

## 論文の内容の要旨

論文題目 Understanding the genome packaging mechanism of influenza viruses by using electron microscopy  
(電子顕微鏡を用いた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解明)

氏名 中津 寿実保

インフルエンザは、インフルエンザウイルスによって引き起こされる急性呼吸器疾患である。A型およびB型インフルエンザウイルスは毎年冬季を中心に流行し、人々の健康だけでなく、経済や社会生活にも大きな損害を与える。そのため、医学・公衆衛生学上重要なウイルスとして、インフルエンザウイルスの研究を進める必要がある。

インフルエンザウイルスは、A型からD型に分類される。A型およびB型ウイルスでは8本、C型およびD型ウイルスでは7本に分節化したマイナス鎖一本鎖RNAをゲノムとして持つ。各RNA分節は、NPおよびポリメラーゼと結合し、塩基数に応じて異なる長さの棒状のRNPを形成する。感染細胞から出芽する際、子孫ウイルスが感染能を獲得するためには、8種類(A型およびB型ウイルス)または7種類(C型およびD型ウイルス)のRNPをすべて粒子内に取り込む必要があるが、これまで、ウイルスがどのようにRNPをウイルス粒子内に取り込むのか、その詳細なメカニズムは明らかになっていなかった。しかし近年、A型実験室株では、8種類のRNPが1本ずつウイルス粒子内に取り込まれること(Chou *et al.*, PNAS 2012)、さらに、8本のRNPが、周囲の7本のRNPが中心の1本のRNPを取り囲むような、「7+1」配置と呼ばれる配置で選択的にウイルス粒子内に取り込まれることが明らかになった(Noda *et al.*, Nature 2006)。一方、臨床分離株や、その他の型のインフルエンザウイルスがどのようにRNPを取り込むのかは明らかになっていない。

本研究では、様々な株や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を明らかにするために、主として透過型電子顕微鏡法(TEM)および電子線トモグラフィ法により、異なる株や型のインフルエンザウイルス粒子内に取り込まれたRNPの微細形態学的・構造学的解析を行った。さらに、ウイルス粒子内に取り込まれたRNPの規則的な配置

の重要性を検証した。

## 第一章 異なる株・型のインフルエンザウイルスにおけるウイルス粒子内への RNP の取り込み

これまでのインフルエンザウイルスのゲノムパッケージング研究では、その増殖性の高さから、一般的に、研究室で長年継代された A 型実験室株が用いられてきた。実験室株は発育鶏卵あるいは培養細胞で繰り返し継代されているため、発育鶏卵や培養細胞での増殖に適応している。一方、自然界で流行し、ヒトなどの感染個体から分離されたばかりの臨床分離株は、生体内の環境に適応しているため、増殖において実験室株とは異なる特性をもつと考えられる (Seladi-Schulman *et al.*, J Virol 2013)。そのため、A 型実験室株のみでなく、A 型臨床分離株についても、ゲノムパッケージング機構を明らかにする必要がある。さらに、A 型ウイルスと同様に季節性インフルエンザウイルスとして流行する B 型ウイルスや、C 型および D 型ウイルスのゲノムパッケージング機構を検討することで、インフルエンザウイルスに共通する RNP の取り込み様式を解明できる可能性が考えられる。

そこで本章では、A 型臨床分離株および異なる型のインフルエンザウイルスのウイルス粒子内に、RNP がどのように取り込まれるのかを電子顕微鏡法により解析した。実験には、A 型および B 型ウイルスの実験室株および臨床分離株と、C 型および D 型ウイルスを用いた。

超薄切片法により、感染細胞から出芽するウイルス粒子の横断面に認められた RNP の形状と本数を計測したところ、解析した全ての A 型および B 型株のウイルス粒子内に「7+1」配置で取り込まれた 8 本の RNP が認められた。7 分節のゲノムを持つ C 型および D 型ウイルスでは、ウイルス粒子内に「6+1」配置をとった 7 本の RNP が認められた。電子線トモグラフィ法を用いて、A 型および B 型ウイルスの実験室株および臨床分離株のウイルス粒子内に取り込まれた RNP の配置と本数を比較したところ、A 型臨床分離株、B 型ウイルスでは一部のウイルス粒子が 7 本以下の RNP を取り込むものの、解析した全てのウイルス株において 80%以上のウイルス粒子が 8 本の RNP を「7+1」配置で取り込んでいることが明らかになった。

以上の結果から、A 型および B 型インフルエンザウイルスは、株によらず、ほとんどのウイルス粒子が 8 本の RNP を「7+1」配置で取り込むことが示唆された。さらに、超薄切片法の結果より、C 型および D 型ウイルスでも、RNP が「6+1」の配置を取って取り込まれることが示唆されたことから、インフルエンザウイルスは株や型によらず、中心の 1 本の RNP を

残りの RNP が囲むような「n+1」配置で RNP を取り込む可能性が示された。

これらの結果から、インフルエンザウイルスの効率的な増殖において、RNP が「n+1」配置でウイルス粒子内に取り込まれることが重要であることが予想される。そこで第二章では、A 型インフルエンザウイルスの増殖における RNP の「7+1」配置の重要性を検証した。

## 第二章 A 型インフルエンザウイルスにおける RNP の「7+1」配置の重要性の検証

本章では、RNP の「7+1」配置の重要性を検証するため、増殖に必要な RNA 分節を一本欠損した 7 分節の変異 A 型インフルエンザウイルスを作製し、これらのウイルスに RNP がどのように取り込まれるのかを解析した。

実験では 7 分節ウイルスとして、HA 分節を欠いた HA(-)ウイルスと、NA 分節を欠いた NA(-)ウイルスをリバースジェネティクス法により作出し、HA 発現細胞あるいはシアリダーゼ存在下で培養して電子顕微鏡サンプルを作製した。その後、それぞれのウイルス粒子を電子線トモグラフィー法により解析した。その結果、7 分節ウイルスも野生型ウイルスと同様に、ウイルス粒子内に 8 本の RNP を「7+1」配置で取り込むことが明らかになった。HA(-)ウイルスに取り込まれた RNP の本数の割合を解析したところ、HA(-)ウイルスにおいてもほとんどのウイルス粒子に 8 本の RNP が規則的配置で取り込まれていた。以上の結果から、A 型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングにおける RNP の「7+1」配置の重要性が示唆された。

同様に、PB2 分節を欠いた PB2(-)ウイルスの作出も試みたが、電子顕微鏡での観察に十分なウイルス力価が得られなかった。そこで、PB2 分節のコード領域の一部を欠損させた PB2 internal deletion (ID)分節を有する PB2 ID ウイルスを作成し、PB2 発現細胞に感染させて電子線トモグラフィーを行った。その結果、PB2 ID ウイルスでは 8 本の RNP の取り込み効率が野生型よりも低下していた。一方、HA 分節のコード領域の一部を欠損させた HA ID 分節を有する HA ID ウイルスでは、8 本の RNP を取り込む効率が PB2 ID ウイルスほど低下していなかった。本研究の結果から、HA 分節および NA 分節と比較して、PB2 分節がより「7+1」配置での取り込みに重要であることが示唆された。

以上、一章と二章の結果から、インフルエンザウイルスの効率的な増殖には、ウイルス粒子内に RNP が「n+1」配置を取って取り込まれることが重要であることが示唆された。さら

に、A型インフルエンザウイルスは、増殖に必須の分節数に依らず、8本のRNPを「7+1」配置で取り込むこと、さらに、その取り込みには、特にPB2分節が重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究では、これまでのゲノムパッケージング研究とは異なり、様々な株や型のインフルエンザウイルスに焦点を当てることで、全てのインフルエンザウイルスに共通し得るRNPの取り込み様式を示した。RNPがウイルス粒子内に「n+1」配置をとって取り込まれる仕組みを担保している宿主因子やウイルス因子を明らかにすることで、ゲノムパッケージング機構のさらなる解明につながる事が考えられる。