

# 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

山形 優太郎

## 目次

要旨	3
略語表	5
<b>第一章 序論</b>	
1-1. A型インフルエンザウイルスの特徴	8
1-2. A型インフルエンザウイルスの構造	9
1-3. A型インフルエンザウイルスの増殖環	9
1-4. インフルエンザウイルスゲノムの性状とゲノムパッケージング	12
1-5. 欠損干渉 (DI) ウイルス	14
1-6. 研究背景と本研究の目的	16
<b>第二章 実験の材料と手法</b>	
細胞	20
ウイルス	20
プラスミド	20
リバーシジェネティクス法によるインフルエンザウイルスの合成	21
ウイルス培養	22
Reverse Transcription (RT) -PCR	22
プラークアッセイによるウイルス力価の計測	23
赤血球凝集 (HA) 試験	23
ウイルス粒子の粗精製	24
ウイルス粒子のクライオ電子顕微鏡観察	24

ウエスタンブロッティング	24
インフルエンザウイルス vRNA 分節特異的 RT-qPCR	25
vRNP の精製と AFM 観察	27
<b>第三章 結果</b>	
3-1. 244DI(UUG)ウイルスの作出	29
3-2. 244DI(UUG)ウイルスは AX4/PB2 細胞で効率よくクローン培養できる	31
3-3. 244DI(UUG)ウイルスは野生型インフルエンザウイルスの増殖を抑制する	34
3-4. 244DI(UUG)ウイルスの性状解析	36
3-5. PB2 244DI(UUG) vRNP の性状解析	46
<b>第四章 考察</b>	
4-1. 244DI ウイルスクローン培養手法の特長	49
4-2. 244DI ウイルスの増殖と増殖抑制のメカニズム	50
4-3. PB2 244DI(UUG) vRNP による他分節 vRNP のゲノムパッケージングへの影響	51
4-4. DI ウイルスの応用への今後の展望	53
<b>参考文献</b>	55
<b>謝辞</b>	60

## 要旨

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。

244DI(UUG)ウイルスをリバーシ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  $7 \times 10^6$  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

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。

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。

## 略語表

AFM: atomic force microscopy

BSA: bovine serum albumin

cDNA: complement DNA

DI: defective interfering

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DNA: deoxyribonucleic acid

DTT: dithiothreitol

FCS: fetal calf serum

HA: hemagglutinin

hpi: hours post infection

M1: matrix protein 1

M2: matrix protein 2

MDCK: Madin-Darby canine kidney cell

MEM: minimal essential medium

MOI: multiplicity of infection

mRNA: messenger RNA

NA: neuraminidase

NCS: newborn calf serum

NP: nucleoprotein

NS: nonstructural protein

PA: polymerase acid

PB1: polymerase basic 1

PB2: polymerase basic 2

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PFU: plaque-forming unit

pH: power of hydrogen

qPCR: quantitative PCR

RNA: ribonucleic acid

RNP: ribonucleoprotein

RT: reverse transcription

TCID<sub>50</sub>: 50% tissue culture infectious dose

TPCK: tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone

UV: ultra violet

vRNA: viral RNA

vRNP: viral RNP

WT: wild-type

# 第一章

## 序論



### 1-1. A 型インフルエンザウイルスの特徴

A 型インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、分節化された一本鎖マインナス RNA をゲノムとして有するウイルスである。水禽や家禽、ブタ、ヒト等の様々な動物種に感染するが、ウイルス株ごとの HA 蛋白質の抗原性 (HA 亜型) の違いによって感染する動物種が異なる。ヒトに感染した場合は咳、くしゃみなどの上気道症状や発熱を引き起こし、重症化すると死に至る恐れがある。インフルエンザウイルスは感染力が強く、これまでとは異なる抗原性のウイルスが出現したときに、度々世界的大流行 (パンデミック) を引き起こしてきた。20 世紀以降、1918 年のスペイン風邪ウイルス、1957 年のアジア風邪ウイルスや 1968 年の香港風邪ウイルス、2009 年の H1N1pdm2009 ウイルスがパンデミックを引き起こしている (Horimoto and Kawaoka, *Nat Rev Microbiol*, 2005; Neumann *et al.*, *Nature*, 2009)。インフルエンザウイルスのパンデミックは甚大な被害をもたらし、全世界での死亡者数は、スペイン風邪では 5,000 万人、香港風邪では 100 万人と報告されている (Patterson and Pyle, *Bull Hist Med*, 1991; Johnson and Mueller, *Bull Hist Med*, 2002)。従って、インフルエンザウイルス研究を通じてインフルエンザの脅威に対抗する手段を構築することは、人類にとって喫緊の課題と言える。

インフルエンザウイルス研究の進展により、ウイルス増殖過程の特定のステップに作用し、その増殖を抑制する阻害薬が複数開発されてきた (Watanabe and Kawaoka, *Curr Opin Virol*, 2015)。過去、あるいは現在使用されている抗インフルエンザウイルス薬には、ウイルスが宿主細胞へ侵入した際にウイルスゲノムの放出 (脱殻) を阻害する水素イオンチャネル M2 阻害薬 (アマンタジン、リマンタジン) や、宿主細胞からのウイルス粒子の放出 (出芽) を抑制するノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬 (オセルタミビル、ザナミビル、ラニナミビル、ペラミビル)、ウイルス mRNA 合成 (転写) を阻害するウイルス RNA ポリメラーゼ阻害薬 (バロキサビルマルボキシル) がある。しかし、それぞれのインフルエンザウイルス阻害薬への薬剤感受性が低下した、薬剤耐性ウイルスが出現しているだけでなく、その耐性

ウイルスが別の患者に伝播し、まれに耐性ウイルスが世界的に流行することもあり、大きな問題となっている（畠山・河岡、日本臨牀、2006）。その対策として、既存のものとは異なる作用機序の新規阻害薬開発が求められる。

### 1-2. A 型インフルエンザウイルスの構造

A 型インフルエンザウイルスは、ゲノム RNA 分節が宿主細胞由来の脂質二重膜であるエンベロープにつつまれており、エンベロープには膜貫通型糖蛋白質である HA と NA、水素イオンチャネル活性を持つ M2 が存在している（図 1）。エンベロープの内側には、マトリックス蛋白質である M1 が結合し、ウイルス粒子の形状を維持している。エンベロープの内部には、ゲノム RNA 分節と、PB1、PB2、PA からなるヘテロ三量体 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ複合体およびウイルス核蛋白質 NP から構成されるリボ核酸蛋白質複合体(viral ribonucleoprotein complex ; vRNP) が 8 本含まれる。vRNP はゲノム RNA の転写および複製を担う。

### 1-3. A 型インフルエンザウイルスの増殖環

インフルエンザウイルスの増殖は、宿主細胞表面のレセプターであるシアル酸に結合することから始まる（図 2）。シアル酸に結合後、エンドサイトーシスにより細胞内へ侵入すると、エンドソーム内の低 pH 環境によりウイルス表面の HA の立体構造が変化し、ウイルスエンベロープとエンドソームの膜融合が起こる。同時に、M2 イオンチャネルにより、水素イオンがウイルス粒子内へ流入することにより、M1 と vRNP との解離が起こり、vRNP が細胞質内へ放出される（脱殻）。vRNP は核内へ移行して、ゲノム RNA が転写・複製された結果、新たなゲノム RNA やウイルス蛋白質が合成される。それらは細胞表面へ輸送され、子孫ウイルス粒子が合成される（アセンブリ、ゲノムパッケージング）。子孫ウイルスは NA のシアリダーゼ活性により、細胞外へ放出される（出芽）。

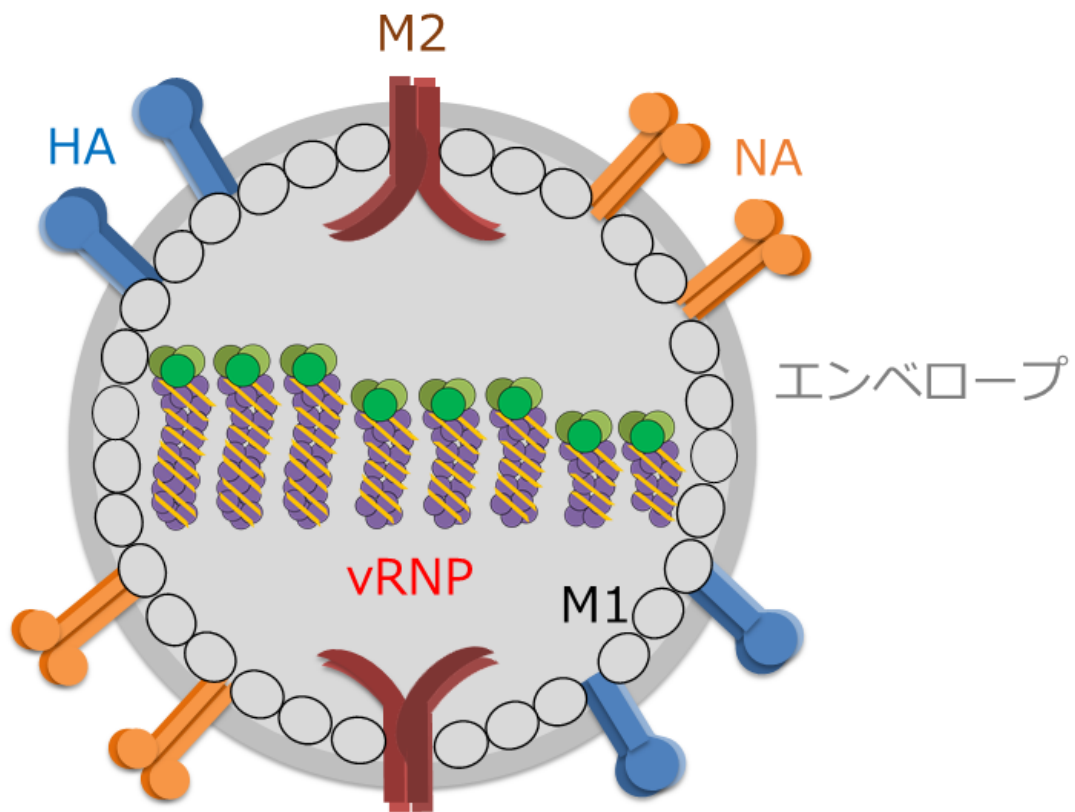


図 1. インフルエンザウイルス粒子の構造の模式図

8本の分節化したゲノム (vRNP) がエンベロープに包まれている。エンベロープはマトリックス蛋白質 M1 によって裏打ちされている。エンベロープには膜糖蛋白質である HA と NA、水素イオンチャネル活性を持つ M2 が存在している。

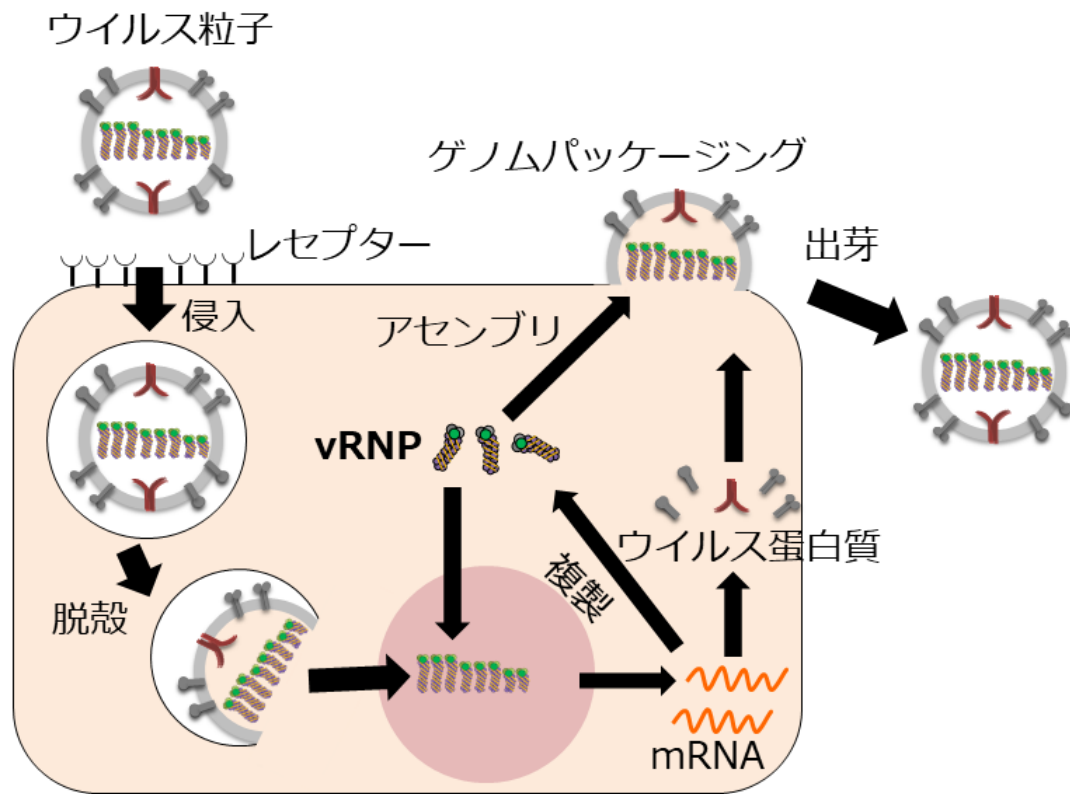


図 2. インフルエンザウイルスの増殖環

細胞に侵入したウイルス粒子は自身の遺伝物質である vRNP を細胞内に放出し、新たなウイルス粒子の材料となる vRNA やウイルス蛋白質が合成される。新たに合成された vRNP やウイルス蛋白質は細胞膜に輸送され、子孫ウイルス粒子を形成し、細胞外へと放出される。

#### 1-4. インフルエンザウイルスゲノムの性状とゲノムパッケージング

A型インフルエンザウイルスは8種類（PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS）の分節化された一本鎖マイナスRNAをゲノムとして有している（図3A）。それぞれのRNA分節は、1から数種類のウイルス蛋白質をコードしており、分節によってviral RNA（vRNA）の長さが異なる。各分節vRNAはウイルス蛋白質をコードする翻訳領域と3'末端 および5'末端に存在する非翻訳領域からなる。各RNA分節の3'末端 および5'末端にはパッケージングシグナルと呼ばれる、vRNAがウイルス粒子内に取り込まれるために必要な領域が、非翻訳領域と翻訳領域にまたがって存在する（Hutchinson *et al.*, *J Gen Virol*, 2010）（図3A）。vRNAの両末端のプロモーター配列（U12 および U13）は相補的な配列を持つため二本鎖のパンハンドル構造を形成し、そこにウイルスポリメラーゼ複合体が結合する。vRNAの残りの領域にはNPが結合し、それがウイルスポリメラーゼ複合体とともに螺旋構造をとったvRNPを形成する（図3B）。ウイルスポリメラーゼ複合体はウイルス蛋白質合成の鋳型となるmRNAや、vRNAと完全に相補的な配列を持つcRNAを合成し、さらにcRNAを鋳型としてvRNAを複製する。細胞質で翻訳されたウイルス蛋白質が核内移行して新たに形成されたvRNPは、Rab11小胞による輸送経路を介して細胞膜へと輸送され、新たに形成された子孫ウイルス粒子に取り込まれる〔ゲノムパッケージング〕（図2）（Eisfeld *et al.*, *J Virol*, 2011）。ウイルス粒子内では、1本のvRNPを中心として残り7本のvRNP複合体が円状に取り囲むような状態で超複合体を形成したvRNPがパッケージされており（Noda *et al.*, *Nature*, 2006）、各vRNPが細胞核で合成された後に細胞膜へと輸送され子孫ウイルス粒子に取り込まれる過程（図2）で8本のvRNPからなる超複合体が形成されると考えられている（Lakdawala *et al.*, *PLoS Pathog*, 2014）。

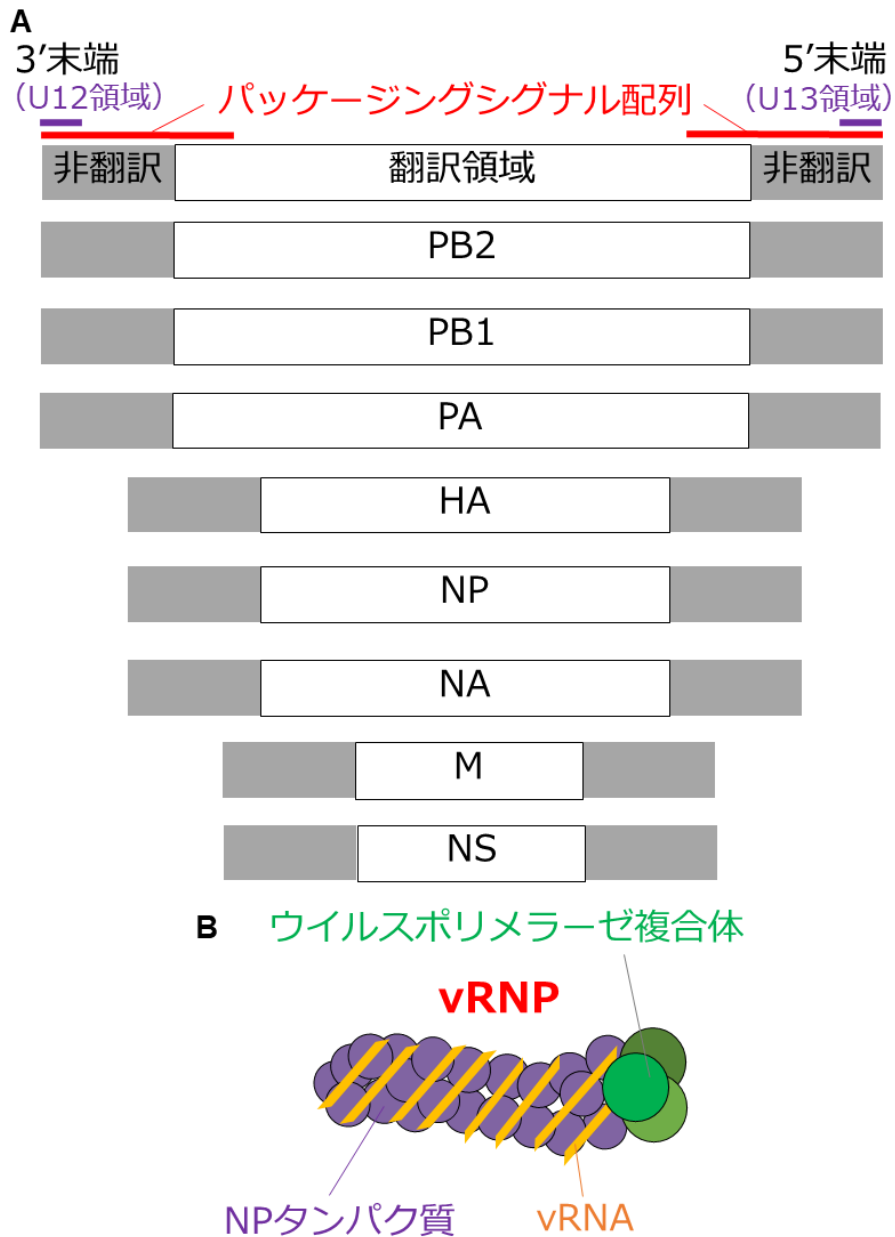


図 3. インフルエンザウイルスゲノムの模式図

(A)インフルエンザウイルス vRNA の模式図。3'末端と 5'末端に非翻訳領域が、その内側に翻訳領域が存在する。ウイルス粒子内に分節ゲノムが取り込まれるために必要なパッケージングシグナル配列が、非翻訳領域と翻訳領域にまたがって存在している。インフルエンザウイルス vRNA は 8 本の分節 (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS) に分かれている。(B)インフルエンザウイルスの vRNP の構造の模式図。細胞に侵入したウイルス粒子は自身の遺伝物質である vRNP を細胞内に放出し、新たなウイルス粒子の材料となる vRNA やウイルス蛋白質が合成される。新たに合成された vRNP やウイルス蛋白質は細胞膜に輸送され、子孫ウイルス粒子を形成し、細胞外へと放出される。

## 1-5. 欠損干渉 (DI) ウイルス

欠損干渉 (defective interfering ; DI) ウイルスとは、そのウイルスゲノムが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ながら、ウイルス蛋白質がコードされた配列を大きく欠失した DI vRNA を有するウイルスである。DI vRNA の欠失変異は、ウイルスポリメラーゼによるゲノム複製のエラーによって生じる (Lazzarini *et al.*, *Cell*, 1981)。その欠損のため、本来コードしている蛋白質を発現できない DI ウイルスは自身のみでは増殖することができず、培養細胞でインフルエンザウイルスを増殖させた場合や、感染動物から得たウイルスサンプルで、頻繁に、野生型ウイルスと混在した状態で認められる (Dimmock *et al.*, *J Virol*, 2008)。DI ウイルスの性状に関しては、1943 年、Henle らにより野生型インフルエンザウイルスの増殖を抑制することが発見された (Henle and Henle, *Science*, 1943)。後の研究で、その原因が蛋白質翻訳領域に欠失変異をもつウイルスゲノムによるものと明らかになり (Von Magnus, *Adv. Virus Res.*, 1954)、ウイルスゲノム欠失変異体が感染性ウイルスの増殖を抑制する現象が Defective Interference (欠損干渉) と定義された (Huang and Baltimore, *Nature*, 1970)。これまでに、DI ウイルスゲノムは、野生型ウイルスゲノムの複製やパッケージングを競合阻害したり、*in vivo* ではインターフェロン応答を誘導したりすることで、野生型ウイルスの増殖を抑制することが報告されている (Yang *et al.*, *Front Microbiol.*, 2019)。

インフルエンザウイルスで最もよく研究されている DI ウイルスの一つは、244DI ウイルスである。244DI ウイルスが有する PB2 244DI vRNA は、PB2 遺伝子分節の 3'末端 244 塩基と 5'末端 151 塩基を有して、その間の 1946 塩基を欠失した、計 395 塩基の短い遺伝子分節で (Dimmock *et al.*, *J Virol*, 2008)、インフルエンザウイルスゲノムの転写・複製に必要な PB2 蛋白質を発現することができない (図 4)。*in vitro* における実験では、プラスミドから発現させた PB2 244DI vRNA が、培養細胞に感染したインフルエンザウイルスの vRNA 複製を阻害することにより、インフルエンザウイルスの増殖を抑制することが示

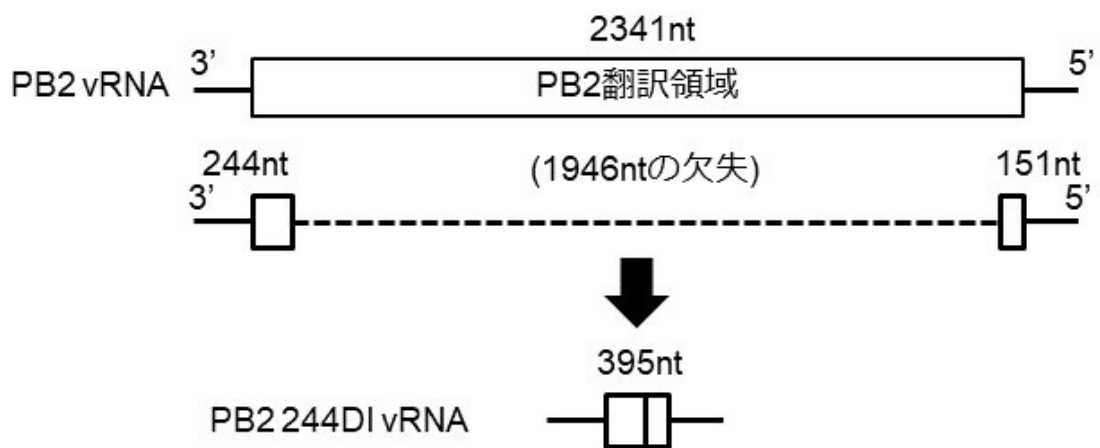


図 4. PB2 244DI vRNA の模式図

PB2 タンパク質配列の 1946 塩基を欠失させ、3'末端 244 塩基と 5'末端 151 塩基が連結した、計 395 塩基の DI 分節となっている。



されている (Meng *et al.*, *Virology*, 2017)。また *in vivo* においては、マウスに致死量の A 型インフルエンザウイルスを感染させた 1 日後に 244DI ウイルスを感染させると、マウスの致死率が大幅に低下することが報告されている (Dimmock *et al.*, *J Virol*, 2008)。Dimmock らが用いた 244DI ウイルスは A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 株由来だが、他の HA 亜型の H2N2 株、H3N2 株ウイルスに対しても致死率の大幅な低下を示したことから、244DI ウイルスが種々のインフルエンザウイルスに対して治療効果を有する可能性が示されている。また、ヒトインフルエンザのモデル動物であるフェレットを用いた実験感染においても、244DI ウイルスと H1N1pdm2009 ウイルスを同時に感染させると、H1N1pdm2009 ウイルス増殖が抑制され、症状が低減されることが示されている (Dimmock *et al.*, *PLoS One*, 2012)。さらに、244DI ウイルスに感染させたマウスでは、A 型インフルエンザウイルス以外の B 型インフルエンザウイルスやマウス肺炎ウイルス感染においても致死率が大幅に低下することが報告されている (Easton *et al.*, *Vaccine*, 2011; Scott *et al.*, *J Gen Virol*, 2011)。従って、244DI ウイルスはインフルエンザの新たな予防薬や治療薬に応用できる可能性があると考えられている。

#### 1-6. 研究背景と本研究の目的

244DI ウイルスは PB2 分節 vRNA の翻訳領域が大幅に欠失しており、PB2 蛋白質を合成できないため、自身のみでは増殖できない。従来の研究では、244DI ウイルスを増殖させるために、PB2 蛋白質を発現する野生型ウイルス（ヘルパーウイルス）と混合して培養されていた。(Dimmock *et al.*, *J Virol*, 2008)。すなわち、DI ウイルスとヘルパーウイルスを混合して鶏卵や細胞に感染させて増殖させた後、DI ウイルスとヘルパーウイルスの混合液を UV 照射処理して、DI 分節よりも塩基長が長く UV が照射されやすい PB2 分節ゲノムを有するヘルパーウイルスを優先的に不活化させることで、DI ウイルスのストックを調製していた (図 5)。しかしこの手法では、UV 照射により DI ウイルスもある程度不活化され

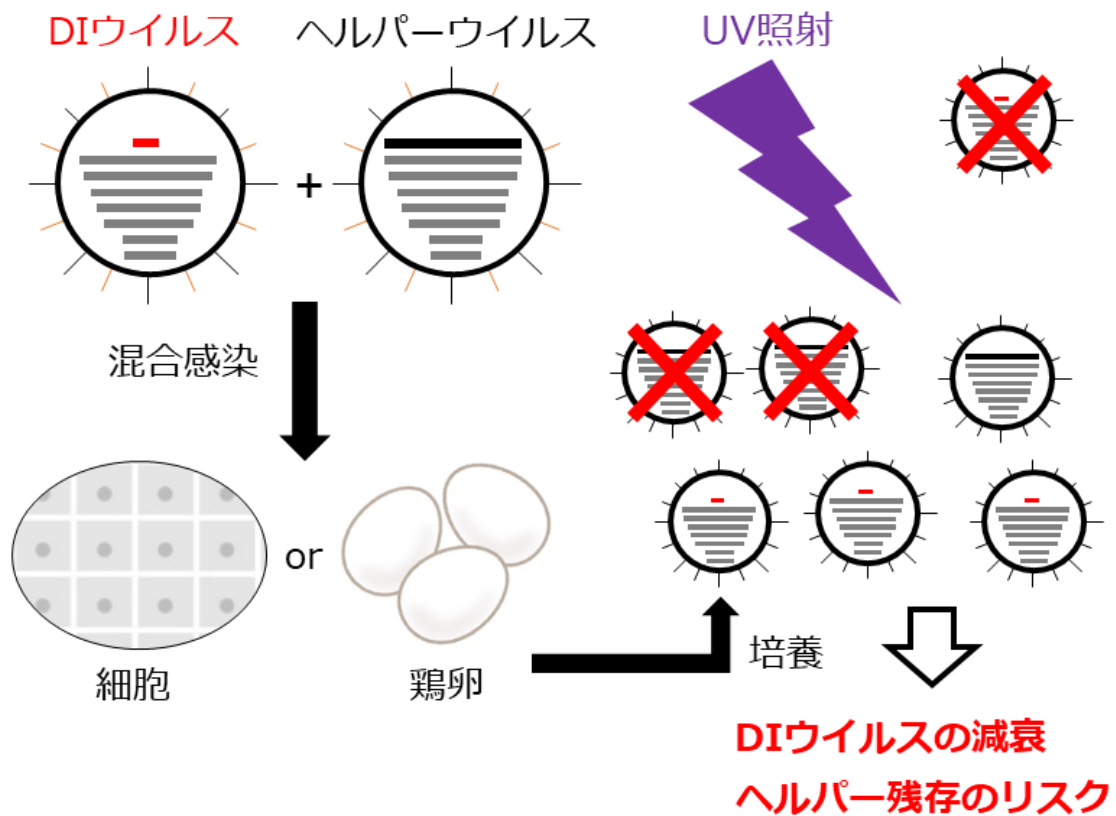


図 5. 従来の PB2 244DI ウイルスの調整法と問題点

従来の手法では PB2 全長分節を有するヘルパーウイルスと混合して感染・増殖させた後、UV 照射でウイルス液中のヘルパーウイルスを不活化させる手法で DI ウイルスを調整していた。しかしこの手法は、UV 照射時にヘルパーウイルスだけでなく DI ウイルスも減衰してしまうこと、さらに UV 照射が不十分だと感染性のあるヘルパーウイルスが残存する恐れがあるため、培養した DI ウイルスを抗ウイルス薬に応用しづらい、という問題点があった。

てしまうため、必要量の DI ウイルスを得るためにより多くのウイルス液を調製しなければならない。また、DI ウイルスの不活化を避けるために UV 照射時間を短くすると、ヘルパーウイルスが不活化されずに DI ウイルス液中に残存してしまう。従って、DI ウイルスを新規抗ウイルス薬開発につなげる上で、DI ウイルスの調製の複雑さや感染性ヘルパーウイルスのコンタミネーションのリスクは大きな問題となっていた。本研究では、これらの問題点を解決するため、ヘルパーウイルスを用いることなく、PB2 蛋白質を恒常的に発現する培養細胞株を用いて DI ウイルスをクローン培養する系を構築することを目的とした。また、本系の構築に成功したことで初めて可能となったクローン化 DI ウイルスの性状解析を行った。

## 第二章

### 実験の材料と手法

## 細胞

ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株 293T 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) から購入したものを使用し、10% Fetal Calf Serum (FCS)、100 units/ml penicillin – 100 µg/ml Streptomycin (Wako 社) を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地 (10% FCS/DMEM) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK 細胞 ; イヌ腎臓尿細管上皮由来細胞株) は、東京大学医科学研究所・河岡義裕教授から分与されたものを使用し、5% Newborn Calf Serum (NCS)、0.3% NaHCO<sub>3</sub> (SIGMA 社)、1×MEM Amino Acids (GIBCO 社)、1×MEM Vitamin (GIBCO 社)、4 mM L-Glutamine (SIGMA 社)、100 units/ml penicillin – 100 µg/ml Streptomycin (Wako 社) を添加した Minimal Essential Medium (MEM) 培地 (5% NCS/MEM) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。細胞内で A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 株由来 PB2 蛋白質を恒常発現する AX4/PB2 細胞 (Ozawa *et al.*, J Gen Virol, 2011) は、東京大学医科学研究所・河岡義裕教授から分与されたものを使用し、10 µg/ml ブラストサイジン S 塩酸塩 (Wako 社) および 2 µg/ml Puromycin (InvivoGen 社) を添加した 5% NCS/MEM (5% NCS/MEM-10 µg/ml Bla-2 µg/ml Pm) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

## ウイルス

ウイルス感染実験では、インフルエンザウイルスの野生型 WSN 株 [A/WSN/33 (H1N1) ; WSN wild-type (WT)] と、後述のリバージェネティクス法により作出した 244DI(UUG) ウイルス株および PB2(UUG) ウイルス株を用いた。ウイルス液は-80°Cで保存し、解凍後、適宜希釈して用いた。

## プラスミド

WSN 株の PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS 分節のゲノムを発現する pPolII プ

ラスミド (pPolI-PB2, pPolI-PB1, pPolI-PA, pPolI-HA, pPolI-NP, pPolI-NA, pPolI-M, pPolI-NS) および WSN 株の PB2, PB1, PA, NP 蛋白質を発現する pCAGGS プラスミド (pCAGGS-PB1, pCAGGS-PB2, pCAGGS-NP, pCAGGS-PA) は、東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与された。PB2 の C 末端に Flag タグ配列を付加した変異体蛋白質 (PB2-Flag) を発現する pCAGGS プラスミド (pCAGGS-PB2-Flag) は、当研究室で以前に作製されたものを用いた。PB2 244DI(UUG) vRNA を発現するプラスミド (pPolI-PB2 244DI(UUG)) (図 6) は、pPolI PB2 に点変異 (28 A>U; 58 A>U; 109 A>U; 166 A>U; 175 A>U; 178 A>U; 184 A>U; 223 A>U; 268 A>U; 295 A>U) と欠失変異 (PB2 分節両末端から 600 塩基ずつ残し、間の領域を欠失) を加えたプラスミド (pPolI-PB2 noATG(600)(600)) を鋳型プラスミドとして使用し、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を応用したインバース PCR を用いて 244DI 欠損変異を加えて作製した。インバース PCR は PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社) を使用し、試薬のプロトコルを参照して行った。PB2(UUG) vRNA を発現するプラスミド (pPolI- PB2(UUG)) は、pPolI-PB2 noATG(600)(600)および pPolI-PB2 を鋳型として、In-Fusion クローニングを用いて pPolI-PB2 noATG(600)(600)の欠失変異を回復させて作製した。In-Fusion クローニングは In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech 社) を使用し、試薬のプロトコルを参照して行った。作製したプラスミドは大腸菌 DH5α 株に形質転換したものを用いて調製した。

#### リバーシジェネティクス法によるインフルエンザウイルスの合成

6 ウェルプレートで 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で一日培養した 293T 細胞の培地を、0.3% Bovine Serum Albumin (BSA ; SIGMA 社)、0.3% NaHCO<sub>3</sub>、1×MEM Amino Acids、1×MEM Vitamin、4mM L-Glutamine、100 units/ml penicillin – 100 µg/ml Streptomycin を添加した MEM 培地 (1×MEM/BSA) に交換し、ウイルス蛋白質発現プラスミド (pCAGGS-PB1, pCAGGS-PB2, pCAGGS-NP, pCAGGS-PA) および vRNA 発現プラスミ

ド (pPolI-PB1, pPolI-PA, pPolI-NP, pPolI-HA, pPolI-NA, pPolI-M, pPolI-NS, pPolI-PB2) をトランスフェクションした。244DI(UUG)ウイルスおよび PB2(UUG)ウイルスの合成時は、pPolI-PB2 の代わりに pPolI-PB2 244DI(UUG)または pPolI-PB2(UUG)を使用した。プラスミドのトランスフェクションには、トランスフェクション試薬 TransIT-293 (タカラバイオ社) を使用した。トランスフェクションから 48 時間後に 10 µg/ml tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK) 処理済みトリプシン (TPCK-Trypsin, Worthington Biochemical 社) 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 30 分インキュベートした後、培養上清を回収して低速遠心 (1750 × g、10 分、4°C) し、上清をウイルス液として回収した。

#### ウイルス培養

37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で一晩培養した MDCK 細胞または AX4/PB2 細胞の培養上清を除き 1×phosphate-buffered saline (PBS) (-) で 2 回洗浄した後、目的の感染多重度 (multiplicity of infection ; MOI) になるように 1×MEM/BSA で希釈したウイルス液を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 60 分インキュベートしてウイルスを細胞に吸着させた。ウイルス液を除去後、1×MEM/BSA – 1 µg/ml TPCK-Trypsin を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下でインキュベートした。培養後、上清を回収して低速遠心 (1750 × g、10 分、4°C) し、上清をウイルス培養液として回収した。

#### Reverse Transcription (RT) -PCR

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen 社) を用いて、培養ウイルス上清から vRNA を抽出した。逆転写酵素 SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific 社) および WSN 株 vRNA の U12 領域と U13 領域のプライマー (5'-AGCAAAAGCAGG-3', 5'-AGCGAAAGCAGG-3') を使用し、試薬のプロトコルを参照して vRNA を逆転写し、

相補 DNA (complement DNA ; cDNA) を合成した。PCR 試薬 KOD-Plus-Neo (TOYOBO 社) を使用し、試薬のプロトコルを参照して PCR 反応を行い、NP 分節 (forward primer, 5'-AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTC-3'; reverse primer, 5'-AGTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTT-3')、PB2 分節 (forward primer (図 7、図 9) , 5'-AGCGAAAGCAGGTCAATTATATTCAATTTGG-3'; forward primer (図 10、図 11) , 5'-AGCGAAAGCAGGTCAATTATATTCAATATGG-3'; reverse primer, 5'-AGTAGAAACAAGGTCGTTTTTAAACTATTCG-3') の cDNA を増幅した。GelRed (Biotium 社) を加えた 1% アガロースゲル電気泳動で PCR 産物を検出した。

#### プラークアッセイによるウイルス力価の計測

12 ウェルプレートに 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で一晩培養した MDCK 細胞または AX4/PB2 細胞の培養上清を除去し、1×MEM/BSA で 2 回洗浄した後、1×MEM/BSA で 10 倍階段希釈したウイルス液を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 60 分インキュベートしてウイルスを細胞に吸着させた。感染細胞を 1×MEM/BSA で 1 回洗浄した後、1×MEM/BSA-1% アガロース -1 µg/ml TPCK-Trypsin 混合液を加え、室温で 15 分以上静置した後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 2 日間培養した。培養後、20% ホルマリンを用いて感染細胞を 1 時間固定し、0.005% アミドブラック溶液で細胞を染色後、プラーク数を計測しウイルス力価を算出した。

#### 赤血球凝集 (HA) 試験

ニワトリ無菌保存血 (日本生物材料センター社) を用いて 0.5% ニワトリ赤血球/PBS 懸濁液を用意した。丸底 96 ウェルプレートの各ウェルに 1×PBS(-) を分注した後、1 列目にウイルス液を加え、2~12 列目に 2 倍階段希釈した。希釈ウイルス液と等量の 0.5% ニワトリ赤血球懸濁液を各ウェルに加え、低速で振盪後、4°C で 1 時間静置した。血球の凝集が見られたもののうち最も高い希釈率の逆数を、ウイルス培養上清の HA 価として算出した。



### ウイルス粒子の粗精製

クライオ電子顕微鏡観察用のウイルス粒子は、ウイルス培養上清を低速遠心（1750 × *g*、15 分、4°C）した後、20%(w/w) sucrose/1×PBS(-) に上清を重層し、SW32Ti ローター（BECKMAN 社）で 30000 rpm, 4°C, 1.5 時間遠心した。上清とスクロース溶液を除いて風乾し、ペレットダウンしたウイルス粒子を 1×PBS(-) で懸濁して回収した。ウエスタンブロットリングおよび RT-qPCR 用のウイルス粒子は、ウイルス培養上清を低速遠心（1750 × *g*、15 分、4°C）し、上清を回収して中速遠心（6595 × *g*、30 分、4°C）後、上清を回収した。上清に RNase(終濃度 5 µg/ml)を加えて 37°Cで 1 時間インキュベートした後、20%(w/w) sucrose/1×PBS(-) に上清を重層し、SW41Ti ローター（BECKMAN 社）で 28000 rpm, 4°C, 2 時間遠心した。上清とスクロース溶液を除いて風乾し、ペレットダウンしたウイルス粒子を 1×PBS(-) で懸濁して回収した。

### ウイルス粒子のクライオ電子顕微鏡観察

AX4/PB2 細胞に感染させたウイルスの培養上清を粗精製した後、クライオ電子顕微鏡を用いて観察した。クライオ電子顕微鏡観察用の試料を作製するため、予めプラズマ処理により浸水化処理を施したグリッド（Quantifoil Cu R1.2/1.3 200 mesh）に精製ウイルス液を吸着させた。グリッドは、Vitrobot Mark IV（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて 7.5 秒間ブロットし、液化エタン内で急速凍結した。作製した試料を、加速電圧 200 kV の Talos F200C cryo-EM（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて、液体窒素温度下で撮影した。撮影条件は倍率× 17500、ピクセルサイズ 0.602 nm / pix、defocus (-10 µm) に設定した。

### ウエスタンブロットリング

粗精製したウイルス粒子サンプルに Tris-Glycine SDS Sample Buffer（Thermo Fisher Scientific 社）と 50 mM dithiothreitol (DTT) を混合し、Mini - PROTEAN TGX Gel (Bio -

Rad 社) を用いて電気泳動した。泳動で分離した蛋白質を Immobilon - P transfer membrane (Millipore 社) に転写してブロッキングワシ (ナカライテスク社) を用いてブロッキング処理した後、5000 倍希釈したヤギ抗インフルエンザウイルス PB2 抗体 (#sc-17603; Santa Cruz 社) またはマウス抗  $\beta$ -actin 抗体 (#ab8226; Abcam 社) を 4°C で一晩処理し、5000 倍希釈した二次抗体抗ヤギ IgG 抗体 (#ab6741; Abcam 社) または抗マウス IgG 抗体 (#NA931; GE Healthcare 社) を常温で 1 時間処理した後、検出試薬 Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク社) で処理し、ChemiDoc (Bio-Rad 社) を用いて目的の蛋白質を検出した。

#### インフルエンザウイルス vRNA 分節特異的 RT-qPCR

粗精製ウイルス粒子サンプルから QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen 社) を用いて抽出した vRNA を RT-PCR と同様に逆転写し、cDNA を合成した。cDNA を TE バッファーで 50 倍希釈した後、各分節由来 cDNA に対応するプライマー(表 1) と quantitative PCR (qPCR) 試薬 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社) を使用し、Rotor-GeneQ (QIAGEN 社) を用いて qPCR 反応を行い、各分節 cDNA を定量した。qPCR 反応は 94°C で 2 分インキュベートした後、95°C 15 秒、55°C 15 秒、72°C 30 秒の増幅条件を 40 サイクル繰り返した。定量は cross point 法で行い、10 倍階段希釈した WSN WT vRNA の測定結果を用いて検量線を作成し、サンプルの測定結果と検量線をもとに vRNA の相対量を算出した。

表 1. qPCR に用いたプライマーリスト

プライマー名	配列 (5'-3')	分節	F/R
WSN_PB2_151_qF2	AGGAGACGTGGTGTGGTAATG	PB2	F
WSN_PB2_151_qR2	GGCCATCCGAATTCCTTTGGTC	PB2	R
WSNPB1_qF	CTGCCAGAAGACAATGAACC	PB1	F
WSNPB1_qR	GGCCATTGCTTCCAATACAC	PB1	R
WSNPA_qF	AGCAAGGCGAGTCAATAGTC	PA	F
WSNPA_qR2	TACTGTCCAGGCTATTGTGC	PA	R
WSNHA_qF4	AGCCACAACGGGAAACTATG	HA	F
WSNHA_qR6	AAGCAGTGAGTCGCATTCTG	HA	R
WSNNA_qF3	GTGGGCTATACACAGCAAAGAC	NA	F
WSNNA_qR3	GTCCTGCATTCCAAGTGAGAAC	NA	R
WSNNP_qF	GCGCCAAGCTAATAATGGTG	NP	F
WSNNP_qR2	TGGAGTGCCAGATCATCATG	NP	R
WSNM_qF	TAGCCAGCACTACAGCTAAG	M	F
WSNM_qR2	TGGCCTGACTAGCAATATCC	M	R
WSNNS_qF2	TCAGAATGGACCAGGCGATC	NS	F
WSNNS_qR2	ATTAGAGTCTCCAGCCGGTC	NS	R

## vRNP の精製と AFM 観察

10cm ディッシュに 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で一日培養した 293T 細胞の培地を 1×MEM/BSA に交換し、ウイルス蛋白質発現プラスミド (pCAGGS-PB1, pCAGGS-PB2-Flag, pCAGGS-NP, pCAGGS-PA) および vRNA 発現プラスミド (pPolI-PB2(UUG)または pPolI-PB2 244DI(UUG)) をトランスフェクションした。プラスミドのトランスフェクションには、トランスフェクション試薬 TransIT-293 を使用した。トランスフェクションから 48 時間後に細胞を 1×PBS(-) で懸濁し、低速遠心 (780 × *g*、10 分、4°C) して細胞を回収した後、溶解バッファー [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 0.05% NP-40, 2 mM DTT, 10 mM Ribonucleoside-Vanadyl Complex (NEB 社) , 1 tablet/10 ml Protease inhibitor complete EDTA-free (Roche 社)] を用いて細胞を溶解し、中速遠心 (20000 × *g*、15 分、4°C) してライセートの上清を回収した。ライセートに抗 Flag M2 アフィニティーゲル (SIGMA 社) を加えて 4°Cで一晩回転し、アフィニティーゲルを溶解バッファーで 1 回、洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 200 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM DTT) で 3 回洗浄した後、500 ng/μl Flag ペプチド/洗浄バッファーを加えて 4°Cで 30 分回転させ、PB2-Flag を含む vRNP を溶出した。ウエスタンブロッティングを用いて vRNP の溶出を確認した後、グリセロール密度勾配遠心法により vRNP を精製した。10%刻みで密度勾配をつけた 30~70% グリセロール/TN バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl) に vRNP 溶出サンプルを重層し、SW55Ti ローター (BECKMAN 社) を用いて 45000 rpm, 4°C, 3 時間超遠心した後、サンプルを上から 11 画分に分けて回収した。回収した画分を SDS-PAGE で流して銀染色し、NP (約 56 kDa) のバンド強度が最も高い画分を vRNP 精製画分と定めた。vRNP 精製画分を撮影バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 40 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) で希釈してマイカ表面上に固着させ、High-Speed AFM System Nano Explorer Model (RIBM 社) を用いて観察した。カンチレバーは BL-AC10DS (オリンパス社) を用いた。

## 第三章

### 結果

### 3-1. 244DI(UUG)ウイルスの作出

はじめに、244DI(UUG)ウイルスを作出するために、DI 遺伝子分節発現プラスミドを製作した。インフルエンザウイルス A/WSN/33 株の PB2 vRNA をもとに、3'末端側から 244 塩基および 5'末端側から 151 塩基を残してその間の配列 (1946 塩基) を欠損させた PB2 244DI 分節発現プラスミドを設計した (図 6)。この PB2 244DI 分節には、転写の際の PB2 蛋白質の翻訳開始コドンおよび同リーディングフレーム上に開始コドンになりうる AUG コドンが 8 つ存在し、PB2 蛋白質の部分欠損体が発現される可能性がある。PB2 244DI 分節から発現する PB2 蛋白質の部分欠損体はインターフェロン応答を誘導することが報告されている (Boergeling *et al.*, PLoS Pathog, 2015) が、244DI ウイルスによるインフルエンザウイルス野生株の増殖抑制能には、PB2 蛋白質部分欠損体は関与しないことも報告されている (Meng *et al.*, Virol J, 2017)。本研究では、PB2 蛋白質部分欠損体発現によるインターフェロン誘導で DI ウイルス産生が阻害される可能性を除外するため、PB2 244DI 分節の 8 つの AUG コドンを UUG コドンに置換した PB2 244DI(UUG) vRNA を発現するプラスミド pPolI-PB2 244DI(UUG) を作出して用いた (図 6)。

リバーシジェネティクス法により、pPolI-PB2 244DI(UUG) とその他 7 種類のインフルエンザウイルス遺伝子発現プラスミドとポリメラーゼ複合体蛋白質および NP 蛋白質発現プラスミドを細胞にトランスフェクションして、244DI(UUG)ウイルスを作出した。その後、244DI(UUG)ウイルスを AX4/PB2 細胞で増殖させた。AX4/PB2 細胞は、MDCK 細胞にヒト由来インフルエンザウイルスのレセプターであるヒト 2,6 シアリルトランスフェラーゼを過剰発現させ、ヒトインフルエンザウイルスの感染性を上げた AX4 細胞 (Hatakeyama *et al.*, J Clin MicroBiol, 2005) に、さらにインフルエンザウイルス PB2 蛋白質を恒常発現させた細胞で、PB2 に機能不全を持つインフルエンザウイルスのレスキューに用いられている (Ozawa *et al.*, J Gen Virol, 2011)。AX4/PB2 細胞で増殖した 244DI(UUG)ウイルスが DI 遺伝子分節を保持しているかどうかを確認するために、回収したウイルス液から RNA

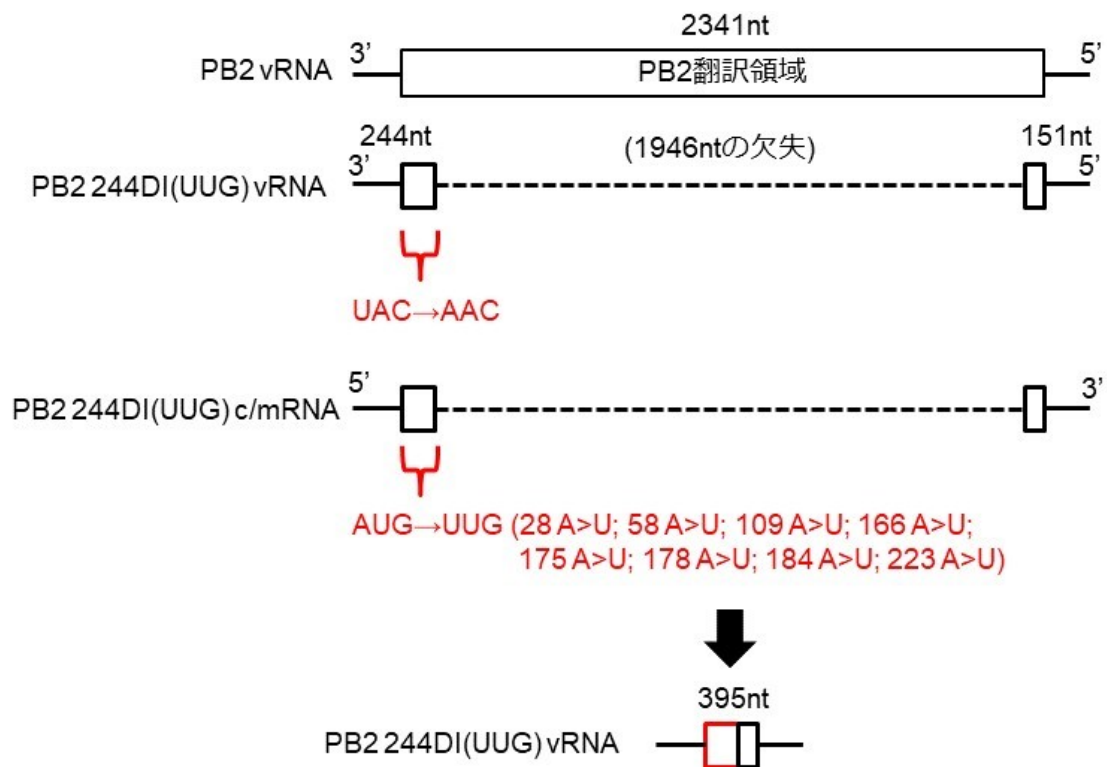


図 6. PB2 244DI(UUG)分節の模式図

PB2 244DI 分節と同様の欠失に加えて、DI 分節から PB2 タンパク質欠損体が発現するのを防ぐため、8 か所の開始コドン(AUG)を UUG に変異させた。

を抽出した。RT-PCR を行って PB2 分節および NP 分節 vRNA から全長 cDNA を増幅し、アガロースゲル電気泳動を行った。その結果、244DI(UUG)ウイルスサンプルからは全長 NP 分節および PB2 244DI(UUG)分節由来の 395 bp 長の cDNA が検出され、全長 PB2 分節は検出されなかった (図 7)。

また、作出した DI ウイルスの 8 分節すべての遺伝子配列をシーケンシングした結果、PB2 244DI(UUG)分節には新たな変異が挿入されていないことを確認した。一方、DI 分節以外では、PA 分節に 1 カ所点変異(1705 A>C; 561 番目のメチオニンのロイシンへの変異)が挿入されていた。この点変異がウイルスの増殖能に影響を与えるか否かを解析した結果、野生型 PA 分節を有する 244DI(UUG)ウイルスと、PA 分節に点変異 (1705 A>C) を加えた 244DI(UUG)ウイルスとでレスキュー後のウイルス力価に有意差は見られなかった。また、前者はレスキュー後も野生型 PA 分節を維持していた。つまり、PA 分節の点変異 (1705 A>C) の有無にかかわらず、ウイルス増殖能に違いは認められなかった。

### 3-2. 244DI(UUG)ウイルスは AX4/PB2 細胞で効率よくクローン培養できる

作出した 244DI(UUG)ウイルスの培養細胞における増殖性を明らかにするために、野生型ウイルス WSN WT または 244DI(UUG)ウイルスを MDCK 細胞または AX4/PB2 細胞に MOI=0.0001 で感染させ、経時的に培養上清を回収した。その後、各感染後時間のウイルス力価を AX4/PB2 細胞を用いたブランクアッセイで測定した (図 8)。WSN WT ウイルスは MDCK 細胞と AX4/PB2 細胞の両方で効率よく増殖し、力価は最高で  $10^9$  plaque-forming unit (PFU) /ml 近くまで達した。これに対し、244DI(UUG)ウイルスは MDCK 細胞では全く増殖しなかったが、AX4/PB2 細胞ではおよそ  $10^7$  PFU/ml まで増殖した。これらの結果から、244DI(UUG)ウイルスは、増殖効率は野生型 WSN より劣るものの、AX4/PB2 細胞では効率よくクローン培養できることが確認された。

次に、244DI(UUG)ウイルスの増殖安定性と遺伝的安定性を調べる目的で、244DI(UUG)



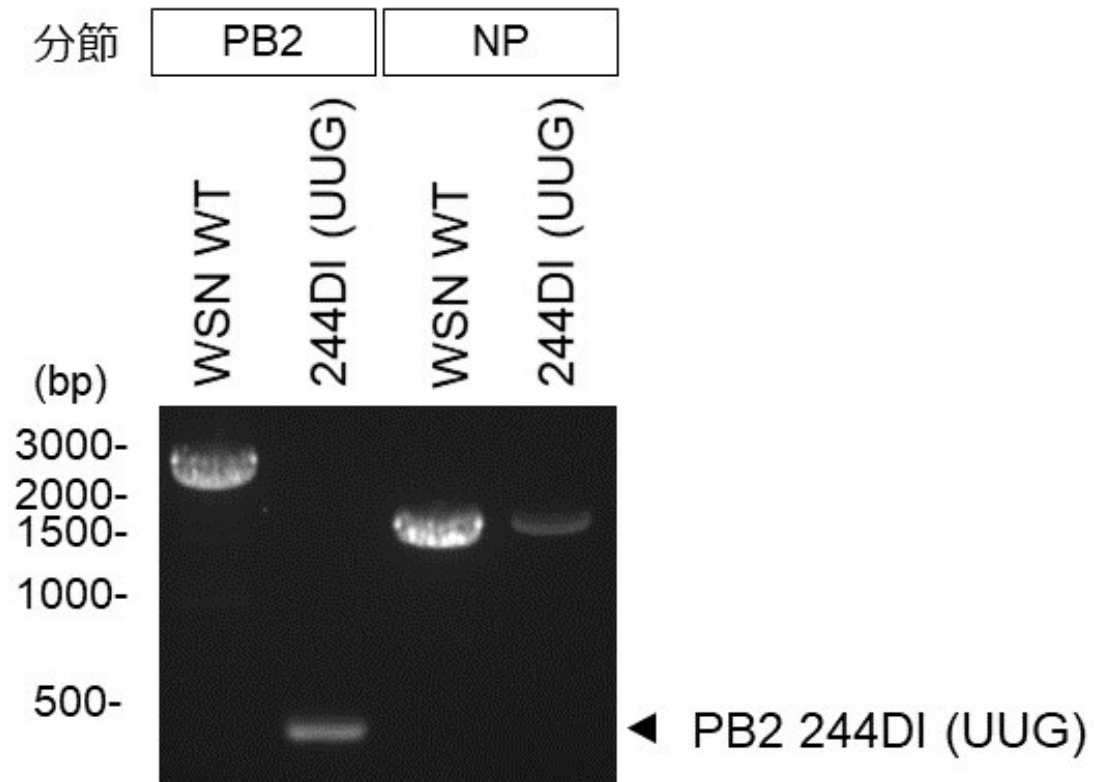


図 7. WSN WT ウイルス及び 244DI(UUG) ウイルスから抽出した vRNA の RT-PCR

MDCK 細胞で培養した WSN WT ウイルス液及び AX4/PB2 細胞で培養した 244DI(UUG) ウイルス液からそれぞれの vRNA を抽出した。抽出した vRNA から逆転写反応により合成した cDNA を鋳型として、PB2 分節及び NP 分節特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行い、cDNA を増幅した。PCR 産物を GelRed を加えたアガロースゲルで電気泳動し、cDNA を検出した。

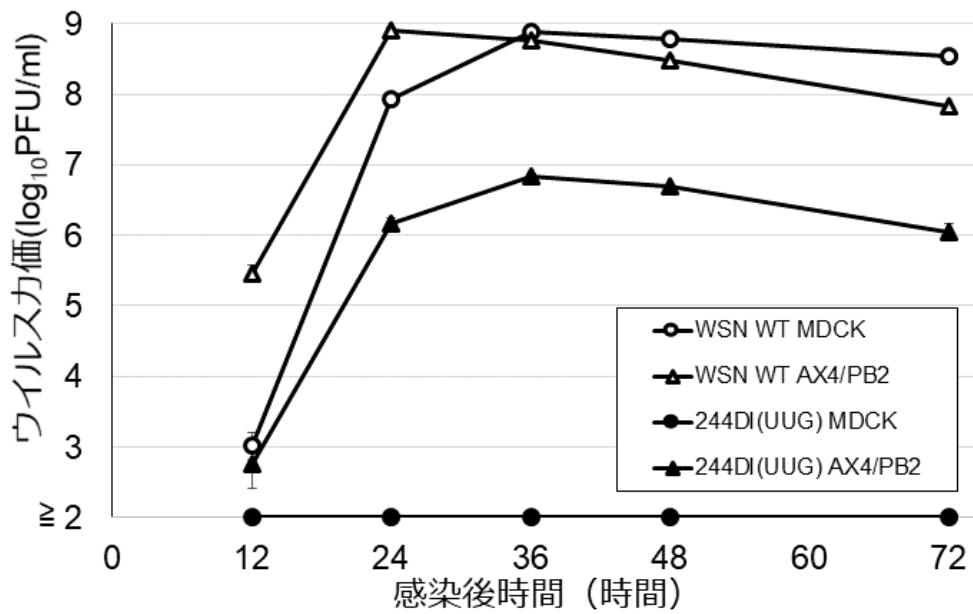


図 8. 244DI (UUG)ウイルスの増殖曲線

MDCK または AX4/PB2 細胞に WSN WT または 244DI (UUG) ウイルスを MOI=0.0001 で感染させて増殖させ、12、24、36、48、72 時間後に培養上清を回収し、AX4/PB2 細胞を用いたプラークアッセイでウイルス力価を計測した。3 回の実験結果から算出した平均値を折れ線グラフで、標準偏差をエラーバーで示した。MDCK 細胞で増殖させた 244DI (UUG)ウイルスの力価は検出限界を下回った。

ウイルスを AX4/PB2 細胞で計 10 回継代した。継代培養の 1 回目はリバーシジェネティクスにより得たウイルス液を 10 倍希釈して、2 回目は MOI=0.0001 で、その後 3 回目から 10 回目までは継代ウイルス液を 30,000 倍希釈して、 $4 \times 10^5$  個の AX4/PB2 細胞に感染させた。45 時間後にウイルス液を回収し、継代 10 回目の p10 ウイルスのウイルス力価を計測するとともに、ウイルス遺伝子配列をシーケンシングにより確認した。その結果、p10 サンプルのウイルス力価は、 $3.2 \times 10^7$  PFU/ml であった。従って、継代を繰り返しても増殖能が低下することなく、十分に DI ウイルスが増殖することがわかった。さらに、10 回継代した 244DI(UUG)ウイルスにおいても、PB2 244DI (UUG)分節の遺伝子配列は維持されていることが確認された (図 9)。以上により、ヘルパーウイルスを用いることなく、遺伝的に安定した 244DI(UUG)ウイルスを効率よくクローン培養する系が確立された。

### 3-3. 244DI(UUG)ウイルスは野生型インフルエンザウイルスの増殖を抑制する

AX4/PB2 細胞でクローン培養された 244DI(UUG)ウイルスが野生型の感染性インフルエンザウイルスの増殖を抑制するか否かを明らかにするために、MDCK 細胞に野生型 WSN ウイルスとさまざまな濃度の 244DI(UUG)ウイルスを共感染させた。MDCK 細胞に感染させる WSN WT ウイルス量を MOI=0.0001 に固定し、混合する 244DI(UUG)ウイルス量を MOI=0.001, 0.01, 0.1, 1 とし、MDCK 細胞に感染させた 48 時間後に培養上清を回収した。ここでは比較対照群として WSN WT のみ (MOI=0.0001) または 244DI(UUG)のみ (MOI=1) を MDCK 細胞に感染させた。244DI(UUG)ウイルスによる野生型ウイルスの増殖抑制効率を調べるため、MDCK 細胞を用いてプラークアッセイを行うとともに、培養上清中のウイルス遺伝子の長さを RT-PCR により調べた。その結果、野生型ウイルスのみ感染させたサンプルと比較して、DI ウイルスの共感染により野生型ウイルスの力価が下がること、また、DI ウイルスの感染量依存的に野生型ウイルスのウイルス力価が低下することが確認された。また、DI ウイルスを共感染することで、培養上清中の PB2 244DI (UUG)分節 vRNA が全

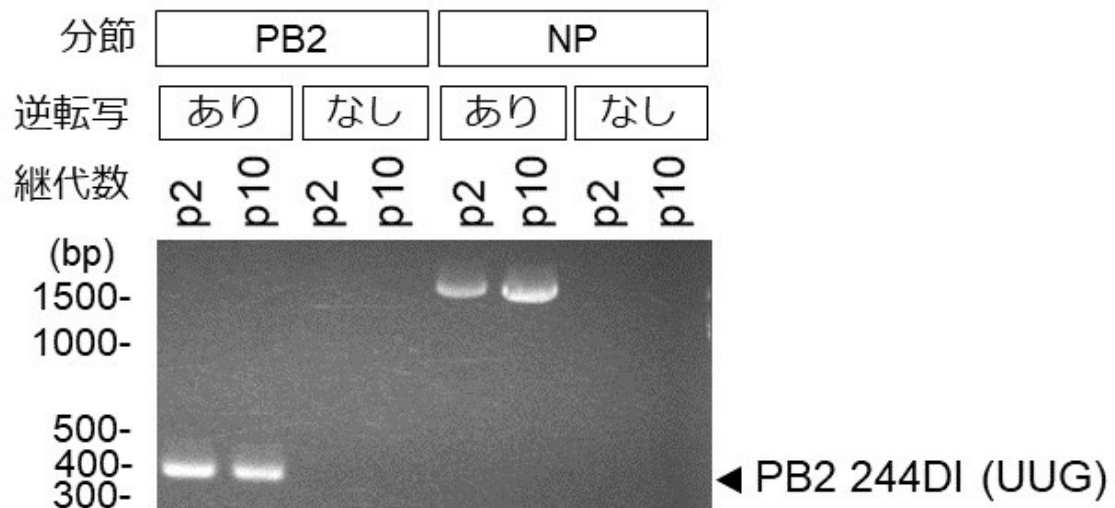


図 9. 継代を繰り返した 244DI (UUG)ウイルスから抽出した vRNA の RT-PCR

2 回(p2)または 10 回(p10)AX4/PB2 細胞で継代培養した 244DI (UUG)ウイルスから vRNA を抽出し、逆転写して合成した cDNA を鋳型として PB2 分節及び NP 分節特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行い、cDNA を増幅した。PCR 産物を GelRed を加えたアガロースゲルで電気泳動し、cDNA を検出した。

長 PB2 分節 vRNA より多く検出された (図 10)。特に、WT ウイルス:DI ウイルスの混合比が 1:1,000 のサンプルでは、培養上清中のウイルス力価が 100,000 分の 1 程度に低下し、混合比 1:10,000 のサンプルでは、感染性ウイルスは検出されなかった。また、混合比 1:1,000 および 1:10,000 サンプルでは、全長 PB2 分節がほとんど検出されなただけでなく、PB2 244DI (UUG)分節も NP 分節もほとんど検出されなかった。この結果は、共感染させる DI ウイルス量を増やすことで野生型ウイルスの増殖が大きく抑制された結果、野生型ウイルスだけでなく DI ウイルスの増殖も抑制されたためと考えられる。

244DI(UUG)ウイルスによる野生型ウイルスの増殖抑制が、244DI(UUG)ウイルスと野生型ウイルスが同一細胞に共感染することで生じるか否かを確認するため、より高い MOI および短時間での培養条件で共感染実験を行った。野生型ウイルスと 244DI(UUG)ウイルスをそれぞれ MOI=1 で混合したサンプル、野生型ウイルスのみ、あるいは 244DI(UUG)ウイルスのみの 3 種類のサンプルを準備し、それぞれのサンプルを MDCK 細胞に感染させて 10 時間培養し、培養上清のウイルス力価を MDCK 細胞を用いたブランクアッセイで測定した。結果、野生型ウイルスと DI ウイルスを混合して感染させたサンプルでは、野生型ウイルスのみ感染させたサンプルと比較して培養上清中のウイルス力価が 100 分の 1 程度に低下した (図 11A)。さらに培養上清から vRNA を抽出して RT-PCR で検出したところ、野生型ウイルスと DI ウイルスを共感染させたサンプルでは PB2 244DI(UUG)分節が容易に検出された一方、全長 PB2 分節はわずかに検出される程度であった (図 11B)。以上により、244DI(UUG)ウイルスが野生型ウイルスと同一細胞へ共感染することにより、野生型ウイルスの増殖を抑制することが確認された。

#### 3-4. 244DI(UUG)ウイルスの性状解析

本研究により初めて 244DI ウイルスクローンを得られたことから、従来のヘルパーウイルスと混合された DI ウイルスでは不可能であった DI インフルエンザウイルスの性状解析

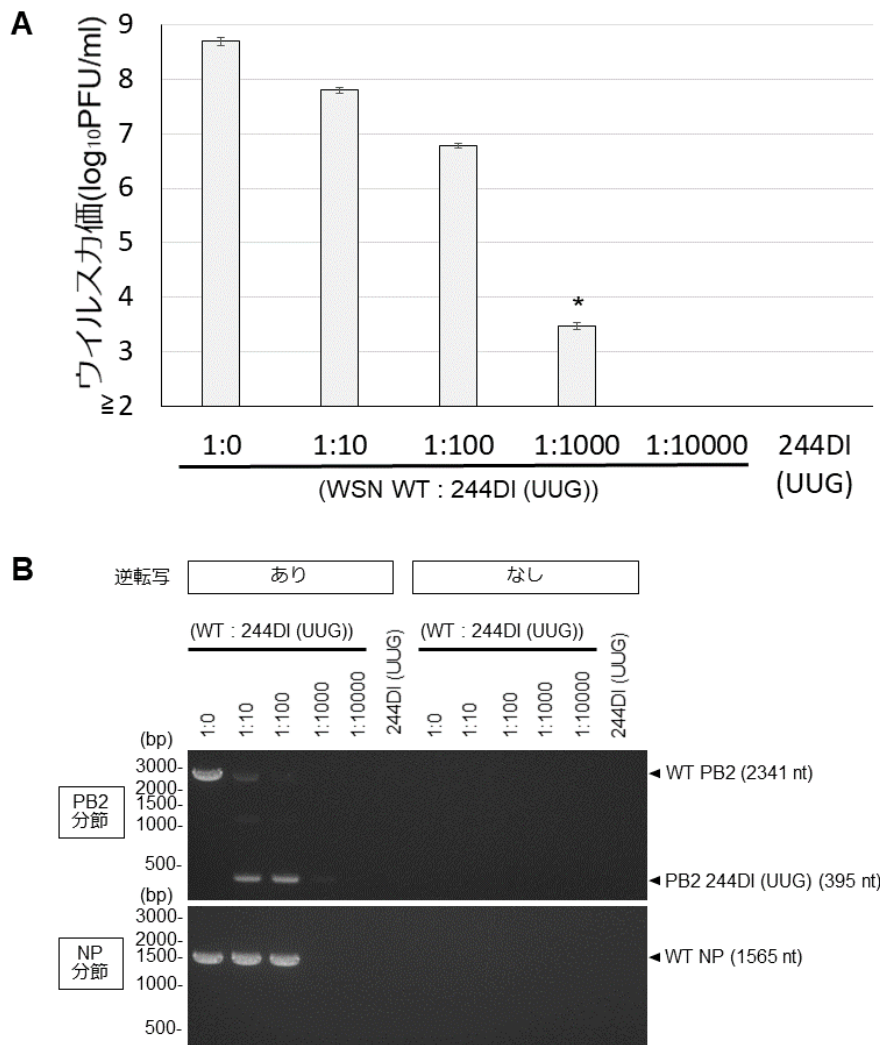


図 10. 244DI (UUG)ウイルスと WSN WT ウイルスの共感染実験

WSN WT ウイルス (MOI=0.0001) と、ウイルス感染価を振った 244DI (UUG) ウイルス (WSN WT: 244DI (UUG)=1: 10, 100, 1000, 10000)の混合液、WSN WT ウイルスのみ、244DI (UUG)ウイルスのみ、のいずれかを MDCK 細胞に感染させ、48 時間後にウイルス培養上清を回収した。(A)MDCK 細胞を用いたプラークアッセイで各培養上清サンプルのウイルス力価を計測した。3 回の実験結果から算出した平均値を棒グラフで、標準偏差をエラーバーで示した。\*で示したサンプルは 3 回の実験のうち 1 回は検出限界を下回ったため、2 回の実験結果の平均値を棒グラフで示した。(B)各培養上清サンプルから vRNA を抽出し、逆転写して合成した cDNA を鋳型として PB2 分節及び NP 分節特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行い、cDNA を増幅した。PCR 産物を GelRed を加えたアガロースゲルで電気泳動し、cDNA を検出した。コントロールサンプルとして、逆転写していない vRNA を鋳型として PCR したサンプルも用意し、電気泳動した。

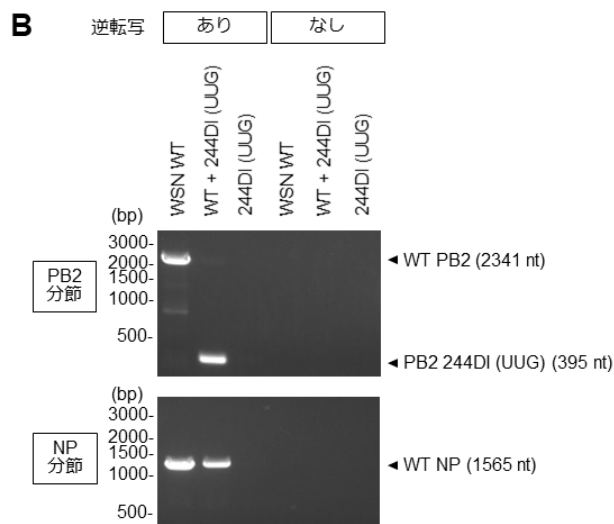
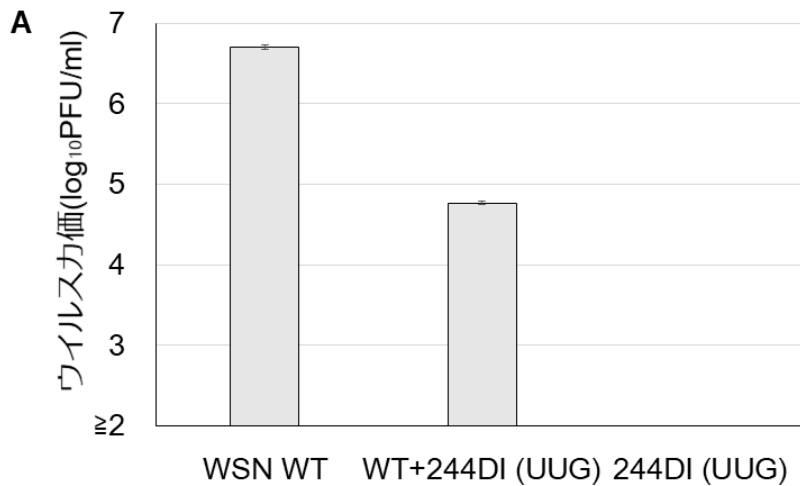


図 11. 244DI (UUG)ウイルスと WSN WT ウイルスの高 MOI 短時間培養条件での共感染実験

WSN WT ウイルス (MOI=1) と 244DI (UUG) ウイルス (MOI=1) の混合液、WSN WT ウイルスのみ (MOI=1) のウイルス液、244DI (UUG)ウイルスのみ (MOI=1) のウイルス液、のいずれかを MDCK 細胞に感染させ、10hpi でウイルス培養上清を回収した。(A)MDCK 細胞を用いたプラークアッセイで各培養上清サンプルのウイルス力価を計測した。3 回の実験結果から算出した平均値を棒グラフで、標準偏差をエラーバーで示した。(B)各培養上清サンプルから vRNA を抽出し、逆転写して合成した cDNA を鋳型として PB2 分節及び NP 分節特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行い、cDNA を増幅した。PCR 産物を GelRed を加えたアガロースゲルで電気泳動し、cDNA を検出した。コントロールサンプルとして、逆転写していない vRNA を鋳型として PCR にかけたサンプルも用意し、電気泳動した。

を行った。

初めに、産生されたウイルス粒子量を比較する目的で、WSN WT ウイルスおよび 244DI(UUG)ウイルスの HA 試験を行った。その結果、ウイルス液等量当たりの HA 価は野生型ウイルスと DI ウイルスで違いがないこと、すなわち、ウイルス粒子産生効率は野生型ウイルスと DI ウイルスでは同程度であることが示された。一方、AX4/PB2 細胞を用いてウイルス力価を調べたところ、野生型ウイルスと比較して 244DI(UUG)ウイルスのウイルス液等量当たりのウイルス価が 100 倍程度低かった (表 2)。つまり、244DI(UUG)ウイルスのウイルス粒子量 (HA 価) あたりのウイルス力価は野生型ウイルスの約 1.9%しかないことがわかった (表 2)。従って、244DI(UUG)ウイルスには、非増殖性のウイルス粒子が多く含まれると考えられた。

次に、DI ウイルス粒子の形態が野生型ウイルス粒子と同じかどうかを確認するため、クライオ電子顕微鏡法を用いた。クローン培養した 244DI(UUG)ウイルス液を 20%スクロースクッションに重層し、超遠心によるペレットダウンで DI ウイルス粒子を粗精製後、クライオ電子顕微鏡下で観察した。クライオ電子顕微鏡法は急速凍結したサンプルを乾燥させることなく無染色で電子顕微鏡解析するため、ネガティブ染色電子顕微鏡法と比較してアーティファクトが少なく、生のウイルス粒子により近い状態でその形態を観察することができる。両ウイルス粒子を観察した結果、野生型ウイルス粒子の粒径 (約 90 nm) に比べて DI ウイルス粒子の粒径 (約 70 nm) が小さくなる傾向が認められた (図 12)。このことから、DI ウイルスの粒子形成が正常に行われておらず、そのゲノムが正常に取り込まれていない可能性が示された。

そこで、244DI(UUG)ウイルスのゲノムパッケージング効率を明らかにするため、ウイルス粒子中の 8 分節の vRNP 量をウエスタンブロッティングおよび RT-qPCR 法により解析した。244DI(UUG)ウイルスの比較対照ウイルスとして、PB2 vRNA と同じ長さの PB2(UUG)分節と残り 7 種類の野生型遺伝子分節を持つ PB2(UUG)ウイルスを作出した。



表 2. 産生されたウイルス粒子量と感染価の比較

ウイルス株	HA 価 (HA units/ml) <sup>1)</sup>	感染価 (PFU/ml) <sup>2)</sup>	PFU/HA 価の相対値 <sup>3)</sup> (平均値 ± 標準偏差)
WSN WT	2,560	$2.83 \times 10^8$	$100 \pm 21.27$
244DI(UUG)	2,560	$5.37 \times 10^6$	$1.89 \pm 0.14$

1) HA 価はニワトリ赤血球数を用いた HA 試験で計測した。

2) ウイルス価は AX4/PB2 細胞を用いたプラークアッセイで計測した。

3) WSN WT の PFU/HA 価を 100 として、PFU/HA 価の相対値を算出した。3 回の実験結果から算出した平均値と標準偏差を示した。

WSN WT

244DI(UUG)

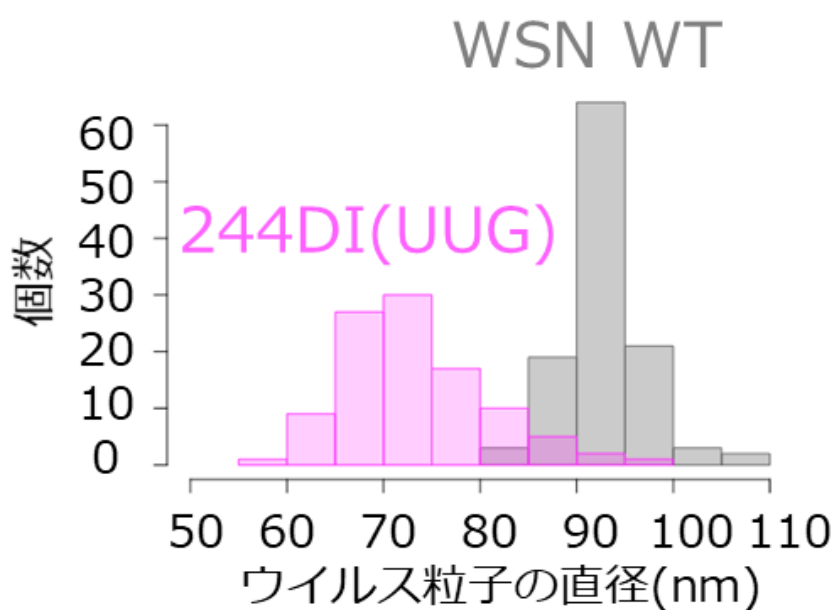
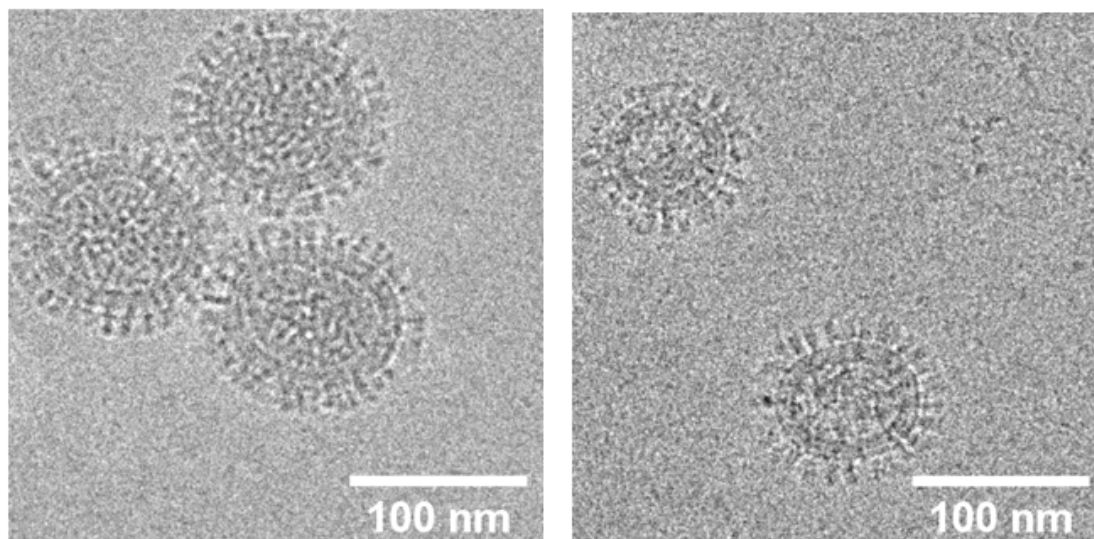


図 12. 244DI(UUG)ウイルス粒子のクライオ電子顕微鏡観察

ウイルス培養上清を 20%スクロースクッションに重層して超遠心し、粗精製したウイルス粒子をクライオ電子顕微鏡で観察した。WSN WT ウイルス粒子（左上図）に比べて、244DI(UUG) ウイルス粒子（右上図）は、ウイルス粒子の粒径が小さいものが多く観察された。ウイルス粒子の直径を計測し、粒子数を数えたところ、WSN WT ウイルス粒子では直径 90 nm、244DI(UUG) ウイルス粒子では直径 70 nm 付近でピークが見られた(下図)。

PB2(UUG)分節は、PB2 分節の全長と同じ塩基長を有しているが、PB2 244DI(UUG)分節のように PB2 翻訳領域の AUG コドンを UUG へ変異させているため、PB2 蛋白質を発現しない (図 13)。

初めに、産生されるウイルス粒子にパッケージングされる RNP 量を比較するため、野生型ウイルスと PB2(UUG)ウイルス、244DI(UUG)のウイルス粒子中の NP 蛋白質量をウエスタンブロッティングにより調べた。それぞれのウイルスを AX4/PB2 細胞で増殖させ、超遠心によりウイルス粒子を濃縮し、産生ウイルス粒子の指標として M1 蛋白質を、RNP の指標として NP 蛋白質を検出した。その結果、PB2(UUG)ウイルスと比較して、244DI(UUG)ウイルスの M1 蛋白質は同程度検出されたのに対し、NP 蛋白質量は著しく少なかった (図 14)。つまり、244DI(UUG)ウイルス粒子内にパッケージングされる vRNP 量が著しく少ない可能性が示された。

次に、濃縮したウイルス粒子から vRNA を抽出して逆転写し、8 分節に特異的なプライマーを用いて qPCR を行い、ウイルス粒子内にパッケージングされた各分節 vRNA の相対定量を行った。PB2 分節検出用プライマーは、野生型 PB2 分節だけでなく、PB2(UUG)分節、PB2 244DI(UUG)分節のいずれも検出可能であり、それぞれのウイルスサンプルで PB2 分節検出用プライマーでの定量値を 100 として他分節の相対的な定量値を算出した。その結果、PB2(UUG)ウイルスでは 8 分節がほぼ同程度に検出されたのに対し、244DI(UUG)ウイルスでは、DI 分節以外の 7 分節全ての vRNA の検出量が PB2 244DI(UUG)分節に比べて大幅に少ないことがわかった (図 15)。先行研究では、PB2 244DI 分節は野生型 PB2 分節のゲノム複製やゲノムパッケージングを競合阻害することが知られている (Dimmock and Easton, J Virol, 2014)。本結果ではさらに、PB2 244DI(UUG)分節は他の 7 種類の vRNA のパッケージング効率を抑制することで野生型ウイルスの増殖を抑制するメカニズムを有すると考えられた。

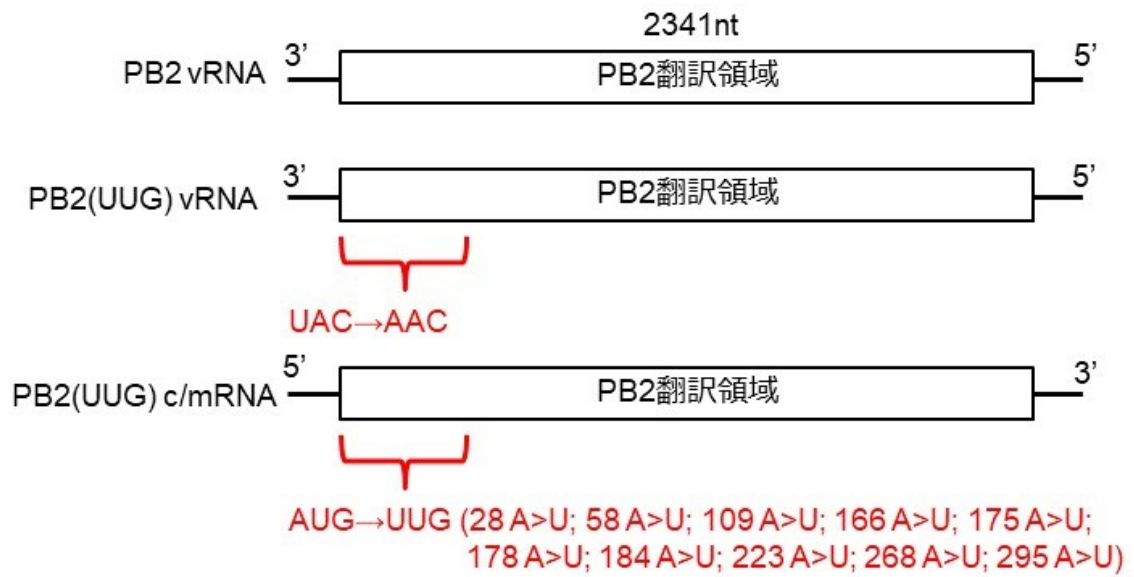


図 13. PB2(UUG)分節の模式図

野生型 PB2 分節と同じ塩基数を持つが、PB2 タンパク質の発現を防ぐため、10 か所の開始コドン(AUG)を UUG に変異させた。

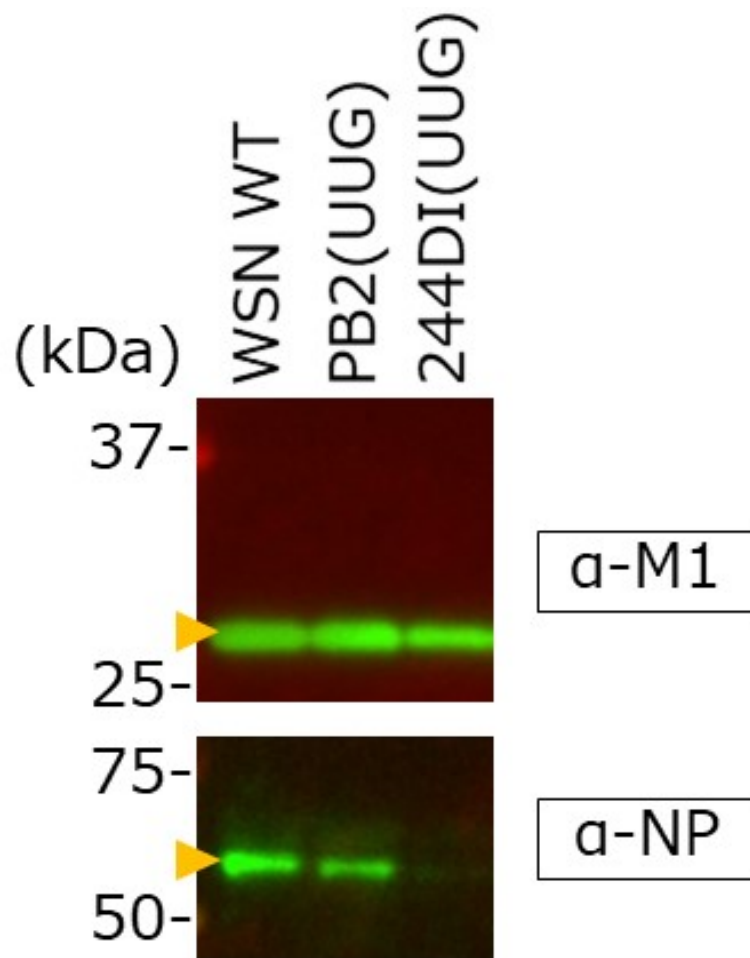


図 14. 244DI(UUG)ウイルス粒子のウエスタンブロッティング

ウイルス培養上清を 20%スクロースクッションに重層して超遠心し、粗精製したウイルス粒子中の蛋白質をウエスタンブロッティングで検出した。PB2(UUG)ウイルスと 244DI(UUG) ウイルスのどちらも M1 蛋白質は同程度検出された (上図) のに対し、NP 蛋白質の検出量は PB2(UUG)ウイルスに比べて 244DI(UUG) ウイルスでは大きく減少した (下図)。

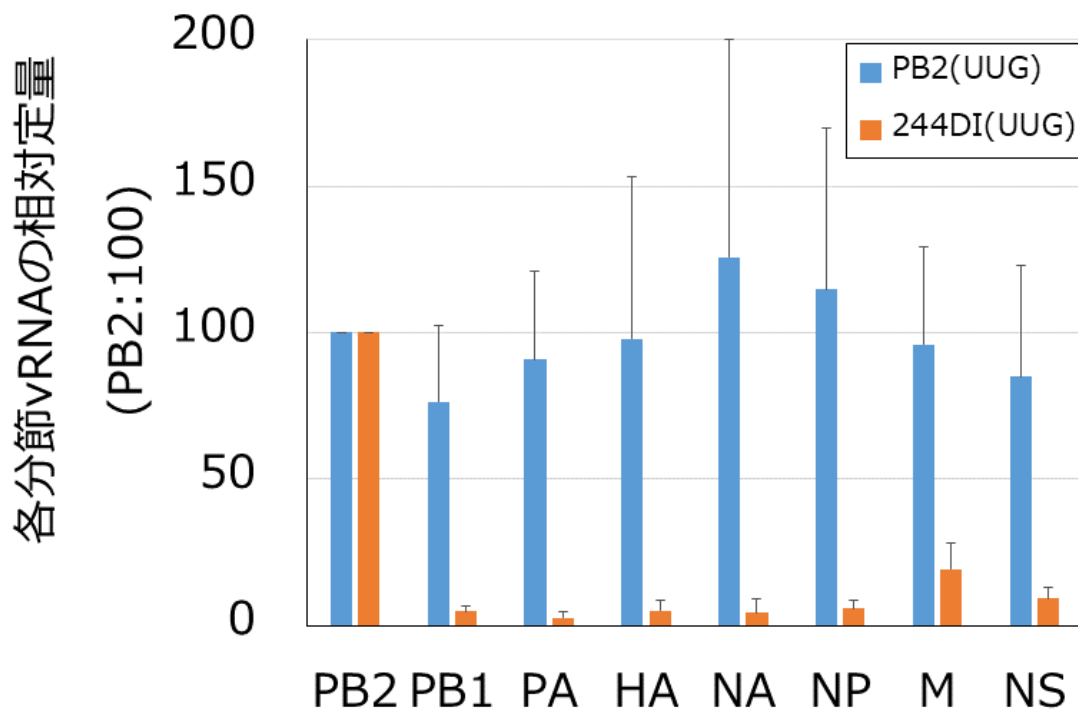


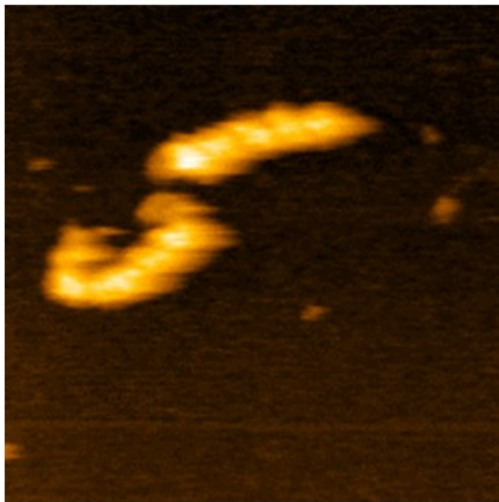
図 15. 244DI(UUG)ウイルス粒子内 vRNA の分節特異的 RT-qPCR

ウイルス培養上清をスクロースクッションに重層して超遠心し、粗精製したウイルス粒子中の vRNA を抽出して逆転写し、qPCR を用いて各分節 vRNA を相対定量した。PB2 分節用 qPCR プライマーは、PB2(UUG)分節と PB2 244DI(UUG)分節の両方を検出できるように設計したものを使用し、PB2 分節の検出量を 100 としたときの他分節の検出量の相対値をグラフで示した。定量は cross point 法を使用し、10 倍階段希釈した WSN WT 精製ウイルス粒子 vRNA サンプルを用いて検量線を作成し、各分節の検出結果から vRNA の相対量を算出した。

### 3-5. PB2 244DI(UUG) vRNP の性状解析

PB2 244DI(UUG) vRNP がパッケージングされる際に、残り 7 分節の vRNP がウイルス粒子に効率よくパッケージングされなくなる理由として、PB2 244DI(UUG) vRNP が正常な螺旋構造を形成できていない可能性がある。その可能性を検証するため、244DI(UUG)vRNA が形成する vRNP の形態を調べた。293T 細胞へのプラスミドトランスフェクションにより、細胞内に RNP 構成蛋白質 (PB2-Flag、PB1、PA、NP) と PB2(UUG) vRNA または PB2 244DI(UUG) vRNA を発現させて vRNP を構築した。vRNP を精製するため、PB2 蛋白質には C 末端に Flag ペプチドタグを付加した。トランスフェクション細胞をライセート化して回収し、抗 Flag アフィニティゲルを用いた免疫沈降法で vRNP を精製した後、グリセロール密度勾配遠心法により vRNP をさらに精製し、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy ; AFM) を用いて観察した。完全長をもつ PB2(UUG) vRNP では、通常の PB2 vRNP と同様の螺旋構造の vRNP が検出された (図 16)。それに対し PB2 244DI(UUG) vRNP では、リング構造が少し捻じれたような vRNP が多く見られた。従って、PB2 244DI(UUG) vRNP の構造は、通常の vRNP 構造と大きく異なることが明らかになった。

PB2 (UUG) vRNP



PB2 244DI(UUG) vRNP

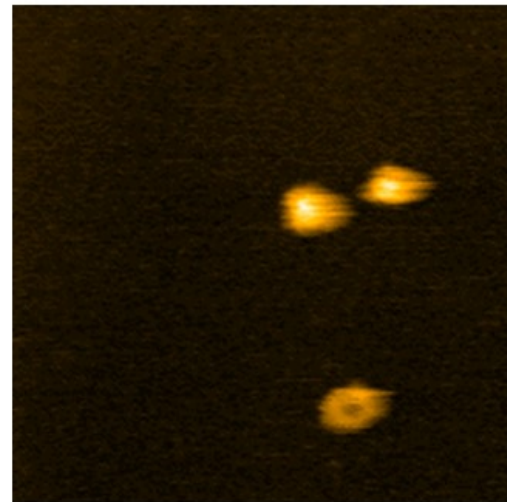


図 16. vRNP 精製画分の AFM 観察

野生型 PB2 分節と同じ塩基長を有する PB2(UUG) vRNP (左図) は、螺旋状の構造を形成している。一方、PB2 244DI(UUG) vRNP (右上図) は、リング状構造 (右図下部) よりも、リング状構造が少し捻じれたような構造 (右図上部) をとるものが多く観察された。



## 第四章

### 考察

#### 4-1. 244DI ウイルスのクローン培養法の特長

本研究では、PB2 恒常発現細胞に 244DI インフルエンザウイルスを感染させることで、ヘルパーウイルスを使用せずに 244DI ウイルスをクローン培養する方法を確立した。また、クローン培養された 244DI ウイルスが、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を確認した。本研究で確立された 244DI インフルエンザウイルスのクローン培養手法は、既存の 244DI ウイルスの培養手法である、ヘルパーウイルスと DI ウイルスを混合して培養した後に UV 照射によりヘルパーウイルスを不活化させる手法の欠点やリスクを克服し、244DI ウイルスの抗ウイルス薬開発への応用に寄与すると期待される。

244DI インフルエンザウイルスに関する研究は現在も盛んに行われている。本研究の根拠論文の出版とほぼ同時期に、244DI インフルエンザウイルスをクローン培養する手法についての論文が別の研究グループから発表された (Bdeir *et al.*, PLoS One, 2019)。この論文で Bdeir らは、細胞内で PB2 蛋白質を恒常発現する 293T 細胞 (293T-PB2) および MDCK 細胞 (MDCK-PB2) を作製し、さらに発現する PB2 配列コドンの最適化により PB2 蛋白質発現量を向上させた。共培養した 293T-PB2 と MDCK-PB2 に 244DI ウイルス作出用のプラスミドをトランスフェクションすることで、244DI ウイルスの作出と増殖を同時に行い、野生型ウイルス : 244DI ウイルスの感染を 1:1,000 で共感染させた場合に、244DI ウイルスが野生型インフルエンザウイルスの増殖を 100 分の 1 程度に抑制することを報告した。しかし、この論文で用いられた 244DI インフルエンザウイルスは、欠失変異の箇所に検出用の蛍光蛋白質配列が挿入されており、DI 分節の全長はおよそ 1000 塩基程度となっている。その点が、従来の 244DI ウイルスや本研究で作出した 244DI (UUG) ウイルスと大きく異なるため、ウイルス増殖性や野生型ウイルス増殖抑制能およびそのメカニズムが従来の 244DI ウイルスと異なる可能性がある。実際に、本研究で作出した 244DI ウイルスでは、野生型ウイルス : 244DI ウイルスの混合比を 1:1,000 として共感染させた場合、野生型ウイルスの増殖を 100,000 分の 1 程度に抑制しており (図 10)、Bdeir らが作製した 244DI ウ

ウイルスよりウイルス抑制能は約 100 倍高い。

#### 4-2. 244DI ウイルスの増殖と増殖抑制のメカニズム

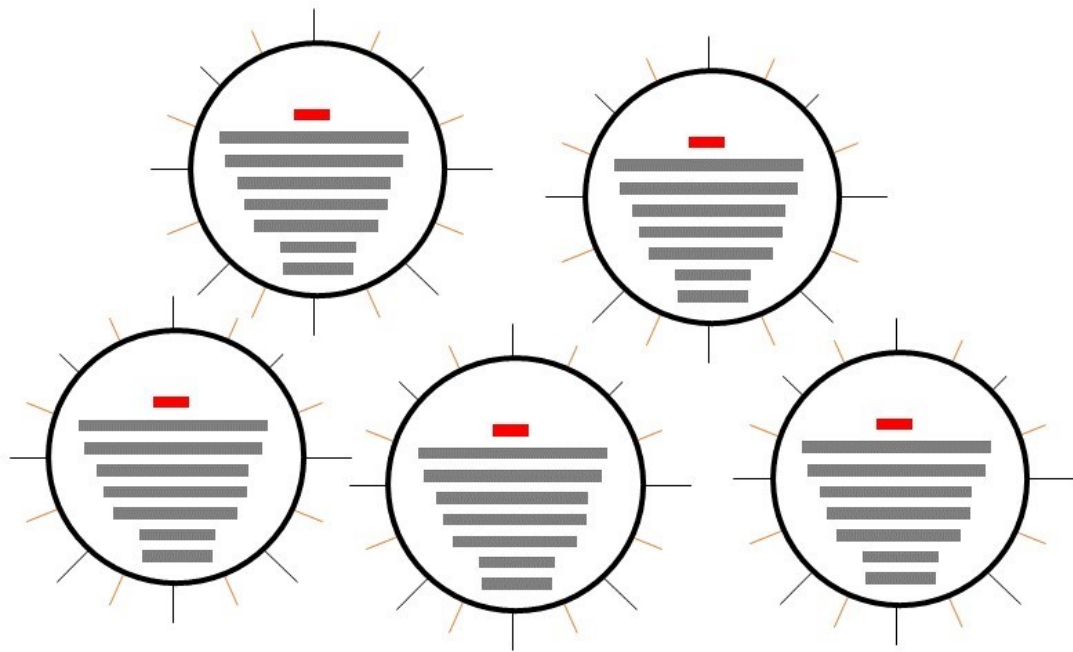
244DI ウイルスは、PB2 蛋白質を発現する AX4/PB2 細胞に感染させると、 $10^7$  PFU/ml 程度まで増殖することがわかったが、野生型 WSN ウイルスの増殖と比較すると、100 分の 1 程度と低かった (図 8)。一方、産生されたウイルス粒子蛋白質を野生型ウイルスと比較すると、ウイルス膜蛋白質量は同程度だったが、ウイルス膜蛋白質あたりの NP 蛋白質量は野生型ウイルスよりも著しく少なかった (図 14)。したがって、244DI ウイルスを AX4/PB2 細胞に感染させると、野生型 WSN ウイルスと等量程度のウイルス粒子を産生するが、そのうち  $10^7$  PFU/ml 程度だけが感染性を有し、それ以外の多数のウイルス粒子は PB2 発現細胞においても非感染性ウイルス粒子であること、おそらく、正常にゲノムパッケージングされていない非感染性ウイルス粒子が多いことがわかった。さらに、244DI ウイルスの PB2 以外の 7 分節の vRNA のパッケージング量が少なかったことから、AX4/PB2 細胞で増殖した 244DI(UUG)ウイルスは、244DI(UUG) vRNA をパッケージングするが、他の 7 分節 vRNA を持たないウイルスが多いことが示唆された。従って、244DI(UUG) vRNA の存在により、PB2 分節以外の 7 分節の vRNA を持たない非感染性ウイルスが多く産生されることが、共感染した野生型ウイルスの増殖を抑制するメカニズムの一つであることが明らかになった。

一方、244DI(UUG)ウイルスを AX4/PB2 細胞に感染させると、 $10^7$  PFU/ml 程度まで増殖することから、PB2 244DI(UUG) vRNA と他の 7 分節 vRNA のゲノムパッケージングが  $10^7$  PFU/ml 程度は行われていること、その結果、244DI(UUG)ウイルスが効率よく作出され、安定的に感染性 244DI(UUG)ウイルスが維持されていると考えられる。従って、244DI(UUG)ウイルスは、PB2 244DI(UUG) vRNA により野生型インフルエンザウイルスの増殖だけでなく自身の増殖も抑制するが、一部の DI vRNA を他 7 分節とともにパッケー

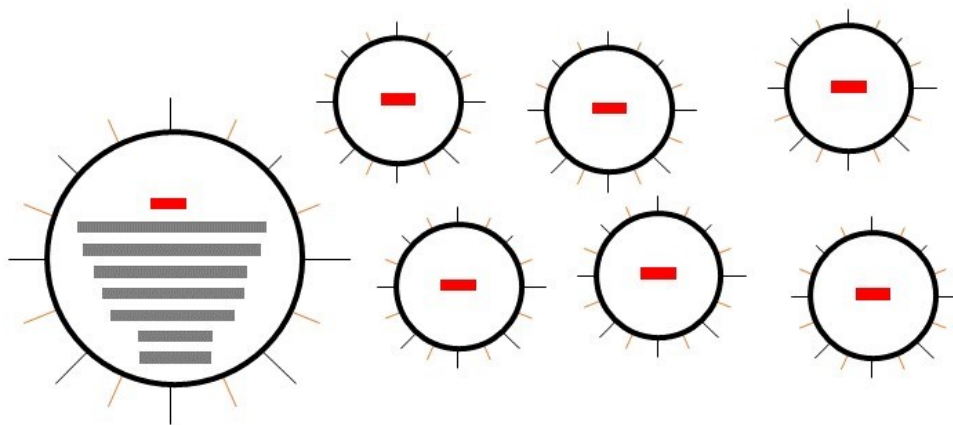
ジングした感染性 DI ウイルスを産生するため、自身の増殖抑制と感染性 DI ウイルス産生のバランスが適切に保たれていることで、DI ウイルスを効率よく増殖、維持、継代することが可能となっていると考えられる。

#### 4-3. PB2 244DI(UUG) vRNP による他分節 vRNP のゲノムパッケージングへの影響

先行研究により、PB2 vRNA のパッケージングシグナルは、PB2 vRNA のパッケージングだけでなく、他の 7 分節のゲノムパッケージングにも必須であることが示されており (Muramoto *et al.*, J Virol, 2006)、他の分節の vRNA との超複合体を形成するために重要な領域であるバンドリングシグナル (bundling signal) がパッケージングシグナルに含まれていると考えられている (Goto *et al.*, J Virol, 2013; Noda and Kawaoka, Rev Med Virol, 2010)。PB2 244DI vRNA はそのゲノム構造から、PB2 vRNA のパッケージングシグナルおよびバンドリングシグナルを持つと考えられる。従来の研究結果から、244DI ウイルス粒子内へのパッケージングにおいて PB2 244DI 分節は (野生型ウイルス由来の) 野生型 PB2 分節と競合すると考えられており (Dimmock and Easton, J Virol, 2014)、PB2 244DI 分節による他の 7 分節のパッケージングへの影響は想定されていなかった。しかし、本研究でクローン培養された 244DI(UUG)インフルエンザウイルスの性状解析の結果、PB2 244DI 分節は他の 7 分節 vRNA と共にパッケージングされづらいことが示された (図 17)。つまり、PB2 vRNA 内部領域を 1946 塩基欠失した 244DI 分節は、他の分節 vRNA との超複合体形成に重要な領域 (バンドリングシグナル) の一部が失われ、他の 7 分節 vRNA との超複合体形成効率が落ちた結果、残りの 7 分節のパッケージング効率が落ちた可能性が考えられる。また、プラスミドを用いた細胞内発現系による先行研究では、PB2 244DI vRNA は PB1、PB2、PA および NP vRNA の合成を抑制することが報告されている (Meng *et al.*, Virol J, 2017)。本研究で行ったウイルス粒子内 vRNA の定量実験において、DI 分節以外の 7 分節の vRNA の取り込み量が大きく減少したのは、感染細胞内における 7 分節の



当初想定されていたPB2 244DIウイルス



実際のPB2 244DIウイルス?

図 17. 推察される PB2 244DI ウイルスの構造の模式図

これまで、244DI ウイルス粒子内に PB2 244DI 分節と他の 7 分節がパッケージングされていると想定されていた。本研究の結果から、実際の 244DI ウイルスには DI 分節以外の分節がパッケージングされていないウイルス粒子が多い可能性が高い。

vRNA 量が少なかったことも原因の一つである可能性がある。

244DI(UUG)分節が単独でウイルス粒子に取り込まれやすいか否かは、さらなる実験を通して検証する必要がある。今後、感染細胞内とウイルス粒子内の PB2 244DI(UUG) vRNA および残り 7 分節の vRNA の定量比較を行い、それぞれの vRNA 分節について、細胞内量とウイルス粒子内量を比較して、各 vRNA の真のパッケージング効率を算出し、PB2 244DI(UUG)分節が他の vRNA より効率よくウイルス粒子に取り込まれやすいか否かを定量的に示す必要があると考えている。

#### 4-4. DI ウイルスの応用への今後の展望

244DI インフルエンザウイルスは、培養細胞への感染や実験動物への鼻腔投与によって、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先行研究で報告されている。ヒト由来の培養細胞を用いた実験では、1.2  $\mu\text{g}$  (400 HA unit) の 244DI ウイルスを事前に感染させ、24 時間後に WSN 株を  $10^3$  PFU 感染させると、WSN 株の増殖が抑制され、ウイルス培養上清中のウイルス感染価が半分以下に減少した (Smith *et al.*, *Viruses*, 2016)。マウスを用いた実験では、1.2  $\mu\text{g}$  (400 HA unit) の 244DI ウイルスと  $2.5 \times 10^4$  50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID<sub>50</sub>) の H3N2 ウイルスを同時に感染させると、H3N2 ウイルスの増殖が抑制され、生存率が 20%から 100%に改善した (Dimmock *et al.*, *J Virol*, 2008)。フェレットを用いた実験では、300  $\mu\text{g}$  (100000 HA unit) の 244DI ウイルスと 100 TCID<sub>50</sub> の H1N1pdm2009 ウイルスを同時に感染させると、H1N1pdm2009 ウイルスの増殖が抑制され、フェレットの病態が緩和された (Dimmock *et al.*, *PLoS One*, 2012)。244DI ウイルスがインフルエンザの治療や予防に応用可能であることは先行研究で示されているが、実際に 244DI ウイルスを抗インフルエンザウイルス薬として生産するためには、大量培養と濃縮が必要だと考えられる。近年、Tapia らにより DI インフルエンザウイルスを工業的に大量培養する手法の開発とその検証がなされた (Tapia *et al.*, *Front. Bioeng. Biotechnol.*

2019)。この論文では従来と同様に DI ウイルスとヘルパーウイルスを混合して培養する手法が取られているが、本研究のような DI ウイルスのクローン培養系を用いることで、クローン培養された DI インフルエンザウイルスの大量生産と、それを材料とした抗インフルエンザウイルス薬の開発の実現に大きく近づけると考えられる。また、本研究で 244DI(UUG) ウイルスは 2560 HA unit/ml の濃度でクローン培養できた (表 2) が、クローン培養された DI インフルエンザウイルスを用いた動物実験は行われていないため、感染性インフルエンザウイルスの増殖抑制に必要なクローン培養 244DI(UUG) ウイルスの投与量はまだ分かっていない。そのため、今後はモデル動物を用いた感染実験を通して、*in vivo* においてウイルス増殖抑制に必要なクローン培養 244DI(UUG) ウイルスの投与量を調べるとともに、それが抗インフルエンザウイルス薬に応用可能な量であるか、244DI(UUG) ウイルスの利用にあたり *in vitro* 実験で見つからなかった問題点はないかを検証していく必要があると考えられる。

## 参考文献

Bdeir, N., Arora, P., Gärtner, S., Hoffmann, M., Reichl, U., Pöhlmann, S., Winkler, M. (2019). A system for production of defective interfering particles in the absence of infectious influenza A virus. *PLoS One* **14**:e0212757.

Boergeling, Y., Rozhdestvensky, T. S., Schmolke, M., Resa-Infante, P., Robeck, T., Randau, G., Wolff, T., Gabriel, G., Brosius, J., Ludwig, S. (2015). Evidence for a Novel Mechanism of Influenza Virus-Induced Type I Interferon Expression by a Defective RNA-Encoded Protein. *PLoS Pathog.* **11**:e1004924.

Dimmock, N. J., Rainsford, E. W., Scott, P. D., Marriott, A. C. (2008). Influenza virus protecting RNA: an effective prophylactic and therapeutic antiviral. *J Virol* **82**:8570-8578.

Dimmock, N. J., Dove, B. K., Scott, P. D., Meng, B., Taylor, I., Cheung, L., Hallis, B., Marriot, A. C., Carroll, M. W., Easton, A. J. (2012). Cloned defective interfering influenza virus protects ferrets from pandemic 2009 influenza A virus and allows protective immunity to be established. *PLoS One* **7**:e49394.

Dimmock, N. J., Easton, A. J. (2014). Defective interfering influenza virus RNAs: time to reevaluate their clinical potential as broad-spectrum antivirals? *J Virol* **88**:5217-5227.

Easton, A. J., Scott, P. D., Edworthy, N. L., Meng, B., Marriott, A. C., Dimmock, N. J. (2011). A novel broad-spectrum treatment for respiratory virus infections: influenza-based defective interfering virus provides protection against pneumovirus infection in



vivo. *Vaccine* **29**:2777-2784.

Eisfeld, A. J., Kawakami, E., Watanabe, T., Neumann, G., Kawaoka, Y. (2011). RAB11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. *J. Virol.* **85**:6117-6126.

Goto, H., Muramoto, Y., Noda, T., Kawaoka, Y. (2013). The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal. *J Virol.* **87**:11316–11322.

Hatakeyama, S., Sakai-Tagawa, Y., Kiso, M., Goto, H., Kawakami, C., Mitamura, K., Sugaya, N., Suzuki, Y., Kawaoka, Y. (2005). Enhanced Expression of an  $\alpha$ 2,6-Linked Sialic Acid on MDCK Cells Improves Isolation of Human Influenza Viruses and Evaluation of Their Sensitivity to a Neuraminidase Inhibitor. *J Clin MicroBiol* **43**:4139-4146.

Hatakeyama, S., Kawaoka, Y. (2006). The molecular basis of resistance to anti-influenza drugs. *Nihon Rinsho* **64**:1845-1852.

Henle, W., Henle, G. (1943). interference of inactive virus with the propagation of virus of influenza. *Science* **98**:87-89.

Huang, A. S., Baltimore, D. (1970). Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* **226**:325-327

Horimoto, T., Kawaoka, Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* **3**:591-600.

Hutchinson, E. C., Von Kirchbach, J. C., Gog, J. R., Digard, P. (2010). Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* **91**:313-328.

Johnson, N. P. A. S., Mueller, J. (2002). Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918-1920 "Spanish" Influenza Pandemic. *Bull Hist Med.* **76**:105-115

Lakdawala, S. S., Wu, Y., Wawrzusin, P., Kabat, J., Broadbent, A. J., Lamirande, E. W., Fodor, E., Altan-Bonnet, N., Shroff, H., Subbarao, K. (2014). Influenza A virus assembly intermediates fuse in the cytoplasm. *PLoS Pathog.* **10**:e1003971.

Lazzarini, R. A., Keene, J. D., Schubert, M. (1981). The Origins of Defective Interfering Particles of the Negative-Strand RNA Viruses. *Cell.* **26**:145-154

Meng, B., Bentley, K., Marriott, A. C., Scott, P. D., Dimmock, N. J., Easton, A. J. (2017). Unexpected complexity in the interference activity of a cloned influenza defective interfering RNA. *Virol J* **14**:138.

Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H., Kawaoka, Y. (2006). Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol.* **80**:2318-

2325.

Neumann, G., Noda, T., Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**:931-939.

Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R. H., Kawaoka, Y. (2006). Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*. **439**:490-492.

Noda, T., Kawaoka, Y. (2010). Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Rev Med Virol*. **20**:380-391.

Ozawa, M., Victor, S. T., Taft, A. S., Yamada, S., Li, C., Hatta, M., Das, S. C., Takashita, E., Kakugawa, S., Maher, E. A., Neumann, G., Kawaoka, Y. (2011). Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene. *J Gen Virol* **92**:2879-2888.

Patterson, K. D., Pyle, G. F. (1991). The Geography and Mortality of the 1918 Influenza Pandemic. *Bull Hist Med*. **65**:4-21

Scott, P. D., Meng, B., Marriott, A. C., Easton, A. J., & Dimmock, N. J. (2011). Defective interfering influenza A virus protects in vivo against disease caused by a heterologous influenza B virus. *J Gen Virol* **92**:2122-2132.

Smith, C. M., Scott, P. D., O'Callaghan, C., Easton, A. J., Dimmock, N. J. (2016). A Defective Interfering Influenza RNA Inhibits Infectious Influenza Virus Replication in Human Respiratory Tract Cells: A Potential New Human Antiviral. *Viruses*. **8**:237.

Tapia, F., Laske, T., Wasik, M. A., Rammhold, M., Genzel, Y., Reichl, U., (2019). Production of Defective Interfering Particles of Influenza A Virus in Parallel Continuous Cultures at Two Residence Times—Insights From qPCR Measurements and Viral Dynamics Modeling. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**:275.

Von Magnus, P. (1954). Incomplete forms of influenza virus. *Adv. Virus Res.* **2**:59-79.

Watanabe, T., Kawaoka, Y. (2015). Influenza Virus-Host Interactomes as a Basis for Antiviral Drug Development. *Curr Opin Virol.* **14**:71-78

Yang, Y., Lyu, T., Zhou, R., He, X., Ye, K., Xie, Q., Zhu, L., Chen, T., Shen, C., Wu, Q., Zhang, B., Zhao, W. (2019). The Antiviral and Antitumor Effects of Defective Interfering Particles/Genomes and Their Mechanisms. *Front Microbiol* **10**:1852.

## 謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yamagata Y, Muramoto Y, Miyamoto S, Shindo K, Nakano M and Noda T.

Generation of a purely clonal defective interfering influenza virus.

Microbiology and Immunology. 63(5):164 - 171, 2019

本研究に使用した AX4/PB2 細胞は東京大学医科学研究所 ウイルス感染分野 河岡 義裕 教授から分与されたものである。本研究は日本学術振興会による研究奨励費の助成を受けている (JP17J00495)。

本研究は京都大学ウイルス・再生医科学研究所 微細構造ウイルス学分野にて行われた。本研究を行うにあたり、京都大学ウイルス・再生医科学研究所 微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授には、研究および研究生活および論文執筆に関して多くのご指導をいただいた。村本 裕紀子 助教には、実験および論文執筆に関して多くの助言をいただいた。中野 雅博 助教には、研究において多くの助言をいただいたことに加え、本研究における AFM 観察の操作をしていただいた。高松 由基 博士、平林 愛 博士には、研究生活において多くの知見をいただいた。森田 裕弥 氏、齋藤 千晴 氏には、研究生活における事務手続きで多大なご協力をいただいた。神道 慶子 博士および宮本 翔 氏には、実験の手法に関して多くのご指導をしていただいた。藤田 陽子 氏には、本研究におけるクライオ電子顕微鏡観察の操作をしていただいた。その他、多くの先輩方ならびに後輩の皆様に、研究生活における多くの知見をいただいた。一緒に暮らした母と弟には、家庭において研究生活の多くを支えていただいた。この場を借りて皆様に深く感謝申し上げます。