

氏 名 (本籍)	堀 田 こずえ (神奈川県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第229号
学 位 授 与 年 月 日	平成19年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Studies on the Receptors for Rabies Virus (狂犬病ウイルスレセプターに関する研究)
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 山 田 章 雄 副査 帯広畜産大学 教 授 松 井 高 峯 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 杉 山 誠

論 文 の 内 容 の 要 旨

狂犬病はマイナスセンス 1 本鎖 RNA をゲノムにもつ狂犬病ウイルスによる人獣共通感染症で、発症するとほぼ 100%が死亡する極めて致死率の高い神経疾患である。狂犬病ウイルスは極めて宿主域が広いが、一方で感受性細胞は限られており、特に神経系においてウイルス増殖部位は神経細胞に限局されている。これまでに本ウイルスの神経親和性を説明するために狂犬病ウイルスのレセプター分子の解析がなされてきた。本研究において、申請者は候補としてあげられている分子について詳細に検討し、狂犬病ウイルスに対するレセプターとして最も重要な分子を同定することを試みた。

第 1 章においては様々な培養細胞におけるこれら候補分子の発現をウエスタンブロット法で調べた。アセチルコリン受容体, p75NGFR および神経細胞接着因子(NCAM)についてウイルス増殖との関連を調べたところ, NCAM がウイルス感受性と最も関連すると考えられた。

NCAM にはスプライシングにより分子量の異なる 3 種類の主要なアイソタイプが存在し、そのうち NCAM-180 および NCAM-140 は狂犬病ウイルスのレセプターとして機能することが知られている。しかし、NCAM-120 についてはその狂犬病ウイルス感染における意義は知られていない。そこで第 2 章では NCAM-120 の遺伝子をクローニングし、哺乳動物細胞で発現させることによりその機能の解析を試みた。この分子は他の NCAM 分子とは異なり細胞膜貫通ドメインと細胞内ドメインのない GPI アンカー型蛋白質である。ウイルスに対して感受性の低い HEp-2 細胞に NCAM-140 ならびに NCAM-120 をコードする遺伝子を導入し、これらの分子を恒常的に発現する細胞 HEp-140 細胞および HEp-120

細胞を樹立した。両者でのそれぞれの分子の発現を免疫学的手法で確認し、ウイルスに対する感受性を調べたところ HEp-140 細胞では明らかなウイルス増殖の増強が認められたが、予想に反し HEp-120 細胞ではウイルス増殖の抑制が認められた。HEp-120 細胞は HEp-140 細胞と同等以上のウイルス吸着活性を示したことから、ウイルスは NCAM-120 蛋白を介して細胞に吸着することができることが明らかになった。次に HEp-120 細胞内へのウイルスの侵入が起きているかどうかを知るためにウイルス遺伝子の転写を調べたところ、NCAM-140 発現細胞と同様に mRNA 合成が行われていることが明らかになった。従って、ウイルスはいずれの細胞においても、吸着し細胞内に侵入していると考えられた。一方、細胞内のウイルス蛋白合成を調べたところ、HEp-140 細胞では N 蛋白の合成が認められたが、HEp-120 細胞ではほとんど N 蛋白の産生は認められなかった。また、P 蛋白合成は起きているが、ウイルスに感受性を示す細胞とは異なる時期的支配を受けていると考えられた。以上の結果から、HEp-120 細胞では細胞内におけるウイルス蛋白合成が正常に行われないうえにウイルス増殖が抑制されていると考えられた。

そこで第 3 章において申請者は、多くのウイルス感染でウイルス蛋白制御に関わっていることが知られている I 型インターフェロンの関与があるか否かを知る目的で、インターフェロン β の mRNA 合成について解析した。ウイルス感染していない HEp-140 細胞ではインターフェロン β の mRNA 合成は認められなかったが、HEp-120 細胞ではインターフェロン β の mRNA 合成が亢進していることが明らかになった。また HEp-120 細胞ではウイルス感染させると速やかなインターフェロン β の mRNA 合成が誘導されたことから、この細胞はいわゆるプライミングを受けた状態と考えることができた。

以上の成績から申請者は、GPI アンカー型 NCAM-120 はインターフェロン β の産生を介して狂犬病ウイルスの増殖を制御していると結論した。

本研究の成果は、これまで知られていなかった GPI アンカー型 NCAM-120 がインターフェロン産生を介して狂犬病ウイルス増殖に抑制的に働くことを示したもので、ウイルス増殖過程の分子的機構を理解する上で重要であると考えられる。また、今後 NCAM-120 によるインターフェロン誘導の機構を解析する事により、本分子の持つ生物学的意義を明らかにすることも可能になると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

狂犬病はマイナスセンス 1 本鎖 RNA をゲノムにもつ狂犬病ウイルスによる人獣共通感染症である。本疾患はウイルスが咬傷部位や粘膜面から侵入し感染が成立し、感染を受けた末梢の神経あるいは筋肉組織から中枢神経に達する。狂犬病ウイルスはすべての温血動物に感染可能であるが、感染部位は限局されている。

申請者は、狂犬病ウイルスのレセプター候補と考えられている分子について、培養細胞に発現させることにより、狂犬病ウイルスに対するレセプターとして最も重要な分子を同定することを試みた。

申請者は最初に様々な培養細胞におけるこれら候補分子の発現をウェスタンブロット法で調べたところ、神経細胞接着因子(NCAM)がウイルス感受性と最も関連すると考えられた。NCAM にはスプライシングにより分子量の異なる 3 種類の主要なア

イソタイプが存在し、そのうち NCAM-180 および NCAM-140 は狂犬病ウイルスのレセプターとして機能することが知られている。しかし、NCAM-120 についてはその狂犬病ウイルス感染における意義は知られていない。そこで申請者は NCAM-120 の遺伝子をクローニングし、哺乳動物細胞で発現させることによりその機能の解析を試みた。この分子は他の NCAM 分子とは異なり細胞膜貫通ドメインと細胞内ドメインがなく GPI アンカー型蛋白質である。ウイルスに対して感受性の低い HEP-2 細胞に発現させたとき、NCAM-140 細胞では明らかなウイルス増殖の増強が認められたが、予想に反し NCAM-120 発現細胞ではウイルス増殖の抑制が認められた。この分子のウイルス吸着能を調べたところ、NCAM-140 と同等以上の吸着活性が認められたことから、ウイルスは NCAM-120 蛋白を介して細胞に吸着することはできることが明らかになった。次にウイルスの細胞内への侵入が起きているかを知るためにウイルス遺伝子の転写を調べたところ、mRNA 合成は NCAM-140 発現細胞と同様に検出できた。従って、ウイルスの侵入も問題なく進んでいると考えられた。ところが、細胞内のウイルス蛋白合成を調べたところ、NCAM-140 発現細胞では N 蛋白の合成が認められたが、NCAM-120 発現細胞ではほとんど N 蛋白の産生は認められなかった。また、P 蛋白合成は起きてはいるが、感受性細胞とは異なる時期的支配を受けていると考えられた。以上の結果から、NCAM-120 発現細胞では細胞内におけるウイルス蛋白合成が正常に行われないうえにウイルス増殖が抑制されていると考えられた。そこで申請者はウイルス蛋白制御に関わっていることが知られている I 型インターフェロンの関与があるか否かを知る目的で、インターフェロン β の mRNA 合成について解析したところ、NCAM-120 発現細胞ではウイルス感染を受けない場合でもインターフェロン β の mRNA 合成が更新していることが明らかになった。

本研究の成果はこれまで知られていなかった GPI アンカー型 NCAM-120 がインターフェロン産生を介して狂犬病ウイルス増殖に抑制的に働くことを示したもので、ウイルス増殖過程の分子的機構を理解する上で重要であると考えられる。また、NCAM-120 によるインターフェロン誘導の機構を解析する事も可能とすると考えられる。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : Role of GPI-anchored NCAM-120 in rabies virus infection

著 者 名 : Hotta, K., Motoi, Y., Okutani, A., Kaku, Y., Noguchi, A., Inoue, S. and Yamada, A.

学術雑誌名 : Microbes and Infection

巻・号・頁・発行年 : 印刷中