

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08083

研究課題名(和文) 狂犬病ウイルスによる自然免疫回避機構の新概念「ストレス顆粒形成抑制」の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for the inhibition of stress granule formation by rabies virus, a new concept of innate immune evasion mechanism

研究代表者

正谷 達膳 (Masatani, Tatsunori)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：70614072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：狂犬病ウイルス弱毒株感染によって形成されるストレス顆粒(SG)にRIG-Iが蓄積される像ことを確認した。SG形成に関わるとされる宿主因子PKRが狂犬病ウイルス感染細胞におけるSG形成にも大きく関わっていることが示された。キメラウイルスを用いた実験により、狂犬病ウイルスのコードする5種類の蛋白質(N、P、M、G及びL)のうち、M蛋白質がSG形成にも大きく関わっていることが示された。M蛋白質はカスパーゼ非依存的な細胞死にも関わることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。本病はワクチンによって予防可能であるものの、ひとたび発症した場合の有効な治療法は無く、その致死率は100%にのぼる。しかし、狂犬病ウイルスが高い病原性を示すメカニズムの分子基盤は不明な点が多いのが現状である。本病の治療戦略を開発するうえで、ウイルスがどのように宿主の免疫系を逃れているかを知ることは重要である。本研究では、自然免疫の発動に重要なシステムとして近年発見された「ストレス顆粒形成」を狂犬病ウイルスが抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the accumulation of RIG-I in stress granules (SGs) formed by rabies virus attenuated strain infection. The host factor PKR, which is thought to be involved in SG formation, is also involved in SG formation in rabies virus-infected cells. Among the five rabies virus-encoded proteins (N, P, M, G, and L), the M protein was shown to play a major role in SG formation. The M protein of the rabies virus Ni-CE strain is also involved in caspase-independent cell death.

研究分野：獣医病原生物学

キーワード：狂犬病 ストレス顆粒 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

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。我が国では現在発生は確認されていないものの、韓国や台湾、ロシアなど近隣諸国では野生動物で流行しており、いつ日本に侵入してもおかしくない状態にあるといえる。本病はワクチンによって予防可能であるものの、ひとたび発症した場合の有効な治療法は無く、その致死率は100%にのぼる。しかし、狂犬病ウイルスが高い病原性を示すメカニズムの分子基盤は不明な点が多いのが現状である。

狂犬病感染動物の脳内ではウイルスが速やかに増殖する。その感染領域は脳内全体にわたり、ウイルス感染細胞は機能不全に陥るとされる。しかし、脳全体に多数のウイルスが増殖しているにもかかわらず、脳内における炎症反応は極めて軽微であり、組織の破壊や壊死も認められない。また、増殖部分への免疫担当細胞の集積もほぼ認められない。すなわち、狂犬病ウイルスは宿主生体防御機構から回避し、効率よく複製・増殖できるよう進化してきたウイルスであるといえる。

一般的に、ウイルス感染に対する生体防御は、自然免疫と獲得免疫が協調することによって行われる。このうち自然免疫は、感染直後に発動する速やかな応答であり、さまざまなウイルスに対する強力な防御壁となっている。I型インターフェロン(IFN; IFN- α 及び β)は、自然免疫における抗ウイルス活性の中心的な役割を担っている分子である。IFNはウイルス感染によって一過性に分泌され、周囲の細胞に抗ウイルス蛋白質を産生させることで強力な抗ウイルス状態に導く。さらに、IFNは獲得免疫を司る免疫担当細胞を活性化し、また炎症反応の誘導にも関与している。狂犬病ウイルスは、この自然免疫を強力に抑制する能力があると考えられる。実際にこれまでに申請者自身により、狂犬病ウイルス強毒株(西ヶ原株)が宿主IFNの産生機構を阻害して効率よく増殖出来るのに対し、西ヶ原株を鶏胚線維芽細胞で長期継代することで得られた弱毒株(Ni-GE株)は、その機能を欠失していることが明らかとなった[1,2,3]。しかし、その詳細な分子機構については未だ不明の点が多い。

IFNの産生機構は、ウイルスの侵入を、細胞に存在するセンサー分子(Toll様レセプターやRIG-Iなど)が認識することで開始される。近年、狂犬病ウイルスの認識に関わるとされるRIG-I蛋白質は、ウイルスRNAを捕捉するにあたりストレス顆粒(Stress granule, SG)とよばれる構造に集積することで、ウイルスセンサーとして機能することが明らかとなってきた[4,5]。

SGは本来、細胞が有害化学物質や温度変化など外的ストレスを受けた際、作りかけのmRNAを一時的に貯蔵することで翻訳を停止し、異常蛋白質が形成・蓄積されるのを防ぐために作られる細胞質内構造として知られてきた。しかし近年、日本の研究チームを中心として、SGがウイルスに対する防御機構の一隅を担う存在であることが明らかとなった。すなわち、ウイルスが細胞内に侵入すると、速やかに細胞質内にSGが形成され、SGにRIG-Iなどウイルスセンサー分子が集積する。細胞内に侵入してきたウイルスRNAの持つ特有の核酸構造をセンサー分子が認識し、IFN産生シグナルが活性化することが明らかとなってきた。つまり、SGはウイルス感染を認識し、自然免疫応答を発動するのに重要な「場」であるといえる。

申請者は予備的に、強毒である西ヶ原株と、弱毒であるNi-GE株をそれぞれ感染させた細胞についてSG形成を解析した。その結果、弱毒のNi-GE株の感染では多数かつ大型のSGが細胞内に形成されたのに対し、強毒の西ヶ原株に感染した細胞ではSGの形成がほぼ認めら

れなかった。すなわち、狂犬病ウイルスの病原性発現機構の一つとして、「SG形成の回避による自然免疫抑制」が想定される。

2. 研究の目的

本研究では狂犬病ウイルスの病原性発現機構の一つとしてウイルス認識の場「SG」の形成抑制を提唱し、SG形成阻害の分子機構を解明する。そこで、西ヶ原株とNi-CE株の各遺伝子を交換してキメラウイルスを作出し、これらを用いてSG形成阻害機能をもつウイルス遺伝子を同定し、そのウイルスタンパク質と宿主細胞との相互作用について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 狂犬病ウイルス弱毒株が誘導するSG形成とRIG-Iとの関連の検討

由来の異なるヒト神経系由来SYM-1細胞および、ヒト腎由来293T細胞へ西ヶ原株およびNi-CE株を感染させ、固定・蛍光抗体による染色を行うことでストレス顆粒の形成を検証した。Ni-CE株感染細胞においてウイルス抗原、ストレス顆粒マーカー分子(G3BP)およびRIG-Iに対する抗体で3重染色することで、感染細胞内に形成されるSGにRIG-Iが集積されるかどうかを検討した。

(2) 狂犬病ウイルスが誘導するSG形成に重要な宿主因子の決定

CRISPR/Cas9に基づいたゲノム編集技術により、ヒト由来293T細胞よりSG形成に必要な宿主因子(G3BP, PKR)を欠損させた。欠損細胞におけるSG形成効率を蛍光顕微鏡により観察・定量化し、これら因子が狂犬病ウイルス感染により誘導されるSG形成に重要であるか検討した。

(3) SG形成回避に重要な狂犬病ウイルス遺伝子の同定

狂犬病ウイルスは5種類の遺伝子(N、P、M、G及びL遺伝子)を持ち、それぞれより転写翻訳される5種類の蛋白質のみで構成されている。すなわち、ウイルスはこれら蛋白質のいずれかを利用してSGの形成を阻害していると予想される。すでに申請者は、西ヶ原株とNi-CE株の遺伝子組換え系を利用することで、西ヶ原株をもとにNi-CE株の遺伝子を一つずつ交換したキメラウイルスを計5種類作出している。そこで、これらキメラウイルス感染細胞におけるSG形成効率を蛍光顕微鏡により観察・定量化し、どのウイルス蛋白質がSG形成阻害に重要であるか同定を試みた。

(4) 狂犬病ウイルスM蛋白質が誘導する細胞死誘導メカニズムの検討

Ni-CE株のM蛋白質のもつ「細胞死誘導能」に注目し[6]、その分子メカニズム解明を目的として以下の実験を行った。まず、西ヶ原、Ni-CE、西ヶ原株のゲノムのうちM遺伝子をNi-CE株のものに置換したキメラウイルスNi(CEM)株、及びNi-CE株のゲノムのうちM遺伝子を西ヶ原株のものに置換したキメラウイルスCE(NiM)株の各株を細胞に感染させた。細胞膜破壊と、アポトーシスの指標であるホスファチジルセリンの反転の度合いをRealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assayキットによって経時的に測定した。各株感染細胞におけるカスパーゼ3および7の活性をCaspase-Glo®3/7 Assayにより測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト神経系由来 SYM-1 細胞および、ヒト腎由来 293T 細胞へ西ヶ原株および Ni-CE 株を感染させ、固定・蛍光抗体による染色を行うことでストレス顆粒の形成を検証した。その結果、両細胞株ともに Ni-CE 株がストレス顆粒形成を誘導したのに対し、西ヶ原株は誘導しなかった。すなわち、本事象は細胞の種類によらないことが示唆された。Ni-CE 株感染 SYM-1 細胞を、ウイルス抗原、G3BP および RIG-I に対する抗体で 3 重染色した結果、Ni-CE 株感染によって形成されるストレス顆粒に RIG-I が蓄積される像が観察された。

(2) ゲノム編集により SG 形成に関わる因子である PKR とその下流の G3BP1 の欠損細胞の作出に成功した。これらに Ni-CE 株を感染させても SG 形成がともに見られなかったことから、これら因子、とくに上流因子である PKR が狂犬病ウイルス感染細胞における SG 形成に関わっていることが示された。

(3) どのウイルス遺伝子がストレス顆粒抑制に関わるか明らかにするため、西ヶ原株の遺伝子を一つずつ Ni-CE 株のものに置換したキメラウイルスを 5 種類作出した。これらを細胞に感染させたところ、西ヶ原株のゲノムのうち M 遺伝子を Ni-CE 株のものに置換したキメラウイルス Ni (CEM) 株のみが、細胞にストレス顆粒形成を誘導した。したがって M 蛋白質が SG 形成に重要であることが示された。

(4) これまでの研究で、Ni (CEM) 株が、感染細胞に細胞死を引き起こすのに対し、西ヶ原株は起こさないことから、Ni-CE 株の M 蛋白質が細胞死誘導に関与することが知られている [6]。そこで、SG 形成と細胞死誘導に関連性があるかどうか検討するために、M 蛋白質が関与する細胞死誘導メカニズム解明を試みた。

興味深いことに、Ni-CE 株の M 遺伝子を持つ株 (Ni-CE 株、Ni (CEM) 株) は強い細胞膜破壊を誘導するのにに対し、西ヶ原株及び Ni-CE 株のゲノムのうち M 遺伝子を西ヶ原株のものに置換したキメラウイルス CE (NiM) 感染では、アポトーシスの特徴であるホスファチジルセリンの反転は引き起こすものの、細胞膜破壊の程度が低かった。すなわち、M 遺伝子は SG 形成だけでなく細胞死シグナルにも何らかの影響をもたらしている可能性が示された。

M 遺伝子にコードされる M 蛋白質の関与する細胞死シグナルの分子レベルでの解明を試みた。感染細胞に細胞死を引き起こす M 蛋白質をが関与する細胞死シグナルパスウェイを特定するため、各株感染細胞におけるカスパーゼ 3 および 7 の活性を測定したところ、いずれの株に感染した細胞もカスパーゼ活性は上昇しなかった。このことは、M 蛋白質が関与する細胞死はカスパーゼ非依存的な細胞死であることが示された。

<引用文献>

- 1 Masatani T, Ito N, Shimizu K, Ito Y, Nakagawa K, Sawaki Y, Koyama H, Sugiyama M. Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J Virol* 84(8): 4002-4012, 2010.
- 2 Ito N, Moseley GW, Blondel D, Shimizu K, Rowe CL, Ito Y, Masatani T, Nakagawa K, Jans DA, Sugiyama M. Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity. *J Virol* 84(13): 6699-6710, 2010.
3. Ito N, Moseley GW, Sugiyama M. The importance of immune evasion in the

pathogenesis of rabies virus. *J Vet Med Sci* 78(7):1089-1098, 2016.

4. Yoneyama M, Jogi M, Onomoto K. Regulation of antiviral innate immunity signaling by stress-induced RNA granules. *J Biochem* 159(3):279-286, 2016
5. Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T. Antiviral innate immunity and stress granule responses. *Trends Immunol.* 35(9):420-418, 2014
6. Mita T, Shimizu K, Ito N, Yamada K, Ito Y, Sugiyama M, Minamoto N. Amino Acid at position 95 of the matrix protein is a cytopathic determinant of rabies virus. *Virus Res* 137(1):33-39, 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ozawa Makoto, Matsuu Aya, Khalil Ahmed Magdy, Nishi Natsuko, Tokorozaki Kaori, Masatani Tatsunori, Horie Masayuki, Okuya Kosuke, Ueno Kosei, Kuwahara Masakazu, Toda Shigehisa	4. 巻 66
2. 論文標題 Phylogenetic variations of highly pathogenic H5N6 avian influenza viruses isolated from wild birds in the Izumi plain, Japan, during the 2016?17 winter season	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transboundary and Emerging Diseases	6. 最初と最後の頁 797 ~ 806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbed.13087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Keisuke, Nakagawa Kento, Omatsu Tsutomu, Katayama Yukie, Oba Mami, Mitake Hiromichi, Okada Kazuma, Yamaoka Satoko, Takashima Yasuhiro, Masatani Tatsunori, Okadera Kota, Ito Naoto, Mizutani Tetsuya, Sugiyama Makoto	4. 巻 35
2. 論文標題 Generation of a novel live rabies vaccine strain with a high level of safety by introducing attenuating mutations in the nucleoprotein and glycoprotein	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 5622 ~ 5628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2017.08.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuya Kosuke, Kanazawa Norihiro, Kanda Takehiro, Kuwahara Masakazu, Matsuu Aya, Horie Masayuki, Masatani Tatsunori, Toda Shigehisa, Ozawa Makoto	4. 巻 61
2. 論文標題 Genetic characterization of an avian H4N6 influenza virus isolated from the Izumi plain, Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 513 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 児島一州、伊藤直人、杉山誠、正谷達膳
2. 発表標題 狂犬病ウイルスM蛋白質95位のアミノ酸は後期アポトーシスにおける細胞膜破壊に関与する
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatani T
2. 発表標題 P proteins from street rabies virus strains inhibit IKK -mediated interferon signaling
3. 学会等名 The 10th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Isshu Kojima, Naoto Ito, Makoto Sugiyama, Tatsunori Masatani
2. 発表標題 Role of amino acid substitution at position 95 in rabies virus matrix protein in cell membrane disruption
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsunori Masatani, Koji Onomoto, Naoto Ito, Makoto Ozawa, Makoto Sugiyama, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita
2. 発表標題 Rabies virus matrix protein is involved in formation of antiviral stress granules in infected cells
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 11) Isshu Kojima, Makoto Ozawa, Naoto Ito, Makoto Sugiyama, Tatsunori Masatani
2. 発表標題 Investigation of cell death mechanism induced by amino acid substitution at position 95 in rabies virus matrix protein
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児島一州、伊藤直人、杉山誠、小澤真、正谷達膳
2. 発表標題 狂犬病ウイルスM蛋白質95位のアミノ酸が関与する細胞死誘導機構の解析
3. 学会等名 9th Negative strand virus-Japan symposium
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----