

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02333

研究課題名(和文) 宿主因子との相互作用解析から紐解く狂犬病ウイルス感染メカニズム

研究課題名(英文) Study for host factors involved in rabies virus infection

研究代表者

佐々木 道仁 (Sasaki, Michihito)

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・講師

研究者番号：70609403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：狂犬病の病態を理解するには、狂犬病ウイルスの細胞内増殖機構、およびそれに対する宿主の感染制御機構(免疫応答)を解明する必要がある。本研究では、上記の機構に關与する宿主因子について研究を実施し、以下の成果を得た。狂犬病ウイルスに感染したアストロサイトからのインターフェロン産生とそれに続く抗ウイルス応答が、ウイルスの排除と感染からの回復に關与していることを明らかにした。また、脂質膜の切り離しを担う宿主ESCRT機構が、狂犬病ウイルスの感染細胞からの出芽を促進させていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスが標的細胞内へ侵入し、細胞内での複製を経て、子孫ウイルスを細胞外へと出芽させる一連の感染サイクルにおいて、多くの宿主タンパク質が關与する。また、宿主はウイルス感染の際に自然免疫機構を活性化させることで、ウイルス増殖を阻害する機能を有している。しかし、狂犬病ウイルスの感染において、こうした宿主因子に着眼した研究は十分ではない。本研究では、狂犬病ウイルス感染時に宿主因子が果たす役割を細胞モデル、動物モデルを用いて解析した。得られた研究成果は、狂犬病の病態解明のための基礎的知見となり、狂犬病の治療、予防法の開発に役立つ。

研究成果の概要(英文)：To understand the pathogenesis of rabies, it is necessary to uncover the replication mechanism of rabies virus and the host immune response against the infection. In this study, we investigated the role of host factors involved in the intracellular replication of rabies virus and host innate immune response to the infection. We revealed that astrocytes infected with rabies virus HEP, an attenuated strain, produce interferon and trigger subsequent antiviral responses for virus elimination and recovery from the infection. We also demonstrated that the host ESCRT mechanism facilitates the budding of rabies virus virion from the infected cells and is involved in the bullet-shaped virion morphology.

研究分野：ウイルス学

キーワード：狂犬病ウイルス 宿主因子 自然免疫機構 病原性 ウイルス粒子出芽機構

## 1. 研究開始当初の背景

狂犬病ウイルスは罹患動物による咬傷により受傷者の末梢組織へ感染後、長く不定な潜伏期を経たのち、中枢神経系にて増殖し、致死的な神経症状を惹き起こす。狂犬病は、感染後直ちにワクチン接種(暴露後免疫)を開始することにより発症を阻止することができるが、狂犬病流行地におけるワクチンの普及は十分ではない。また、狂犬病発症後の治療法は無いため、毎年**55,000**名以上が本感染症により死亡している。狂犬病は制圧対策が進まない「顧みられない感染症」である。

狂犬病ウイルスは強い神経指向性や長い潜伏期に代表される特徴的な病原性を有しており、他のウイルスとは異なる独自の感染機構の存在が示唆されてきた。狂犬病ウイルスゲノムがコードする遺伝子は **N、P、M、G、L** のわずか **5** つであり、標的細胞内への侵入、細胞内でのゲノム複製、子孫ウイルスの細胞外への出芽といった一連の感染過程では、多数の宿主因子が関与していることが予想されるが、狂犬病ウイルス感染に関与する宿主因子の知見は十分ではなく、狂犬病ウイルス感染機構は未解明な点が多い。また、宿主はウイルス感染の際に自然免疫機構を活性化させ、ウイルス増殖を阻害する機能を有している。ワクチン製造に用いられる弱毒狂犬病ウイルス **HEP** 株を接種したマウスは、一時的な体重減少を呈した後、ウイルスが生体内から排除され、狂犬病を発症することなく感染から回復する。しかしながら、**HEP** 株感染時に脳内からウイルス排除を達成する宿主応答の詳細は十分に解明されていない。

狂犬病の治療法・予防法を研究開発する上で、上述の狂犬病ウイルスの細胞感染機構や宿主の抗ウイルス応答に関する十分な知見があることが望ましい。

## 2. 研究の目的

これまでに、研究代表者は **siRNA** ライブラリーを用いた宿主因子スクリーニングの手法を取り入れ、細胞の狂犬病ウイルス感受性を上昇、あるいは低下させる宿主因子を複数同定している。このうちのひとつ **NDST1** は、細胞のヘパラン硫酸の生合成に関与する酵素であり、その機能解析を通じて、細胞表面に存在するヘパラン硫酸が狂犬病ウイルスの **G** タンパク質と結合し、狂犬病ウイルスの細胞吸着を増大させることでウイルス感染を促進する宿主因子であることを明らかにしている (**Sasaki M. et al., J Infect Dis, 217(11): 1740-1749, 2018**)。本研究では、**siRNA** ライブラリーにより新たに同定した宿主因子の機能解析を通じて、狂犬病ウイルスの細胞感染機構の解明を目的とした。さらに、強い抗ウイルス作用を有するインターフェロンに着眼し、**HEP** 感染マウス脳組織におけるインターフェロンの機能解析を通じて、狂犬病ウイルスの脳内排除に関与する宿主応答機構の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### 1) 狂犬病ウイルス出芽過程における宿主 **ESCRT** 機構の関与、および

### 2) 狂犬病ウイルス細胞内増殖過程における宿主 **YB-1** の役割

リバースジェネティクス法によりレポーター遺伝子を有する組換え狂犬病ウイルスを取得し、これを用いて **siRNA** ライブラリースクリーニングを実施した。レポーター遺伝子の発現量を指標に、**siRNA** 導入による遺伝子発現抑制によって狂犬病ウイルス感染が減少する(すなわち狂犬病ウイルス感染を促進する)宿主遺伝子を探索した。複数のスクリーニングを経て、**TSG101** と **YB-1** を見出し、狂犬病ウイルス感染におけるこれらの遺伝子産物の役割を解析した。

### 3) インターフェロンを介した狂犬病ウイルス脳内排除機構

狂犬病ウイルス **G** 蛋白質の **333** 番目に位置するアミノ酸は狂犬病ウイルスの病原性に密接に関与する。**333** 位にグルタミン (**Q**) を有する野生型 **HEP** 株は、接種マウスにおいて致死的病態を惹起せず弱毒化した病原性を示すが、**333** 位のアミノ酸をアルギニン酸 (**R**) へ置換する変異を導入した **HEP/Q333R** 株は、マウスに致死的病態を惹き起こし、強毒型の病原性を示す。本研究では、リバースジェネティクス法により **HEP/Q333R** 株を取得し、培養細胞およびマウス脳組織を用いて野生型 **HEP** 株と **HEP/Q333R** 株感染時の宿主のインターフェロン応答を比較した。さらに、**I** 型及び **II** 型インターフェロン受容体を欠損し、インターフェロンを介した抗ウイルス応答が生じないマウス (**AG129** マウス) を用いて、野生型 **HEP** 株感染時の病態を解析した。

## 4. 研究成果

### 1) 狂犬病ウイルスの出芽過程における宿主 **ESCRT** 機構の関与

感染細胞におけるウイルス粒子の出芽過程において、一部のエンベロープウイルスは、脂質

膜の切り離しを担う宿主の **Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)** 機構を利用する。本研究のスクリーニングから同定した **TSG101** は **ESCRT** 関連タンパク質である。**TSG101** 以外の **ESCRT** 関連タンパク質の遺伝子発現を抑制した場合も、狂犬病ウイルスの増殖は阻害されたことから、**ESCRT** 機構が狂犬病ウイルスの感染を促進していることが判明した。**TSG101** は、狂犬病ウイルス **M** タンパク質内に存在し **late (L)**-ドメインと呼ばれるアミノ酸配列モチーフを介して **M** タンパク質と相互作用していた。そこで狂犬病ウイルス **M** タンパク質が有する **L**-ドメインに変異を導入した狂犬病ウイルス変異ウイルスを作出したところ、変異ウイルスを感染させた細胞では、細胞内の子孫ウイルスが細胞膜下に滞留する様子が認められ、出芽した子孫ウイルスの形状は狂犬病ウイルスに特徴的な弾丸状の粒子形態を呈していなかった。さらに、この変異ウイルスは、細胞での増殖性及びマウスにおける病原性が低下していた。以上の結果から、狂犬病ウイルスの **M** タンパク質と **TSG101** 相互作用が、狂犬病ウイルスの出芽と弾丸状ウイルス粒子形成に重要であることが示された (**Itakura Y. et al., Epub ahead of print, J Virol, 2023**)。

## 2) 狂犬病ウイルスの細胞内増殖過程における宿主 **YB-1** の役割

本研究のスクリーニングから同定した宿主転写関連因子 **Y-box binding protein (YB-1)** の狂犬病ウイルス感染における役割を解析した。細胞の **YB-1** 遺伝子発現を抑制すると、感染初期のウイルス遺伝子発現量が減少した。また、ゲルシフトアッセイ (**RNA-EMSA**) 解析により、**YB-1** がウイルス **mRNA** の 5'非翻訳領域に結合することが判明し、その標的配列 (**Y-box recognition sequence, YRS**) を同定した。同定した **YRS** に 1-2 塩基の変異を導入すると下流の遺伝子発現量が変化することがウイルスミニゲノムを用いたレポーターアッセイにより確認された。**YB-1** の細胞内局在を解析したところ、狂犬病ウイルス感染後期になると **YB-1** の局在は顆粒状に変化し、狂犬病ウイルス増殖の際に細胞内に形成されるウイルスタンパク質複合体 (ネグリ小体) に近接した場所に観察された。以上の結果から、狂犬病ウイルスは自身の **mRNA** に存在する **YRS** と **YB-1** の結合を介して、ウイルス遺伝子発現量を増加させ、ウイルス増殖を亢進させることが示唆された。

## 3) インターフェロンを介した狂犬病ウイルスの脳内排除機構

培養細胞を用いて野生型 **HEP** 株と **HEP/Q333R** 株の感染性と、ウイルス感染に伴うインターフェロン産生を比較した。神経細胞由来 **NA** 細胞において両株は同等の感染性を示した一方、星状膠細胞 (アストロサイト) 由来 **SVG-A** 細胞においては、野生型 **HEP** 株は **HEP/Q333R** 株に比べて高い感染性を示した。続いて、生体におけるアストロサイトへの感染性とインターフェロン産生の違いについて調べるために、免疫応答が正常なマウスに野生型 **HEP** 株あるいは **HEP/Q333R** 株を感染させ、その脳からアストロサイトを分離し、ウイルスゲノム及びインターフェロン遺伝子発現を定量した結果、野生型 **HEP** 株は **HEP/Q333R** 株に比べてアストロサイトへの感染効率およびインターフェロン産生レベルが高いことが判明した。

既報の通り、弱毒化した野生型 **HEP** 株を脳内接種すると、免疫応答が正常なマウスは一過性の体重減少ののち感染から回復した。一方、野生型 **HEP** 株に感染したインターフェロン受容体欠損 **AG129** マウスは神経症状を呈し人道的エンドポイントに達した。ウイルス感染マウスの脳組織を用いた病理解析により、**HEP/Q333R** 株は野生型 **HEP** 株に比べて、アストロサイトへの感染性が低下していることを確認した。以上の結果から、狂犬病ウイルスに感染したアストロサイトからのインターフェロン産生とそれに続く抗ウイルス応答が、ウイルスの排除と感染からの回復に関与していることが示唆された (**Itakura et al., iScience, 25(4):104122, 2022**)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Itakura Yukari, Tabata Koshiro, Saito Takeshi, Intaruck Kittiya, Kawaguchi Nijiho, Kishimoto Mai, Torii Shiho, Kobayashi Shintaro, Ito Naoto, Harada Michiko, Inoue Satoshi, Maeda Ken, Takada Ayato, Hall William W., Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Sasaki Michihito	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Morphogenesis of Bullet-Shaped Rabies Virus Particles Regulated by TSG101	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00438-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Itakura Yukari, Tabata Koshiro, Morimoto Kohei, Ito Naoto, Chambaro Herman M., Eguchi Ryota, Otsuguro Ken-ichi, Hall William W., Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Sasaki Michihito	4. 巻 25
2. 論文標題 Glu333 in rabies virus glycoprotein is involved in virus attenuation through astrocyte infection and interferon responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104122 ~ 104122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kainga Henson, Chatanga Elisha, Phonera Marvin Collen, Kothowa John Pilate, Dzimbiri Precious, Sasaki Michihito, Muleya Walter, et al.	4. 巻 168
2. 論文標題 Current status and molecular epidemiology of rabies virus from different hosts and regions in Malawi	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-022-05635-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kaneko Chiho, Sasaki Michihito, Omori Ryosuke, Nakao Ryo, Kataoka-Nakamura Chikako, Isoda Norikazu, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Immunization Coverage and Antibody Retention against Rabies in Domestic Dogs in Lusaka District, Zambia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 738 ~ 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10060738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaneko Chiho, Omori Ryosuke, Sasaki Michihito, Kataoka-Nakamura Chikako, Simulundu Edgar, Isoda Norikazu, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Domestic dog demographics and estimates of canine vaccination coverage in a rural area of Zambia for the elimination of rabies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0009222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0009222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐々木 道仁、伊藤 直人、杉山 誠、Gonzalez Gabriel、伊藤 公人、大場 靖子、澤 洋文
2. 発表標題 狂犬病ウイルス感染に関する宿主因子の探索および同定遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第18回狂犬病研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michihito Sasaki, Naoto Ito, Makoto Sugiyama, Gonzalez Gabriel, Kimihito Ito, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa
2. 発表標題 A host YB-1 protein binds to rabies virus mRNAs and promotes viral gene expression
3. 学会等名 The 7th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michihito Sasaki, Naoto Ito, Makoto Sugiyama, Gonzalez Gabriel, Kimihito Ito, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa
2. 発表標題 A host YB-1 protein binds to rabies virus mRNAs and promotes viral gene expression
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板倉 友香里, 佐々木 道仁, 大場 靖子, 澤 洋文
2. 発表標題 インターフェロン受容体欠損マウスにおける狂犬病ウイルス病原性発現機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 道仁, Gonzalez Gabriel, 伊藤 直人, 杉山 誠, 伊藤 公人, 大場 靖子, 澤 洋文
2. 発表標題 狂犬病ウイルスの遺伝子発現に関する宿主因子の同定と機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michihito Sasaki, Paulina D. Anindita, Naoto Ito, Makoto Sugiyama, Michael Carr, Ayato Takada, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa
2. 発表標題 Characterization of rabies virus mutants showing different abilities to bind to heparan sulfate.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板倉友香里、田畑耕史郎、伊藤直人、大場靖子、澤洋文、佐々木道仁
2. 発表標題 G蛋白質333位のアミノ酸残基が規定する狂犬病ウイルスの病原性発現機構の解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板倉友香里、田畑耕史郎、伊藤直人、大場靖子、澤洋文、佐々木道仁
2. 発表標題 G蛋白質333位のアミノ酸に規定される狂犬病ウイルスのアストロサイト感染性と病原性の関係
3. 学会等名 第19回狂犬病研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板倉友香里、伊藤直人、大場靖子、澤洋文、佐々木道仁
2. 発表標題 狂犬病ウイルス感染増殖過程におけるESCRT-1構成因子TSG101の役割
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukari ITAKURA, Koshiro TABATA, Takeshi SAITO, Kittiya INTARUCK, Nijiho KAWAGUCHI, Mai KISHIMOTO, Ayato TAKADA, Yasuko ORBA, Hirofumi SAWA, Michihito SASAKI
2. 発表標題 Budding and virion morphogenesis of Rabies virus regulated by ESCRT-1 component TSG101
3. 学会等名 The 10th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉友香里、田畑耕史郎、Kittiya Intaruck、岸本麻衣、伊藤直人、大場靖子、澤洋文、佐々木道仁
2. 発表標題 狂犬病ウイルスの弾丸状粒子形成におけるM蛋白質とESCRT-1構成因子TSG101の相互作用の意義
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉 友香里、田畑耕史郎、齋藤健、Intaruck Kittiya、川口虹穂、岸本麻衣、伊藤直人、高田礼人、大場靖子、澤洋文、佐々木道仁
2. 発表標題 ESCRTタンパク質と狂犬病ウイルスの相互作用から考察する弾丸状ウイルス粒子形成機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
研究協力者	澤 洋文  (Sawa Hirofumi)  (30292006)	北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・教授   (10101)	
研究協力者	小林 進太郎  (Kobayashi Shinrato)  (00634205)	北海道大学・獣医学研究院・准教授   (10101)	
研究協力者	カー マイケル  (Carr Michael)  (70769588)	北海道大学・国際連携研究教育局・准教授   (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
アイルランド	アイルランド国立大学ダブリン校		
ザンビア	ザンビア大学		