

氏名(本(国)籍)	濱 本 紀 子(鹿児島県)
主指導教員氏名	岐阜大学 准教授 井 上 智
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第438号
学位授与年月日	平成27年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2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(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
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 西 條 政 幸 副査 帯広畜産大学 教 授 猪 熊 壽 副査 岩 手 大 学 教 授 村 上 賢 二 副査 東京農工大学 教 授 水 谷 哲 也 副査 岐 阜 大 学 教 授 石 黒 直 隆 副査 岐 阜 大 学 教 授 森 川 茂 副査 岐 阜 大 学 准教授 井 上 智

学位論文の内容の要旨

狂犬病ウイルスは、ラブドウイルス科リッサウイルス属に属し、野外流行株である街上毒と街上毒を実験室内で継代することによって宿主に対する末梢感染性が減弱して潜伏期間が短縮・一定化し、さらには免疫誘導能が増強した固定毒(ワクチン株・実験株)に分けることができる。電子顕微鏡で感染細胞を観察すると、街上毒では細胞膜からウイルスが出芽する像が観察されないが、固定毒では細胞膜から高頻度に出芽している像が報告されている。また、最近の研究で、街上毒の固定毒化に伴う培養細胞でのウイルス増殖効率の上昇やマウスに対する病原性の低下は、狂犬病ウイルス G 蛋白質の糖鎖修飾と関連していると報告されている。街上毒が固定毒化する過程で獲得した表現型について、街上毒株と固定毒株で比較解析を行うことにより、固定毒化に伴う弱毒化の機序を解明することができれば、不明な点の多い狂犬病の病理発生とその発症機序を明らかにすることが可能になると考えられる。

本研究では、街上毒が固定毒化する過程で G 蛋白質の N 型糖鎖付加部位が増加することに着目した。そこで、分子生物学的・免疫組織学的手法を用いて街上毒 Kyoto 株と固定毒 CVS-26 株の組み換え G 蛋白質発現系を作製し、種々の変異導入 G 蛋白質を発現した。また、Kyoto 株と CVS-26 株の組み換えウイルスも作製した。これらを用いて G 蛋白質の N 型糖鎖修飾と細胞内局在、ウイルス粒子出芽部位等を比較解析した。さらに、街上毒由来 G 蛋白質と比較して固定毒由来 G 蛋白質発現細胞で有意に発現レベルが上昇する細胞遺伝子群の検索を行うことによって、固定毒化に伴って増加した G 蛋白質の N 型糖鎖修飾とウイルスの弱毒化との関連について解析した。

第一章で、マウス神経芽腫由来の培養細胞(MNA細胞)に Kyoto 株を感染させると、G 蛋

白質は感染細胞の核周囲に局在し、細胞膜には分布しないが、CVS-26 株感染細胞では G 蛋白質が細胞膜に分布することを見出した。そこで、CVS-26 株の G 蛋白質の遺伝子を Kyoto 株の遺伝子に入れ替えた組み換えウイルス rCVS-26(Kyoto-G) 株を作製した。rCVS-26(Kyoto-G) 株感染 MNA 細胞での G 蛋白質の局在から、Kyoto 株の G 蛋白質が細胞膜に分布しない特性を持つことが明らかになった。また、rCVS-26(Kyoto-G) 株は、CVS-26 株由来の 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。rCVS-26 株感染 MNA 細胞では、CVS-26 株の 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するが、rCVS-26(Kyoto-G) を感染細胞では、核周囲で G 蛋白質と N 蛋白質が共局在した。両蛋白質が共局在する部位は、ウイルス粒子の出芽部位であると考えられることから、G 蛋白質の局在部位がウイルス粒子形成部位を規定することが示唆された。

第二章では、Kyoto 株と CVS-26 株の N 型糖鎖付加部位を変異させた組み換え G 蛋白質を MNA 細胞に発現して、G 蛋白質が小胞体・ゴルジ体から細胞膜に輸送されるためには糖鎖付加が必要であることを明らかにした。さらに、街上毒である Kyoto 株の G 蛋白質の第 204 位のアミノ酸に N 型糖鎖を付加した G 蛋白質 (Kyoto rG (S204N)) が、小胞体から細胞膜に輸送されることを明らかにし、固定毒化に伴って増加した G 蛋白質の N 型糖鎖修飾が G 蛋白質の局在を規定することを証明した。しかし、CVS-26 株 G 蛋白質は第 204 位のアミノ酸の N 型糖鎖付加以外にも細胞膜移行に関与する因子を持っていることも示された。

第三章では、Kyoto rG (S204N) を MNA 細胞に発現させて優位に活性化する遺伝子群を DNA マイクロアレイ法により解析した。その結果、Kyoto 株 G 蛋白質発現細胞と比較して Kyoto rG (S204N) 発現細胞では、細胞表面への蛋白質輸送に関わる RTP4 遺伝子と、自然免疫反応に関わる遺伝子 (Ifi44 遺伝子, Mx1 および Mx2 遺伝子, Oas2, Phf11a 遺伝子) の mRNA 発現が有意に上昇していた。これらの細胞由来遺伝子は蛋白質の細胞膜への輸送や自然免疫反応に関わっていることから、街上毒の固定毒化に伴って起こる出芽部位の変化や免疫応答の亢進といった性状変化に寄与すると考えられた。

狂犬病ウイルスのエンベロープ表面に存在する G 蛋白質は、病原性の決定因子として重要であることは多くの論文で示されているが、街上毒の大きな特徴である感染後の長い潜伏期や宿主免疫の不应答を説明できる報告はない。本研究によって、街上毒が固定毒化する過程で獲得した G 蛋白質の第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が、ウイルス粒子の細胞膜からの出芽や宿主の免疫応答の亢進に関与している可能性が示唆された。今後、Kyoto rG (S204N) 発現細胞で見出された、蛋白質の膜輸送や免疫応答に関与する遺伝子群の誘導機序を詳細に解析したり、これらの遺伝子のノックアウト細胞を用いた解析を行うことにより、街上毒が固定毒化する過程で獲得した新たな N 型糖鎖付加部位が、固定毒の病原性低下等にどのように関わるのかが解明されることが期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

狂犬病は、狂犬病ウイルスによる感染症であり、ほぼ 100%の確率で死亡する人獣共通感染症である。狂犬病ウイルスには、野外株である街上毒と街上毒を継代して末梢感染性が減弱し、強い免疫応答能等の性質を獲得した固定毒がある。本学位論文では、街上毒と固定毒を比較研究し、狂犬病ウイルスの固定毒化に関わる性状変化が主に G 蛋白質の N 型糖鎖修飾の違いに起因することを明らかにした。

第 1 章では、固定毒由来 CVS-26 株感染細胞の膜糖蛋白質 (G 蛋白質) が細胞膜に分布し N 蛋白質と共局在するが、街上毒由来 Kyoto 株感染細胞では核周囲に両蛋白質が共局在す

ることを明らかにした。また, Kyoto 株 G 蛋白質を持つ組み換え CVS-26 株感染細胞は, G 蛋白質と N 蛋白質が核周囲に共局在し, G 蛋白質がウイルスの粒子形成部位を規定することが示唆された。

第2章では, Kyoto 株組み換え G 蛋白質をマウス神経芽腫由来 MNA 細胞に発現させると, G 蛋白質は核周囲小胞体に分布し細胞膜に分布しないが, CVS-26 株 G 蛋白質の多くは細胞膜に分布し, 両株 G 蛋白質の N 型糖鎖付加を阻害させると核周囲小胞体に分布することを, また, Kyoto 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸を N 型糖鎖付加部位に置換すると細胞膜に分布することを明らかにした。一方, CVS-26 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸を N 型糖鎖付加部位に変異させても一部が細胞膜に分布したことから, 第 204 位の N 型糖鎖付加は G 蛋白質の細胞膜輸送を規定するが, これ以外にも細胞膜輸送に関与する因子が存在することが示唆された。

第3章では, Kyoto 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸に N 型糖鎖付加部位を導入させた Kyoto 株 G 蛋白質 (S204N) を発現させた細胞における宿主遺伝子プロファイルをマイクロアレイで解析した。その結果, Kyoto 株 G 蛋白質 (S204N) 発現細胞では, 蛋白質の細胞膜輸送に関わる RTP4 遺伝子と自然免疫の誘導に関わる遺伝子群の発現が有意に上昇していた。これらの誘導により, 固定毒に特徴的な G 蛋白質の細胞膜分布と免疫応答増強が説明できる可能性がある。これらの成績は, 街上毒の固定毒化に伴う性状変化を分子レベルで解明することに資する重要な知見と考えられた。

以上の研究成果は, 街上毒が固定毒化の過程で獲得した細胞膜からのウイルス粒子の発芽や宿主の免疫応答の亢進に, G 蛋白質における第 204 位アミノ酸の N 型糖鎖修飾が深く関連していることが示唆された。また, 本研究は街上毒に特徴的な病原性や発症機序の究明に資するものと考えられた。

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: Association between RABV G proteins transported from the perinuclear space to cell surface membrane and N-glycosylation of the sequon Asn²⁰⁴
- 著 者 名: Hamamoto, N., Uda, A., Tobiume, M., Park, CH., Noguchi, A., Kaku, Y., Okutani, A., Morikawa, S. and Inoue, S.
- 学術雑誌名: Japanese Journal of Infectious Diseases
- 巻・号・頁・発行年: In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目: Gene expression analysis of host innate immune responses in the central nervous system following lethal CVS-11 infection in mice
- 著 者 名: Sugiura, N., Uda, A., Inoue, S., Kojima, D., Hamamoto, N., Kaku, Y., Okutani, A., Noguchi, A., Park, CH. and Yamada, A.

学術雑誌名: Japanese Journal of Infectious Diseases

巻・号・頁・発行年: 64 (6) : 463-472, 2011 年