

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05975

研究課題名(和文)豚インフルエンザウイルスの増殖性の分子基盤解明

研究課題名(英文)Molecular basis for replication of swine influenza viruses

研究代表者

小澤 真(OZAWA, Makoto)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：50568722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：畜産および公衆衛生の両面において重要な豚インフルエンザウイルスのウイルス学的特性の解明を目的として、ウイルスの人工合成技術を樹立・活用し、ブタ細胞における増殖性の分子基盤を解析した。ウイルスのポリメラーゼ活性を規定する4遺伝子分節だけでなく、全8遺伝子分節組み合わせが、ブタ細胞におけるウイルス増殖に重要であることが明らかとなった。また、現在の野外流行株の多くは、ブタ細胞において優れた増殖性を示す遺伝子分節構成を備えていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

豚インフルエンザウイルスは畜産衛生と公衆衛生の両面において重要な病原体であり、その特性の解明は社会的命題のひとつだが、ヒトの季節性インフルエンザウイルスや高病原性鳥インフルエンザウイルスと異なり、その分子レベルの基礎研究はほとんど進められていない。本研究で得られた豚インフルエンザウイルスのウイルス学的特性に関する新知見は、サーベイランスやワクチン開発など、様々な分野での応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To clarify virological characteristics of swine influenza viruses that are relevant to both animal and public health, the molecular basis for viral replication in swine cells was investigated using a molecular technique for artificial generation of viruses. The results revealed that all eight viral gene segments (not just the four required for viral polymerase activity) are critical for viral replication in swine cells. The results also suggest that swine influenza virus variants with a genetic constellation conferring remarkable replication ability in swine cells have become dominant in nature.

研究分野：ウイルス学、動物衛生学

キーワード：インフルエンザウイルス 豚 増殖性 分子基盤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

豚インフルエンザウイルスは、畜産衛生と公衆衛生の両面において重要な病原体であり、その特性の解明は社会的命題のひとつである。しかし、ヒトの季節性インフルエンザウイルスや高病原性鳥インフルエンザウイルスと比べ、分子レベルの基礎研究は著しく遅れている。これまでにを行った研究で、豚インフルエンザウイルスが国内飼養豚に広く蔓延していること(第64回日本ウイルス学会学術集会)、ヘマグルチニン(HA)やノイラミニダーゼ(NA)の亜型に関わらず、国内流行株の内部遺伝子分節のほとんどが pdm09 ウイルスに由来すること(引用文献 1,2)を明らかにした。これらの結果は、pdm09 ウイルスの内部遺伝子分節が、従来の『古典的豚ウイルス』と比べ、ブタ細胞における高い増殖性をウイルスへ付与することを示唆している。

### 2. 研究の目的

豚インフルエンザウイルスのブタ細胞における増殖性の分子基盤を解明すること。

### 3. 研究の方法

#### (1) 古典的豚ウイルスの人工合成系の樹立

豚インフルエンザウイルスの分子生物学的な基礎研究の実施体制を整備するため、H1N2 亜型古典的豚ウイルス株 A/swine/Miyazaki/1/2006(H1N2)を動物衛生研究部門・西藤岳彦インフルエンザ・プリオン病研究センター長より分与していただき、その人工合成系を樹立した。

#### (2) 古典的豚ウイルスと pdm09 ウイルスのブタ由来培養細胞における増殖性の比較

樹立した古典的豚ウイルスの人工合成系と、東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与していただいたパンデミック初期分離株 A/California/04/2009(H1N1)の人工合成系を組み合わせ、ウイルスの表面タンパク質をコードする HA および NA 遺伝子分節は古典的豚ウイルスに、残り6つの内部遺伝子分節は pdm09 ウイルスに由来する組換えウイルスを作出した。この組換えウイルスと野生型古典的豚ウイルスの増殖性を、様々なブタ由来培養細胞において比較した。

#### (3) pdm09 ウイルス由来内部遺伝子分節のウイルス増殖性に与える影響の評価

古典的豚ウイルスと pdm09 ウイルスの人工合成系を組み合わせ、両ウイルス株に由来する遺伝子分節を様々な構成で備えた組換えウイルス 24 種類の作出を試みた。作出できた組換えウイルスについては、ブタ由来培養細胞における増殖性を比較し、pdm09 ウイルス由来の内部遺伝子分節が増殖性に与える影響を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 古典的豚ウイルスの人工合成系の樹立

H1N2 亜型古典的豚ウイルス株 A/swine/Miyazaki/1/2006(H1N2)より抽出したウイルス RNA を鋳型としてプラスミドを構築し、古典的豚ウイルスの人工合成系を樹立した。この実験系を用いて人工的に作出したウイルスは、インフルエンザ研究で汎用されるイヌ腎臓由来細胞において、本来の分離株と同等の増殖性を示すことを確認した(図1)。

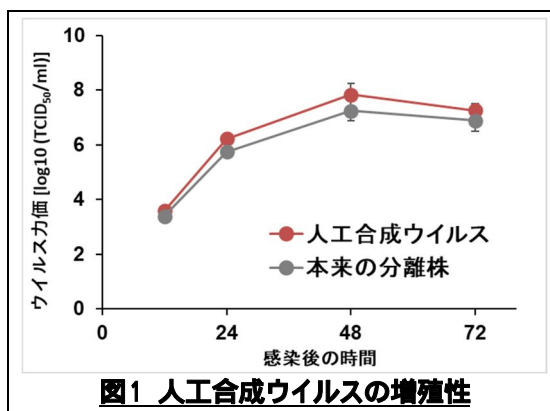


図1 人工合成ウイルスの増殖性

#### (2) 古典的豚ウイルスと pdm09 ウイルスのブタ由来培養細胞における増殖性の比較

pdm09 ウイルス由来の内部遺伝子を持つ組換えウイルスは、多くのブタ由来培養細胞において、古典的豚ウイルスよりも効率良く増殖した。とりわけブタ腎臓由来 PK13 細胞における両ウイルスの増殖性には顕著な差があった(図2左)ため、以降の実験では PK13 細胞を中心に解析を進めた。一方、両ウイルスのイヌ腎臓由来細胞における増殖性の差は限定的だった(図2右)。

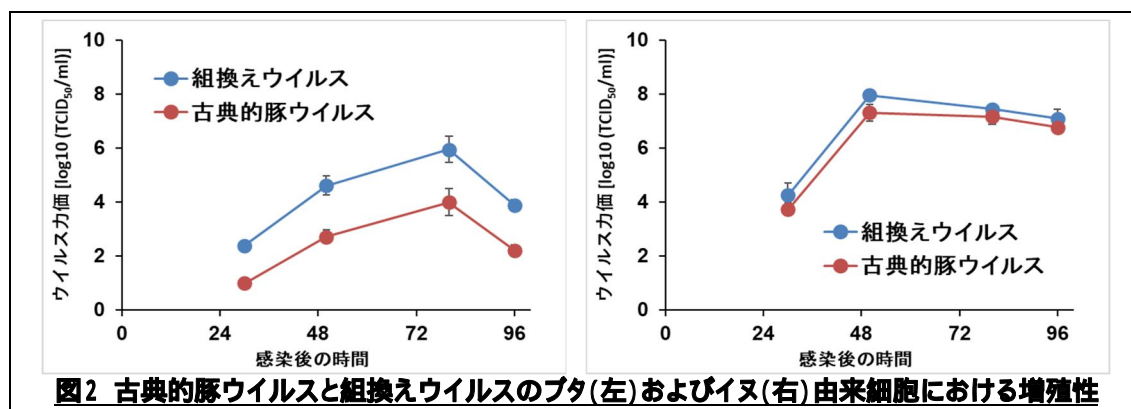


図2 古典的豚ウイルスと組換えウイルスのブタ(左)およびイヌ(右)由来細胞における増殖性

(3) pdm09 ウイルス由来内部遺伝子分節のウイルス増殖性に与える影響の評価

各遺伝子分節の由来:								作出	ウイルス名 (図4)
HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS		
CS	CS	CS	CS	CS	CS	CS	CS	■	古典的豚
CS	CS	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	■	pdmx6
CS	CS	pdm	CS	CS	CS	CS	CS	*	
CS	CS	CS	pdm	CS	CS	CS	CS	■	pdm-PB2
CS	CS	CS	CS	pdm	CS	CS	CS	*	
CS	CS	CS	CS	CS	pdm	CS	CS	■	pdm-NP
CS	CS	CS	CS	CS	CS	pdm	CS	■	pdm-M
CS	CS	CS	CS	CS	CS	CS	pdm	■	pdm-NS
CS	CS	pdm	CS	CS	CS	pdm	pdm	*	
CS	CS	CS	pdm	CS	CS	pdm	pdm	*	
CS	CS	CS	CS	pdm	CS	pdm	pdm	*	
CS	CS	CS	pdm	pdm	pdm	CS	CS	*	
CS	CS	pdm	CS	pdm	pdm	CS	CS	*	
CS	CS	pdm	pdm	CS	pdm	CS	CS	*	
CS	CS	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	*	
CS	CS	pdm	pdm	CS	pdm	pdm	pdm	*	
CS	CS	pdm	pdm	pdm	CS	pdm	pdm	■	CS-NP
CS	CS	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	CS	*	
CS	CS	pdm	pdm	pdm	pdm	CS	CS	*	
pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	CS	CS	■	pdmx6(HA+NA)

図3 24種の組換えウイルスの作出の成否

CS: 古典的豚ウイルス pdm: pdm09 ウイルス ■: 作出成功

作出を試みた遺伝子構成の異なる24種類の組換えウイルスのうち、8種類のウイルスのみが作出できた(図3)。6つの内部遺伝子分節のうち5分節が古典的豚ウイルス、残り1分節のみがpdm09ウイルスに由来する組換えウイルスは、PB2またはPA遺伝子分節がpdm09ウイルス由来のものを除く4種類が作出できた。一方、5分節がpdm09ウイルス、残り1分節だけが古典的豚ウイルスに由来する組換えウイルスは、NP遺伝子が古典的豚ウイルスに由来する1種類のみが作出できた。

従来のA型インフルエンザウイルス研究の中で、ウイルスのポリメラーゼ活性を規定する4遺伝子分節(PB2、PB1、PA、およびNP遺伝子分節)の組み合わせが、ウイルスの増殖性に重要な役割を果たしていることが繰り返し示されてきた。しかし本研究では、ポリメラーゼ関連の4遺伝子分節がpdm09ウイルス由来であっても、MまたはNS遺伝子分節が古典的豚ウイルス由来の組換えウイルスはほとんど作出できず、HAおよびNA遺伝子分節も含めた6遺伝子分節がpdm09ウ

イルス由来の組換えウイルスのみが作出できた。

作出できた8種類の組換えウイルスのPK13細胞における増殖性を比較した結果、実際の野外流行株でも見られる遺伝子構成を持つウイルス、つまりHAおよびNA遺伝子分節が古典的豚ウイルス由来、およびHA、NA、およびNP遺伝子分節が古典的豚ウイルス由来の2種類の組換えウイルスが、試験した2つのタイムポイントの両方において野生型古典的豚ウイルスよりも優位に高いウイルス力価を示した(図4)。

以上の結果から、ブタ細胞において優れた増殖性を示す遺伝子分節構成を備えたウイルスが、豚インフルエンザウイルス野外流行株の主流となっていることが示唆された。

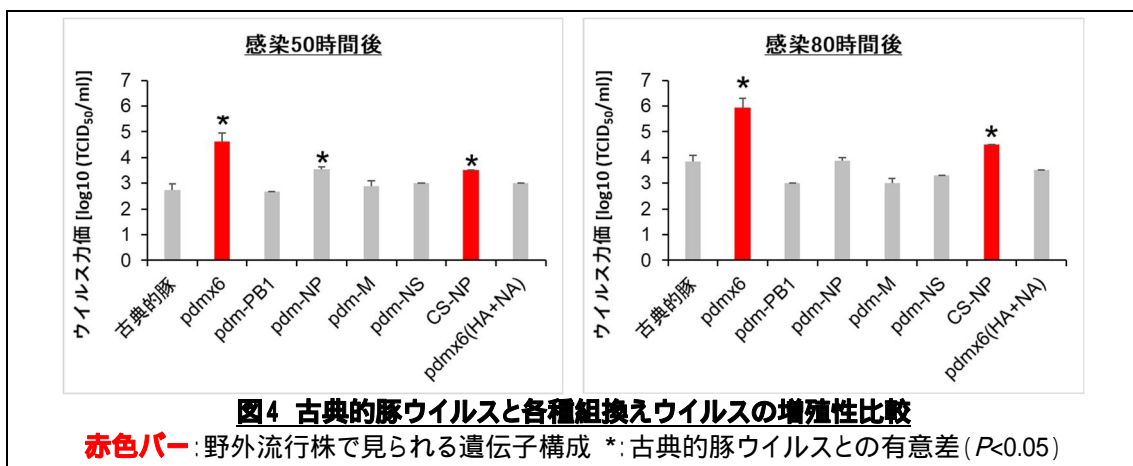


図4 古典的豚ウイルスと各種組換えウイルスの増殖性比較

赤色バー: 野外流行株で見られる遺伝子構成 \*: 古典的豚ウイルスとの有意差 (P<0.05)

< 引用文献 >

- Ozawa M, Matsuu A, Yonezawa K, Igarashi M, Okuya K, Kawabata T, Ito K, Tsukiyama-Kohara K, Taneno A, Deguchi E. Efficient isolation of Swine influenza viruses by age-targeted specimen collection. J Clin Microbiol 53, 1331-1338 (2015).
- Okuya K, Matsuu A, Kawabata T, Koike F, Ito M, Furuya T, Taneno A, Akimoto S, Deguchi E, Ozawa M. Distribution of gene segments of the pandemic A(H1N1) 2009 virus lineage in pig populations. Transbound Emerg Dis 65, 1502-1513 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okuya K., Matsuu A., Kawabata T., Koike F., Ito M., Furuya T., Taneno A., Akimoto S., Deguchi E., Ozawa M.	4. 巻 65
2. 論文標題 Distribution of gene segments of the pandemic A(H1N1) 2009 virus lineage in pig populations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transboundary and Emerging Diseases	6. 最初と最後の頁 1502 ~ 1513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tbed.12887	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------