

狂犬病ウイルス P 蛋白質アイソフォームが関与する
病原性発現機構の解明

2016 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岐阜大学)

岡田 和真

狂犬病ウイルス P 蛋白質アイソフォームが関与する
病原性発現機構の解明

岡田 和真

目次

緒言	1
図	10
第 1 章 N 末端領域欠損型 P 蛋白質アイソフォーム (tPs) の 発現能を欠失した CE(NiP)ΔP2-5 株の作出	12
序論	13
材料及び方法	14
培養細胞	14
ウイルス	14
CE(NiP)ΔP2-5 株の作製	15
ダイレクトシーケンス法	15
フォーカスアッセイ	17
プラスミド	18
SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および ウエスタンブロット	18
NA 細胞における各ウイルスの増殖能の検討	19
結果	20
CE(NiP)株感染細胞における P 蛋白質アイソフォームの 発現パターン の検討	20
CE(NiP)ΔP2-5 株の作出	21

CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞における P 蛋白質アイソフォームの 発現パターンの検証	21
培養神経細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株の増殖能	22
考察	23
図表	26
第 2 章 CE(NiP)ΔP2-5 株に導入した変異が P1 の機能性に及ぼす 影響	32
序論	33
材料及び方法	35
培養細胞	35
プラスミド	35
SDS-PAGE およびウエスタンブロット	36
ミニゲノムアッセイ	37
レポーターアッセイによる IFN- β プロモーター活性の測定	38
レポーターアッセイによる ISRE 活性の測定	39
結果	40
ウイルス RNA 合成における CE(NiP) Δ P2-5 株 P1 の機能性	40
CE(NiP) Δ P2-5 株 P1 の IFN 産生抑制活性	40
CE(NiP) Δ P2-5 株 P1 の IFN 応答抑制活性	41
考察	43
図	45

第3章 狂犬病ウイルスの神経病原性における tPs の重要性	53
序論	54
材料及び方法	55
培養細胞及びウイルス	55
Luc 発現 CE(NiP)および CE(NiP) Δ P2-5 株の作出	55
CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株の神経病原性の検討	56
ルシフェラーゼアッセイによるマウス脳内における各株の ウイルス複製能の検討	57
マウス脳内における各株の感染性ウイルス産生能の比較	57
結果	59
脳内接種によるマウスに対する CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の 神経病原性の検討	59
マウス脳内における CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株および CE(NiP)-Luc 株の ウイルス複製能の比較	59
マウス脳内における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の 感染性ウイルス産生能の比較	60
考察	61
図表	63

第 4 章 狂犬病ウイルスの神経侵入性における tPs の重要性	68
序論	69
材料及び方法	70
培養細胞及びウイルス	70
プラスミド	70
ミニゲノムアッセイ	71
CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株の神経侵入性の検討	71
感染マウスの各組織からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成	72
Nested PCR	72
ルシフェラーゼアッセイによるマウス筋肉内における各株の	73
ウイルス複製能の検討	
ルシフェラーゼアッセイによる培養筋肉細胞における各株の	74
ウイルス複製能の検討	
培養筋肉細胞における各株の感染性ウイルス産生能の比較	75
結果	76
筋肉内接種によるマウスに対する CE(NiP) Δ P2-5 株および	76
CE(NiP)株の神経侵入性の比較	
感染マウス体内における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の分布	76
マウス筋肉における CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株および CE(NiP)-Luc 株の	77
ウイルス複製能の比較	
培養筋肉細胞における CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株および CE(NiP)-Luc 株の	77
ウイルス複製能の比較	

培養筋肉細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の 感染性ウイルス産生能の比較	78
筋肉細胞でのウイルス RNA 合成における CE(NiP) Δ P2-5 株 P1 の 機能性	79
考察	80
図表	83
第 5 章 筋肉細胞における tPs の IFN 産生抑制活性	91
序論	92
材料及び方法	93
培養細胞及びウイルス	93
プラスミド	93
レポーターアッセイによる IFN- β プロモーター活性の測定	93
SDS-PAGE およびウエスタンブロット	94
感染細胞からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成	94
リアルタイム PCR	95
結果	97
CE(NiP) Δ P2-5 株または CE(NiP)株を感染させた培養筋肉細胞における <i>Ifn-β</i> 、 <i>Mx1</i> および <i>Oas1</i> 遺伝子発現量の比較	97
筋肉細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 の IFN 産生抑制活性	97
筋肉細胞における各 P 蛋白質アイソフォームの IFN 産生抑制活性	98
考察	100

図	104
結論	107
図	109
謝辞	110
引用文献	111

諸言

狂犬病は、重篤な神経症状を主徴とするウイルス性人獣共通感染症である。本病に対する有効な治療法は、いまだ確立されていない。一般に、狂犬病の潜伏期間は長く不定であり、通常 20～90 日、まれに 6 年の例も報告されている (18, 36)。患者は、発熱、頭痛などの前駆症状を呈した後、不可逆的に進行する神経症状を示し、ほぼ 100%が死亡する。狂犬病は、日本、オセアニアおよびスカンジナビア半島などの一部地域を除く全世界に広く分布しており、その死者数はアジア、アフリカなどの発展途上国を中心に、年間約 59,000 人と推定される (13)。本病の病原体である狂犬病ウイルス（ラブドウイルス科リッサウイルス属）は、幅広い宿主域を持ち、ヒトを含めた全ての哺乳類に対して感染性を示すと考えられている。その中でも、発展途上国ではイヌが、先進国ではコウモリ、アライグマおよびキツネなどの野生動物が主要な病原巣となる (14)。特にイヌは、ヒトに対する感染源動物として重要である。

狂犬病は、通常、感染動物の唾液中に存在する狂犬病ウイルスが咬傷を介して感染することにより伝播する。体内に侵入したウイルスは筋肉細胞における増殖を経て末梢神経に感染し、さらに軸索輸送により脊髄へと感染を拡げる。脊髄に侵入したウイルスは神経細胞内で増殖しつつ、シナプス間伝播および軸索輸送を繰り返しながら脳に到達する。その後、狂犬病ウイルスは、中枢神経系における感染拡大の結果、重篤な神経症状を伴う致死的な非化膿性脳炎を引き起こす (18)。

幸いなことに、狂犬病は、適切なワクチン接種を行うことで効果的に予防することが可能である。一般的に、狂犬病ワクチンの接種は、暴露前および暴露

後免疫に区別することができる。暴露前免疫は、いわゆる予防接種を意味し、ウイルスの暴露を受けるリスクの高い人や、人への主要な感染源動物であるイヌなどに対して実施される。一方、暴露後免疫は、動物から咬傷を受けた人を対象に行われており、潜伏期間中に十分な防御免疫を誘導することで発症を予防する方法である。WHOは、暴露後免疫のスケジュールとして、暴露後0、3、7、14および28日目の計5回にわたるワクチン接種を推奨している(42)。加えて、重度の咬傷により大量のウイルス暴露を受けたと考えられる場合には、狂犬病ウイルスに対する免疫グロブリンも初回ワクチン接種時に接種することが推奨されている。今も被害が集中する発展途上国を中心に、年間約1,500万人が本免疫法を受けているとされる(43)。

狂犬病の発症予防法として暴露後免疫の高い有効性が認められているものの、本法にはいくつかの問題点が存在する。前述のとおり、本法はその有効性を保証するために、暴露直後から約1ヶ月にわたる計5回ものワクチン接種、場合によっては免疫グロブリンの接種も必要となる。しかしながら、狂犬病の主な流行国であるアジア、アフリカなどの発展途上国では、高価なワクチンの頻回接種および免疫グロブリンの接種の実施に相当な経済的負担が要求されるため、本法の普及は不十分なままである(37)。以上より、現行の暴露後免疫に替わる、より安価で有効な暴露後発症予防法の開発が求められている。そのためには、狂犬病ウイルスが体内に侵入してから中枢神経系に到達するまでの機構を解明し、新規予防法の開発に有用となる基盤情報を蓄積する必要がある。

また、発展途上国において、主たる感染源動物のイヌにおける予防接種率が低いことも、狂犬病の制圧を拒む大きな要因となっている。この低い予防接種

率は、動物用の不活化ワクチンが高価なことを主な原因としている。従って、この問題を解決する手段として、より安価な弱毒生ワクチンの使用が有効と考えられる。弱毒生ワクチンは、不活化ワクチンと異なり、接種個体内において増殖する感染性ウイルスを含むため、少ないウイルス量で効果的に免疫を誘導する。そのため、一般的に生ワクチンの製造コストは不活化ワクチンよりも低い。さらに、生ワクチンの投与は、筋肉内接種に加え、経口接種のように注射器を使用しない方法によっても可能なことが報告されている(1, 3, 41)。以上より、生ワクチンを使用することで、安価かつ簡便にイヌへのワクチン接種を行うことができる。しかしながら、生ワクチン株の残存病原性および病原性復帰の可能性など、その安全性には懸念が残るため、現状ではヒトと生活圏を共有するイヌに生ワクチンを使用することは難しい。このような背景から、近年では、遺伝子改変技術による安全な生ワクチン候補株の作出が試みられている(10, 26)。すなわち、ウイルスゲノムに任意の弱毒変異を導入することにより、高度に弱毒化されたワクチン株の作製が可能となる。このような技術を用いて、安全性の高い弱毒生ワクチン株を作出するためには、狂犬病ウイルスの病原性決定機構に関する情報のさらなる蓄積が必要となる。

さらに、狂犬病に対する治療法が確立していないことも、本病による死亡者数が減少しない主要な原因である。通常、狂犬病ウイルスの感染は、脳内に軽微な炎症反応しか引き起こさないことから(9, 18)、狂犬病ウイルスは、脳内において宿主の免疫反応を回避していることが考えられる。このことは、狂犬病ウイルスの免疫回避能を抑制する化合物を開発することにより、ウイルスを脳内から排除できる可能性を示している。また、狂犬病ウイルスに感染した脳で

は、神経細胞の変性や壊死がほとんど観察されないため (18, 25)、狂犬病の致死的な神経症状は、脳の器質的変化ではなく、その機能障害に起因することが示唆されている。この事実は、脳内での神経機能障害の原因を除去することで、狂犬病の神経症状を治療できる可能性を示している。上記のように、脳内の免疫活性化、あるいは神経機能障害の原因除去による狂犬病の治療法を開発するためには、脳内における狂犬病ウイルスの病態形成機構を解明する必要がある。

以上より、狂犬病に対する新たな暴露後発症予防法の開発、安全性の高い狂犬病生ワクチン株の樹立、ならびに狂犬病に対する治療法の開発のためには、いずれも狂犬病ウイルスの病原性発現機構に関する基盤情報が必要となる。しかしながら、その分子機構については不明な点が多い。

狂犬病ウイルスは約 12 キロベースのマイナス鎖一本鎖 RNA のゲノムを持ち、そのゲノムは 3'末端から N、P、M、G および L 遺伝子の順に 5 つの構造蛋白質 (それぞれ N、P、M、G、および L 蛋白質) をコードしている。ウイルス粒子は、宿主細胞由来の脂質二重膜、M および G 蛋白質からなるエンベロープ、ならびにゲノム RNA と N、P および L 蛋白質からなるらせん対称のヌクレオカプシドで構成されている。M 蛋白質は脂質二重層を裏打ちしており、ウイルス粒子形成および出芽に重要な役割を果たす (11, 15, 23, 44)。G 蛋白質はエンベロープ外部にスパイク状に突出し、宿主細胞への吸着および侵入に関与する (9, 44)。一方、N 蛋白質はゲノム RNA と結合し、ヌクレオカプシドの骨格となる N-RNA 複合体を形成する (12, 44)。RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである L 蛋白質は、その共因子である P 蛋白質を介して N 蛋白質と結合し、N-RNA 複合体を鋳型としてゲノム RNA の複製および mRNA の転写を行う (7, 12, 44)。さらに、P

蛋白質は、ウイルスゲノム RNA の転写・複製に必須の役割を果たすだけでなく、宿主の自然免疫に対するウイルスの抵抗性においても重要な役割を担うことが報告されている (2, 4, 5, 16, 27, 30, 35, 38-40)。

自然免疫において重要な役割を果たす宿主因子として、インターフェロン (IFN)- α および IFN- β に代表される I 型 IFN が知られている。感染細胞では、ウイルスゲノム由来 2 本鎖 RNA などのウイルス因子の認識をきっかけとして、IFN 産生を司るシグナル伝達経路が活性化される (19)。具体的には、ウイルス由来 2 本鎖 RNA を認識した Toll like receptor-3、もしくは Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) などのパターン認識受容体が活性化することにより、IFN 産生系の転写因子である Interferon Regulatory Factor 3 (IRF-3) がリン酸化され、活性型となる。活性化された IRF-3 は核内の DNA に結合し、IFN プロモーターを活性化させることで I 型 IFN 遺伝子の転写を誘導する。さらに、発現した I 型 IFN が、感染細胞自身あるいはその近傍の細胞に発現する I 型 IFN 受容体に結合すると、抗ウイルス作用を担う IFN 応答のシグナル伝達経路の活性化が引き起こされる。その結果、IFN 応答系の転写因子である Signal Transducers and Activator of Transcriptional (STAT) 1 および 2 が活性型となる。活性化された STAT1 および 2 は、核内に輸送された後、IFN 誘導性遺伝子のプロモーター領域に存在する IFN-stimulated responding element (ISRE) に結合する。その結果、2'-5'oligoadenylate synthetase (Oas) や Myxovirus resistance (Mx) などの抗ウイルス蛋白質をコードする IFN 誘導性遺伝子の転写が促進され、細胞は抗ウイルス状態となる。

これまでに、狂犬病ウイルスの P 蛋白質は、これら I 型 IFN の産生および応

答のシグナル伝達経路のそれぞれを阻害することが証明され、同ウイルスの IFN アンタゴニストとして機能することが明らかとなっている (4, 5, 16, 27, 30, 38-40)。Brzózka ら (4) は、P 蛋白質が IRF-3 の活性化を抑制することで、感染細胞からの I 型 IFN の産生を阻害することを報告している。また、P 蛋白質は、STAT1 および STAT2 に結合し、その核内移行を阻害することで、IFN 応答を抑制することが明らかとなっている (5, 16, 27, 38, 39)。前述のとおり P 蛋白質はウイルスゲノム RNA の複製において必須の役割を持つだけでなく、このように宿主の免疫に対するウイルスの抵抗性においても重要な役割を有している。

狂犬病ウイルス感染細胞において、P 蛋白質は 5 種類のアイソフォームとして発現される (図 1) (6)。各アイソフォームの翻訳は、P 遺伝子 mRNA 上にアミノ酸の読み枠を同じくして存在する 5 つの開始コドンより、リボソームのリーキースキャニング機構によって行われ、その結果として P 蛋白質の全長を有する P1、ならびに N 末端を様々な長さで欠損している P2~P5 [N terminally-truncated P proteins (tPs)] が発現される。具体的には、完全長の P1 が 297 個のアミノ酸からなる一方で、P2、P3、P4 および P5 は、それぞれ P1 の 20~297、53~297、69~297、83~297 位に相当するアミノ酸領域から構成される。アイソフォームの中でも P1 は、その 1~19 位のアミノ酸領域によって L 蛋白質と結合することにより RNA ポリメラーゼの共因子として機能する (8)。一方、tPs は L 蛋白質結合領域を含む N 末端領域を欠損しているため、RNA ポリメラーゼの共因子としての機能を保持しない。興味深いことに、tPs の翻訳開始点である 4 つの開始コドン AUG (+鎖で表示) は、既知のウイルス

株間において高度に保存されていることから (20, 28)、狂犬病ウイルスの感染において、tPs が何らかの重要な役割を果たすことが示唆される。

狂犬病ウイルスの tPs の機能は長らく不明であったものの、近年のいくつかの研究によってこれらの機能が明らかにされつつある。Marschalek ら (21) は、Internal ribosome entry site の活用により P2 を過剰に発現するよう遺伝子改変された狂犬病ウイルスを用いて、I 型 IFN に対するウイルスの抵抗性に P2 が関与することを報告している。また、プラスミドを用いた発現系の実験によって、P3 が STAT1 の核内移行および核内での STAT1 と DNA の結合を阻害することも明らかとなっている (27, 39) (図 2-Ⓐ)。これらに加えて、Blondel ら (2) は、P3 が抗ウイルス蛋白質である Promyelocytic leukemia protein (PML) と結合することを示している (図 2-Ⓑ)。以上の結果より、複数の P 蛋白質アイソフォームが、自然免疫に対するウイルスの抵抗性に関与することが示唆されている。これらの知見は、tPs が IFN アンタゴニストとして、狂犬病ウイルスの病原性発現に寄与している可能性を示しているものの、病原性におけるその重要性はいまだ不明のままである。

狂犬病ウイルスの病原性は、末梢組織から中枢神経系まで感染を拡大するウイルスの能力である神経侵入性、ならびに中枢神経系内で感染拡大し、宿主に致命的な神経症状を引き起こす能力である神経病原性によって決定される。これまで、狂犬病ウイルスの神経侵入性および神経病原性の機構を明らかにするために、遺伝的に近縁であり、かつ病原性の異なる 2 株を用いた比較解析が行われてきた。そのうち、狂犬病ウイルス固定毒 (実験室株) である西ヶ原株は、筋肉内および脳内接種によりマウスに致命的感染を引き起こすのに対し、西ヶ

原株を鶏胚線維芽細胞で 100 代継代することによって確立された Ni-CE 株は、筋肉内接種ではマウスを発症させず、脳内接種では軽度の症状を伴う非致死感染を引き起こすことが明らかとなっている (34, 45)。以上の結果は、これら 2 株の神経侵入性および神経病原性に明瞭な違いが存在することを示している。さらに、西ヶ原株由来の P 遺伝子を Ni-CE 株のゲノムに保有するキメラウイルス CE(NiP)株が、筋肉内および脳内接種により致死感染をマウスに引き起こすことが報告されている (34, 45)。以上のことより、P 遺伝子が狂犬病ウイルスの神経侵入性および神経病原性の両者において重要であることが明らかとなった。さらに、神経侵入性および神経病原性を有する CE(NiP)株は、P 蛋白質アイソフォームが関与する病原性発現機構を解明する上で有用なウイルスであると考えられた。

本研究では、狂犬病ウイルスの病原性発現機構における tPs の重要性を検討する目的で、CE(NiP)株の遺伝子操作により、全ての tPs の発現を欠失した変異株 [CE(NiP) Δ P2-5 株] を作製し、その病原性を検証した。第 1 章では、CE(NiP) Δ P2-5 株に導入した変異が感染細胞内での tPs の発現に与える影響を検討するため、同株感染細胞内での P 蛋白質アイソフォームの発現パターンを検証した。さらに、培養神経細胞における同株の増殖効率を検討した。第 2 章では、CE(NiP) Δ P2-5 株に導入した変異が P1 の機能に与える影響を検討するため、同株の P1 が RNA ポリメラーゼ共因子としての活性、ならびに IFN アンタゴニスト活性を保持するかどうかを検証した。第 3 章では、神経病原性における tPs の重要性を検討する目的で、CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株をマウスに脳内接種し、各株の病原性を比較した。また、第 4 章では、神経侵入性に

における tPs の重要性を検討する目的で、マウスへの筋肉内接種により各株の病原性を比較し、さらに感染マウスにおける各株の体内分布、ならびに筋肉細胞における各株の増殖効率を比較した。第 5 章では、筋肉細胞における tPs の IFN 産生抑制活性を検討するため、CE(NiP) Δ P2-5 株を感染させた筋肉細胞における IFN 遺伝子の発現量を検証した。さらに、筋肉細胞における各 P 蛋白質アイソフォームの IFN 産生抑制能を検討した。以上、狂犬病ウイルスの病原性発現において tPs が果たしている役割の解明を試みた。

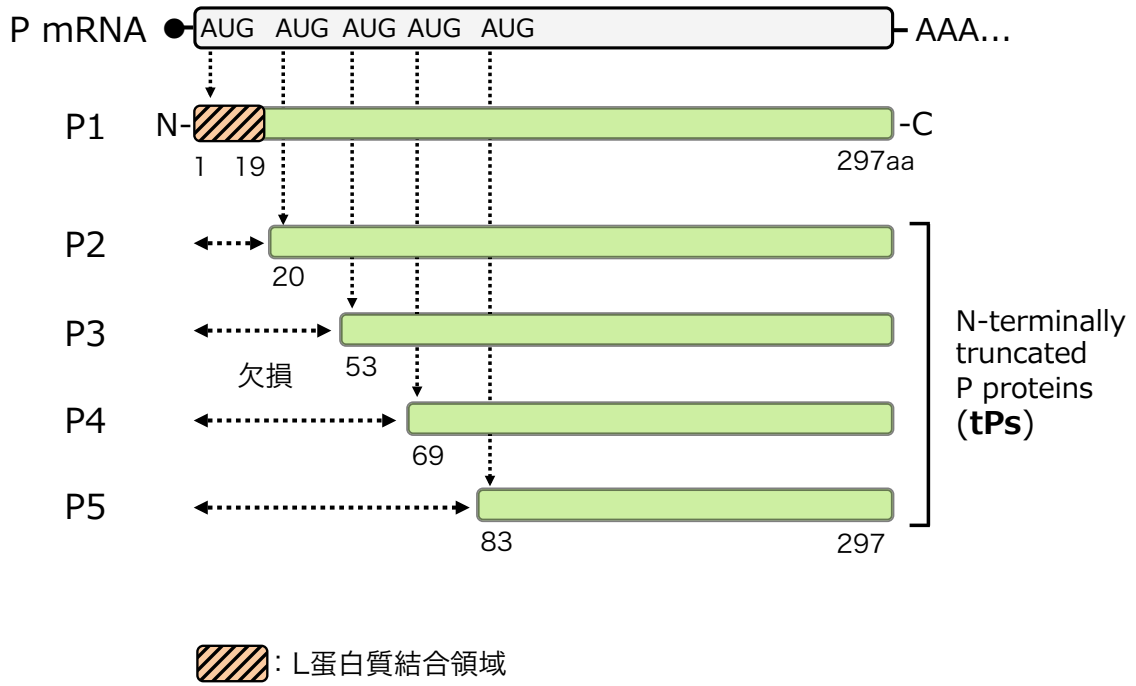


図 1. P 遺伝子 mRNA から発現する P 蛋白質アイソフォームの模式図

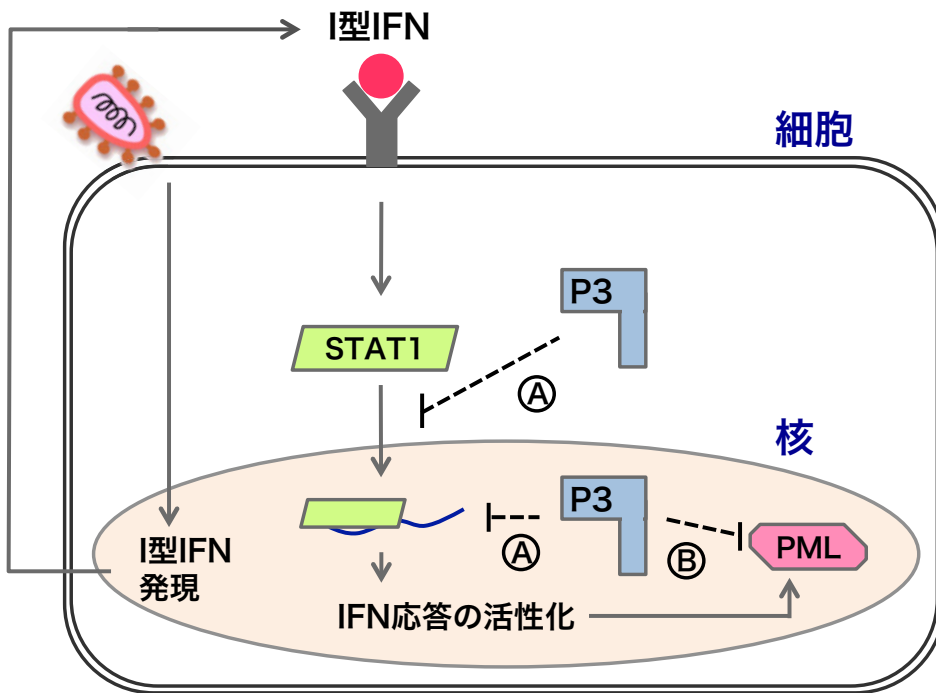


図 2. これまでに報告されている P3 の機能の模式図

- Ⓐ: P3 が STAT1 と結合し、STAT1 の核内移行および核内での DNA との結合を阻害することが示唆されている(27, 39)。
- Ⓑ: P3 が抗ウイルス蛋白質の PML に結合することが報告されている(2)。

第 1 章

N 末端領域欠損型 P 蛋白質アイソフォーム (tPs) の
発現能を欠失した CE(NiP) Δ P2-5 株の作出

序論

狂犬病ウイルスの P 遺伝子 mRNA 上には、同じアミノ酸の読み枠に 5 つの開始コドンが存在し、P 蛋白質の全長を有する P1、ならびに N 末端領域を様々な長さで欠損した tPs (P2~P5) が翻訳される (緒言 図 1) (6)。これまでの研究により、P1 は RNA ポリメラーゼの共因子としてウイルス増殖に必須の役割を持つことが判明している (44)。一方、tPs については、いくつかのアイソフォームに IFN アンタゴニストとしての機能が報告されているものの (21, 27, 39)、その機能の詳細は明らかにされておらず、また病原性における重要性も不明のままである。

そこで第 1 章では、狂犬病ウイルスの病原性発現における tPs の重要性を検討するツールを作製する目的で、神経病原性および神経侵入性を共に有する CE(NiP)株の遺伝子操作により、tPs の発現能を欠失した変異株、CE(NiP) Δ P2-5 株の作出を試みた。具体的には、CE(NiP)株 P 遺伝子上の tPs の翻訳開始点である 4 つの開始コドン AUG を、全て AUA に変異させることとした (図 1-1)。さらに、CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞における P 蛋白質アイソフォームの発現パターン、ならびに同株のウイルス増殖効率を検討した。

材料および方法

培養細胞

マウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞 (32) を、CO₂ インキュベーター (ヒラサワ) 内で培養した (37°C、設定 CO₂ 濃度 : 5%)。NA 細胞の増殖用培地 (GM) として、10%ウシ胎仔血清 (FCS) (Gibco、製品番号: 10437-028) 添加イーグル MEM 培地 (E-MEM) (日水、製品番号: 05900) を用いた。また、T7 ポリメラーゼを恒常的に発現する BHK 細胞 (BHK/T7-9 細胞) (17) を、5%FCS および 10%トリプトース・ホスフェイト・ブロス (Becton Dickinson、製品番号: 260300) 添加 E-MEM を用いて培養し (37°C、設定 CO₂ 濃度 : 5%)、後述の組換え狂犬病ウイルス株の作出に用いた。

ウイルス

Ito ら (17) が報告した組換え狂犬病ウイルス作出系によって、CE(NiP)株の全長ゲノム RNA を発現するゲノムプラスミド pCE(NiP) (34) から同株を回収した。具体的には、1 ウェルあたり、8.1 μ l の *TransIT-LT1* (Mirus、製品番号: MIR2300) を 50 μ l の OPTI-MEM (Gibco、製品番号: 31985-070) と混合した後、室温で 20 分間静置することによりプラスミド導入試薬を調整した。次に、1 ウェルあたり 2 μ g の pCE(NiP)、ならびに狂犬病ウイルス RC-HL 株の N、P および L 蛋白質を各々発現する 0.4 μ g の pT7IRES-RN、0.1 μ g の pT7IRES-RP および 0.2 μ g の pT7IRES-RL を含むプラスミド溶液を、50 μ l の OPTI-MEM と混合し、プラスミド溶液を調整した。調整したプラスミド導入試薬およびプラスミド溶液を混和し、20 分間室温で静置した後、混合液を組

織培養プレート（Greiner Bio-One、24 ウェル、製品番号: 662160）に培養した BHK/T7-9 細胞に滴下した。37°C で 5 日間培養した細胞の培養液を 1,400 ×g、10 分間の条件で遠心し、ウイルスを含むその上清を回収した後、-80°C で保存した。保存した上清を 10 倍希釈した後、接着性細胞フラスコ（Greiner Bio-One、75cm²、製品番号: 658170）に培養した NA 細胞に接種した。接種 5 日後に回収した培養液を 1,400 ×g、10 分間の条件で遠心した後、得られた上清を CE(NiP) 株のストックウイルスとし、-80°C で保存した。

CE(NiP)ΔP2-5 株の作製

CE(NiP)ΔP2-5 株の完全長ゲノム RNA を発現するゲノムプラスミド [pCE(NiP)ΔP2-5] を作製するため、以下の実験を行った。常法の DNA クローニング技術を用いて、P 蛋白質の 20、53、69 および 83 位のメチオニン (Met) が全てイソロイシン (Ile) に置換されるように pCE(NiP) に変異を導入した (図 1-1)。作製されたゲノムプラスミド pCE(NiP)ΔP2-5 から、CE(NiP) 株と同様の方法 (17) によってウイルスを回収した。前述した同様の方法により、NA 細胞および保存したウイルスを用いて CE(NiP)ΔP2-5 株のストックウイルスを作製した。また、回収されたウイルスの変異導入領域の塩基配列を、後述のダイレクトシーケンス法によって決定し、同株のゲノムに目的の変異が導入されていることを確認した。

ダイレクトシーケンス法

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN、製品番号 52904) を用いて、

CE(NiP) Δ P2-5株のストックウイルス 140 μ l から RNA 溶液 50 μ l を抽出した。その後、抽出された RNA を鋳型とし、逆転写 (RT) 反応を行った。具体的には、RNA 溶液 11 μ l に Random Primer [hexadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)₆] (TaKaRa、製品番号: 3801) および 10 mM dNTP Mix (Invitrogen、製品番号: 18427-013) を各々 1 μ l ずつ混和し、65°C で 5 分間加温した後に氷上で急冷した。その溶液に 4 μ l の 5 \times First-Strand Buffer、各々 1 μ l の 0.1 M DDT、RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen、製品番号: 10777-019) および SuperScriptIII Reverse Transcriptase を混和した。この反応液を 25°C / 5 分間、50°C / 60 分間、70°C / 15 分間の条件で加温して cDNA を合成し、PCR に使用するまで 4°C で保存した。

次に、*TaKaRa Ex Taq Hot Start Version* (TaKaRa、製品番号: RR006A)、ならびにプライマーとして RHNS18(+)および RHN7(-) (表 1-1) を用いて、合成された cDNA を鋳型に PCR を行い、4 つの変異導入部位を含む P 遺伝子領域 cDNA を増幅した。具体的には、2.5 μ l の 10 \times *Ex Taq Buffer*、2 μ l の dNTP Mixture、0.25 μ l ずつの 50 μ M プライマーおよび 0.125 μ l の *TaKaRa Ex Taq HS* を、滅菌超純水に加えて全量が 24 μ l となるよう PCR 調整液を作製した。その PCR 調整液に 1 μ l の鋳型 cDNA を混和し、以下の条件で反応を行った。調製液を 95°C / 5 分間の条件で加温した後、95°C / 30 秒間の熱変性、58°C / 30 秒間のアニーリング、72°C / 1 分間の伸長反応の処理を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C / 5 分間の条件で保温した。増幅後、精製された cDNA を鋳型として用いて、*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems、製品番号: 4336917) により、シーケンス反応を行った。なお、プライマーには RHN28(+)を用いた。

反応後のサンプルを精製した後に、3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems) による解析を行った。

フォーカスアッセイ

組織培養プレート (Greiner bio-one、24 ウェル、製品番号: 662160) に培養した NA 細胞を用いて、フォーカスアッセイによるウイルス感染価の測定を行った。5%FCS 添加 E-MEM を用いて 10 倍段階希釈した各ウイルス液を、1 ウェルあたり 0.1 ml ずつ NA 細胞に接種し、37°C / 1 時間の条件でウイルスを吸着させた。ハンクス液 (日水、製品番号: 05905) を用いて細胞を洗浄したのち、0.5%メチルセルロース (ナカライテスク、製品番号: 22224-55) ・10%FCS 含有 E-MEM を各ウェルに 0.5 ml 加え、CO₂ インキュベーター内で培養した。接種 2 日後に 2%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (和光純薬、製品番号: 163-20145) を加え、1 時間感作させることで細胞を固定した後、100%メタノール (和光純薬、製品番号: 134-01833) を用いて膜透過処理を 1 分間行った。次に、間接蛍光抗体法 (IFA) により感染細胞を染色した後、各ウェルに形成されたフォーカス (ウイルス抗原陽性細胞が凝集するスポット) の数に基づきウイルス感染価を算出した。なお、IFA には一次抗体として抗狂犬病ウイルス N 蛋白質モノクローナル抗体 13-27 (24) を、二次抗体としてフルオロセイン・イソチオシアネート (FITC) 標識抗マウス IgG (Cappel、製品番号: 55514) を用いた。フォーカスの観察には Axiovert200 顕微鏡 (Carl Zeiss Microscopy Co., Ltd.) を用いた。

プラスミド

各 P 蛋白質アイソフォームを発現するコントロールプラスミドとして使用するため、P1 から P5 を発現するプラスミドを常法の DNA クローニング技術を用いて構築した。すなわち、CE(NiP)株のゲノムプラスミドを鋳型として、表 1-2 のプライマーを用いた PCR を行い、P1、P2、P3、P4、もしくは P5 遺伝子領域を含む 5 種の cDNA を増幅した。これらの増幅産物を、哺乳類細胞発現ベクター pCAGGS/MCS (東京大学医科学研究所 河岡義裕教授より分与) のクローニング部位に挿入した。作製した CE(NiP)株の P1 から P5 をそれぞれ発現するプラスミドを、各々 pCAGGS-P1、-P2、-P3、-P4 および -P5 と命名した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウエスタンブロット

組織培養プレート (Greiner bio-one、24 ウェル、製品番号: 662160) に培養した NA 細胞に、1 ウェルあたり 0.8 μ g の pCAGGS-P1 ~ -P5 を各々導入した。このとき、プラスミド導入試薬として Lipofectamine 2000 (Invitrogen、製品番号: 11668027) を使用した。また、同様に 24 ウェルの組織培養プレート上に培養した NA 細胞に、CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株を感染多重度 (MOI、細胞 1 個あたりの感染ウイルス粒子数) = 2 で接種した。導入および感染 2 日後に、各々の細胞をダルベッコ PBS(-) (日水、製品番号: 05913) を用いて洗浄した後、1 ウェルあたり 50 μ l の Sample Buffer Solution (2ME+) (\times 2) (和光製薬、製品番号: 196-11022) を用いて細胞を溶解・回収した。各細胞溶解液中の蛋白質を熱変性させた後、10%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。

電気泳動後、トランスブロットTurboブロットシステム (Bio-Rad) を用いて、ゲル中の蛋白質をPolyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。次に、5% スキムミルクおよび0.1% Tween20を含むPBSを用いてPVDF膜をブロッキングした後、一次抗体として、P1の187~197位のアミノ酸領域を認識する抗ウイルスP蛋白質ペプチド・ウサギ抗体 (α P1-5) (和光製薬で製造) (図1-1) あるいは抗チューブリンマウスモノクローナル抗体 (Sigma、製品番号: T5168) を反応させた。さらに洗浄した後、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウスIgG抗体 (Cappel、製品番号: 55567) あるいはHRP 標識抗ウサギIgG抗体 (Cappel、製品番号: 55676) を反応させた。Western Lightning Plus ECL kit (Perkin-Elmer、製品番号: NEL103001EA) を用いて化学発光させた後、ChemiDoc XRS+システム (Bio-Rad) によりPVDF膜上のシグナルを検出した。

NA 細胞における各ウイルスの増殖能の検討

組織培養プレート (Greiner bio-one、6 ウェル、製品番号: 657160) に培養した NA 細胞に、CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株を MOI=0.01 となるように接種し、1、3および5日後に培養上清を回収した。その後、前述のフォーカスアッセイにより培養上清中のウイルス感染価を測定した。なお、上記のウイルス接種については、1条件あたり3つのウェルを用いて行い、各々の上清中のウイルス感染価の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には *t* 検定を適用した。

結果

CE(NiP)株感染細胞における P 蛋白質アイソフォームの発現パターンの検討

CE(NiP)株感染細胞における tPs の発現を検討する目的で、CE(NiP)株感染 NA 細胞をウェスタンブロットにより解析した (図 1-2)。同時に、各アイソフォームの移動度を示すコントロールとして、pCAGGS-P1~P5 を各々導入した NA 細胞を解析に用いた。プラスミド導入細胞における各アイソフォームの発現を確認できたことより、本研究において使用した α P1-5 は全てのアイソフォームを検出可能な抗体であることが確認された (レーン番号 2~6)。さらに、組換え蛋白質の移動度の比較により、P1 の移動度が P2 よりも僅かに大きいことが明らかとなった (レーン番号 2 および 3)。なお、これらプラスミド導入細胞では、各々のプラスミドがコードする最長の P 蛋白質アイソフォームのみが検出され、それ以外のアイソフォームの発現は確認されなかった。

上記の組換え蛋白質のバンドの移動度に基づき、CE(NiP)株感染細胞における tPs の発現パターンを検証した (図 1-2、レーン番号 8)。CE(NiP)株感染細胞において P1 もしくは P2 の発現を示すバンドが検出されたものの、これらの移動度の近似により P1 および P2 の発現を区別して確認することはできなかった。また、P3 の発現を示すバンドは検出されたものの、P4 および P5 の発現は検出されなかった。しかしながら、P3 の発現が確認できたことより、CE(NiP)株感染細胞ではリボソームのリーキスキャニング機構による翻訳が起きていることが確認された。

CE(NiP) Δ P2-5 株の作出

CE(NiP) Δ P2-5 株を作出するために、各種プラスミドを BHK/T7-9 細胞に導入した。導入 5 日後の上清中には、感染性ウイルスの存在が確認された（データ未掲載）。得られたウイルスの P 遺伝子の一部をダイレクトシーケンスにより解析した結果、P 遺伝子上の tPs の翻訳開始点である 4 つの開始コドン AUG が、全て AUA に変異していることが確認された（図 1-3）。以上より、CE(NiP) Δ P2-5 株の作出に成功したことを確認した。

CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞における P 蛋白質アイソフォームの発現パターンの検証

CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞における P 蛋白質アイソフォームの発現パターンを検証するため、CE(NiP) Δ P2-5 株を感染させた NA 細胞をウエスタンブロットにより解析した（図 1-2、レーン番号 9）。CE(NiP)株感染細胞において検出された P3 の発現を示すバンドは、CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞では検出されなかった（図 1-2、レーン番号 9）。さらに、CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞において最もシグナル強度の強いバンドが、CE(NiP)株感染細胞での P1 もしくは P2 を示すバンドより僅かに速く移動した。このことから、CE(NiP)株感染細胞における P2 の発現が確認されたと同時に、CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞では P2 の発現量が著しく減少していることが示された（図 1-2、レーン番号 8 および 9）。以上より、CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞では tPs の発現が欠失していることが示された。

培養神経細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株の増殖能

培養神経細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株の増殖能を検証するため、NA 細胞に CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株を接種し、経時的に培養上清中のウイルス感染価を測定した (図 1-4)。両株のウイルス感染価は時間経過と共に上昇し、互いに類似した増殖曲線が確認された。さらに、接種 5 日後には、CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株のウイルス感染価は、それぞれ 1.7×10^8 および 3.5×10^8 FFU/ml を示し、両ウイルス感染価に有意な差は認められなかった ($p \geq 0.05$)。

考察

本章の実験において、CE(NiP)株を感染させた神経由来 NA 細胞では、P1、P2 および P3 の発現が検出されたのに対して、P4 および P5 の発現は検出されなかった(図 1-2)。同様の現象は、別の狂犬病ウイルス株である Challenge Virus Standard (CVS) 株を用いた過去の報告でも確認されている (6)。一方、その報告の中では、精製した CVS 株のウイルス粒子中から P4 および P5 が検出されている。このことは、ウイルス粒子中に感染細胞内よりも高濃度の P4 および P5 が存在することだけでなく、感染細胞内では非常に低いレベルではあるものの、P4 および P5 が確かに発現していることを示している。従って本研究では、CE(NiP)株感染細胞では、低レベルながらも P4 および P5 が発現されていると仮定し、実験を計画した。

ウェスタンブロットによる解析において、CE(NiP)株感染 NA 細胞では P3 の発現が明瞭に検出されたのに対して(図 1-2、レーン番号 9)、pCAGGS-P1~P5 を導入した NA 細胞では各々のプラスミドがコードする最長のアイソフォームの発現のみが確認された(図 1-2、レーン番号 2~6)。このような結果より、何らかのウイルス感染刺激が細胞内での tPs の発現を促進している可能性が考えられた。実際に、この可能性は以前の成績によっても支持されている (6)。すなわち、T7 プロモーター依存的に P 蛋白質を発現するプラスミドを導入した細胞に、T7 RNA ポリメラーゼを発現するワクチニアウイルスを感染させた場合、その細胞において tPs の発現が誘導されることがこれまでに報告されている。興味深いことに、Shabman ら (33) は、細胞がストレス状態にある時、エボラ

ウイルス L 遺伝子 mRNA 上に存在する 2 番目の開始コドンからの翻訳が促進されることを報告している。以上のことから、狂犬病ウイルス感染細胞においても、感染刺激によって発生したストレスが tPs の発現を誘導している可能性が考えられる。

本研究では、CE(NiP) Δ P2-5 株を作出するため、P 遺伝子上の tPs の翻訳開始点である 4 つの開始コドン AUG (Met) を、全て AUA (Ile) へと変異させた (図 1-1)。この Met を Ile へと置換するアミノ酸変異は、P3 の翻訳開始点を持たないごく一部の野外流行株 [例: V123.DG (GenBank 登録番号: AF369318) および V124DG (AF369319)] でも確認されている変異である (28)。また、Met および Ile は共に疎水性アミノ酸に分類されることから、各アミノ酸の置換は P1 の分子構造およびその機能に大きく影響しないと予想される。さらに、以前の研究において、狂犬病ウイルス SAD L16 株の遺伝子操作により、P2、P3 および P5 の開始コドンに Ile をコードする塩基を導入した変異株が作出されている。その研究では、培養細胞における同変異株および元株である SAD L16 株の増殖能を比較しており、両株の増殖能が同等であることを示している (30)。以上より、本研究では CE(NiP) Δ P2-5 株の作出のため、tPs の開始コドンを、Ile をコードする AUA に置換することとした。

ゲノムプラスミド pCE(NiP) Δ P2-5 から回収された感染性ウイルスを、ダイレクトシーケンスによって解析した結果、同ウイルスの P 遺伝子に前述の変異が存在することが確認された (図 1-3)。従って、CE(NiP) Δ P2-5 株が回収できたと考えられた。さらに、CE(NiP) Δ P2-5 株感染 NA 細胞における P 蛋白質アイソフォームの発現パターンを検証した結果、同感染細胞では P2 および P3 の

発現が欠失していることが確認された（図 1-2、レーン番号 9）。以上より、CE(NiP) Δ P2-5 株作製のために P 遺伝子に導入した 4 つの AUA の変異が、同株の tPs 発現能を欠失させることが示された。

NA 細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の増殖能を検討した結果、接種 5 日後における両株の感染価間に有意差が認められなかったことから、両株は同等の増殖能を有していることが示された（図 1-4）。この成績は、CE(NiP) Δ P2-5 株が、tPs の発現能を欠失しつつも、培養神経細胞における増殖能を保持していることを示している。これらの知見と同様に、前述した SAD L16 変異株も、tPs の発現能を欠失しつつ、元株と同等の増殖能を保持していることが示されている（4）。以上より、培養細胞におけるウイルス増殖に tPs の発現が必要ではないことから、tPs はウイルスの増殖に必須な役割を持たないアクセサリ蛋白質であると考えられた。

第 1 章では、P 遺伝子への変異導入、ならびに tPs 発現能の欠失を確認し、CE(NiP) Δ P2-5 株の作出に成功した。さらに、培養神経細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の増殖効率が同等であったことより、tPs がアクセサリ蛋白質であることが明らかとなった。

表 1-1. ダイレクトシーケンスに使用したプライマー

プライマー	方向 ^a	配列 (5' → 3')	アニール部位 ^b
RHNS18(+)	F	ACTTTGTTGGATGCTATATGGG	1008 - 1029
RHN7(-)	R	GTTCATTTTGTTCAGTGGTGTGCCCCG	2502 - 2477
RHN28(+)	F	AGTCAGTTCCAATCATCAAGCCCGT	1348 - 1372

^a: F (フォワードプライマー)、R (リバースプライマー)

^b: 狂犬病ウイルス西ヶ原株 (Accession No.AB044824) の完全長ゲノム配列に基づく塩基番号

表 1-2. pCAGGS-P1~ -P5 の作製に使用したプライマー

プライマー	方向 ^a	配列 (5' → 3')
P1(+)	F	ACGGAGCTCAATATGAGCAAGATCTTCGT
P2(+)	F	TTACTTCGAATTCTGAGACGATGGCTGAAGAGACTGTT
P3(+)	F	TTACTTCGAATTCTGAGACCATGAGCCGA
P4(+)	F	TTACTTCGAATTCTGAGACGATGTCCAAA
P5(+)	F	TTACTTCGAATTCTGAGAAGATGGATGAAGGA
P(-)	R	CAGCGAGGTGCTAGCTTAGCAAGATGCATAGCGA

^a: F (フォワードプライマー)、R (リバースプライマー)

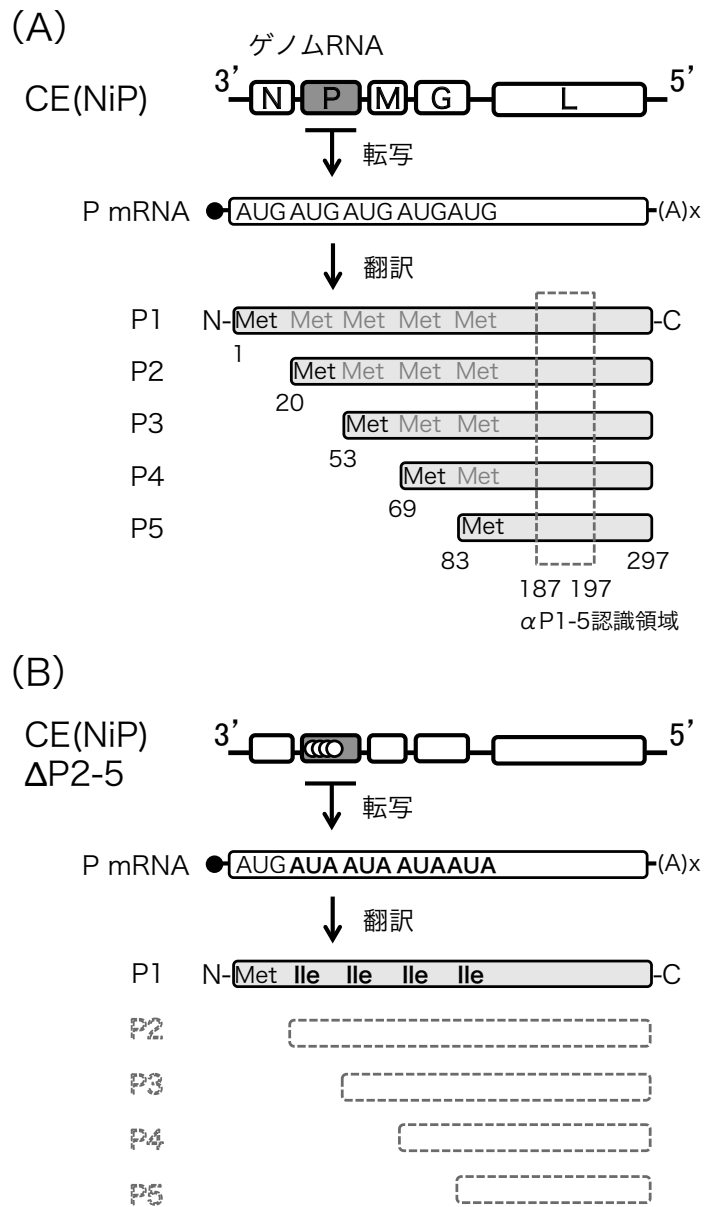


図 1-1. CE(NiP)株 (A) および CE(NiP)ΔP2-5 株 (B) のゲノム構成、ならびに各 P 遺伝子 mRNA から発現する P 蛋白質アイソフォームの模式図

白丸 (○) は P 遺伝子上に導入された変異[AUG→AUA (+鎖として表示)]を示す。
αP1-5: 抗 P 蛋白質ペプチド抗体

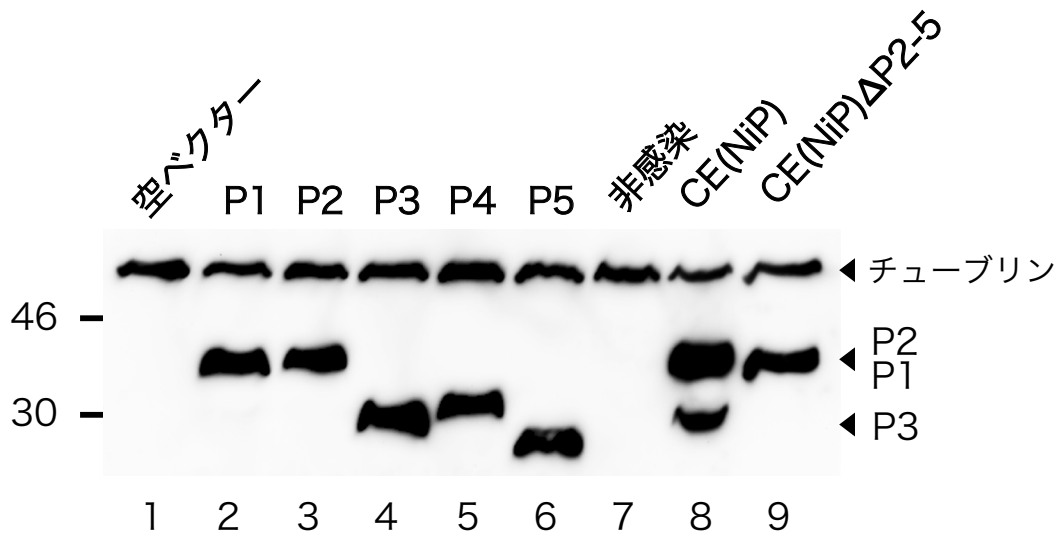


図 1-2. CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株感染 NA 細胞におけるアイソフォームの発現パターン

CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株の感染 NA 細胞を、P1～P5 を発現させるため各々pCAGGS-P1～-P5 を導入した NA 細胞と共に、ウエスタンブロットにより解析した。

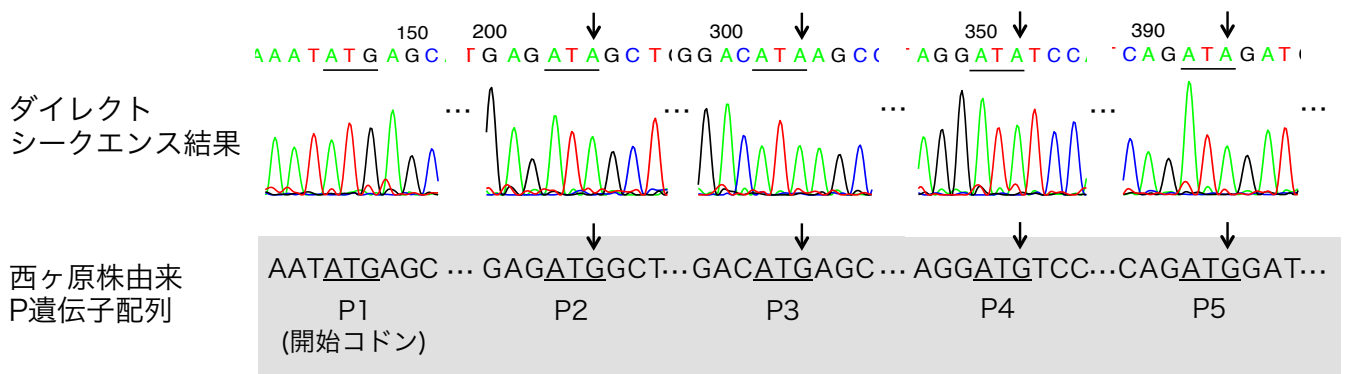


図 1-3. ダイレクトシーケンスによる CE(NiP) Δ P2-5 株 P 遺伝子上の変異導入箇所の配列分析

矢印 (↓) は変異導入箇所を示す。

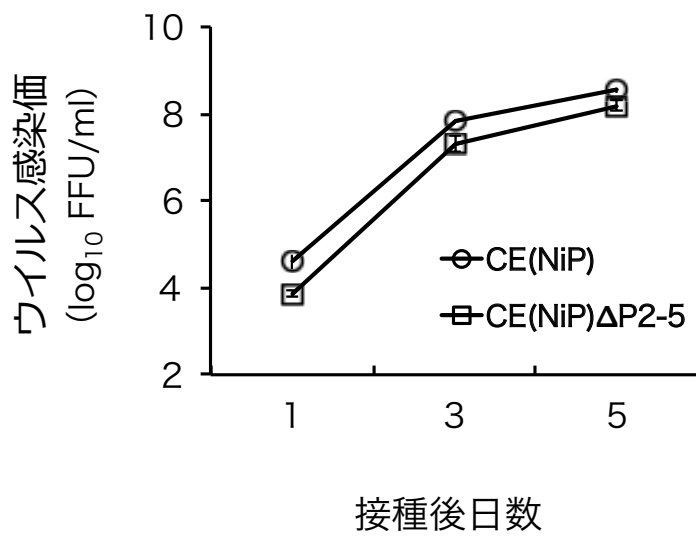


図 1-4. NA 細胞における CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株の増殖能の比較

CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株を、MOI=0.01 の条件で NA 細胞に接種した。接種後 1、3 および 5 日目に培養上清を回収した後、フォーカスアッセイによって上清中のウイルス感染価を計測した。

第 2 章

CE(NiP) Δ P2-5 株に導入した変異が

P1 の機能に及ぼす影響

序論

第1章において、tPsの翻訳開始点である開始コドンへの変異導入によって、tPsの発現能を欠失したCE(NiP) Δ P2-5株を作出した。しかしながら、各アイソフォームの開始コドンが同じアミノ酸の読み枠内に存在するために、CE(NiP) Δ P2-5株が発現するP1には、メチオニン(Met)からイソロイシン(Ile)への計4つのアミノ酸変異が導入される(第1章 図1-1)。これまでの報告により、P1はRNA依存性RNAポリメラーゼ共因子としてウイルスRNA合成に必須の役割を持つことが明らかとなっている(44)。さらに、IFN産生および応答をそれぞれ阻害するIFNアンタゴニスト活性を有することが報告されている(4, 5, 16, 35, 38-40)。従って、CE(NiP) Δ P2-5株を用いて病原性におけるtPsの重要性を評価する場合、同株がtPsの発現能を欠くと同時に、同株のP1が前述の機能を保持することが前提となる。すなわち、4つのアミノ酸変異がCE(NiP) Δ P2-5株のP1の機能に与える影響を検証する必要がある。

ウイルスRNA合成におけるP1の機能性を検討するため、本章ではミニゲノムアッセイを行うこととした(図2-1)。これまでも、狂犬病ウイルスを含むマイナス鎖RNAウイルスのRNAポリメラーゼ活性の評価のために、ミニゲノムアッセイが行われてきた(29, 31)。本アッセイでは、ミニゲノムRNAを発現するミニゲノムプラスミド、ならびにP蛋白質、N蛋白質およびL蛋白質発現プラスミドを培養細胞に共導入することで行われる。細胞内に発現されるミニゲノムRNAは、ウイルスRNAの転写・複製に重要となるゲノム両末端の非コード領域の配列(3'リーダーおよび5'トレーラー配列)を持ち、これらの間にルシフェラーゼ遺伝子が挿入された構造を持つ(図2-1A)。このミニゲノムRNA

がプラスミドから発現された P、N および L 蛋白質と結合することで、ヌクレオカプシドが形成される。その結果、RNA ポリメラーゼである L 蛋白質と、その共因子の P 蛋白質 (P1) によって、ミニゲノム RNA の複製、ならびにルシフェラーゼ遺伝子 mRNA の転写が起こる (図 2-1B)。以上の原理より、ミニゲノムアッセイを行うことで、ウイルス RNA 合成における P1 の機能性を、ルシフェラーゼ活性に基づき評価することができる。

一方、P1 の IFN アンタゴニスト活性を評価するために、本章では各種プロモーター活性の測定に汎用されるレポーターアッセイを用いることとした。一般的に、レポーターアッセイでは、ルシフェラーゼ遺伝子などのレポーター遺伝子の上流に、活性測定の対象となるプロモーター領域を持つプラスミド (レポータープラスミド) を使用する。本プラスミドを導入した培養細胞において、対象のプロモーターの活性化を引き起こすシグナル伝達系を刺激することで、レポータープラスミドよりルシフェラーゼ遺伝子 mRNA の発現が誘導される。そのため、当該プロモーター活性をルシフェラーゼ活性に基づき評価することが可能となる。以上のようなレポーターアッセイの特性より、IFN- β プロモーターまたは ISRE 含有プロモーターを持つレポータープラスミドを用いれば、それぞれ IFN 産生または応答に対する P1 の抑制活性を評価することができる (図 2-2 および 3)。

第 2 章では、CE(NiP) Δ P2-5 株に導入した 4 つのアミノ酸変異が P1 の機能に影響するかどうかを検証する目的で、ミニゲノムアッセイにより CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 のウイルス RNA 合成における機能を、またレポーターアッセイによりその IFN アンタゴニスト活性を評価した。

材料および方法

培養細胞

NA 細胞を第 1 章に記載した方法によって培養した。また、ヒト神経芽細胞腫由来 SYM-I 細胞 ([財]生産開発科学研究所 京都大学名誉教授 河合明彦博士より分与) を、CO₂ インキュベーター (ヒラサワ) 内で培養した (37°C、設定 CO₂ 濃度: 5%)。SYM-I 細胞の GM として、10%FCS (Gibco、製品番号: 10437-028) 添加 E-MEM (日水、製品番号: 05900) を用いた。

プラスミド

各 P 蛋白質アイソフォームの発現プラスミドとして、第 1 章に記述した pCAGGS-P1~P5 を使用した。また、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 を発現するプラスミドを作製するため、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 遺伝子領域を含む cDNA を PCR により増幅し、pCAGGS/MCS のクローニング部位に挿入した。作製した CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 を発現するプラスミドを pCAGGS-P1 Δ P2-5 と命名した。さらに、tPs の発現を抑制する目的で、N 末端に GFP を融合した P1 を発現するプラスミドを作製した (図 2-4)。具体的には、CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 遺伝子領域を含む cDNA を PCR により増幅した。その後、この増幅産物を pEGFP-C1 (Clontech) の GFP 遺伝子の下流に存在するクローニング部位に、アミノ酸の読み枠が同じになるよう挿入した。N 末端側に GFP が融合された CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 を発現するプラスミドを、それぞれ pEGFP-P1 および pEGFP-P1 Δ P2-5 と、各々のプラスミドより発現される GFP 融合型 P1 を GFP-P1 および GFP-P1 Δ P2-5 と命名した。IFN 産生を誘導

するプロモーター活性測定用のレポータープラスミドとして、ホタルルシフェラーゼ (GL) 遺伝子上流に IFN- β プロモーター配列を有する IFNB-pGL3 (McGill University、Rongtuan Lin 博士より分与) を用いた。また、IFN 応答を誘導するプロモーター活性測定用のレポータープラスミドとして、GL 遺伝子上流に ISRE を含むプロモーター配列を有する pISRE-luc (Stratagene、製品番号: 219092) を用いた。導入効率補正用プラスミドには、ウミシイタケルシフェラーゼ (RL) 遺伝子上流に単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター領域を有する pRL-Tk (Promega、製品番号: E2241) を用いた。

ミニゲノムプラスミド作製のため、以前の研究において作製された pRVDI-luc (40) を鋳型として PCR を行い、ハンマーヘッド型リボザイム - 狂犬病ウイルスゲノム 5'トレイラー配列 - GL - 狂犬病ウイルスゲノム 3'リーダー配列 - デルタ肝炎ウイルスリボザイムの順に各遺伝子領域を含む cDNA を増幅した。増幅産物を pCAGGS/MCS に挿入することで、ミニゲノムプラスミド pCAGGS-RVDI-Luc を作製した。また、Ni-CE 株のゲノムプラスミドを鋳型として PCR を行い、L 遺伝子領域を含む cDNA を増幅した。その増幅産物を pCAGGS/MCS のクローニング部位に挿入することで、L 蛋白質発現プラスミドの pCAGGS-CEL を作製した。pCAGGS-CEN は、以前の研究において作製されたものを使用した (22)。

SDS-PAGE およびウエスタンブロット

組織培養プレート (Greiner bio-one、24ウェル、製品番号: 662160) に培養した NA 細胞に、1 ウェルあたり 0.8 μ g の pCAGGS-P1~P5、pEGFP-C1、

pEGFP-P1またはpEGFP-P1 Δ P2-5を導入した。このとき、プラスミド導入試薬としてLipofectamine 2000 (Invitrogen、製品番号: 11668027) を使用した。導入2日後に、各々の細胞をPBSによって洗浄した後、50 μ lのSample Buffer Solution (2ME+) ($\times 2$) (和光製薬、製品番号: 196-11022) を用いて溶解した。細胞溶解液中の蛋白質を熱変性させた後、第1章に記載した方法に従い、SDS-PAGEおよびウエスタンブロットによって解析した。また、後述のレポーターアッセイに用いられたSYM-IおよびNA細胞の溶解液も、ウエスタンブロットにより解析した。なお、SYM-I細胞の解析には一次抗体として抗ウイルスP蛋白質ウサギポリクローナル抗体 ([財]生産開発科学研究所 京都大学名誉教授河合明彦博士より分与) を用いた。

ミニゲノムアッセイ

組織培養プレート (Greiner bio-one、24 ウェル、製品番号: 662160) に培養した NA 細胞に、1 ウェルあたり 0.12 μ g の pCAGGS-P1、pCAGGS-P1 Δ P2-5 または pCAGGS/MCS と共に、0.8 μ g の pCAGGS-RVDI-Luc、0.4 μ g の pCAGGS-CEL および 1.2 μ g の pCAGGS-CEN を導入した。このとき、プラスミド導入試薬として Lipofectamine 2000 (Invitrogen、製品番号: 11668027) を使用した。37°Cで2日間培養した細胞をダルベッコ PBS(-) (日水、製品番号: 05913) を用いて洗浄した後、100 μ l の Cell Culture Lysis Reagent (Promega、製品番号: E1531) を用いて溶解し、-80°Cで凍結した。融解した細胞溶解液を攪拌し、12,000 \times g / 4°C / 2 分間の条件で遠心後、Luciferase assay system (Promega、製品番号: E1500) によって上清 10 μ l 中のルシフェラーゼ活性を

測定した。ルシフェラーゼ活性は、Relative Light Unit (RLU)/sec として表記した。なお、上記のプラスミド導入細胞については、1 条件あたり 3 ウェルを用意し、各々のルシフェラーゼ活性値の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には、分散分析および Dunnett の多重検定を用いた。

レポーターアッセイによる IFN- β プロモーター活性の測定

組織培養プレート (Greiner bio-one、24 ウェル、製品番号: 662160) に培養した SYM-I 細胞に、1 ウェルあたり 0.12 μg の pEGFP-P1、pEGFP-P1 Δ P2-5 または pEGFP-C1 と共に、0.25 μg の IFNB-pGL3 および 0.04 μg の pRL-Tk (Promega、製品番号: E2241) を導入した。このとき、プラスミド導入試薬として Lipofectamine 2000 (Invitrogen、製品番号: 11668027) を使用した。その後、37°C で 24 時間培養した細胞に、5 μg の 2 本鎖 RNA アナログの Poly (I·C) を導入した。さらに 37°C で 24 時間培養した細胞をダルベッコ PBS(-) (日水、製品番号: 05913) を用いて洗浄した後、100 μl の Passive Lysis Buffer (Promega、製品番号: E1941) を用いて溶解し、-80°C で凍結した。融解した細胞溶解液を攪拌し、12,000 $\times\text{g}$ 、4°C、2 分間の条件で遠心後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega、製品番号: E1910) によって上清 10 μl 中のルシフェラーゼ活性を測定した。なお、サンプル間のプラスミド導入効率の差異による影響を補正するため、得られた GL 活性の値を RL 活性の値で割ったものを IFN- β プロモーター活性として表示した。上記のプラスミド導入細胞については、1 条件あたり 3 ウェルを用意し、各々のルシフェラーゼ活性値の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には、分散分析および Dunnett の多重検定を用いた。

レポーターアッセイによる ISRE 活性の測定

組織培養プレート (Greiner bio-one、24 ウェル、製品番号: 662160) に培養した NA 細胞に、1 ウェルあたり 0.12 μg の pEGFP-P1、pEGFP-P1 Δ P2-5 または pEGFP-C1 と共に、0.25 μg の pISRE-luc および 0.04 μg の pRL-Tk を導入した。このとき、プラスミド導入試薬として Lipofectamine 2000 (Invitrogen、製品番号: 11668027) を使用した。その後、37°C で 24 時間培養した細胞に、1,000U/ml の濃度で IFN- α (PBL Assay Science、製品番号: 1120-1) を処理した。さらに 37°C で 6 時間培養した細胞をダルベッコ PBS(-) (日水、製品番号: 05913) を用いて洗浄した後、100 μl の Passive Lysis Buffer (Promega、製品番号: E1941) を用いて溶解し、-80°C で凍結した。前述の IFN- β プロモーター活性の測定と同様の方法によって、細胞溶解液中の GL 活性および RL 活性を測定した。得られた GL 活性の値を RL 活性の値で割ったものを ISRE 活性として表示した。上記のプラスミド導入細胞については、1 条件あたり 3 ウェルを用意し、各々のルシフェラーゼ活性値の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には、分散分析および Dunnett の多重検定を用いた。

結果

ウイルス RNA 合成における CE(NiP) Δ P2-5 株 P1 の機能性

ウイルス RNA 合成における CE(NiP) Δ P2-5 株 P1 の機能性を検討する目的で、CE(NiP) Δ P2-5 株または CE(NiP)株の P1 を発現させた NA 細胞を用いてミニゲノムアッセイを行った (図 2-5)。空ベクターを導入した細胞におけるルシフェラーゼ活性が 374 RLU/sec であったのに対し、CE(NiP)株の P1 を発現させた細胞では 4.6×10^4 RLU/sec のルシフェラーゼ活性が検出された。この結果より、P1 発現細胞においてミニゲノム RNA の複製、ならびにルシフェラーゼ遺伝子 mRNA の転写が誘起されていることが確認された。さらに、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 を発現させた細胞においても、 4.5×10^4 RLU/sec の値が検出され、CE(NiP) Δ P2-5 株または CE(NiP)株の P1 を発現させた細胞におけるルシフェラーゼ活性の間に有意差は認められなかった ($p \geq 0.05$)。従って、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 は、CE(NiP)株の P1 と同等の RNA ポリメラーゼ共因子としての活性を保持していることが示された。

CE(NiP) Δ P2-5 株 P1 の IFN 産生抑制活性

レポーターアッセイでは、tPs の非存在下で P1 機能の評価を行うため、GFP-P1 Δ P2-5 および GFP-P1 をそれぞれ発現する pEGFP-P1 Δ P2-5 および pEGFP-P1 を使用した。これらを導入した NA 細胞をウエスタンブロットで解析した結果、どちらのプラスミドを導入した細胞においても tPs のバンドは検出されず、GFP-P1 Δ P2-5 および GFP-P1 のバンドのみが検出された (図 2-6)。そこで、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 が IFN 産生を抑制する活性を保持しているか

どうか検討する目的で、GFP-P1 Δ P2-5 および GFP-P1 を発現させた SYM-I 細胞における IFN- β プロモーター活性をレポーターアッセイにより比較した (図 2-2 および 7)。空ベクターを導入した陰性対照の細胞では、Poly (I·C) の処理により IFN- β プロモーターが活性化された。一方で、GFP-P1 Δ P2-5 または GFP-P1 を発現させた細胞では、IFN- β プロモーター活性が陰性対照の細胞における同活性の約 1/2 となり、有意に抑制された ($p < 0.05$)。また、GFP-P1 Δ P2-5 および GFP-P1 を発現させた細胞における IFN- β プロモーター活性の間に有意差は認められなかった ($p \geq 0.05$)。Poly (I·C) を処理した細胞の溶解液をウエスタンブロットによって解析した結果、同等のシグナル強度を持つ GFP-P1 Δ P2-5 および GFP-P1 のバンドが確認された。以上の結果より、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 は、CE(NiP) 株の P1 と同等の IFN 産生抑制活性を有していることが示された。

CE(NiP) Δ P2-5 株 P1 の IFN 応答抑制活性

CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 が IFN 応答抑制活性を保持しているかどうかを検討する目的で、GFP-P1 Δ P2-5 および GFP-P1 を発現させた NA 細胞における ISRE 活性をレポーターアッセイにより比較した (図 2-3 および 8)。空ベクターを導入した陰性対照の細胞では、IFN- α の処理により、ISRE の活性化が確認された。一方で、GFP-P1 Δ P2-5 または GFP-P1 を発現させた細胞では、ISRE 活性が陰性対照の細胞における同活性の約 1/20 から 1/30 となり、有意に抑制された ($p < 0.01$)。また、GFP-P1 Δ P2-5 および GFP-P1 を発現させた細胞における ISRE 活性の間に有意差は認められなかった ($p \geq 0.05$)。IFN- α を処理した細胞の溶解液をウエスタンブロットによって解析した結果、同等のシグナル強度を

持つ GFP-P1 Δ P2-5 および GFP-P1 のバンドが検出された。以上より、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 は、CE(NiP)株の P1 と同等の IFN 応答抑制活性を有していることが示された。

考察

CE(NiP) Δ P2-5 株の作出のために行った遺伝子改変により、同株の P1 には 4 つのアミノ酸変異が導入された (第 1 章 図 1-1)。これらの変異が、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 の機能を低下させる場合、CE(NiP) Δ P2-5 株の弱毒化を引き起こす可能性がある。つまり、同株が弱毒化した場合、tPs 発現能の欠失によるものなのか、または P1 の機能の欠失によるものなのかが区別できない。従って、CE(NiP) Δ P2-5 株に導入された変異が、同株の P1 の機能に影響するかどうかを検証する必要がある。

CE(NiP) Δ P2-5 株が発現する P1 の、ウイルス RNA 合成における機能性を評価するため、CE(NiP) Δ P2-5 株または CE(NiP)株の P1 を発現させた神経由来 NA 細胞を用いてミニゲノムアッセイを行った。その結果、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 が RNA ポリメラーゼ共因子としての活性を保持し、その活性は CE(NiP)株の P1 と同等であることが示された (図 2-5)。この成績は、NA 細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の増殖効率が同等であったこととも一致する (第 1 章 図 1-4)。以上より、CE(NiP) Δ P2-5 株に導入された変異は、ウイルス RNA 合成における P1 の機能に影響しないことが示された。

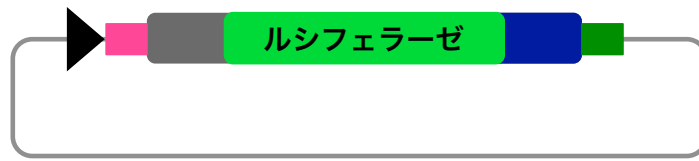
第1章では、pCAGGS-P1~P5をそれぞれ導入したNA細胞において、各々のプラスミドがコードする最長のアイソフォームのみが検出されることが確認されている (第1章 図1-2、レーン番号2~6)。しかしながら、いくつかのtPsがIFNアンタゴニスト活性を有することが強く示唆されていることを考慮し (21, 27, 39)、本章では、より厳密にtPsの発現を制限した状況下においてP1のIFNアンタゴニスト活性を評価することとした。具体的には、レポーターアッセイを行

う際、P1発現プラスミドとしてpEGFP-P1 Δ P2-5およびpEGFP-P1を使用した。これらのプラスミド上では、GFP遺伝子の開始コドンからリボソームによる翻訳が始まる。GFP遺伝子の開始コドンとtPsの同コドンの距離が離れているため、リーキースキャニングによるtPsの翻訳が制限されると考えた。実際に、pEGFP-P1 Δ P2-5およびpEGFP-P1を導入した細胞をウエスタンブロットによって解析した結果、tPsの発現は検出されず、GFP-P1 Δ P2-5およびGFP-P1の発現のみが確認された(図2-6)。以上より、tPsの非存在下においてCE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株のP1のIFNアンタゴニスト活性を比較する上で、pEGFP-P1 Δ P2-5およびpEGFP-P1が有用であると考えられた。

本章では、CE(NiP) Δ P2-5株のP1のIFNアンタゴニスト活性を評価するため、GFP-P1 Δ P2-5およびGFP-P1を発現させた培養神経細胞を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、CE(NiP) Δ P2-5株のP1が、IFN産生および応答を抑制する活性を保持することが示された(図2-7および-8)。これまでの研究によって、P1のIFN産生抑制活性に176~181位、またIFN応答抑制活性に267~297位の領域が重要であることが明らかとなっている(30, 38)。これらの領域に、CE(NiP) Δ P2-5株のP1に導入された4つのアミノ酸変異部位(20、53、69および83位)は含まれておらず、結果として同株のP1はIFNアンタゴニスト活性を失わなかったと考えられた。

第2章では、CE(NiP) Δ P2-5株のP1が、RNAポリメラーゼ共因子としての活性、ならびにIFNアンタゴニスト活性を保持することが示された。以上より、CE(NiP) Δ P2-5株のP1に存在する4つのアミノ酸変異は、その機能に影響しないことが明らかとなった。

(A)



■: ハンマーヘッドリボザイム

■: 5'トレーラー配列

■: 3'リーダー配列

■: デルタ肝炎ウイルスリボザイム

(B)

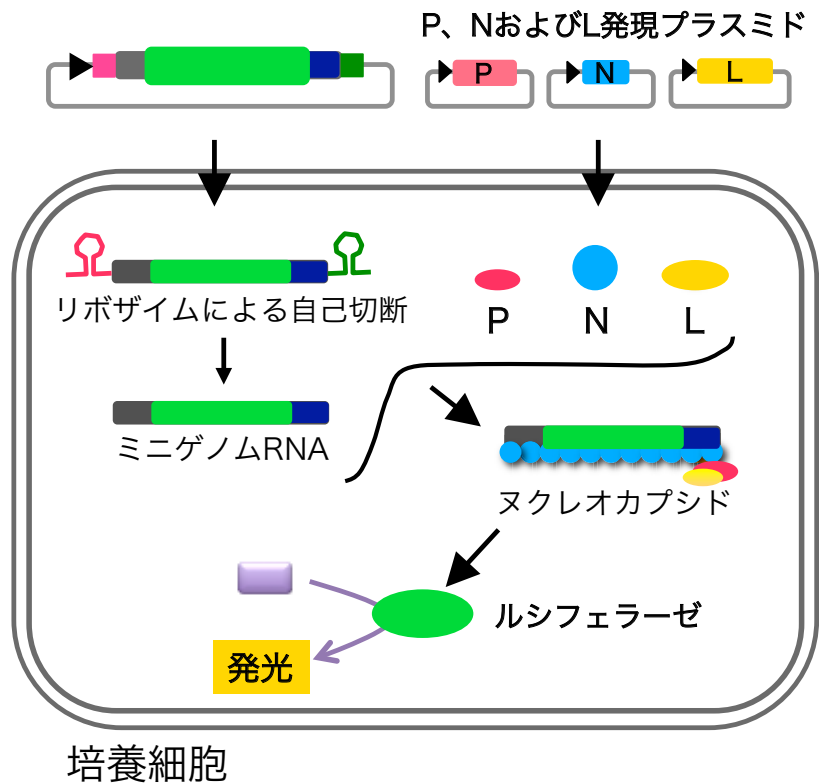


図 2-1. (A)ミニゲノムプラスミドの模式図

(B)ミニゲノムアッセイの原理の模式図

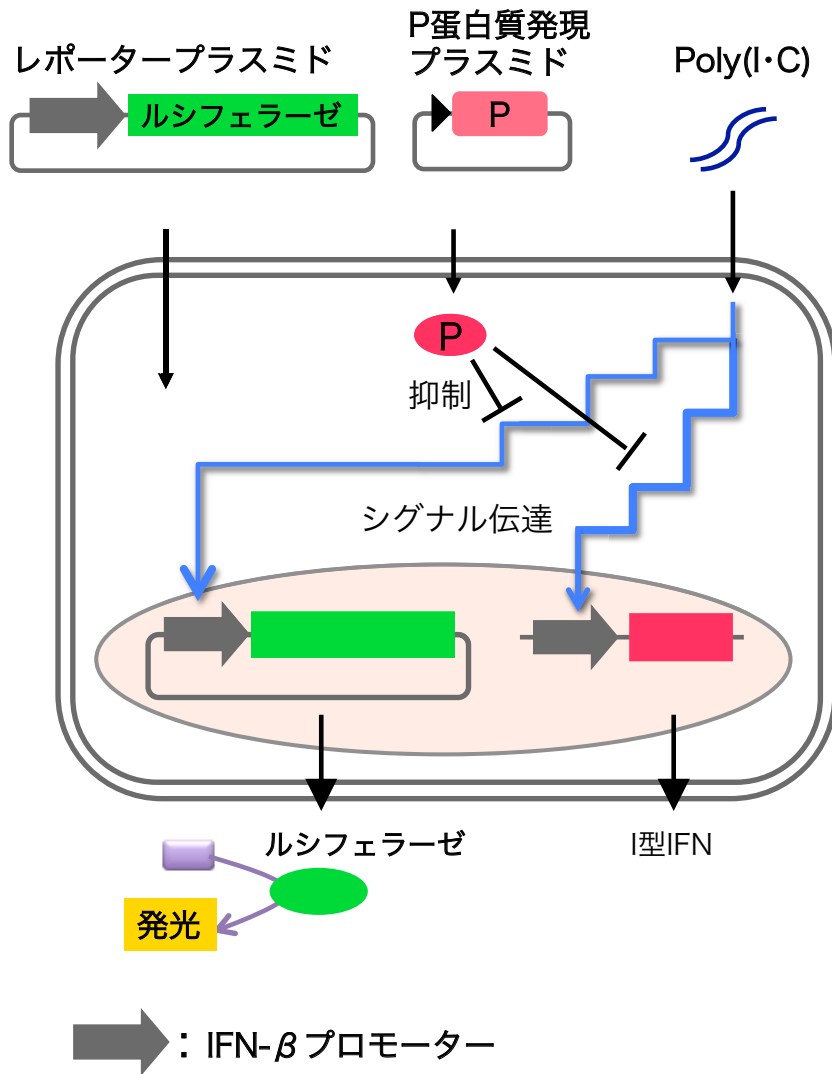


図 2-2. IFN-β プロモーターレポーターアッセイの模式図

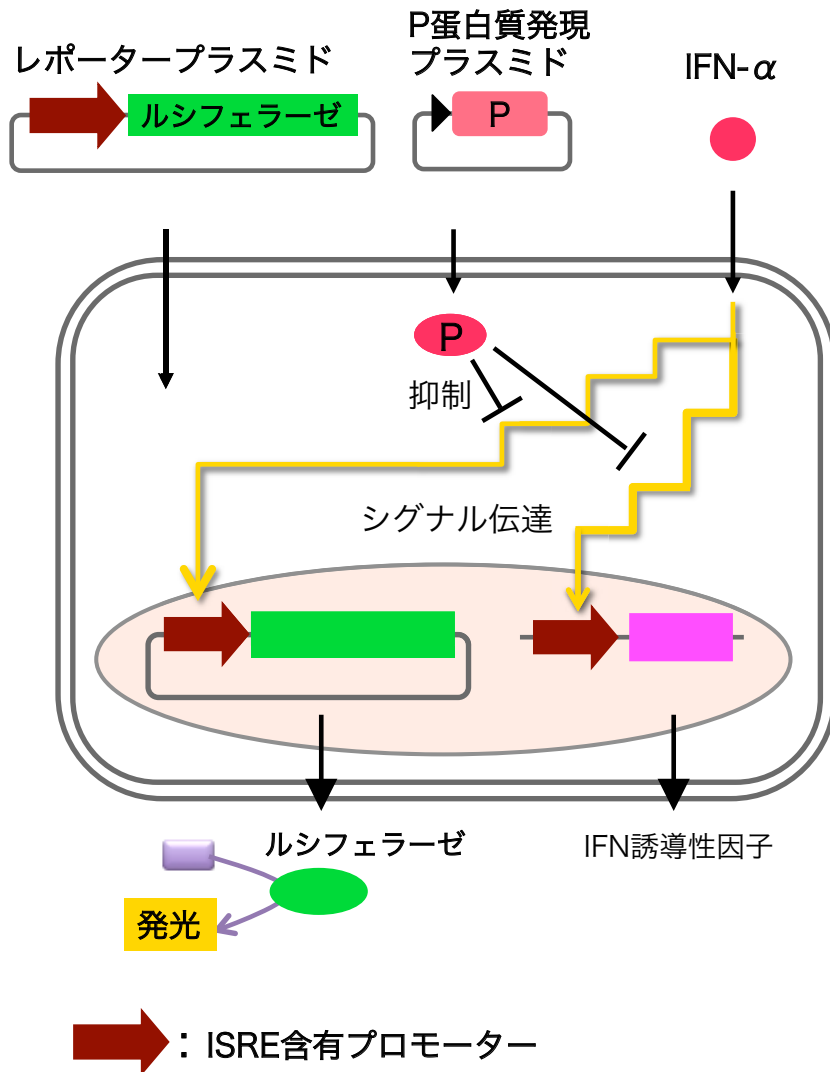


図 2-3. ISRE レポーターアッセイの模式図

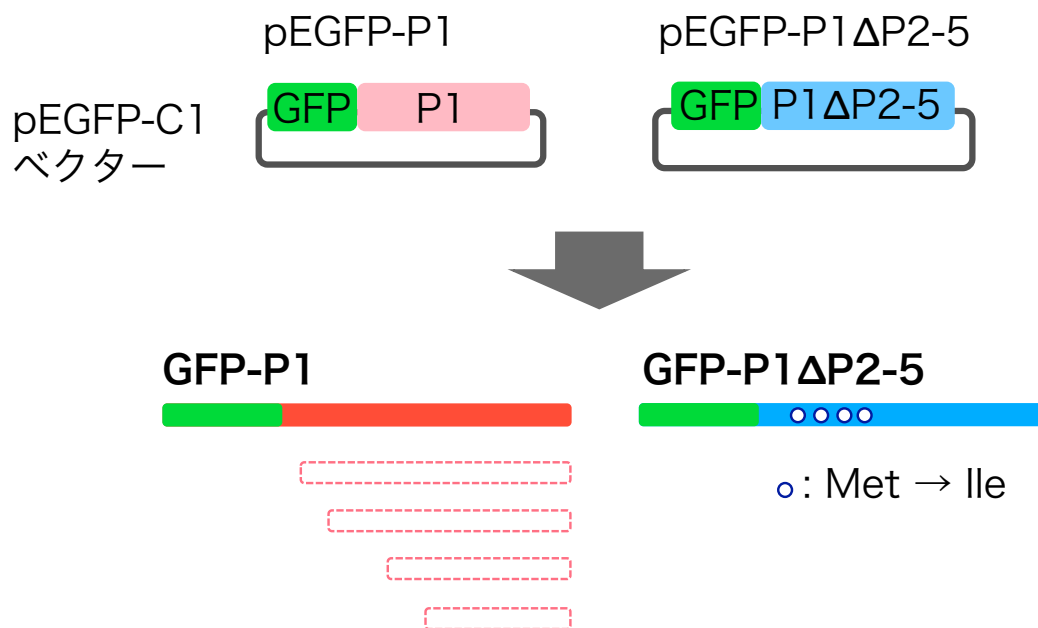


図 2-4. pEGFP-P1 および pEGFP-P1 Δ P2-5 から発現する GFP-P1 および GFP-P1 Δ P2-5 の模式図

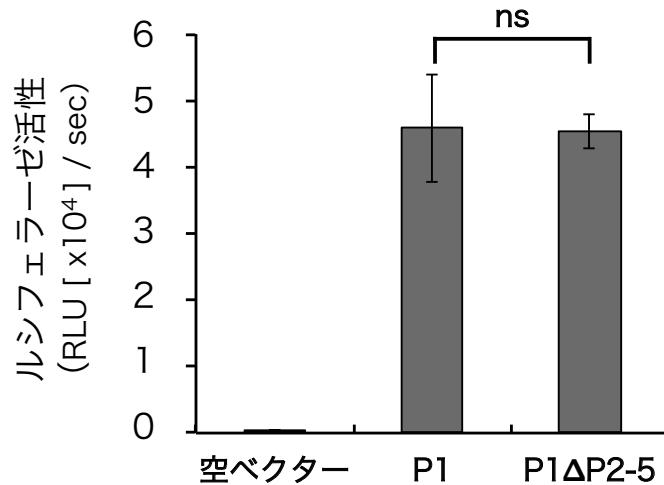


図 2-5. CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株の P1 のウイルス RNA 合成における機能性

空ベクター、pCAGGS-P1 もしくは pCAGGS-P1ΔP2-5 を、ルシフェラーゼ発現ミニゲノムプラスミド、N 蛋白質発現プラスミドおよび L 蛋白質発現プラスミドと共に、NA 細胞に導入した。導入 2 日後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。pCAGGS-P1 および pCAGGS-P1ΔP2-5 より発現する蛋白質を、各々 P1 および P1ΔP2-5 と表記している。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

ns: $p \geq 0.05$

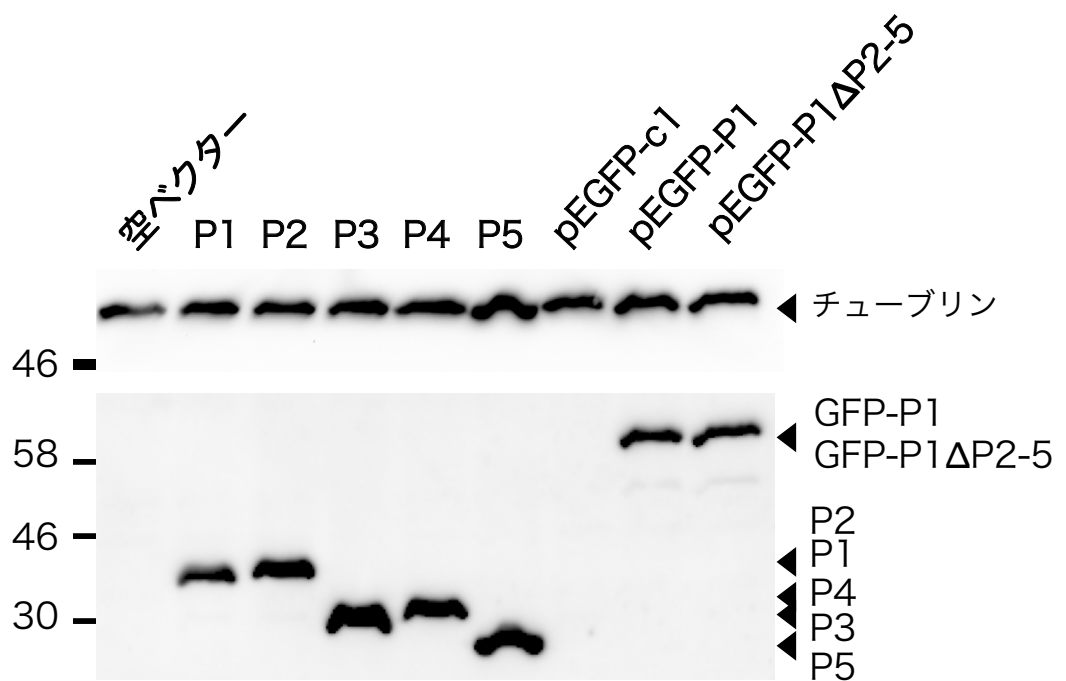


図 2-6. pEGFP-P1 および pEGFP-P1ΔP2-5 を導入した
NA 細胞における GFP-P1 および GFP-P1ΔP2-5 の発現

pEGFP-P1 および pEGFP-P1ΔP2-5 を導入した NA 細胞を、P1～P5 を発現させるため各々 pCAGGS-P1～P5 を導入した NA 細胞と共に、ウエスタンブロットにより解析した。

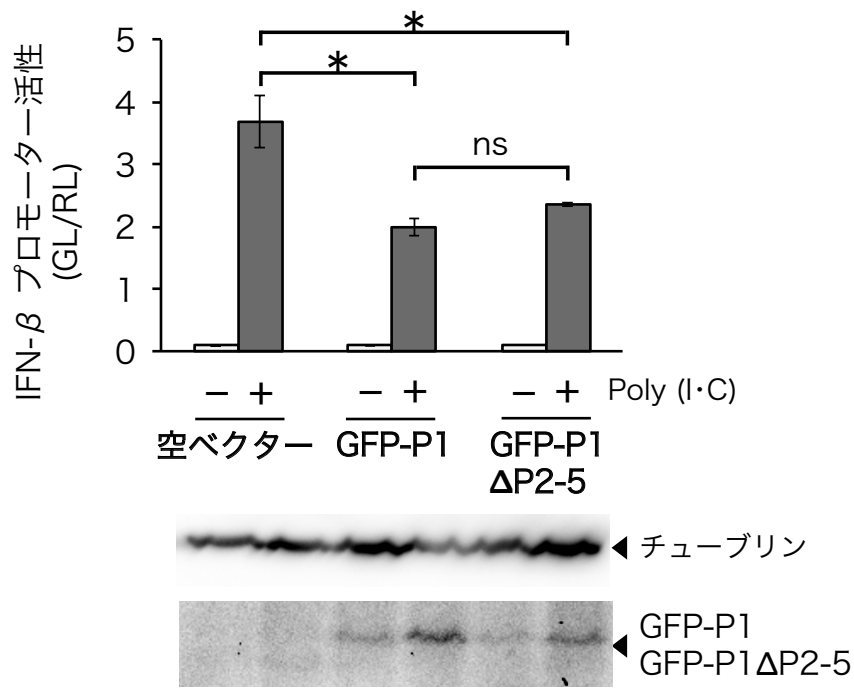


図 2-7. CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 の IFN 産生抑制活性の比較

空ベクター、pEGFP-P1 もしくは pEGFP-P1 Δ P2-5 と共に、レポータープラスミドの IFNB-pGL3 および導入効率補正用の pRL-Tk を SYM-I 細胞に導入した。導入 24 時間後に、さらに Poly (I·C) を各々の細胞に導入した。24 時間培養した後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ウエスタンブロットにより、細胞溶解液中のチューブリンおよび GFP 融合型 P1 を検出した結果をグラフ下部に示している。エラーバーは標準誤差を示す。*: $p < 0.05$ 、ns: $p \geq 0.05$

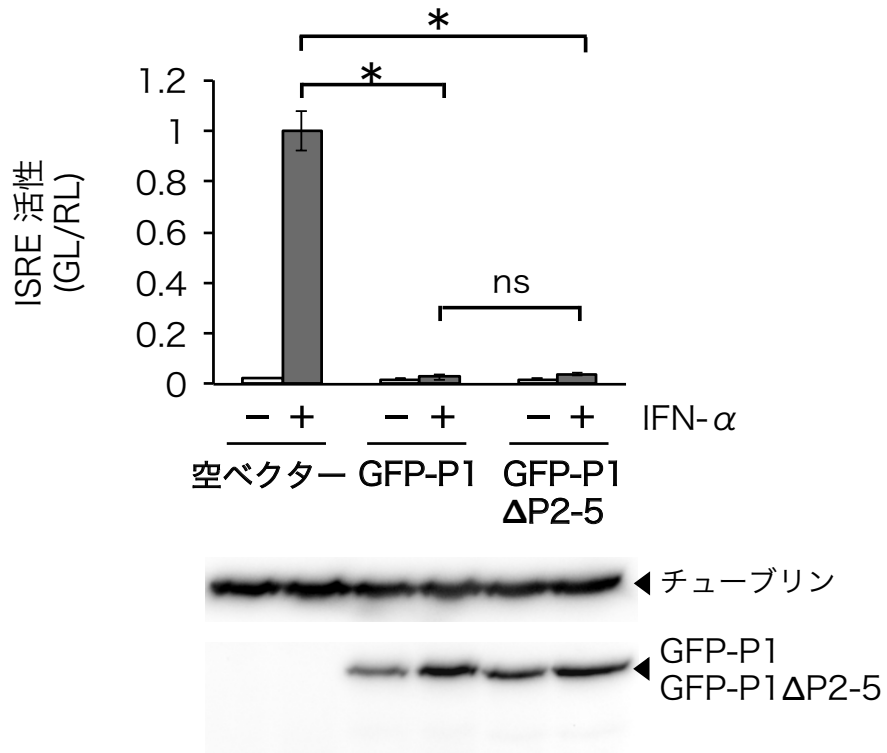


図 2-8. CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 の IFN 応答抑制活性の比較

空ベクター、pEGFP-P1 もしくは pEGFP-P1 Δ P2-5 と共に、レポータープラスミドの pISRE-luc および導入効率補正用の pRL-Tk を NA 細胞に導入した。導入 24 時間後に、各々の細胞に IFN- α を投与した。6 時間培養した後に、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ウエスタンブロットにより、細胞溶解液中のチューブリンおよび GFP 融合型 P1 を検出した結果をグラフ下部に示している。エラーバーは標準誤差を示す。*: $p < 0.01$ 、ns: $p \geq 0.05$

第 3 章

狂犬病ウイルスの神経病原性における tPs の重要性

序論

第 1 章において、tPs の発現能を欠失した CE(NiP) Δ P2-5 株を作出した。さらに第 2 章では、CE(NiP) Δ P2-5 株に導入された変異が、同株の P1 の機能に影響を与えないことを明らかにした。すなわち、CE(NiP) Δ P2-5 株は、P1 の機能を保持しつつ、tPs の発現能を欠失しているウイルスであることを示した。以上の結果より、CE(NiP) Δ P2-5 株は、狂犬病ウイルスの病原性発現機構における tPs の重要性の検討に有用であると考えられた。

狂犬病ウイルスの病原性の中でも、神経病原性は、中枢神経系内において感染拡大し、感染宿主に致死的な神経症状を引き起こすウイルスの能力と定義される。これまで、ウイルスの神経病原性を検討する方法として、マウスへの脳内接種が一般的に用いられてきた。以前の研究において、神経病原性が減弱した弱毒の Ni-CE 株のゲノムに強毒の西ヶ原株由来 P 遺伝子を保有する CE(NiP) 株が、脳内接種によってマウスに致死的な感染を引き起こすことが示されている (34)。この結果より、神経病原性において P 蛋白質が重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかしながら、神経病原性における tPs の重要性はいまだ不明である。

そこで第 3 章では、狂犬病ウイルスの神経病原性における tPs の重要性を検討する目的で、マウスへの脳内接種により CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP) 株の神経病原性を比較した。さらに、脳内におけるウイルス増殖において tPs が重要な役割を持つのかどうかを検証するために、感染マウス脳内における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP) 株のウイルス増殖効率を比較した。

材料と方法

培養細胞およびウイルス

NA 細胞および BHK/T7-9 細胞を、第 1 章に記載した方法によって培養した。BHK/T7-9 細胞は、後述の組換え狂犬病ウイルス株の作出に用いられた。CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株については、第 1 章に記述したものを使用した。また第 1 章に記載した方法により、各株のストックウイルスを作製した。

Luc 発現 CE(NiP)および CE(NiP) Δ P2-5 株の作出

G-L 遺伝子間にルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を保有する組換え CE(NiP)株 [CE(NiP)-Luc 株]を作出するため、以前の研究において作製されたゲノムプラスミド pCE(NiP)-Luc (45) を使用した (図 3-1A)。さらに、Luc を発現する組換え CE(NiP) Δ P2-5 株 [CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株] を作製するため、前述の pCE(NiP)-Luc を鋳型として PCR を行い、G 遺伝子の転写終結および N 遺伝子の開始シグナル、Luc 遺伝子領域、G 遺伝子の転写終結および L 遺伝子の開始シグナル、ならびに L 遺伝子の一部を含む cDNA を増幅した。この増幅産物を *Pst*I および *Bsp*1407I によって切断した pCE(NiP)-Luc に挿入することで、CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株のゲノムプラスミド [pCE(NiP) Δ P2-5-Luc] を作製した。第 1 章に記述した組換えウイルス作出系により、ゲノムプラスミド pCE(NiP)-Luc および pCE(NiP) Δ P2-5-Luc から、それぞれ CE(NiP)-Luc 株および CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株を回収した (図 3-1B)。また、第 1 章に記載した方法により、各株のストックウイルスを作製した。回収したウイルスの G-L 遺伝子間領域の配列をダイレクトシーケンス法によって決定し、ウイルスに Luc

遺伝子が挿入されていることを確認した。また第 1 章に記述したフォーカスアッセイにより、各株のウイルス感染価を測定した。

CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株の神経病原性の検討

本章に記載した動物実験には、全て ddY マウス（4 週齢、雄、日本 SLC）を用いた。1 群あたり 20 匹のマウスに、 1×10^4 FFU または 1×10^3 FFU の CE(NiP) 株または CE(NiP) Δ P2-5 株を含むウイルス液 0.03 ml を脳内接種した。陰性対照として、ウイルス希釈液（5%FCS 添加 E-MEM）のみを接種した非感染マウスを用いた。感染マウスおよび非感染マウスの症状の推移を 14 日間観察した。マウスの症状を「正常」、「体重減少（観察時点までに確認された体重の最大値から 5%の減少）」、「軽度の神経症状（よろめき、または片後肢の運動障害）」、「重度の神経症状（沈鬱、または両後肢の運動障害）」および「死亡」の 5 つに分類して評価した。感染マウスの発症率は、観察終了日までに、体重減少、または神経症状を示したマウスの匹数に基づいて算出し、死亡率は、死亡したマウスの匹数に基づいて算出した。なお、立ち直り反射の消失（仰向けにした状態から 10 秒以内に体勢を立て直すことができない）が認められたマウスについては人道的エンドポイントの適用の対象とし、頸椎脱臼による安楽殺を行った。発症率および致死率の有意差検定には、フィッシャーの正確確率検定を用いた。本動物実験は、予め、岐阜大学動物実験委員会によって承認された（実験承認番号：13069）。

ルシフェラーゼアッセイによるマウス脳内における各株のウイルス複製能の検討

1 群あたり 3 匹のマウスに、 1×10^4 FFU の CE(NiP)-Luc 株または CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株を脳内接種した。陰性対照として、ウイルス希釈液 (5%FCS 添加 E-MEM) のみを脳内接種した非感染マウスを用いた。接種 1、3 および 5 日後にこれらマウスを安楽殺し、脳を採取した。続いて、採取した脳の重さを計測し、1 ml の Passive Lysis Buffer (製品番号: E1941、Promega) を用いて脳を溶解した後、 -80°C で凍結した。融解した溶解液を攪拌し、 $20,000 \times \text{g} / 15$ 分間の条件で遠心後、Luciferase assay system (Promega、製品番号: E1500) によって上清 10 μl 中のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、RLU/sec/g (脳の重量) として表記した。各株の感染脳におけるルシフェラーゼ活性の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には分散分析および Dunnett の多重検定を適用した。

マウス脳内における各株の感染性ウイルス産生能の比較

1 群あたり 5 匹のマウスに、 1×10^4 FFU の CE(NiP)株、または CE(NiP) Δ P2-5 株を脳内接種した。陰性対照として、ウイルス希釈液 (5%FCS 添加 E-MEM) のみを脳内接種した非感染マウスを用いた。接種 5 日後にこれらマウスを安楽殺し、脳を採取した。続いて、採取した脳の重さを計測し、NA 細胞用培養液を用いて 10 倍希釈脳乳剤を作製した後、 -80°C で凍結した。融解した脳乳剤を $3,000 \times \text{g} / 10$ 分間の条件で遠心した後、第 1 章で述べたフォーカスアッセイを用いて上清中のウイルス感染価を計測した。各々の上清中のウイルス感染価の

平均値および標準誤差を算出し、統計処理には t 検定を適用した

結果

脳内接種によるマウスに対する CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の神経病原性の検討

CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の神経病原性を比較する目的で、マウスへの脳内接種により各株の病原性を検証した(表 3-1 および図 3-2)。 1×10^4 FFU の各株を接種したそれぞれのマウス群において、全ての個体が観察期間中に発症し、死亡した(図 3-2A)。各株接種マウス群の発症率および致死率は、どちらも 100%であった。また、 1×10^3 FFU のウイルス量を脳内接種した実験において、CE(NiP)株接種群では、20 個体中 17 個体が体重減少、もしくは神経症状を示した後に死亡したのに対し、CE(NiP) Δ P2-5 株接種群では、20 個体中 19 個体が発症後に死亡した(図 3-2B)。すなわち、発症率および致死率は、CE(NiP)株接種群で 85%、ならびに CE(NiP) Δ P2-5 株接種群で 95%となった。なお、両接種群の発症率および致死率の間に有意差は認められなかった($p \geq 0.05$)。以上より、CE(NiP) Δ P2-5 株の神経病原性は、CE(NiP)株と同等であることが示された。

マウス脳内における CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株および CE(NiP)-Luc 株のウイルス複製能の比較

マウス脳内における CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株および CE(NiP)-Luc 株のウイルス複製能を比較する目的で、各株を脳内接種したマウスの脳を経時的に採取し、各感染脳のルシフェラーゼ活性を測定した(図 3-3)。その結果、

CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株および CE(NiP)-Luc 株の感染脳におけるルシフェラーゼ活性は時間経過と共に上昇し、接種 5 日後における両者のルシフェラーゼ活性はそれぞれ 4.8×10^7 および 2.47×10^8 RLU/sec/g を示した。接種 3 および 5 日後において、CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株感染脳のルシフェラーゼ活性は、CE(NiP)-Luc 株感染脳における同活性よりも低かったものの、両者の間に有意差は認められなかった ($p \geq 0.05$)。以上より、マウス脳内における CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株のウイルス複製能は、CE(NiP)-Luc 株と同等であることが示された。

マウス脳内における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の感染性ウイルス産生能の比較

マウス脳内における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株のウイルス産生能を比較する目的で、各株を脳内接種したマウスの脳における感染性ウイルス量を測定した (図 3-4)。その結果、CE(NiP) Δ P2-5 株感染脳におけるウイルス感染価が 1.5×10^6 FFU/g だったのに対し、CE(NiP)株感染脳におけるウイルス感染価は 2.9×10^6 FFU/g となった。なお、両者の間に有意差は認められなかった ($p \geq 0.05$)。従って、マウス脳内における CE(NiP) Δ P2-5 株の感染性ウイルス産生能は、CE(NiP)株と同等であることが示された。

考察

狂犬病ウイルスの神経病原性におけるtPsの重要性を検証するために、本章ではマウスへの脳内接種によりCE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株の神経病原性を比較した。1 \times 10⁴ FFUの各株を接種したマウス群では、どちらの接種群においても100%の発症率および致死率が確認された（表3-1および図3-2A）。この結果より、CE(NiP) Δ P2-5株がCE(NiP)株と同等の高い神経病原性を有することが考えられたものの、どちらの接種群においても致死率が100%であったことから、両株の僅かな病原性の差を観察できなかった可能性も考えられた。そこで、全個体が死亡しないウイルス量の条件で各株の病原性を再検討することを目的に、同様の接種試験を1 \times 10³ FFUのウイルス量によって行った。その結果、CE(NiP)株接種群の発症率および致死率が、いずれも85%であったのに対し、CE(NiP) Δ P2-5株接種群では95%となり、両接種群の発症率および死亡率の間に有意差がないことが明らかとなった（ $p \geq 0.05$ ）（表3-1および図3-2B）。以上の結果より、CE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株の神経病原性は同等であることが確認された。従って、神経病原性において、tPsではなくP1が主要な役割を担っていると考えられた。これまでに神経病原性に重要なP蛋白質アイソフォームを同定した報告はなく、本研究により初めてP1が重要である可能性が示された。

以前の研究により、P蛋白質のIFNアンタゴニスト活性がCE(NiP)株の神経病原性に関与していることが強く示唆されている（16）。本章では、P蛋白質としてP1のみを発現するCE(NiP) Δ P2-5株がCE(NiP)株と同等の神経病原性を示すことが確認された（表3-1および図3-2）。これらの知見により、P1のIFNアンタゴニスト活性が神経病原性の発現において十分である可能性が考えられた。

第2章において、CE(NiP)株およびCE(NiP) Δ P2-5株のP1が同等のIFNアンタゴニスト活性を有することが確認されたことも、この可能性を支持している。以上より、CE(NiP) Δ P2-5株の神経病原性には、P1のIFNアンタゴニスト活性が関与していると考えられた。

これまでの報告により、脳内における狂犬病ウイルスの増殖効率が、ウイルスの神経病原性と正の関係にあることが示されている(40)。従って、CE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株が同程度の神経病原性を有することは、脳内における両株の増殖効率が同等である可能性を示している。本章では、マウス脳内における両株の増殖効率を比較するため、CE(NiP) Δ P2-5-Luc株およびCE(NiP)-Luc株感染マウス脳におけるルシフェラーゼ活性、ならびにCE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株感染マウス脳における感染性ウイルス量を検討した。その結果、各実験において、これらの株の脳内におけるウイルス複製能および感染性ウイルス産生能が同等であることが確認された(図3-3および-4)。以上より、マウス脳内におけるウイルス増殖においてtPsの重要性が低いことが示された。この成績は、CE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株の神経病原性が同等であることを裏付けるものである。

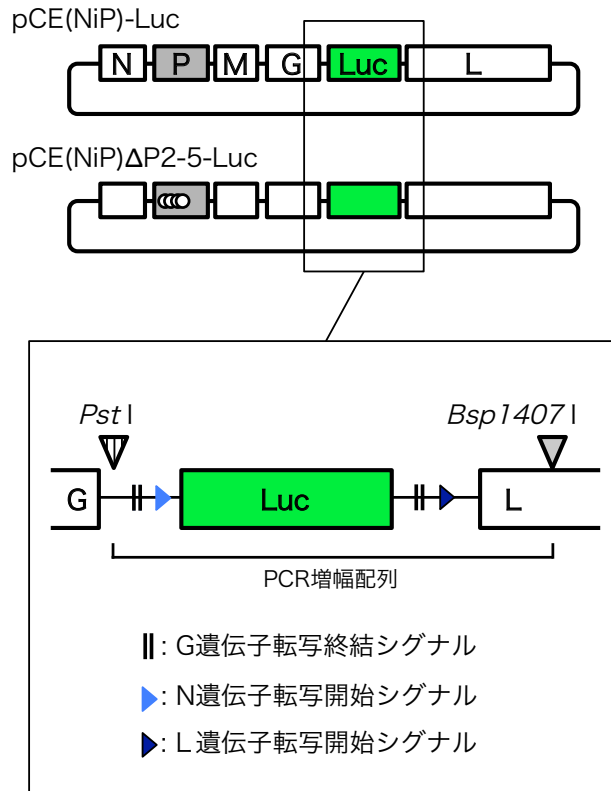
第3章では、CE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株の神経病原性およびマウス脳内における増殖効率は同等であることを示すことができた。これらの成績より、狂犬病ウイルスの神経病原性、ならびに脳内での増殖において、tPsが重要な役割を果たしていないことが明らかとなった。

表 3-1. CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株を脳内接種されたマウスの発症率
および致死率

株	1×10^4 FFU		1×10^3 FFU	
	発症率 (発症/接種個体数)	致死率 (死亡/接種個体数)	発症率 (発症/接種個体数)	致死率 (死亡/接種個体数)
CE(NiP)	100% (20/20)	100% (20/20)	85% (17/20)	85% (17/20)
CE(NiP) Δ P2-5	100% (20/20)	100% (20/20)	95% ^{ns} (19/20)	95% ^{ns} (19/20)

^{ns}: CE(NiP)株接種群と比較して、有意差なし ($p \geq 0.05$)

(A)



(B)

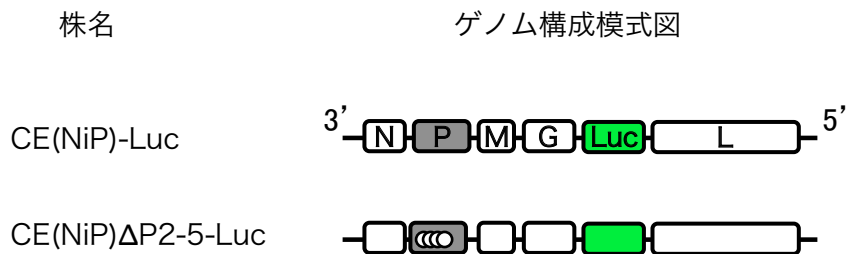


図 3-1. (A)ゲノムプラスミド pCE(NiP)-Luc の模式図
(B)CE(NiP)-Luc 株および CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株の
ゲノム構成模式図

白丸 (○) は P 遺伝子上に導入された変異[プラスミド: ATG→ATA、ゲノム: AUG→AUA (+鎖として表示)]を示す。

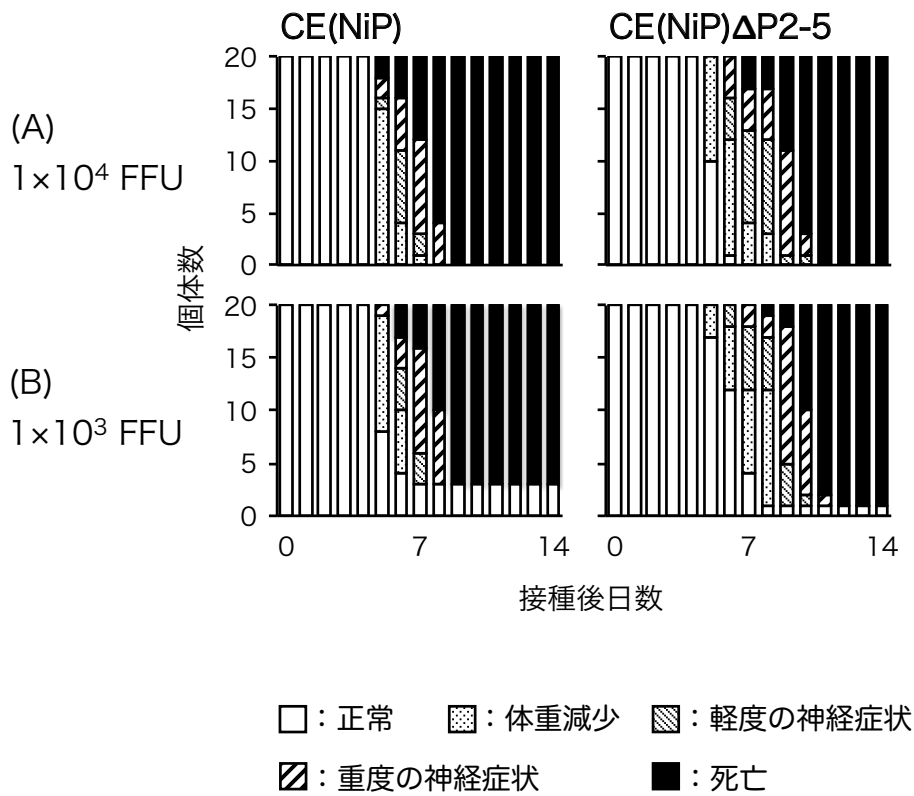


図 3-2. 1×10^4 FFU (A) もしくは 1×10^3 FFU (B) の CE(NiP)株
および CE(NiP) Δ P2-5 株が脳内接種されたマウスの症状推移

1×10^4 FFU (A) もしくは 1×10^3 FFU (B) の CE(NiP)株または CE(NiP) Δ P2-5 株を、20 匹/群の 4 週齢マウス (ddY 系統、雄) に脳内接種した。接種後 14 日間における各株感染マウスの症状を観察した。感染マウスの症状を正常、体重減少、軽度の神経症状、重度の神経症状および死亡の 5 つに分類した。

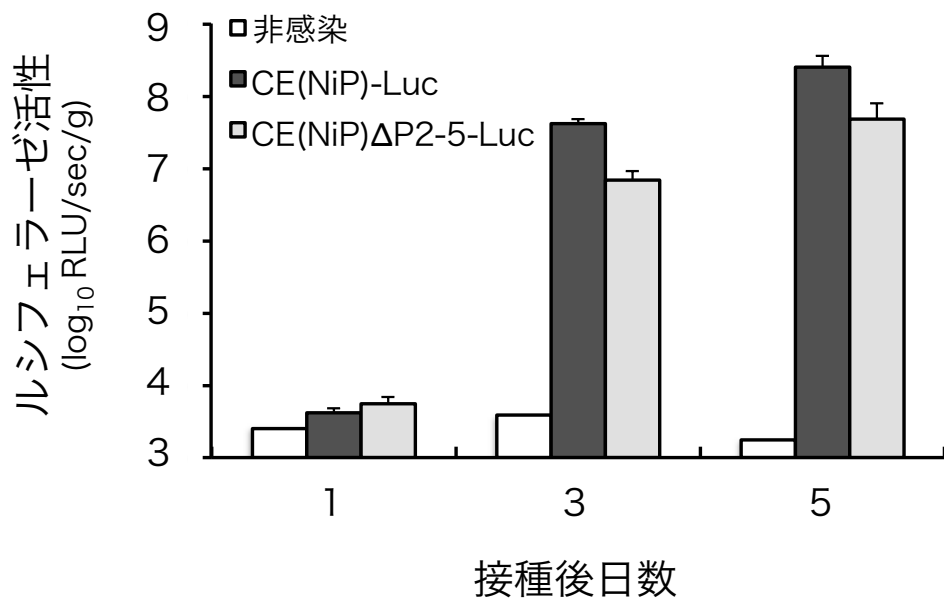


図 3-3. 感染マウス脳内における CE(NiP)ΔP2-5-Luc 株および CE(NiP)-Luc 株のウイルス複製効率の比較

1×10⁴ FFU の CE(NiP)ΔP2-5-Luc 株および CE(NiP)-Luc 株を、3 匹/群の 4 週齢マウス (ddY 系統、雄) に脳内接種した。接種 1、3 および 5 日後に各感染脳を採取し、ルシフェラーゼ活性を計測した。

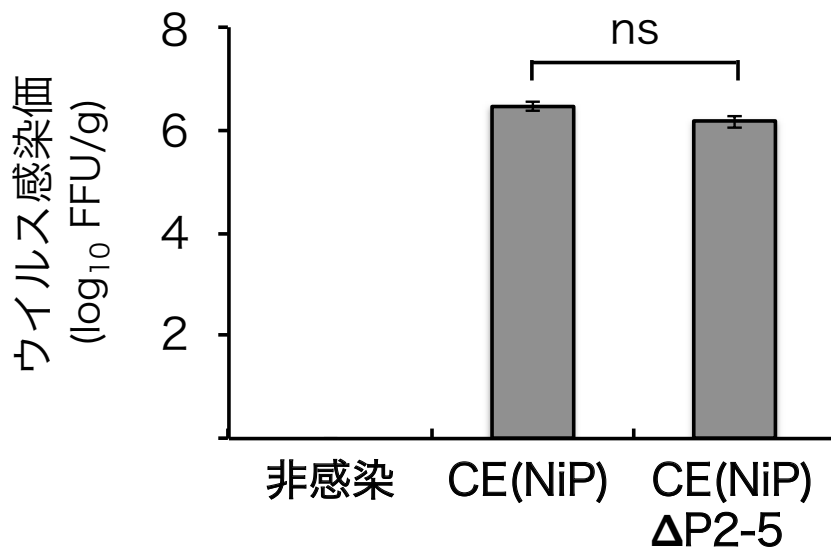


図 3-4. 感染マウス脳内における CE(NiP)ΔP2-5 株および CE(NiP)株の感染性ウイルス産生能の比較

1×10⁴ FFU の CE(NiP)ΔP2-5 株および CE(NiP)株を、5 匹/群の 4 週齢マウス (ddY 系統、雄) に脳内接種した。接種 5 日後に各感染脳を採取し、フォーカスアッセイにより脳内の感染性ウイルス量を計測した。ns: p≥0.05

第 4 章

狂犬病ウイルスの神経侵入性における tPs の重要性

序論

狂犬病ウイルスの病原性において、神経侵入性は、末梢組織から中枢神経系へと感染を拡大するウイルスの能力と定義される。これまで、ウイルスの神経侵入性を評価するために、マウスへの筋肉内接種が一般的に用いられてきた。以前の報告において、弱毒のNi-CE株が筋肉内接種によってマウスを発症させないのに対し、Ni-CE株のゲノムに強毒の西ヶ原株由来P遺伝子を保有するCE(NiP)株は致死的な感染を引き起こすことが確認されている (45)。従って、神経侵入性においてP蛋白質が重要な役割を持つことが示された。さらに、P蛋白質は、筋肉細胞における狂犬病ウイルスの増殖を促進し、ウイルスの末梢神経への感染効率を高めることが示唆されている (45)。しかしながら、狂犬病ウイルスの神経侵入性、ならびに筋肉細胞での増殖においてtPsが重要な役割を持つのかどうかは不明のままである。

そこで第4章では、狂犬病ウイルスの神経侵入性における tPs の役割を検証する目的で、マウスへの筋肉内接種により、CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の神経侵入性ならびに両株の体内分布を比較した。さらに、筋肉細胞でのウイルス増殖における tPs の重要性を検証するため、マウスの筋肉内ならびに培養筋肉細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の増殖効率を比較した。

材料と方法

培養細胞およびウイルス

NA 細胞を、第 1 章に記載した方法によって培養した。マウス骨格筋由来 G-8 細胞 (American Type Culture Collection [ATCC] Number: CRL-1456) を CO₂ インキュベーター (ヒラサワ) 内で培養した (37°C、設定 CO₂ 濃度 : 5%)。G-8 細胞用 GM として、10%FCS および 10%ウマ血清 (HS) (Invitrogen、製品番号: 26050-088) 添加ダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM) (Invitrogen、製品番号: 11995-065) を用いた。G-8 細胞の分化誘導は、ATCC の記載に従って行った。具体的には、同細胞の GM を分化誘導用培地である 2%FCS および 2%HS 添加 D-MEM と交換することで分化を誘導した。CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株は第 1 章に記述したものを、CE(NiP)-Luc 株および CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株については第 3 章に記述したものを使用した。各株のストックウイルスの作製法については、第 1 章に記載した方法を用いた。

プラスミド

CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 を発現するプラスミドとして、それぞれ pCAGGS-P1 および pCAGGS-P1 Δ P2-5 を使用した。また、ミニゲノムプラスミドとして、第 2 章において作製した pCAGGS-RVDI-Luc を使用した。N 蛋白質および L 蛋白質発現プラスミドは、第 2 章と同様に各々 pCAGGS-CEN および pCAGGS-CEL を使用した。

ミニゲノムアッセイ

組織培養プレート（Greiner bio-one、24 ウェル、製品番号: 662160）の上で培養・分化した G-8 細胞に、1 ウェルあたり 0.2 μg の pCAGGS-P1、pCAGGS-P1 Δ P2-5 または pCAGGS/MCS と共に、0.8 μg の pCAGGS-RVDI-Luc、0.4 μg の pCAGGS-CEL および 0.4 μg の pCAGGS-CEN を導入した。このとき、プラスミド導入試薬として、*TransIT-LT1*（TaKaRa、製品番号: MIR2304）を使用した。37°C / 2 日間の条件で各細胞を培養した後、第 2 章に記載した方法によって細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、RLU/sec として表記した。なお、上記のプラスミド導入細胞については、1 条件あたり 3 ウェルを用意し、各々のルシフェラーゼ活性値の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には、分散分析および Dunnett の多重検定を用いた。

CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株の神経侵入性の検討

本章に記載した動物実験には、全て ddY マウス（4 週齢、雄、日本 SLC）を使用した。1 群あたり 20 匹のマウスの左側大腿筋に、 1×10^6 FFU の CE(NiP) 株または CE(NiP) Δ P2-5 株を含むウイルス液 0.1 ml を筋肉内接種した。陰性対照として、ウイルス希釈液（5%FCS 添加 E-MEM）のみを接種した非感染マウスを用いた。感染マウスおよび非感染マウスの症状の推移を 24 日間観察した。マウスの症状の判定、ならびに発症率および致死率の算出は、第 3 章に記載した方法を用いた。発症率および致死率の有意差検定には、フィッシャーの正確確率検定を用いた。なお、本動物実験は、予め、岐阜大学動物実験委員会によって承認された（実験承認番号：13069）。

感染マウスの各組織からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成

1 群あたり 5 匹のマウスの左側大腿筋に、 1×10^6 FFU の CE(NiP)株もしくは CE(NiP) Δ P2-5 株を筋肉内接種した。陰性対照として、ウイルス希釈液 (5%FCS 添加 E-MEM) のみを筋肉内接種した非感染マウスを用いた。接種 5 日後にこれらマウスを安楽殺し、左側大腿筋、左側坐骨神経、脊髄および脳を採取し、液体窒素を用いて急速凍結した。凍結した各組織を乳鉢および乳棒を用いて粉碎後、TRIzol Reagent (Invitrogen、製品番号: 15596-026) および PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen、製品番号: 12183018A) を用いて各組織から RNA を抽出した。次に、抽出した RNA を鋳型として、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen、製品番号: 18080-044) およびウイルスゲノム特異的 RT プライマー-RHN19 (+) (表 4-1) を用いて cDNA を合成した。具体的には、抽出した RNA 11 μ l に、各々 1 μ l の 10 mM dNTP Mix (Invitrogen、製品番号: 18427-013) および RHN19 (+) プライマーを加え、65°C で 5 分間加熱した後、氷上で急冷した。この RNA 混合液に 4 μ l の 5 \times First-Strand Buffer、それぞれ 1 μ l の 0.1 M DDT、RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen、製品番号: 10777-019) および SuperScript III Reverse Transcriptase を加え、55°C / 60 分間の条件で RT 反応を行った後、70°C / 15 分間の保温により酵素を失活させた。

Nested PCR

表 4-1 に示したプライマー、ならびに *TaKaRa Ex Taq Hot Start Version*

(TaKaRa、製品番号: RR006A) を用いた PCR によって、ウイルスゲノム N 遺伝子領域を含む cDNA を増幅した。具体的には、2.5 μ l の 10 \times *Ex Taq* Buffer、2 μ l の dNTP Mixture、0.25 μ l ずつの 50 μ M プライマーおよび 0.125 μ l の *TaKaRa Ex Taq* HS を、滅菌超純水に加えて全量が 24 μ l となるよう PCR 調整液を作製した。その PCR 調整液に 1 μ l の鋳型 cDNA を混和し、以下の条件で反応を行った。1st PCR では、調整液を 95 $^{\circ}$ C / 5 分間加温した後に、95 $^{\circ}$ C / 30 秒間の熱変性、58 $^{\circ}$ C / 30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C / 1 分間の伸長反応の処理を 30 サイクル繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C / 5 分間の条件で保温した。また、2nd PCR では、アニーリング温度を 50 $^{\circ}$ C、サイクル数を 25 に変更した。

TAE バッファー (40 mM Tris-acetate/1 mM EDTA) を加えて作製したエチジウムブロマイド加 (0.5 μ g/ml) 1.2%アガロースゲルを用いて、PCR 産物の電気泳動を行った。電気泳動後、UV トランスイルミネーター (ULTRA LUM) によって、PCR による遺伝子の増幅 (461 bp) を確認し、ChemiDoc XRS+ システム (Bio-Rad) を用いてゲルを撮影した。

ルシフェラーゼアッセイによるマウス筋肉内における各株のウイルス複製能の検討

1 群あたり 3 匹のマウスの左側大腿筋に、 1×10^6 FFU の CE(NiP)-Luc 株または CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株を筋肉内接種した。陰性対照として、ウイルス希釈液 (5%FCS 添加 E-MEM) のみを筋肉内接種した非感染マウスを用いた。接種 0、24、48 および 72 時後にこれらマウスを安楽殺し、左側大腿筋を採取した。続いて、採取した大腿筋の重さを計測し、1 ml の Passive Lysis Buffer (Promega、

製品番号: E1941) を用いて大腿筋を溶解した後、 -80°C で凍結した。融解した溶解液を攪拌し、 $20,000 \times \text{g} / 15$ 分間の条件で遠心後、Luciferase assay system (Promega、製品番号: E1500) によって上清 $10 \mu\text{l}$ 中のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、RLU/sec/g (筋肉の重量) として表記した。各株の感染筋肉におけるルシフェラーゼ活性の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には分散分析および Dunnett の多重検定を適用した。

ルシフェラーゼアッセイによる培養筋肉細胞における各株のウイルス複製能の検討

組織培養プレート (Greiner bio-one、24 ウェル、製品番号: 662160) の上で培養・分化した G-8 細胞に、CE(NiP)-Luc 株、または CE(NiP) Δ P2-5-Luc 株を MOI=1 となるよう接種した。接種 1、3 および 5 日後に、ダルベッコ PBS(-) (日水、製品番号: 05913) で洗浄した感染細胞を、1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ の Cell Culture Lysis Reagent (Promega、製品番号: E1531) を用いて溶解し、 -80°C で凍結した。融解した細胞溶解液を攪拌し、 $12,000 \times \text{g} / 2$ 分間の条件で遠心後、Luciferase assay system (Promega、製品番号: E1500) によって上清 $10 \mu\text{l}$ 中のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、RLU/sec として表記した。なお、上記のウイルス接種については、1 条件あたり 3 ウェルで行い、各々のルシフェラーゼ活性の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には分散分析および Dunnett の多重検定を適用した。

培養筋肉細胞における各株の感染性ウイルス産生能の比較

組織培養プレート（Greiner bio-one、6 ウェル、製品番号: 657160）の上で培養・分化した G-8 細胞に、CE(NiP)株または CE(NiP) Δ P2-5 株を MOI=1 となるよう接種した後、1、3 および 5 日後に培養上清を回収した。第 1 章において述べたフォーカスアッセイにより培養上清中のウイルス感染価を測定した。なお、上記のウイルス接種については、1 条件あたり 3 ウェルで行い、各々の培養上清中のウイルス感染価の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には Student の t 検定を適用した。

結果

筋肉内接種によるマウスに対する CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の神経侵入性の比較

CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の神経侵入性を比較する目的で、マウスへの筋肉内接種により各株の病原性を検討した(表 4-2 および図 4-1)。CE(NiP)株接種群では、20 匹中 16 匹が体重減少または神経症状を示した後に死亡した。一方、CE(NiP) Δ P2-5 株接種群では、20 匹中 7 匹のみが体重減少または神経症状を示し、そのうちの 6 匹が死亡した。すなわち、CE(NiP)株接種群における発症率および致死率がいずれも 80%であったのに対し、CE(NiP) Δ P2-5 株接種群では、各々 35%および 30%であった。なお、両接種群における発症率および致死率の間には有意差が認められた ($p < 0.01$)。以上の結果より、CE(NiP) Δ P2-5 株の神経侵入性は、CE(NiP)株よりも減弱していることが示された。

感染マウス体内における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の分布

筋肉内接種されたマウスにおける CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の体内分布を比較する目的で、各株感染マウスの大腿筋、坐骨神経、脊髄および脳内におけるウイルス遺伝子の存在を RT-nested PCR 法に基づく検出系により検討した(図 4-2)。CE(NiP)株接種群の 5 個体中 3 個体が発症し、CE(NiP) Δ P2-5 株接種群に発症個体が認められなかった接種 5 日後において、各組織におけるウイルス遺伝子の存在を検討した結果、全ての感染マウスにおいて、接種部位である大腿筋からウイルス遺伝子が検出された。CE(NiP)株接種群では、大腿筋に加え、全ての感染マウスの坐骨神経、脊髄および脳からウイルス遺伝子が検

出されたのに対し、CE(NiP) Δ P2-5株接種群では、5個体中1個体のみの坐骨神経、脊髄および脳からウイルス遺伝子が検出された。以上より、CE(NiP) Δ P2-5株の末梢神経への感染効率は、CE(NiP)株よりも減弱していることが示された。

マウス筋肉におけるCE(NiP) Δ P2-5-Luc株およびCE(NiP)-Luc株のウイルス複製能の比較

マウス筋肉におけるCE(NiP) Δ P2-5-Luc株およびCE(NiP)-Luc株のウイルス複製能を比較する目的で、各株を筋肉内接種したマウスの大腿筋におけるルシフェラーゼ活性を経時的に測定した(図4-3)。CE(NiP)-Luc株接種群において、ルシフェラーゼ活性が接種48時間後から72時間後にかけて上昇する傾向が確認されたのに対して、CE(NiP) Δ P2-5-Luc株接種群では、接種72時後までルシフェラーゼ活性は低く維持された。接種72時後におけるCE(NiP) Δ P2-5-Luc株接種群のルシフェラーゼ活性値が 9.1×10^3 RLU/sec/gだったのに対し、CE(NiP)-Luc株接種群のルシフェラーゼ活性値は非接種群と同等の 4.2×10^3 RLU/sec/gの値を示した。以上より、マウス大腿筋におけるCE(NiP) Δ P2-5-Luc株の複製能は、CE(NiP)-Luc株よりも低い傾向にあることが確認された。

培養筋肉細胞におけるCE(NiP) Δ P2-5-Luc株およびCE(NiP)-Luc株のウイルス複製能の比較

培養筋肉細胞におけるCE(NiP) Δ P2-5-Luc株およびCE(NiP)-Luc株のウイルス複製能を比較する目的で、各株を接種したG-8細胞におけるルシフェラーゼ活性を経時的に測定した(図4-4)。CE(NiP)-Luc株感染細胞では時間経過と共に

ルシフェラーゼ活性が上昇したのに対し、CE(NiP) Δ P2-5-Luc株感染細胞におけるルシフェラーゼ活性は接種5日後まで低く維持された。接種3日後において、CE(NiP)-Luc株感染細胞におけるルシフェラーゼ活性が 9.1×10^3 RLU/secだったのに対し、CE(NiP) Δ P2-5-Luc株感染細胞では同活性は 1.3×10^3 RLU/secと1/7の値を示し、有意に低かった ($p < 0.05$)。また、接種5日後においても、CE(NiP) Δ P2-5-Luc株感染細胞のルシフェラーゼ活性値は、CE(NiP)-Luc株感染細胞より有意に低かった ($p < 0.01$)。以上の結果より、培養筋肉細胞におけるCE(NiP) Δ P2-5-Luc株のウイルス複製能は、CE(NiP)-Luc株よりも低いことが示された。

培養筋肉細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の感染性ウイルス産生能の比較

培養筋肉細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の感染性ウイルス産生能を比較する目的で、G-8 細胞に各株を接種し、培養上清中のウイルス感染価を経時的に測定した (図 4-5)。両株のウイルス感染価は時間経過と共に上昇し、両感染価の差は縮まる傾向があるものの、どの接種後日数においても、CE(NiP) Δ P2-5 株のウイルス感染価は、CE(NiP)株の感染価よりも有意に低かった ($p < 0.05$)。特に、接種 1 日後では、CE(NiP)株のウイルス感染価が 1.5×10^4 FFU/ml であったのに対して、CE(NiP) Δ P2-5 株のウイルス感染価は 1.1×10^3 FFU/ml と、約 1/10 の値を示した。従って、培養筋肉細胞において、CE(NiP) Δ P2-5 株の感染性ウイルス産生能は CE(NiP)株よりも低いことが示された。

筋肉細胞でのウイルス RNA 合成における CE(NiP) Δ P2-5 株 P1 の機能

筋肉細胞において、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 がウイルス RNA 合成における機能を保持しているかどうか検討する目的で、CE(NiP) Δ P2-5 株または CE(NiP) 株の P1 を発現させた G-8 細胞を用いてミニゲノムアッセイを行った(図 4-6)。空ベクターを導入した細胞におけるルシフェラーゼ活性が 82 RLU/sec であったのに対し、CE(NiP)株の P1 を発現させた細胞では 1.2×10^4 RLU/sec のルシフェラーゼ活性が検出された。この結果より、同株の P1 を発現させた細胞においてミニゲノム RNA の複製およびルシフェラーゼ遺伝子 mRNA の転写が誘起されていることが確認された。さらに、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 を発現させた細胞においても、 8.9×10^3 RLU/sec のルシフェラーゼ活性が検出され、CE(NiP) Δ P2-5 株または CE(NiP)株の P1 を発現させた細胞におけるルシフェラーゼ活性の間に有意差は認められなかった ($p \geq 0.05$)。以上より、筋肉細胞において、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 は、CE(NiP)株の P1 と同等の RNA ポリメラーゼ共因子としての活性を保持していることが示された。

考察

本章では、狂犬病ウイルスの神経侵入性におけるtPsの重要性を検証するため、マウスへの筋肉内接種によってCE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株の病原性を比較した。その結果、CE(NiP) Δ P2-5株の神経侵入性が減弱していることが確認され、狂犬病ウイルスの神経侵入性においてtPsが重要な役割を果たしていることが示された(表4-2および図4-1)。これまでに、狂犬病ウイルスの病原性発現におけるtPsの重要性を示した報告はない。従って、本研究において初めて、狂犬病ウイルスの神経侵入性にtPsが重要であることが明らかとなった。

次に、神経侵入性におけるtPsの役割を解明する手掛かりを得るために、大腿筋に筋肉内接種したマウスにおけるCE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株の体内分布を比較した。この時、各組織内のウイルス遺伝子を検出するために、以前の研究において確立されたRT-nested PCRによる検出系を使用した(45)。本実験系は、感染性ウイルスに換算して10 FFUまで検出可能であることが報告されている(45)。従って、全ての感染マウスの大腿筋から検出されたウイルス遺伝子は、大腿筋内の複製ウイルスに加え、接種液中に含まれる非複製ウイルスに由来すると考えられる(図4-2)。一方で、末梢神経へのウイルス感染は、CE(NiP)株接種群の100%の個体において確認されたのに対し、CE(NiP) Δ P2-5株接種群では20%のみで認められた(図4-2)。すなわち、CE(NiP) Δ P2-5株の末梢神経への感染効率が低下していることが明らかとなった。以上の結果より、狂犬病ウイルスの末梢神経への感染において、tPsが重要な役割を果たしていることが示された。

以前の研究において、末梢神経へのウイルスの感染拡大には、筋肉細胞にお

けるウイルス増殖が重要であることが示されている (45)。そこで、*in vivo*および*in vitro*の実験系を用いて、筋肉細胞におけるCE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株の増殖効率を比較した。その結果、どちらの実験系においても、筋肉細胞におけるCE(NiP) Δ P2-5株の増殖効率が低下していることが示された (図4-3、-4および-5)。これらの結果は、筋肉細胞におけるウイルス増殖にtPsが重要である可能性を示している。

上記のように、tPsの発現能の欠失が筋肉細胞におけるCE(NiP) Δ P2-5株の増殖効率を低下させたと考えられた。一方、CE(NiP) Δ P2-5株のP1に導入された4つのアミノ酸変異が、筋肉細胞でのウイルスRNA合成におけるP1の機能を減弱させた可能性も否定できない。第2章では、神経細胞においてP1が同機能を保持することを確認したものの、筋肉細胞においても保持しているかどうかは確認できていない。そこで本章では、筋肉由来G-8細胞を用いてミニゲノムアッセイを行い、CE(NiP) Δ P2-5株のP1のRNAポリメラーゼ共因子としての活性を検証した。同アッセイの結果、G-8細胞においてCE(NiP) Δ P2-5株のP1が、CE(NiP)株のP1と同等に、RNAポリメラーゼ共因子としての活性を有することが示された (図4-6)。以上の結果より、筋肉細胞におけるCE(NiP) Δ P2-5株の増殖能の減弱は、同株のP1に導入された変異の影響ではなく、tPsの発現能の欠失を原因とすることが明らかとなった。

*in vivo*および*in vitro*の実験系により、筋肉細胞におけるCE(NiP) Δ P2-5株の増殖能がCE(NiP)株よりも減弱していることが示された一方で (第4章 図4-3、-4および-5)、神経細胞では両株の増殖能が同等であることが明らかとなっている (第1章 図1-4、第3章 図3-3および-4)。このように、細胞種によって

CE(NiP) Δ P2-5株の増殖効率が異なることは、ウイルス増殖におけるtPsの重要性が細胞種ごとに異なることを示している。すなわち、tPsが細胞種特異的な機能を有している可能性が考えられた。

本章では、CE(NiP) Δ P2-5 株の神経侵入性、末梢神経への感染効率ならびに筋肉細胞でのウイルス増殖効率が、CE(NiP)株よりも減弱していることが示された。従って、tPs が筋肉細胞におけるウイルス増殖を促進し、末梢神経へのウイルス感染効率を高める役割を果たすことで、狂犬病ウイルスの神経侵入性に寄与していることが示唆された。

表 4-1. RT および Nested PCR に使用したプライマー

	プライマー	方向 ^a	配列 (5' → 3')	位置 ^b
RT	RHN19(+)	F	AAAATGTAACACCTCTACAATG	52 – 73
1 st PCR	N501(+)	F	TCCTGAGTCTGTATAGGTTGAGCAA	501 – 525
	RHN18(-)	R	CCATGTAGCATCCAACAAAGT	1028 – 1008
2 nd PCR	N540(+)	F	ACACCGGTA ACTATAAAACAAACAT	540 – 564
	N1000(-)	R	ATTGAACACATGACCAACGGCATTTC	1000 – 976

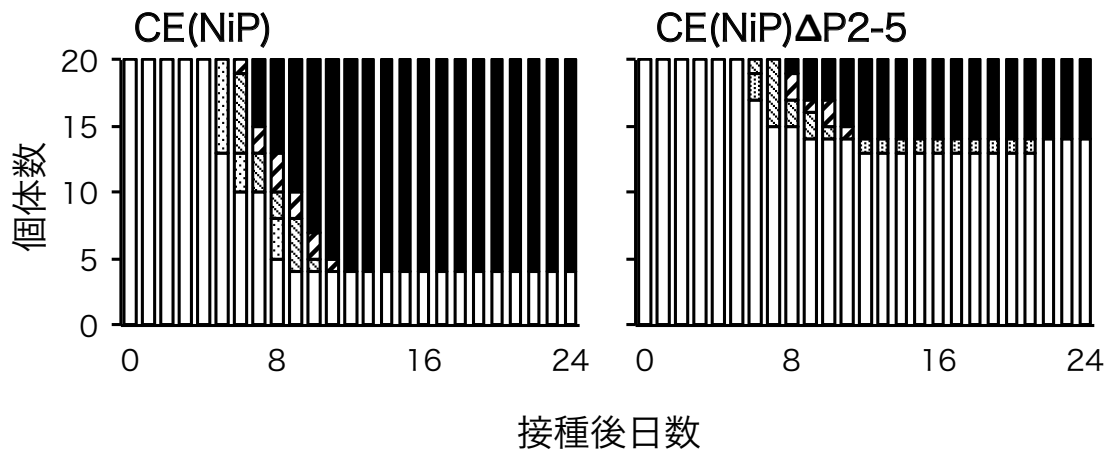
^a: F (フォワードプライマー)、R (リバースプライマー)

^b: 狂犬病ウイルス西ヶ原株 (Accession No.AB044824) の完全長ゲノム配列に基づく塩基番号

表 4-2. CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株が筋肉内接種されたマウスの発症率および致死率

株	発症率 (発症/接種個体数)	致死率 (死亡/接種個体数)
CE(NiP)	80% (16/20)	80% (16/20)
CE(NiP) Δ P2-5	35%* (7/20)	30%* (6/20)

*: 発症率および致死率を CE(NiP)株接種群と比較して、有意差あり (p<0.01)



□: 正常 ▤: 体重減少 ▨: 軽度の神経症状 ▩: 重度の神経症状 ■: 死亡

図 4-1. CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株が筋肉内接種されたマウスの症状推移

1×10⁶ FFU の CE(NiP)株または CE(NiP)ΔP2-5 株を、20 匹/群の 4 週齢マウス (ddY 系統、雄) に筋肉内接種した。接種後 24 日間における各株感染マウスの症状を観察した。感染マウスの症状を正常、体重減少、軽度の神経症状、重度の神経症状および死亡の 5 つに分類した。

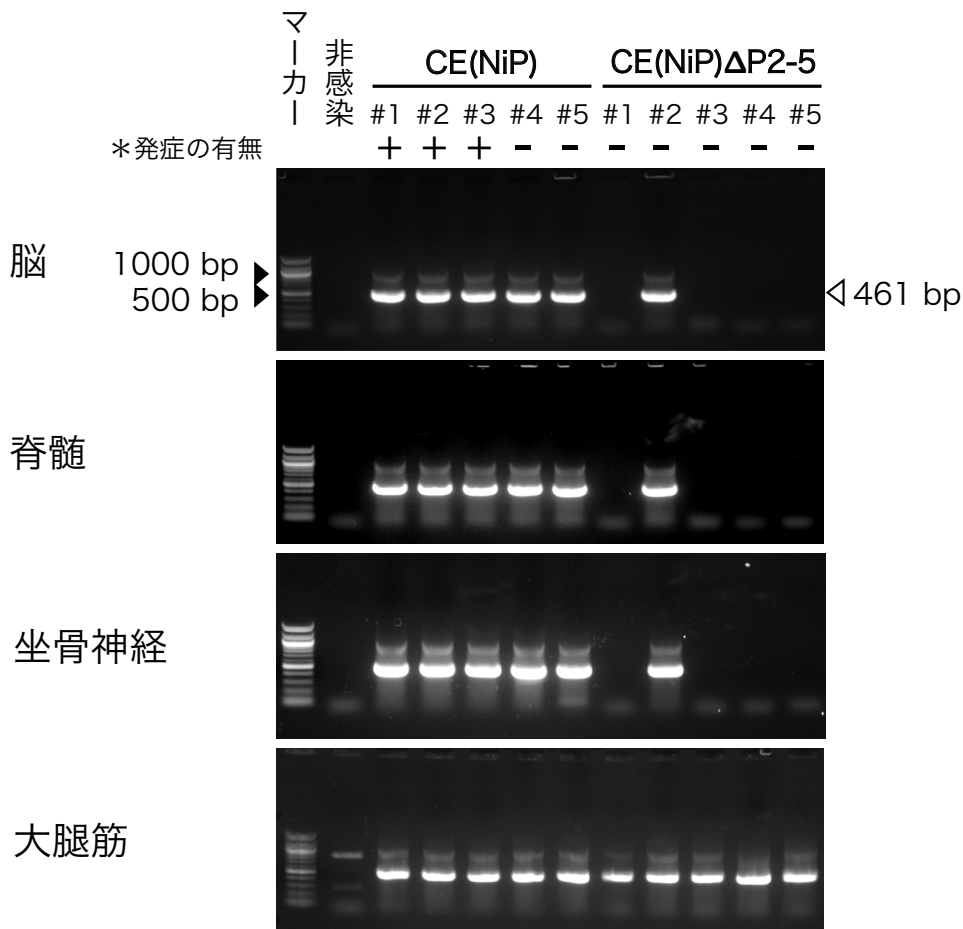


図 4-2. 感染マウスにおける CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株の体内動態の比較

1 \times 10⁶ FFU の CE(NiP)株または CE(NiP) Δ P2-5 株を筋肉内接種した 5 匹/群の 4 週齢マウス (ddY 系統、雄) から、脳、脊髄、坐骨神経および大腿筋を接種 5 日後に採取した。各臓器から RNA を抽出した後、狂犬病ウイルス N 遺伝子 (461 bp) を標的とした RT-nested PCR により各組織におけるウイルス遺伝子を検出した。#: マウス個体識別番号、非感染: ウイルス希釈液を筋肉内接種したマウスの各組織、*: 組織を採取した接種 5 日後までに、体重減少、もしくは軽度の神経症状を示した個体を+、無症状出会った個体を-とした。

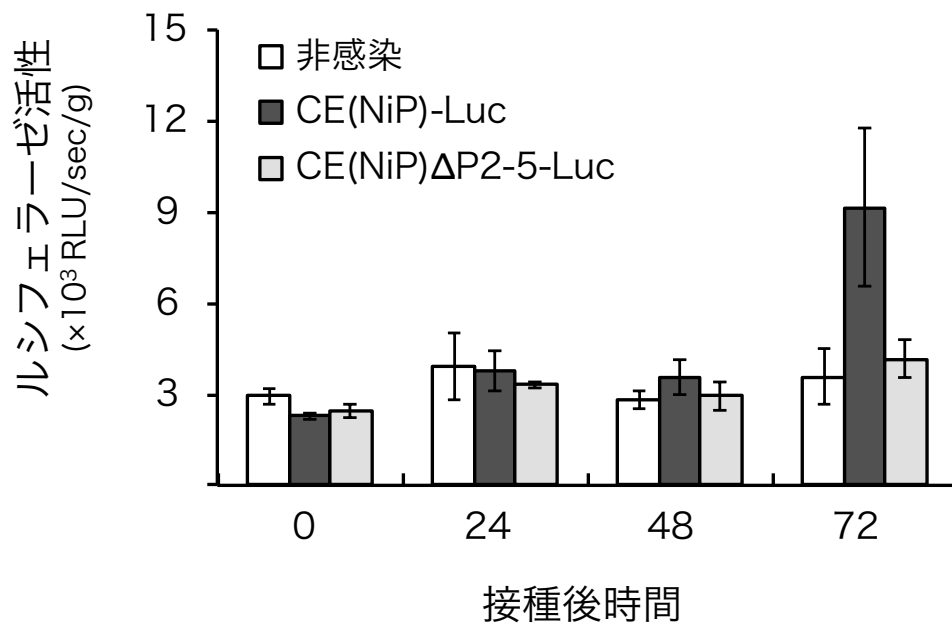


図 4-3. 感染マウス筋肉内における CE(NiP)-Luc 株および CE(NiP)ΔP2-5-Luc 株のウイルス複製効率の比較

1×10^6 FFU の CE(NiP)-Luc 株または CE(NiP)ΔP2-5-Luc 株を、3 匹/群の 4 週齢マウス (ddY 系統、雄) 筋肉内接種した。接種 0、24、48 および 72 時間後に各マウスから大腿筋を採取し、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、RLU/sec/g (筋肉の重量) により、算出した。

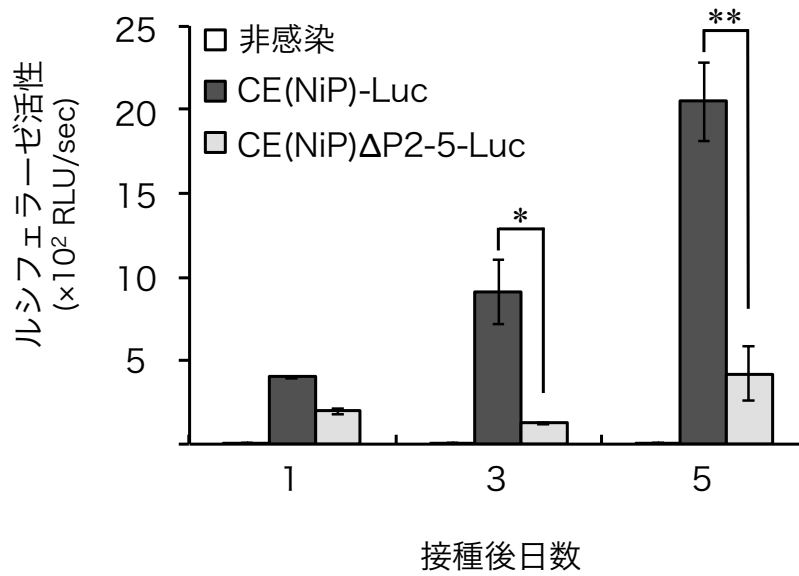


図 4-4. G-8 細胞における CE(NiP)-Luc 株および CE(NiP)ΔP2-5-Luc 株のウイルス複製効率の比較

CE(NiP)-Luc 株および CE(NiP)ΔP2-5-Luc 株を、G-8 細胞に MOI=1 となるよう接種した。接種 1、3 および 5 日後に各感染細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を計測した。*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$

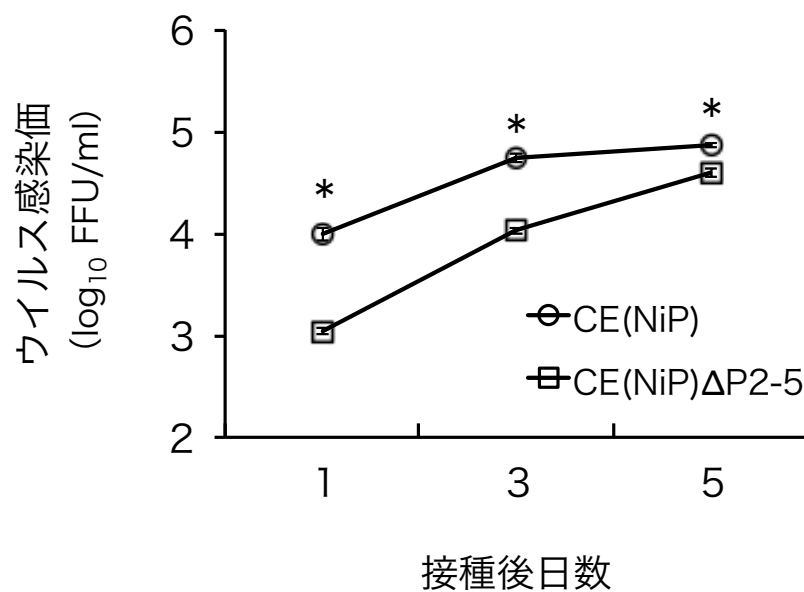


図 4-5. G-8 細胞における CE(NiP)-Luc 株および CE(NiP)ΔP2-5-Luc 株の感染性ウイルス産生能の比較

CE(NiP)-Luc 株および CE(NiP) ΔP2-5-Luc 株を、G-8 細胞に MOI=1 となるよう接種した。接種 1、3 および 5 日後に培養上清を回収し、フォーカスアッセイによって上清中のウイルス感染価を計測した。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。*: p<0.05

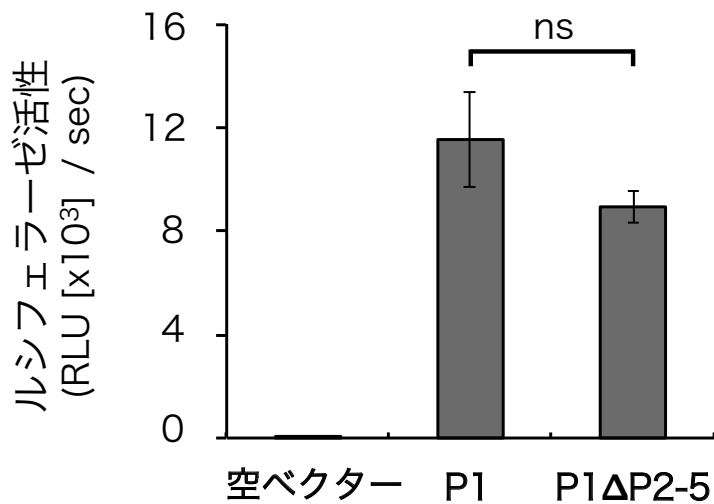


図 4-6. G-8 細胞における CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株の P1 のウイルス RNA 合成における機能

空ベクター、pCAGGS-P1 もしくは pCAGGS-P1ΔP2-5 を、ルシフェラーゼ発現ミニゲノムプラスミド、N 蛋白質発現プラスミドおよび L 蛋白質発現プラスミドと共に、G-8 細胞に導入した。導入 2 日後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。pCAGGS-P1 および pCAGGS-P1ΔP2-5 から発現する蛋白質を、各々 P1 および P1ΔP2-5 と表記している。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

ns: $p \geq 0.05$

第 5 章

筋肉細胞における tPs の IFN 産生抑制活性

序論

第4章では、tPsが筋肉細胞におけるウイルス増殖を促進することで、末梢神経への感染効率を高めることが示唆された。これまでに、筋肉細胞における効率的なウイルス増殖に、P蛋白質のIFN産生抑制活性が重要であることが示されている(45)。また別の報告によって、P蛋白質が176~181位のアミノ酸領域を介して、IFN産生を司る細胞内シグナル伝達を抑制することが明らかとなっている(30)。このアミノ酸領域が全てのP蛋白質アイソフォームに存在する領域であることより(第1章 図1-1)、どのアイソフォームもIFNの産生抑制に関与する可能性が考えられた。以上の知見より、筋肉細胞においてtPsがIFN産生抑制活性を有するという仮説を得た。

そこで第5章では、筋肉細胞におけるIFN産生の抑制にtPsが重要かどうかを検討する目的で、CE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株に感染した培養筋肉細胞におけるIFN関連遺伝子の発現量を比較した。さらに、培養筋肉細胞における各P蛋白質アイソフォームのIFN産生抑制活性を検証した。

材料と方法

培養細胞およびウイルス

NA 細胞を、第 1 章に記載した方法によって培養した。また、G-8 細胞 (American Type Culture Collection [ATCC] Number: CRL-1456) を第 4 章に記載した方法によって培養した。CE(NiP)株および CE(NiP) Δ P2-5 株については第 1 章に記述したものを使用した。各株のストックウイルスの作製法については、第 1 章に記載した方法を用いた。

プラスミド

GFP-P1 および GFP-P1 Δ P2-5 を発現するプラスミドとして、第 2 章に記述した pEGFP-P1 および pEGFP-P1 Δ P2-5 を使用した。各 P 蛋白質アイソフォームを発現するプラスミドとして、第 1 章に記述した pCAGGS-P1~P5 を使用した。さらに、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 を発現するプラスミドとして、pCAGGS-P1 Δ P2-5 を使用した。西ヶ原株の N 蛋白質を発現する pCAGGS-N は、以前の研究において作製されたものを使用した (22)。

レポーターアッセイによる IFN- β プロモーター活性の測定

組織培養プレート (Greiner bio-one、24 ウェル、製品番号: 662160) の上で培養・分化した G-8 細胞に、1 ウェルあたり 0.12 μ g の pEGFP-P1、pEGFP-P1 Δ P2-5 または pEGFP-C1 と共に、0.25 μ g の IFN β -pGL3 および 0.04 μ g の pRL-Tk (Promega、製品番号: E2241) を導入した。また、pEGFP-P1、pEGFP-P1 Δ P2-5 または pEGFP-C1 の代わりに、pCAGGS-P1~P5、

pCAGGS-P1ΔP2-5、pCAGGS-N、もしくはpCAGGS/MCSを使用する実験も行った。プラスミド導入試薬には、*TransIT-LT1* (TaKaRa、製品番号: MIR2304) を使用した。その後、37°Cで24時間培養した細胞に、1ウェルあたり0.5 μg の2本鎖RNAアナログのPoly (I・C)を導入した。さらに37°C / 6時間の条件で各細胞を培養した後、第2章に記載した方法により細胞内のGL活性およびRL活性を測定した。得られたGL活性の値をRL活性の値で割ったものをIFN-βプロモーター活性として表示した。上記のプラスミド導入細胞については、1条件あたり3ウェルを用意し、各々のルシフェラーゼ活性値の平均値および標準誤差を算出した。統計処理には、分散分析およびDunnnettの多重検定を用いた。

SDS-PAGE およびウエスタンブロット

第1章に記載した方法によって、前述のレポーターアッセイに用いられたG-8細胞をSDS-PAGEおよびウエスタンブロットにより解析した。

感染細胞からの RNA 抽出ならびに cDNA 合成

組織培養プレート (Greiner bio-one、24 ウェル、製品番号: 662160) の上で培養・分化した G-8 細胞をハンクス液で洗浄した後、CE(NiP)株またはCE(NiP)ΔP2-5 株を MOI=1 となるよう同細胞に接種した。ウイルス接種 24 時間後の細胞をダルベッコ PBS(-) (日水、製品番号: 05913) を用いて洗浄した後、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN、製品番号: 74134) によって各感染細胞から RNA を抽出した。一定の濃度に統一した RNA を鋳型として、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen、製品番号: 18080-044) および Random

Primer [hexadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)₆] (TaKaRa、製品番号: 3801) を用いて cDNA を合成した。具体的には、抽出した RNA 11 μ l に、各々 1 μ l の 10 mM dNTP Mix (Invitrogen、製品番号: 18427-013) および上記の Random Primer を加え、65°C で 5 分間加熱した後に氷上で急冷した。このサンプル RNA 混合液に 4 μ l の 5×First-Strand Buffer、各々 1 μ l の 0.1 M DDT、RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen、製品番号: 10777-019) および SuperScriptIII Reverse Transcriptase を加え、25°C / 5 分間、50°C / 60 分間、70°C / 15 分間の条件で加温して cDNA を合成し、後述のリアルタイム PCR に使用するまで 4°C で保存した。

リアルタイム PCR

感染細胞内の全RNA中における *Ifn- β* 、*Mx1*、*Oas1* およびマウスグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*Gapdh*) mRNA の発現量を、作製した cDNA を用いて、TaqMan 法に基づいたリアルタイム PCR により測定した。すなわち、10 μ l の TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems、製品番号: 4369016) にサンプル cDNA を 2 μ l 混合した。この混合液に各標的遺伝子の TaqMan Assays (Applied Biosystems、*Ifn- β* : Mm00439546、*Mx1*: Mm00487796、*Oas1*: Mm00449297 および GAPDH: 4352339E) を 1 μ l 加え、滅菌超純水を加えて最終量が 20 μ l になるように調整した。上記調整液を、StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて以下の条件で反応させた。すなわち、50°C / 2分間、95°C / 10分間の熱反応の後、95°C / 15秒間の熱変性および 60°C / 1分間のアニーリング・伸長反応を 40 サイクル繰り返

した。各サンプルにおける遺伝子発現量を *Gapdh* mRNA の発現量で割ることにより、サンプル間の初期細胞数およびRNA抽出効率の差異による影響を補正した。なお、上記のリアルタイムPCRについては、1条件あたり3ウェルの細胞を用いて実施し、*Gapdh* mRNAにより補正した各々の遺伝子発現量の平均値及び標準誤差を算出した。統計処理には分散分析およびDunnnettの多重検定を適用した。

結果

CE(NiP) Δ P2-5 株または CE(NiP)株を感染させた培養筋肉細胞における *Ifn- β* 、*Mx1* および *Oas1* 遺伝子発現量の比較

CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株感染筋肉細胞における IFN 産生の程度を比較する目的で、各株感染 G-8 細胞における *Ifn- β* mRNA の発現量を検証した (図 5-1A)。CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞における *Ifn- β* mRNA の発現量は、CE(NiP)株感染細胞における同 mRNA の発現量の約 4 倍の値となり、有意に高かった ($p < 0.01$)。次に、IFN 誘導性遺伝子に注目し、同感染細胞における *Mx1* および *Oas1* mRNA の発現量を検討した (図 5-1B および C)。CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞における *Mx1* および *Oas1* mRNA の発現量は、CE(NiP)株感染細胞における同 mRNA の発現量の約 4 倍および 5 倍の値を示し、有意に高かった ($p < 0.01$)。以上より、筋肉細胞において、CE(NiP) Δ P2-5 株の感染は CE(NiP)株よりも IFN 遺伝子および IFN 誘導性遺伝子の発現を強く誘導することが示された。

筋肉細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 の IFN 産生抑制活性

筋肉細胞において CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 が IFN 産生抑制活性を保持しているかどうかを検証する目的で、GFP-P1 Δ P2-5 および GFP-P1 を発現させた G-8 細胞における IFN- β プロモーター活性をレポーターアッセイにより比較した。しかし、GFP-P1 を発現させた細胞においても、Poly (I·C) の処理により刺激された IFN- β プロモーター活性は抑制されないことが判明した (データ未掲載)。すなわち、本アッセイに GFP-P1 および GFP-P1 Δ P2-5 は使用できないことが示され

た。そこで、P1発現プラスミドのpEGFP-P1 Δ P2-5およびpEGFP-P1を、それぞれpCAGGS-P1 Δ P2-5およびpCAGGS-P1に変更し、再度レポーターアッセイを行った（図5-2）。陰性対照の細胞においてPoly (I·C)の処理によりIFN- β プロモーターが活性化された一方で、CE(NiP) Δ P2-5株またはCE(NiP)株のP1を発現させた細胞では、IFN- β プロモーター活性が陰性対照における同活性の約1/8まで下がり、有意に抑制された ($p < 0.01$)。また、両株のP1を発現させた細胞におけるIFN- β プロモーター活性の間に、有意差は認められなかった ($p \geq 0.05$)。Poly (I·C)を処理した細胞の溶解液をウエスタンブロットによって解析した結果、tPsのバンドは確認されず、同程度のシグナル強度を持つCE(NiP) Δ P2-5株およびCE(NiP)株のP1のバンドのみが確認された。以上の結果より、筋肉細胞において、CE(NiP) Δ P2-5株のP1のIFN産生抑制活性は、CE(NiP)株のP1と同等であることが示された。

筋肉細胞における各 P 蛋白質アイソフォームの IFN 産生抑制活性

筋肉細胞における各 P 蛋白質アイソフォームの IFN 産生抑制活性を検証する目的で、pCAGGS-P1~P5 を各々導入した G-8 細胞における IFN- β プロモーター活性をレポーターアッセイにより比較した（図 5-3）。空ベクターまたは pCAGGS-N を導入した陰性対照の細胞では、Poly (I·C)の処理により IFN- β プロモーターが活性化された。一方、各 P 蛋白質アイソフォームを発現させたいずれの細胞においても、IFN- β プロモーター活性は陰性対照の細胞における同活性の約 1/6 から 1/10 となり、有意に抑制された ($p < 0.005$)（図 5-3A）。Poly (I·C)を処理した細胞の溶解液をウエスタンブロットによって解析した結

果、シグナル強度に差があるものの、各プラスミドより発現される最長のアイソフォームのバンドのみが検出された (図 5-3B)。従って、筋肉細胞において、全てのアイソフォームが IFN 産生抑制活性を有する可能性が示された。

考察

tPs が筋肉細胞において IFN 産生を抑制する可能性を検証するため、まず CE(NiP)P2-5 株および CE(NiP)株を接種した筋肉由来 G-8 細胞における IFN 遺伝子および IFN 誘導性遺伝子の発現量を比較した。その結果、CE(NiP)株感染細胞と比較して、CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞では *Ifn- β* 遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった (図 5-1A)。また、CE(NiP) Δ P2-5 株感染細胞において、IFN 誘導性遺伝子である *Mx1* および *Oas1* 遺伝子の発現量も、CE(NiP)株感染細胞より高いことが確認された (図 5-1B および C)。以上より、CE(NiP) Δ P2-5 株を接種した G-8 細胞において、IFN の産生が亢進していることが示された。これらの結果により、筋肉細胞において tPs が IFN の産生を抑制している可能性が支持された。

上記のように、tPs の発現能の欠失は、CE(NiP) Δ P2-5 株感染筋肉細胞における IFN 産生を強く亢進させたと考えられる。一方、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 に導入された 4 つの変異が、筋肉細胞における P1 の IFN 産生抑制活性を減弱させ、その結果、IFN の産生が強く誘導された可能性も否定できない。第 2 章では、神経細胞において P1 が同活性を保持することが確認されたものの、筋肉細胞においても保持しているかどうかは不明のままである。そこで本章では、レポーターアッセイにより、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 を発現させた筋肉由来 G-8 細胞における IFN- β プロモーター活性を検証した。

当初、pEGFP-P1 および pEGFP-P1 Δ P2-5 を用いて同アッセイを行ったものの、GFP-P1 を発現させた G-8 細胞において IFN- β プロモーター活性の抑制が確認されなかった (データ未掲載)。この結果より、G-8 細胞では、GFP を付

与することにより CE(NiP)株 P1 の IFN 産生抑制活性が欠落すると考えられた。そこで、pEGFP-P1 および pEGFP-P1 Δ P2-5 の代わりに、pCAGGS-P1 および pCAGGS-P1 Δ P2-5 を用いることとした。ウエスタンブロットによって、pCAGGS-P1 もしくは pCAGGS-P1 Δ P2-5 を導入した G-8 細胞の溶解液を解析した結果、P1 の発現のみが検出され、tPs は検出限界以下であった (図 5-2)。一方で、P1 の N 末端に GFP を付加していないために、pCAGGS-P1 を導入した培養筋肉細胞において検出限界以下のレベルで tPs が発現している可能性は否定できない。しかしながら、tPs が IFN 産生を抑制することが示唆されている状況の中 (図 5-1)、pCAGGS-P1 および pCAGGS-P1 Δ P2-5 を導入した G-8 細胞では、同程度に IFN- β プロモーター活性が抑制された (図 5-2)。従って、pCAGGS-P1 導入細胞において発現される検出限界以下の tPs の影響は無視できるレベルと考えられた。さらに、本成績より、CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 が、CE(NiP)株の P1 と同等の IFN 産生抑制活性を有することが強く示唆された。以上より、CE(NiP) Δ P2-5 株感染筋肉細胞における IFN 遺伝子の発現量の増加は、同株の P1 に導入された変異の影響によるものではなく、tPs の発現能の欠失によることが示された。

CE(NiP) Δ P2-5 株に感染した筋肉由来 G-8 細胞において IFN 遺伝子および IFN 誘導性遺伝子の発現が強く誘導されたことより、tPs が IFN 産生を抑制する活性を持つ可能性が考えられた。そこで、G-8 細胞を用いたレポーターアッセイによって、各 P 蛋白質アイソフォームの IFN- β プロモーター抑制活性を検証した。その結果、どのアイソフォームも IFN 産生抑制活性を有することが示唆された (図 5-3)。これまでの研究によって、tPs の中でも P2 および P3 が、

IFN 応答を抑制する活性を有することは強く示唆されていた (21, 27, 39)。しかしながら、tPs が IFN 産生を抑制する活性を有することを示した研究はこれまでになく、本研究において初めて、同活性の存在を示すことができた。

ここまでの成績によって、筋肉細胞における CE(NiP) Δ P2-5 株の増殖効率が CE(NiP)株よりも減弱することが明らかとなった(第 4 章 図 4-3、-4 および 5)。また、いずれの tPs も IFN 産生抑制活性を有することと一致して (図 5-3)、CE(NiP) Δ P2-5 株に感染した筋肉細胞では、CE(NiP)株感染細胞よりも IFN の産生が強く誘導されることが示されている (図 5-1)。これらの知見は、筋肉細胞において tPs が IFN の産生を抑制することで、ウイルス増殖を促進することを示唆している。また、これらは、筋肉細胞でのウイルス増殖における IFN 産生抑制の重要性を示した以前の知見を支持している (40)。

前述のように、筋肉細胞において CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の増殖効率が異なるのに対し、神経細胞における両株の増殖効率は同等であることが示されている (第 1 章 図 1-4、第 3 章 図 3-3 および 4)。この事実は、筋肉細胞での効率的なウイルス増殖には、tPs の IFN 産生抑制活性が重要であるものの、神経細胞での増殖には必要ではないことを示唆している。つまり、tPs が筋肉細胞のような特定の細胞種においてのみ IFN の産生を抑制している可能性が考えられた。しかしながら、本章のレポーターアッセイと同様の方法により、培養神経細胞における各 P 蛋白質アイソフォームの IFN- β プロモーター抑制活性を検討した結果、いずれのアイソフォームも IFN 産生抑制活性を有することが強く示唆された (データ未掲載)。以上の結果より、tPs による細胞種特異的な IFN 産生の抑制には、複雑な機構が関与すると考えられた。その機構を解明

するためには、CE(NiP)株に感染した筋肉細胞および神経細胞における tPs の発現パターンの違いがあるかどうかを解析するなど、更なる検討が必要と考えられる。

第 5 章では、CE(NiP) Δ P2-5 株感染筋肉細胞において、CE(NiP)株感染細胞よりも、IFN 産生が亢進していることが示された。さらに、レポーターアッセイによって、各々の P 蛋白質アイソフォームが IFN- β プロモーター活性を抑制することが示された。以上より、筋肉細胞において tPs が IFN の産生を抑制する役割を果たしていることが明らかとなった。

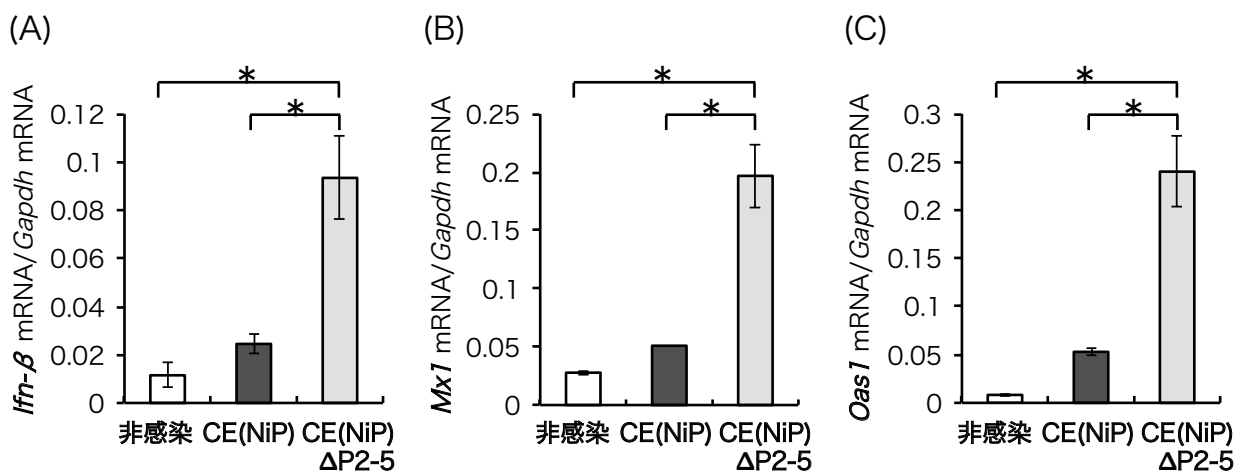


図 5-1. CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株を接種した G-8 細胞における *Ifn-β*、*Mx1* および *Oas1* 遺伝子の発現量

G-8 細胞に、CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株を MOI=1 で接種し、接種 24 時間後に感染細胞における(A) *Ifn-β*、(B) *Mx1* および(C) *Oas1* 遺伝子発現量をリアルタイム PCR により定量した。ウイルス希釈液のみを接種したものを、非感染とした。エラーバーは、標準誤差を示す (n=3)。*: p<0.01

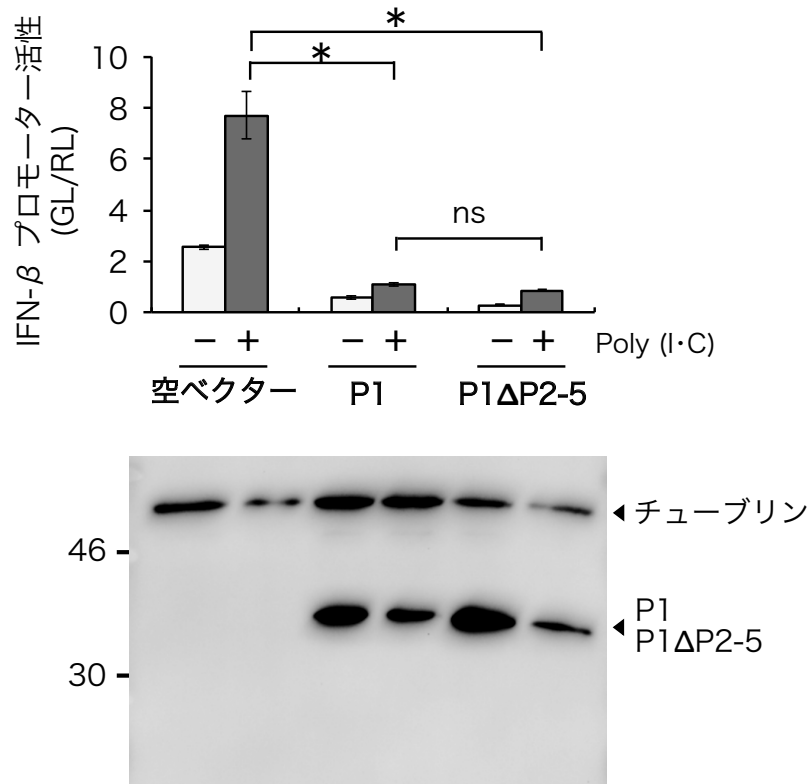


図 5-2. G-8 細胞における CE(NiP)株および CE(NiP)ΔP2-5 株の P1 の IFN 産生抑制活性の比較

空ベクター、pCAGGS-P1 もしくは pCAGGS-P1ΔP2-5 と共に、レポータープラスミドの IFNB-pGL3 および導入効率補正用の pRL-Tk を G-8 細胞に導入した。導入 24 時間後に、さらに Poly (I·C) を各々の細胞に導入した。6 時間培養した後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。pCAGGS-P1 および pCAGGS-P1ΔP2-5 より発現する蛋白質を、各々 P1 および P1ΔP2-5 と表記している。ウエスタンブロットにより、細胞溶解液中のチューブリン、P1 および P1ΔP2-5 を検出した結果をグラフ下部に示している。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。*: p<0.01

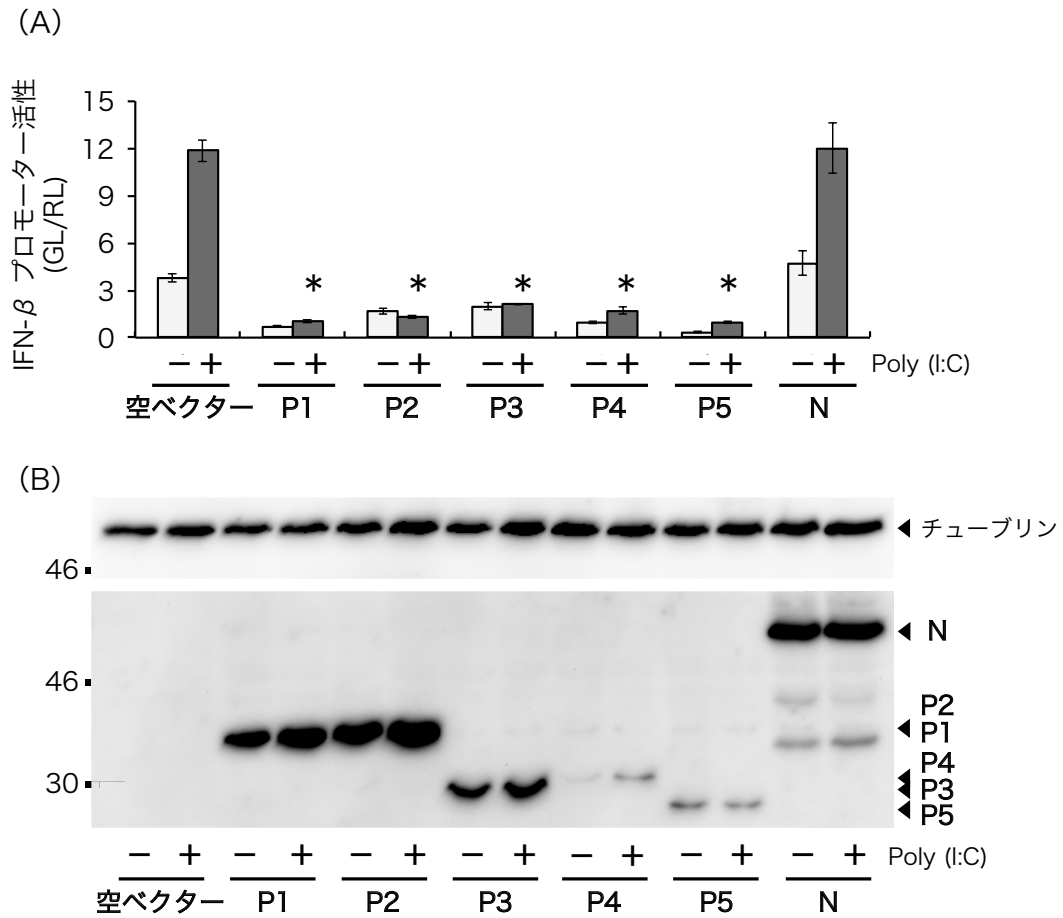


図 5-3. G-8 細胞における各 P 蛋白質アイソフォームの IFN 産生抑制活性

(A) 空ベクター、pCAGGS-P1~P5 もしくは pCAGGS-N と共に、レポータープラスミドの IFNB-pGL3 および導入効率補正用の pRL-Tk を G-8 細胞に導入した。導入 24 時間後に、さらに Poly (I:C) を各々の細胞に導入した。6 時間培養した後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。(B) ウェスタンブロットにより、細胞溶解液中のチューブリンおよび各 P 蛋白質アイソフォームを検出した。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。*: p<0.01

結論

狂犬病ウイルス P 遺伝子上には、既知のウイルス株間において高度に保存される 5 つの開始コドンが存在し、その結果として、P 蛋白質の全長を有する P1、ならびに N 末端を様々な長さで欠損する tPs (P2~P5) が翻訳される。これまでに、狂犬病ウイルスの神経病原性および神経侵入性において P 蛋白質が重要な役割を果たすことが示されたものの、tPs の重要性は不明のままであった。そこで本研究では、狂犬病ウイルスの病原性発現機構における tPs の役割を検証するために、神経病原性および神経侵入性を共に有する CE(NiP)株の遺伝子操作を行い、tPs の発現能を欠失した CE(NiP) Δ P2-5 株を作出した。CE(NiP) Δ P2-5 株および CE(NiP)株の比較解析により、以下の成績が得られた。

1. tPs は、ウイルス増殖に必須ではないアクセサリ蛋白質である。
2. CE(NiP) Δ P2-5 株の P1 は、RNA ポリメラーゼ共因子としての活性および IFN アンタゴニスト活性を保持している。
3. 神経病原性および脳内でのウイルス増殖には、tPs ではなく P1 が重要である。
4. 神経侵入性、末梢神経へのウイルス感染、ならびに筋肉細胞でのウイルス増殖において、tPs が重要な役割を果たす。
5. 筋肉細胞において tPs は IFN の産生を抑制する。

上記の成績より、筋肉細胞において tPs が IFN 産生を抑制し、ウイルス増殖を促進することで、末梢神経へのウイルス感染効率を高める役割を果たしていることが明らかとなった (図 6)。以上より、tPs が関与する、狂犬病ウイルス

の神経侵入性の機構を示すことができた。本研究において得られた成績は、tPsを標的とした新たな暴露後発症予防法の開発、ならびに安全性の高い生ワクチンの開発に応用可能であると考えられた。

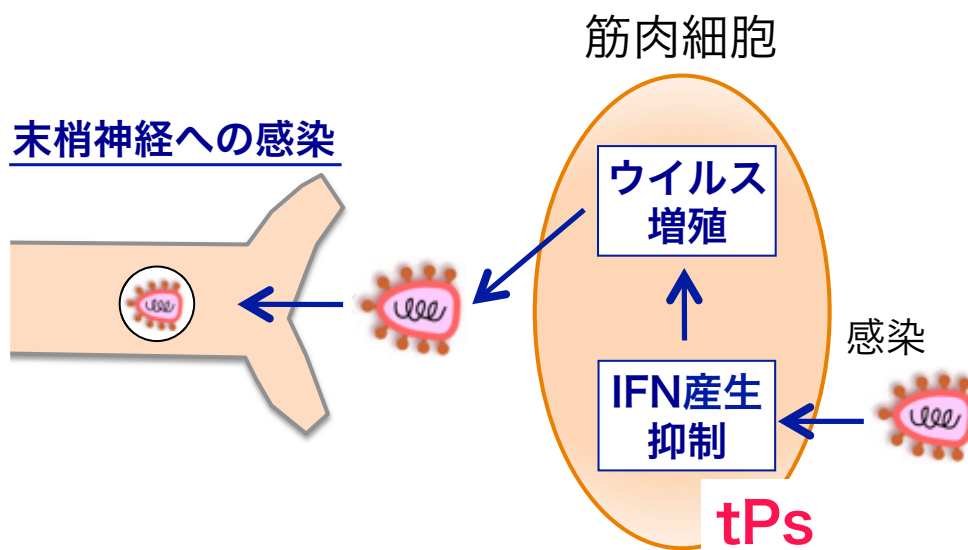


図6 本研究の結果により考えられる tPs が関与する神経侵入性の機構の模式図

謝辞

本研究において、終始懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました 岐阜大学 人獣共通感染症学研究室 杉山 誠 教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を進めるにあたり終始熱心なご指導を、ならびに微細にわたる本稿の校閲をしていただきました 岐阜大学 人獣共通感染症学研究室 伊藤 直人 准教授に深く感謝いたします。

論文草稿にあたり適切な助言を賜りました 岐阜大学大学院 連合獣医学研究科 動物感染症制御学研究室 浅井 鉄夫 教授、東京農工大学 農学部 国際家畜感染症防疫研究教育センター 水谷 哲也 教授、帯広畜産大学 原虫病研究センター 横山 直明 教授、岩手大学 農学部 獣医微生物学研究室 村上 賢二 教授に心からの謝意を表します。

また、快く材料を提供して下さった東京大学 医科学研究所 河岡 義裕 教授、McGill University Rongtuan Lin 博士に心より感謝いたします。

最後に、本研究の基礎となる知見を明らかにされた諸先輩方、私の研究生活を支えていただいた岐阜大学 人獣共通感染症学研究室の皆様心から感謝いたします。

引用文献

- 1) Black, J.G., Lawson, K.F. (1980). The safety and efficacy of immunizing foxes (*Vulpes vulpes*) using bait containing attenuated rabies virus vaccine. *Can J Comp Med* 44, 169-176.
- 2) Blondel, D., Regad, T., Poisson, N., Pavie, B., Harper, F., Pandolfi, P.P., De The, H., Chelbi-Alix, M.K. (2002). Rabies virus P and small P products interact directly with PML and reorganize PML nuclear bodies. *Oncogene* 21, 7957-7970.
- 3) Briggs, D.J., Nagarajan, T., Rupprecht, C.E. (2013). Rabies Vaccines. *In*: Jackson, A.C. [ed.] *Rabies*, 3rd ed., pp. 497-526. Academic Press, London, United Kingdom.
- 4) Brzozka, K., Finke, S., Conzelmann, K.K. (2005). Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 79, 7673-7681.
- 5) Brzozka, K., Finke, S., Conzelmann, K.K. (2006). Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J Virol* 80, 2675-2683.
- 6) Chenik, M., Chebli, K., Blondel, D. (1995). Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism. *J Virol* 69, 707-712.
- 7) Chenik, M., Chebli, K., Gaudin, Y., Blondel, D. (1994). In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein. *J Gen Virol* 75 2889-2896.
- 8) Chenik, M., Schnell M, Conzelmann KK, Blondel D. (1998). Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and

phosphoprotein. *J Virol* 72.

9) Dietzschold, B., Li, J., Faber, M., Schnell, M. (2008). Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol* 3, 481-490.

10) Faber, M., Pulmanausahakul, R., Hodawadekar, S.S., Spitsin, S., McGettigan, J.P., Schnell, M.J., Dietzschold, B. (2002). Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J Virol* 76, 3374-3381.

11) Finke, S., Conzelmann, K.K. (2003). Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *J Virol* 77, 12074-12082.

12) Finke, S., Conzelmann, K.K. (2005). Replication strategies of rabies virus. *Virus Res* 111, 120-131.

13) Hampson, K., Coudeville, L., Lembo, T., Sambo, M., Kieffer, A., Attlan, M., Barrat, J., Blanton, J.D., Briggs, D.J., Cleaveland, S., Costa, P., Freuling, C.M., Hiby, E., Knopf, L., Leanes, F., Meslin, F.X., Metlin, A., Miranda, M.E., Muller, T., Nel, L.H., Recuenco, S., Rupprecht, C.E., Schumacher, C., Taylor, L.H., Vigilato, M.A., Zinsstag, J., Dushoff, J., Global Alliance for Rabies Control Partners for Rabies, P. (2015). Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003709.

14) Hanlon, C.A. (2013). Rabies in Terrestrial Animals. *In*: Jackson, A.C. [ed.] Rabies, 3rd ed., pp. 179-213. Academic Press, London, United Kingdom.

15) Harty, R.N., Brown, M.E., McGettigan, J.P., Wang, G., Jayakar, H.R., Huibregtse, J.M., Whitt, M.A., Schnell, M.J. (2001). Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. *J Virol* 75, 10623-10629.

- 16) Ito, N., Moseley, G.W., Blondel, D., Shimizu, K., Rowe, C.L., Ito, Y., Masatani, T., Nakagawa, K., Jans, D.A., Sugiyama, M. (2010). Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity. *J Virol* 84, 6699-6710.
- 17) Ito, N., Takayama-Ito, M., Yamada, K., Hosokawa, J., Sugiyama, M., Minamoto, N. (2003). Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system. *Microbiol Immunol* 47, 613-617.
- 18) Jackson, A.C., Fu, Z.F. (2013). Pathogenesis. *In: Jackson, A.C. [ed.] Rabies*, 3rd ed., pp. 299-349. Academic Press, London, United Kingdom.
- 19) Kawai, T., Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7, 131-137.
- 20) Kobayashi, Y., Okuda, H., Nakamura, K., Sato, G., Itou, T., Carvalho, A., Silva, M., Mota, C., Ito, F., Sakai, T. (2007). Genetic Analysis of Phosphoprotein and Matrix Protein of Rabies Viruses Isolated in Brazil. *J Vet Med Sci* 69, 1145-1154.
- 21) Marschalek, A., Drechsel, L., Conzelmann, K.K. (2011). The importance of being short: the role of rabies virus phosphoprotein isoforms assessed by differential IRES translation initiation. *Eur J Cell Biol* 91, 17-23.
- 22) Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Sawaki, Y., Koyama, H., Sugiyama, M. (2010). Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J Virol* 84, 4002-4012.
- 23) Mebatsion, T., Weiland, F., Conzelmann, K.K. (1999). Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol*

73, 242-250.

24) Minamoto, N., Tanaka, H., Hishida, M., Goto, H., Ito, H., Naruse, S., Yamamoto, K., Sugiyama, M., Kinjo, T., Mannen, K., Mifune, K. (1994). Linear and conformation-dependent antigenic sites on the nucleoprotein of rabies virus. *Microbiol Immunol* 38, 449-455.

25) Miyamoto, K., Matsumoto, S. (1967). Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J Exp Med* 125, 447-456.

26) Morimoto, K., McGettigan, J.P., Foley, H.D., Hooper, D.C., Dietzschold, B., Schnell, M.J. (2001). Genetic engineering of live rabies vaccines. *Vaccine* 19, 3543-3551.

27) Moseley, G.W., Lahaye, X., Roth, D.M., Oksayan, S., Filmer, R.P., Rowe, C.L., Blondel, D., Jans, D.A. (2009). Dual modes of rabies P-protein association with microtubules: a novel strategy to suppress the antiviral response. *J Cell Sci* 122, 3652-3662.

28) Nadin-Davis, S.A., Abdel-Malik, M., Armstrong, J., Wandeler, A.I. (2002). Lyssavirus P gene characterisation provides insights into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein. *Virology* 298, 286-305.

29) Neubauer, J., Ogino, M., Green, T.J., Ogino, T. (2016). Signature motifs of GDP polyribonucleotidyltransferase, a non-segmented negative strand RNA viral mRNA capping enzyme, domain in the L protein are required for covalent enzyme-pRNA intermediate formation. *Nucleic Acids Res* 44, 330-341.

30) Rieder, M., Brzozka, K., Pfaller, C.K., Cox, J.H., Stitz, L., Conzelmann, K.K. (2011). Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: inhibition of interferon regulatory factor 3 activation

is important for pathogenicity. *J Virol* 85, 842-852.

31) Schnell, M.J., Conzelmann, K.K. (1995). Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. *Virology* 214, 522-530.

32) Schubert, D., Humphreys, S., Baroni, C., Cohn, M. (1969). In vitro DIFFERENTIATION OF A MOUSE NEUROBLASTOMA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 64, 316-323.

33) Shabman, R.S., Hoenen, T., Groseth, A., Jabado, O., Binning, J.M., Amarasinghe, G.K., Feldmann, H., Basler, C.F. (2013). An upstream open reading frame modulates ebola virus polymerase translation and virus replication. *PLoS Pathog* 9, e1003147.

34) Shimizu, K., Ito, N., Mita, T., Yamada, K., Hosokawa-Muto, J., Sugiyama, M., Minamoto, N. (2007). Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice. *Virus Res* 123, 154-160.

35) Shimizu, K., Ito, N., Sugiyama, M., Minamoto, N. (2006). Sensitivity of rabies virus to type I interferon is determined by the phosphoprotein gene. *Microbiol Immunol* 50, 975-978.

36) Smith, J., Fishbein, D., Rupprecht, C., Clark, K. (1991). Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. *N Engl J Med* 324, 205-211.

37) Taylor, L.H., Costa, P., Briggs, D.J. (2013). Public Health Management of Humans at Risk. *In: Jackson, A.C. [ed.] Rabies*, 3rd ed., pp. 543-573. Academic Press, London, United Kingdom.

38) Vidy, A., Chelbi-Alix, M., Blondel, D. (2005). Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways.

J Virol 79, 14411-14420.

39) Vidy, A., El Bougrini, J., Chelbi-Alix, M.K., Blondel, D. (2007). The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1. J Virol 81, 4255-4263.

40) Wiltzer, L., Okada, K., Yamaoka, S., Larrous, F., Kuusisto, H.V., Sugiyama, M., Blondel, D., Bourhy, H., Jans, D.A., Ito, N., Moseley, G.W. (2014). Interaction of rabies virus P-protein with STAT proteins is critical to lethal rabies disease. J Infect Dis 209, 1744-1753.

41) Winkler, W.G., McLean, R.G., Cowart, J.C. (1975). Vaccination of foxes against rabies using ingested baits. J Wildl Dis 11, 382-388.

42) World Health Organization (2013). Prevention of human rabies. WHO Expert Consultation on Rabies second report. pp. 54-63. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

43) World Health Organization (2016). Rabies Fact Sheet. pp. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

44) Wunner, W.H., Conzelmann, K.K. (2013). Rabies Virus. *In*: Jackson, A.C. [ed.] Rabies, 3rd ed., pp. 17-60. Academic Press, London, United Kingdom.

45) Yamaoka, S., Ito, N., Ohka, S., Kaneda, S., Nakamura, H., Agari, T., Masatani, T., Nakagawa, K., Okada, K., Okadera, K., Mitake, H., Fujii, T., Sugiyama, M. (2013). Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness. J Virol 87, 12327-12338.