

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18915

研究課題名（和文）薬剤耐性インフルエンザ株の出現機構に寄与するMutatorウイルスの機能意義

研究課題名（英文）Functional significance of variants with different replication fidelity in influenza virus RNA polymerase.

研究代表者

森 幸太郎（Mori, Kotaro）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・メディカルゲノムセンター・ゲノム医療研究推進室長

研究者番号：10773822

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼはウイルスゲノム複製の際にエラーを生じやすい。ウイルスポリメラーゼサブユニットの1つであるPB1上の66番目のアミノ酸がロイシン（L）からバリン（V）に変異した株（PB1-L66V）は複製エラーが減少し、生ワクチンに搭載されている弱毒化変異の解消を生じにくくすることが示唆された。PB1上の82番目のアミノ酸がチロシン（Y）からシステイン（C）に変異した株（PB1-Y82C）は複製エラーが増加し、ウイルス集団中で優勢にはならないが低い頻度で集団中に存在す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

ウイルスポリメラーゼサブユニットの1つであるPB1の変異体であるPB1-L66Vは複製エラーが減少するため、安全な生ワクチン開発といった医学的応用が期待される。一方で複製エラーを生じやすいPB1-Y82Cは高効率に変異を導入しやすい性質により、ウイルスの進化に寄与すると考えられる。このような変異を生じやすい酵素自身が何らかの宿主因子と相互作用を受けながら発現量を調節されている可能性も考えられ、今後そのような分子の同定が期待される。

研究成果の概要（英文）：Influenza virus RNA-dependent RNA polymerase is error-prone during viral genome replication. PB1-L66V, an influenza virus polymerase mutant, has reduced replication errors, suggesting that it is less likely to introduce reverse mutation into the attenuating mutations contained in live vaccines. PB1-Y82C has increased replication errors and is not prevalent in the virus population but is present at low frequency in the population.

研究分野：分子生物学分野

キーワード：Fidelity Variant Viral RNA Polymerase Quasispecies

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスをはじめとする RNA ウイルスは、感染した個体の細胞、すなわち宿主細胞の中に侵入し、宿主細胞のリソースを利用しながらウイルス自身が持つポリメラーゼという酵素を用いてウイルスゲノムのコピーの合成(複製)をおこなう。感染細胞内でウイルスゲノムが複製される際、ウイルスに由来するポリメラーゼによって高頻度に変異が導入されることが知られている。このため、感染細胞中の子孫ウイルスゲノムは遺伝的に不均一な「Quasispecies」と呼ばれる集団を形成している。季節性インフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは特に複製の際にエラーを生じやすく、その頻度はおよそ 140000 に 1 塩基の頻度で塩基置換が生じるとされている。これまでに、RNA ウイルスのポリメラーゼにおいて、ゲノム複製の正確性が変化したポリメラーゼが単離され、報告されるようになってきた。しかし、そのようなゲノムの正確性が変化したポリメラーゼがウイルス集団中で優勢になることは少なく、臨床分離株として得られた例はほとんどなかった。したがって、そのような正確性の変化したポリメラーゼのウイルスにおけるメリットやデメリットは不明であった。一方で、国内外において RNA ウイルスのゲノム複製の正確性が変化したポリメラーゼを用いて医学的に応用するといった視点を持つ研究が展開され始めていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼにおけるゲノム複製の正確性が変化した変異体の単離、そしてその変異体ポリメラーゼの機能意義、医学的応用の可能性について調べることにした。

### 3. 研究の方法

順遺伝学的手法、逆遺伝学的手法によりウイルスゲノム複製における正確性が変化したインフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼのスクリーニングを試みた。次世代シーケンス解析により複製忠実度を測定する手法を立ち上げ、これを利用することでウイルス集団中のゲノムの多様性を解析した。

### 4. 研究成果

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは Polymerase basic protein 1 (PB1), Polymerase basic protein 2 (PB2), Polymerase acidic protein (PA) からなる 3 者複合体を形成している。ポリメラーゼ 3 者複合体のうち、実際の塩基重合を担う活性中心は PB1 である。我々はこれまでに、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの PB1 上の 66 番目のアミノ酸がロイシン (L) からバリン (V) に変異した株 (PB1-L66V) および 82 番目のアミノ酸がチロシン (Y) からシステイン (C) に変異した株 (PB1-Y82C) をスクリーニングにより単離した。酵素の性質として、PB1-L66V は一般的なウイルスポリメラーゼと比較して約 2 倍変異を導入しにくいことが明らかとなった。

わが国におけるインフルエンザウイルスのワクチンは、ウイルスを分解した後に、副反応の原因となる脂質膜成分を除去した安全性の高い不活化ワクチン(いわゆる「スプリットワクチン」)が製造・使用されている。しかし、このスプリットワクチンは発症した患者において重症化を防止するという点では優れているものの、感染予防の観点ではその有効性が低いことがたびたび指摘されている。一方、生きたウイルスを接種するため、より有効性が高い「弱毒化生ワクチン」が使用されている国や地域もある。弱毒化生ワクチンは、健常人の体温では病原性を発揮することができない「弱毒化変異」を導入することでその安全性を担保しているが、インフルエンザウイルスには生体内で増殖する際に自身の遺伝子に高頻度に変異を起こすという性質があるため、「弱毒化変異」が解消される可能性、すなわち生ワクチン接種によってインフルエンザを発症してしまう可能性が否定できない。このため、弱毒化生ワクチンは最もワクチンを必要とする乳幼児や高齢者、病気等で免疫不全がある人に対しては使用することができない。PB1-L66V はウイルスゲノムの複製に関する正確性が向上しているため、このような弱毒化生ワクチンの欠点を補える可能性について検討した。その結果、野生型である PB1-L66 と比べて PB1-L66V はゲノムの安定性が向上しており、感染を継続しても弱毒化変異の解消が生じにくいことが明らかとなった。

一方 PB1-Y82C では一般的なウイルスポリメラーゼと比較して約 2 倍変異を導入しやすい。変異を導入しやすいウイルスポリメラーゼのウイルス学的利点として、環境変化や抗ウイルス薬の存在などでウイルス集団の消滅の危機を脱するために効率よく新たな変異体を生み出すことが考えられた。ウイルスゲノム集団中において、PB1-Y82C は野生型の酵素の中に低い頻度で

混ざっていることが明らかとなったが、このような変異を生じやすい酵素自身は何らかの宿主因子と相互作用を受けながら発現量を調節されている可能性も考えられ、今後そのような分子の同定が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mori Kotaro, Ohniwa Ryosuke L., Takizawa Naoki, Naito Tadasuke, Saito Mineki	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a Genetically Stable Live Attenuated Influenza Vaccine Strain using an Engineered High-Fidelity Viral Polymerase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00493-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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
---------	---------