

第一回ウイルス学キャンプ in 湯河原プログラム

新しい粘膜ワクチンアジュバントを用いた経鼻
インフルエンザワクチンの開発

インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼPAサブユニ
ットの温度感受性変異株を用いたウイルスゲノム複製機構の解析

同種指向性マウス白血病ウイルス感染受容体の発
現制御機構

攻撃性の高いミツバチの脳から同定された新規昆虫ピ
コルナ様ウイルス、Kakugo ウイルスの解析

エイズ脳症における神経細胞死にはTRAIL分
子が関与する

狂犬病ウイルス西ヶ原株からRC-HL株への弱毒化に
関連する遺伝子の同定

講演要旨

アイチウイルス複製機構の解析

佐々木 潤（藤田保健衛生大学医学部 ウイルス・寄生虫学講座）

アイチウイルス（ピコルナウイルス科）のゲノム RNA の複製と encapsidation にかかわる、ウイルスタンパク質とゲノム非翻訳領域内の element について。

HIV 感染症に対する免疫治療

立川（川名）愛（東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野）

ここ 10 年間で多数の抗 HIV 薬の開発により HIV 感染症の予後は劇的に改善された。しかしながらその一方で副作用や薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。「薬のみに頼らない新しい治療法」としての免疫治療に関して最前線の研究を紹介する。

改良型アデノウイルスベクターの開発

水口裕之（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部）

遺伝子治療用ベクターの開発研究を通して発展してきたウイルスベクターは、作製法が簡便化されたこともあり、遺伝子の機能解析などの生命科学研究を行う上で必須の基盤技術となっている。さらに、ウイルスの表面タンパク質や、パッケージングされるウイルスゲノムを様々に改変して、新たな機能を付与した新規ウイルスベクターの開発が進んでいる。本講演では、我々が取り組んでいる改良型アデノウイルスベクターの開発現状について紹介する。

コロナウイルスの転写機構と細胞死のメカニズム

水谷哲也（国立感染症研究所ウイルス一部）

コロナウイルスはユニークな転写機構で短時間に大量の mRNA を合成し、細胞内シグナル伝達の活性化とアポトーシスを起こすことが知られている。これらのメカニズムについて最新の SARS ウイルスを含む研究成果を紹介する。

ウイルス学の新しい側面：比較ウイルス学と予測ウイルス学

宮沢孝幸（帯広畜産大学 獣医学科 獣医公衆衛生学教室）

新たなウイルス感染症が、人間社会に次々と襲いかかっている。そのほとんどは、動物固有のウイルスが新たに人に感染することにより生じる。これに対抗するためには、「予測ウイルス学」の確立が必要であり、それを支えるのは「比較ウイルス学」である。

HIV-1 の表面タンパク質の多様性と生物情報

山口由美（産業技術総合研）

HIV-1 の表面タンパク質のアミノ酸変化には、増殖能を損なうものもあるが、免疫系の認識から逃れることを可能にするものもある。各アミノ酸サイトにおけるタンパク質の多様性の実態や自然淘汰のかかり方を解明するために、遺伝子情報解析を行い、タンパク質の機能情報や立体構造情報と合わせた分析を行った。

新しい粘膜ワクチンアジュバントを用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発

一戸猛志（国立感染症研究所感染病理部）

我々はこれまでにマウスのインフルエンザモデルを用いてアジュバント併用経鼻ワクチンが気道粘膜に交叉反応性の高い分泌型IgA抗体を誘導できることを明らかにしてきた。アジュバントとしてコレラ毒素Bサブユニット（CTB*）を用い良好な結果が得られてきたがヒトでの経鼻投与を考えた場合、毒素を用いたアジュバントを使用せずにIgA抗体を誘導できたらより安全なワクチンになると考えられる。そこで生体の自然免疫系を刺激するTLR3のリガンドである合成dsRNA（Poly(I:C））が、安全性に優れていて、粘膜ワクチンの強力なアジュバントに成りえる可能性があるかを検討する。

HAワクチンを1 μ g 単独もしくはPoly(I:C）と共にBALB/c マウスへ4週間隔で2度経鼻接種した。接種2週間後に、インフルエンザウイルスA/PR8/34（H1N1）を感染させ、その3日後に血清、鼻腔洗浄液を回収し血清および鼻腔洗浄液中の抗体価をELISAで、ウイルス価はプラークアッセイを用いて測定した。またアジュバントの毒性を調べるために、Poly(I:C）またはCTB*をそれぞれマウスの脳内へ直接投与し影響を調べた。

Poly(I:C）アジュバント併用ワクチン群では血清中のIgG、鼻腔洗浄液中のIgA抗体価が上昇し、それに伴い鼻腔洗浄液中とのウイルス価が完全に抑えられた。肺炎モデルマウスでもコントロール群では感染7日目に全滅したのに対し、Poly(I:C）アジュバント併用ワクチン群では肺洗浄液中のウイルスの増殖が抑えられ全て生存した。同じA型インフルエンザウイルスで異なる亜型のウイルス感染に対しても交叉反応性を示した。毒性実験では、CTB* 25 μ gを脳内接種するとマウスは体重減少がみられ、接種4日後には5匹中2匹が死亡したが、Poly(I:C）では等量を脳内接種しても神経毒性は認められなかった。

HA ワクチンと共に Poly(I:C）を経鼻免疫することにより気道粘膜に交叉反応性の高い分泌型 IgA 抗体を誘導できることが明らかとなった。Poly(I:C）はマウスへの脳内接種の実験から安全性にも優れていることが示され、ヒトでの実用化を念頭に置いた粘膜ワクチンの強力なアジュバントに成りえる可能性があると考えられる。

インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PA サブユニットの温度感受性変異株を用いたウイルスゲノム複製機構の解析

川口 敦史（筑波大学 基礎医学系 感染生物）

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは PB1、PB2 及び PA の 3 種のサブユニットから構成されている。PB1 は RNA 合成反応の触媒活性を持ち、PB2 は転写反応のプライマーとして利用される宿主キャップ構造との結合活性を持つ。一方、PA は遺伝学的解析からウイルスゲノムの複製反応に関わることが推測されているが、その詳細は明らかとされていない。また、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼは mRNA と vRNA 及び cRNA の異なる 3 種類の RNA を合成するが、どのようにして合成反応を変換しているのか解明されていない。本研究では、PA に変異が導入されたことにより、非許容温度において複製反応が欠損していると考えられている *ts53* 株を用いて、インフルエンザウイルスの複製反応の解析を行った。

*ts53*株感染細胞における転写量及び複製量を定量したところ、非許容温度において mRNA の合成量は野生株と同等であったが、vRNA 及び cRNA はほとんど合成されていなかった。よって、*ts53*株感染細胞中では、転写反応においては機能的な RNA ポリメラーゼが構成されていると考えられる一方、複製反応においては機能的な RNA ポリメラーゼが構成されていないと考えられた。また、グリセロール密度勾配遠心法により、*ts53*株感染細胞を分画したところ、非許容温度では許容温度と比較して分子量の軽い画分に各サブユニットが回収され、許容温度とは異なる RNA ポリメラーゼ複合体が構成されている事が示唆された。現在、非許容温度においてどのような RNA ポリメラーゼ複合体が構成されているのか解析を行っている。

同種指向性マウス白血病ウイルス感染受容体の発現制御機構

藤澤隆一（獨協医科大学微生物学講座）

カチオン型アミノ酸輸送体蛋白CAT1は、同種指向性（ecotropic）マウス白血病ウイルス（eMuLV）の感染受容体として機能する。従ってCAT1の発現制御機構の解明はeMuLVの感染機構や受容体干渉の機序を明らかにする上で重要である。本研究はGFP標識したマウスCAT1（mCAT1）を培養細胞で発現させ、ウイルス感染がその発現に与える影響を解析することを目的としている。

mCAT1のC末をGFP標識した融合蛋白（mCAT1-GFP）を発現するプラズミドベクターをイヌ腎由来上皮細胞株MDCKに導入し、発現細胞を得た。得られた細胞をレーザー共焦点顕微鏡にて解析したところ、mCAT1-GFPはbasolateral membrane上に発現したが、apical membraneには殆ど発現が見られなかった。この細胞にeMuLVを慢性感染させたところ、mCAT1-GFPの発現は減少し、ウイルスのSU蛋白はapical membrane上に発現した。これらの結果は、mCAT1のbasolateral membraneへのtraffickingを司る機構が存在し、eMuLVの感染がこの機構に影響を与える可能性を示している。また、ポストゴルジネットワークにおけるmCAT1とSUの輸送機構には違いがあることが示唆される

攻撃性の高いミツバチの脳から同定された新規昆虫ピコルナ様ウイルス、Kakugo ウイルスの解析

藤幸知子¹、竹内秀明¹、小野正人²、大岡静衣³、佐々木哲彦²、野本明男³、久保健雄¹（¹東大・院理・生物、²玉川大・農、³東大・院医）

セイヨウミツバチの働き蜂は、巣の防衛のため、一部の個体（攻撃蜂）がオオスズメバチなどの天敵を攻撃する。我々は、この攻撃行動に関わる遺伝子を検索する過程で、攻撃蜂の脳特異的に検出される新規なRNA、Kakugo を同定し様々な昆虫ピコルナ様ウイルスのゲノムRNAと相同性を示すことを見出した。またKakugo RNA がウイルス粒子のゲノムRNAとして存在することを示唆するとともに感染性物質を構成することを示した。以上の結果は、Kakugo RNA が攻撃性の高いミツバチの脳選択的に感染する新規な昆虫ピコルナ様ウイルス（Kakugo ウイルス）のゲノムRNAであることを示す。これは、動物の本能行動としての攻撃行動とウイルス感染が密接に関連することを示唆する初めての知見であり、ウイルス感染が動物の行動に与える影響を考える上で興味深い。現在このウイルスについてさらに解析を進めている。

エイズ脳症における神経細胞死には TRAIL 分子が関与する

三浦 義治（京都大学ウイルス研究所）

エイズ脳症で起こっている神経細胞死を、患者剖検脳、モデルマウス、培養系実験で解析した。エイズ脳症患者の剖検脳では、TUNEL 染色陽性細胞・活性型カスパーゼ3および8陽性細胞が見られ、この中に神経細胞も含まれていた。また、TRAIL 陽性のマクロファージが浸潤していた。エイズ脳症モデルマウスの脳では TUNEL 染色陽性の神経細胞が血管周囲領域に見られ、さらに TRAIL 陽性のウイルスに感染したマクロファージが浸潤していた。さらに抗 TRAIL 中和抗体をマウスに投与すると、神経細胞死は著明に抑制された。（PNAS 100. 2777-2782, 2003）次に、細胞培養実験系を用いて、HIV に感染したマクロファージ上の TRAIL 分子が神経細胞にアポトーシスを誘導するかどうかを調べた。マウス胎児由来の神経グリア細胞培養系に HIV に感染させたヒト単球由来マクロファージを共培養すると神経細胞におこるアポトーシスは有意に増加した。そして HIV に感染したマクロファージに

は TRAIL 分子が発現していた。次に、上述の培養系に TRAIL を過剰発現させた細胞を添加すると、神経細胞のアポトーシスは有意に増加した。これらの事実から HIV に感染した脳では、HIV に感染したマクロファージに発現した TRAIL が神経細胞のアポトーシスの誘導に重要であると考えられた。

狂犬病ウイルス西ヶ原株から RC-HL 株への弱毒化に関連する遺伝子の同定

山田健太郎、伊藤直人¹、伊藤睦代、細川淳二、清水健太、杉山 誠¹、源 宣之¹ (岐阜大・連合獣医学研究科, 1 岐阜大・人獣共通感染症学)

狂犬病ウイルス RC-HL 株は、日本における動物用ワクチン製造株であり、脳内接種により成熟マウスに体重減少を起すことが、致死感染を起ささない弱毒型である。一方、その親株の西ヶ原株は強毒型で、神経症状を伴う致死感染を起す。この両株は固定毒 (fixed virus) であり、以前より固定毒の病原性には G タンパク質の 333 番目のアミノ酸が関連しているとされているが、RC-HL 株は弱毒型であるにも拘らず、この 333 番目のアミノ酸は強毒型と同じである。したがって、西ヶ原株から RC-HL 株への弱毒化には、これまでに報告されている領域とは

異なる、新規の遺伝子領域が関連していると考えられる。新規の弱毒化関連遺伝子の同定およびそのメカニズムの解明は、安全な弱毒生ワクチンの作出において有益な情報となり得る。そこで、私達は西ヶ原株および RC-HL 株のキメラウイルス作出により弱毒化関連遺伝子の同定を試みた。

G 遺伝子 open reading frame (G-ORF) を西ヶ原株由来に組換えた RC-HL 株、R(G) 株は成熟マウスに致死感染を起し、その逆の西ヶ原株の G-ORF を RC-HL 株由来に組換えた Ni(G) 株も致死感染を起し弱毒化しなかったこと、さらに N-ORF を組換えた西ヶ原株、Ni(N) 株も弱毒化しなかったが、N-ORF と G-ORF を同時に組換えた Ni(NG) 株が弱毒化した。他の ORF の弱毒化への関連について調べたので報告する。

様々なキメラウイルスを作出し、成熟マウスへの病原性を検討した結果、西ヶ原株由来の G-ORF を持つキメラウイルスは強毒型を示し、G-ORF を含む 2 つ以上の ORF が RC-HL 株由来であるキメラウイルスは弱毒型を示した。このことから、西ヶ原株から RC-HL 株への弱毒化には、G 遺伝子が大きな役割を担っているが単独ではなく、multigenic であると考えられた。