

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 27 日現在

機関番号：34451

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590552

研究課題名(和文) ウイルスの変異率を下げるための研究

研究課題名(英文) A study to lower a viral mutation rate

研究代表者

田中 恭子 (Tanaka, Kyoko)

滋慶医療科学大学院大学・医療管理学研究科・教授

研究者番号：90374925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼの活性上昇に伴って、ヌクレオチドあたりの変異率が上昇する傾向があった。高い変異率のウイルスRNAポリメラーゼ複合体には、癌細胞で転写活性化因子として働いていることが知られている宿主タンパク質が結合していることがわかった。ウイルス複製時に変異を促進している宿主側要因ではないかと考えられた。

ウイルスの遺伝子変異のウイルス側要因を調査するため、選択圧のかかる環境下においてウイルスを継代培養した。子孫ウイルスのウイルス集団内の変異率を次世代型シーケンサーで調べ、遺伝子の変異傾向をプロットした。現在、既存のデータベース内遺伝子情報を加えて解析中である。

研究成果の概要(英文)：A candidate host factor which may contribute to alter the mutation rate of the virus polymerase was explored in the early experiment. As a series of the experiments, virus factor which may affect mutation rate was sought by comparing a pair viruses derived from the same lineage. These viruses showed a different tendency of mutation under certain environment of selective pressure. With the aim of discovering the genetic predisposition, we conducted Next-generation DNA sequencing against them and plotted the gene mutation. Currently we are comparing these ascertained mutation genes with gene sequences in the database.

研究分野：生物計算学

キーワード：ウイルス 遺伝子変異 進化

1. 研究開始当初の背景

人獣共通感染症の病原体には、長年にわたり共生/寄生生活を行ってきた保有宿主が存在する。インフルエンザウイルスは、水禽類が保有宿主であり、膨大な数のウイルス・プールの中にある異なる亜型間で頻繁に遺伝子分節の交換が行われている。しかしながら、各遺伝子分節内の遺伝子配列は、比較的安定に保たれている。一方、保有宿主から離れ、家禽や人で流行して分離されたインフルエンザウイルスは、流行する亜型が比較的限られているが、各遺伝子分節内の遺伝子配列には、多くの変異が観察される傾向がある(図1)。

私たちは、A型インフルエンザウイルスが、保有宿主の水禽を離れ、他の宿主で増殖を繰り返した場合、特に強い選択圧がかかっていない分子においてもランダムに変異が起こり、分子の多様性が増すことを報告した(Kobe J. Med. Sci., 2012)。

水禽はA型インフルエンザウイルスの保有宿主であるために、水禽に充分適応したウイルスにおいて「変異率が低いこと」は、「当然のこと」として考えられてきたが、A型インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼによる、分子レベルでの変異率は、ほぼ一定のはずである。したがって、水禽での増殖の際にも、選択圧のかからない分子には他の宿主と同程度の変異がみられても不思議ではない。ところが上述のように、実データは異なった結果であった。癌細胞同様、インフルエンザウイルスの遺伝子変異率の変化についても、mutator mutantの考えがあり、人の世界で流行しているウイルスは、より変異率の高いmutator mutantが選ばれてきた結果、変異率が高い性質があるのではないかと考えられた。

そこで先ず私は、家禽や人などの保有宿主以外の宿主体内では、インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼの変異率を「促進」または「抑制作用を解除」する何等かの機構があるものと仮定し、「さきがけ研究」のテーマとして、ポリメラーゼの活性と変異率の関係を調べてきた。その結果、*in vitro*の系において、インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼの上昇に伴って、ヌクレオチドあたりの変異率が上昇する傾向があることがわかった(未発表データ)。次に、高い変異率と低い変異率のインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼ複合体に、それぞれどのような宿主タンパクが関与しているかを調べるため、各複合体に対する結合タンパク質の網羅的解析を行った。その結果、活性と変異率が高いポリメラーゼ複合体には、癌細胞で転写活性化因子としてはたらいっていることが知られている宿主タンパク質が結合し

ていることがわかった(未発表)。

これらの点をふまえて、インフルエンザウイルスの変異率上昇機序について再考察した。その結果、インフルエンザウイルスポリメラーゼ活性の上昇とそれに伴う変異率の上昇には、癌細胞同様の転写活性化因子の生成が関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

前回までの実験で、ウイルスの変異率を変化させる宿主側要因の存在が示唆された。一方で、同じ選択圧を加えた継代培養実験において、子孫株に、選択圧に対応する特定の変異を生じやすいウイルス株と生じ難いウイルス株があることもわかってきた。

本研究では、癌遺伝子同様の転写活性化因子の生成機構に焦点を当てるとともに、子孫株に変異を生じやすいウイルス株を、変異の生じ難いウイルス株と比較することで、ウイルス複製時に変異を促進しているウイルス側要因が見つかるかどうかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)インフルエンザウイルスの宿主細胞内での遺伝子複製機構の解析

ポリメラーゼ活性が高いRNAポリメラーゼ複合体では、癌細胞様の転写活性化因子の結合がみられることが、普遍的な現象かどうかを調べる。

ウイルスRNAポリメラーゼ複合体の*in vitro*内発現と活性測定

ミニレプリコンシステムを用いた。様々なA型インフルエンザウイルス由来のウイルスRNAポリメラーゼ複合体タンパク質(PA、PB1、PB2、NP)の発現ベクターと、テンプレート疑似ウイルスRNAの発現用ベクターを作成した。また、PB1遺伝子の異なる読み取り枠にコードされているPB1-F2タンパク質を対象としたウイルスRNAポリメラーゼ複合体の活性測定実験では、PB1-F2の発現ベクターも作成した。

疑似ウイルスRNA遺伝子の複製量をリアルタイムPCRで測定し、ウイルスRNAポリメラーゼの活性量とした。

ウイルスポリメラーゼタンパク質に結合する宿主タンパク質の網羅的探索

前述のミニレプリコンシステムを用いウイルスRNAポリメラーゼ複合体タンパク質(PA、PB1、PB2、NP)と、疑似ウイルスRNAを発現させた。PB1-F2を対象とした実験では、PB1-F2の発現ベクターも作成した。

タンパク質発現がピークとなった時点で、核内タンパク質を抽出し、ポリメラーゼに対する抗体を用いて、免疫沈降法にて、結合する宿主タンパク質を採取した。採取したタンパク質は、質量分析にて、タンパク質同定を行った。

(2)インフルエンザウイルスによる遺伝子変異のウイルス側要因を調査

2009年の新型インフルエンザウイルス流行時に、同一患者から得られた2株のウイルスを使用し、選択圧のかかる環境下においてウイルスを継代培養した。

薬剤負荷による変異株出現率の調査

同2株を、各々、低濃度～高濃度の抗ウイルス薬存在下で継代培養し、変異株出現率を調査した。

人由来株化細胞での継代培養時に出現する遺伝子変異を網羅的に調査

子孫ウイルスのウイルス集団内の変異率を次世代型シーケンサーで調べ、遺伝子の変異傾向をプロットした。既存のデータベース内遺伝子情報を加えて解析する。

4. 研究成果

(1)インフルエンザウイルスの宿主細胞内での遺伝子複製機構の解析

これまでの実験で、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの活性上昇に伴って、ヌクレオチドあたりの変異率が上昇する傾向があることがわかり、高い変異率のウイルス RNA ポリメラーゼ複合体には、癌細胞で転写活性化因子としてはたらいっていることが知られている宿主タンパク質が結合していることがわかった(未発表)。これらの蛋白質は、ウイルス複製時に変異を促進している宿主側要因ではないかと考えられた。

また、近年、11番目のウイルス蛋白質として検出されたPB1-F2が、PB1を介してウイルスポリメラーゼ活性の調節に関わる例が報告された。そのため、PB1-F2タンパク質を加えたウイルス RNA ポリメラーゼ複合体の *in vitro* 内発現と活性測定のための実験系も確立した(Ueda et al., 2014)。

このPB1-F2添加の実験系から、ウイルスの人体内での進化過程において、PB1-F2タンパク質はウイルスポリメラーゼへの関与機能を失う傾向にある可能性があること、鳥類由来のウイルスのPB1-F2タンパク質に高度に保持されている特定のアミノ酸が哺乳類細胞におけるウイルスポリメラーゼの活性上昇に強く影響し

ている可能性があること、鳥由来ウイルスのPB1-F2は、人への病原性が強い高病原性鳥インフルエンザウイルスの薬剤ターゲットになり得る可能性があること、が考えられた。

ただし、本PB1-F2添加の実験系においては鳥由来ウイルスのPB1-F2存在下でのウイルスポリメラーゼタンパク質に結合する宿主タンパク質の網羅的探索は留保している。

(2)インフルエンザウイルスによる遺伝子変異のウイルス側要因を調査

計画した薬剤負荷による実験では、複数回の試行にもかかわらず、いずれの実験でも継代中にウイルスが消失し、実験が成立しなかった。しかしながら、人由来株化細胞での継代実験では、ポリメラーゼ活性が低いウイルスも増殖が可能であったため、2世代目の子孫ウイルスのウイルス集団内の変異率を次世代型シーケンサーで調べ、遺伝子の変異傾向をプロットした(未発表)。現在、既存のデータベース内遺伝子情報を加えて解析中である。

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 2件)

Vázquez-Manríquez E. M., (他 21名), and Shinya K., Emergence of HA mutants during influenza virus pneumonia, *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5(8):787-795. 査読有

Ueda. Y., Tanaka M., Kyan Y., Yoshida M., Sasahara K., and Shinya K., PB1-F2 Amino Acids Regulate Influenza A Viral Polymerase Activity, *Journal of Basic & Applied Sciences*, 2014, 10, 1-6. 査読有

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

新矢(田中)恭子(SHINYA(TANAKA), Kyoko)

滋慶医療科学大学院大学・医療管理学研究科・客員教授

研究者番号: 90374925

(4)研究協力者

笹原 健二(SASAHARA, Kenji)

鈴木 泰博(SUZUKI, Yasuhiro)

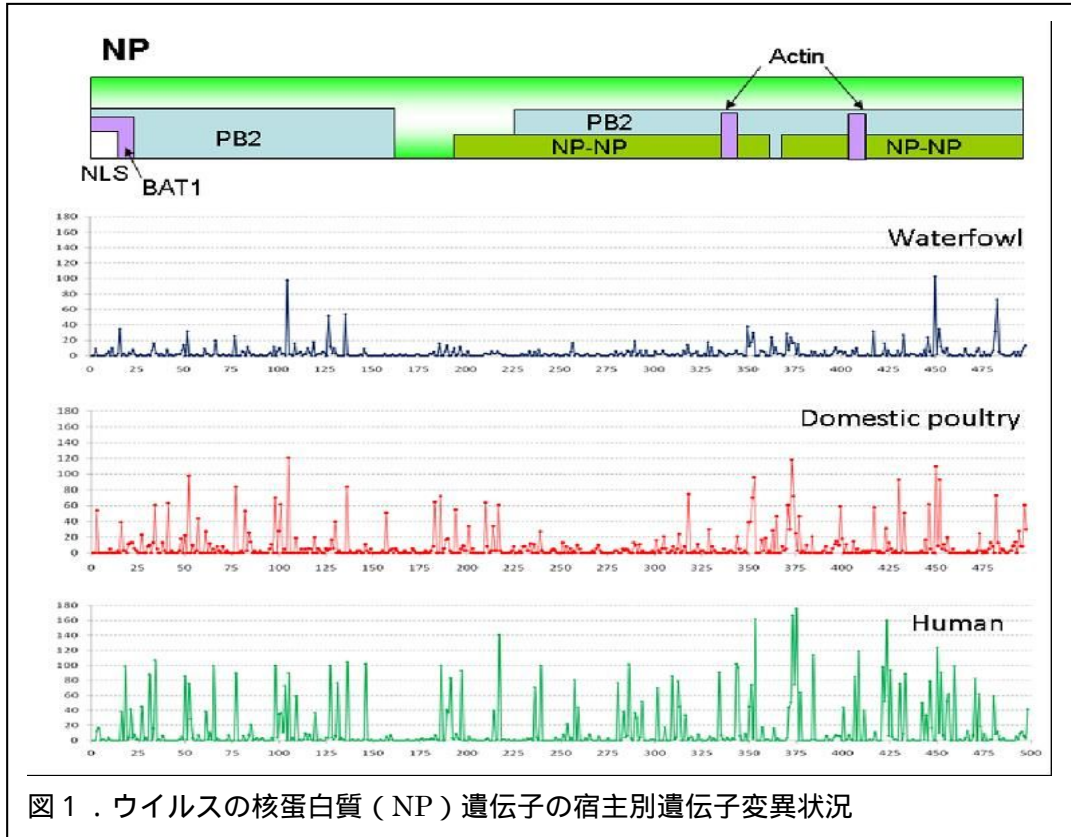


図1 . ウイルスの核蛋白質 (NP) 遺伝子の宿主別遺伝子変異状況