

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20619

研究課題名（和文）8分節D型インフルエンザウイルスを用いたM1・M2タンパク質の機能解析

研究課題名（英文）Construction of an eight-segment influenza D virus with M1 and M2 genes.

研究代表者

石田 大歩（Ishida, Hiroho）

麻布大学・獣医学部・助教

研究者番号：40963476

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：D型インフルエンザウイルス（IDV）はウシ呼吸器病症状候群の原因ウイルスの一つと考えられている。IDVは7本に分節化したゲノムを有し、M分節にはM2(p42)及びM1タンパク質がコードされている。今回、リバースジェネティクス法により、M1とM2(p42)遺伝子をそれぞれ別の分節にもつ8分節IDVに成功した。また10アミノ酸ずつ欠損させたM1・M2(p42)タンパク質を有する組換え欠損ウイルスの作出を試みた。その結果、M1・p42タンパク質間で共通のアミノ酸領域の内、6つの領域で、p42タンパク質では必須の機能を有していない一方で、M1タンパク質では重要な機能を担っていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、M1とM2(p42)遺伝子をそれぞれ別の分節(M1とM2分節)にもつ8分節型IDVの作出法を確立した。本手法は、M1・M2タンパク質の機能の個別解析を可能にするため、IDVの分子生物学的解析の新しい基盤に成り得ると期待される。また、それぞれのタンパク質に独立した変異の導入を可能にするため、M1・M2タンパク質を標的にした弱毒生ワクチン開発への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：Influenza D virus (IDV) is considered to be one of the causative viruses of bovine respiratory disease complex. In this study, an eight-segmented IDV with M1 and M2 (p42) genes in separate segments was successfully generated by reverse genetics. We also attempted to generate a partial deletion virus with M1 and M2 (p42) proteins deleted by 10 amino acids each. The results revealed that six of the amino acid regions common to both M1 and M2 (p42) proteins have important functions in the M1 protein while not essential functions in the p42 protein.

研究分野：獣医学

キーワード：D型インフルエンザウイルス インフルエンザウイルス オルソミクソウイルス 牛呼吸器病症状候群 リバースジェネティクス M1 P42 M2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

D 型インフルエンザウイルス (IDV) は、2011 年に呼吸器症状を呈するブタから発見された新しいウイルスである。その後の疫学調査によって IDV の本来の宿主はウシであり、経済損失が最も大きい BRDC の主要因ウイルスであることがわかってきた。そのため IDV のワクチンの導入によって BRDC を制御出来る可能性がある。一方、IDV の不活化ワクチン効果をウシで検証した報告によると、その感染防御効果は高くなかった。したがって、感染防御免疫を効率良く誘導するためには不活化ワクチンよりも効果の高い弱毒生ワクチンが必要である。しかし、弱毒化のために必要な IDV の病原性や増殖性に関するウイルス学的性状解析の報告はほとんどされていない。

IDV は、7 本に分節化したゲノムを有し、M 分節のスプライシング mRNA からは、エンベロープを裏打ちする M1 タンパク質が翻訳される。一方、非スプライシング mRNA からはシグナルペプチドを持った前駆体タンパク質 p42 が翻訳され、その後切断されることで、膜貫通型イオンチャネルである M2 タンパク質が生成される。近縁な C 型インフルエンザウイルス(ICV)の M1 と M2 タンパク質では、ウイルスの複製や増殖性に関与する様々な機能が報告されている。そのため IDV の M1 と M2 タンパク質の機能を解析することで、弱毒化のために必要な病原性や増殖性に関わる知見を得られる可能性がある。しかし、通常の M 分節では、一方の遺伝子に変異を導入した場合、もう片方の遺伝子にも変異が生じてしまうため、これらのウイルスタンパク質の機能を個別に解析するための変異ウイルスの作出は困難である。

これに対し、M 分節を改変し、M1 および M2 タンパク質を独立して発現するウイルスの作出法を確立することで、これらのタンパク質の機能を個別に明らかにすることが出来ないかという学術的な「問い」が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、M1 と M2(p42)遺伝子をそれぞれ別の分節(M1 と M2 分節)にもつ 8 分節型 IDV 作出法の確立、および ウイルスの増殖性や複製に関連した M1・M2 タンパク質の機能ドメインを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

M1・M2 タンパク質の機能の個別解析の手法として、M1 と M2(p42)遺伝子を別々の分節に組み入れた 8 分節型 IDV の作出を試みた。具体的には、IDV の M1 遺伝子内のスプライシングアクセプター配列にサイレント変異を入れることで p42 遺伝子のみを発現する RG 用プラスミドを構築した。また M 分節のイントロン領域を欠損させることで、M1 遺伝子のみを発現させる RG 用プラスミドも構築した。これらのプラスミドと M 分節以外の各分節発現プラスミドを用い、申請者が以前に開発した RG 法によりウイルス作出を行った。組換えウイルスの作出可否は、RT-PCR による RNA 分節の検出とシーケンス解析で判定した。

次に、ウイルスの複製や増殖に関与する M1・M2 タンパク質の機能ドメインを明らかにするために、アミノ酸を部分的に欠損させた M1 あるいは M2 タンパク質を有する 8 分節型 IDV の作出を試みた。具体的には、10 アミノ酸ずつ欠損させた M1 分節発現プラスミドを構築し、これを RG 法に用いることで組換え欠損ウイルスの作出を行った。また P42 タンパク質についても同様な欠損ウイルスの作出を行った。作出可否は、RT-PCR による RNA 分節の検出とシーケンス解析で判定し、これにより、ウイルス産生に関わる必須機能ドメインの同定を行った。

4. 研究成果

研究計画当初、M1 遺伝子内のスプライシングアクセプター配列にサイレント変異を入れることで p42 遺伝子のみを発現する RG 用プラスミドを構築する予定であったが、プラスミドクロニングが上手くいかなかった。そこで、スプライシングアクセプターではなくスプライシングドミナント配列にサイレント変異を入れることで p42 遺伝子のみを発現する RG 用プラスミドを構築した。このプラスミドと IDV のウイルスポリメラーゼタンパク質 (PB2、PB1、P3) とヌクレオチドタンパク質 (NP) 発現プラスミドを細胞にトランスフェクトしたところ、mRNA のスプライシングは生じず、M1 遺伝子は発現されることが確認された (図 1)。この p42 遺伝子発現プラスミドと M1 遺伝子発現プラスミドを M 分節以外の各分節発現プラスミドと共に細胞へトランスフェクトすることで M1 と M2(p42)遺伝子をそれぞれ別の分節(M1 と M2 分節)にもつ 8 分節型 IDV (rIDV-8seg-M) の作出に成功した。作出したウイルスの増殖性を調べたところ、rIDV-8seg-M は野生型の 7 分節ウイルス (wt-IDV) よりも著しく低い増殖性を示した (図 2)。また、感染性ウイル

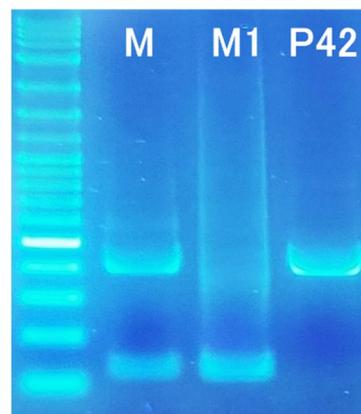


図 1. スプライシング阻害の確認

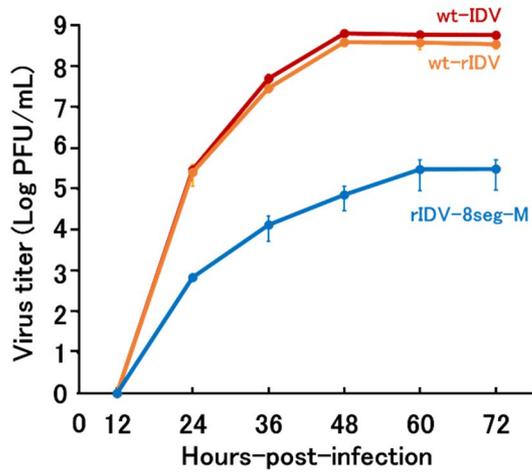


図2. ウイルスの増殖曲線

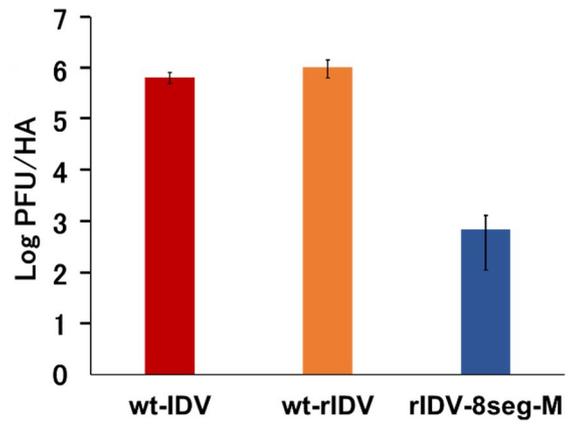


図3. 感染性ウイルス粒子の割合

ス粒子 (PFU) と赤血球凝集価 (HA; ウイルス抗原量としての指標) の割合を調べたところ、野生型ウイルスに比べて、rIDV-8seg-M は 100 倍以上低値を示した (図3)。これらのことから、8 分節化に伴い、感染性ウイルス粒子の割合が低下することがウイルスの増殖性に影響している可能性が考えられた。ウイルスゲノムの 8 分節化によるウイルス弱毒化効果をさらに検証することで、ワクチン開発に有用な知見が得られる可能性がある。

次にウイルスの複製や増殖に関与する M1・M2 (p42) タンパク質の機能ドメインを明らかにするために、アミノ酸を部分的に欠損させた M1 あるいは p42 タンパク質を有する 8 分節型 IDV の作出を試みた。具体的には、10 アミノ酸ずつ欠損させた M1 あるいは p42 分節発現プラスミドを構築し、これらを RG 法に用いることで組換え欠損ウイルスの作出を行った。M1 タンパク質に関しては、すべての部分欠損ウイルスが作出不可となった。一方、p42 タンパク質に関しては、6 つの領域で部分欠損ウイルスを作出することが出来た (図4)。いずれの領域も、M1 タンパク質と共通のアミノ酸領域であったことから、これらの領域が p42 タンパク質では必須の機能を有していない一方で、M1 タンパク質では重要な機能を担っていることが示唆された。

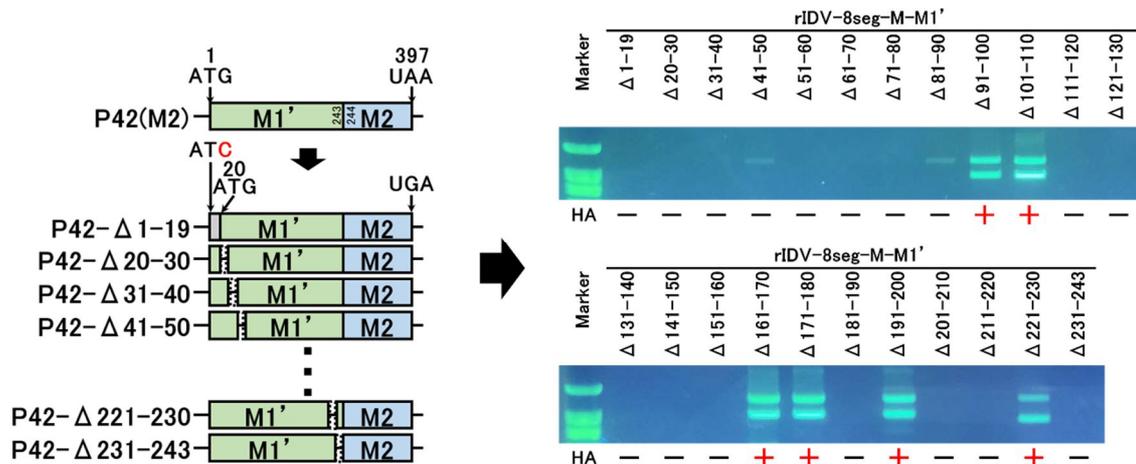


図4. p42 タンパク質の M1' 領域を欠損させた rIDV-8seg-M の作製

本研究で確立された手法は、M1・M2 タンパク質の機能の個別解析を可能にするため、IDV の分子生物学的解析の新しい基盤に成り得ると期待される。また、それぞれのタンパク質に独立した変異の導入を可能にするため、M1・M2 タンパク質を標的にした弱毒生ワクチン開発への応用も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田大歩、水野俊太郎、村上裕信、村上晋、堀本泰介、長井誠
2. 発表標題 M1・M2遺伝子を別の分節に持つ8分節D型インフルエンザウイルスの作出
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------