

研究課題別評価書

1. 研究課題名

RNAポリメラーゼの安定性に関わる宿主因子の探索

2. 氏名

新矢 恭子

3. 研究のねらい

毎年冬になると人社会で流行するインフルエンザウイルスは長年にわたり鴨などの水禽類の体内で寄生生活を行ってきたウイルスを起源とします。インフルエンザウイルスの8本の遺伝子は、水禽類の体内では、あまり遺伝子変異が起こらず、比較的安定に保たれていますが、人で流行している人のインフルエンザウイルスの遺伝子配列には、多くの変異が観察される傾向があります。人のインフルエンザウイルスは、なぜ、遺伝子変異を起こしやすいのか、その謎を探ります。

4. 研究成果

A 型インフルエンザウイルスは、ヒトを含む多くの動物から、病原体として分離されていますが、全ての A 型インフルエンザウイルスの起源は、自然宿主と考えられている水禽類がもっているウイルス集団にあると考えられています。つまり、自然宿主である水禽類の集団の中では、病気もおこさず静かに感染環がまわっているウイルスが、稀に、他の動物種の集団内に侵入をして病気を起こすようになったものとかんがえられています。

ヒトでの A 型インフルエンザウイルス感染症は、主に呼吸器病を引き起こします。病気を引き起こす「病原体」であることから、非常に恐ろしいイメージを抱きますが、実際は、核酸・蛋白質・脂質二重膜からなる小さな、そして単純な構造体です。その大きさは、約80~100ナノメートルとされています。ヒトのゲノムがDNAから成っており、全ゲノム長が30億と言われるのに対し、A 型インフルエンザウイルスのゲノムはRNAから成り、全ゲノム長がたったの1万3千しかなく、そこから作られるウイルス固有の蛋白質は知られている範囲で11種類のみです。ところが一旦、生きた細胞に感染が成立すると、強力な細胞ハイジャックシステムが働き始めます。ウイルスは感染細胞内で脱殻し、ウイルス遺伝子が細胞核へと移行します。細胞は、ウイルス蛋白質とウイルス遺伝子RNAの生産を始めます。その後、細胞は子孫ウイルスを産生し、最終的には死に至ります。この強力な細胞ハイジャック成功の秘訣は、細胞への侵入後、速やかにウイルス固有の遺伝子産生をし、ウイルス固有の蛋白質を産生する点にあると考えられます。そして、実際にウイルスから細胞内に持ち込まれるウイルス側の物質のうち、これらの機能に関わっていると考えられるのが細胞核内に移行する部分(ウイルスのRNAポリメラーゼユニット、核蛋白質、ウイルスRNA)です。したがって、ウイルスのRNAポリメラーゼユニットは、ウイルスが細胞に感染し、動物個体に病気を発症させる過程で重要な役割を果たしているのではないかと考えています。

その様な大切な役割をしているウイルスのRNAポリメラーゼですが、実は、ヒトのA型インフルエンザウイルスに、ワクチンがすぐ効かなくなる、進化速度が速い、分離されるウイルスは多くの変異ウイルス集団である、などの特徴があることから、「インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼは、RNA複製時のエラー率が高い」と考えられてきました。そのため、1980年代から、ヒトのインフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼの複製エラー率を計算する研究がおこなわれています。また、それらの研究のなかから、ウイルスは生きた細胞で増殖を繰り返しているうちにその子孫ウイルス集団のなかに変異を促進するウイルス、Mutator Mutants、が出現してくるという考え方も生まれてきました。

そこで、私はまず、水禽群に保持されているA型インフルエンザウイルスの遺伝子プールとヒトで保持されている季節性インフルエンザウイルスの遺伝子プール内で、現代に分離されたウイ

ルス遺伝子と相同性の高いウイルス遺伝子が、過去に分離されたウイルスの遺伝子配列に見つかるとかを調べてみました。その結果、水禽類のウイルス遺伝子プールでは、ヒトのウイルス遺伝子プールに比べて、比較的安定に遺伝子配列が保たれている様子がわかりました。そのため、私は今回の研究で、水禽由来およびヒト由来 A 型インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼの RNA 複製における正確性の違いがあるかどうか、を調べてみたいと考えました。また、それに関連して、それぞれの RNA ポリメラーゼに関わる宿主因子に違いがあるかどうかもしらべてみたいと考えました。

最初におこったのは、ヒト由来ウイルスと水禽由来ウイルスの RNA ポリメラーゼのエラー率の計算です。ヒト由来のウイルス RNA ポリメラーゼは、トリ由来のウイルス RNA ポリメラーゼよりもエラー率が高い傾向が見られました。次に、各々のウイルスポリメラーゼの活性を測ってみると、ヒト由来ウイルスの RNA ポリメラーゼの活性のほうが高い傾向がありました。つまり、ヒト由来ウイルスの RNA ポリメラーゼは、水禽由来ウイルスのポリメラーゼよりも、RNA 複製時のエラー率が高く、かつ、RNA 複製の活性も高い傾向がみられました。したがって、今度は、その原因を探ってみることにしました。

実は、トリ由来の A 型インフルエンザウイルスが、種の域を超えてヒトに感染して増殖する時、よりヒトの細胞で増殖しやすくなる変異、ヒト型変異、が入る現象が多くみられます。その際、ポリメラーゼ遺伝子そのものにもいくつかのヒト型変異がみられることが知られています。そのため、ポリメラーゼ遺伝子そのものに入った変異が、RNA 複製時のエラー率の上昇に関わっている可能性があるのではないかと考えました。

そこで、A 型インフルエンザウイルスが感染すると、ウイルスのポリメラーゼにヒト型変異がおこる動物モデルを探しました。そして、感染モデル動物として、ダチョウが役立つことを発見しました(ダチョウは、見た目がトリの仲間ようですが、生物の進化系統樹では、鳥類とは異なる系統に属します。それでもウイルスにヒト型変異がおこる、ヒトとおなじ細胞内システムを、ダチョウという生物が持っていることに驚かされますが。)。私たちは2種類のトリ由来ウイルスをダチョウに感染させて、呼吸器組織(気管・肺)、脳、肝臓、腎臓、脾臓からウイルスを分離し、その分離ウイルス集団内の個々のウイルスの遺伝子配列を調べました。その結果、肺以外の殆どの臓器のウイルス集団に多くの割合でヒト型変異ウイルスが含まれていることがわかりました。この感染モデル動物でポリメラーゼ遺伝子に変異が入ったウイルスが見つかったので、各々の元のウイルスの RNA ポリメラーゼと変異を持ったウイルスの RNA ポリメラーゼとで、RNA 複製時のエラー率を比較することにしました。現在、一つ一つのポリメラーゼの変異とエラー率との関係を見るための実験を重ねています。

5. 自己評価

試行錯誤の結果、ウイルス RNA ポリメラーゼによるウイルス RNA 合成量を測定する系が確立されたため、同系を活用して測定を重ねています。また、トリ由来ウイルスがヒトへ感染した時にみられるウイルス遺伝子の人型変異を再現することができる、感染モデル動物が見つかったので、その部分については、Journal of Virology に発表をしました。現時点で、当初目標の70%位の達成位置にあると考えています。

6. 研究総括の見解

ウイルスの RNA ポリメラーゼを in vitro の系で作動させ、変異率を計算する方法を確立し、ウイルス RNA ポリメラーゼの活性を評価する独自の方法を確立したことは、評価する。ヒト由来のウイルス RNA ポリメラーゼは、トリ由来のウイルス RNA ポリメラーゼよりも変異率が高い傾向をつきとめ、ヒト由来ウイルスの RNA ポリメラーゼの活性のほうが高い傾向があることも発見した。さらに、感染によって、A 型インフルエンザウイルスに人型変異が入るモデル動物を探索し、ダチョウがそのモデルになり得ることを発見したことは、今後の感染予防研究を加速させることに繋がると思う。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Shinya K, Watanabe S, Ito T, Kasai N, Kawaoka Y. Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. *J Gen Virol.* 2007 88:547–53.
2. Shinya K, Makino A, Ozawa M, Kim JH, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Le QM, Kawaoka Y. Ostrich involvement in the selection of H5N1 influenza virus possessing mammalian-type amino acids in PB2. *J Virol.* 2009 83:13015–8.

②受賞

平成 19 年度科学技術分野、文部科学大臣表彰、若手科学者賞

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Watanabe T, Watanabe S, Shinya K, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 106:588–92.
2. Cillóniz C, Shinya K, Peng X, Korth MJ, Proll SC, Aicher LD, Carter VS, Chang JH, Kobasa D, Feldmann F, Strong JE, Feldmann H, Kawaoka Y, Katze MG. Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes. *PLoS Pathog.* 2009 5:e1000604.
3. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature.* 2009 460:1021–5.