

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07716

研究課題名(和文) 細胞の狂犬病ウイルス感受性を規定する新規宿主因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of host cellular factors involved in rabies virus infection

研究代表者

佐々木 道仁 (Sasaki, Michihito)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教

研究者番号：70609403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染成立と病原性発現には宿主因子が密接に関与するが、狂犬病ウイルス感染に関与する宿主因子の研究は少ない。本研究では、狂犬病ウイルス感染に関与する宿主因子を同定と狂犬病ウイルス感染機構の解明を目的とした。ヒトsiRNAライブラリーを用いたスクリーニングを実施し、狂犬病ウイルス感染に関与する宿主遺伝子を28個同定した。また、細胞のヘパラン硫酸が狂犬病ウイルスの吸着因子として機能することを見出し、その詳細な分子機構を明らかにした。一連の解析を通じて、狂犬病ウイルスの感染機構の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：Cellular host factors play critical roles in virus infection. To investigate the host factors involved in rabies virus infection, we have performed a large scale of RNAi screening and found 28 host genes. Next, we revealed that cellular heparan sulfate supports rabies virus attachment and subsequent entry into cells. The direct binding between rabies virus glycoprotein and heparan sulfate was demonstrated. The molecular mechanism of the interaction between rabies virus glycoprotein and heparan sulfate was analyzed in detail. Collectively, our study identified host factors potentially involved in rabies virus infection, and highlights a previously undescribed role of heparan sulfate as an attachment factor of rabies virus infection.

研究分野：獣医学、ウイルス学、分子生物学

キーワード：狂犬病ウイルス 宿主因子 スクリーニング RNAi ヘパラン硫酸 吸着因子 ウイルス表面糖タンパク

1. 研究開始当初の背景

狂犬病ウイルスは狂犬病に罹患した動物の咬傷によって体内に侵入し、中枢神経系に到達すると致死的な神経症状(狂犬病)を惹起する。狂犬病ウイルス感染により中枢神経症状が出現した後は、ほぼ100%の症例が死に至る。狂犬病は不活化ワクチン接種により予防できるが、流行地である発展途上国においてワクチンの普及は進んでいない。また、狂犬病に対する有効な治療法は確立されておらず、毎年55000人以上が本感染症により死亡している。

先行研究により、狂犬病ウイルスゲノムがコードする遺伝子上の病原性決定領域が次々と明らかになり、病原性を規定するウイルス側因子の解明が進んできた。一方、ウイルス感染による病原性発現には宿主因子が密接に関与するにもかかわらず、狂犬病ウイルス感染時の宿主因子動態に着目した研究は少ない。そこで研究代表者は、狂犬病ウイルス感染に関与する宿主因子を同定し、その機能解析を通じて狂犬病ウイルス感染機構や病原性発現機構を解明することを最終目標とした研究を開始した。

これまでに研究代表者はヒト siRNA ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング系を確立し、狂犬病ウイルス感染に関与する宿主因子のスクリーニングを開始した。9032個のヒト遺伝子を対象とした1次スクリーニングの結果、ウイルス感染を促進する候補遺伝子を110個、ウイルス感染を抑制する候補遺伝子を140個(合計250個)抽出した。しかしながら、スクリーニング結果の再現性を含めて、抽出した候補遺伝子が細胞の狂犬病ウイルス感受性を規定する遺伝子であるか更なる検証が必要であった。

2. 研究の目的

既に実施した1次スクリーニングにより抽出した候補遺伝子群を対象として2次スクリーニングを実施し、真に細胞の狂犬病ウイルス感受性を規定する宿主因子を同定する。続いて、同定した遺伝子の機能解析を通じて、細胞における狂犬病ウイルス感染の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト siRNA ライブラリーを用いた2次スクリーニング

1次スクリーニングにより抽出した250個の候補遺伝子を標的とした siRNA ライブラリーをヒト神経由来培養細胞株 SK-N-SH に導入した後、各ウェルに狂犬病ウイルスを接種し、蛍光抗体法により感染細胞をカウントすることで、各々の遺伝子ノックダウンによる細胞のウイルス感受性の変化を定量的に評価した。

(2) 狂犬病ウイルス感染における細胞表面のヘパラン硫酸の機能解析

(1)のスクリーニングにより同定した宿主遺伝子に、ヘパラン硫酸の生合成に関与する酵素 N-deacetylase/N-sulfotransferase 1 (NDST1)が含まれていた。そこで、NDST1の機能解析に先立ち、狂犬病ウイルス感染における細胞のヘパラン硫酸の機能解析を実施した。実験では成熟マウスに致死感染を惹き起こす狂犬病ウイルス CVS 株を使用した。

(3) 狂犬病ウイルスエンベロープ糖タンパク質 glycoprotein (G) とヘパラン硫酸の相互作用解析

パキキュロウイルス発現系を用いて狂犬病ウイルス CVS 株の組換え G タンパク質を作出し、組換え G タンパク質とヘパラン硫酸の直接結合を表面プラズモン共鳴 (SPR) により解析した。

(4) 狂犬病ウイルス感染におけるヘパラン硫酸の硫酸修飾の影響

ヘパラン硫酸はその生合成過程において N-硫酸修飾、2O-硫酸修飾、3O-硫酸修飾、6O-硫酸修飾を受ける。このうち、N-硫酸基、2O-硫酸基、6O-硫酸基を化学的に除去したヘパリンを用いて、感染阻害効果を検証した。次に、N-硫酸修飾、2O-硫酸修飾、6O-硫酸修飾を司る宿主酵素 NDST1-4、HS2ST、HS6ST1-3 の発現を siRNA を用いて抑制し、細胞の CVS 感受性の変化を解析した。

(5) 狂犬病ウイルス株間で異なるヘパラン硫酸結合能の解析

上記(1)-(4)の解析で使用した狂犬病ウイルス CVS 株に加えて、成熟マウスに致死感染を惹き起こさない弱毒の狂犬病ウイルス HEP 株を用いてヘパラン硫酸との相互作用解析を行った。次に、CVS 株 G タンパク質と HEP 株 G タンパク質のキメラ体を作製し、G タンパク質のヘパラン硫酸結合活性に関する領域の同定を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト siRNA ライブラリーを用いた2次スクリーニング

3回の繰り返し実験により再現性が確認された28個の遺伝子を、狂犬病ウイルス感染に関与する宿主遺伝子として同定した(図1)。このうち、18個は狂犬病ウイルス感染を増強する感染支持因子であり、残りの10個は狂犬病ウイルス感染を抑制する感染阻害因子であった。28個の遺伝子との相互作用に関する研究報告はこれまでに無い。一方、このうち3個の遺伝子は、狂犬病と同じラブドウイルス科に属する水疱性口内炎ウイルスとの相互作用が報告されていた。

(2) 狂犬病ウイルス感染における細胞表面のヘパラン硫酸の機能解析

酵素処理により、細胞表面のヘパラン硫酸を除去すると、細胞の狂犬病ウイルス CVS

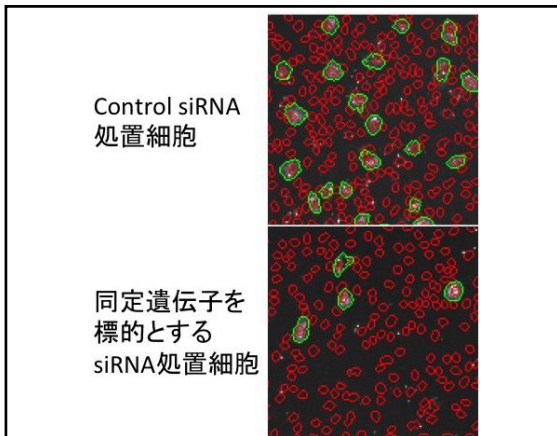


図 1. 宿主遺伝子発現抑制による狂犬病ウイルス感染細胞数の減少

ウイルス抗原を蛍光抗体法により染色後、画像解析したもの。緑はウイルス感染細胞、赤は別画像で取得した細胞核を示している。

陰性対象の Control siRNA 処置細胞(上)に比べて、スクリーニングにより同定した遺伝子の発現を抑制した細胞(下)ではウイルス感染細胞数が減少している。

株の感受性が減少した。また、CVS とヘパラン硫酸を混合した後、細胞へ接種すると、細胞表面の CVS 吸着量及び感染細胞数は減少した。さらに、ヘパラン硫酸の構造類似体であるヘパリンを結合させたセファロースビーズを用いてプルダウンアッセイを行い、CVS とヘパリンの直接結合を検出した。これらの結果から、細胞表面に存在するヘパラン硫酸は狂犬病ウイルスと結合し、ウイルスの効率的な細胞吸着とそれに続く感染を支持していることが判明した。

(3) 狂犬病ウイルスエンベロープ糖タンパク質 glycoprotein (G) とヘパラン硫酸の相互作用解析

狂犬病ウイルス G タンパク質はウイルス粒子表面に存在し、細胞へのウイルス感染において重要な役割を果たす。作製した組換え G タンパク質とヘパリンの直接結合を表面プラズモン共鳴 (SPR) により検出し (図 2)、G タンパク質がヘパラン硫酸のリガンドとして機能することを明らかにした。

(4) 狂犬病ウイルス感染におけるヘパラン硫酸の硫酸修飾の影響

ヘパリンと異なり、N-硫酸基または 6O-硫酸基を化学的に除去したヘパリンは、CVS と混合しても感染阻害作用を示さなかった。また、RNAi により N-硫酸修飾に参与する NDST1 と NDST2、または 6O-硫酸修飾に参与する HS6ST1 の遺伝子発現を抑制すると、細胞の狂犬病ウイルス感受性が有意に減少した。これらの結果から、ヘパラン硫酸の N-硫酸基及び 6O-硫酸基が CVS との相互作用に重要であることが明らかとなった。

(5) 狂犬病ウイルス株間で異なるヘパラン硫

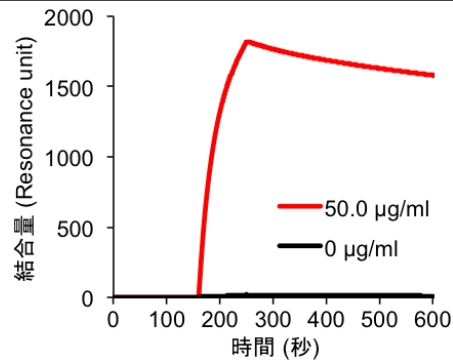


図 2. 表面プラズモン共鳴 (SPR) による組換え G タンパク質とヘパリンの結合解析

ヘパリンを固定化したセンサーチップに組換え G タンパク質を添加する (赤) と結合レスポンスが検出された。

酸結合能の解析

CVS 株と異なり、HEP 株はヘパラン硫酸と混合した後、細胞へ接種しても感染阻害が認められなかった。また、酵素処理により細胞のヘパラン硫酸を除去しても、細胞の HEP 株感受性は変化しなかった。これらの結果は HEP 株がヘパラン硫酸と相互作用しないことを示唆している。そこで、CVS 株 G タンパク質と HEP 株 G タンパク質のキメラ体を複数作製し、G タンパク質のヘパラン硫酸結合活性に参与する領域の同定を行った。その結果、G タンパク質の 158 位、186 位、248 位のアミノ酸が、ヘパラン硫酸との相互作用に重要であることが明らかとなった。

以上の結果から、狂犬病ウイルスの細胞感受性に参与する宿主遺伝子を 28 個同定した。また、細胞のヘパラン硫酸が狂犬病ウイルスの吸着因子として機能することを見出し、その詳細な分子機構を明らかにした。一連の解析を通じて、狂犬病ウイルスの感染機構の一端を解明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Sasaki M, Anindita PD, Ito N, Sugiyama M, Carr M, Fukuhara H, Ose T, Maenaka K, Takada A, Hall WW, Orba Y, Sawa H: The role of heparan sulfate proteoglycans as an attachment factor for rabies virus entry and infection.

J Infect Dis. 217(11): 1740-1749. 2018(査読有)

Anindita PD, Sasaki M, Okada K, Ito N, Sugiyama M, Saito-Tarashima N, Minakawa N, Shuto S, Otsuguro S, Ichikawa S, Matsuda A, Maenaka K, Orba Y, Sawa H: Ribavirin-related compounds exert in vitro inhibitory effects toward

rabies virus.

Antiviral Res. 154:1-9. 2018 (査読有)

Anindita PD, **Sasaki M.**, Nobori H, Sato A, Carr M, Ito N, Sugiyama M, Orba Y, Sawa H: Generation of recombinant rabies viruses encoding NanoLuc luciferase for antiviral activity assays.

Virus Res. 515:121-128. 2016 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

Sasaki M., Anindita PD, Ito N, Sugiyama M, Fukuhara H, Ose T, Maenaka K, Orba Y, Sawa H: Characterization of heparan sulfate as the attachment factor for rabies virus infection.

第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 25 日

Anindita PD, **Sasaki M.**, Ito N, Sugiyama M, Minakawa N, Shuto S, Otsuguro S, Ichikawa S, Matsuda A, Maenaka K, Orba Y, Sawa H: Antiviral activity of ribavirin-related compounds against rabies virus in vitro. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会。大阪国際会議場、大阪市、2017 年 10 月 25 日

佐々木道仁, Anindita Paulina D., 伊藤直人, 杉山誠, 福原秀雄, 尾瀬農之, 前仲勝実, 澤洋文: 狂犬病ウイルスの細胞吸着に關与する宿主因子の解析。第 160 回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017 年 9 月 15 日

Anindita Paulina D., **佐々木道仁**, 伊藤直人, 杉山誠, 南川典昭, 周東智, 乙黒聡子, 市川聡, 松田彰, 前仲勝実, 大場靖子, 澤洋文: Examination of antiviral activity of 5-ethynyl-1-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) against rabies virus in vitro. 第 160 回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017 年 9 月 14 日

佐々木道仁, Anindita Paulina D., 伊藤直人, 杉山誠, 福原秀雄, 尾瀬農之, 前仲勝実, 大場靖子, 澤洋文: ヘパラン硫酸を介した狂犬病ウイルスの細胞吸着機構の解析。第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 1 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 道仁 (SASAKI Michihito)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン

ター 分子病態・診断部門・特任助教
研究者番号: 70609403