

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850189

研究課題名(和文)野鳥由来A型インフルエンザウイルスが豚細胞内で増殖可能となる要因の研究

研究課題名(英文)Study on factors affecting growth ability of avian influenza viruses from wild birds in pigs

研究代表者

竹前 喜洋(TAKEMAE, Nobuhiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門越境性感染症研究領域・主任研究員

研究者番号：10584386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：野鳥由来A型インフルエンザウイルス(島根株)を豚肺胞上皮細胞で低温条件で連続継代すると、PB2遺伝子に1箇所、PB1遺伝子に2箇所に塩基置換が起こる。これらの内、PB1遺伝子の1箇所以外は、非同義置換であった。これらのアミノ酸置換を単独又は両方導入した変異型と野生型をリバーシジェネティクス法により作出した。野生型は、低温側よりも高温側での増殖能が高かったが、非同義置換を導入した変異型には、顕著な温度感受性は認められなかった。さらに、PB2及びPB1遺伝子に導入される非同義置換が、それぞれ低温側でのウイルスポリメラーゼ活性の上昇と高温側でのポリメラーゼ活性の低下を起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A low pathogenic avian influenza A virus [A/whistling swan/Shimane/580/2002 (H5N3)](Shi580) showed single base substitution in PB2 and two base substitutions in PB1 genes after serial passages at low temperature in the primary swine respiratory epithelial cells. One of the substitutions in PB1 gene was synonymous, but the others were non-synonymous. Using reverse genetics, the wild type and the mutants that contained non-synonymous substitutions in PB2 and/or PB1 genes, were generated. Wild type Shi580 replicated more efficiently at higher temperature than lower temperature, whereas all the mutants did not show the temperature sensitivity. We investigated the effect of these mutations on viral polymerase activities. As the results, the PB2 mutant resulted in the increases of viral polymerase activity at lower temperature, whereas the PB1 mutant did in the decrease of it at higher temperature, suggesting these substitutions in PB2 and PB1 genes may affect the host adaptation.

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 宿主特異性 温度感受性 豚 鳥

1. 研究開始当初の背景

(1) A型インフルエンザウイルスの自然宿主は水禽類などの野鳥であり、自然界においては、野鳥から哺乳類へ直接感染は通常は起こらない。鳥ウイルスが、新しい宿主に適應するには宿主細胞内での増殖能の獲得が必要となるためである。

(2) 自然界では、鳥から豚への感染事例が複数報告されているが、一過性の発生で収束した例と、豚に侵入した鳥インフルエンザウイルスが豚に定着した例がある。こうした鳥ウイルスの豚での増殖能の違いをもたらす要因は良く分かっていない。

(3) 鳥ウイルスが豚に定着する要因の探索の手掛かりとして、鳥と豚の宿主体温の違いに着目し、それぞれのウイルスの標的臓器である鳥(鶏)の直腸および豚の気管上部の体温を測定したところ、それぞれ約41 および約36であった。

(4) 野鳥及び豚から分離されたA型インフルエンザウイルスについて、温度別感染力価を比較した結果、野鳥由来ウイルスは、41での増殖性が33よりも高かった。一方で、豚由来ウイルスは、33での増殖性が41よりも高かった。

(5) 高温条件で増殖性の高い野鳥由来低病原性鳥インフルエンザウイルスである鳥取株と島根株を、豚肺胞上皮細胞に感染させて33で14代継代した結果、33での増殖性が41での増殖性よりも高いウイルス(豚細胞での低温増殖能を獲得した鳥ウイルス)を得た。

2. 研究の目的

鳥由来A型インフルエンザウイルス(AIV)の豚への適應は、パンデミックウイルス出現への重要なステップと考えられるが、AIVの豚で増殖能獲得機構には未知な部分がある。これまでに鳥と豚の体温の違いに着目し、AIVを豚肺胞上皮細胞で低温条件で連続継代することで、低温で高い増殖能を持つAIVを得ている。本研究では、低温馴化に伴ってウイルス遺伝子に導入される塩基置換の機能を明らかにし、AIVが豚で長期間維持されるために必要なウイルス側の要因を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 高温条件(41)で高い増殖能を持つ低病原性鳥インフルエンザウイルスA/teal/Tottori/150/2002(H5N3)(鳥取株)及びA/whistling swan/Shimane/580/2002(H5N3)(島根株)の野生型株及び豚肺胞上皮細胞で低温条件

(33)で14代継代したの各株のRNAをそれぞれ抽出し、cDNAライブラリーを作製する。次世代シーケンサーを用いて、全ゲノムシーケンセスを行い、低温馴化に伴うウイルスポリメラーゼ遺伝子に認められた塩基置換の蓄積を明らかにする。

(2) 野生型島根株と鳥取株及び(1)でポリメラーゼ遺伝子に認められた各塩基置換を導入したそれぞれの株をリバースジェネティクス法で作製し、MDCKを用いた温度別感染力価を比較する。

(3) 島根株の野生型リボヌクレオプロテイン複合体(PB2, PB1, PA, NPの複合体)又は(2)で同定したPB2とPB1遺伝子の塩基置換を導入した変異型リボヌクレオプロテイン複合体を発現するプラスミドをそれぞれ導入したMDCK細胞内におけるウイルスポリメラーゼ活性を比較し、温度感受性との関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 豚細胞で33条件で14代連続継代した鳥取株と島根株のポリメラーゼ遺伝子に認められた塩基置換を表1にまとめた。低温馴化した鳥取株には、PB2遺伝子の562番目とPB1遺伝子の2138番目にアミノ酸置換を伴う塩基置換がそれぞれ認められた。低温馴化した島根株には、PB2遺伝子の1918番目とPB1遺伝子の1684番目にアミノ酸置換を伴う塩基置換が認められた。連続継代による各塩基置換の蓄積を調べるために、バリアント解析を行った結果、それぞれ全リード数に占める変異割合は、PB2遺伝子で96%以上、PB1遺伝子でそれぞれ82%以上であることが分かった。

鳥取株のPB2遺伝子とPB1遺伝子及び島根株のPB1遺伝子にそれぞれ認められた塩基置換部位は、リボヌクレオプロテイン複合体におけるPB2-PB1結合部位であった。また、島根株のPB2遺伝子に認められた塩基置換部位は、宿主特異性に影響を与えることが知られている627ドメインを形成する部位の近傍であった。以上の結果、これらのアミノ酸置換が、ウイルスポリメラーゼ活性に影響を与えている可能性を示唆していた。

表1 低温条件で豚肺胞上皮細胞で14代継代した鳥取株及び島根株のウイルスポリメラーゼ遺伝子に起こる非同義置換

ウイルス	PB2遺伝子		PB1遺伝子	
	G562A ^a	A1918C	G1684A	G2138T
鳥取株	98.8 ^b	ND ^c	ND	85.7
島根株	ND	96.1	82.9	ND

^a 各遺伝子に認められた塩基置換部位

^b 全リードに占める塩基置換の割合(%)

^c Not detected.

(2) 鳥取株の野生型ウイルス遺伝子(8本)

及び低温馴化株に認められた PB2、PB1 遺伝子に各塩基置換を導入した pHW2000 プラスミドを作製し、リバースジェネティクス法による野生型ウイルス及び各塩基置換を導入したウイルスの作製を試みた。しかしながら、Transfection 後に MDCK 細胞、LMH 細胞、CEF 細胞、発育鶏卵でのウイルスレスキューを試みたが、いずれの方法においても鳥取株を作製することができなかった。そのため、もう一方の低温馴化株である島根株を用いて以下の実験を行った。

島根株の野生型遺伝子及び低温馴化株に認められた PB2 と PB1 遺伝子に各塩基置換を導入した pHW2000 プラスミドを作製した。これらを用いて、リバースジェネティクス法により野生型島根株及び PB2 と PB1 遺伝子に塩基置換を単独又は両方もつ変異型ウイルスを作製し、各塩基置換の MDCK 細胞における温度感受性への影響を比較した。野生型島根株の 41 条件で MDCK 細胞の増殖能は、33 条件に比べて、約 26 倍高かった (図 1)。一方で、PB2(A1918T)、PB1(G1684A)のいずれか又は両方の変異を導入した変異型島根株の温度感受性試験では、33 と 41 間で増殖性に有意な差が認められなかった。

以上の結果から、低温馴化した島根株の PB2 と PB1 遺伝子に認められた非同義置換がウイルスの温度感受性に関与していることを明らかにした。

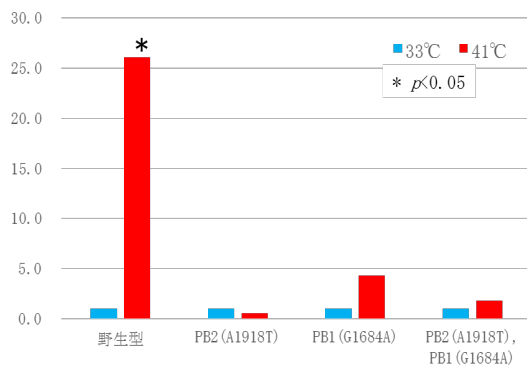


図1 低温馴化した島根株のPB2とPB1遺伝子に認められる塩基置換が温度感受性に与える影響。縦軸は33°C条件でのTCID₅₀/mlに対する相対値

(3)(2)で作製した島根株に由来する野生型 PB2、野生型 PB1、野生型 PA、野生型 NP 遺伝子のそれぞれの配列を含む各 pHW2000 プラスミドと変異型 PB2、PB1 遺伝子の配列をそれぞれ含む pHW2000 プラスミドを、MDCK 細胞内で擬似的なウイルス RNA を転写するプラスミドとともに MDCK 細胞に Transfection し、野生型と変異導入型リボヌクレオプロテイン複合体のウイルスポリメラーゼ活性を比較した。PB2(A1918T)を単独に導入した複合体と PB2(A1918T)と PB1(G1684A)の両方の変異を導入した島根株由来リボヌクレオプロテイン複合体のポリメラーゼ活性は、33

条件で野生型のポリメラーゼ活性よりも2倍以上有意に高かった(図2)。一方で、PB1(G1684A)を単独又はPB1(G1684A)とPB2(A1918T)の両方の変異を導入したリボヌクレオプロテイン複合体のポリメラーゼ活性は、41で野生型よりも3割から4割有意に低下することが分かった。以上の結果から、低温馴化に伴う島根株のPB2遺伝子に認められた塩基置換は、高温側で、PB1遺伝子に認められた塩基置換は、低温側でのウイルスポリメラーゼ活性に影響を与えていることが明らかになった。

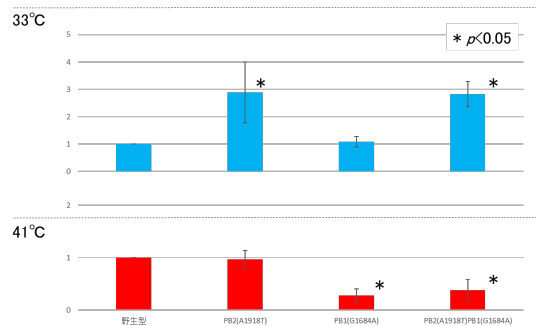


図2 低温馴化型Shimane株のPB2とPB1遺伝子に認められる塩基置換がウイルスポリメラーゼ活性に与える影響。上段は、33°C、下段は41°C条件における野生型のポリメラーゼ活性に対する相対値。

以上、本研究で野鳥由来鳥インフルエンザウイルスの豚細胞での低温馴化に伴いウイルスポリメラーゼに認められた非同義置換が宿主特異性に関与している可能性を得た。これらの塩基置換は、これまでに報告されている宿主特異性に関与する部位とは異なっている。今後、豚細胞における低温馴化の際にウイルスポリメラーゼ遺伝子に以外に認められる塩基置換がウイルス性状にどのように関与するかを解析し、A型インフルエンザウイルスの宿主域決定要因のさらなる解明に寄与することができると考える。

<引用文献>

Steel, J., Lowen, A.C., Mubareka, S., Palese, P., 2009. Transmission of Influenza Virus in a Mammalian Host Is Increased by PB2 Amino Acids 627K or 627E/701N. PLOS Pathogens 5, e1000252.

Yamada, S., Hatta, M., Staker, B.L., Watanabe, S., Imai, M., Shinya, K., Sakai-Tagawa, Y., Ito, M., Ozawa, M., Watanabe, T., Sakabe, S., Li, C., Kim, J.H., Myler, P.J., Phan, I., Raymond, A., Smith, E., Stacy, R., Nidom, C.A., Lank, S.M., Wiseman, R.W., Bimber, B.N., O'Connor, D.H., Neumann, G., Stewart, L.J., Kawaoka, Y., 2010. Biological and Structural Characterization of a Host-Adapting Amino Acid in Influenza Virus. PLOS Pathog. 6, e1001034.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹前 喜洋 (TAKEMAE, Nobuhiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・動物衛生研究部門 越境性感染症
研究領域・主任研究員

研究者番号：10584386