

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670227

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの遺伝子変異率を規定する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis for the regulation of gene mutation rate in 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：A型インフルエンザウイルスの遺伝子変異率を規定する分子基盤を解明するため、ウイルスのPB1遺伝子にランダムな変異を持つウイルスライブラリーを構築した。このウイルスライブラリーの中から、(1)抗ウイルス薬に対する感受性が低下したウイルスクローン、ならびに(2)レポーター遺伝子の発現安定性が上昇したウイルスクローンを選抜した。各ウイルスクローンの遺伝子変異率のレポーターアッセイによる確認とPB1遺伝子の解析を通じて、遺伝子変異率を上昇ならびに低下させるPB1遺伝子変異を同定した。

研究成果の概要(英文)：To determine the molecular basis for the regulation of gene mutation rate in influenza A viruses, we generated recombinant influenza A virus library possessing random mutation(s) in the PB1 gene. We selected virus clones exhibiting (1) reduced sensitivity to antiviral and (2) enhanced stability of the reporter gene expression. Through validation of the mutation rate of the selected virus clones by means of reporter assays and sequencing of the PB1 genes, we identified the PB1 gene mutations that enhance and reduce the viral mutation rates, respectively.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス 遺伝子変異率 分子基盤 ウイルスライブラリー

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む様々な動物に感染して多大な健康・経済被害をもたらす A 型インフルエンザウイルスは、RNA 遺伝子をゲノムとする。RNA 遺伝子の合成を担う RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp) には、遺伝子の転写・複製時にミスが生じた際の修復・校正機能 (proofreading 活性) が備わっていないため、RNA ウイルスの遺伝子変異率は、DNA をゲノムとする生命体と比べて極端に高い。この遺伝的特性は、多くの子孫ウイルスが感染・増殖性を失うデメリットを伴う一方で、遺伝的多様性の観点からは大きなメリットとなる。とりわけインフルエンザウイルスの場合、その遺伝子変異率の高さが、宿主免疫からの回避や新たな宿主への適応、薬剤耐性化などに寄与していると考えられる。

インフルエンザウイルスの RNA 遺伝子は、3 種類の RNA ポリメラーゼ・サブユニット (PB2、PB1、PA 蛋白質) の協調作用により転写・複製される。このうち PB1 蛋白質は、全ての RNA ウイルスに幅広く保存されている RdRp モチーフを 4 つ有し、RNA 遺伝子の転写・複製過程において中心的な役割を担う。近年、この RdRp モチーフが、RNA ウイルスの遺伝子変異率に影響を及ぼす可能性が示唆されているが、その分子基盤を解明するための実験系は確立されていなかった。

2. 研究の目的

PB1 蛋白質の RdRp モチーフを解析対象として、A 型インフルエンザウイルスのウイルス遺伝子変異率を規定する分子基盤を解明すること。

3. 研究の方法

PB1 遺伝子分節の cDNA をコードしたプラスミドを鋳型として、Fidelity の低い DNA Polymerase を用いた PCR によりランダムな塩基置換を導入する『Error-prone PCR 法』により、PB1 遺伝子の RdRp モチーフを含む 303~482 番目のアミノ酸 (全 180 アミノ酸残基) の領域を増幅した。この際、あらかじめ 1 クローン当たり概ね 1~2 アミノ酸がランダムに置換される PCR 条件を検討した。

増幅遺伝子産物を、野生型 PB1 遺伝子分節をコードするウイルス RNA 発現用プラスミドの該当領域へクローニングし、ランダムな塩基置換を伴う PB1 遺伝子発現プラスミドライブラリーを調整した。この際、180 アミノ酸残基中 1~2 カ所にランダムなアミノ酸置換を導入するには、理論上 6.4×10^6 ($=180C_2 \times 20^2$) の多様性が必要となるので、各変異体のプラスミドを 10 コピー以上ずつ回収するため、形質転換した大腸菌数が 6.4×10^7 コロニー形成単位を超えるよう、ライゲーションや形質転換などの反応条件を最適化した。

で調整したプラスミドライブラリーを

用いて、培養細胞へのプラスミド導入により感染性インフルエンザウイルスを作出する技術『リバースジェネティクス法 (Neumann et al., 1999, PNAS)』を実施し、ランダムな PB1 蛋白質変異体を発現するウイルスライブラリーを構築した。この際、より多くの PB1 蛋白質変異体発現ウイルスの解析を可能とするため、培養上清中のウイルス力価ができるだけ高くなるよう、実験条件を最適化した。

抗インフルエンザ薬のひとつで、耐性ウイルスが出現しにくいことで知られるウイルスのノイラミニダーゼ活性阻害剤のひとつ・ペラミビル存在下で構築したウイルスライブラリーを培養細胞へ接種し、明瞭なプラークを形成したウイルス 12 株をクローニングした。この 12 株の全長 PB1 遺伝子の塩基配列を解析し、互いに異なる位置に非同義置換を有する 6 株を見出した。

で調整したプラスミドライブラリーを用いて、野生型 HA 遺伝子の代わりに、翻訳領域の大部分を GFP 遺伝子に置換した組換え HA 遺伝子 (Watanabe et al., 2003, J Virol) をコードする HA 遺伝子分節有する HA 遺伝子欠損・GFP 遺伝子発現ウイルスライブラリーを、リバースジェネティクス法により構築した。

で構築したウイルスライブラリーを HA 発現細胞へ接種し、GFP 陽性プラーク 320 個からウイルス株をクローニングした。これらのウイルス株を、野生型 PB1 遺伝子を持つ HA 遺伝子欠損・GFP 遺伝子発現ウイルス 8 株と共に HA 発現細胞で継代した。全ての野生型 PB1 遺伝子を持つウイルスの感染細胞における GFP 発現が確認できなくなった 8 継代目で、感染細胞における明瞭な GFP 発現が確認できたウイルス 6 株をクローニングした。この 6 株を HA 発現細胞へ接種し、50% 以上のプラークで GFP を発現する 3 株を見出した。この 3 株の全長 PB1 遺伝子の塩基配列を解析し、互いに異なる位置に非同義置換を有することを確認した。

ルシフェラーゼ遺伝子をコードしたミニゲノム発現プラスミド、ならびにルシフェラーゼ遺伝子の途中に人為的にストップコドンを導入した変異ミニゲノムの発現プラスミドを構築した。あらかじめこれらのプラスミドを導入した培養細胞へ、とで見出した計 9 株の変異ウイルス、ならびに野生型ウイルスを接種し、ルシフェラーゼ活性を指標に、野生型ウイルスとの遺伝子変異率の差異を確認した。

4. 研究成果

A 型インフルエンザウイルスの遺伝子変異率を上昇させる可能性が高い 6 種類の PB1 遺伝子変異、ならびに低下させる可能性が高い 3 種類の PB1 遺伝子変異を同定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計16件)

1. Kanda T, Ozawa M, Tsukiyama-Kohara K. IRES-mediated translation of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in cultured cells derived from FMDV-susceptible and -insusceptible animals. *BMC Vet Res* 12, 66 (2016).【査読有】DOI: 10.1186/s12917-016-0694-8
2. Katsura H, Fukuyama S, Watanabe S, Ozawa M, Neumann G, Kawaoka Y. Amino acid changes in PB2 and HA affect the growth of a recombinant influenza virus expressing a fluorescent reporter protein. *Sci Rep* 6, 19933 (2016).【査読有】DOI: 10.1038/srep19933
3. Masatani T, Ozawa M, Yamada K, Ito N, Horie M, Matsuu A, Okuya K, Tsukiyama-Kohara K, Sugiyama M, Nishizono A. Contribution of the interaction between the rabies virus P protein and I-kappa B kinase to the inhibition of type I IFN induction signalling. *J Gen Virol* 97, 316-326 (2016).【査読有】DOI: 10.1099/jgv.0.000362
4. Okuya K, Kawabata T, Nagano K, Tsukiyama-Kohara K, Kusumoto I, Takase K, Ozawa M. Isolation and characterization of influenza A viruses from environmental water at an overwintering site of migratory birds in Japan. *Arch Virol* 160, 3037-3052 (2015).【査読有】DOI: 10.1007/s00705-015-2610-0
5. Ozawa M, Kawabata T, Okuya K, Nagano K, Kanda T, Kanazawa N, Tsukiyama-Kohara K, Taneno A, Deguchi E. Full genome sequences of torque teno sus virus strains that coinfect a pig with postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan: implications for genetic diversity. *Arch Virol* 160, 3067-3074 (2015).【査読有】DOI: 10.1007/s00705-015-2593-x
6. Uraki R, Piao Z, Akeda Y, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Ozawa M, Oishi K, Kawaoka Y. A bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from secondary pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* (2015).【査読有】DOI: 10.1093/infdis/jiv341
7. Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. Molecular Determinants of Virulence and Stability of a Reporter-Expressing H5N1 Influenza A Virus. *J Virol* 89, 11337-11346 (2015).【査読有】DOI: 10.1128/JVI.01886-15
8. Matsuu A, Hobo S, Ando K, Sanekata T, Sato F, Endo Y, Amaya T, Osaki T, Horie M, Masatani T, Ozawa M, Tsukiyama-Kohara K. Genetic and serological surveillance for non-primate hepacivirus in horses in Japan. *Vet Microbiol* 179, 219-227 (2015).【査読有】DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.05.028
9. Taft AS, Ozawa M, Fitch A, Depasse JV, Halfmann PJ, Hill-Batorski L, Hatta M, Friedrich TC, Lopes TJ, Maher EA, Ghedin E, Macken CA, Neumann G, Kawaoka Y. Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian H5N1 influenza virus. *Nat Commun* 6, 7491 (2015).【査読有】DOI: 10.1038/ncomms8491
10. Ozawa M, Matsuu A, Tokorozaki K, Horie M, Masatani T, Nakagawa H, Okuya K, Kawabata T, Toda S. Genetic diversity of highly pathogenic H5N8 avian influenza viruses at a single overwintering site of migratory birds in Japan, 2014/15. *Euro Surveill* 20, 15-27 (2015).【査読有】<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21132>
11. 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).【査読有】DOI: 10.1128/JCM.02941-14
12. Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, Ozawa M, Ando T, Shoemaker JE, Ishikawa I, Yamada S, Neumann G, Watanabe S, Kitano H, Kawaoka Y. Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies. *Nat Commun* 6, 6600 (2015).【査読有】DOI: 10.1038/ncomms7600
13. Uraki R, Das SC, Hatta M, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Ozawa M, Coban C, Ishii KJ, Kawaoka Y. Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine. *Vaccine* 32, 5295-5300 (2014).【査読有】DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.07.079
14. Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Yamada S, Uchida Y, Saito T, Takahashi K, Sugaya N, Tashiro M, Kawaoka Y. Detection sensitivity of influenza rapid diagnostic tests. *Microbiol Immunol* 58, 600-606

- (2014). 【査読有】 DOI: 10.1111/1348-0421.12185
15. Ezzikouri S, Ozawa M, Kohara M, Elmdaghri N, Benjelloun S, Tsukiyama-Kohara K. Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. *J Med Virol* 86, 925-932 (2014).【査読有】 DOI: 10.1002/jmv.23916
 16. Fonseca W, Ozawa M, Hatta M, Orozco E, Martinez MB, Kawaoka Y. A recombinant influenza virus vaccine expressing the F protein of respiratory syncytial virus. *Arch Virol* 159, 1067-1077 (2014). 【査読有】 DOI: 10.1007/s00705-013-1932-z
- 〔学会発表〕(計22件)
1. International Symposium: Development of Effective PED and TGE vaccine and its application. Makoto Ozawa. Characterization of porcine epidemic diarrhea (PED) virus field strains. Nigiwai Koryukan AU (Akita, Japan). February 27, 2016.
 2. 第63回日本ウイルス学会学術集会 Dongming Zhao, 福山 聡、山田 晋弥、Lopes Tiago, 前村 忠、桂 廣亮、小澤 真、渡邊 真治、Gabriele Neumann、河岡 義裕 「In vitro and in vivo characterization of an H5N1 influenza A virus expressing a reporter gene」 福岡国際会議場 2015年11月23日
 3. 第63回日本ウイルス学会学術集会 小澤 真、松鶴 彩、所崎 香織、堀江 真行、正谷 達膳、中川 寛子、奥谷 公亮、川畑 淑子、戸田 重久 「H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝的多様性」 福岡国際会議場 2015年11月22日
 4. 第63回日本ウイルス学会学術集会 正谷 達膳、山田 健太郎、堀江 真行、小澤 真、伊藤 直人、松鶴 彩、杉山 誠、小原 恭子、西園 晃 「狂犬病ウイルス街上毒 1088 株 P 蛋白質による IKK 介在シグナル抑制」 福岡国際会議場 2015年11月22日
 5. 第158回日本獣医学会学術集会 Chimene Nze Nkogue, 藤田 志歩、堀江 真行、Michiko Ogino, Yuki Kobayashi, Keijiro Mizukami, 正谷 達膳、小澤 真、Alfred Ngomanda, Juichi Yamagiwa, 大和 修、水谷 哲也、小原 恭子 「Infectious disease assessment in wild gorillas in African rainforest(Gabon): case of adenovirus」 北里大学 2015年9月9日
 6. 第158回日本獣医学会学術集会 藤井 祐至、岡寺 康太、三竹 博道、伊藤 直人、岡田 和真、中川 賢人、岡崎 克則、迫田 義博、高田 礼人、小澤 真、正谷 達膳、杉山 誠 「渡り鳥から検出された新型口ウイルス A の遺伝学的解析」 北里大学 2015年9月8日
 7. 第158回日本獣医学会学術集会 松鶴 彩、所崎 香織、寸田 祐嗣、森田 剛仁、川口 博明、堀江 真行、正谷 達膳、中川 寛子、奥谷 公亮、川畑 淑子、戸田 重久、小原 恭子、小澤 真 「2014-15年冬季に鹿児島県出水平野で分離された H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの解析と感染野鳥における特徴」 北里大学 2015年9月7日
 8. The 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging. Pig Diseases 2015. M. Ozawa, A. Matsuu, K. Yonezawa, M. Igarashi, K. Okuya, T. Kawabata, K. Ito, K. Tsukiyama-Kohara, A. Taneno, E. Deguchi. Efficient isolation of Swine influenza viruses by age-targeted specimen collection. Kyoto International Conference Center. June 23, 2015.
 9. The 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging. Pig Diseases 2015. K. Akioka, H. Kawaguchi, K. Onoue, M. Ozawa, M. Horie, M. Noguchi, A. Tanimoto, N. Miyoshi. Infectious experimental model of Neonatal Microminipig in ABSL2 Facility. Kyoto International Conference Center. June 23, 2015.
 10. The 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging. Pig Diseases 2015. K. Onoue, H. Kawaguchi, M. Ozawa, M. Horie, K. Akioka, M. Noguchi, A. Tanimoto, N. Miyoshi. Development of Microminipig infected model of porcine endemic diarrhea (PED). Kyoto International Conference Center. June 23, 2015.
 11. 第62回日本ウイルス学会学術集会 齊藤 誠、安井 文彦、棟方 翼、飛田 良美、小澤 真、小原 恭子、伊東 利紗、菅 裕明、佐々木 亨、窪田 規一、小原 道法 「亜型を超えた感染阻害活性を示すヘマグルチニン結合性特殊環状ペプチド」 パシフィコ横浜 会議センター 2014年11月12日
 12. 第62回日本ウイルス学会学術集会 浦木 隆太、木曾 真紀、岩附(堀本) 研子、山吉 誠也、小澤 真、Coban Cevayir、石井 健、河岡 義裕 「インフルエンザワクチンに対するヘモゾインのアジュバンド効果の検証」 パシフィコ横浜 会議センター 2014年11月12日
 13. 第62回日本ウイルス学会学術集会 福山 聡、桂 廣亮、Dongming Zhao、安東 友美、Jason E. Shoemaker、小澤 真、河岡 義裕 「生体イメージングを用いたインフルエンザウイルスに対する宿主応答解析」

- パシフィコ横浜 会議センター 2014 年 11 月 12 日
14. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 Sayeh Ezzikouri、池 海英、真田 崇弘、永野 希織、山口 千穂、神田 雄大、金澤 伯弘、奥谷 公亮、上野 晃聖、中川 寛子、Chimene Nze Nkogue、三好 宣彰、小澤 真、Soumaya Benjelloum、村上 周子、田中 靖人、小原 道法、小原 恭子 「Development of Tupaia belangeri for HBV persistent infection」 パシフィコ横浜 会議センター 2014 年 11 月 10 日
 15. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 小澤 真、松鶴 彩、米澤 弘毅、五十嵐 学、奥谷 公亮、川畑 淑子、伊藤 公人、小原 恭子、種子野 章、出口 栄三郎 「豚インフルエンザウイルスの効率的なサーベイランス方法の検討」 パシフィコ横浜 会議センター 2014 年 11 月 10 日
 16. 平成 26 年度獣医学術九州地区学会 小澤 真 「家畜におけるインフルエンザ」 かごしま県民交流センター（鹿児島）2014 年 10 月 4 日
 17. 第 157 回日本獣医学会学術集会 Chimene Nze Nkogue、藤田 志歩、荻野 倫子、水上 圭二郎、正谷 達膳、小澤 真、堀江 真行、Ngomanda, A、山極 寿一、大和 修、水谷 哲也、小原 恭子 「Infectious disease assessment in wild gorillas in African rainforest (Gabon) : case of adenovirus」 北海道大学 2014 年 9 月 11 日
 18. 第 157 回日本獣医学会学術集会 小澤 真、川畑 淑子、奥谷 公亮、永野 希織、神田 雄大、金澤 伯弘、小原 恭子、出口 栄三郎 「豚トルクテノウイルスの遺伝的多様性」 北海道大学 2014 年 9 月 11 日
 19. 第 157 回日本獣医学会学術集会 松鶴 彩、帆保 誠二、小澤 真、堀江 真行、正谷 達膳、佐藤 文夫、遠藤 祥郎、安藤 邦英、藤井 良和、天谷 友彦、小原 恭子 「全国の馬における非霊長類由来へパシウイルスの感染状況」 北海道大学 2014 年 9 月 10 日
 20. 第 157 回日本獣医学会学術集会 奥谷 公亮、川畑 淑子、永野 希織、小原 恭子、楠元 勇、高瀬 公三、小澤 真 「ツルのインフルエンザウイルスに対する感受性の検討」 北海道大学 2014 年 9 月 10 日
 21. 第 51 回日本ウイルス学会九州支部総会 池 海英、Ezzikouri, S.、真田 崇弘、永野 希織、山口 千穂、神田 雄大、金澤 伯弘、奥谷 公亮、上野 晃聖、中川 寛子、Chimene Nze Nkogue、小澤 真、小原 道法、小原 恭子 「ツパイを用いた HCV 感染・発症モデル系並びに治療評価系の開発」 城山観光ホテル（鹿児島）2014 年 9 月 5 日
 22. XVI International Congress of Virology.

R Uraki, Z Piao, Y Akeda, K Iwatsuki-Horimoto, M Kiso, M Ozawa, K Oishi, Y Kawaoka. A bivalent vaccine based on a replication-incompetent influenza A virus possessing pneumococcal surface protein A protects mice from secondary pneumococcal infection. Montréal (Canada). July 28, 2014.

〔図書〕(計 7 件)

1. 小澤 真、河岡 義裕「専門家に聞くインフルエンザウイルス講座 第7回 インフルエンザの診断法」インフルエンザ 2016 年 1 月号 39-42 ページ
2. 小澤 真、河岡 義裕「専門家に聞くインフルエンザウイルス講座 第6回 H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザについて」インフルエンザ 2015 年 10 月号 57-60 ページ
3. 小澤 真、河岡 義裕「専門家に聞くインフルエンザウイルス講座 第5回 抗インフルエンザウイルス薬の過去・現在・未来」インフルエンザ 2015 年 4 月号 47-49 ページ
4. 小澤 真、河岡 義裕「専門家に聞くインフルエンザウイルス講座 第4回 インフルエンザウイルスの受容体と種特異性」インフルエンザ 2015 年 1 月号 57-59 ページ
5. 小澤 真、河岡 義裕「専門家に聞くインフルエンザウイルス講座 第3回 インフルエンザウイルスの病原性と伝播性」インフルエンザ 2014 年 10 月号 49-51 ページ
6. 小澤 真「生産者が知っておきたい豚インフルエンザの基本と対策」養豚界 2014 年 9 月号 46-47 ページ
7. 小澤 真、河岡 義裕「専門家に聞くインフルエンザウイルス講座 第2回 インフルエンザウイルスの宿主域と命名法」インフルエンザ 2014 年 4 月号 53-55 ページ

6. 研究組織

(1) 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