

狂犬病ウイルス（街上毒）が固定毒化で
獲得した病原性低下に係る
N-glycosylation の役割に関する研究

2014 年

岐阜大学大学院
連合獣医学研究科
(岐阜大学)

濱 本 紀 子

狂犬病ウイルス（街上毒）が固定毒化で
獲得した病原性低下に係る
N-glycosylation の役割に関する研究

濱 本 紀 子

目次

緒言	1
第一章 狂犬病ウイルス Kyoto 株（街上毒）と CVS-26 株（固定毒）の G 蛋白質の細胞膜局在と Kyoto 株（街上毒）との比較解析	6
序論	7
材料及び方法	9
細胞	9
ウイルス	9
ウイルス接種	9
間接蛍光抗体法（IFA）	10
ウイルス力価測定	11
リアルタイム RT-PCR	12
リバーシジェネティクス	12
結果	17
狂犬病ウイルス感染 MNA 細胞における G 蛋白質の局在	17
組換え狂犬病ウイルス感染 MNA 細胞における G 蛋白質と N 蛋白質の共局在	17
Kyoto 株, rCVS-26 株及び rCVS-26(Kyoto-G)株を感染させた MNA 細胞におけるウイルス増殖	17
Kyoto 株, rCVS-26 株及び rCVS-26(Kyoto-G)株を感染させた MNA 細胞中の狂犬病ウイルス RNA 量	18

考察	20
図表	24
第二章 G 蛋白質の細胞膜への分布を規定する第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加に関する研究	32
序論	33
材料及び方法	36
細胞	36
N 型糖鎖付加部位へ変異導入した 組換え G 蛋白質発現プラスミドの作製	36
トランスフェクション	37
ツニカマイシン添加による糖鎖付加阻害	38
PNGase F による脱糖鎖	38
ウェスタンブロッティング	38
間接蛍光抗体法 (IFA)	40
結果	41
G 蛋白質単独発現細胞における G 蛋白質の分布	41
Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質の N 型糖鎖修飾	41
ツニカマイシンによる糖鎖付加阻害が 組換え G 蛋白質の細胞内分布に与える影響	41
第 204 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入が 組換え G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響	42
第 37 位と第 319 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入が CVS-26 株 G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響	43
考察	45
図表	52

第三章 第 204 位アミノ酸に N 型糖鎖付加された Kyoto 株 (街上毒) の G 蛋白質発現により 発現レベルが変動する細胞遺伝子の検索	65
序論	66
材料及び方法	67
細胞	67
トランスフェクション	67
マイクロアレイ解析	67
結果	70
Kyoto rG 発現細胞と, Kyoto rG (S204N) 発現細胞における 細胞由来遺伝子発現の比較解析	70
CVS-26 rG 発現細胞と, CVS-26 rG (N204S) 発現細胞における 細胞由来遺伝子発現の比較解析	70
考察	72
図表	76
結論	84
謝辞	87
引用文献	89

緒言

狂犬病は、狂犬病ウイルスを病原とし、致死性の脳炎を主症状とする人獣共通感染症であり、すべての哺乳類が感受性を持っていると言われている。日本、ニュージーランド、オーストラリア、ハワイ、グアム・フィジー諸島などの限られた国を除き、世界中で発生が見られる。特にアジアやアフリカで多く発生しており、世界保健機構の推計によれば、年間 60,000 人以上が狂犬病によって死亡しているとされており、古代エジプトやギリシャ、ローマ時代から現在に至るまで公衆衛生上の重要な問題であり続けている (1, 59)。

狂犬病ウイルスの感染は、通常、感染動物に噛まれた際に、唾液中のウイルスが傷口から侵入することによって成立するが、これ以外に、傷口や粘膜面を感染動物に舐められる、ウイルスを含むエアロゾルを吸い込むといった経緯で感染することがある (21)。アジア、アフリカなどの発展途上国では主にイヌが媒介動物であり、欧米ではスカンクやアライグマ、キツネ、コウモリなど野生動物由来の狂犬病が問題となっている (59)。狂犬病ウイルスは、高い神経親和性を示し、平均して 1~3 か月、時には数年にわたる長く不定な潜伏期間中に、咬傷部近傍の末梢神経から逆行的に中枢神経系 (Central Nervous System, 以下 CNS) に到達して増殖することで宿主を発症に至らせると考えられている (21, 22, 46)。CNS 到達後の脊髄から脳、脳内におけるウイルスの感染拡大は非常に速やかであり、CNS で増殖したウイルスは感染の後期に神経を經由して網膜、角膜、唾液腺、筋肉、皮膚などの神経細胞に分布する。唾液腺ではウイルスの増殖が起こり、動物間やヒトへの伝播の原因となる (4, 22, 59)。

ヒトの狂犬病では、患者は、頭痛や発熱、感染部位の疼痛などの初期症状に

引き続き、咽喉頭炎、意識障害、神経過敏、幻覚、恐水症状、麻痺、昏睡などの病態を示したのち、最終的に呼吸麻痺や多臓器不全によって死亡する(21)。有効な治療法は未だ確立されておらず、発症後の死亡率はほぼ 100%である。しかし、狂犬病ワクチンによる暴露前免疫により予防は可能であり、暴露後でも直ちに狂犬病ワクチンによる暴露後免疫を行うことで発症を阻止できる。感染部位が CNS に近い場合には、暴露後免疫と免疫グロブリンを併用することで、発症を阻止することが可能である(59)。

狂犬病の特徴として、死に至るほど激しい神経症状が見られるにもかかわらず、発症し死亡したヒトや動物において、特異的な剖検所見が認められないことが挙げられる。病理組織学的には CNS の非化膿性脳炎を呈するが、炎症や組織の変性は軽度であり、発症機序については不明な点が多い(21, 43)。

狂犬病ウイルスは、モノネガウイルス目 (order *Mononegavirales*) ラブドウイルス科 (family *Rhabdoviridae*) リッサウイルス属 (genus *lyssavirus*) に属するマイナス一本鎖 RNA ウイルスであり、縦約 180nm、幅約 75nm の弾丸状の形状をとる(13, 60)。ウイルスゲノムは核蛋白質 (nucleoprotein, 以下 N 蛋白質), リン酸化蛋白質 (phosphoprotein, 以下 P 蛋白質), RNA ポリメラーゼ (large protein, 以下 L 蛋白質), マトリックス蛋白質 (matrix protein, 以下 M 蛋白質), 糖蛋白質 (glycoprotein, 以下 G 蛋白質) の 5 種類のウイルス蛋白質遺伝子をコードしている(60)。N 蛋白質は RNA と結合し, P 蛋白質, L 蛋白質とともにヌクレオカプシドを構成している(30)。M 蛋白質と G 蛋白質は、宿主由来の脂質二重膜とともにエンベロープを構成し、ヌクレオカプシドを包み込みウイルス粒子を形成する(60)。

狂犬病ウイルスは、野外流行株である街上毒 (street virus) と培養細胞や実験動物を用いて繰り返し継代して作出された固定毒 (fixed virus) に分類され

る (29, 37)。固定毒には、親株である街上毒や継代歴の違いにより、実験動物に対する病原性の異なる様々な株が存在する。街上毒は、ヒトに対する極めて高い病原性から取り扱うことのできる施設が限られ、さらに潜伏期が不定であることなどから、その解析も限定されてきた。一方、固定毒は、街上毒と比較して株ごとの潜伏期や症状など性状が安定していて街上毒よりも取り扱いやすいことから、これまで様々な実験室内研究やワクチン開発に用いられてきた。しかし、固定毒は、街上毒と比較して末梢感染性の減弱や潜伏期間の短縮・一定化、さらには免疫誘導能の増強といった性状の変化が見られ、固定毒を用いた研究で得られた所見が必ずしも街上毒に該当するとは限らない (4, 9, 26, 29, 38, 42, 52, 55, 56)。特に、街上毒が、その特徴的な長い潜伏期の中に宿主体内のどこでどのように潜んでいるのか、どのように宿主の免疫機構を回避しているのかについては、未だに解明されていない。したがって、街上毒と固定毒の病原性の差を決定する機構を解明することが街上毒による狂犬病の病態を理解することにつながると考えられる。

狂犬病ウイルスの重要な病原性決定因子として、G 蛋白質が挙げられている (13)。G 蛋白質は、エンベロープの外側にスパイク状に配置しており、細胞表面上のウイルス受容体と結合し、細胞への吸着・侵入に重要な役割を果たし、ウイルス中和抗体の産生を誘導する主要な抗原となる (5, 7, 8, 10, 27, 38, 42, 44, 57, 60)。また、病原性の高い固定毒株の G 蛋白質の 333 位アミノ酸がアルギニンやリジンから他のアミノ酸に変異することによって、マウスに対する病原性の著しい低下や末梢感染性の低下、培養細胞における細胞間伝播の効率の低下など、様々な性状の変化が生じることが報告されている (7, 8, 27, 51)。これらの固定毒で得られた知見からも、街上毒と固定毒の病原性の違いについて、G 蛋白質が強く関与していることが示唆される。

街上毒と固定毒の G 蛋白質を比較した場合に見られる最も特徴的な違いは潜在的 N 型糖鎖付加部位のコンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr ; X はプロリン以外のアミノ酸) の数である。街上毒の G 蛋白質が 1 ないし 2 か所の潜在的 N 型糖鎖付加部位を持つものに対して、固定毒の G 蛋白質は 3 か所以上の潜在的 N 型糖鎖付加部位を持っている (36, 39, 49, 63, 64)。実験的に街上毒の G 蛋白質に N 型糖鎖を追加すると、マウスに対するウイルスの病原性が低下し、培養細胞内でのウイルス増殖が亢進したという報告がある (62~64)。また、電子顕微鏡による観察によって、街上毒は細胞膜からはほとんど出芽せず、主に細胞内小器官の膜からウイルス粒子が出芽するのに対して、固定毒では細胞膜からのウイルス粒子の出芽が頻繁に認められたと報告されている (12, 20, 32~34, 37)。

本研究では、街上毒と固定毒でウイルスの出芽様式が異なることに着目し、ウイルスの出芽に重要な役割を持つ G 蛋白質、特に G 蛋白質に付加される N 型糖鎖数及び N 型糖鎖付加部位の違いが、街上毒と固定毒のウイルス粒子形成の過程の違いに深く関与していると予測し、分子生物学的、免疫組織学的手法を用いて、N 型糖鎖が G 蛋白質の細胞内局在、ウイルス粒子の出芽に与える影響を解析した。さらに、糖鎖数の異なる狂犬病ウイルスの G 蛋白質発現細胞における細胞由来遺伝子発現プロファイルがどのように異なるかを解析した。これらの解析によって、狂犬病ウイルスの街上毒が、固定毒化する過程で獲得した病原性低下に係る因子とその機序を明らかにすることを目的とした。

第一章では、狂犬病ウイルスは、ヌクレオカプシドが G 蛋白質と M 蛋白質の局在する小胞体・ゴルジ体あるいは細胞膜の脂質二重膜を被って出芽すると考えられることから、細胞内における G 蛋白質の局在の違いがウイルス粒子の

出芽部位の違いを決定する要因であると仮説を立てた。そこで、街上毒の Kyoto 株と固定毒の CVS-26 株感染細胞内におけるそれぞれの G 蛋白質の局在の違いを明らかにし、その局在が G 蛋白質のみにより規定されることを組換え狂犬病ウイルスを作製して証明し、G 蛋白質が街上毒と固定毒の出芽様式の違いに関与していることを示すことを目的とした。

第二章では、街上毒 Kyoto 株と固定毒の CVS-26 株のそれぞれの G 蛋白質の細胞内分布を規定する要因として、街上毒と固定毒の G 蛋白質に付加される N 型糖鎖の違いに注目し、特に Kyoto 株の G 蛋白質には存在せず CVS-26 株 G 蛋白質に存在する、第 204 位のアミノ酸への N 型糖鎖修飾が G 蛋白質の細胞膜への分布に関与しているとの仮説を立て、これを組換え G 蛋白質を用いた実験によって明らかにすることを目的とした。

第三章では、第二章で第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖修飾の有無によって G 蛋白質の細胞内分布に違いが見られたことから、糖鎖修飾部位が異なる G 蛋白質が発現された細胞内において、蛋白質輸送、ウイルスの出芽、ウイルス複製、免疫応答に関与する細胞由来遺伝子群の mRNA 発現が変化するという仮説を立てた。そこで、第 204 位アミノ酸に N 型糖鎖が付加される、または付加されない組換え G 蛋白質をそれぞれ発現させた細胞における mRNA 発現量を、DNA マイクロアレイ法によって比較解析して発現レベルの異なる遺伝子群を検索した。

第一章

狂犬病ウイルス Kyoto 株（街上毒）と CVS-26 株（固定毒）の G 蛋白質の細胞膜局在 の比較解析

序論

狂犬病ウイルスは、野外流行株である街上毒と実験室株である固定毒とに分類される (29, 37)。固定毒には親株である街上毒や継代方法の違いなどでさまざまな実験室株が存在し、末梢感染性やマウスに対する病原性などの性状も株によって異なる。

固定毒は、その病原性の低さや免疫誘導能の高さから不活化ワクチンの製造用株として用いられると同時に、街上毒よりも取扱いやすいため、実験室での狂犬病ウイルス研究に広く用いられてきた。

しかし、固定毒は街上毒と比較するとその性状に様々な違いがあることが指摘されている。例えば、街上毒の潜伏期間は長く不定で、一週間から時には数年に及ぶこともあるが、固定毒の潜伏期間はより短く一定化している (29)。また、固定毒の多くは街上毒よりも末梢感染性が減弱している (29)。さらに、街上毒に感染したヒトや動物では、血清抗体価の上昇や、CNS における炎症性細胞の浸潤や神経細胞の破壊などはほとんど認められないが、実験的に固定毒に感染させた動物では確認されている (37, 50, 55)。

このように、街上毒と固定毒の間にはその性状や病原性において様々な違いが存在し、固定毒を用いた研究で得られた知見が街上毒にもそのまま適用できるとは限らない。しかし、街上毒と固定毒の性状や病原性について比較解析し、その違いを決定する要因を明らかにすることで、未だに不明な点の多い街上毒の病原性を決定する因子や発症機序を明らかにすることができると考えられる。

本研究では、過去に行われた電子顕微鏡による観察で、街上毒は細胞膜からの出芽がほとんど見られないのに対し、固定毒では細胞膜からの出芽が見られるという報告に注目し、固定毒が街上毒よりも細胞外に出芽しやすくなってい

ることが、街上毒と固定毒の病態の違いに影響しているという仮説を立てた (12, 20, 32~34, 37)。また、狂犬病ウイルスの病原性決定機構に膜糖蛋白質である G 蛋白質が深く関わっていることが報告されていることから、街上毒と固定毒の出芽部位の違いに G 蛋白質が深く関与しているものと推論した (13, 60)。

第一章では、電子顕微鏡による観察で見られた街上毒と固定毒の出芽部位の違いと、街上毒と固定毒の G 蛋白質の違いの関係について解析した。街上毒である Kyoto 株と固定毒である CVS-26 株の G 蛋白質について、感染細胞における細胞内分布を比較した。また、CVS-26 株の G 蛋白質を Kyoto 株の G 蛋白質に置き換えた組換えウイルスを作製して、感染細胞におけるウイルス由来の G 蛋白質の分布と感染性ウイルス粒子の細胞外への放出量について比較解析を行った。

材料及び方法

細胞

マウス神経芽細胞腫 (MNA) 細胞を, 10%非働化ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco, Invitrogen by Life technologies, Carlsbad, CA, USA), ペニシリン (100 U / ml) とストレプトマイシン (100 μ g / ml) (Gibco) を添加したイーグル最小必須培地 (MEM) (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, MO, USA) (MEM-10% FBS) で培養した。

ウイルス

狂犬病ウイルスの街上毒である Kyoto 株は, 2006 年に報告されたフィリピンからの狂犬病の輸入症例由来で, ストックウイルスを使用時まで-80°Cで保存した (48, 65)。

狂犬病ウイルス CVS-26 株 (固定毒) は, Dr C.E.Rupprecht (Rabies section, Virus and Rickettsia Zoonoses Branch, Center for Disease Control and Preservation, Atlanta, GA, USA) より分与していただいた。マウス脳内に接種し増殖させた後, 9 倍容量の MEM-2% FBS でホモジナイズし, 上清をストックウイルスとして使用時まで-80°Cで保存した。

ウイルス接種

MNA 細胞を CELLview4 分画ガラスボトムシャーレ (CELLview Cell culture dish with glass bottom, TC, 35 mm, 4 compartment) (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) に, 5.0×10^4 cell / 分画で播きこんで, 細胞がシャーレの底面の 80%を占めるよう一晩培養した。リン酸緩衝生

理食塩水 (PBS) で細胞を洗浄後, 5.0×10^2 フォーカス形成単位 (FFU) のウイルス液 $100 \mu\text{l}$ を各分画に接種し, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 下で 1 時間培養し, 吸着させた。その後 PBS で細胞を 3 回洗い, MEM-2% FBS を各分画に $500 \mu\text{l}$ ずつ添加し, 37°C で 72 時間, または 96 時間培養し, 間接蛍光抗体法 (indirect immunofluorescence antibody assay, IFA) で解析した。

MNA 細胞を平底 96 穴プレート (Iwaki, Tokyo, Japan) の底面の 90-100% を占めるように培養した。PBS で細胞を洗浄後, 5.0×10^2 FFU のウイルス液 $100 \mu\text{l}$ を各 well に接種し, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 下で 1 時間培養し, 吸着させた。PBS で細胞を 3 回洗浄後, MEM-2%FBS を $150 \mu\text{l}/\text{well}$ 添加し, 37°C で 96 時間培養した。吸着終了時点を 0 時間とし, 24 時間後, 48 時間後, 72 時間後, 96 時間後に上清と細胞を回収して -80°C で保存し, 後日ウイルスウイルス力価とウイルス RNA 量を測定した。ウイルス 1 株につき, 4 well の細胞に接種し, それぞれについて測定後, 1 群 4 well のウイルス力価と RNA 量の平均値を算出した。

間接蛍光抗体法 (IFA)

ウイルスを感染させた 4 分画ガラスボトムシャーレの細胞から上清を除去し, 10%中性緩衝ホルマリン (Wako, Tokyo, Japan) を各分画に 1 ml ずつ加え, 室温で 30 分反応させて, 細胞を固定した。PBS で細胞を 3 回洗浄した後, PBS で 0.02%に希釈した Triton X-100 (SIGMA) を各分画に $500 \mu\text{l}$ ずつ加え, 5 分反応させ, 細胞膜の透過処理を行った後に PBS で細胞を 3 回洗浄した。間接蛍光抗体法は, ホルマリン固定細胞と固定細胞の細胞膜透過処理を行ったものを抗原として行った。一次抗体として PBS で $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した抗 G 蛋白質モノクローナル抗体 7-1-9 (生産開発科学研究所分子微生物研究室 河合

明彦先生より分与)を各分画に 100 μ l ずつ加え、室温で 1 時間反応させた(18, 39)。PBS で細胞を 3 回洗浄後、二次抗体として、fluorescein isothiosyanate (FITC) 標識 -goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen) を 0.1%4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 添加 PBS で 1:50 に希釈したものを各分画に 100 μ l ずつ加え、室温で 30 分反応させた。PBS で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV-1000 ; Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

N 蛋白質を G 蛋白質と共染色するために、一次抗体と 1 時間反応させる際に、500 倍に希釈した抗 N 蛋白質ウサギ血清を同時に添加し、二次抗体として 1,000 倍に希釈した Alexa Fluor 555 標識 anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ fragment (Cell signaling technology, Inc., Beverly, MA, USA) を室温で 30 分反応させた (16)。

ウイルス力価測定

1 群 4 well から回収した上清を、MEM-2%FBS で 10 倍階段希釈した。細胞は、5 回凍結融解した後、150 μ l の MEM-2%FBS で懸濁し、10 倍階段希釈した。96 穴プレートに培養した MNA 細胞に接種し、37°C、48 時間培養した。PBS で洗浄後、80%アセトンで 4°C、30 分の固定を行い、その後完全に乾燥させ、染色直前に PBS で洗浄した。FITC 標識抗狂犬病ウイルス N 蛋白質抗体 (Fujirebio Diagnostics, Inc., Malvern, PA, USA) を PBS で 1:50 に希釈し、0.002%エバンスブルーを加えたものを染色液として 80 μ l / well で細胞に添加し、室温で 30 分染色した。PBS で細胞を洗浄後、蛍光顕微鏡 (Eclipse TE200; Nikon, Tokyo, Japan) で観察した (46)。ウイルスの感染価はフォーカス形成単位 (FFU / 150 μ l) で算出し、4 well の平均をウイルス感染価として算出し

た。

リアルタイム RT-PCR

QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, GmbH., Hilden, Germany) を用いて、感染細胞の培養上清からウイルス RNA を抽出した。最終的に、96 穴プレート 1 well の培養上清 (150 μ l) あたり 60 μ l の溶出バッファー (buffer AVE) で溶出した。また、RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて感染細胞から total RNA を抽出した。最終的に、平底 96 穴プレート 1 well の細胞あたり 60 μ l の RNAase free water で溶出した。

培養上清中、および感染細胞中の狂犬病ウイルス RNA 量を、QuantiTect Probe one step RT-PCR kit (QIAGEN) を用いた N 蛋白質遺伝子を標的としたリアルタイム RT-PCR にて定量した。10 μ l の 2 x Quantitect Probe RT-PCR Master Mix, 0.2 μ l の Quantitect RT Mix, と 1 μ l の RNA 抽出液, 0.06 μ l の各プライマーおよびプローブ (100 pmol / μ l) (表 1-1) を混合し、RNase Free 蒸留水を加えて反応液が 20 μ l になるように調製した。上記反応液を、Light Cycler 480 system II (Roche Diagnostics, GmbH., Basel, Schweiz) を用いて以下の条件で反応させた。50°C で 30 分逆転写反応した後、95°C、15 分の熱反応を行い、94°C・15 秒の熱変性、60°C・1 分のアニーリング・伸長反応を 45 サイクル繰り返した。ウイルス 1 株につき、4 well の細胞に接種し、1 群 4 well の細胞から得られた RNA 量を、既知量の合成 RNA を用いて作成した標準曲線を用いて定量した。

リバーシジェネティクス

Inoue らの用いた手法を参考に、リバーシジェネティクスの手法を用いて、

CVS-26 株由来の N, P, M, L 蛋白質と, Kyoto 株由来の G 蛋白質から構成される組換えウイルス rCVS-26 (Kyoto-G) 株と, すべて CVS-26 株由来のウイルス蛋白質から成る組換えウイルス rCVS-26 株を作製した (図 1-1) (大臣確認通知番号: 平成 24 年 3 月 21 日付 23 受文科振第 2709 号) (17)。

rCVS-26 フルゲノムプラスミド pzC26-full とヘルパープラスミド pzC26-G, pzC26-P, pzC26-N, pzC26-L を, 京都大学の井上謙一先生より分与していただいた。これらのプラスミドは, それぞれ pcDNA3.1/Zeo (+) (Invitrogen) に, CVS-26 株由来のフルゲノム cDNA および N, P, G, L 蛋白質遺伝子の cDNA をそれぞれ組み込んだものである。pzC26-full では, フルゲノムの 5' 端にハンマーヘッド型リボザイムが, 3' 端に HDV リボザイムが付加されており, また, G 蛋白質遺伝子の 5' 端に制限酵素サイト Afl II が, 3' 端に制限酵素サイト Pac I が付加されている。CVS-26 株と pzC26-full の遺伝子配列を比較すると, P 蛋白質遺伝子の第 831 位ヌクレオチドが A から T に, L 蛋白質遺伝子の第 5058 位が T から A に, L 蛋白質遺伝子の第 7416 位が T から C へ変異していたが, これらがコードするウイルス蛋白質のアミノ酸配列は完全に一致した。全ての遺伝子は pcDNA3.1/Zeo (+) の CMV プロモーターのコントロール下で発現させた。

Kyoto 株の G 蛋白質遺伝子を CVS-26 株に組換えた rCVS-26 (Kyoto-G) 株は, 以下の方法で作製した。Kyoto 株 RNA を QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し, RNA 抽出溶液 10 μ l を, 1 μ l の random primer (50 ng / μ l) (Promega Corporation., Fitchburg, WI, USA) と混合し, 95°C で 1 分熱変性させ, 氷上で冷却した。4 μ l の 5 x AMV reverse transcription buffer (Promega), 4 μ l の 2.5mM dNTP (TAKARA BIO Inc., Shiga, Japan), 1 μ l の RNase inhibitor (40U / μ l) (Promega), 1 μ l の AMV 逆転写酵素

(20 U / μ l) (Promega) を加えて混合し、42°C・45 分の逆転写反応を行い、95°C・5 分の熱処理を行った。

この cDNA 溶液 1 μ l と、5 μ l の 10 x High Fidelity PCR buffer (Invitrogen), 5 μ l の dNTP Mixture (2 mM), 2 μ l の MgSO₄ (50 μ M), 1 μ l のプライマー (RABVK/Y-G-F・RABVK/Y-G-R または Kyoto-G-F-Afl II・Kyoto-G-R-Pac I (表 1-2)) (10 nM), 0.2 μ l の Platinum Taq High Fidelity (5 U / μ l) を混合し、蒸留水を加えて反応液が 50 μ l になるよう調製し、サーマルサイクラーを用いて以下の条件で反応させた。94°C・2 分の熱反応ののち、94°C・30 秒の熱変性および 51°C・30 秒のアニーリング、68°C・90 秒の伸長反応を 30 サイクル繰り返し、最後に 94°C・30 秒、51°C・30 秒、68°C・10 分の反応を行った。

得られた PCR 産物を、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) を用いた TA クローニングによってクローニングした。4 μ l の PCR 産物と 1 μ l の salt solution, 1 μ l の TOPO vector を混合し室温で 5 分置き、Competent high DH5 α (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) 25 μ l と混合し、氷上に 20 分置いた後、42°C のウォーターバスで 45 秒間加熱し、すぐに氷上に戻した。250 μ l の SOC 培地 (Invitrogen) を加え、37°C・80 rpm で振盪しながら 1 時間培養し、アンピシリン加 [Anpicillin sodium (Wako) 100 μ g / ml]] LB 寒天培地 [LB broth for microbiology (Merck Millipore, MA, USA), 1.5% Agar, Bacteriological Type A Ultra pure (USB, Affimetrix., CA, USA)] に播きこみ、37°C で一晩培養してコロニーを形成させた。

シングルコロニーを、5ml のアンピシリン加 LB 培地に懸濁してさらに培養し、Quicklyse Miniprep kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。挿入された遺伝子の塩基配列を、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

(Applied Biosystems by Life Technologies. Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて決定した。1 μ l のプラスミド液と 1 μ l の 2.5 x BigDye Terminator Ready Reacting Mix, 3.5 μ l の 5 x BigDye Sequencing Buffer, 3.2 μ l のプライマー (1 pmol) とを混合し、蒸留水を加えて 20 μ l の反応液を調製し、以下の反応を行った。96°C・3 分の熱反応を行い、96°C・10 秒, 50°C・5 秒, 60°C・4 分の熱反応, アニーリング, 伸長反応を 25 サイクル繰り返した。反応物を精製するために、5 μ l のエデト酸二ナトリウム水溶液 (edetate disodium, EDTA) (125 mM) と, 60 μ l の 100% エタノールを加え、室温で 15 分反応させた後, 4°C・3200 rpm で 30 分遠心し、上清を捨て、60 μ l の 70% エタノールで沈殿を一回洗った。15 μ l のホルムアミドを加え、95°C・2 分の熱反応を行い、Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) を用いて解析を行った。

プラスミドによってトランスフォーメーションされた大腸菌 DH5 α を、50ml の LB 培地で培養し、増殖させた DH5 α から Nucleobond Xtra Midi (MACHEREY-NAGEL. GmbH., Düren, Germany) を用いてプラスミドを抽出した。

RABVK/Y-G-F・RABVK/Y-G-R プライマーによる PCR 産物を組み込んだプラスミドは、4 μ l の 10 x H バッファー (TAKARA) と, 4 μ l の 10 x BSA (TAKARA), 1 μ l の *EcoRI* (TAKARA) と *NotI* (TAKARA), 1 μ l の DNA 液を混ぜ、蒸留水で 40 μ l になるよう反応液を調製し、37°C で 3 時間反応させた。また、Kyoto-G-F-Afl II・Kyoto-G-R-Pac I プライマーによる PCR 産物を組み込んだプラスミドは、1 μ l の *AflII* (TAKARA) と 1 μ l の *Pac I* (TOYOBO) を加えて 37°C で 3 時間反応させた。0.8% Seakem GTG agarose (Lonza, Basel, Switzerland) / TAE ゲルを用いて電気泳動にかけ、G 蛋白

質をコードする cDNA を QIAfilter Gel-extraction kit (QIAGEN) を用いて精製し、インサートとして用いた。同様に、それぞれ *EcoRI* と *NotI* で処理して精製した pcDNA3.1/Zeo(+)と、*AflII* と *PacI* で処理して G 遺伝子部分を除去して精製した pzC26-full をベクターとして用意した。インサートとベクターのモル比が 10:1 になるように混合し、DNA 混合液と等量の Ligation high Ver.2 (TOYOBO) を加え、16°C で 30 分ライゲーション反応を行い、反応産物を DH5 α にトランスフェクションしてクローニングした。pcDNA3.1/Zeo に Kyoto 株 G 蛋白質をコードする cDNA を組み込んだものをヘルパープラスミド pzKyoto-G、Kyoto 株 G 蛋白質をコードする cDNA を pzC26-full に組み込んだものを、フルゲノムプラスミド pzC26 (Kyoto-G)-full とした (図 1-2)。挿入された塩基配列が Kyoto 株の G 蛋白質遺伝子の塩基配列と同じであることを確認した。

6 well プレートに MNA 細胞を 2.0×10^5 cell / well 播きこみ、一晚培養し、細胞が底面の 50-80% を占めるようにした。フルゲノムプラスミドとヘルパープラスミドの溶液を、pzC26-full (Kyoto-G) : 6 μ g / well, pzC26-N : 1 μ g / well, pzC26-P : 0.5 μ g / well, pzKyoto-G : 0.3 μ g / well, pzC26-L : 0.2 μ g / well の比率になるよう混合した。TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus Bio LLC., Madison, WI, USA) 180 μ l と、無血清 MEM 900 μ l を混合し、5 分静置した。DNA 液と試薬液を混合し、20 分静置した。MNA 細胞に、110 μ l / well ずつ添加した。3 日ごとに上清を回収して 12 well プレートに培養した MNA 細胞に接種し、FITC 標識抗狂犬病ウイルス N 蛋白質抗体を用いた蛍光抗体法によってウイルスの増殖を確認した。回収されたウイルスの塩基配列を確認後、G 蛋白質組換えウイルス rCVS-26 (Kyoto-G) として実験に用いた。rCVS-26 株も同様に作製し、実験に用いた。

結果

狂犬病ウイルス感染 MNA 細胞における G 蛋白質の局在

狂犬病ウイルス感染細胞における G 蛋白質の局在を IFA により解析した。感染細胞をホルマリン固定した抗原では細胞膜周囲の局在を、細胞膜透過処理を行った抗原では細胞内における局在を解析した。その結果、Kyoto 株感染細胞では、G 蛋白質は主に細胞質内の核周囲に局在し、細胞膜への分布は認められなかった。CVS-26 株感染細胞では、G 蛋白質は主に細胞膜周囲に分布した (図 1-3)。

組換え狂犬病ウイルス感染 MNA 細胞における G 蛋白質と N 蛋白質の共局在

rCVS-26 株感染 MNA 細胞では、G 蛋白質は CVS-26 株と同様、主に細胞膜周囲に分布し細胞質内にも分布した。rCVS-26 株の N 蛋白質は、細胞膜周囲と細胞質内に分布しており、特に細胞膜周囲で G 蛋白質と N 蛋白質の共局在が認められた。一方、Kyoto 株感染細胞では、G 蛋白質と N 蛋白質は、細胞質内にのみ分布しており細胞膜周囲には分布が認められなかった (図 1-4)。

組換えウイルス rCVS-26 (Kyoto-G) 株感染細胞では、Kyoto 株感染細胞と同様、G 蛋白質は細胞質内にのみ分布した。N 蛋白質も細胞質内にのみ分布し、細胞膜周囲にはほとんど認められなかった。また、G 蛋白質と N 蛋白質は細胞質内で共局在した (図 1-4)。

Kyoto 株, rCVS-26 株及び rCVS-26 (Kyoto-G) 株を感染させた MNA 細胞におけるウイルス増殖

それぞれのウイルス株を感染後、0 時間後から 96 時間後にかけて、ウイルス

感染細胞と培養上清を 24 時間ごとに採材し、そのウイルス力価を測定した。

Kyoto 株感染細胞の培養上清のウイルス力価は、0 時間後から 72 時間後までは検出限界未満であったが、96 時間後に 1.5 FFU / well となり、非常に低力価ながらウイルス増殖が認められた。一方、rCVS-26 株感染細胞の培養上清のウイルス力価は、1.75 FFU / well (0 時間後) から 4.75×10^5 FFU / well (96 時間後) まで経時的に上昇し、効率の良いウイルス増殖が認められた。組換えウイルス rCVS-26(Kyoto-G)株の感染細胞の培養上清のウイルス力価は、0.75 FFU / well (0 時間後) から 1.25×10^3 FFU / well (96 時間後) まで上昇していた (図 1-5A)。

細胞を 5 回凍結融解した後、感染細胞内のウイルスのウイルス力価を測定したところ、Kyoto 株感染細胞では 48 時間後から感染性ウイルスが検出され、96 時間後に 1.5×10^6 FFU / well と、ウイルス力価の緩やかな上昇が認められた。rCVS-26 株感染細胞では、24 時間後にウイルス増殖が認められ、96 時間後に 3.45×10^6 FFU / well と、効率の良いウイルス増殖が認められた。rCVS-26 (Kyoto-G) 感染細胞では、24 時間後にウイルス増殖が認められ、96 時間後には 7.0×10^3 FFU / well にウイルス力価が上昇した (図 1-5B)。

Kyoto 株、rCVS-26 株及び rCVS-26 (Kyoto-G) 株を感染させた MNA 細胞中の狂犬病ウイルス RNA 量

96 穴プレートに MNA 細胞を播きこみ、各ウイルスを 1 群 4 well ずつ接種し、24 時間ごとに上清と細胞を回収して、感染 MNA 細胞内の狂犬病ウイルス RNA 量をリアルタイム RT-PCR により定量した。

その結果、Kyoto 株感染細胞の培養上清中からは、0 時間時点で 1.82×10^3 copy / well のウイルス RNA が検出され、96 時間後で 4.92×10^4 copy / well と、

わずかな上昇が認められた。rCVS-26 (Kyoto-G) 株感染細胞の培養上清中のウイルス RNA 量は、0 時間時点の 1.50×10^2 copy / well から 96 時間後に 2.66×10^7 copy / well に上昇していた。rCVS-26 株感染細胞の培養上清中のウイルス RNA 量は、0 時間後時点で 1.20×10^2 copy / well であったが、96 時間後には 1.78×10^8 copy / well に上昇していた (図 1-6A)。

一方、細胞内のウイルス RNA 量を定量したところ、Kyoto 株感染 MNA 細胞では 0 時間の時点で 1.08×10^4 copy / well のウイルス RNA が検出され、96 時間後には 1.37×10^4 copy / well のウイルス RNA が検出された。rCVS-26 株感染細胞では、検出限界未満から 96 時間後には、 4.48×10^8 copy / well までウイルス RNA 量が増加した。rCVS-26 (Kyoto-G) 感染細胞では、 4.60×10^3 copy / well から 5.98×10^8 copy / well まで狂犬病ウイルス RNA 量が増加した (図 1-6B)。

考察

狂犬病ウイルス感染細胞における G 蛋白質の細胞内分布を、IFA と共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果、街上毒である **Kyoto** 株の G 蛋白質は細胞膜周囲に分布せず核周辺部に局在したが、固定毒である **CVS-26** 株の G 蛋白質は細胞膜周囲に分布した (図 1-3)。狂犬病ウイルスは、ヌクレオカプシドが G 蛋白質と M 蛋白質の分布する脂質膜をエンベロープとして被って出芽してくるため、G 蛋白質の分布する場所に出芽が起きていると考えられる (60)。したがって、**Kyoto** 株と **CVS-26** 株感染細胞で認められた細胞膜への G 蛋白質分布の顕著な相違は、街上毒では細胞膜からの出芽はほとんど見られないが、固定毒では頻繁に認められるという、これまで報告された電子顕微鏡による狂犬病ウイルスの出芽に関する観察結果を裏付けるものであったと言える (12, 20, 32~34, 37)。

このような G 蛋白質の感染細胞内での局在の相違が、G 蛋白質自身によって規定されるのか、あるいは他のウイルス蛋白質によっても規定されるのかを明らかにするために、リバーシジェネティクス的手法により、**CVS-26** 株由来の N, P, M, L 蛋白質と、**Kyoto** 株由来の G 蛋白質を持つ組換えウイルス **rCVS-26 (Kyoto-G)** 株と、全ての構造蛋白質が **CVS-26** 株由来である **rCVS-26** 株を複製した。これらの組換えウイルスを MNA 細胞に感染させて、G 蛋白質の細胞内分布を **Kyoto** 株感染 MNA 細胞と比較した。その結果、**rCVS-26** 株の G 蛋白質は **CVS-26** 株と同様に細胞膜に分布したが、**rCVS-26 (Kyoto-G)** の G 蛋白質は、**Kyoto** 株と同様に細胞膜には分布しなかった (図 1-4)。この結果から、G 蛋白質の細胞膜への分布は、G 蛋白質自身によってのみ規定されることが示された。

また、N 蛋白質の細胞内分布についても IFA により解析したところ、rCVS-26 株感染細胞では N 蛋白質の細胞膜周辺への局在が認められ、細胞膜周囲で G 蛋白質と共局在したのに対し、Kyoto 株感染細胞および rCVS-26 (Kyoto-G) 株感染細胞では、N 蛋白質の細胞膜周囲への分布は認められず、細胞質内で G 蛋白質と N 蛋白質の共局在が認められた (図 1-4)。エンベロープの構成蛋白質である G 蛋白質とヌクレオカプシドの構成蛋白質である N 蛋白質の分布が重なる場所は、ウイルス粒子が G 蛋白質を被って出芽する場所であると考えられることから、これらの結果は、Kyoto 株や rCVS-26 (Kyoto-G) 株のウイルス粒子が、主に細胞質内のおそらく小胞体・ゴルジ体で出芽し、rCVS-26 株のウイルス粒子は細胞膜で出芽することを示すものと考えられた。本研究からは、G 蛋白質と N 蛋白質の共局在が、両蛋白質の相互作用によるものか、G 蛋白質とマトリックス蛋白質である M 蛋白質、M 蛋白質と N 蛋白質がそれぞれ相互作用することによるものなのかは不明であり、今後の研究が必要とされるが、ウイルス粒子の出芽部位を G 蛋白質が規定することが明らかとなった。

これまで、固定毒 SAD 株では、G 蛋白質を欠損させても細胞膜から出芽することが報告されているが、G 蛋白質が存在しないと M 蛋白質の働きにより細胞膜からの出芽が起きると考えられる (35)。しかし G 蛋白質を欠損させた場合の出芽効率は、G 蛋白質を有するウイルスに比べて 30 分の 1 に低下しており、G 蛋白質が細胞膜からの出芽促進に深く関わっていることも示されている (35)。

G 蛋白質の性質の違いにより、ウイルス粒子の出芽部位が規定されることが明らかとなったが、このことがウイルス増殖あるいは感染性ウイルスの形成にどのように影響するかを確認するため、それぞれのウイルス株を細胞に接種した後、培養上清と細胞内のウイルスのウイルス力価の経時的変化を調べた。そ

の結果、Kyoto 株を感染させた MNA 細胞では、ウイルス増殖は認められたものの非常に効率が低かった。一方、感染性ウイルスは培養上清と比較して細胞内で早期に検出され、街上毒の成熟ウイルス粒子は主に細胞内で作られるという報告に沿う結果であると考えられた。

一方、rCVS-26 株は、感染 24 時間後からウイルス増殖が認められ、96 時間後にかけて、培養上清においても感染細胞においてもウイルス力価が上昇し、リバーシジェネティクスで作製された固定毒である rCVS-26 株が MNA 細胞において効率よく増殖することが確認された (図 1-5A, B)。この rCVS-26 株の G 蛋白質の遺伝子のみを Kyoto 株の遺伝子と入れ替えた組換え狂犬病ウイルス rCVS-26 (Kyoto-G) 株は、Kyoto 株と比較して有意に効率よくウイルスが増殖したことから、CVS-26 株と Kyoto 株の G 蛋白質の遺伝子以外のウイルス遺伝子も両株のウイルス増殖の違いに関与していることが明らかとなった。しかし、rCVS-26 (Kyoto-G) 株の感染性ウイルスは培養上清と比較して細胞内で早期に検出され、Kyoto 株と同様の傾向を示した。過去に、固定毒 SN 株の G 蛋白質を街上毒 SHBRV-18 株の G 蛋白質と組換えた結果、培養細胞における感染性ウイルスの増殖効率が低下したことが報告されており、これは本実験で得られた結果と一致する (42)。

rCVS-26 株の G 蛋白質を Kyoto 株の G 蛋白質に入れ替えた結果、rCVS-26 株よりもウイルス増殖が低下したのはウイルス粒子の形成能が G 蛋白質の局在により影響を受けるためと考えられる。しかし、G 蛋白質はウイルスの細胞への吸着及び細胞内への侵入に関与することから、産生されたウイルスの細胞への吸着・侵入効率が低下した可能性も考えられた。

そこで、感染細胞培養上清のウイルス RNA 量を経時的に調べた結果、rCVS-26 (Kyoto-G) 株感染細胞からも、若干 rCVS-26 株感染細胞よりも低い

ものの効率良くウイルス粒子が上清に放出されていた。しかし、培養上清のウイルス RNA 量とウイルスウイルス力価の比率は、rCVS-26 (Kyoto-G) 株では rCVS-26 株よりも有意に低かった。このことから、rCVS-26 (Kyoto-G) 株感染細胞から産生されるウイルスのウイルス力価が rCVS-26 株感染細胞から産生されるウイルスのウイルス力価よりも低い大きな要因は、産生されたウイルス粒子の感染性が低いためであると考えられた。G 蛋白質を欠損したウイルス粒子が M 蛋白質によって細胞膜から出芽するという報告があることから、rCVS-26 (Kyoto-G) 株感染細胞から産生されたウイルス粒子の感染性が低いのは、一部の粒子が G 蛋白質の分布しない細胞膜から M 蛋白質の機能によって出芽しているためとも考えられる (35)。

一方、感染細胞内のウイルス RNA 量は、rCVS-26 (Kyoto-G) 株では rCVS-26 株と同等以上であったことから、CVS-26 株の G 蛋白質を Kyoto 株の G 蛋白質に入れ替えても、感染後の細胞内でのウイルス RNA の合成量にはほとんど影響がないことが示唆された。

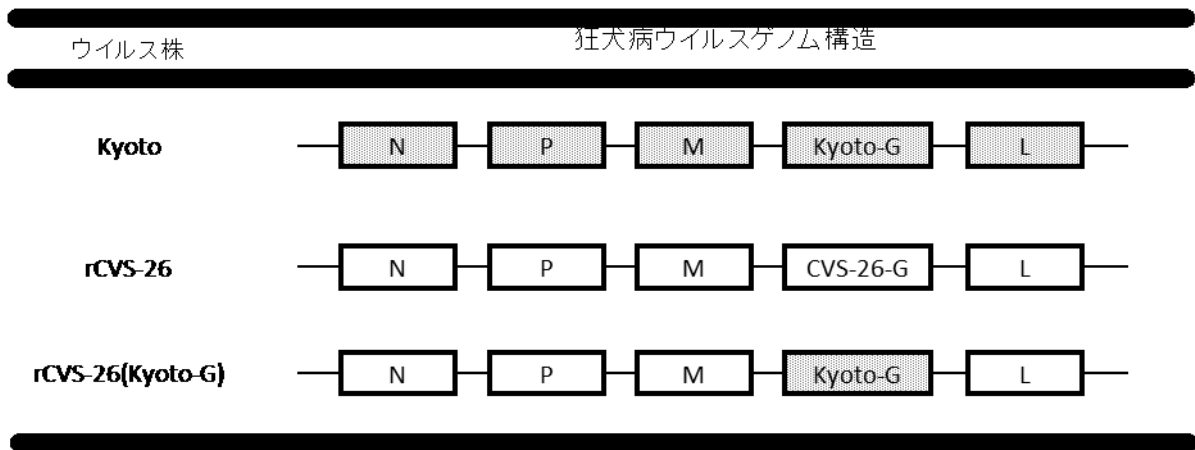
本章では、街上毒である Kyoto 株と、固定毒である CVS-26 株では、感染細胞における G 蛋白質の局在が異なることが示された。また、組換えウイルス rCVS-26 (Kyoto-G) を用いた実験で、ウイルス感染細胞における G 蛋白質の細胞内分布の違いや感染性ウイルス粒子の産生量の違いに、Kyoto 株の G 蛋白質と CVS-26 株の G 蛋白質の違いが関与していることが示された。このことから、Kyoto 株の G 蛋白質と CVS-26 株の G 蛋白質のアミノ酸配列や立体構造、糖鎖修飾などの違いが、G 蛋白質の細胞内局在や感染性ウイルス粒子産生量の決定に関わっていると考えられた。

表1-1. 狂犬病ウイルスの定量リアルタイムPCR用プライマー

プライマー名・プローブ名	プライマー 配列
Rab-F955	5' ATGGGTCAAGTCAGATCYCTAAATGC 3
Rab-R1029	5' GCCCCTAGAACAGACATCTCA 3'
Rab-P983	6FAM-CGGTTATTGCTGCATGTGCCCTC-TAMRA

標的: Kyoto株N遺伝子 955-1029
(Genbank アクセッション番号: AB573762)
PCR産物のサイズ: 75bp

図1-1. 組換えウイルスゲノム構造



Kyoto株はストックウイルスを使用した。**G**蛋白質のウイルス性状に対する影響を観察するために、固定毒**CVS-26**株のゲノムをベースに、**G**蛋白質のみ**Kyoto**株の**G**蛋白質に置き換えた組換えウイルスを作出した。**CVS-26**株**G**蛋白質を持つ**rCVS-26**株も作出した。

表1-2. Kyoto-G増幅PCR用プライマー

用途	プライマー名	プライマー配列	制限酵素サイト
ヘルパープラスミド 組み込み用	RABVK/Y-G-F	5' <u>CGCGAATTC</u> ACCATGATTCCTCAGGCTCTT 3'	EcoR I
	RABVK/Y-G-R	5' TATG <u>CGGCCCGCTC</u> ACATGCTGATCTCACCT 3'	Not I
フルゲノム 組み込み用	Kyoto-G-F-Afl II	5' <u>ATACTTAAGGAAAGATGATTCCTCAGGCTC</u> 3'	Afl II
	Kyoto-G-R-Pac I	5' <u>CGGTTAATTAAATTACAGCTTGGTCTCACC</u> 3'	Pac I

標的: Kyoto株G遺伝子(LC009632)

下線部: 制限酵素サイト

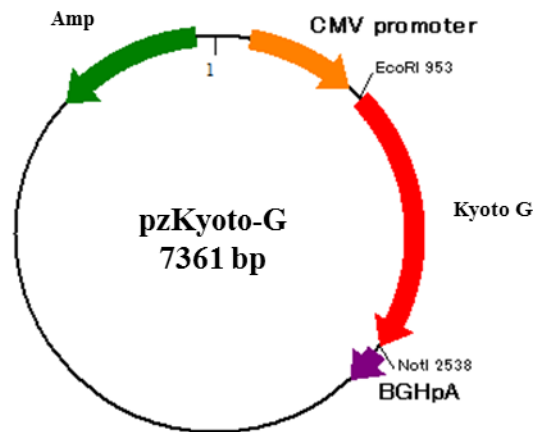
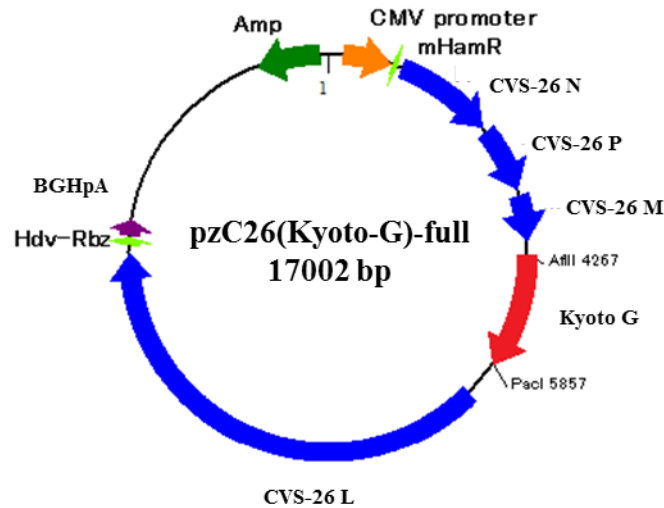


図1-2. リバースジェネティクス用に作製したプラスミドの模式図

狂犬病ウイルスCVS-26株の遺伝子全長をコードするpzc26-fullをもとに、G蛋白質遺伝子をKyoto株のG蛋白質遺伝子に組み換えてpzc26(Kyoto-G)-fullを作製した。

Kyoto株G蛋白質遺伝子のcDNAをpcDNA3.1/Zeo(+)に挿入し、ヘルパープラスミドpzKyoto-Gを作製した。

mHamR: ハンマーヘッド型リボザイム Hdv-Rbz: HDVリボザイム BGHpA: 牛成長ホルモンポリアデニレートシグナル Amp: アンピシリン抵抗性遺伝子

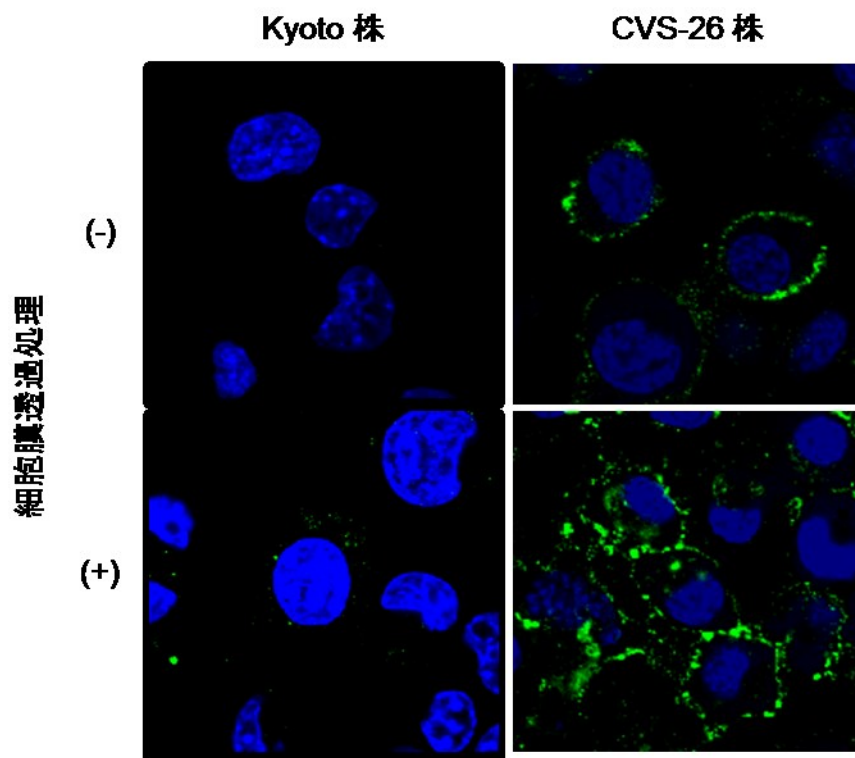


図1-3. 狂犬病ウイルス感染細胞におけるG蛋白質の局在
MNA細胞にKyoto株とCVS-26株をそれぞれ感染させ、72時間後にホルマリンで固定し、そのまま(-)あるいは0.2%Triton-X100で細胞膜透過処理(+), G蛋白質の局在をIFAにより解析した。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。
緑色蛍光: G蛋白質 青色蛍光: 核

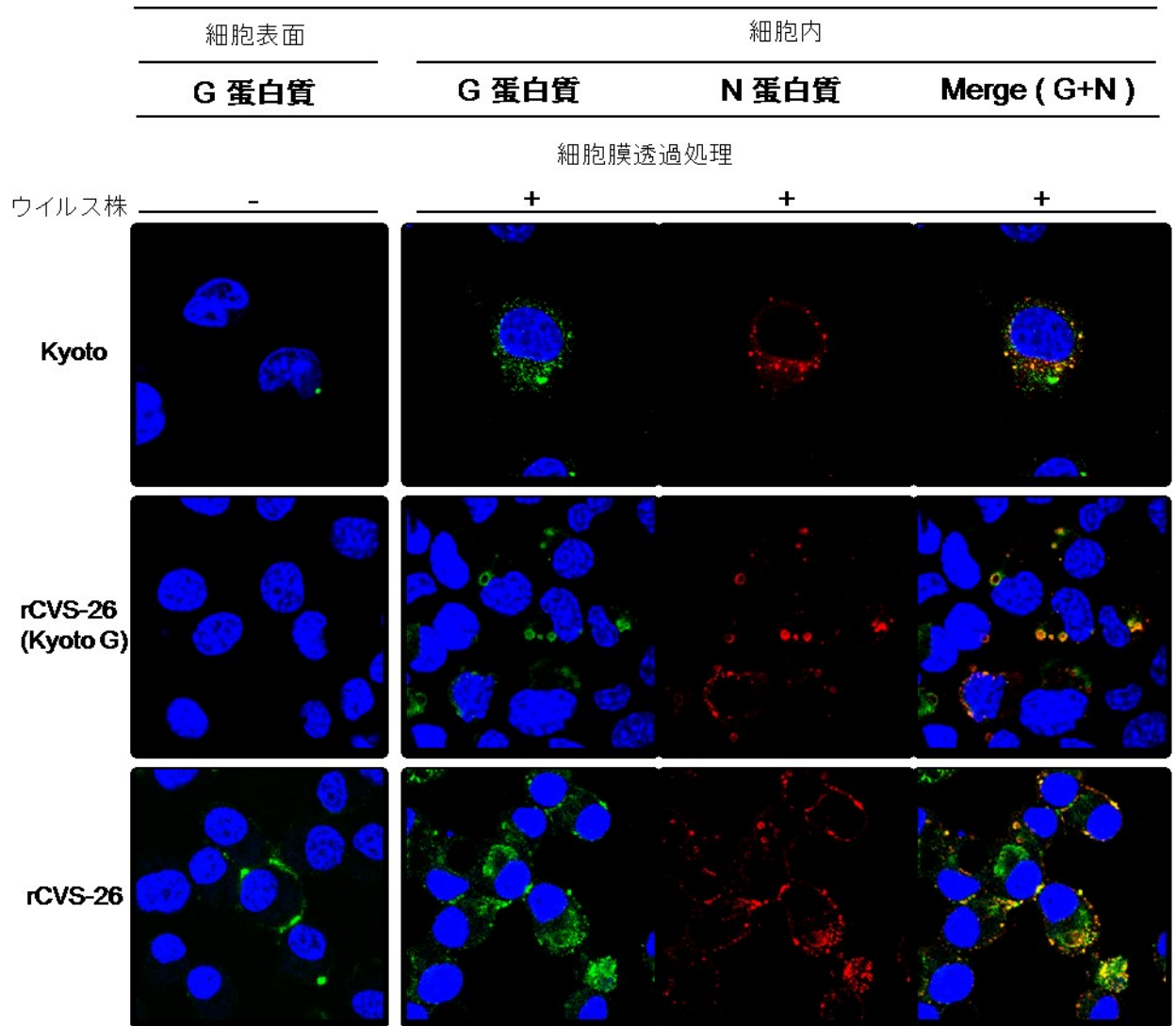


図1-4. Kyoto株、rCVS-26株、rCVS-26(Kyoto-G)株感染MNA細胞におけるGおよびN蛋白質の局在
MNA細胞にKyoto株、rCVS-26株、rCVS-26(Kyoto-G)株をそれぞれ接種し、96時間後にホルマリンで固定し、そのまま(-)あるいは0.5%Triton X-100で細胞膜透過処理後にG蛋白質とN蛋白質の局在をIFAにより解析した。観察には共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview FV100 Olympus)を用いた。
緑色蛍光: G蛋白質 赤色蛍光: N蛋白質 青色蛍光: 核

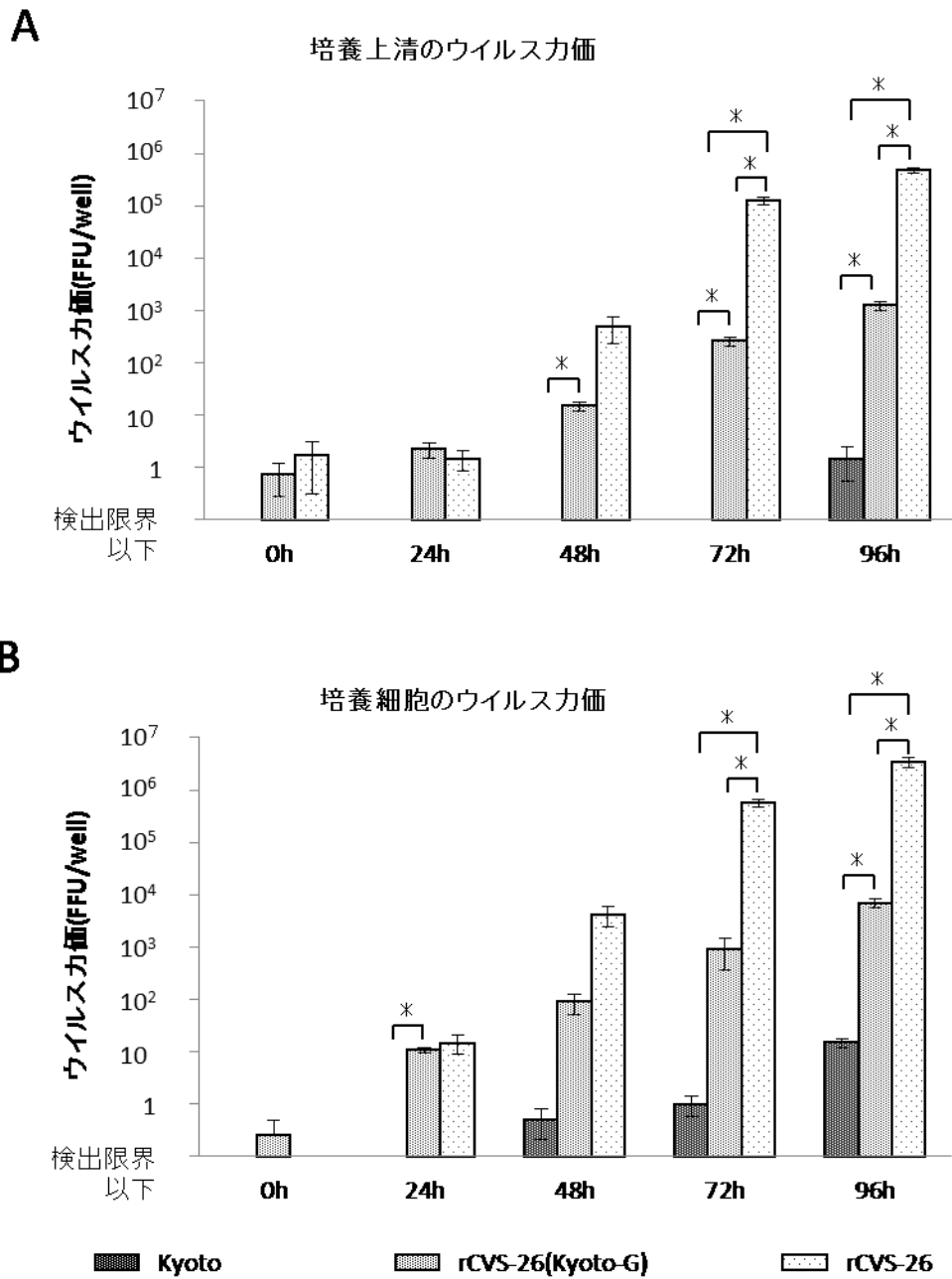


図1-5. ウイルス接種後の培養上清および細胞内のウイルス力価の経時的変化
 96wellプレートにMNA細胞を培養し、それぞれのウイルス株を接種した。24時間ごとに上清(A)と細胞(B)を回収してウイルス力価を測定し、1群4wellの平均値を算出した。(* $p < 0.05$ エラーバー: 標準誤差)

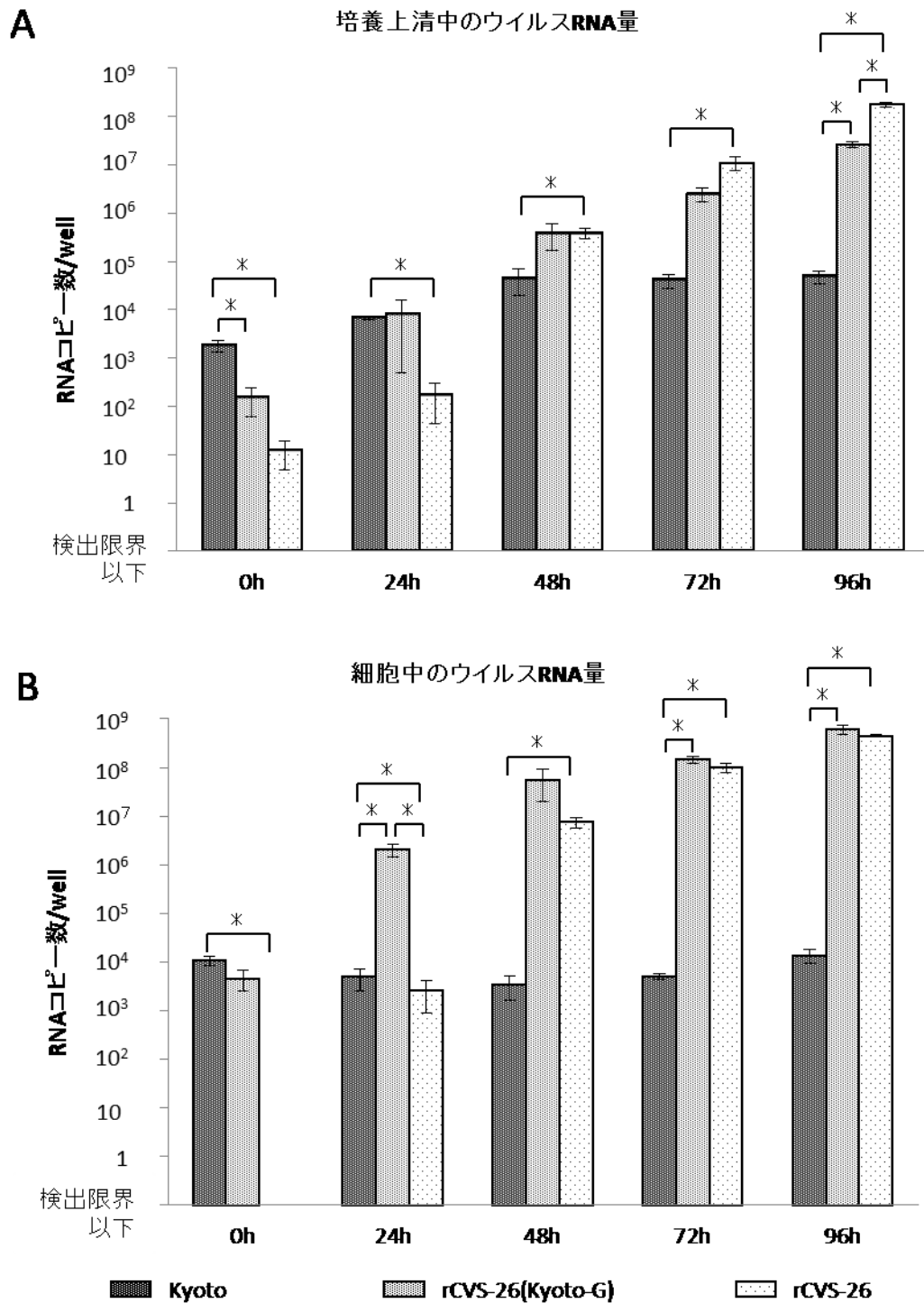


図1-6. ウイルス接種後の情勢および細胞内の狂犬病ウイルスRNA量の経時的変化
 96wellプレートにMNA細胞を培養し、それぞれのウイルス株を接種した。感染後24時間ごとに培養上清(A)と細胞(B)を回収してRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRによりウイルスRNAを定量した。1群4wellの平均値を算出し、グラフに示した。
 (* $p < 0.05$ エラーバー: 標準誤差)

第二章

G 蛋白質の細胞膜への分布を規定する
第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加に関する研究

序論

第一章では、街上毒である Kyoto 株と固定毒である CVS-26 株を感染させた MNA 細胞において、Kyoto 株の G 蛋白質は細胞膜に分布せず核周辺部位に局在するのに対して、CVS-26 株の多くの G 蛋白質が細胞膜に局在することが明らかにされた。また、CVS-26 株の G 蛋白質遺伝子を Kyoto 株の G 蛋白質に組換えた、組換えウイルス rCVS-26 (Kyoto-G) 株を作製し、MNA 細胞に感染させて細胞内の G 蛋白質と N 蛋白質の局在を調べた。その結果、Kyoto 株の G 蛋白質と CVS-26 株の N, P, M, L 蛋白質を有する rCVS-26 (Kyoto-G) 株が細胞膜でウイルス粒子を形成しないことが示唆され、G 蛋白質の細胞膜への移行の有無は、Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質が持つアミノ酸配列・立体構造・糖鎖修飾等の違いに起因するものと考えられた。そこで、本章では Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質が示した MNA 細胞内での分布の違いを規定する要因について解析した。

狂犬病ウイルスの G 遺伝子は、524 個のアミノ酸からなる G 蛋白質をコードしているが、N 末端から第 19 位のアミノ酸までの領域は、シグナルペプチド (signal peptide, SP) であり、G 蛋白質の成熟過程でシグナルペプチダーゼに切断されるため、成熟した G 蛋白質は 505 個のアミノ酸で構成される。この 505 個のアミノ酸のうち、N 末端から第 439 位のアミノ酸までが細胞外ドメイン (ectodomain, ED) で、ウイルス粒子表面にスパイク状に突き出ており、細胞のレセプターや中和抗体と結合する。第 439 位から第 461 位でアミノ酸までが膜貫通ドメイン (transmembrane region, TM) で、脂質二重膜を貫通している。C 末端側の 44 個のアミノ酸が細胞質ドメイン (cytoplasmic domain, CD) と呼ばれ、脂質 2 重膜より内側 (細胞質内あるいはウイルス粒子内) に

存在し、ウイルス粒子形成に重要な役割を果たすマトリックス蛋白質である M 蛋白質と相互作用する。ウイルス粒子上の G 蛋白質は 3 量体を形成する (14, 60)。

街上毒と固定毒の G 蛋白質の構造を比較した時、最も顕著な違いは潜在的な N 型糖鎖付加部位の数である。街上毒の G 蛋白質は 1~2 か所の潜在的な N 型糖鎖付加部位 (Asn-X-Thr/Ser) を持つのに対し、固定毒の G 蛋白質は 3~4 か所の潜在的 N 型糖鎖付加部位を持つ (表 2-1) (36, 39, 49, 63, 64)。一般的に、糖蛋白質の糖鎖は、ポリペプチド鎖をプロテアーゼや抗体による影響から保護し、細胞内蛋白質輸送に影響し、そして糖蛋白質の生理学的機能に深く関わっているとされている (52)。

狂犬病ウイルスの G 蛋白質では、新たな N 型糖鎖付加部位の獲得は街上毒の固定毒化において重要な意味を持つと考えられている。実際に街上毒 1088 株を繰り返し継代して配列と性状の変化を調べた実験で、G 蛋白質に付加される N 型糖鎖が増加すると、ウイルスの細胞からの出芽効率が上昇し、マウスに対する病原性の低下が見られたと報告された (64)。また、固定毒 ERA 株と CVS 株を用いた実験で、N 型糖鎖の付加を阻害することによって細胞膜への G 蛋白質の分布が抑制されたという報告がある (3, 45)。したがって、第一章で観察された、Kyoto 株感染 MNA 細胞と CVS-26 株感染 MNA 細胞における G 蛋白質の細胞内局在の違いにも、G 蛋白質に付加される N 型糖鎖が深く関与していると考えられる。

本章では、Kyoto 株 G 蛋白質と CVS-26 株 G 蛋白質の N 型糖鎖付加部位の違いに注目した。第 204 位アミノ酸に変異を導入し、それぞれ第 204 位アミノ酸に N 型糖鎖付加部位を持つ G 蛋白質と N 型糖鎖付加部位を持たない G 蛋白質を作製した。これらの組換え G 蛋白質を発現させた MNA 細胞における G

蛋白質の細胞内局在を，共焦点レーザー顕微鏡を用いて比較解析し，第 204 位の N 型糖鎖付加の G 蛋白質の細胞内局在に係る役割を解明した。

材料及び方法

細胞

狂犬病ウイルス G 蛋白質の発現には、マウス神経芽細胞腫 (MNA) 細胞を用い、MEM-10% FBS で培養した。

N 型糖鎖付加部位へ変異導入した組換え G 蛋白質発現プラスミドの作製

PrimeSTAR mutagenesis Basal kit (TAKARA) を用いて、pzKyoto-G および pzC26-G の潜在的糖鎖付加部位への変異導入を行った (表 2-2, 図 2-1)。25 μ l の 2 x PrimeSTAR Max Premix と、1 μ l のフォワードおよびリバースプライマー (10 pmol / μ l) (表 2-3)、50~100 pg / μ l に希釈した鋳型プラスミドを混合し、蒸留水を加えて 50 μ l の反応液を調製し、以下の条件で PCR を行った。98°C・2 分の熱変性の後、98°C・10 秒の熱変性と 55°C・15 秒のアニーリング、72°C・35 秒の伸長反応を 30 サイクル繰り返し、さらに 98°C・10 秒、55°C・15 秒、72°C・10 分の反応を行った。

2 μ l の PCR 産物を、25 μ l の Competent high DH5 α (TOYOBO) と混合し、氷上に 20 分置いた後、42°C で 45 秒間加熱し、氷上に戻した。SOC 培地 (Invitrogen) を 250 μ l 加えて 80 rpm で振盪しながら 37°C で 1 時間培養し、アンピシリン加 LB 寒天培地に播きこみ、37°C で一晩培養しコロニーを形成させた。シングルコロニーを 5 ml のアンピシリン加 LB 培地に懸濁して 37°C で一晩培養し、Quicklyse Miniprep kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。

変異導入の確認は遺伝子配列を決定して確認した。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行

った。EDTA 溶液とエタノールを反応させて沈殿させ、精製したシーケンス反応産物に 15 μ l のホルムアミドを加えて溶解し、95°C・2 分で熱変性させた後、Genetic Analyzer 3130 (Applied biosystems) を用いて解析した。

プラスミドをトランスフェクションした DH5 α を、50 ml のアンピシリン加 LB 培地 (MERCK) に懸濁して 37°C で一晩培養し、Nucleobond Xtra Midi (MACHEREY NAGEL) を用いてプラスミドを抽出した。

上記の手順で、変異導入 G 蛋白質の cDNA を挿入したプラスミド、pzKyoto-G(S204N), pzC26-G(N204S), pzC26-G(N37S), pzC26-G(N319Q), pzC26-G(N204S,N319Q), pzC26-G(N37S,N204S,N319Q) を作製した。これらにより表 2-2 及び図 2-1 に示す変異導入 G 蛋白質が発現される。プラスミド液の濃度は ND-100 (Nanodrop Technologies., Wilmington, DE, USA) で測定し、無血清 MEM で 1 μ g / 100 μ l に調製してトランスフェクションに用いた。

トランスフェクション

6 穴プレートまたは CELLview 4 分画ガラスボトムシャーレ (Greiner Bio-One) に 1.0×10^5 / ml の濃度に懸濁した MNA 細胞を、2 ml / well (6 穴プレート) または 500 μ l / 分画 (4 分画ガラスボトムシャーレ) で播きこみ、シャーレ底面の 80% を細胞が占める様に一晩培養した。プラスミド液を無血清 MEM で 1 μ g / 100 μ l に希釈し、希釈プラスミド液 100 μ l あたり 3 μ l の TransIT Neural transfection reagent (Mirus) と混合し、30 分静置した。混合液を 6 well プレートの細胞には 200 μ l / well ずつ、4 分画ガラスボトムシャーレの細胞には 50 μ l / 分画ずつ添加した。37°C, 5%CO₂ 下で 48 時間培養した後、それぞれウェスタンブロッティングと IFA により発現した G 蛋白質を

解析した。

ツニカマイシン添加による糖鎖付加阻害

MNA 細胞にプラスミドをトランスフェクションして、37°C、5% CO₂ 下で 4 時間培養した後に、培地を取り除き、1 μg / ml のツニカマイシン (SIGMA) を含む培地に交換した。その後再び 37°C、5%CO₂ 下で培養し、トランスフェクション後 48 時間培養した後、ウェスタンブロッティングと IFA により発現した G 蛋白質を解析した。

PNGase F による脱糖鎖

N 型糖鎖の N-アセチルグルコサミン残基とアスパラギン残基間を切断する Peptide-N-Glycosylase F (PNGase F) により G 蛋白質の N 型糖鎖を除去した。以下に示す方法で調製した細胞溶解液に、1 μl の 5% SDS と、1 μl の dithiothreitol (DTT) (Wako) (1 M) を加え、95°C で 5 分熱処理した後、急冷した。さらに、2 μl のリン酸緩衝液 (0.5 M・pH 7.5)、2 μl の 10% Triton X-100、2 μl の recombinant PNGase F (Promega) を加え、37°C で 3 時間反応させたものをサンプルとして SDS-PAGE とウェスタンブロッティングにより解析した。

ウェスタンブロッティング

プラスミドをトランスフェクションし、48 時間培養した 6 穴プレートの MNA 細胞から上清を取り除き、PBS で 3 回洗った後、Lysis buffer [50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.01% (vol/vol) Tween-20, 1% (vol/vol) Triton X-100] を加え、氷上で 1 時間反応させて細胞を溶解した。そ

の後 4°C・12000 x g で 30 分遠心し、上清を細胞溶解液として回収した (24)。

2.5 μ l の NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen) と、1 μ l の NuPAGE sample reducing agent (Invitrogen)、5 μ l の細胞溶解液を混合し、蒸留水を加えて 10 μ l の反応液を調製し、70°C で 10 分反応させた。NuPAGE MOPS SDS running buffer (Invitrogen) を調製し、上流バッファーのみに NuPAGE Antioxidant (Invitrogen) を 250 μ l / 100 ml になるよう添加した。NuPAGE Novex 8% Bis-Tris Midi protein Gels, 26 well (Invitrogen) に、反応液を 10 μ l / well 添加し、200V, 500mA, 50W で 40 分間、電気泳動を行った。

PVDF membrane (Immobilon-P Transfer Membrane., MILLIPORE, MA, USA) をメタノールに 5 分浸し、蒸留水に 10 分浸したのち、調製した NuPAGE transfer buffer (Invitrogen) に浸した。Transfer buffer に浸したろ紙に、泳動後のゲルとメンブレンを挟み、Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) にセットし、20V, 100mA, 20W で 30 分間電流を流し、セミドライブロットティングによる転写を行った。

スキムミルク (Difco, BD., Franklin Lakes, NJ, USA) を PBS で 50 倍に希釈し、転写したメンブレンを浸して振盪しながら室温で 1 時間又は 4 °C で一晩反応させ、ブロッキングを行った。

PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) で希釈した 1%スキムミルクで抗狂犬病ウイルス G 蛋白質マウスモノクローナル抗体 7-1-9 を 4 μ g / ml に希釈し、一次抗体液としてメンブレンを浸して振盪しながら 4°C で一晩反応させた。PBS-T にメンブレンを浸し、室温で振盪しながら 5 分 x 4 回メンブレンを洗浄した。Monoclonal mouse anti-rabbit glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (HyTest Ltd., Turku, Finland) を 1%スキムミルク / PBS-T で 5,000 倍 (0.2 μ g / ml) に希釈し、一次抗体液として、メンブレンを浸して振

盪しながら室温で 30 分反応させ、PBS-T で 5 分 x 4 回洗った。HRP 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate) (Thermo Fisher scientific) を 1%スキムミルク/ PBS-T で 5,000 倍に希釈し、二次抗体液としてメンブレンを浸し、室温で 30 分反応させた後、PBS-T で 4 回洗った。ECL prime Western Blotting Detection Reagent substrate solution (GE Healthcare., Little Chalfont, UK) を用いて化学発光させ、シグナルを Varsa Doc (Bio-Rad) で検出し、撮影した。

間接蛍光抗体法 (IFA)

プラスミドをトランスフェクションし、48 時間培養した 4 分画ガラスボトムシャーレの MNA 細胞から上清を除去し、10%中性緩衝ホルマリン (Wako) を 1 ml / 分画加え、室温で 30 分反応させ、細胞を固定した。PBS で細胞を 3 回洗浄した後、PBS で 0.02%に希釈した Triton X-100 (SIGMA) を 500 μ l / 分画加え、5 分反応させ、細胞膜の透過処理を行った。PBS で細胞を 3 回洗浄後、一次抗体として PBS で 4 μ g / ml に希釈した抗 G モノクローナル抗体 7-1-9 を 100 μ l / 分画加え、室温で 1 時間反応させた。PBS で細胞を 3 回洗浄後、二次抗体として FITC-Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen) を PBS で 1:50 に希釈し、DAPI (0.1 %), 小胞体マーカーである ER-ID RED Dye (Enzo Life Sciences, Inc., NY, USA) (1 μ g / ml) を添加して細胞に 100 μ l / 分画加え、室温で 30 分反応させた。PBS で 3 回洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV-1000 ; Olympus) で観察した。

結果

G 蛋白質単独発現細胞における G 蛋白質の分布

Kyoto 株および CVS-26 株の G 蛋白質を発現するプラスミドをトランスフェクションして、それぞれの G 蛋白質を一過性に発現させた MNA 細胞において、Kyoto 株由来の組換え G 蛋白質(Kyoto rG)は、細胞質内のみに分布し、CVS-26 株由来の組換え G 蛋白質 (CVS-26 rG) は、細胞質内だけでなく細胞膜にも多く分布していた (図 2-2)。

また、Kyoto rG 発現細胞では、Kyoto rG が小胞体に局在することが明らかとなった。同様に、CVS-26 rG 発現細胞においても、細胞内に分布している G 蛋白質は、小胞体に局在した (図 2-3)。

Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質の N 型糖鎖修飾

MNA 細胞に発現させた Kyoto rG は、ウェスタンブロッティング解析で CVS-26 rG よりも移動度が早く、Kyoto rG の方が CVS-26 rG よりも分子量が小さいことが示された (図 2-4, 2-5)。一方、Kyoto rG と CVS-26 rG を MNA 細胞で発現させる際にツニカマイシンを添加すると、Kyoto rG と CVS-26 rG は、ほぼ同じ分子量を示した (図 2-4)。さらに、MNA 細胞に発現させた Kyoto rG と CVS-26 rG を PNGase F で酵素処理したところ、両者はほぼ同じ分子量を示した (図 2-5)。これらの結果から、Kyoto rG よりも CVS-26 rG の方に多くの N 型糖鎖が付加されていることが明らかとなった。

ツニカマイシンによる糖鎖付加阻害が組換え G 蛋白質の細胞内分布に与える影響

ツニカマイシンを培地に添加した状態で MNA 細胞に Kyoto 株および CVS-26 株の組換え G 蛋白質を発現させ、IFA で検出し、その分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、ツニカマイシン添加の有無に関わらず、Kyoto rG は核周囲の小胞体に局在しており、細胞膜への分布は認められなかった。一方、CVS-26 rG は、ツニカマイシンを添加しなかったときは多くが細胞膜へ分布したが、ツニカマイシンを添加すると、核周囲の小胞体に局在するようになった (図 2-6)。

第 204 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入が組換え G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響

Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質遺伝子の配列をもとに、アミノ酸配列を確認したところ、Kyoto 株 G 蛋白質は、第 37 位アミノ酸と、第 319 位アミノ酸の 2 か所が潜在的な N 型糖鎖付加部位であるのに対し、CVS-26 株 G 蛋白質では、第 37 位アミノ酸と、第 319 位アミノ酸に加え、第 204 位アミノ酸が潜在的な N 型糖鎖付加部位 (Asn-Lys-Thr) であった。Kyoto 株 G 蛋白質では、第 204 位アミノ酸はセリンで潜在的 N 型糖鎖付加部位ではなかった (Ser-Lys-Thr) (表 2-1)。National Center for Biotechnology Information のデータベースを利用して、他の街上毒の G 蛋白質のアミノ酸配列を調べたところ、第 204 位アミノ酸が潜在的 N 型糖鎖付加部位である街上毒の株は存在しなかった (表 2-1)。

Kyoto 株の G 蛋白質には存在せず、CVS-26 株の G 蛋白質に存在する第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が、G 蛋白質の細胞内局在を規定しているかを検討するために、Kyoto 株由来の G 蛋白質の第 204 位アミノ酸をセリンからアスパラギンに変異を導入し、N 型糖鎖付加配列を導入した組換え G 蛋白質 [Kyoto rG (S204N)] と、CVS-26 株由来の G 蛋白質の第 204 位アミノ酸をアスパラ

ギンからセリンに変異を導入し、糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [CVS-26 rG (N204S)] を MNA 細胞に発現させた。ウェスタンブロッティングでこれらの変異導入 G 蛋白質の分子量を、それぞれ Kyoto rG および CVS-26 rG と比較した結果、Kyoto rG (S204N) は、Kyoto rG よりも分子量の大きなバンドと、Kyoto rG とほぼ同じ分子量のバンドに分かれた。CVS-26 rG (N204S) は、Kyoto rG と同程度の分子量のバンドと、CVS-26 rG と同程度の分子量のバンドに分かれた (図 2-7)。

Kyoto rG , Kyoto rG (S204N), CVS-26 rG , CVS-26 rG (N204S) の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡で調べた結果、Kyoto rG (S204N) は、Kyoto rG では認められなかった細胞膜への分布が認められた。一方、CVS-26 rG(S204N)は、CVS-26 rG と同様に細胞膜への分布が依然認められたものの、細胞質内では Kyoto rG と同様に核周囲に多くの G 蛋白質の分布が見られるようになった (図 2-8)。

第 37 位と第 319 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入が CVS-26 株 G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響

CVS-26 株 G 蛋白質の第 37 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が G 蛋白質の細胞内局在を規定しているかを明らかにするために、第 37 位アミノ酸をアスパラギンからセリンへ変異させ N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [CVS-26 rG (N37S)] と第 319 位アミノ酸をアスパラギンからグルタミンに変異させ N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [CVS-26 rG (N319Q)] を MNA 細胞に発現させた。ウェスタンブロッティングでこれらの変異導入 G 蛋白質の分子量を、それぞれ Kyoto rG 及び CVS-26 rG と比較した結果、CVS-26 rG (N37S) は、CVS-26 rG と同じ分子量であっ

たが、CVS-26 rG (N319Q) は CVS-26 rG よりも分子量が低下していた (図 2-9)。さらに、第 204 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸の N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [CVS-26 rG (N204S,N319Q)] を MNA 細胞に発現させると、ツニカマイシン存在下で発現させた CVS-26 rG と同じ分子量の蛋白質が大部分であったが、それより分子量の大きいバンドが少量認められた (図 2-9)。これらの結果から、CVS-26 株の G 蛋白質の第 37 位の N 型糖鎖付加配列には効率良く N 型糖鎖修飾されていないことが明らかとなった。

これらの変移導入 CVS-26 rG 蛋白質の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べた結果、CVS-26 rG (N37S) と、CVS-26 rG (N319Q) は、細胞膜への分布が認められたが、CVS-26 rG (N319Q) の細胞レベルでの細胞膜への分布は CVS-26 rG と比較して減少していた。CVS-26 rG (N204S,N319Q) も、細胞膜への分布は認められたが、CVS-26 rG (N319Q) と比較すると細胞レベルでの細胞膜への分布はさらに減弱していた。3 か所の潜在的 N 型糖鎖付加部位を完全に欠失させた CVS-26 rG (N37S,N204S,N319Q) は、細胞膜への分布は全く認められなかった (図 2-10)。

考察

狂犬病ウイルスの G 蛋白質を単独で MNA 細胞に発現させた場合でも, Kyoto 株と CVS-26 株を MNA 細胞に感染させた場合と同様に, Kyoto 株由来の rG 蛋白質は細胞膜に分布せず小胞体に局在したが, CVS-26 株由来の rG 蛋白質は細胞膜に分布した (図 2-2)。この結果は, Kyoto 株の G 蛋白質と CVS-26 株の G 蛋白質の間に存在するアミノ酸配列や立体構造, 糖鎖修飾などの違いが G 蛋白質の細胞内分布や感染性ウイルス粒子形成部位およびその産生量の決定に関わっていることを示唆した第一章で得られた実験成績を支持するものであった。

Kyoto rG 発現 MNA 細胞では, G 蛋白質と小胞体の共染色から Kyoto rG は小胞体に局在することが明らかになった (図 2-3)。一方, CVS-26 rG 発現 MNA 細胞では, CVS-26 rG の多くは細胞膜に分布するが, 細胞内に分布する CVS-26 rG は小胞体に局在することが明らかになった (図 2-3)。このことから, 粗面小胞体で G 蛋白質が合成された後, Kyoto rG が小胞体に留まるのに対して, CVS-26 rG は細胞内の糖蛋白質輸送経路を利用して, ゴルジ体を経由して細胞膜に輸送されることが示唆された。第一章で, CVS-26 株の G 蛋白質の遺伝子を Kyoto 株の G 遺伝子に入れ替えた組換え狂犬病ウイルスを感染させた MNA 細胞では, 細胞内の核周辺部で G 蛋白質と N 蛋白質が共局在し, 感染性ウイルスの多くが細胞内に留まるようになることを明らかにしたが, 第二章で得られた実験成績と併せて考察すると, 街上毒と固定毒の G 蛋白質の性状によりその細胞内局在が規定され, G 蛋白質が局在する部位でウイルス粒子形成が起きることが強く示唆された。即ち, G 蛋白質がウイルスの出芽部位決定に深くかかわると考えられる。このことは, 固定毒のウイルス粒子が細胞膜から主に出芽するのに対して, 街上毒のウイルス粒子は細胞膜からはほとんど出芽せず,

小胞体やゴルジ体などの細胞内小器官の膜から細胞質内に出芽する現象をよく説明する (12, 33, 34, 37)。

一般的な街上毒と固定毒の G 蛋白質に特徴的な性状として、潜在的 N 型糖鎖付加部位の数が異なることが挙げられ、街上毒では 1~2 か所であるのに対し固定毒では 3~4 か所である (表 2-1) (36, 39, 49, 63, 64)。Kyoto 株の G 蛋白質では第 37 位と第 319 位のアミノ酸が潜在的 N 型糖鎖付加部位であるが、CVS-26 株の G 蛋白質では、第 37 位と第 319 位の他に、第 204 位アミノ酸が N 型糖鎖付加部位である (表 2-1)。そこで、G 蛋白質の細胞内局在に G 蛋白質への N 型糖鎖修飾が関与しているか否かを検討した。

まず、潜在的な N 型糖鎖付加部位への実際の糖鎖付加の有無を確認するために、組換え G 蛋白質発現 MNA 細胞をツニカマイシン処理して N 型糖鎖付加を阻害した場合 (図 2-4) と、組換え G 蛋白質発現 MNA 細胞の溶解液を PNGase F で処理して N 型糖鎖を除去した場合 (図 2-5) の G 蛋白質の分子量の変化を解析した。本来の Kyoto rG の分子量は CVS-26 rG の分子量よりも小さいことから、両者の N 型糖鎖の数が異なると考えられる。一方、ツニカマイシン処理をして Kyoto rG と CVS-26 rG を発現させると、それぞれ本来の G 蛋白質よりも分子量が小さくなり両 G 蛋白質の分子量は等しくなった。また、Kyoto rG および CVS-26 rG 発現 MNA 細胞溶解液を PNGase F で酵素処理すると、ツニカマイシン処理と同様、それぞれ本来の rG よりも分子量が小さくなり、両 G 蛋白質の分子量は等しくなった。これらの結果から、CVS-26 rG 蛋白質は Kyoto rG よりも多くの N 型糖鎖が付加されていることが明らかとなった。

次に、N 型糖鎖付加が G 蛋白質の細胞内局在に与える影響を解析するため、ツニカマイシンを培地に添加して、N 型糖鎖の付加を阻害しながら Kyoto rG と CVS-26 rG を MNA 細胞にそれぞれ発現させた。その結果、Kyoto rG はツ

ニカマイシン処理の有無にかかわらず小胞体へ局在し、細胞膜への分布は認められなかったが、CVS-26 rG ではツニカマイシン未処理で発現させた際には認められた細胞膜への分布が、ツニカマイシン処理により認められなくなり、核周囲の小胞体に局在するようになった (図 2-6)。このことから、G 蛋白質が細胞膜に輸送されるためには、G 蛋白質への糖鎖付加が必要であることが明らかとなった。ツニカマイシン処理や、G 蛋白質遺伝子への変異導入による糖鎖付加の阻害により、G 蛋白質の細胞膜への輸送が阻害されることは、CVS 株や他の固定毒株 (ERA 株) でも報告されており、この結果はそれらの報告と一致するものであった (3, 45)。

Kyoto 株を含む一般的な街上毒の G 蛋白質には、CVS-26 株の G 蛋白質に見られる第 204 位アミノ酸を含む潜在的 N 型糖鎖付加配列がない。そこで、第 204 位アミノ酸を変異させた Kyoto rG と CVS-26 rG を作製し、MNA 細胞に発現させて G 蛋白質の分子量と細胞内分布を調べた。変異を導入した G 蛋白質への糖鎖付加の有無についてはウェスタンブロッティングで変異導入前後の分子量を比較することで確認した (図 2-6)。その結果、第 204 位アミノ酸の N 型糖鎖付加部位のアスパラギンをセリンに変異させた CVS-26 rG (N204S) は、CVS-26 rG よりも分子量が小さくなり、Kyoto rG と同程度の分子量を示すバンドと、CVS-26 rG と同程度の分子量を示す薄いバンドに分かれた。このことから、CVS-26 rG の第 204 位アミノ酸に N 型糖鎖が付加されていたことが示された。一方、第 204 位アミノ酸をセリンからアスパラギンに変異させ潜在的 N 型糖鎖付加部位を導入した Kyoto rG (S204N) では、Kyoto rG と同じ分子量のバンドと、CVS-26-rG と同程度の分子量を示す薄いバンドが検出されたことから、Kyoto rG (S204N) の第 204 位アミノ酸に N 型糖鎖が付加されたものの、その効率は CVS-26 rG の第 204 位アミノ酸への糖鎖付加効率よりも低

いことが示された。狂犬病ウイルスの G 蛋白質の第 204 位アスパラギンへの糖鎖付加効率が低いことについては、これまで他の株 (CVS-11 株, 変異導入 1088 株) でも報告されている (61, 63)。ERA 株や CVS-11 株では, 第 37 位アミノ酸を含む潜在的糖鎖付加部位に, ほとんど N 型糖鎖が付加されなかったという報告がある (39, 45, 58, 61)。また, アミノ酸配列上では N 型糖鎖付加部位であっても, 隣接するアミノ酸によって疎水性が高くなって糖鎖がアクセスしにくい, 蛋白質の立体構造上, 内側に折り込まれているなどの理由で糖鎖が付加されないことがあることも報告されている (39)。これらから, Kyoto 株の G 蛋白質は, CVS-26 株の G 蛋白質と比較して, N 型糖鎖が付加されにくい構造をとると考えられた。

Kyoto rG (S204N) を MNA 細胞に発現させたところ, G 蛋白質の細胞膜への分布が観察されたが, 細胞あたりの細胞膜への分布量は CVS-26 rG と比較して少なかった (図 2-8)。このことから, 第 204 位アミノ酸に N 型糖鎖が付加されることによって G 蛋白質が細胞膜へ輸送されることが示された。Kyoto rG (S204N) の細胞膜への分布効率が低いのは, Kyoto rG(S204N)の一部のみが第 204 位アミノ酸に糖鎖が付加されたことを反映していると考えられる (図 2-7)。

一方, CVS-26 rG(N204S)を発現させた MNA 細胞では, 第 204 位アミノ酸をセリンに変異させて N 型糖鎖付加を阻害しても一部の G 蛋白質の細胞膜への分布が認められた (図 2-8)。このことと, CVS-26 rG(N204S)の大部分は CVS-26 rG よりも分子量が小さくなるものの, 一部は CVS-26 rG と同等の分子量であることから, 第 204 位の糖鎖修飾が阻害されるとほかの潜在的 N 型糖鎖付加部位へ糖鎖が付加される可能性が示唆された。

そこで, CVS-26 rG(N204S)の一部が細胞膜に分布した原因を明らかにする

ために、潜在的 N 型糖鎖付加部位である第 37 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸に変異を導入した種々の CVS-26 株の組換え G 蛋白質を MNA 細胞に発現させて、第 204 位アミノ酸以外の潜在的 N 型糖鎖付加部位への糖鎖付加が CVS-26 株の G 蛋白質の細胞膜への分布に与える影響を解析した (図 2-1)。CVS-26 株の G 蛋白質の潜在的糖鎖付加部位である第 37 位、第 204 位、第 319 位アミノ酸残基それぞれに変異を導入した組換え G 蛋白質と、第 204 位と第 319 位の 2 か所に変異を導入した組換え G 蛋白質、第 37 位と第 204 位と第 319 位の 3 か所全てに変異を導入した組換え G 蛋白質を MNA 細胞に発現させた結果、第 37 位アミノ酸をアスパラギンからセリンに置換した CVS-26 rG(N37S)の分子量は、CVS-26 rG と比較して変化が見られなかったが、他の変異を導入した G 蛋白質は、どれも CVS-26 rG よりも分子量が小さくなっていた (図 2-9)。これらの結果から、CVS-26 株組換え G 蛋白質の第 37 位アスパラギンには、ほとんど N 型糖鎖が付加されないことが示された。これは、CVS-26 株に近縁な CVS-11 株の第 37 位アスパラギンには N 型糖鎖が付加されないというこれまでの報告と一致する (39, 45, 61)。しかし、第 204 位アスパラギンをセリンに置換して N 型糖鎖付加配列を欠失させた CVS-26 rG (N204S) と第 204 位と第 319 位のアスパラギンをそれぞれセリンとグルタミンに置換して N 型糖鎖付加配列を欠失させた CVS-26 rG (N204S,N319Q) では、糖鎖修飾のない G 蛋白質に相当する分子量と、より大きい分子量の二種類の G 蛋白質が認められたことから、これらの組換え G 蛋白質では、一部の第 37 位アスパラギンに N 型糖鎖が付加されていたことが示唆された (図 2-9)。

これらの組換え G 蛋白質発現 MNA 細胞では、CVS-26 rG(N37S)と CVS-26 rG(N319Q)は細胞膜に分布していた。なお、CVS-26 rG (N319Q) の細胞膜への分布は、CVS-26 rG や CVS-26 rG (N37S) と比較して明らかに低下してい

たことから、第 319 位アスパラギンへの N 型糖鎖付加も、G 蛋白質の細胞膜への分布に関わっていることが示唆された。また、3 か所の N 型糖鎖付加配列を全て欠失させた CVS-26 rG (N37S,N204S,N319Q) は、細胞膜への分布が認められず、核周辺にのみ局在したことから、N 型糖鎖が CVS-26 rG の細胞膜への輸送に必要不可欠であることが示された (図 2-10)。

本章において、街上毒である Kyoto 株由来の G 蛋白質の第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖修飾を導入すると、G 蛋白質が小胞体から細胞膜へ輸送されたことから、この部位の N 型糖鎖は G 蛋白質の細胞膜への輸送に重要な役割を持つことが明らかとなった。

一方、固定毒である CVS-26 株由来の G 蛋白質は、第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加を欠失させても細胞膜への分布が認められた。このことから、CVS-26 株は街上毒から固定毒化される過程で G 蛋白質の第 204 位アミノ酸が N 型糖鎖付加されるような変異を獲得したと考えられるが、これ以外にも G 蛋白質の細胞膜への輸送を促すような変異を獲得したことが示唆された。固定毒 ERA 株の G 蛋白質を用いた実験では、第 37 位の潜在的糖鎖付加部位が、糖鎖付加効率が低くても G 蛋白質の細胞膜への分布に影響を与えることが報告された (45)。また、同じく ERA 株 G 蛋白質を用いた実験で、ある糖鎖付加部位の糖鎖の存在の有無は、同一蛋白質上の他の潜在的糖鎖付加部位の糖鎖に対するシアル酸付加などの修飾には影響を与えるが、糖鎖付加効率には影響を与えないと報告されている (45, 58)。しかし、本研究では、第 204 位アミノ酸への変異導入によって、CVS-26 株 G 蛋白質の第 37 位アミノ酸への糖鎖付加が促進されたことを示唆する結果が得られた。本研究で作製した CVS-26 rG (N204S) については、第 204 位アミノ酸への変異導入によって、G 蛋白質の

立体構造が変わり、第 37 位アミノ酸など他の糖鎖付加部位への糖鎖付加頻度等が上昇したのではないかと考えられた。将来、Kyoto 株の G 蛋白質と CVS-26 株の G 蛋白質について、第 204 位アミノ酸への変異導入による蛋白質の立体構造や糖鎖修飾の変化を詳細に調べることで、固定毒化の機序をさらに究明できると考えられた。

表2-1 街上毒と固定毒のG蛋白質の糖鎖付加部位とアミノ酸配列

ウイルス株	アミノ酸配列 ¹⁾					分離された国	Genbank アクセッション番号
	37-39	158-160	204-206	247-249	319-321		
U932AFG	NLS	KCL	SKT	DET	NKT	Afghanistan	JX987725
Benin.8697BEN/1986	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Benin	FJ545673
BRdg101	NLS	KCS	GKT	DET	NKT	Brazil	AB276308
144BF/2007	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Burkina Faso	EU827276
02006CBG	NLS	KCS	SKT	DEA	NKT	Cambodia	EU886134
Cameroon.8801CAM/1987	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Cameroon	FJ545675
90RABN9196	NLS	KCL	SKT	DET	NKT	Canada	U11758
92R8GL0867	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Canada	AF344307
Chad.9218TCH/1992	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Chad	FJ545683
WJ07-1	NLS	KCS	GKT	DET	NKT	China	EU828658
Chpg3	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	China	AB428309
8684GRO	NLS	KCL	SKT	DET	NKT	Greenland	JX987731
Guinea.9361GUI/1993	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Guinea	FJ545685
SN01-23	NLS	KCL	SKT	DET	NKT	Indonesia	AB115921
96321IRA	NLS	KCL	SKT	DET	NKT	Iran	JX987734
RS10-1954/fox/mar10/Udine	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Italy	KC197915
04033MAD	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Madagascar	DQ420624
Mauritania.9120MAU/1991	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Mauritania	FJ545682
3634DR	NLS	KCL	GKT	DDT	NKT	Mexico	JQ685936
99138IR	NLS	KCS	SKT	DEA	NKT	Myanmar	EU886129
3878-78(11008NEP)	NLS	KCS	GKT	DET	NKT	Nepal	JX944593
247NIG/2007	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Niger	EU827277
Pk 60	NLS	KCL	SKT	DET	NKT	Pakistan	HE801618
RV/R10.PHL/2009/Tra-251	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Philippines	AB564015
9143RUS	NLS	KCL	SKT	DET	NKT	Russia	JX987733
RV1171	NLS	KCS	SKT	DEA	NKT	Serbia	JF973746
479/96	NLS	KCS	GKT	DET	NKT	South Africa	HQ266621
94257SRI	NLS	KCS	GKT	DET	NKT	Sri Lanka	EU886156
TW-1694	NLS	KCS	SKT	DEV	NKT	Taiwan	KF501179
D713d	NLS	KCS	SKT	DEA	NKT	Thailand	HQ232301
rv61	NLS	KCS	GKT	DET	NKT	UK	JQ685981
AK_98091	NLS	KCL	SKT	DET	NKT	USA	KC792188
1888	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	USA	AB645847
01017VNM	NLS	KCS	SKT	DEA	NKT	Viet Nam	EU886160
Kyoto	NLS	KCS	SKT	DET	NKT	Japan	LC009632
BRhm531	NLV	KCS	SKT	DET	NKT	Brazil	AB276314
BR-NL2	SLS	KOM	GKI	DEI	NKT	Brazil	AB383172
raccoon isolate FLA 125	SLS	KCT	GKT	DET	NKT	Canada	U27216
SHBRV	SLS	KCL	GRT	DDI	NNT	North America	U52946
FL1078	SLS	KCL	GKT	DEA	NKT	USA	JQ595327
KS8640	SLS	KCS	GRT	DEI	NKT	USA	KF484540
LAH60	SLS	KCL	GRV	EDI	NKT	USA	JQ686007
NJ1049	SLS	KCL	GRT	GET	NKT	USA	JQ595326
GA31940	SLS	KCL	GRT	NET	NKT	USA	JQ595325
M11251	SLS	KCL	GRT	NET	NKT	USA	JQ595322
A11-3058	SLS	KCL	GRT	NET	NKT	USA	JX871881
A10-6958	SLS	KCL	GRT	NET	NKT	USA	JX871852
CVS-26	NLS	KCS	NKT	DET	NKT		LC009634
CVS-11	NLS	KCS	NKT	DET	NKT		AF085333
CVS-N2c	NLS	KCS	NKT	DET	NKT		AF325714
B2c	NLS	KCS	NKT	DET	NKT		AF042824
ERA	NLS	KCS	SET	NET	NKT		GQ406342
SAD Bern	NLS	KCS	SET	NET	NKT		KC178556
Lysvulpen	NLS	KCS	SET	NET	NKT		KC178555
Nishigahara	NLS	KCS	SKT	NET	NKT		AB044824
RC-HL	NLS	KCS	STT	NET	NKT		AB009663
Ni-CE	NLS	KCS	SKT	NET	NKT		AB128149
CTN	NLS	KCS	SKT	NET	NKT		DQ767897
HEP-Flury	NLS	NCS	DKT	DET	NKT		AB085828
LEP-Flury	NLS	NCS	GKT	DET	NKT		GU565703
PV	NLS	NCS	SET	NET	NKT		M13215

街上毒

固定毒

： 潜在的N型糖鎖付加部位

1)成熟G蛋白質のN末端アミノ酸を1番目として数えたアミノ酸番号を示す

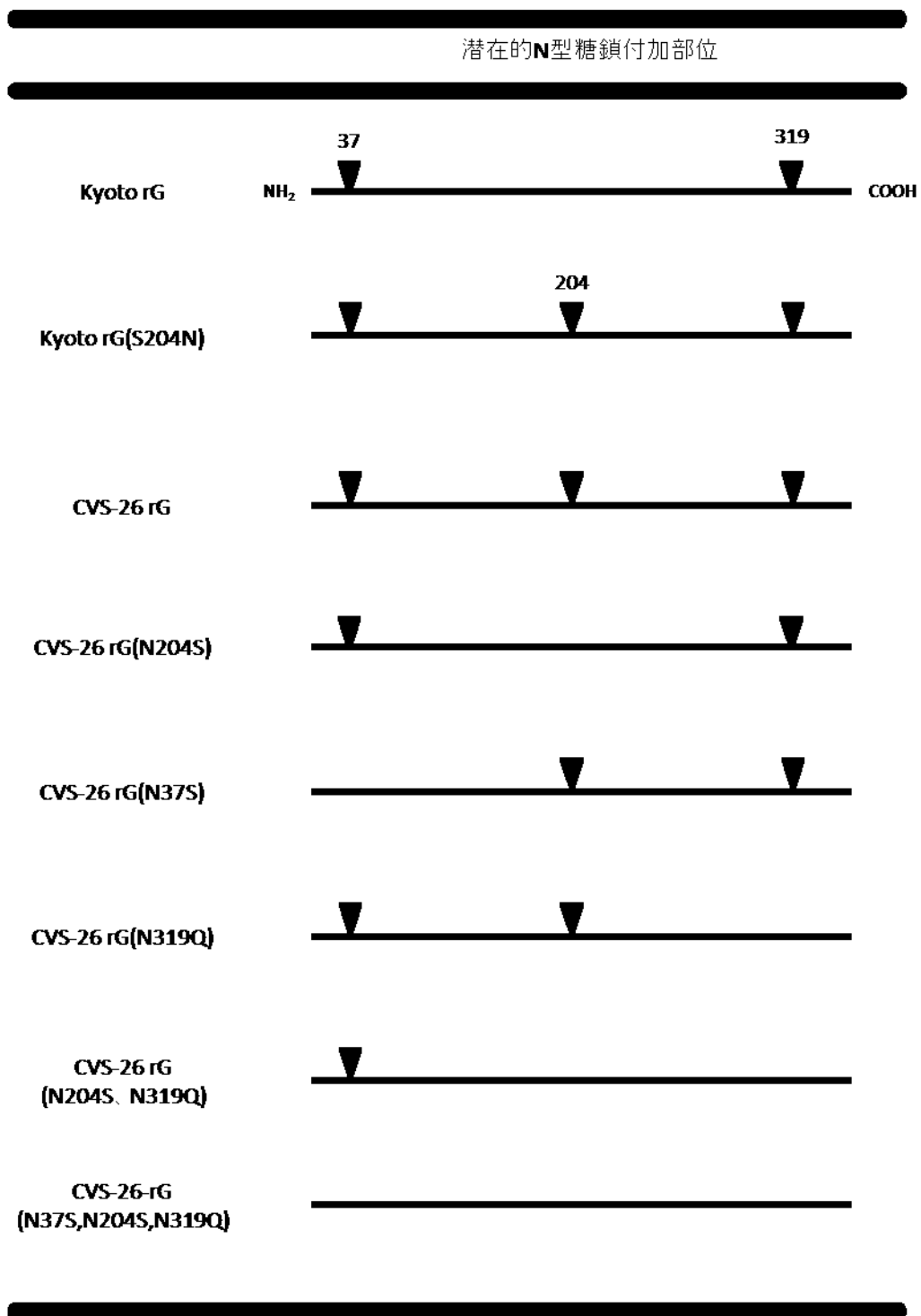
表2-2. G蛋白質糖鎖付加部位への変異導入

	変異導入部位の配列						潜在的糖鎖付加部位 ³⁾
	cDNAの塩基配列 ¹⁾			アミノ酸配列 ²⁾			
	166-174	667-675	1012-1020	37-39	204-207	319-321	
Kyoto rG	3'-AGTAAGACC-5'	3'-AGTAAGACC-5'	3'-AATAAGACC-5'	NLS	SKT	NKT	37位, 319位
Kyoto rG(S204N)	3'-AGTAAGACC-5'	3'- <u>AACAAGACT</u> -5'	3'-AATAAGACC-5'	NLS	<u>NKT</u>	NKT	37位, 204位, 319位
CVS-26 rG	3'-AACCTGTCC-5'	3'-AACAAGACT-5'	3'-AACAAAACC-5'	NLS	NKT	NKT	37位, 204位, 319位
CVS-26 rG(N204S)	3'-AACCTGTCC-5'	3'-AG <u>TAAGACC</u> -5'	3'-AACAAAACC-5'	NLS	<u>SKT</u>	NKT	37位, 319位
CVS-26 rG(N37S)	3'-AG <u>CCTGTCC</u> -5'	3'-AACAAGACT-5'	3'-AACAAAACC-5'	<u>SLS</u>	NKT	NKT	204位, 319位
CVS-26 rG(N319Q)	3'-AACCTGTCC-5'	3'-AACAAGACT-5'	3'- <u>CAAAAACC</u> -5'	NLS	NKT	<u>QKT</u>	37位, 204位
CVS-26 rG (N204S, N319Q)	3'-AACCTGTCC-5'	3'-AG <u>TAAGACC</u> -5'	3'- <u>CAAAAACC</u> -5'	<u>SLS</u>	<u>SKT</u>	NKT	37位
CVS-26 rG (N37S, N204S, N319Q)	3'-AG <u>CCTGTCC</u> -5'	3'-AG <u>TAAGACC</u> -5'	3'- <u>CAAAAACC</u> -5'	<u>SLS</u>	SKT	<u>QKT</u>	糖鎖付加部位無し

PrimeSTAR mutagenesis basal kit(Takara)に付属のマニュアルに従い、変異を導入した。

1)G蛋白質遺伝子をコードするORFの開始コドンから数えた番号, 2)成熟G蛋白質(SPDメインが切り離されたもの)のN末端アミノ酸を1番とした番号, 3)N型糖鎖付加配列(N-X-SまたはN-X-T(Xはプロリン以外))のアスパラギンの位置。成熟G蛋白質のN末端アミノ酸を1番として数えた番号

図2-1. 組換えG蛋白質の糖鎖付加部位



▼ N型糖鎖付加配列(N-X-SまたはN-X-T(Xはプロリン以外))のアスパラギンの位置。番号は成熟G蛋白質のN末端アミノ酸を1番として数えた。

表2-3. 変異導入用プライマーリスト

プライマー名	プライマー配列
Kyoto-G(S204N)-F	5'- GGGAA <u>CAAGACT</u> TGTGGATTGTAGATGAG-3'
Kyoto-G(S204N)-R	5'- ACAAGTCTT <u>G</u> TCCCTTTGGATGCTCTCT-3'
CVS-26-G(N204S)-F	5'- GGGAGTAAAGAC <u>CT</u> GCGGCTTTGTGGATGAA-3'
CVS-26-G(N204S)-R	5'- GCAGGTCTT <u>ACT</u> CCCCTTTGGATGCTCTCTT-3'
CVS-26-G(N37S)-F	5'-TGTACCAG <u>CCT</u> GTCCGAGTTCTCCTA-3'
CVS-26-G(N37S)-R	5'-GGACAGG <u>C</u> TGGTACATCCTTCATCCT-3'
CVS-26-G(N319Q)-F	5'-ATATTCC <u>AAAAA</u> ACCTTGATGGAGGCT-3'
CVS-26-G(N319Q)-R	5'-GGTTTTT <u>T</u> GGAATATGGTATATGCTTT-3'

すべてPrimeSTAR mutagenesis basal kitに付属のマニュアルに従って設計した。

下線部: 変異導入部位

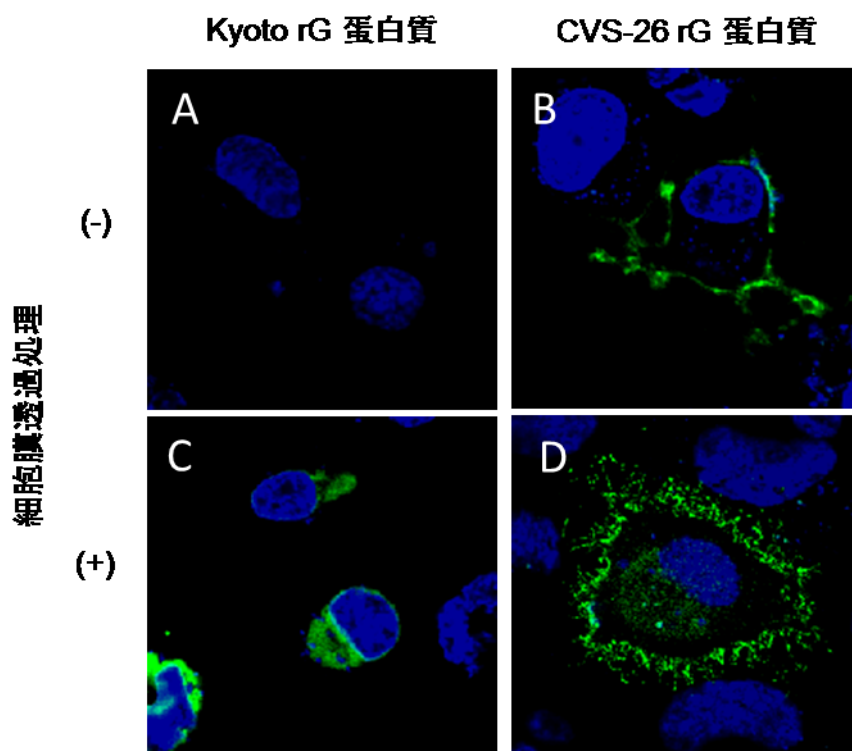


図2-2. 組み換えG蛋白質の細胞内分布

Kyoto株の組み換えG蛋白質発現細胞(A, C)と, CVS-26株の組み換えG蛋白質発現細胞(B, D)を, ホルマリン固定後, 抗Gモノクローナル抗体7-1-9で染色したもの(A, B)と0.2%Triton-X100処理により細胞膜の透過処理を行い(C, D)染色した。対比染色としてDAPIで核を染色した。

緑色蛍光: rG蛋白質 青色蛍光: 核

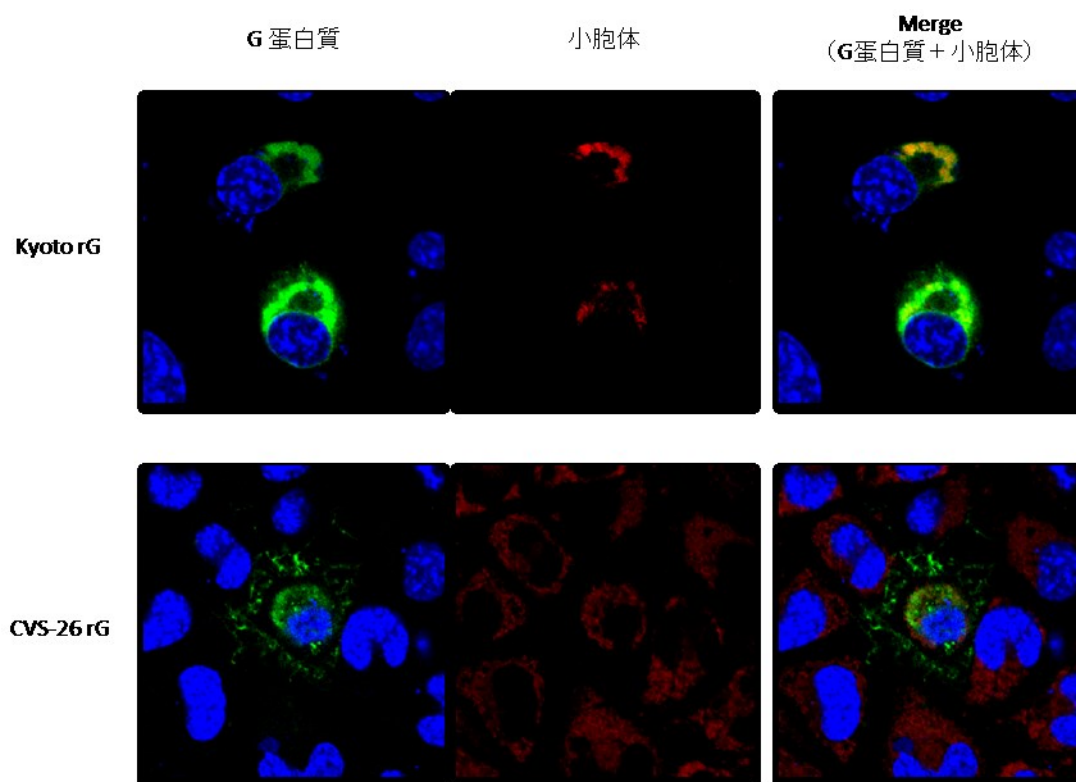


図2-3. G蛋白質と小胞体の共染色

G蛋白質発現プラスミドをMNA細胞にトランスフェクションし、48時間培養した後ホルマリン固定し、Triton X-100による透過処理を行った。その後、抗Gモノクローナル抗体719で染色し、ER-ID Red dyeによる小胞体の染色、DAPIによる核染色により、G蛋白質の局在を調べた。

緑色蛍光: rG蛋白質 赤色蛍光: 小胞体 青色蛍光: 核

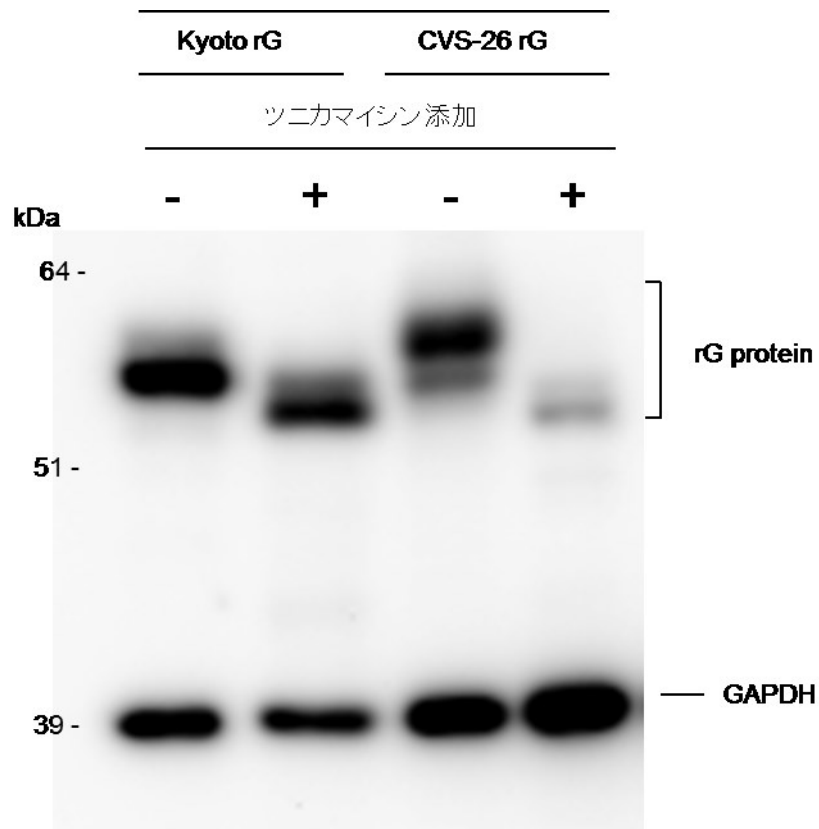


図2-4. ツニカマイシン処理による糖鎖付加阻害が組み換えG蛋白質の分子量に与える影響
 - : ツニカマイシン無添加で培養。+ : ツニカマイシンを添加して培養。
 発現プラスミドをトランスフェクション後48時間培養したMNA細胞の溶解液をウェスタンブロットングで解析した。対照としてGAPDHを検出した。

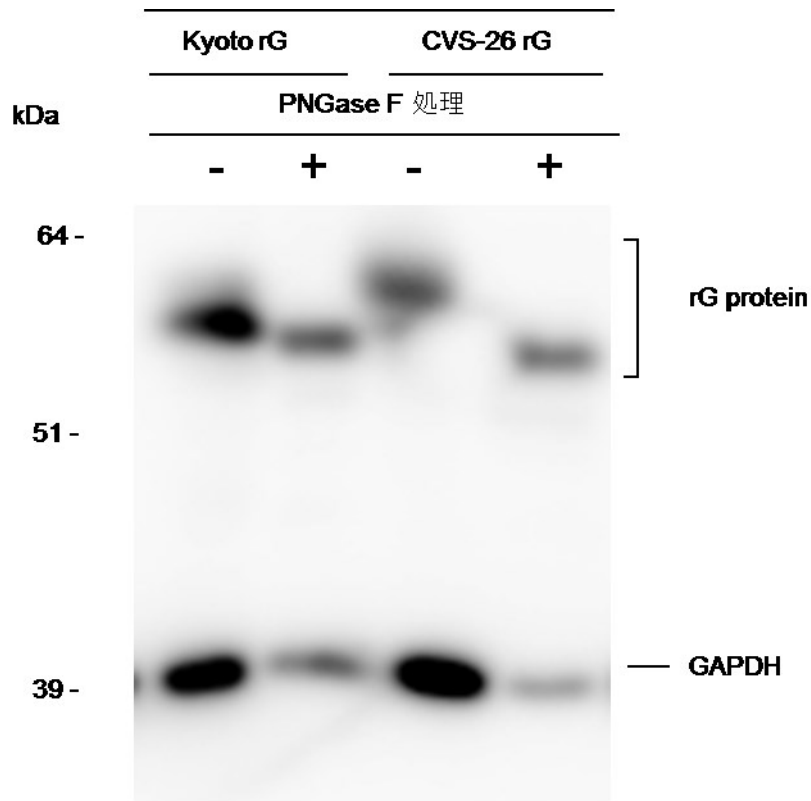


図2-5. PNGase Fによる脱糖鎖がG蛋白質の分子量に与える影響

- : 未処理の細胞溶解液, + : PNGase F処理した細胞溶解液

発現プラスミドをトランスフェクション後48時間培養した細胞を溶解し, PNGase F処理の有無の影響をウェスタンブロットングで解析した。対照としてGAPDHを検出した。

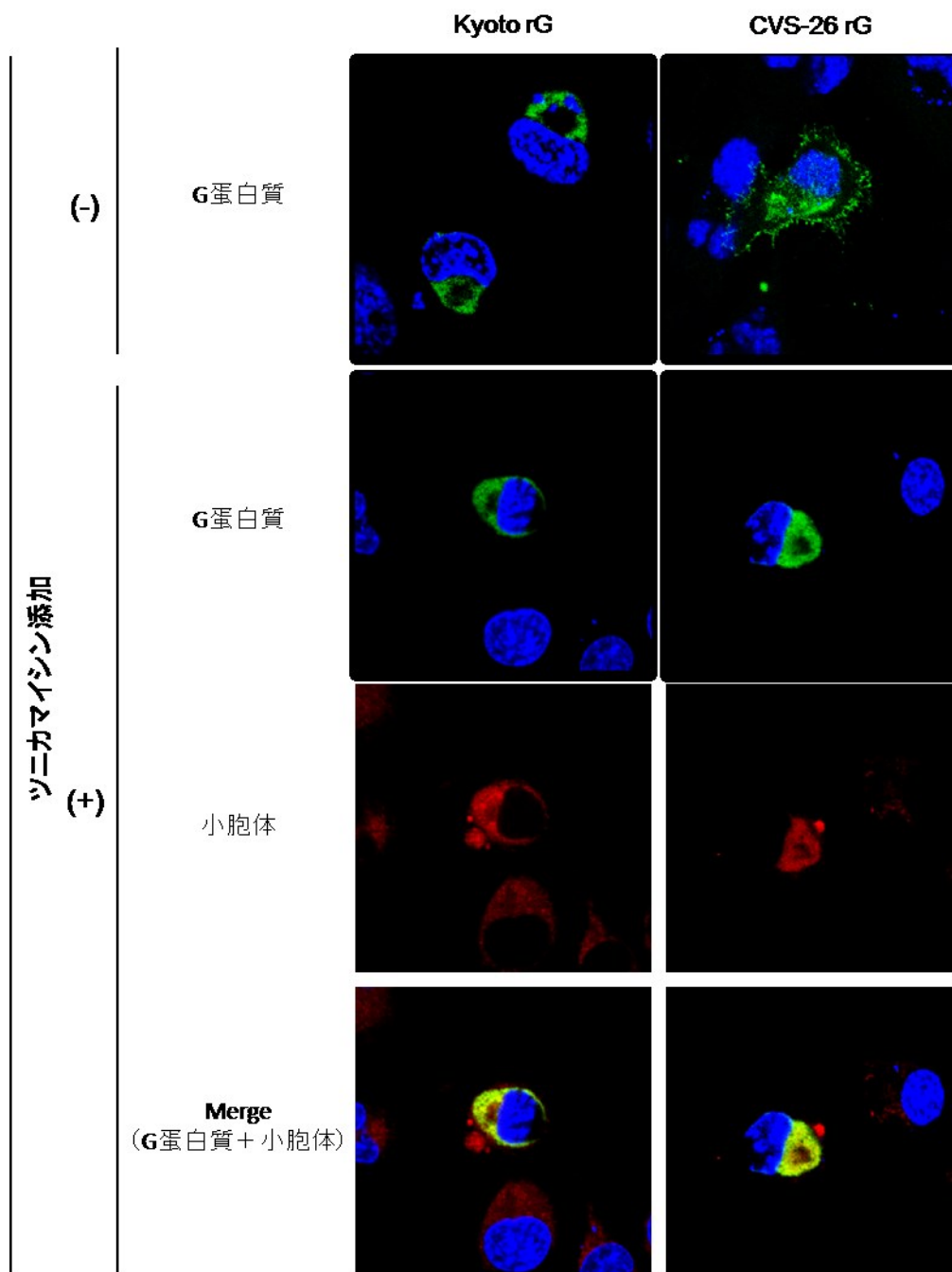


図2-6.ツニカマイシン処理による組換えG蛋白質の細胞内分布への影響
 発現プラスミドをMNA細胞にトランスフェクションし、4時間後にツニカマイシンを添加して、
 44時間培養した後ホルマリン固定、細胞膜の透過処理を行い、G蛋白質の分布をIFAにより
 解析した。対比染色としてDAPIで核を染色した。
 緑色蛍光:G蛋白質 赤色蛍光:小胞体 青色蛍光:核

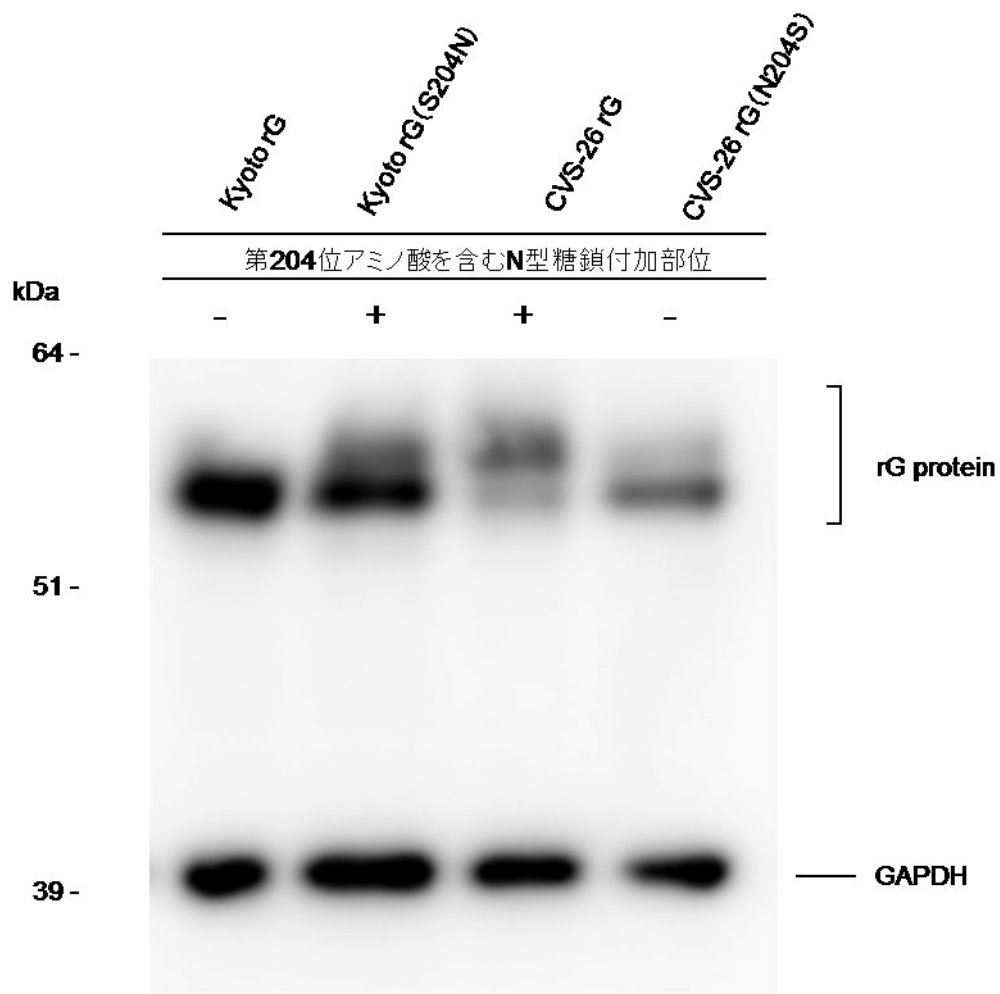


図2-7. 第204位アミノ酸に変異導入した組換えG蛋白質の分子量の変動
 Kyoto株, CVS-26株の第204位アミノ酸に変異導入してN型糖鎖付加部位を導入あるいは欠失したG蛋白質の分子量をウェスタンブロットングで解析した。

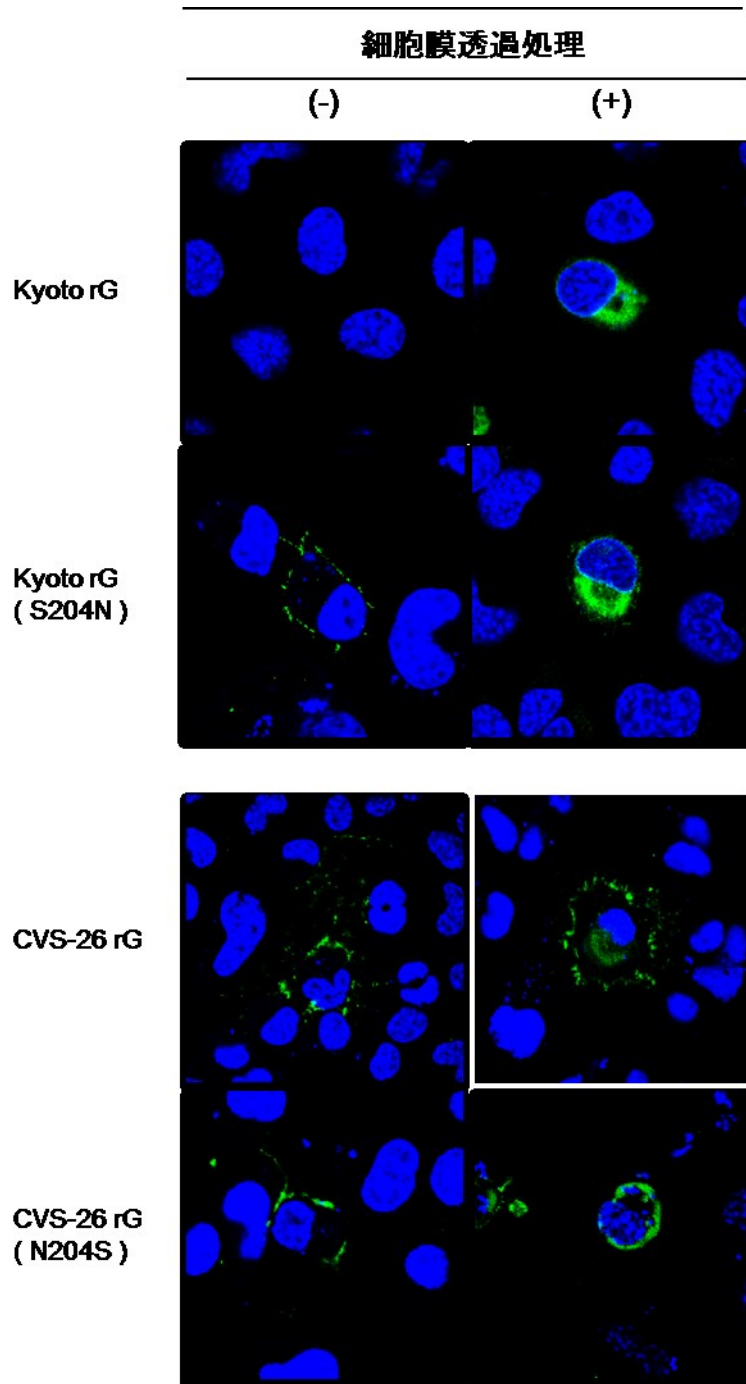


図2-8. 第204位のアミノ酸に変異導入した組換えG蛋白質の細胞内分布
 発現プラスミドをトランスフェクションして48時間後の細胞をホルマリン固定し、膜透過処理を行いG蛋白質の分布をIFAで解析した。対比染色としてDAPIで核を染色した。
 緑色蛍光: G蛋白質 青色蛍光: 核

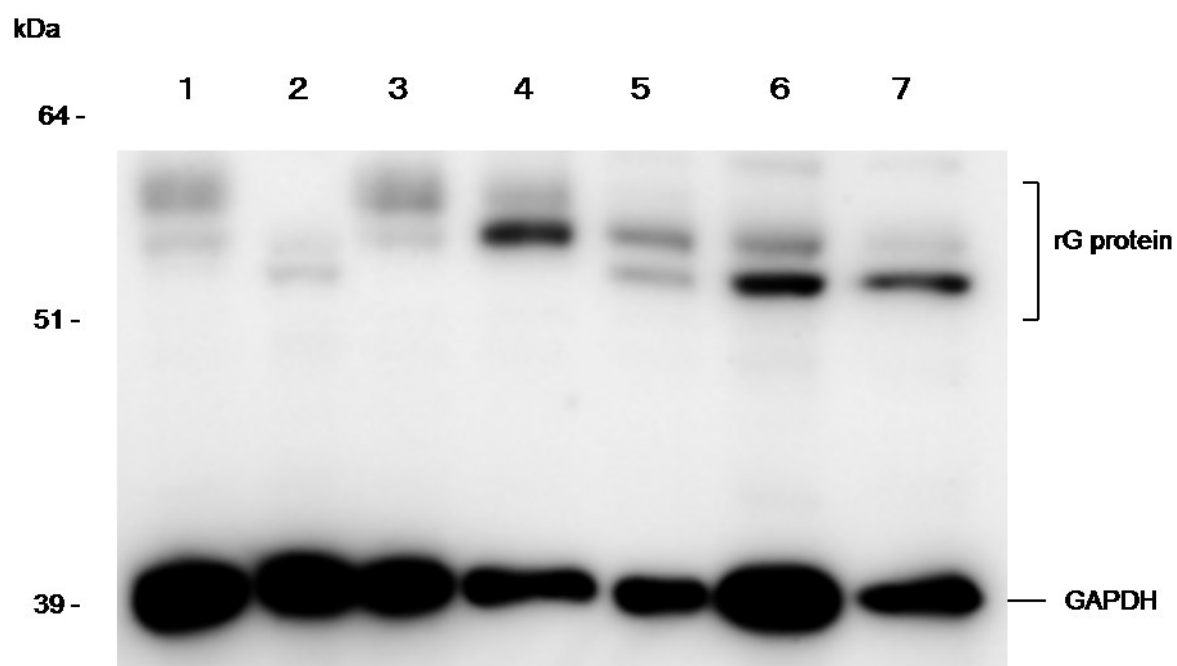


図2-9. CVS-26株の37位, 319位アミノ酸に変異導入したG蛋白質の分子量の変動
 1: CVS-26 rG 2: CVS-26 rG(ツニカマイシン添加) 3: CVS-26 rG(N37S) 4: CVS-26 rG(N204S) 5: CVS26 rG(N319Q) 6: CVS-26 rG(N204S, N319Q) 7: C26 rG(N37S, N204S, N319Q)
 MNA細胞にrG蛋白質を発現させてウェスタンブロッティングによりG蛋白質を検出した。

細胞膜透過処理

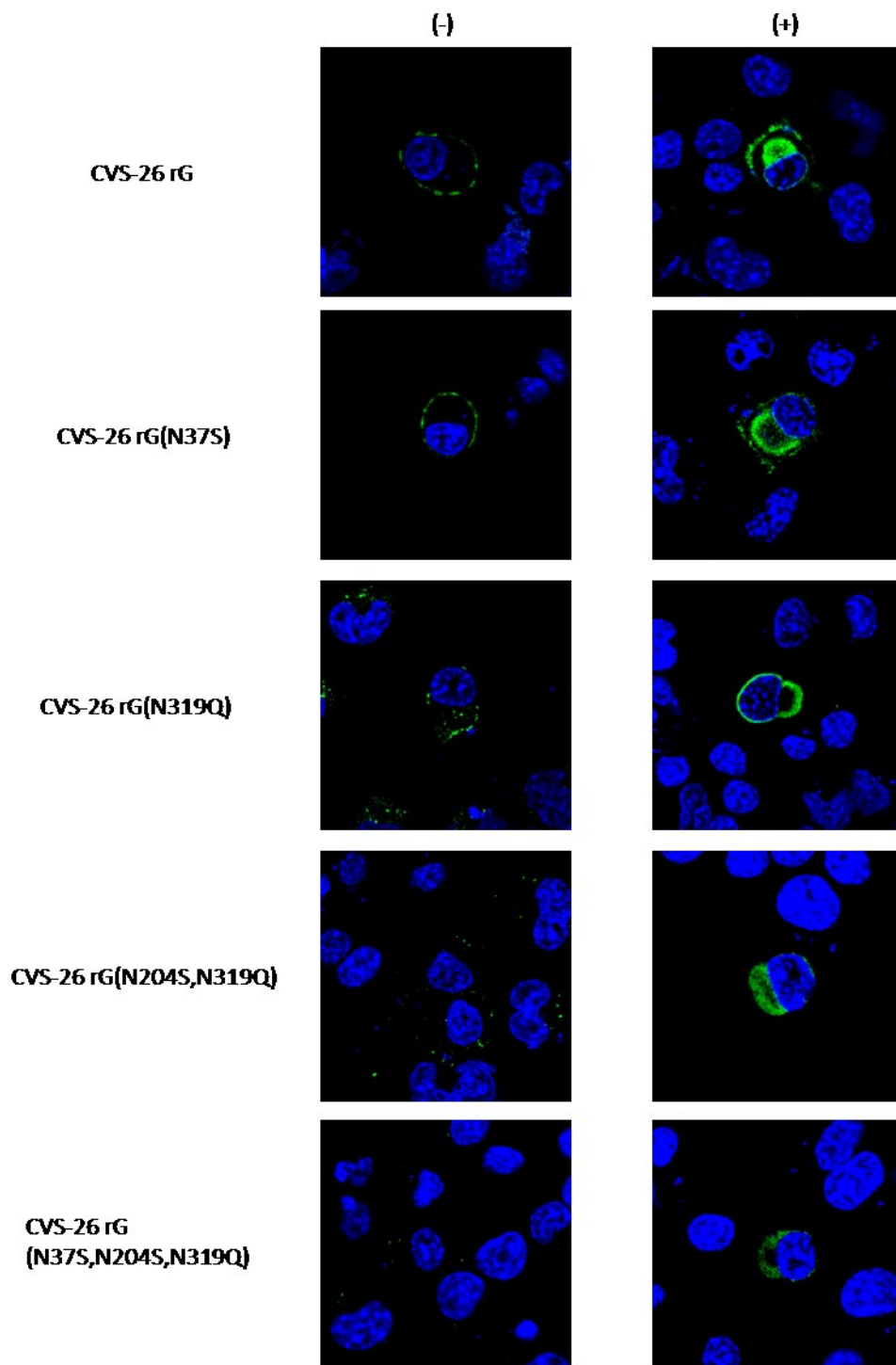


図2-10. 第37位, 第319位のアミノ酸に変異導入したCVS-26株の組換えG蛋白質の細胞内分布
 発現プラスミドをトランスフェクションして48時間後の細胞をホルマリン固定し, 膜透過処理してG蛋白質の
 細胞内分布をIFAにより解析した。対比染色としてDAPIで核を染色した。
 緑色蛍光: G蛋白質 青色蛍光: 核

第三章

第 204 位アミノ酸に N 型糖鎖付加された
Kyoto 株（街上毒）の G 蛋白質発現により
発現レベルが変動する細胞遺伝子の検索

序論

第一章, 第二章において, 街上毒である Kyoto 株由来の G 蛋白質が感染細胞の核周囲にある小胞体にのみ局在するのに対して, 固定毒である CVS-26 株由来の G 蛋白質が感染細胞の細胞膜にも分布することを見出し, Kyoto 株 G 蛋白質に第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加配列を挿入することで G 蛋白質が細胞膜に分布するようになることを発見した。G 蛋白質の第 204 位アミノ酸のアスパラギンに N 型糖鎖が付加されたことで, G 蛋白質を小胞体膜およびゴルジ体から細胞膜に運ぶ細胞内輸送経路が活性化されたのではないかと考えられた。

また, 狂犬病ウイルスは固定毒化により抗原性が増強し, かつ, G 蛋白質が免疫誘導やアポトーシス誘導に深く関わるということが指摘されている。このことから, 糖鎖修飾の異なる G 蛋白質を発現させた細胞内における蛋白質輸送, ウイルスの出芽, ウイルス複製, 免疫応答に関与する遺伝子群の活性化状態を比較解析することで, 固定毒化の過程で獲得したと考えられる第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が感染細胞に及ぼす影響の解析につながり, 街上毒の固定毒化により得られたウイルスの性状を解明できる可能性が考えられた。(11, 13, 26, 41, 55, 66)。

そこで, 第三章では, 街上毒の Kyoto 株と固定毒の CVS-26 株の組換え G 蛋白質およびそれぞれの第 204 位アミノ酸の N 型糖鎖付加配列の有無によって細胞の mRNA の発現が有意に変化する遺伝子群があるか否かを DNA マイクロアレイによって解析した。

材料及び方法

細胞

MNA 細胞を, MEM-10% FBS で培養し, トランスフェクションに用いた。

トランスフェクション

24 穴プレート (Iwaki) に MNA 細胞を 5.0×10^4 cell / well で播きこみ, 底面の 80% を細胞が占めるように一晩培養した。pzC26-G, pzKyoto-G, pzC26-G (N204S), pzKyoto-G (S204N) のプラスミド液を無血清 MEM で $1 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$ に希釈し, 希釈プラスミド液 $100 \mu\text{l}$ あたり $3 \mu\text{l}$ の TransIT Neural transfection reagent (Mirus) と混合し, 30 分静置した後, $50 \mu\text{l} / \text{well}$ ずつ添加し, 48 時間培養した。それぞれのプラスミドを 4 well にトランスフェクションし, それぞれをマイクロアレイで解析した。

マイクロアレイ解析

狂犬病ウイルス Kyoto 株およびその第 204 位に変異導入した G 蛋白質が発現する細胞において, 有意に発現量に変動がある細胞遺伝子を検出するために, それぞれの G 蛋白質を発現する細胞由来 RNA のプロファイルをマイクロアレイにより解析した。

pzKyoto-G および pzKyoto-G (S204N) プラスミドをトランスフェクションした MNA 細胞から, RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を精製し, 得られた total RNA は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Foster city, CA, USA) と Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) を用いて品質を測定した。高品質 (RNA Integrity Number が 7 以上) な Total

RNA であることが確認されたサンプルについて、マイクロアレイ解析に使用した。150 ng の Total RNA は Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent) を用いて cDNA に逆転写し、cRNA 増幅および Cy3 標識を行った。得られた Cy3 標識 cRNA は RNeasy mini kit (QIAGEN) で精製後、RNA 濃度と Cy3 濃度を Spectrophotometer ND-100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) で測定し、Cy3 取り込み率を算出し、6pmol / μ g 以上であることを確認した。その後、600 ng の標識 cRNA を Fragmentation Buffer で 60°C, 30 分で断片化し、SurePrint G3 Mouse GE Microarray 60k probes \times 4 arrays/ slide (Agilent) に 65°C, 17 時間ハイブリダイズさせた。マイクロアレイスライドは、Wash Solution 1, Wash Solution 2 (Agilent) で洗浄後、マイクロアレイスキャナ (Agilent) で Cy3 の蛍光イメージを取得した。pzKyoto-G および pzKyoto-G(S204N) をトランスフェクションした 2 軍の細胞それぞれ 4 サンプルから得られた各イメージファイルは Feature Extraction software ver.11 (Agilent) で解析し、6 万種の細胞由来遺伝子の発現強度が記載されたテキストファイルを得た。

Feature Extraction software より出力したテキストファイルを GeneSpring GX 12 (Agilent) に取り込み、以下の 2 段階を踏んでデータの Normalization (正規化) を行った。①Per Chip Normalization : マイクロアレイ間のシグナル強度の系統的な誤差を補正し生物学的な変動を抽出する為に、サンプル毎に 6 万プローブの中で 75 percentile の蛍光を保持するプローブ蛍光強度を 1 に変換し、その他のプローブは相対値に変換した。②Per Gene Normalization : 各プローブ蛍光強度の 2 群の細胞計 8 つのサンプル間の値の中から中央値を 1 に変換後、その他のプローブ蛍光強度は相対値で示した。

GeneSpring を用いて正規化した計 8 サンプルのデータは、プローブ名と遺

伝子名を関連付けた後、pzKyoto-G 群 (N=4) および pzKyoto-G (S204N) 群 (N=4) の 2 群に分類した。有意に発現レベルの変動した遺伝子を選定する前に、2 群中 1 群で確実に遺伝子発現が確認された遺伝子の抽出、および生データにおいて 2 群中 1 群で 10 以上のシグナル強度が確認された遺伝子を抽出した。その後、2 倍以上変動する遺伝子の抽出後、有意に変動した遺伝子を moderated t-test ($p < 0.05$, Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR)) を用いて選定した。

pzKyoto-G 群と pzKyoto-G (S204N) 群間で有意に発現レベルが変動していた遺伝子群の、生物学的意味を解釈する為に Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity systems, Redwood City, CA, USA) により機能解析を行った。

CVS-26 株 G 蛋白質および、第 204 位アミノ酸に変異導入した G 蛋白質を発現させた MNA 細胞、pzC26-G 群と pzC26-G (N204S) トランスフェクション細胞群 (1 群 4 サンプル, 計 8 サンプル) の比較解析についても、同様の手順で行った。

結果

Kyoto rG 発現細胞と, Kyoto rG (S204N) 発現細胞における細胞由来遺伝子発現の比較解析

Kyoto rG 発現 MNA 細胞と, Kyoto rG (S204N) 発現細胞の細胞由来 mRNA の発現プロファイルをマイクロアレイによって比較解析した。Kyoto rG 発現 MNA 細胞と比較して, Kyoto rG (S204N) 発現細胞で有意に発現レベルの変化していた細胞遺伝子は 6 遺伝子で, すべて Kyoto rG (S204N) 発現細胞で発現レベルが有意に上昇していた (表 3-1)。これら 6 遺伝子に関して IPA による機能解析で, 有意性の高い関連遺伝子の機能を検索したところ, 抗微生物反応や炎症反応に関連する遺伝子群が特に有意に変化していることが示された (表 3-2)。IPA による機能解析では, canonical pathway として, role of pattern recognition receptor in bacterial and viral recognition が活性化していると示されたが, 6 遺伝子の中でこの経路に含まれるのは, 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素 (2',5'-oligoadenylate synthetase2, OAS2) をコードする遺伝子だけであった (図 3-1)。

CVS-26 rG 発現細胞と, CVS-26 rG (N204S) 発現細胞における細胞由来遺伝子発現の比較解析

Kyoto 株組換え G 蛋白質発現細胞での解析と同様に, CVS-26 rG 発現 MNA 細胞と, CVS-26 rG (N204S) 発現細胞の細胞由来 mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイによって比較解析した。その結果, CVS-26 rG 発現細胞と比較して CVS-26 rG (N204S) 発現細胞で発現が有意に変化していた細胞由来遺伝子は, 76 遺伝子で, うち IPA に機能が登録されていたのは 55 遺伝子だった。

機能が既知の 55 遺伝子の内、CVS-26 rG (N204S) 発現細胞で発現レベルが上昇していた細胞由来遺伝子は 33 遺伝子で、発現が減少していた遺伝子は 22 遺伝子だった (表 3-3)。

これらの発現が有意に変化していた遺伝子に関して IPA で機能解析を行い、有意性の高い関連遺伝子の機能を検索したところ、内分泌系疾患に関連する遺伝子群で特に有意な発現の変動が見られた (表 3-4)。活性化していた canonical pathway として role of pattern recognition receptors in recognition of bacteria and viruses (図 3-2) や interferon signaling (図 3-3) などが挙げられたが、いずれも有意に変化していた 76 遺伝子のうち、1~4 遺伝子しか含まれていなかった。

考察

マイクロアレイ解析を行うに当たり, Kyoto rG 蛋白質と Kyoto rG (S204N) 蛋白質間および CVS-26 rG 蛋白質と CVS-26 rG (N204S) 蛋白質間で, G 蛋白質の細胞内における発現量が同等であることをウェスタンブロッティングで確認した。その上で MNA 細胞における細胞遺伝子群の発現レベルについて比較解析した。

Kyoto rG 発現細胞と Kyoto rG (S204N) 発現細胞について比較解析を行ったところ, Kyoto rG 発現細胞に対して Kyoto rG (S204N) 発現細胞で有意に発現レベルが上昇している細胞由来遺伝子が 6 遺伝子認められた (表 3-1)。これら 6 遺伝子について, IPA による機能解析を行ったところ, 細胞表面への蛋白質発現に関わる 1 遺伝子の活性化と, 自然免疫反応に関わる抗微生物反応や炎症反応の活性化に関連する 5 遺伝子の活性化が明らかとなった。

Kyoto rG (S204N) 発現細胞で発現レベルの上昇した自然免疫反応に関わる抗微生物反応や炎症反応の活性化に関連する 5 遺伝子は以下のとおりである。Ifi44 (interferon-induced protein 44 をコードする), Mx1/Mx2 (Mixovirus resistance protein 1 および 2 をコードする), Oas2 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 2 をコードする), Phf11a (PHD finger protein 11 をコードする) はインターフェロンによって発現が誘導される遺伝子で, いずれも抗ウイルス活性やヘルパーT 細胞の活性化に関わることが示されており, ウイルス感染によって発現量が変化することが報告されている (15, 16, 23, 25, 28, 31, 54, 67, 68)。固定毒は街上毒よりも感染宿主細胞における免疫誘導能が強いことが, これまでの研究で指摘されており, 第 204 位アミノ酸を N 型糖鎖付加部位に変異させ, 固定毒である CVS-26 株の G 蛋白質の N 型糖鎖付加部位に

近似させた Kyoto rG (S204N) を発現させた細胞で、これら自然免疫誘導に関わる遺伝子の発現上昇が示されたことは、固定毒化によって宿主の免疫応答が増強されるという報告を支持する成績であった (8, 9, 29, 37, 38, 53, 55, 56)。

一方、Kyoto rG (S204N) 発現細胞で発現レベルの上昇した細胞表面への蛋白質発現に関わる Rtp4 遺伝子がコードする receptor (chemosensory) transporter protein 4 (RTP4) は、他の蛋白質と結合する能力を持っており、味覚受容体の排出に関わり、受容体のユビキチン化を防いで細胞表面への発現を強化する役割を持つことが指摘されている (2)。また、細胞表面における μ オピオイド受容体と δ オピオイド受容体とのヘテロダイマーの形成を調節する役割を持っていると言われている (6)。また、Kyoto 株 G 蛋白質への第 204 位アミノ酸を含む N 型糖鎖付加部位の導入により、G 蛋白質の細胞膜への分布が見られるようになったことから、宿主細胞で発現レベルが有意に上昇した Rtp4 遺伝子が、第 204 位アミノ酸に N 型糖鎖修飾された G 蛋白質の細胞膜への輸送に関わると考えられた。

また、これら 6 遺伝子の発現上昇は、CVS-11 株を感染させたマウスの CNS を用いて行ったマイクロアレイでも認められている (47)。しかし、今回のマイクロアレイ解析のみからは、優位に発現レベルの変化した遺伝子の種類が少ないため、Kyoto rG (S204N) を発現させた MNA 細胞内でこれら特定のシグナル伝達経路が活性化されていると判断することはできなかった (表 3-2, 図 3-1)。これらの細胞遺伝子発現レベルの上昇が持つ意義を理解するためには、今後、リアルタイム PCR による発現量の定量や、特定の遺伝子をノックアウトした細胞を用いた G 蛋白質の発現実験や狂犬病ウイルス感染実験などを行い、詳細に解析することで、これらの細胞遺伝子が狂犬病ウイルス街上毒の固

定毒化によって獲得された G 蛋白質の免疫原性の増強や細胞内輸送にどのようにかかわっているかを明らかにする必要がある。

一方、第 204 位アミノ酸をアスパラギンからセリンに置換して N 型糖鎖付加配列を欠失させた CVS-26 rG (N204S) では街上毒の Kyoto 株と同じ糖鎖付加部位と数となり、CVS-26 rG を発現させた細胞よりも免疫反応に関連する遺伝子の発現レベルが低下することが期待されたが、インターフェロン誘導性蛋白質 (IRF7, Irgm1, Igtg, OAS, GBP4 など) や、オートファジー関連因子である IRGM や、異常蛋白のユビキチン化と分解に関わる UBA7 などの遺伝子で発現の有意な上昇、アポトーシス抵抗性に関与する BNIP 遺伝子、免疫反応に関わる PDCD1LG2 遺伝子の有意な発現低下などが示されたが、街上毒の表現型に係る遺伝子群と考えることは困難であった。糖蛋白質の糖鎖は蛋白質のフォールディングや輸送、機能に影響を与えるとされている (45, 52, 58)。CVS-26 rG の第 204 位アミノ酸をアスパラギンからセリンに置換して糖鎖付加が欠失された CVS-26 rG (N204S) は、N 型糖鎖付加部位と数が同じ Kyoto 株の G 蛋白質とは異なるフォールディングや立体構造をとるため、誘導される細胞遺伝子群が異なった可能性がある。このことは、CVS-26 rG (N204S) の一部が第 204 位の糖鎖欠失を補う新たな糖鎖付加がおそらく第 37 位アミノ酸に起きていることから予想される。

本研究によって、街上毒である Kyoto 株 G 蛋白質に第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加配列を挿入して固定毒の特性を獲得した G 蛋白質の発現が、細胞表面への蛋白質輸送に関わる Rtp4 遺伝子と、固定毒化した狂犬病ウイルスに特徴的な免疫誘導の増強を説明し得る自然免疫反応に関わる遺伝子群 (Ifi44 遺伝子, Mx1 および Mx2 遺伝子, Oas2, Phf11a 遺伝子) の発現レベルを有

意に上昇させることが示されたが、これらの遺伝子誘導が Kyoto 株の第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加のみに認められる現象か、多くの街上毒の固定毒化において共通して認められる現象かを今後明らかにする必要がある。もしこれが固定毒化に共通して認められるのであれば、これらの細胞遺伝子の誘導は固定毒の G 蛋白質の細胞膜への輸送や免疫原性の増強を説明する重要な知見であると考えられる。

表3-1. Kyoto rG発現MNA細胞と、Kyoto rG(S204N)発現MNA細胞における細胞由来遺伝子の発現比

遺伝子記号 ¹⁾	遺伝子名 ²⁾	プローブID ³⁾	変化倍数 ⁴⁾
Ifi44	interferon-induced protein 44	A_51_P487690	2.07794
Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1	A_55_P2118441	2.142197
Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	A_51_P514085	2.07353
Oas2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	A_55_P2019719	2.018492
Phf11a	PHD finger protein 11	A_51_P262515	2.224489
Rtp4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	A_51_P304170	2.36952

pzKyoto-GをトランスフェクションしたMNA細胞と、pzKyoto-G(S204N)をトランスフェクションしたMNA細胞を比較して、有意に発現が変化していた細胞由来遺伝子の発現比を示した。

1)GeneSpring GX12(Agilent)における遺伝子記号, 2)遺伝子名, 3)GeneSpring GX12(Agilent)におけるプローブのID, 4)pzKyoto-GをトランスフェクションしたMNA細胞の細胞由来遺伝子の発現量を基準としたときの, pzKyoto-G(S204N)をトランスフェクションしたMNA細胞における変化倍数

表3-2. IPAによる遺伝子機能解析

カテゴリー	p値
Antimicrobial Response	4.05E-6-7.53E-04
Inflammatory Response	4.05E-06-4.48E-02
Dermatological Diseases and Conditions	4.38E-04-4.38E-04
Infectious Disease	5.02E-04-1.10E-02
Inflammatory Disease	3.26E-03-3.26E-03
RNA Damage and Repair	6.76E-03-6.76E-03
Cell Signaling	1.00E-02-1.00E-02
Post-Translational Modification	2.48E-02-2.48E-02
Protein Trafficking	2.90E-02-2.90E-02
Nucleic Acid Metabolism	4.65E-02-4.65E-02
Organismal Development	1.10E-02-1.10E-02
Tissue Morphology	1.87E-02-1.87E-02

pzKyoto-Gをトランスフェクションした細胞と比べpzKyoto-G(S204N)をトランスフェクションした細胞で発現が変化していた遺伝子をIPAで機能解析した。

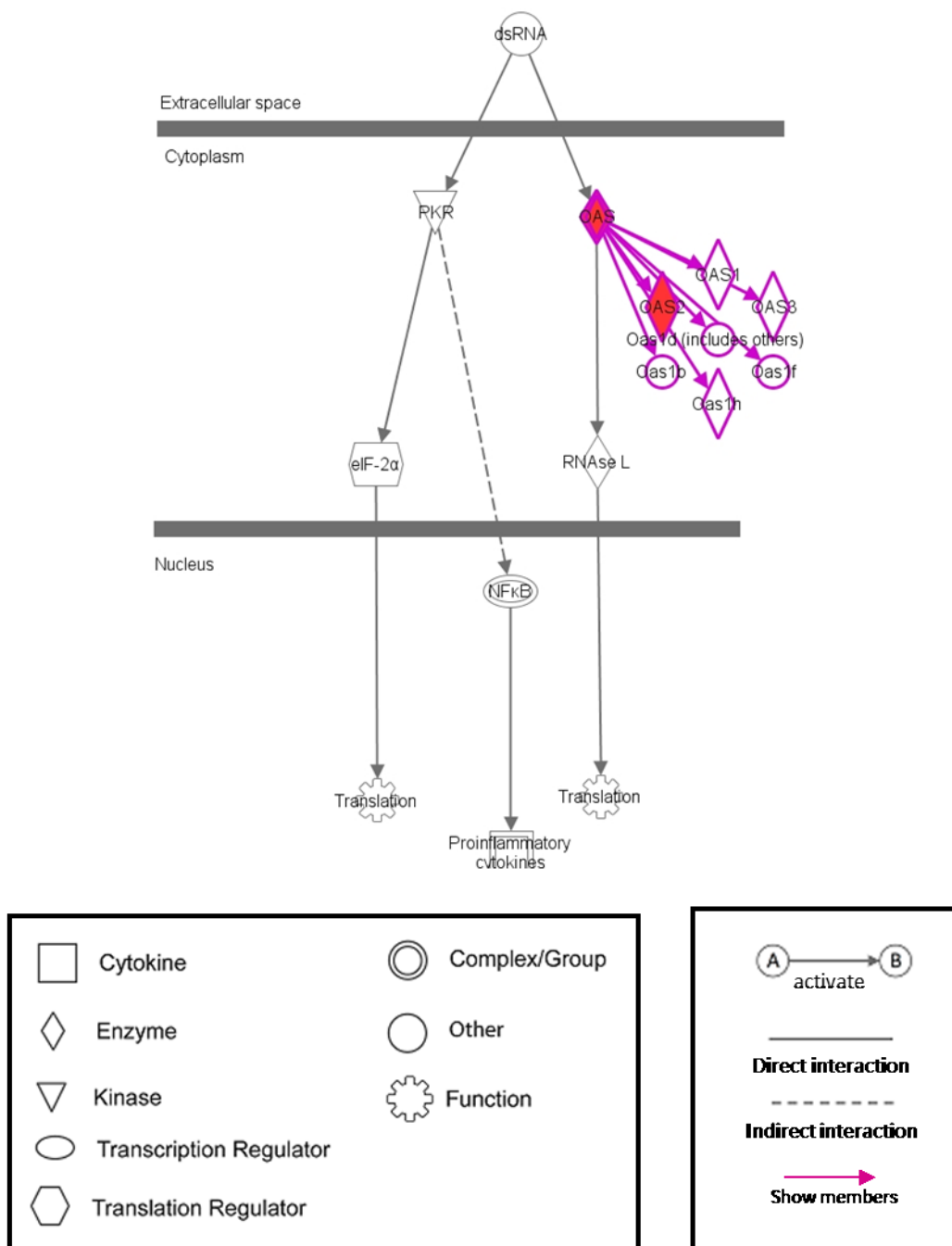


図3-1 pzKyoto-G(S204N)トランスフェクション後48時間後のMNA細胞におけるcanonical pathway
 pzKyoto-G(S204N)をトランスフェクションして48時間培養した後、同様に培養したpzKyoto-Gトランスフェクション細胞と比較して発現が有意(発現比2倍以上, $p < 0.05$)に変化していた遺伝子のRole of pattern recognition receptor in bacterial and viral recognitionのcanonical pathwayをIPA (Ingenuity Systems)で解析した。
 赤: 発現が有意(発現比2倍以上, $p < 0.05$)に上昇していた遺伝子
 白: アップロードの際、データ中に含まれなかった遺伝子、またはマイクロアレイスライドにプリントされていない遺伝子

表3-2 **CVS-26 rG**発現MNA細胞と、**CVS-26 rG(N204S)**発現MNA細胞における細胞由来遺伝子の発現比

遺伝子記号 ¹⁾	遺伝子名 ²⁾	プローブID ³⁾	変化倍数 ⁴⁾
Adm	adrenomedullin	A_51_P265571	-3.01438
Ankrd29	ankyrin repeat domain 29	A_55_P2103501	-2.04187
Ankrd37	ankyrin repeat domain 37	A_52_P319438	-2.13259
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	A_55_P2091473	-2.47665
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	A_66_P120736	-2.59158
Cd99	CD99 antigen	A_55_P2136732	-2.58671
Cep85l	centrosomal protein 85kDa-like	A_66_P115161	-2.02338
Cox4i2	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2	A_55_P2054663	-2.14414
Dlx3	distal-less homeobox 3	A_55_P2122987	-2.04371
Foxi1	forkhead box l1	A_55_P2166513	-2.65846
Gm10584	predicted gene 10584	A_66_P140794	-2.07975
Kbtbd11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11	A_52_P570240	-2.84101
Kcnma1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	A_55_P2071656	-2.01479
Nanog	Nanog homeobox	A_55_P2007699	-2.16474
Pdcd1lg2	programmed cell death 1 ligand 2	A_55_P2122075	-2.44712
PRR30	proline rich 30	A_55_P2030991	-2.57035
Rgma	repulsive guidance molecule family member a	A_55_P1955382	-2.18029
Rgs8	regulator of G-protein signaling 8	A_52_P635598	-2.62405
Selenbp1	selenium binding protein 1	A_55_P1961014	-2.04216
Sncb	synuclein, beta	A_51_P448971	-2.16483
Sva	seminal vesicle antigen	A_55_P2136184	-2.04104
Wdr66	WD repeat domain 66d	A_52_P517174	-2.03908

pzC26-GをトランスフェクションしたMNA細胞と、pzC26-G(N204S)をトランスフェクションしたMNA細胞を比較して、有意に発現が変化していた遺伝子の発現比を示した。

1)GeneSpring GX 12(Agilent)における遺伝子記号, 2)遺伝子名, 3)GeneSpring GX 12(Agilent)におけるプローブのID, 4)pzC26-GをトランスフェクションしたMNA細胞の遺伝子発現量を基準としたときの, pzC26-G(N204S)をトランスフェクションしたMNA細胞における変化倍数

表3-3. CVS-26 rG発現MNA細胞と、CVS-26 rG(N204S)発現MNA細胞における細胞由来遺伝子の発現比 (続き)

遺伝子記号 ¹⁾	遺伝子名 ²⁾	プローブID ³⁾	変化倍数 ⁴⁾
1600025M17Rik	RIKEN cDNA 1600025M17 gene	A_52_P113830	2.572618
1700001J03Rik	RIKEN cDNA 1700001J03 gene	A_51_P219594	2.2580428
Atp6v1c2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2	A_51_P518600	2.123378
C17orf64	chromosome 17 open reading frame 64	A_55_P2144115	2.1345606
Ca6	carbonic anhydrase VI	A_55_P2004370	2.327941
Gbp3	guanylate binding protein 3	A_55_P2097219	2.421785
Gbp4	guanylate binding protein 4	A_55_P2472435	2.091762
Gm9706	predicted gene 9706	A_66_P101942	2.127334
Ifi44	interferon-induced protein 44	A_51_P487690	3.476629
Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	A_51_P359570	3.356575
Igtp	interferon gamma induced GTPase	A_51_P112355	2.146831
Irf7	interferon regulatory factor 7	A_51_P421876	2.146035
Irgm1	immunity-related GTPase family M member 1	A_51_P262171	2.131205
Irgm1	immunity-related GTPase family M member 1	A_55_P1981479	2.122606
Irgm	immunity-related GTPase family M member 2	A_55_P2137611	2.191696
Kif12	kinesin family member 12	A_52_P221776	2.115356
Mx1/Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	A_51_P514085	3.058738
Oas1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	A_55_P1998943	2.288275
Oas1f	2'-5' oligoadenylate synthetase 1F	A_51_P154842	2.153668
Oas2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	A_55_P2019719	2.767946
Phf11	PHD finger protein 11	A_51_P262515	2.640972
Phf11	PHD finger protein 11	A_55_P2015687	2.646102
Plcl1	phospholipase C-like 1	A_52_P191567	3.465272
Rtp4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	A_51_P304170	2.697798
Samd9l	sterile alpha motif domain containing 9-like	A_55_P2151601	2.816665
Samd9l	sterile alpha motif domain containing 9-like	A_66_P121787	2.983446
Tgtp1/Tgtp2	T cell specific GTPase 2	A_55_P2062246	2.6064
Txnip	thioredoxin interacting protein	A_55_P2006255	2.521094
Txnip	thioredoxin interacting protein	A_51_P438805	2.711176
Uba7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	A_55_P2026233	2.068286
Usp18	ubiquitin specific peptidase 18	A_55_P2114953	2.426864
Wdr78	WD repeat domain 78	A_55_P2301312	2.245837
Xaf1	XIAP associated factor 1	A_55_P1966833	2.206304

pzC26-GをトランスフェクションしたMNA細胞と、pzC26-G(N204S)をトランスフェクションしたMNA細胞を比較して、有意に発現が変化していた遺伝子の発現比を示した。

1) GeneSpring GX 12(Agilent)における遺伝子記号, 2) 遺伝子名, 3) GeneSpring GX 12(Agilent)におけるプローブのID, 4) pzC26-GをトランスフェクションしたMNA細胞の遺伝子発現量を基準としたときの、pzC26-G(N204S)をトランスフェクションしたMNA細胞における変化倍数

表3-4. IPAによる遺伝子機能解析

カテゴリー	P値
Endocrine System Disorders	1.48E-09-4.41E-03
Gastrointestinal Disease	1.48E-09-4.12E-02
Immunological Disease	1.48E-09-4.54E-02
Metabolic Disease	1.48E-09-4.96E-02
Neurological Disease	1.73E-05-4.33E-02
Post-Translational Modification	7.11E-05-4.41E-03
Protein Folding	7.11E-05-7.11E-05
Cellular Assembly and Organization	9.94E-05-4.33E-02
Cell Cycle	7.13E-04-4.87E-02
Nucleic Acid Metabolism	7.91E-04-1.41E-02
Embryonic Development	7.13E-04-4.75E-02
Behavior	1.62E-03-1.75E-02
Auditory and Vestibular System Development and Function	2.21E-03-1.54E-02
Cardiovascular System Development and Function	2.21E-03-4.75E-02
Connective Tissue Development and Function	2.21E-03-4.44E-02

pzC26-Gをトランスフェクションした細胞と比べ、pzC26-G(N204S)をトランスフェクションした細胞で発現が変化していた遺伝子をIPAで機能解析した。

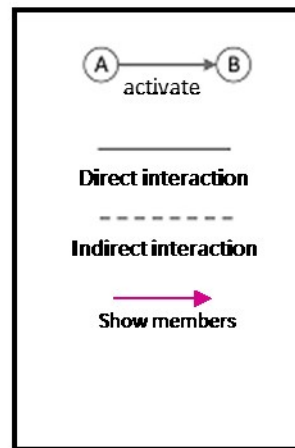
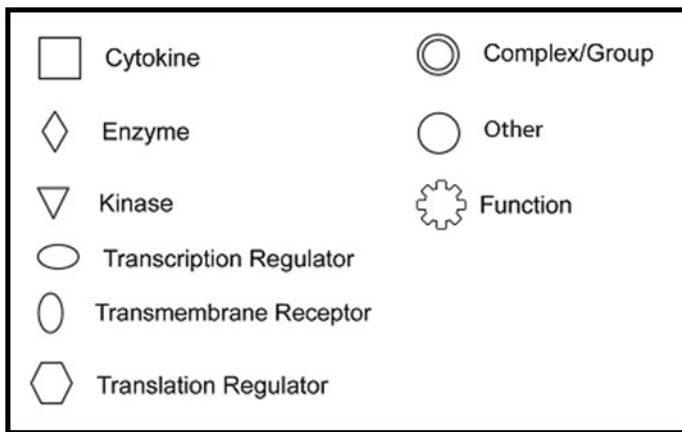
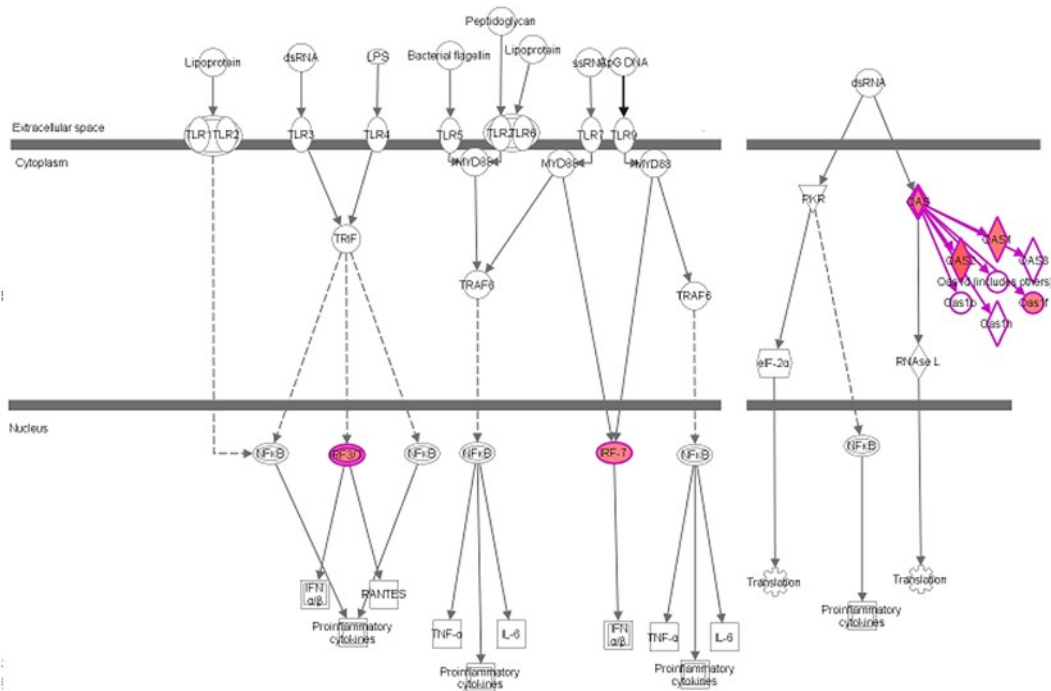


図3-2 pzC26-G(N204S)トランスフェクション後48時間後のMNA細胞におけるcanonical pathway

pzC26-G(N204S)をトランスフェクションして48時間培養した後、同様に培養したpzC26-Gトランスフェクション細胞と比較して発現他有意(発現比2倍以上, $p < 0.05$)に変化した遺伝子のRole of pattern recognition receptors in recognition of bacteria and virusesのcanonical pathwayをIPA(Ingenuity Systems)で解析した。

赤: 発現が有意(発現比2倍以上, $p < 0.05$)に上昇していた遺伝子

白: アップロードの際、データ中に含まれなかった遺伝子、またはマイクロアレイスライドにプリントされていない遺伝子

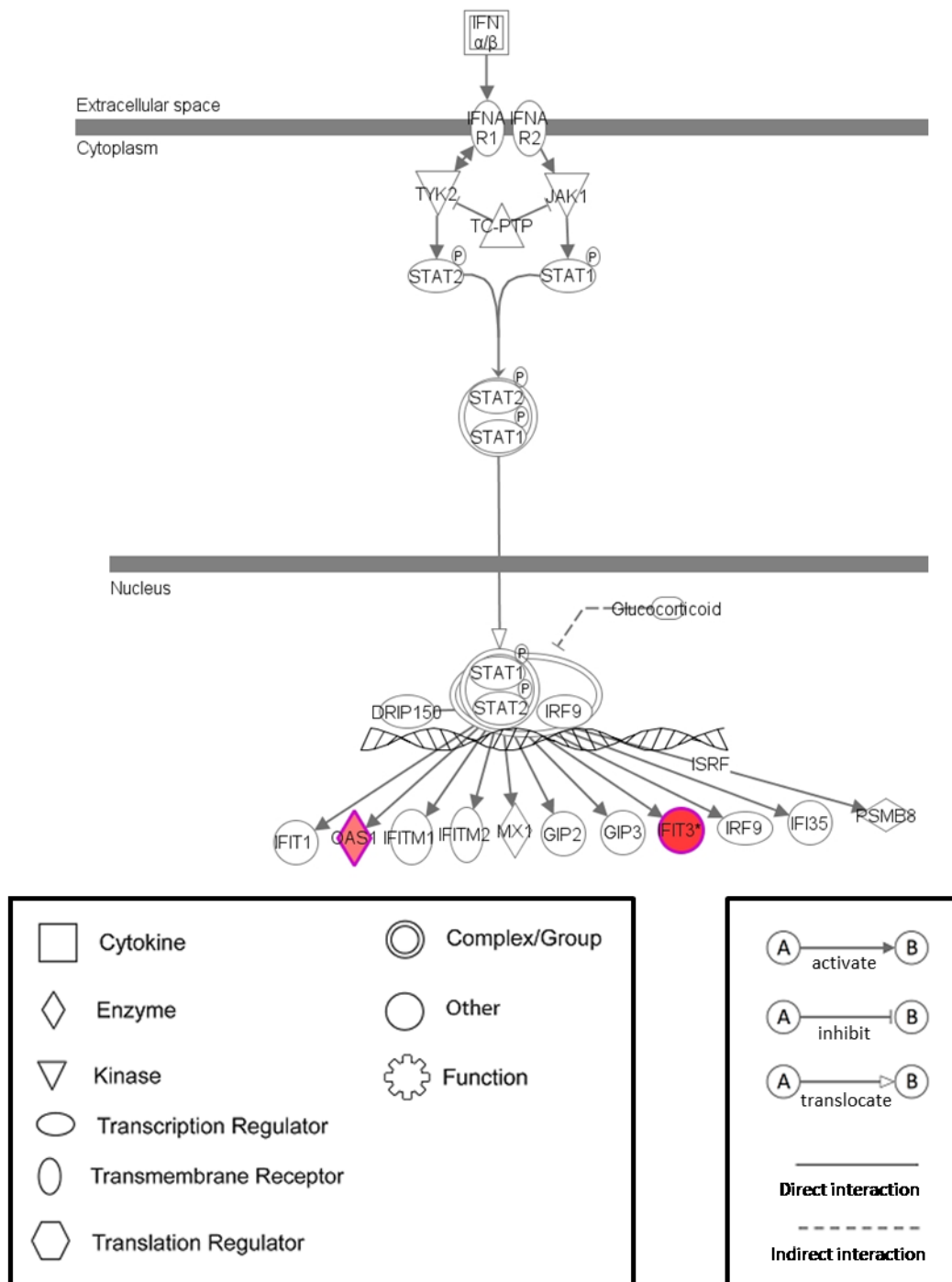


図3-3 pzC26-G(N204S)トランスフェクション後48時間後のMNA細胞におけるcanonical pathway

pzC26-G(N204S)をトランスフェクションして48時間培養した後、同様に培養したpzC26-Gトランスフェクションした細胞と比較して発現が有意(発現比2倍以上、 $p < 0.05$)に変化した遺伝子のInterferon signalingのcanonical pathwayをIPA (Ingenuity Systems)で解析した。

赤: 発現が有意(発現比2倍以上、 $p < 0.05$)に上昇していた遺伝子

白: アップロードの際、データ中に含まれなかった遺伝子、またはマイクロアレイスライドにプリントされていない遺伝子

結論

狂犬病ウイルスは、野外流行株である街上毒と街上毒を実験室内で継代して作出された固定毒に分類される。固定毒は街上毒と比較して、末梢感染性の減弱や潜伏期間の短縮と一定化、さらには免疫誘導能の増強といった様々な性状の変化が見られる（4, 9, 29, 38, 42, 53, 55, 56）。これまでに、電子顕微鏡による感染細胞の観察から、街上毒は細胞膜からのウイルス粒子の出芽がほとんど認められないが、固定毒では細胞膜からのウイルス粒子の出芽が高頻度で認められることが報告されている（12, 20, 32～34, 37）。また、最近の研究で、街上毒の固定毒化に伴う増殖効率の上昇や、マウスに対する末梢感染性の低下に、狂犬病ウイルスの G 蛋白質に付加される N 型糖鎖数の増加が関係することが示唆された（62～64）。

そこで本研究では、街上毒と固定毒の出芽部位の違いには G 蛋白質の糖鎖修飾の違いが関与していると仮説を立て、これを証明するために街上毒の Kyoto 株と固定毒の CVS-26 株および両者のキメラである組換えウイルスと組換え G 蛋白質の哺乳類細胞発現系を用いて、G 蛋白質の糖鎖修飾と細胞内分布について比較解析した。さらに種々の組換え G 蛋白質を発現させた細胞において発現レベルの上昇する細胞由来遺伝子を比較解析した。その結果、以下の知見が得られた。

1. 街上毒の Kyoto 株を感染させた MNA 細胞において G 蛋白質は細胞膜に輸送されなかったが、固定毒の CVS-26 株を感染させた MNA 細胞では G 蛋白質は細胞膜に分布した。

2. 固定毒の CVS-26 株の G 蛋白質をコードする遺伝子のみを街上毒の Kyoto 株の遺伝子に置換した組換え狂犬病ウイルス rCVS-26(Kyoto-G)株をリバースジェネティクスにより作製し、MNA 細胞に感染させると、その G 蛋白質は細胞膜に輸送されず、Kyoto 株感染細胞と同様に小胞体に局在した。
3. 固定毒の CVS-26 株をリバースジェネティクスにより作製した、組換え狂犬病ウイルス rCVS-26 株を感染させた MNA 細胞では、G 蛋白質はヌクレオカプシドを構成する N 蛋白質と細胞膜周囲に共局在したが、街上毒由来 Kyoto 株の G 蛋白質を持つ rCVS-26(Kyoto-G)を感染させた MNA 細胞では、G 蛋白質と N 蛋白質は MNA 細胞の細胞膜周囲には分布せず、核周辺の小胞体に共局在した。
4. 街上毒の Kyoto 株の G 蛋白質を持つ rCVS-26(Kyoto-G)株は、固定毒の CVS-26 株の G 蛋白質を持つ rCVS-26 株よりも感染性ウイルス粒子の産生量が有意に低下した。
5. 街上毒の Kyoto 株に由来する Kyoto rG と固定毒の CVS-26 株に由来する CVS-26 rG を MNA 細胞に発現させると、Kyoto rG は細胞膜に分布せず小胞体に局在したが、CVS-26 rG は細胞膜に分布した。
6. 街上毒の Kyoto 株に由来する G 蛋白質の第 204 位アミノ酸をセリンからアスパラギンに置換して N 型糖鎖付加配列を挿入した Kyoto rG (S204N) を MNA 細胞に発現させると細胞膜に分布するようになった。

7. 街上毒の Kyoto 株に由来する G 蛋白質の第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加配列を挿入して固定毒の特性の一つである細胞膜へ輸送される性質を獲得した Kyoto rG (S204N) を発現させた MNA 細胞で、自然免疫誘導に関わる細胞遺伝子群の発現上昇が示され、固定毒の免疫誘導の増強という表現型を獲得したのではないかと考えられた。

以上の結果から、Kyoto 株感染細胞と CVS-26 株感染細胞における G 蛋白質の分布の違いには、G 蛋白質の第 204 位アミノ酸への糖鎖付加が大きく関与していることが明らかとなった。糖鎖付加数の増加により、G 蛋白質が細胞膜へ効率的に輸送されたことは、これまでに報告されている街上毒が固定毒化する際に獲得する表現型の一つを説明し得る (12, 20, 32~34, 37)。また、固定毒は街上毒よりも免疫誘導能が強いことがこれまでの研究で指摘されているが、第 204 位アミノ酸を糖鎖付加部位に変異させ、固定毒である CVS-26 株の G 蛋白質に近似させた Kyoto rG (S204N) を発現させた細胞で、自然免疫誘導に関わる遺伝子の発現上昇が示されたことは、固定毒化によって免疫応答が増強される現象を部分的に説明し得る (8, 9, 29, 37, 38, 53, 55, 56)。また、蛋白質の膜輸送に関与する遺伝子も発現上昇が認められ、第 204 位アミノ酸へ糖鎖付加された G 蛋白質の細胞膜への輸送効率の上昇を説明し得ると考えられた。

本研究により、狂犬病ウイルスの街上毒が固定毒化される過程でウイルスが獲得した特徴的な性状の少なくとも一部を明らかにできたと結論される。

謝辞

本研究に携わる機会を与えて頂き、始終懇篤なるご指導・ご鞭撻を頂き、また、本稿を微細にわたり校閲して頂いた国立感染症研究所 獣医科学部 第二室室長 井上智先生に、深甚なる謝意を表します。また、本研究を進めるに当たり、国立感染症研究所 獣医科学部 前部長 山田章雄先生、現部長 森川茂先生、岐阜大学 人獣共通感染症学研究室 杉山誠教授にご指導、ご鞭撻、ご厚情を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

論文草稿に対し、適切な助言を賜った国立感染症研究所 ウイルス第一部部長 西條政幸先生、岐阜大学 食品環境衛生学研究室 石黒直隆教授、帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門 猪熊壽教授、岩手大学 獣医微生物学研究室 村上賢二教授、東京農工大学 農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター 水谷哲也教授に心より謝意を表します。

生産開発科学研究所 分子微生物研究室 河合明彦先生、京都大学 霊長類研究所 分子生理研究部門 井上謙一助教には、貴重な研究材料を提供していただくとともに、有益なご助言を賜りました。ここに篤く御礼申し上げます。

免疫組織学的解析についてご助言を賜りました国立感染症研究所 感染病理部 飛梅実先生、マイクロアレイ解析を行うに当たり、技術指導及び適切な助言を賜りました国立感染症研究所 獣医科学部 宇田晶彦先生、病理組織学的解析にご協力頂いた北里大学 獣医病理学教室 朴天鎬准教授、糖鎖付加の解析について助言を頂いた大分大学 微生物学講座 山田健太郎助教に篤く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご協力をいただいた、国立感染症研究所 獣医科学部 第二室 野口章先生、加来義浩先生、奥谷晶子先生、

ならびに、私の研究生生活を支えてくださった国立感染症研究所 獣医科学部の皆様に深く感謝いたします。

最後に、私の学生生活を支え、励ましてくれた家族に感謝します。

引用文献

- 1) Baer,G.M. (2007). The History of Rabies. In: Jackson, A.C. and Wunner, H.W., [eds]. Rabies. Second edition., pp.1~22. Academic Press, London.
- 2) Behrens,M., Bartelt,J., Reichling,C., Winnig,M., Kuhn,C. and Meyerhof,W. (2006). Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. J. Biol. Chem. 281(29), 20650~20659.
- 3) Burger,S.R., Remaley,A.T., Danley,J.M., Moore,J., Muschel,R.J., Wunner,W.H. and Spitalnik,S.L. (1991). Stable expression of rabies virus glycoprotein in Chinese hamster ovary cells. J. Gen. Virol. 72, 359~367.
- 4) Charlton,K.M.. (1994) The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 187, 95~119.
- 5) Coulon,P., Derbin,C., Kucera,P., Lafay,F., Prehaud,C. and Flamand,A. (1989). Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. J. Virol. 63, 3550~3554.
- 6) Décaillot,F.M., Rozenfeld,R., Gupta,A. and Devi,L.A. (2008). Cell surface targeting of μ - δ opioid receptor heterodimers by RTP4. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 105(41), 16045~16050.
- 7) Dietzschold,B., Wiktor,T.J., Trojanowski,J.Q., Macfarlan,R.I., Wunner,W.H., Torres-Anjel,M.J. and Koprowski,H. (1985). Differences in cell-to cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. J. Virol. 56, 12~18.

- 8) Dietzschold, B., Wunner,W.H., Wiktor,T.J., Lopes,A.D., Lafon,M., Smith,C.L. and Koprowski,H. (1983). Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 70~74.
- 9) Dietzshold,B., Li,J., Faber,M. and Schnell,M. (2008). Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol.* 3(5), 481~490.
- 10) Faber,M., Prumanausahakul,R., Nagao,K., Prośniak,M., Rice,A.B., Koprowski,H., Schnell,M.J. and Dietzshold,B. (2004). Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(46), 16328~16332.
- 11) Faber,M., Pulmanusahakul,R., Hodawadekar,S.S., Spitsin,S., McGettigan,J.P., Schnell,M.J. and Dietzschold,B. (2002). Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* 76(7), 3374~3381.
- 12) Fekadu,M., Chandler,F.W. and Harrison,A.K. (1982). Pathogenesis of rabies in dogs inoculated with an Ethiopian rabies virus strain. Immunofluorescence, histologic and ultrastructural studies of the central nervous system. *Arch. Virol.* 71, 109~126.
- 13) Finke,S. and Conzelmann,K.K. (2005). Replication strategies of rabies virus. *Virus Res.* 111, 120~131.
- 14) Gaudin,Y., Ruigroc,R.W., Tuffereau,C., Knossow,M. and Flamand,A. (1992). Rabies virus glycoprotein is a Trimer. *Virology.* 187, 627~632.
- 15) Guo,J.T., Hayashi,J. and Seeger,C. (2005) West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *J.Virol.* 79(3), 1343~

1350.

- 16) Harman,A.N., Lai,J., Turville,S., Samaraziwa,S., Gray,L., Marsden,V., Mercier,S.K., Jones,K., Nasr,N., Rustagi,A., Cumming,H., Donaghy,H., Mak,J., Gale,M.Jr., Churchill,M., Hertzog,P. and Cunningham,A.L. (2011). HIV infection of dendritic cells subverts the IFN induction pathway via IRF-1 and inhibits type 1 IFN production. *Blood*. 118(2), 298~308.
- 17) Inoue,K., Shoji,Y., Kurane,I., Iijima,T., Sakai,T. and Morimoto,K. (2003). An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J. Virol. Methods*. 107, 229~236.
- 18) Inoue,S., Sato,Y., Hasegawa,H., Noguchi,A., Yamada,A., Kurata,T. and Iwasaki,T. (2003). Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific antirabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. *Pathol. Int*. 53(8), 525~533.
- 19) Irie,T. and Kawai,A. (2002). Studies on the different conditions for rabies virus neutralization by monoclonal antibodies #1-46-12 and #7-1-9. *J. Gen. Virol*. 83, 3045~3053.
- 20) Iwasaki,Y., Ohtani,S. and Clark,H.F. (1975). Maturation of rabies virus by budding from neuronal cell membrane in suckling mouse brain. *J. Virol*. 15, 1020~1023.
- 21) Jackson,A.C. (2007). Human disease. In: Jackson, A.C. and Wunner, H.W., [eds]. *Rabies*. Second edition., pp.309 ~ 340. Academic Press, London.

- 22) Jackson,A.C. (2007). Pathogenesis. In: Jackson, A.C. and Wunner, H.W., [eds]. Rabies. Second edition., pp.341 ~ 381. Academic Press, London.
- 23) Jin,H.K., Yoshimatsu,K., Takada,A., Ogino,M., Asano,A., Arikawa,J. and Watanabe,T. (2001). Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication. Arch. Virol. 146(1), 41~49.
- 24) Kaku,Y., Noguchi,A., Hotta,K., Yamada,A. and Inoue,S. (2011). Inhibition of rabies virus propagation in mouse neuroblastoma cells by an intrabody against the viral phosphoprotein. Antiviral Res. 91, 64-71.
- 25) Kitamura,A., Takahashi,K., Okajima,A. and Kitamura,N. (1994). Induction of the human gene for p44, a hepatitis-C-associated microtubular aggregate protein, by interferon-alpha/beta. Eur. J. Biochem.224(3), 877~83.
- 26) Kuang,Y., Lackay,S.N., Zhao,L. and Fu,Z.F. (2009). Role of chemokines in the enhancement of BBB permeability and inflammatory infiltration after rabies virus infection. Virus Res. 144(1-2), 18~26.
- 27) Kucera,P., Dolivo,M., Coulon,P. and Flamand,A. (1985). Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. J. Virol. 55, 158~162.
- 28) Lee,S.H. and Vidal,S.M. (2002). Functional Diversity of Mx Proteins: Variations on a Theme of Host Resistance to Infection. Genome Res. 12(4), 527~530.
- 29) Lepine,P. (1938). On the evolution of fixed strains of rabies virus. J Hyg. 38, 180~184.

- 30) Liu,P., Yang,J., Wu,X. and Fu,Z.F. (2004) Interactions amongst rabies virus nucleoprotein, phosphoprotein and genomic RNA in virus-infected and transfected cells. *J. Gen. Virol.* 85, 3725~3734.
- 31) Marcovistz,R., Leal,EC., Matos,D.C. and Tsiang,H. (1994). Interferon production and immune response induction in apathogenic rabies virus-infected mice. *Acta Virol.* 38(4), 193~197.
- 32) Matsumoto,S. and Kawai,A. (1969). Comparative studies on development of rabies virus in different host cells. *Virology.* 39(3), 449~459.
- 33) Matsumoto,S., Schneider,L.G., Kawai,A. and Yonezawa,T. (1974). Further studies on the replication of rabies and rabies-like viruses in organized cultures of mammalian neural tissues. *J. Virol.* 14, 981~996.
- 34) Matsumoto,S. and Yonezawa,T. (1971). Replication of rabies virus in organized cultures of mammalian neural tissues. *Infect. Immun.* 3, 606~616.
- 35) Mebatsion,T., König,M. and Conzelmann, KK. (1996). Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell.* 84, 941~951.
- 36) Ming,P., Du,J., Tang,Q., Yan,J., Nadin-Davis,S.A., Si,H., Tao,X., Huang,Y., Hu,R. and Liang,G. (2009). Molecular characterization of the complete genome of a street rabies virus isolated in China. *Virus. Res.* 143, 6~14.
- 37) Miyamoto,K. and Matsumoto,S. (1967). Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J. Exp. Med.* 125(3), 447

~456.

- 38) Morimoto,K., Hooper,D.C., Spitsin,S., Koprowski,H. and Dietzschold,B. (1999). Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J. Virol.* 73, 510~518.
- 39) Morimoto,K., Kawai,A. and Mifune,K. (1992). Comparison of rabies virus G proteins produced by cDNA-transfected animal cells that display either inducible or constitutive expression of the gene. *J. Gen. Virol.* 73, 335~345.
- 40) Ni,Y., Tominaga,Y., Honda,Y., Morimoto,K., Sakamoto,S. and Kawai,A. (1995). Mapping and Characterization of a Sequential Epitope on the Rabies Virus Glycoprotein Which Is Recognized by a Neutralizing Monoclonal Antibody, RG719. *Microbiol. Immunol.* 39(9) 693~702.
- 41) Prehaud,C., Lay,S., Dietzschold,B. and Lafon,M. (2003). Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. *J. Virol.* 77, 10537~10547.
- 42) Pulmanusahakul,R., Li,J., Schnell,M.J. and Dietzshold,B. (2008). The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J. Virol.* 82(5), 2330~2338.
- 43) Rossiter,J.P. and Jackson,A.C. (2007). Pathology. In: Jackson AC, Wunner HW, editors. *Rabies*. Second edition., pp.383~409. Academic Press, London.
- 44) Seif,I., Coulon,P., Rollin,P.E. and Flamand,A. (1985). Rabies virulence:

- effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* 53, 926~934.
- 45) Shakin-Eshlemen,S.L., Remaley,A.T., Eshleman,J.R., Wunner,W.H. and Apitalnik,S.L. (1992). N-linked glycosylation of rabies virus glycoprotein. Individual sequons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 267, 10690-10698.
- 46) Smith,J.S., Fishbein,D.B., Rupprecht,C.E. and Clark,K. (1991). Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. *N. engl. J. Med.* 324(4), 205~211.
- 47) Sugiura,N., Uda,A., Inoue,S., Kojima,D., Hamamoto,N., Kaku,Y., Okutani,A., Noguchi,A., Park,CH. and Yamada,A. (2011). Gene expression analysis of host innate immune responses in the central nervous system following lethal CVS-11 infection in mice. *Jpn. J. Infect. Dis.* 64, 463~472.
- 48) Tobiume,M., Sato,Y., Katano,H., Nakajima,N., Tanaka,K., Noguchi,A., Inoue,S., Hasegawa,H., Iwasa,Y., Tanaka,J., Hayashi,H., Yoshida,S., Kurane,I. and Sata,T. (2009). Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. *Pathol. Int.* 59(8), 555~566.
- 49) Tordo,N. (1996). Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin,F.X., Kaplan,M.M. and Koprowski,H. [eds] *Laboratory techniques in rabies. Fourth edition.*, pp.28~51. WHO, Geneva.

- 50) Trimarchi, C.V. and Nadin-Davis, S.A. (2007). Diagnostic Evaluation. In: Jackson, A.C. and Wunner, H.W. [eds] Rabies. Second edition., pp.411 ~469. Academic Press, London.
- 51) Tuffereau, C., Leblois, H., Benejean, J., Coulon, P., Lafay, E. and Flamand, A. (1989). Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology*. 172, 206~212.
- 52) Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. 3, 97~130.
- 53) Vaziri, B., Torkashvand, F., Eslami, N. and Fayaz, A. (2012). Comparative proteomics analysis of mice lymphocytes in early stages of infection by different strains of rabies virus. *Indian J Virol*. 23(3), 311~316.
- 54) Wang, J., Bassagoudanavar, S.H., Wang, X., Hopewell, E., Albrecht, R., García-Sastre, A., Malachandran, S. and Beg, A.A. (2010). NF- κ B RelA subunit is crucial for early IFN- β expression and resistance to RNA virus replication. *J. Immunol*. 185(3), 1720~1729.
- 55) Wang, ZW., Sarmiento, L., Wang, Y., Li, X., Dhingra, V., Tsegai, T., Jiang, B. and Fu, ZF. (2005). Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system. *J. Virol*. 79(19), 12554~12565.
- 56) Wiktor, T.J., Doherty, P.C. and Koprowski, H. (1977). Suppression of cell-mediated immunity by street rabies virus. *J. Exp. Med*. 145(6), 1617~1622.

- 57) Wiktor,T.J., Gyorgy,E., DieterSchlumberger, H., Sokol, F. and Koprowski, H. (1973). Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol.* 110(1), 269~276.
- 58) Wojcayk,BS., Takahashi,N., Levy,M.T., Andrews,D.W., Abrams,W.R., Wunner,W.H. and Spitalnic,S.L. (2005). N-glycosylation at one rabies virus glycoprotein sequon influences N-glycan processing at a distant sequon on the same molecule. *Glycobiology.* 15(6), 655~666.
- 59) World Health Organization. (2013). WHO Expert consultation on Rabies, Second report. World Health Organ Tech. Rep. Ser. 982, 1~139.
- 60) Wunner,H.W. (2007). Rabies virus. In: Jackson,A.C. and Wunner,H.W. [eds] Rabies. Second edition, pp.23~68. Academic Press, London.
- 61) Wunner,W.H., Dietzshold,B., Smith,C.L., Lafon,M. and Golub,E. (1985). Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. *Virology.* 140, 1~12.
- 62) Yamada,K., Noguchi,K. and Nishizono,A. (2013). Characterization of street rabies virus variants with an additional N-glycan at position 247 in the glycoprotein. *Arch. Virol.* 159(2), 207~216.
- 63) Yamada,K., Noguchi,K., Nonaka,D., Morita,M., Yasuda,A., Kawazato,H. and Nishizono,A. (2013). Addition of a single N-glycan to street rabies virus glycoprotein enhances virus production. *J.Gen.Virol.* 94, 270~275.
- 64) Yamada,K., Park,CH., Noguchi,K., Kojima,D., Kubo,T., Komiya,N., Matsumoto,T., Mitui,M.T., Ahmed,K., Morimoto,K., Inoue,S. and Nishizono,A. (2012). Serial passage of a street rabies virus in mouse

neuroblastoma cells resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus. Res.* 165, 34~45.

- 65) Yamamoto,S., Iwasaki,C., Oono,H., Ninomiya,K. and Matsumura,T. (2008). The first imported case of rabies into japan in 36 years: a forgotten life-threatening disease. *J Travel Med.* 15(5), 372~374.
- 66) Zhang,G., Wang,H., Mahmood,F., Fu,ZF. (2012). Rabies virus glycoprotein is an important determinant for the induction of innate immune responses and the pathogenic mechanisms. *Vet Microbiol.* 162(2-4), 601~613.
- 67) Zhang,Y., Dean,C., Chessum,L., Nquyen,D., Stewart,M., Taylor,M., Cookson,W.O. and Moffatt,M.F. (2014). Functional analysis of a novel ENU-induced PHD finger 11 (Phf11) mouse mutant. *Mamm. Genome.* 25(11-12), 573~582.
- 68) Zürcher,T., Pavlovic,J. and Staeheli,P. Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology.* 187(2), 796~800.