

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12812

研究課題名（和文）運動能と情報処理能を持つ自律探査型ウイルスベクターの開発

研究課題名（英文）Development of autonomous searching-type viral vector with motility and intelligence

研究代表者

堺 立也（Sakai, Tatsuya）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00309543

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）：インフルエンザウイルスの感染行動解析により、ヒトウイルスに近い行動パターンのウイルスがトリウイルスの中に存在することが明らかになった。これまでミズドリを宿主とするウイルスは、ヒトへ感染しないと考えられていた。しかし、ヒトへの感染が可能なウイルスがトリウイルスの中にすでに存在することが示された。

リバースジェネティクス法によりトリウイルスのヘマグルチニンとノイラミニダーゼを有し方向性を持った運動を行うウイルスを作製した。ヘマグルチニンとノイラミニダーゼに変異を導入することでウイルス行動の人為操作が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでミズドリのインフルエンザウイルスはヒトへは感染しないと考えられていた。本研究のウイルス感染行動解析によりトリウイルスの中にヒトウイルスに近い行動パターンをとるウイルスが存在することが明らかになり、自然界のミズドリ内にヒトへの感染の可能性を持つウイルスが存在することが示唆された。これは新型インフルエンザウイルス出現を理解する上で重要である。またリバースジェネティクス法によりトリウイルスのヘマグルチニンとノイラミニダーゼを有するウイルスの作製はウイルス行動の人為的操作を可能とし、自律探査型ウイルスベクターとしての応用が今後期待できる。

研究成果の概要（英文）：Analysis of influenza virus infection behavior revealed that avian viruses with behavioral patterns similar to those of human viruses existed. It has been thought that viruses parasitic in waterbirds do not infect humans. However, it was shown that a virus capable of infecting humans already exists among avian viruses.

By reverse genetics, I constructed influenza viruses that possess hemagglutinin and neuraminidase of avian viruses moving in a directional manner. By introducing mutations in hemagglutinin and neuraminidase, it became possible to artificially manipulate viral behavior.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス インフルエンザ 行動解析 運動メカニズム

### 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでの研究で、インフルエンザウイルスが独自の運動機構を持つことを明らかにした。さらにウイルスの運動は過去の位置に戻らない「自己回避歩行的」運動であり、このことはウイルスが自らの位置情報を記録および検出する能力(情報処理能力)を持つことを意味する。インフルエンザウイルス粒子の表面には 2 種類のスパイクタンパク質、ヘマグルチニンとノイラミニダーゼが存在する。ヘマグルチニンは細胞表面のウイルス受容体であるシアロ糖鎖と結合し、ノイラミニダーゼはシアロ糖鎖の分解酵素である。ウイルスの運動は、ヘマグルチニンとシアロ糖鎖の結合が次々と入れ替わることでおきる。また、ウイルス粒子が過去に存在した場所のシアロ糖鎖をノイラミニダーゼが破壊することで運動が自己回避歩行的になると考えている。ところでこの運動や情報処理の能力はインフルエンザウイルスの種類により大きく異なり、その差はウイルスのヘマグルチニンとノイラミニダーゼの生理活性(ヘマグルチニンのシアロ糖鎖との結合力やノイラミニダーゼのシアロ糖鎖分解活性)に依存すると予想されるが具体的にはわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、各種のインフルエンザウイルスの運動・情報処理能およびそれを産み出すヘマグルチニンとノイラミニダーゼの機能の比較解析をおこない、運動・情報処理の分子メカニズムを明らかにすることを目指した。さらにウイルスタンパク質に変異を導入することでウイルス運動・情報処理能を制御し、組織表面で自らの位置情報を読み取りながら効率的に標的細胞に到達する自律探査型ウイルスベクター作製の基盤となる技術の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

インフルエンザウイルス: ヒトおよびミズドリを宿主とするウイルス、リバーシジェネティクス法によりヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼに変異を導入したウイルスを使用した。

インフルエンザウイルスの行動解析: 各種インフルエンザウイルスの運動の可視化解析と分類を行った。細胞表面を模した *in vitro* 系(シアロ糖鎖を結合させることで細胞表面を模したガラス表面)におけるウイルスの運動を反射干渉顕微鏡を用いて画像化した。得られたウイルス運動の軌跡から、ウイルスの運動性、運動の方向性、運動様式の成分の解析を行った。

### 4. 研究成果

本研究により次の(1)(2)の成果が得られた。

(1)ウイルス行動解析: ヒトおよびミズドリを宿主とするインフルエンザウイルスの運動の可視化解析の結果、ヒトウイルスは、2,3 型シアロ糖鎖結合表面でよく運動し、2,6 型シアロ糖鎖結合表面で動かない傾向がみられた。一方トリウイルスの運動は、様々なパターンが存在したが、一部のトリウイルスは、ヒトウイルスと同様に、2,3 型シアロ糖鎖結合表面でよく運動し、2,6 型シアロ糖鎖結合表面で動かないという結果が得られた。これまで、ミズドリを宿主とするウイルスはヒトへは感染せず、ブタなどの中間宿主を経由することでヒトへの感染性を獲得すると考えられてきた。しかし、ヒトウイルスの運動パターンに近いトリウイルスの存在は、ミズドリを宿主とするウイルスの中にすでにヒトへ感染するポテンシャルを持つウイルスが存在することを示唆する。これは、新型インフルエンザウイルス出現の機構を考える上で重要な知見である。

さらに、ヒトウイルスの運動は方向性がないか低い(自己回避歩行的でないかその程度が低い)運動であるのに対し、トリウイルスの中には方向性を持った運動をおこなうものが存在した。トリウイルスの運動パターンは多様であるが、一部のウイルスはより高次の運動方向制御機構を持つことが明らかになった。

(2)リバーシジェネティクス法によるウイルス作製: 方向性を持った運動を行うトリウイルスのヘマグルチニンとノイラミニダーゼの遺伝子 RNA を単離し、トリウイルスのヘマグルチニンとノイラミニダーゼをもつウイルスをリバーシジェネティクス法により作製した。作製したウイルスの行動解析をおこなった結果、運動性は元のトリウイルスより劣るものの運動の方向性は元のトリウイルスと同等に保持されていることが確認できた(図 1)。

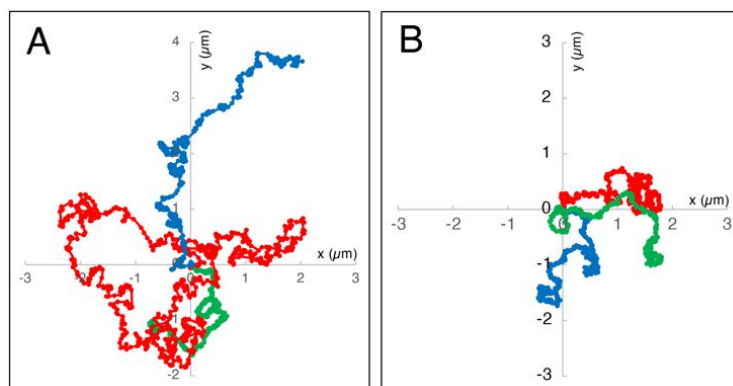


図 1. トリウイルスとリバーシジェネティクス方で作製したウイルスの運動

A. ミズドリを宿主とするインフルエンザウイルスの運動の軌跡。

B. リバーシジェネティクス法で作製したウイルスの軌跡(このウイルスのヘマグルチニンとノイラミニダーゼは、A のトリウイルスと同じ)。運動性は元のトリウイルスに劣るものの、運動の方向性は保持されている。

さらに、リバースジェネティクス法で作製したウイルスを発育鶏卵で継代することで鶏卵馴化ウイルス株を分離した。鶏卵馴化ウイルスのヘマグルチニンとノイラミニダーゼの遺伝子配列を調べた結果、それぞれのタンパク質で1~2個のアミノ酸変異が起きていることが判明した。一方、鶏卵馴化ウイルスの行動解析をおこなった結果、馴化前のウイルスと同等の運動性と運動の方向性を有することが明らかになった。ウイルスの鶏卵馴化によるヘマグルチニンとノイラミニダーゼのアミノ酸変異はウイルス運動に影響しないことが確認できた。

以上の結果は、ヘマグルチニンとノイラミニダーゼに変異を導入することでウイルス行動の人為操作が可能になったこと、変異ウイルスを発育鶏卵で増殖させることで、ウイルスの大量培養や精製が可能になったことを示す。これらは、運動能を変化・調整した変異ウイルス作製の基盤となる技術・知見であり、これにより組織表面のシアロ糖鎖密度情報を読み取りながら標的細胞を探索する行動制御型ウイルスベクターの開発といった今後の応用が実現可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堺立也, 佐保香苗, 今井正樹, 信澤枝里, 黒田和道, 齊藤峰輝
2. 発表標題 インフルエンザウイルス運動のシアロ糖鎖特異性
3. 学会等名 第34会中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堺立也, 佐保香苗, 齊藤峰輝, 今井正樹, 信澤枝里, 黒田和道
2. 発表標題 インフルエンザウイルス運動の糖鎖依存性
3. 学会等名 第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学微生物学教室 <a href="http://www.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/index.html">http://www.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/index.html</a>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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
---------	---------