

Title	インフルエンザウイルス (A/NJ/8/76株) ニューラミニダーゼ遺伝子の全塩基配列と遺伝子重複・欠失による進化
Author(s)	三木, 哲郎
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33722">https://hdl.handle.net/11094/33722</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	三	木	哲	郎
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6	2	7
学位授与の日付	昭	和	59	年
学位授与の要件	学	位	規	則
学位論文題目	インフルエンザウイルス (A/NJ/8/76株) ニューラミニダーゼ 遺伝子の全塩基配列と遺伝子重複・欠失による進化			
論文審査委員	(主査)	教授 熊原 雄一		
	(副査)	教授 本庶 佑 教授 近藤 宗平		

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

インフルエンザウイルスは膜蛋白である赤血球凝集素 (Haemagglutinin: HA) とニューラミニダーゼ (Neuraminidase: NA) の抗原性を変化させて大流行をくり返している。今回, H1N1 亜型の A/New Jersey (NJ)/8/76 株より NA 遺伝子をクローン化し, その全塩基配列を決定し, 既に報告されている他の株の NA 遺伝子と比較して NA 遺伝子の進化について考察した。

#### (方法ならびに成績)

##### ① NA 遺伝子のクローニングと塩基配列決定

インフルエンザウイルスは 8 本の一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスである。鶏卵培養したインフルエンザウイルスより抽出した RNA を鋳型とし, ウイルス RNA の 3' 末に相補的な 12 ヌクレオチドをプライマーとし, 逆転写酵素で一本鎖 cDNA を合成した。続いて同酵素で二本鎖 cDNA とし, oligo (dG)-oligo (dC) tailing 法で pBR 322 の Pst I site へクローニングした。別にホルムアミドゲルより NA 遺伝子を抽出し, 逆転写酵素で合成した <sup>32</sup>P 標識 cDNA をプローブとし全 cDNA のライブラリーより NA 遺伝子の cDNA をクローン化した。この cDNA クローンより最も長いクローン pNA 6 と pNA 28 を用い, 制限酵素地図を作り, Maxam-Gilbert 法で DNA 塩基配列を決定した。cDNA 合成時, S1 ヌクレアーゼ処理で削られる +鎖 cDNA の 3' 末端部の塩基配列は Hae III/HgiA I の約 50 ヌクレオチドをプライマーとし, プライマーイクステンション法で決定した。

##### ② NA 遺伝子の構造

NA 遺伝子は, 1458 ヌクレオチド長で 469 個のアミノ酸をコードしていた。

システイン残基は19個、予想される糖鎖結合部位は7個存在した。疎水性領域は7番目のIleuより35番目のSerまで29個のアミノ酸よりなり、この部分はシグナルペプチドと膜に結合する部分を兼ねていると考えられた。

#### ③他のNA遺伝子との比較

システイン残基は、N1亜型のA/PR/8/34株(PR8)、A/WSN/33株(WSN)と比較するとすべて保存されていた。N1とN2亜型(A/Udorn/72株)間では、C末端半分がよく保存されていた。糖鎖結合部位は、N1とN2亜型間でよく保存されているが、いずれもN末端の茎に相当する部分にクラスターが存在した。システイン残基を基準としてアミノ酸を並べその比較を行なうと、NJとPR8間で82%、NJとWSN間で79%、PR8とWSN間で91%の相同性があり、アミノ酸の置換を伴わない塩基置換(同義置換)の比較の結果も合わせると、WSNとPR8の先祖株がNJと分岐後、WSNとPR8に分岐したものと考えられた。

#### ④糖鎖結合部位の重複・欠失

NJのNAの茎の部分の糖鎖結合部位は、クラスターを形成しているが、塩基配列を調べると15塩基よりなる1単位が7個くり返して存在することが判明した。これらの共通配列はTATGTAAACAATACTであった。7個の単位の中で、2.4.5.6番目の単位が糖鎖結合部位であった。RNAゲノムでのくり返し配列の発生機構は不明であるが、糖鎖結合部位の増加は茎の部分を蛋白分解酵素の巧撃より保護するために重要であると考えられた。Blokら(1981)により、1933年から1935年のN1亜型のA/WSN/33株、A/PR/8/34株、A/Melbourne/35株、A/BH/35株の茎の部分に、33個から48個の塩基の欠失が報告されている。この欠失の機構を考える時、1942年の欠失のないA/Bellamy/42の塩基配列を使用し、2つのモデルを考えた。第一はRNA polymerase jumping modelで、RNA polymeraseがU-richの手前で停止し鋳型を変えてjumpするというモデルである。合成されたばかりの+鎖の3'末端と、新しく鋳型となるRNAの3'側領域が相補的な塩基配列をもつため二次構造をとりRNA polymeraseのjumpingを助けていると考えられた。次に、RNA looping out modelが考えられた。これは欠失部分が、inverted repeatな配列をもつためstem-loop構造をとり、根元の部分が切断され再結合するというモデルである。stem-loop構造時、RNA polymeraseが根元の部分をjumpしても欠失がおこると考えられた。4つの欠失株の発生機構としていずれのモデルもとれるが、NJ株ではstem-loop構造はとれないが、RNA polymerase jumping modelはとれることより、1930年代の前半欠失株はstem-loop構造をとり形成された可能性が大きい。

(総括)

HA蛋白の亜型間での抗原性変異(antigenic drift)は、点突然変異によると考えられている。NA蛋白の茎の部分の遺伝子重複・欠失によるダイナミックな変異は、蛋白分解酵素に対する感受性を変化させると考えられるが、点突然変異と共に抗原性変異に大きく関与している可能性がある。

## 論文の審査結果の要旨

要旨：本研究は、A/NJ/8/76（HINI）株の膜蛋白のひとつであるニューラミニダーゼの遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定することにより、遺伝子の重複欠失を見出したものである。これまでインフルエンザウィルスの進化は主に点突然変異と、遺伝子の reassortment によるものと考えられていたが、本論文により、遺伝子の重複・欠失も進化に大きく関与していると考えられ、学位論文として価値あるものと認める。