

学位論文の要旨

Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (*G*) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1.

(RS ウイルス・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)

March, 2023

( 2023 年 3 月 )

Eiko Igarashi

五十嵐 映子

Department of Microbiology and Molecular Biodefense Research

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 分子生体防御学

( Doctoral Supervisor : Akihide Ryo, Professor )

( 指導教員 : 梁 明秀 教授 )

## 学位論文の要旨

### Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (*G*) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1.

(RS ウイルス・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)

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25283803/>

#### 1. 序論

Morris らにより 1956 年に発見された RS ウイルス (Respiratory syncytial virus 呼吸器合胞体ウイルス: RSV) は、種々の呼吸器感染症に関与する病原体である。また、本疾患は、乳幼児のほぼ 100%が 2 歳までに初感染を経験し、初感染時に気管支炎、細気管支炎ならびに肺炎などの下気道炎に喘息様症状 (喘鳴) を高率に合併することが示唆されている。さらに、乳幼児の肺炎の原因の 50%以上は、RSV 感染に起因することが報告されている (Leung et al., 2005)。くわえて、RSV 感染は乳幼児のみならず、高齢者においても下気道炎を引き起こし、乳幼児と同様に下気道炎の原因となることも示唆されている。したがって、乳幼児と高齢者における RSV 感染症の疾病負荷は、インフルエンザと同等もしくはそれ以上と推察されている (Weiss & McMichael, 2004)。

RSV 感染症の予防策の一つとして不活化ワクチン開発が進められてはいるが、未だに臨床応用には至っていない。一方、重症化予防策としてヒトキメラ型マウスモノクローナル抗体 (パリビズマブ) の開発が進み、現在、心疾患などの基礎疾患を有する乳幼児に国内外で臨床応用されている。

RSV は、ヒトメタニューモウイルスと同じニューモウイルス科に分類され、オルソニューモウイルス属に属する、1 本鎖・マイナスセンス RNA ウイルスである (ゲノム全長: 約 15.2kb、粒子径: 80~350nm)。ウイルス粒子上には、付着糖蛋白 (attachment glycoprotein, G 蛋白) ならびに膜融合蛋白 (fusion protein, F 蛋白) の 2 種類の主要抗原が存在する (Collins & Crowe, 2006)。RSV は遺伝学的系統解析により、RSV はサブグループ A (RSV-A) と B (RSV-B) に分類される (Mufson et al., 1985)。RSV の主要抗原の一つである 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 (C-terminal hypervariable region) が存在し、多様なアミノ酸配列を呈する。また、当該部位は、G 蛋白抗原に対する中和抗体を誘導するエピトープ配列と重複することが示唆されている (Collins et al., 2013)。

近年検出された RSV には、*G* 遺伝子の C 末端超可変領域に重複塩基配列が挿入された変異がみられ、RSV-A の遺伝子型 ON1 および RSV-B の遺伝子型 BA と新たな変異を有する遺

伝子型が多く検出されている (Cui et al., 2013)。このような背景から、本研究においては、主に 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 の分子進化を明らかにすることを目的とした。

## 2. 実験材料と方法

本研究は、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) について下記のバイオインフォマティクス解析を行い、RSV-A の C 末端超可変領域における分子進化を明らかにした。

### 1) 系統解析

遺伝学的距離を明らかにするため、近隣結合法 (NJ 法) による系統解析を行った。また、時系列的進化を明らかにするため、Bayesian Markov chain Monte Carlo (BMCMC) 法による時系列分子系統樹解析を行った。解析には、BEAST version 2.6.7 ソフトウェアを用いた。

### 2) RSV 株間の遺伝学的距離解析

遺伝子型 ON1 および NA1 の *G* 遺伝子の解析領域における株間における遺伝学的距離を明らかにするため、解析ソフトウェアの MEGA 7.0 を用いて、遺伝学的距離の解析を行った。

### 3) 選択圧 (selective pressure) 解析

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、Datamonkey の 3 種類の方法 (SLAC、FEL、IFEL) を用いて、*G* 遺伝子の一部における、それぞれの遺伝子型の各コドンの選択圧の推定を行った。コドンの選択圧は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 ( $dS$ ) が有利に働く部位を正の選択部位 (positive selection site)、非同義置換 ( $dN$ ) が有利に働く部位を負の選択部位 (negative selection site) と推定した。

## 3. 結果

NJ 法および BMCMC 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わかった。RSV は、1956 年以降に Long 株から分岐し、遺伝子型 NA1 は 1996 年に GA2 から、遺伝子型 ON1 は 2004 年に遺伝子型 NA1 から分岐したことが推察された。また、解析領域における RSV-A の *G* 遺伝子の進化速度の平均値は、 $7.11 \times 10^{-3}$  (95%HPD :  $6.34 \times 10^{-3} \sim 7.86 \times 10^{-3}$ ) 置換/部位/年と推定された。

全ての解析株における遺伝学的距離の平均値は  $0.056 \pm 0.028$ 、遺伝子型 NA1 では  $0.030 \pm 0.011$ 、遺伝子型 ON1 では  $0.044 \pm 0.015$  であった。遺伝学的距離の分布は、遺伝子型 NA1

では単峰性であるのに対し、遺伝子型 ON1 は複数のピークを有する分布となった。

また、C 末端超可変領域におけるそれぞれの遺伝子型の各コドンの選択圧の推定を行った結果、遺伝子型 NA1 では 1 カ所、遺伝子型 ON1 では 7 カ所が SLAC、FEL ならびに IFEL の 3 種類の方法で共通の選択圧部位と推定された。負の選択部位については、遺伝子型 NA1 では 2 カ所、遺伝子型 ON1 では 7 カ所が 3 種類の方法で共通の選択圧部位と推定された。

#### 4. 考察

NJ 法および BMCMC 法による系統解析により、遺伝子型 NA1 ならびに遺伝子型 ON1 は複数の系統に進化したことがわかった。また、RSV は、70 年以上前に共通始祖ウイルス (Long 株) から分岐し、遺伝子型 NA1 は GA2 から、遺伝子型 ON1 は遺伝子型 NA1 から分岐したことが明らかになった。また、RSV-A の G 遺伝子は早い速度で進化していることも推察された。さらに、株間の遺伝学的距離は、遺伝子型 NA1 ならびに ON1 とも比較的短いことも推察された ( $p\text{-distance} > 0.1$ )。くわえて、各コドンの選択圧の推定解析により、遺伝子型 NA1 および遺伝子型 ON1 において少数の正の選択部位と多くの負の選択部位が推定された。以上のことから、遺伝子型 NA1 および ON1 の G 遺伝子 C 末端超可変領域では、高頻度でアミノ酸置換が生じ、ウイルスの蛋白機能の維持を行いつつ、非常に速い速度で進化していることが示唆された。

## 引用文献

Collins, P.L., Karron, R.A. (2013), Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., Choen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R., Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology*, sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1086-1123.

Cui, G., Zhu, R., Qian, Y., Deng, J., Zhao, L., Sun, Y., Wang, F. (2013), Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups A and B in children in recent five consecutive years, *PLoS ONE*, 8, e75020.

Leung, A.K., Kellner, J.D., Davies, H.D. (2005), Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J. Natl. Med. Assoc*, 97, 1708-1713.

Mufson, M.A., Orvell, C., Rafnar, B., Norrby, E. (1985), Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus, *J. Gen. Virol*, 66, 2111-2124.

Weiss, R.A., McMichael, A.J. (2004), Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases, *Nat. med*, 10, S70-76.

## 論文目録

### I. 主論文

Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1.

**Hirano, E.**, Kobayashi, M., Tsukagoshi, H., Yoshida, LM., Kuroda, M., Noda, M., Ishioka, T.,

Kozawa, K., Ishii, H., Yoshida, A., Oishi, K., Ryo, A., Kimura, H.:

Infect Genet Evol., 28:183-91, 2014

### II. 副論文

なし

### III. 参考論文

- 1 Surveillance of adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui Prefecture, Japan, 1995-2010.

Nakamura, M., **Hirano, E.**, Kowada, K., Ishiguro, F., Yamagishi, Z., Adhikary, A.K., Hanaoka, N., Okabe, N., Taniguchi, K., Fujimoto, T.:

J Med Virol., 84(1):81-6, 2012

- 2 Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2005 to 2011 in Fukui, Japan.

Nakamura, M., **Hirano, E.**, Ishiguro, F., Mizuta, K., Noda, M., Tanaka, R., Tsukagoshi, H., Kimura, H.:

Jpn J Infect Dis., 66(1):56-9, 2013

- 3 Molecular evolution of the hypervariable region of the attachment glycoprotein gene in human respiratory syncytial virus subgroup B genotypes BA9 and BA10.

Nagasawa, K., **Hirano, E.**, Kobayashi, M., Ryo, A., Oishi, K., Obuchi, M., Ishiwada, N., Noda, M., Kuroda, M., Shimojo, N., Kimura, H.:

Infect Genet Evol., 36:217-23, 2015

- 4 Molecular evolution of the fusion protein (F) gene in human respiratory syncytial virus subgroup B.  
Kimura, H., Nagasawa, K., Kimura, R., Tsukagoshi, H., Matsushima, Y., Fujita, K., **Hirano, E.**, Ishiwada, N., Misaki, T., Oishi, K., Kuroda, M., Ryo, A.:  
Infect Genet Evol., 52:1-9, 2017
  
- 5 Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010.  
Yoshida, A., Kiyota, N., Kobayashi, M., Nishimura, K., Tsutsui, R., Tsukagoshi, H., **Hirano, E.**, Yamamoto, N., Ryo, A., Saitoh, M., Harada, S., Inoue, O., Kozawa, K., Tanaka, R., Noda, M.,  
Okabe, N., Tashiro, M., Mizuta, K., Kimura, H.:  
J Med Microbiol, 61(Pt 6), 820-9, 2012