

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	山形 優太郎
論文題目	欠損干渉インフルエンザウイルスのクローン培養系の確立と性状の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>欠損干渉 (defective interfering ; DI) ウイルスは、ウイルス粒子に取り込まれるために必要なパッケージングシグナルを保持したまま、ウイルス蛋白質翻訳領域の一部を欠失した DI ウイルスゲノムを有するウイルスである。インフルエンザウイルスで最も解析が進んでいる DI ウイルスの一つである 244DI ウイルスは、ウイルスゲノム PB2 vRNA の翻訳領域のうち 1946 塩基を欠失する PB2 244DI vRNA を有し、共感染した感染性インフルエンザウイルスの増殖を抑制することが知られている。244DI ウイルスは、ウイルスポリメラーゼ蛋白質 PB2 を発現できないため、従来、244DI ウイルスを調製する際には野生型のヘルパーウイルスと混合して増殖させた。しかし、この方法では、ヘルパーウイルスが残存するリスクがあり、治療薬や予防薬として利用できない。そこで本研究ではこの欠点を克服するため、DI ウイルス [244DI(UUG)ウイルス] を、PB2 発現細胞を用いてクローン培養する手法を確立すること、またクローン培養した DI ウイルスの性状を明らかにすることを目的とした。</p> <p>244DI(UUG)ウイルスをリバースジェネティクス法で作出し、PB2 蛋白質を恒常的に発現する AX4/PB2 細胞に感染させたところ、十分なウイルス力価 (約 7×10^6 PFU/ml) の DI ウイルスをクローン培養することができた。得られた 244DI(UUG)ウイルスを野生型 WSN ウイルスと共感染させたところ、244DI(UUG)ウイルス量依存的に野生型 WSN ウイルスの増殖を抑制した。クローン培養した DI ウイルスの性状解析のため、DI ウイルス粒子に含まれるウイルス蛋白質量を野生株と比較したところ、マトリックス蛋白質である M1 蛋白質は同程度であったが、NP 蛋白質量は著しく少なかった。さらに、DI ウイルス粒子をクライオ電子顕微鏡で観察したところ、野生型ウイルス粒子と比較して粒径が小さいウイルス粒子が多かった。これらの結果から、ウイルス粒子内のリボ核酸蛋白質複合体 (vRNP) の量が野生型ウイルスより少ないことが示唆された。そこで、ウイルス粒子中の 8 分節の vRNA 量を分節特異的 RT-qPCR 法で比較したところ、DI ウイルス粒子中の PB2 分節以外の 7 分節の vRNA 量が PB2 244DI(UUG)分節と比較して著しく少なかった。</p> <p>以上の結果から、クローン培養した 244DI(UUG)ウイルスには野生型インフルエンザウイルスの増殖を抑制する効果があること、また、本 DI ウイルスのゲノムパッケージングは正常に行われておらず PB2 244DI(UUG)分節以外の 7 分節の vRNA が効率よくパッケージングされていないことがわかった。従来の研究では、PB2 244DI 分節は野生型 PB2 vRNA とゲノム複製や子孫ウイルス粒子へのパッケージングを競合阻害することで、共感染した感染性インフルエンザウイルスの増殖を抑制すると報告されていた。本研究では、PB2 244DI vRNA がパッケージングされる際に他の 7 分節のパッケージング効率を抑制することも、感染性ウイルスの増殖抑制能に寄与することが示唆された。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、欠損干渉インフルエンザウイルスのクローン培養法を確立し、その性状を明らかにすることで、欠損干渉ウイルス (DIウイルス) がどのように野生型ウイルスの増殖を抑制するかを示したものである。

インフルエンザウイルスは8本に分節化したRNAをゲノムとして持つ。8本のゲノム分節のうち、PB2分節の翻訳領域に1946塩基の欠損変異 (PB2 244DIゲノム) を持つ244DIウイルスは、野生型インフルエンザウイルスと共感染するとその増殖効率を大きく抑制することから、新たな抗ウイルス薬候補として期待されている。しかし、244DIウイルスを培養するためには、PB2蛋白質を供給するための増殖型ヘルパーウイルスと共培養する必要があるため、現状の方法では244DIウイルスを治療薬として利用することはできない。

そこで申請者は、PB2蛋白質発現細胞を用いて244DIウイルスをクローン培養する系の確立を試みた。リバーシジェネティクス法で244DIウイルスを作出し、PB2蛋白質を恒常的に発現するAX4/PB2細胞を用いて培養することで、高力価 (~ 10^7 PFU/ml) のクローン化した244DIウイルスを得た。また、本培養系を用いて、244DIウイルスを高力価のまま持続的に培養できることを示した。さらに、クローン化した244DIウイルスが野生型ウイルスと共感染することで、野生型ウイルスの増殖を抑制することを示した。

次に、244DIウイルスが野生型ウイルスの増殖を抑制するメカニズムを明らかにするため、244DIウイルスの性状を解析した。クライオ電子顕微鏡解析の結果、244DIウイルスの直径は野生型ウイルスより小さく、ウイルス粒子形成の不全が示唆された。ウェスタンブロット法およびRT-qPCR法により、AX4/PB2細胞で増殖した244DIウイルスは、野生型ウイルスと同程度にウイルス粒子を産生するが、それらの多くはPB2 244DIゲノムのみを持つ非増殖性ウイルス粒子であり、他の7本のRNA分節はウイルス粒子内に効率良く取り込まれないことを示した。すなわち、244DIウイルスと野生型ウイルスが共感染した際に、PB2 244DIゲノムが単独で優先的に子孫ウイルス粒子にパッケージングされることで、野生型ウイルスの増殖を抑制すると考えられた。

本論文は、新たな抗インフルエンザ薬として応用可能なDIウイルスのクローン培養系を確立しただけでなく、DIウイルスによる野生型ウイルスの増殖抑制機構の一端を明らかにした、ウイルス学的意義の高い論文である。以上のように、本論文は申請者が有するウイルス学に関する高度な学識と優れた研究能力を示し、論理的かつ一貫性を持って記述されている。また、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念を提示している。よって、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値があると認めた。また、令和2年1月31日に公聴会を実施し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 令和 年 月 日