

## 審査の結果の要旨

氏名 山地 玲奈

本研究の目的は、鳥由来の H5N1 ウイルスが、ヒトの呼吸器細胞で増えやすくなるために必要なアミノ酸変異を同定することである。本研究では、ヒト分離 H5N1 ウイルスと鳥分離 H5N1 ウイルスを比較することで、H5N1 ウイルスがヒトに適応するために必要なアミノ酸変異を同定しようと試み、下記の結果を得ている。

1. 2010年に Vietnam でヒトから分離された 7 株の H5N1 ウイルスは、A549 細胞(ヒト II 型肺胞上皮細胞)においていずれもよく増殖した。中でも A/Vietnam/UT36285/2010 (36285) は、哺乳動物における効率よい増殖に関わる既知のアミノ酸変異を持たないにも関わらず、A549 細胞においてよく増殖したことから、現在までに報告のない新しいアミノ酸変異を有する可能性があること示唆された。その一方で、2 株の鳥分離株 A/wild bird/Anhui/82/2005 (Wb/AH82-RG)、A/chicken/Vietnam/TY31/2005 (Ck/TY31-RG) は A549 細胞で低い増殖性を示した。これより、36285 と Wb/AH82-RG、36285 と Ck/TY31-RG の比較において、A549 細胞で H5N1 ウイルスがよく増殖するのに必要なアミノ酸変異を特定できると考えられた。
2. 36285 と Wb/AH82-RG 間の比較について。Reverse genetics 法を用いた組み換えウイルスの増殖を比較することで、2 株間の増殖の差には、最も PB2 が関わっていることが示された。そこで、36285 と Wb/AH82-RG の PB2 遺伝子を元にした PB2 キメラウイルスを作製し増殖を比較したところ、PB2 221-345 番目のアミノ酸が 2 株間の増殖の差に関わっていることが示された。PB2 の 221-345 番目までのアミノ酸配列のうち、36285 と Wb/AH82 間の違いは 249、309、339 番目の 3 か所であった。Wb/AH82-RG の PB2 遺伝子を元に、249、309、339 番目のアミノ酸を 1 箇所または複数箇所、36285 由来のアミノ酸に置換した PB2 変異ウイルスを作製し、A549 細胞における増殖を比較した。249G、339M、309D の 3 カ所を導入したウイルスは Wb-AH82-RG と比較し  $10^2$  PFU/ml 程増殖しやすくなり、249G、339M の 2 カ所を導入した変異ウイルス、309D 単独で導入した変異ウイルスも Wb-AH82-RG と比較しよく増えるようになった。以上の結果より、PB2-249G、339M、309D が 36285-RG と Wb/AH82-RG の増殖の差に関与することが示された。
3. 36285 と Ck/TY31-RG 間の比較について。Reverse genetics 法を用いた組み換えウイルスの増殖を比較することで、2 株間の増殖の差には、最も PA が関わっていることが示された。36285 と Ck/TY31-RG 間における PA のアミノ酸配列の違いは 25 か所であった。これら 25 か所のアミノ酸配列の中で、多くの鳥分離 H5N1 ウイルスにはない

がヒト分離株 36285 にはある、稀な配列は 9 か所(44, 85, 127, 231, 241, 305, 343, 401, 573 番目)であった。36285 の PA 遺伝子をもとに、9 か所のアミノ酸配列を 1 か所ずつ Ck/TY31 由来に置換した PA 変異ウイルスの増殖を観察したところ、44, 127, 241, 343, 573 番目のアミノ酸を鳥由来にすると増殖がやや低下することが示された。この結果を元に、Ck/TY31 の PA 遺伝子を元に 44, 127, 241, 343, 573 番目の 5 か所のアミノ酸をヒト由来に置換すると、PA 全体がヒト由来のウイルスと同等によく増殖した。また、44, 127, 241, 343, 573 番目の 5 か所のアミノ酸をヒト由来に置換すると、マウスにおける病原性は著しく上昇した。以上の結果より、PA-V44I、V127A、C241Y、A343T、I573V は、A549 細胞における 36285、Ck/TY31-RG の増殖の差、マウスにおける病原性の差に関わることが示された。

以上、本論文は、1 株のヒト分離株と 2 株の鳥分離株を比較することで、2 株間の A549 におけるウイルス増殖の差に関わるアミノ酸変異を特定した。鳥で流行している H5N1 ウイルスが、ヒトへ適応し効率よくヒト-ヒト感染するのに必要なアミノ酸変異、そしてメカニズムは完全には明らかになっていない。本研究で同定されたアミノ酸変異は、今後分離される H5N1 ウイルスのリスク評価、並びにヒトへの適応メカニズムの解明につながる重要な貢献をなすと考えられた。したがって学位の授与に値するものと考えられる。