

氏名(本(国)籍)	正谷達膳(愛知県)
主指導教員名	岐阜大学 教授 杉山 誠
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第331号
学位授与年月日	平成23年3月14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	狂犬病ウイルスN蛋白質が関与する病原性発現機構の 解明に関する研究
審査委員	主査 岐阜大学 教授 福士秀人 副査 帯広畜産大学 教授 鈴木宏志 副査 岩手大学 教授 重茂克彦 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 副査 岐阜大学 教授 山田章雄

論文の内容の要旨

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株は、脳内接種によりマウスに致死性を示す強毒株であるのに対し、本株の鶏胚線維芽細胞馴化株である Ni-CE 株は致死性を示さない弱毒株である。Ni-CE 株のゲノムに西ヶ原株の N 遺伝子を持つキメラウイルス CE(NiN) 株がマウスに致死性を示したことから、西ヶ原株及び Ni-CE 株の病原性の違いには N 遺伝子が関連することが報告されている。狂犬病ウイルスの N 遺伝子が病原性に関連することを示した報告は他にないことから、両株の N 蛋白質の機能を比較することで、病原性に関わる新たな N 蛋白質の機能を解明することができると考えた。そこで本研究では、西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiN) 株の感染に対する宿主応答を比較解析することにより、N 蛋白質が関与する病原性発現機構の解明を試みた。

最初に、N 蛋白質が宿主遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにするために、西ヶ原株、Ni-CE 株及び CE(NiN) 株感染神経系細胞における遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析によって網羅的に比較した。その結果、西ヶ原株及び CE(NiN) 株感染細胞において、自然免疫に関与するインターフェロン (IFN) 遺伝子 (*IFN- β* , *IFN-11* 等) や炎症性ケモカイン遺伝子 (*CXCL10*, *CCL5* 等) の発現が、Ni-CE 株感染細胞に比べ低いことが示された。さらに、リアルタイム PCR によっても同様の結果が確認された。したがって、西ヶ原株 N 蛋白質は自然免疫及び炎症反応の抑制に関連することが示された。

次に、西ヶ原株 N 蛋白質が関与する IFN 及びケモカイン遺伝子発現抑制機構の解明を試みた。これら遺伝子の発現に関与する転写因子として、IFN regulatory factor-3 (IRF-3) が知られている。各株感染細胞の IRF-3 依存的 IFN- β プロモーター活性を測定したところ、西ヶ原株及び CE(NiN) 株感染細胞における同活性は、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低かった。次に、RNA

ウイルスの感染を認識して活性化され、IRF-3 の活性化に関与する宿主因子である Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) に注目した。RIG-I を各株感染細胞に過剰発現させたところ、Ni-CE 株感染細胞の IRF-3 依存的 IFN- β プロモーター活性が有意に上昇したのに対し、西ケ原株及び CE(NiN) 株感染細胞の同活性は変化しなかった。したがって、西ケ原株 N 蛋白質は RIG-I の活性化の回避またはその下流シグナルの抑制に関与することが示された。一方、RIG-I の恒常活性化型変異体の過剰発現によって、各株感染細胞の同活性はいずれも同等のレベルまで上昇した。以上より、西ケ原株 N 蛋白質は RIG-I 活性化の回避に関与することが明らかとなった。

続いて、西ケ原株及び Ni-CE 株の N 蛋白質の間に存在する 3 つのアミノ酸変異 (273 位、394 位及び 395 位) のうち、RIG-I 活性化の回避及び病原性に関与するアミノ酸の同定を試みた。これら 3 アミノ酸のうち、単独または二つを組合せて西ケ原株と同じアミノ酸に置換した Ni-CE 変異株を作出し、各株感染細胞における RIG-I の活性化を検討した。その結果、273 位及び 394 位のアミノ酸に変異を持つ CE(NiN273/394) 株が、CE(NiN) 株と同様に RIG-I の活性化を回避することが分かった。さらに、マウスに対する同変異株の病原性は他の Ni-CE 変異株に比べて強く、CE(NiN) 株と同等であった。RIG-I の活性化回避に関与するアミノ酸と病原性決定基が一致したことから、N 蛋白質による RIG-I 活性化の回避が病原性発現機構に重要な役割を果たしていることが示唆された。

最後に、西ケ原株 N 蛋白質がマウスの脳においても自然免疫及び炎症反応を抑制する方向で機能しているかどうかを検証した。マウスの脳内における両株感染細胞の分布を比較した結果、Ni-CE 株感染細胞の分布が海馬に限局していたのに対し、CE(NiN) 株感染細胞は脳全体に分布していた。したがって、西ケ原株 N 蛋白質は脳におけるウイルスの感染拡大に関与することが示された。Ni-CE 株感染マウスの脳におけるウイルスゲノム量が CE(NiN) 株感染マウスに比べ著しく低かったにもかかわらず、両株感染マウスの脳における IFN- β 及び CXCL10 遺伝子発現量に有意差は無かった。したがって、CE(NiN) 株は Ni-CE 株よりこれら遺伝子発現を抑制すると考えられた。CE(NiN) 株感染マウスの海馬では、Ni-CE 株感染に比べて IFN 応答の指標である Signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) のリン酸化が抑制されていた。また、CE(NiN) 株感染マウスの脳における炎症像は、Ni-CE 株感染に比べてより軽微であった。以上より、マウスの脳において、西ケ原株 N 蛋白質は自然免疫及び炎症反応を抑制する機能を持つことが示された。CE(NiN273/394) 株感染マウスの脳についても同様に解析したところ、いずれの試験においても、CE(NiN) 株感染マウスとほぼ同じ結果が得られた。したがって、第 3 章で同定された N 蛋白質上の病原性決定基が、脳における自然免疫及び炎症反応の抑制にも重要であることが確認された。

以上より、西ケ原株は N 蛋白質の RIG-I 活性化回避機能によって脳内の免疫応答を抑制し、感染を拡大させることで強い病原性を示すと考えられた。一方、Ni-CE 株の N 蛋白質は同機能が減弱しているため、同株は免疫応答によって脳から効率よく排除されると考えられた。

本研究において、狂犬病ウイルス N 蛋白質が RIG-I の活性化を回避する機能を持つことを初めて明らかにした。この知見は狂犬病ウイルスの病原性発現機構の解明だけでなく、狂犬病の治療法確立のための基盤的な情報と考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、マウスに致死性を示す狂犬病ウイルス・西ケ原株と本株から派生した致死性を示さない Ni-CE 株の病原性の違いに注目し、N 遺伝子が関連する病原性発現メカニズムについて解明を行っている。

第 1 章では、両株に加え、マウスに致死性を示す Ni-CE 株のゲノムに西ケ原株の N 遺伝子を持つキメラウイルス CE(NiN) 株の感染神経系細胞における遺伝子発現変化をマイ

クロアレイ解析により比較し、西ケ原株及び CE(NiN)株感染細胞において、自然免疫に関与するインターフェロン (*IFN*) 遺伝子や炎症性ケモカイン遺伝子の発現が、Ni-CE 株感染細胞に比べ低いことを示した。このことから、西ケ原株 N 蛋白質が自然免疫及び炎症反応の抑制に関連することを明らかにした。

第 2 章では、西ケ原株 N 蛋白質が関与する *IFN* 及びケモカイン遺伝子発現に関係する転写因子 *IFN regulatory factor-3 (IRF-3)* について解析し、西ケ原株及び CE(NiN)株感染において *IRF-3* 依存的 *IFN-β* プロモーター活性が、Ni-CE 株感染細胞に比べて有意に低いことを示した。次に、RNA ウイルスの感染により認識活性化され、*IRF-3* の活性化に関与する宿主因子 *Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)* について解析したところ、西ケ原株 N 蛋白質は *RIG-I* の活性化の回避またはその下流シグナルの抑制に関与することが明らかとなった。

第 3 章では、西ケ原株及び Ni-CE 株の N 蛋白質の間に存在する 3 つのアミノ酸変異のうち、273 位及び 394 位のアミノ酸に変異を持つ株が、CE(NiN)株と同様に *RIG-I* の活性化を回避することを示した。

第 4 章では、各ウイルス感染マウスの脳内における感染細胞の分布、ウイルスゲノム量、*IFN-β* 及び *CXCL10* 遺伝子発現量、*IFN* 応答の指標 *Signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)* のリン酸化抑制性及び炎症像を比較した。その結果、西ケ原株 N 蛋白質は自然免疫及び炎症反応を抑制する機能を持つことを明らかにした。

以上より、狂犬病ウイルス N 蛋白質が *RIG-I* の活性化を回避する機能を持ち、この現象が本ウイルスの病原性に影響を与えていることを初めて明らかにした。この知見は狂犬病ウイルスの病原性発現機構の解明だけでなく、狂犬病の治療法確立のための基盤的な情報と考えられた。

以上について、審査委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 : Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the *RIG-I*-mediated antiviral response
著 者 名 : Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Sawaki, Y., Koyama, H. and Sugiyama, M.
学術雑誌名 : Journal of Virology
巻・号・頁・発行年 : 84(8) : 4002-4012, 2010

- 2) 題 目 : Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host *RIG-I*-mediated antiviral response and pathogenicity
著 者 名 : Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Abe, M., Yamaoka, S. and Sugiyama, M.
学術雑誌名 : Virus Research
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Amino acid substitutions at positions 242, 255 and 268 in rabies virus glycoprotein affect spread of viral infection
著 者 名 : Ito, Y., Ito, N., Saito, S., Masatani, T., Nakagawa, K., Atoji, Y. and Sugiyama, M.
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
卷・号・頁・発行年 : 54 (2) : 89-97, 2010

- 2) 題 目 : Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity
著 者 名 : Ito, N., Moseley, G. W., Brondel, D., Shimizu, K., Rowe, C. L., Ito, Y., Masatani, T., Nakagawa, K., Jans, D. A. and Sugiyama, M.
学術雑誌名 : Journal of Virology
卷・号・頁・発行年 : 84(13) : 6699-6710, 2010