

審査の結果の要旨

氏名 古澤 夢梨

論文提出者の所属研究室で行われた先行研究において、インフルエンザウイルスに挿入された外来遺伝子は不安定であるがウイルスポリメラーゼのアミノ酸変異によって安定化することが示されていた。すなわち、蛍光タンパク質 Venus の遺伝子を挿入した組み換えインフルエンザウイルス (WT-Venus-PR8) において、挿入された Venus 遺伝子は不安定でありウイルスを継代すると容易に脱落してしまうこと、PB2-E712D 変異によって Venus 遺伝子が安定して維持されるようになること、が示されていた。しかしながら、その分子メカニズムは明らかになっていなかった。本論文は、分子生物学的手法を用いて外来遺伝子の脱落および安定化に関わるメカニズムの一端を明らかにしている。

本論文の結果は、大きく5つに分けられる。始めの「Loss of Venus expression in WT-Venus-PR8 restores replication efficiency」では、ウイルスゲノムに挿入された Venus 遺伝子はウイルスの継代の過程で速やかに脱落すること、ポリメラーゼの PB2-E712D 変異によって安定して維持されるようになることが明確に示されている。また、先行研究では示されていなかったが、Venus 遺伝子の脱落に伴ってウイルスの増殖性が回復していくということが明らかにされている。2つめの「The PB2-E712D mutation does not cause an appreciable change in polymerase fidelity」では、deep sequence 解析によって PB2-E712D がポリメラーゼの複製忠実度に影響するという仮説を検証している。本論文の結果からは、複製忠実度は外来遺伝子の安定化に重要ではないという結論が導かれた。外来遺伝子の安定化がポリメラーゼ変異によって起こることから、ポリメラーゼの複製忠実度が関与しているという仮説は容易に導かれるが、その仮説が支持されない結果となった。外来遺伝子の安定化にはより複雑なメカニズムが関わっていることが示唆され、興味深い結果になったと言える。3つめの「Transcription/replication of the modified RNA segment is impaired in WT-Venus-PR8」では、Venus 遺伝子が不安定な WT-Venus-PR8 と Venus 遺伝子が安定化する Venus-PR8-PB2-E712D との間でウイルスゲノムの転写/複製効率に有意な差があることが明らかにされた。vRNA の発現量の比較のみならず、vRNA から翻訳されるタンパク質量の比較や、ウイルスタンパク質量に伴って変化する IFN- β の発現量の比較も行っており、遺伝子改変されたセグメント特異的に転写/複製効率が変化すること、またその変化がもたらす影響が確実に検証されている。4つめの「The inserted Venus gene is deleted via internal deletion」では、Venus 遺伝子の脱落が internal deletion によって生じることが示唆された。reverse genetics 法によって作製した2種類の変異ウイルスを共感染させるという独創的かつ新規的な実験系が利用されている。Venus 遺伝子の脱落メカニズムとしては、gene recombination と internal deletion の2つが考えられたが、共感染実験によって2種類のメカニズムを区別することを可能とし、internal deletion が Venus の脱落を引き起こす主なメカニズムであることを確認した。最後の「Additional mutations stabilize the Venus gene」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複数同定すること

に成功している。これらのアミノ酸変異は、今後新たな組み換えインフルエンザウイルスを製作する際に利用できると考えられ、有意義なデータであると言える。また、同定されたアミノ酸変異の位置関係から、これらのアミノ酸がポリメラーゼ複合体と RNA の結合安定性に関与することで外来遺伝子の安定化をもたらしているという仮説を導いている。

本論文は、基礎ウイルス学的に興味深い内容であるとともにウイルスベクターやレポーターウイルスの開発に応用できる可能性があるといった点で非常に意義のある研究であると言える。論文中では、結果と考察を導く上で十分かつ正確なデータが提示されている。また、今回得られたデータと過去の文献から得られる知見を統合して論理的な考察がなされている。論文提出者が研究者として十分な遂行能力と論理的思考力を持ち合わせていることを示している。

なお、本論文は、Shinya Yamada, Tiago Jose da Silva Lopes, Jayeeta Dutta, Zenab Khan, Divya Kriti, Harm van Bakel, Yoshihiro Kawaoka との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究計画を立て、実験、解析および論文執筆を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は博士（医科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1647 字