抜け落ちるという現象である。どちらのメカニズムで Venus 遺伝子が脱落するのかを明らかにするため、図 4 の実験系を考えた。WT-Venus-PR8 の NS セグメントの C 末端または N 末端のいずれか一方に同義置換を加えた 2 種類のウイルスを作製し、MDCK 細胞に共感染させた。共感染後に Venus を発現しなくなったウイルスの NS セグメントの配列を解析した。

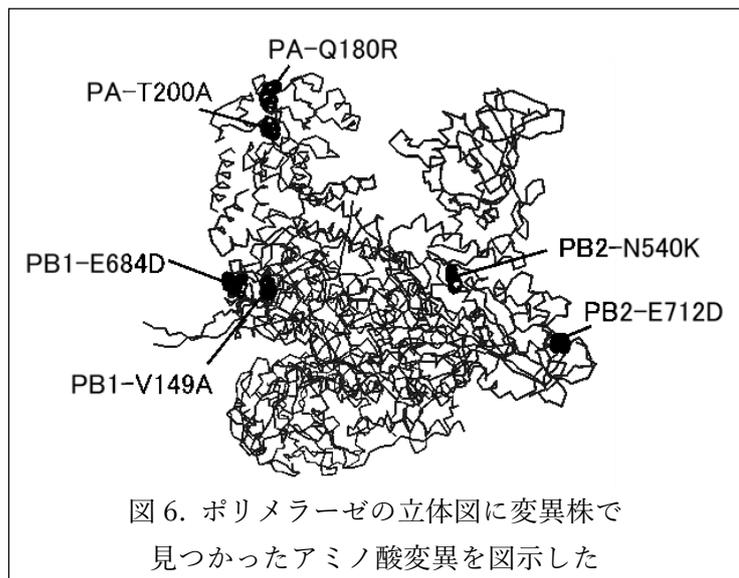


共感染後に得られたウイルスの NS セグメントの配列の一例を図 5 に示す。解析したすべてのウイルスは NS セグメントの N 末端または C 末端のどちらか一方のみに同義置換を有しており、両末端に同義置換を有しているウイルスや同義置換が排除されたウイルスは得られなかった。従って、Venus 遺伝子の脱落は gene recombination ではなく、internal deletion によって生じることが示唆された。

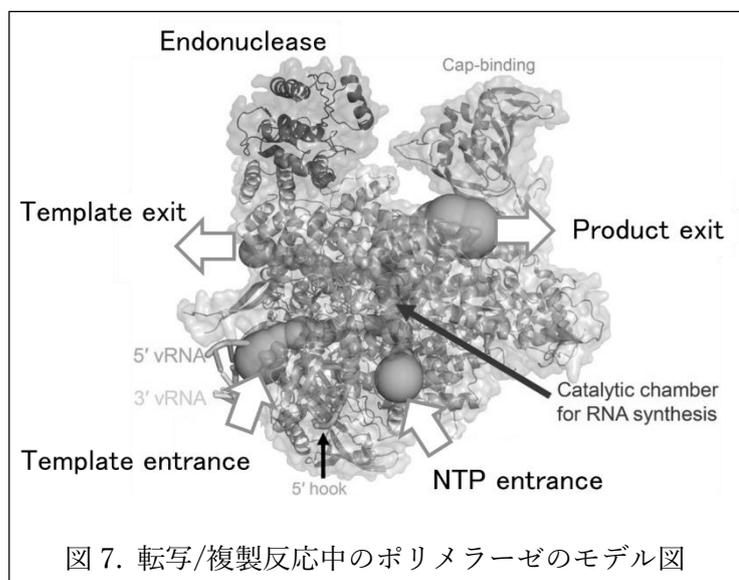


3. Venus 遺伝子の安定化にはどのようなメカニズムが関与しているのか

Venus 遺伝子の安定化メカニズムを推測するため、既知の PB2-E712D 変異以外の Venus 遺伝子の安定化に寄与するアミノ酸変異を探索した。WT-Venus-PR8 を MDCK 細胞に感染させ、Venus を安定的に発現する変異株が得られるまで Venus 陽性ウイルスのプラークピックと継代を繰り返した。得られた変異株のポリメラーゼを構成する遺伝子(PB2,PB1,PA)の配列を調べたところ、それぞれの変異株に図 6 に示すアミノ酸変異のいずれかが導入されていた。図 7 に転写/複製反応中のポリメラーゼのモデル図を示す(Pflug et al., 2017)。図 6 と図 7 を比較すると、Venus の安定化に寄与することが示唆された変異のうち、PB1 の 2 つの変異はテンプレートの出口の近く、PB2-540 は新規合成された RNA 産物の出口の近くに位置していることが分かる。従って、これらのアミノ酸は転写/複製反応中のポリメラーゼと RNA テンプレート、RNA 産物の結合安定性に



に寄与することが示唆された変異のうち、PB1 の 2 つの変異はテンプレートの出口の近く、PB2-540 は新規合成された RNA 産物の出口の近くに位置していることが分かる。従って、これらのアミノ酸は転写/複製反応中のポリメラーゼと RNA テンプレート、RNA 産物の結合安定性に



関わっている可能性がある。一方、エンドヌクレアーゼ活性部位にあたる PA の 2 つの変異と PB2-712 は RNA の通り道とは離れた位置に存在する。これらのアミノ酸は、ポリメラーゼと RNA の結合安定性に間接的に関わっている、もしくは異なる安定化メカニズムに関わっている可能性が考えられる。

【まとめ】

- ・ 外来遺伝子の挿入によりセグメント特異的に転写/複製効率が低下する。
- ・ PB2-E712D は NS セグメントの転写/複製効率を向上させることで Venus を安定化する。
- ・ Venus 遺伝子は internal deletion によって脱落する。
- ・ Venus 遺伝子の安定化に関わる複数のアミノ酸変異を新たに同定した。

【考察】

WT-Venus-PR8 では、Venus 遺伝子が挿入された NS セグメント特異的に転写/複製効率が低下していることが明らかとなった。その結果、抗ウイルス作用を持つ IFN- β の発現を十分に抑制することができず、ウイルスが効率良く増殖できないと考えられる。増殖の過程で Venus 遺伝子が脱落したウイルスが生じると、元の WT-Venus-PR8 よりもそれらのウイルスの方が効率良く増殖する。従って、継代を繰り返すと Venus が脱落したウイルスが選択され、Venus を発現するウイルスは維持されないと考えられる。PB2-E712D 変異が入ると、NS セグメントの転写/複製効率が回復し、Venus 遺伝子を含むウイルスも効率良く増殖できるようになる。外来遺伝子を含むセグメント特異的に転写/複製効率が低下するメカニズムは不明であるが、RNA の二次構造が関わっている可能性がある。外来遺伝子の挿入によって生じた異常な RNA 二次構造部分で転写/複製が阻害されていることが考えられる。PB2-E712D 変異によって転写/複製効率が回復するメカニズムも明らかではないが、転写/複製反応中のポリメラーゼ複合体、RNA テンプレート、RNA 産物の結合親和性を向上させることによって異常な RNA 構造部分でも滞りなく転写/複製反応を行うことができるのではないかと考えている。共感染実験の結果から、Venus 遺伝子は internal deletion によって脱落することが示唆された。PB2-E712D によってポリメラーゼとテンプレートの結合親和性が向上するのであれば、PB2-E712D は internal deletion の発生頻度の低下にも貢献している可能性がある。また、本研究では Venus 遺伝子の安定化に寄与する新たなアミノ酸変異を同定した。これらの変異の一部はポリメラーゼ上の RNA テンプレートや RNA 産物の通り道の近くに存在し、Venus 遺伝子の安定化にポリメラーゼと RNA テンプレート、RNA 産物の結合安定性に関わるという仮説が支持される。これらの変異は外来遺伝子を安定的に発現する組み換えウイルスの作製に利用できると考えられる。