

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 五十嵐 映子

横浜市立大学大学院医学研究科 分子生体防御学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	公衆衛生学	教授	後藤 温
副査	横浜市立大学附学院医学研究科	皮膚科学	教授	山口 由衣
副査	横浜市立大学附属病院	感染制御部	講師	加藤 英明

博士の学位論文審査結果の要旨

RS ウイルスサブグループ A・遺伝子型 NA1 ならびに遺伝子型 ON1 における 付着糖タンパク (G) 遺伝子の分子進化

RS ウイルス感染症は RS ウイルス (Respiratory syncytial virus 呼吸器合胞体ウイルス: RSV) に起因する急性呼吸器感染症の一つであり、乳幼児では重症化しやすく、気管支炎や喘鳴・喘息の発症、憎悪の関与している。毎年、秋から冬のインフルエンザシーズン前に流行が見られ、疫学的には 2 歳までにはほぼ 100% が初感染を起こす。

RSV はゲノム全長が約 15.2kb の 1 本鎖・マイナスセンス RNA ウイルスであり、付着糖タンパク (G 蛋白) および膜融合蛋白 (F 蛋白) の 2 種類の主要抗原を有している。G 蛋白をコードしている G 遺伝子の C 末端近傍には、C 末端超可変領域が存在し、多様なアミノ酸配列を呈している。この領域における遺伝学的系統解析により、2 つのサブグループ A (RSV-A) と B (RSV-B) に分類される。RSV-A では、G 遺伝子の C 末端超可変領域に 72 塩基の重複塩基配列が挿入された遺伝子型 ON1 が 2010 年にカナダで初めて確認され、その後世界中で多く検出されている。

本研究においては、RSV-A 遺伝子型 ON1 とその始祖遺伝子型と推定されている遺伝子型 NA1 の C 末端超可変領域における進化を明らかにすることを目的とし、世界各国で検出された RSV の G 遺伝子の塩基配列を GenBank から網羅的に収集し、675 株 (うち遺伝子型 NA1 161 株、遺伝子型 ON1 484 株) に分子進化の解明を行った。

解析株の系統の推測に近隣結合法による系統解析により、遺伝子型 NA1 は 3 系統、遺伝子型 ON1 は 4 系統に分類されることが推定された。また、Bayesian Markov chain Monte Carlo (BMCMC) 法による時系列分子系統樹解析により、RSV-A の G 遺伝子の進化速度は、 7.11×10^{-3} (95%HD: $6.34 \times 10^{-3} \sim 7.86 \times 10^{-3}$) 置換/部位/年と推定され、非常に速い速度で進化していることが示唆された。

株間における遺伝学的距離の推定に遺伝学的距離解析を行い、遺伝子型 NA1 の遺伝学的距離の平均値は 0.030 ± 0.011 、遺伝子型 ON1 では 0.044 ± 0.015 と推定された。遺伝子型 ON1 の遺伝学的距離は遺伝子型 NA1 に比べ大きいこと、遺伝子型 ON1 の遺伝学的距離の分布は単峰性ではないことが示され、遺伝子型 ON1 は進化の過程にある可能性が示唆された。

ウイルス蛋白質の機能や構造に関与するアミノ酸置換解析を行うため、それぞれの遺伝子型の各コドンの非同義置換速度と同義置換速度の比を尺度とし、同義置換 (dS) が有利に働く正の選択部位および非同義置換 (dN) が有利に働く負の選択部位を推定したところ、遺伝子型 NA1 では正の選択部位は 1 カ所、負の選択部位 2 カ所、遺伝子型 ON1 では正の

選択部位は7カ所、負の選択部位は7カ所が推定された。RSVのG遺伝子C末端超可変領域においても、アミノ酸に正および負の選択圧が働き、細胞接着などのウイルスの機能を維持している可能性があることが示唆された。

RSV-AのG遺伝子C末端超可変領域では、ウイルスの機能を維持するために、アミノ酸置換を伴いながら、速い速度で進化していることが示唆された。また、新たに出現した遺伝子型ON1はその始祖の遺伝子型NA1に比し、急速に進化していることが示唆された。

G蛋白のアミノ酸配列ならびに抗原性の変化は、再感染や流行に関与すること、RSVのG遺伝子の進化はRSウイルス感染症の再感染にも寄与していること、C末端超可変領域は、中和抗体のエピトープ機能にも関与していること等から、ウイルスの分子進化の解明により蛋白質の機能や構造の変化を臨床症状と合わせて解明していくことで、遺伝子変異によるアミノ酸置換と病原性や感染性、臨床症状、流行の予測が可能であると考えられる。

審査にあたり、以上の論文要旨の説明の後に以下の質疑応答が行われた。

まず加藤副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) 今回の解析は大きな変化が見られる超可変領域ではなく保存性の高い領域で行ったものか。
- 2) インフルエンザで見られる抗原ドリフトのような大きな変異が見られると、エピカーブが大きく変化するのではないか。2010年以前のRSウイルスの流行状況はどのようなものであったか。
- 3) 解析に用いる株のアライメントの一致率について何か決まりはあるのか。今回は99%以上一致する株で解析を行っているが問題はないのか。
- 4) 遺伝子型ON1は遺伝子型NA1に比べ急速に変化しているとあるが、すでに進化が淘汰されていると考えられる遺伝子型NA1と同じように比較してもよいのか。
- 5) インフルエンザは毎年ピークがあり、抗原ドリフトなどの変異が起こっていると言われるが、RSウイルスの場合変異に長い期間を要するのはなぜか。

これらの質問に対して以下の回答を得た。

- 1) 今回の解析は変異の激しい超可変領域における変異をみている。
- 2) 遺伝子型ON1は2010年にカナダで初めて確認され、国内では2011年に初めて確認された。グラフでは定点報告数を示しているが、RSウイルス抗原キットが2011年10月に保険適応になり、報告数が増加した背景もあるため、2011年の遺伝子型ON1出現による報告数への影響の把握は困難である。
- 3) 本来は100%一致している株で解析を行うのがよいが、解析の限界を考慮し、解析株数と配列から今回は99%を閾値とした。今回の解析は300塩基程度で行っており、塩基配列および蛋白配列を考慮して解析株の選択を行った。
- 4) 遺伝子型NA1は2004年に初めて検出され、その後約12年程度確認された遺伝子型である。今回の解析における進化速度は、遺伝子型NA1は進化が安定した時、遺伝子型

ON1 は進化の過程において推定されたものであり、条件は異なる。今後、遺伝子型 ON1 の進化が安定した時に解析を行うことで、同条件で遺伝子型 NA1 と ON1 の進化速度の比較ができるものと考えられる。

- 5) インフルエンザは節で組み換えが起こるなど、ウイルスにより変異の仕方が異なる。そのため、ウイルスにより変異に要する時間も異なると考えられる。

次に山口副査から以下の論評と質問が足された。

- 1) この研究が行われた後の当該分野における発展、寄与はどのようなものであったか。
- 2) 今後ウイルスの感染性や病原性が高くなるなどということはこの解析から判断、予測ができるのか。今回の研究は臨床的にどのようにつながるのか。
- 3) 今回は G 蛋白に着目した解析であったが、他の領域もウイルスにとって重要なものと考えられる。その他の領域と組み合わせた解析が必要なのではないか。

これらの質問に対して以下の回答を得た。

- 1) 報告書の作成にあたり、解析株を追加し再度解析を行った。論文投稿当時は遺伝子型 ON1 が確認されて 2, 3 年後であったため、遺伝子型 ON1 の分子進化を解析した論文としては先駆的なものであった。その後、各国で RSV の進化速度の解明や、新たな系統の確認もされ、分子進化の解析の普及に寄与したと考えている。
- 2) 特定の変異が入ると感染性や病原性などに関与するという部位は確認されていないため、遺伝子変異およびアミノ酸置換の構造的な部分だけでなく、臨床症状等と合わせて考察していく必要がある。臨床症状と合わせて解析を行うことで臨床的な応用につながると考えている。
- 3) 現在、RSV の F 蛋白における解析も進んでおり、F 蛋白の分子進化は G 蛋白に比べ遅いと言われている。病原性や感染性などへの関与を推察するにあたり、G 蛋白のみの解析では不十分であり、その他の領域も合わせて解析していく必要があると考えている。

最後に、後藤主査より以下の論評、質問がなされた。

- 1) 2021 年の RS ウイルス感染症の流行が大きかったのはなぜか。また、その流行が大きかったのは、ウイルスの変異によるものではなかったのか。
- 2) 今の所属は県庁で行政に携わっているが、保健行政にどのように役立っているのか。
- 3) RSV に着目した理由はあるのか。
- 4) 2011 年の流行曲線のカーブはそれほど大きなものではなさそうであるが、大きな流行が見られたのか。
- 5) 系統を推定はどのようにして分類するのか。また、今回の遺伝学的距離の解析で 0.07 以上のものがあるように見られるが、これは新たな遺伝型にはならないのか。

これらの質問に対して以下の回答を得た。

- 1) 2020 年はコロナの影響により、感染対策が講じられていたこと、外出控えにより感染の

機会が少なかったことから、患者報告が少なかったと考えられる。その翌年の 2021 年は 2020 年に罹るはずであった乳幼児も感受性者となり、2 年分の感受性者が罹患したことにより流行が大きくなったと考えられている。また、2021 年に検出された RSV について遺伝子解析が行われているが、変異が見つかったとの報告はないため、2021 年の流行はウイルスの変異によるものではないと考えられる。

- 2) 現在はコロナ対応が主であり、新型コロナウイルスの変異株の話題となった時には、系統解析や進化速度、変異カ所等、今回の研究で得た知識を活用することができた。
- 3) 地方衛生研究所ウイルスの検査に携わっていた 2012 年の夏に県内の小児科の先生から RSV の流行が例年より早く、患者数も多いという話があり、検体を提供いただき RSV の検出を始めたのがきっかけとなった。
- 4) 2011 年の流行状況のピークは小さいが、幅は広く面積は大きいため、流行は大きいものであった。
- 5) 系統について複数の系統解析について系統樹から視覚的に分類している。遺伝学的距離が 0.07 以上であれば新たな遺伝子型に分類にされるが、系統解析と合わせて分類されるため、今回は新たな遺伝子型とは考えられなかった。

以上のような質疑応答がなされた。

本学位論文は、呼吸器感染症の主原因の病原体の一つである RSV の新たに出現した遺伝子型の分子進化について解明した報告である。RSV の進化速度について明らかにするとともに、分子進化の分野における発展に寄与した先駆的な研究であったと判断された。申請者は審査員からのいずれの質問に対しても適切な回答がなされ、本研究に対して深い理解と洞察力を有していることを示した。以上より申請者は医学博士を授与されるにあたり相当であると判定した。