

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22780261

研究課題名（和文）マイナス鎖 RNA ウイルスの自然免疫回避戦略におけるヌクレオカプシド蛋白質の役割

研究課題名（英文）Role of nucleocapsid protein of Mononegaviruses in evasion of innate immunity

研究代表者

伊藤 直人 (NAOTO ITO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20334922

研究成果の概要（和文）：狂犬病ウイルスは、ヌクレオカプシド（N）蛋白質の機能により、宿主細胞のウイルス RNA センサーである RIG-I の活性化を回避し、I 型インターフェロンの産生を抑制している。本研究では、この現象の詳細な分子機序の解明を目的とした。その結果、N 蛋白質の 273 及び 394 位のアミノ酸が RIG-I 活性化回避に重要であることを示した。また、RIG-I 標的分子である可能性が指摘されている欠損干渉 RNA の分子構造を明らかにし、その定量のための基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：Rabies virus, by a function of its nucleocapsid (N) protein, evades activation of the cellular factor RIG-I, which recognizes viral RNA and plays important role in induction of type I interferon. The aim of this study was to elucidate the molecular mechanism underlying this phenomenon. We found that amino acids at positions 273 and 394 in N protein are important for evasion of RIG-I activation. Also, we determined molecular structure of defective interfering (DI) RNAs, which is a possible target for RIG-I, and established molecular basis to quantify DI RNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
H23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学・基礎獣医学

キーワード：狂犬病ウイルス、マイナス鎖 RNA ウイルス、ヌクレオカプシド、自然免疫、インターフェロン、RIG-I

1. 研究開始当初の背景

強毒の狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株

は、その派生株で弱毒の Ni-CE 株と比較した場合、宿主細胞のウイルス RNA センサー分子

である RIG-I の活性化を効率的に回避し、その結果として I 型インターフェロンの産生を抑制する。西ヶ原株 N 遺伝子を Ni-CE 株のゲノムに持つキメラウイルス CE(NiN) 株が Ni-CE 株よりも効率よく RIG-I の活性化を回避することから、西ヶ原株と Ni-CE 株の RIG-I 活性化回避能の違いに N 蛋白質が関与することが明らかとなっている (図 1)。

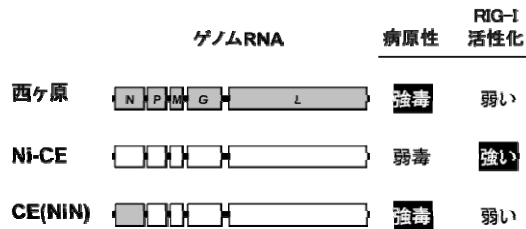


図 1. 本研究に使用した狂犬病ウイルス各株のゲノム構成、病原性ならびに RIG-I 活性化能の違い

## 2. 研究の目的

狂犬病ウイルスを含むモノネガウイルスのヌクレオカプシド蛋白質が自然免疫の回避にどのような役割を果たしているのかを明らかにするため、狂犬病ウイルス Ni-CE 株と CE(NiN) 株の RIG-I 活性化回避能の違いに着目し、その分子機序を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) Ni-CE 株の遺伝子操作系を用いて N 遺伝子に変異を導入することにより、Ni-CE 株と CE(NiN) 株の RIG-I 活性化回避能及び病原性の変化に関するアミノ酸変異を特定した。

(2) 上記で同定された Ni-CE 株 N 蛋白質上のアミノ酸変異を狂犬病生ワクチン株である ERA 株のゲノムに導入することにより、本変異株のインターフェロン誘導能の増強及び病原性の低下が起こるか否かを検討した。

(3) RIG-I の標的 RNA であることが示唆されているゲノム RNA の産生量を Ni-CE 株及び CE(NiN) 株感染培養神経細胞の間で比較した。

(4) 同様に、RIG-I の標的 RNA である可能性が指摘されている欠損干渉 RNA (DI RNA) に着目し、RT-PCR 法を用いて、Ni-CE 株及び CE(NiN) 株感染細胞において DI RNA の産生の有無を比較・検証した。

(5) Ni-CE 株及び CE(NiN) 株感染細胞において産生される DI RNA の cDNA をクローン化し、

その配列構造を決定した。また、その多様性についても検証した。

(6) RIG-I 活性化に重要な 2 本鎖構造を持つ RNA (dsRNA) を認識する抗体を用いて、Ni-CE 株及び CE(NiN) 株感染細胞を染色し、その発現量の違いを比較した。

## 4. 研究成果

(1) Ni-CE 株と CE(NiN) 株の RIG-I 活性化回避能及び病原性の変化に N 蛋白質 273 及び 394 位のアミノ酸変異が関与することを明らかにした。さらに、各株の RIG-I 活性化回避能と病原性が正の対応関係にあることを示した。このことは、自然免疫回避が狂犬病ウイルスの病原性発現に重要であることを強く示唆している。(Masatani et al., Virus Res., 2011)

(2) Ni-CE 株 N 蛋白質の 273 及び 394 位のアミノ酸変異を生ワクチン株である ERA 株に導入した結果、病原性の低下とインターフェロン誘導能の増強が認められた。これら N 蛋白質上の変異と、既知の弱毒化変異と組み合わせることにより、より安定に弱毒化され、かつ高い免疫誘導能を持つ生ワクチン株を作出することが可能となった。(投稿準備中)

(3) リアルタイム PCR 法を用いた解析により、Ni-CE 株及び CE(NiN) 株感染細胞におけるゲノム及びアンチゲノム RNA 量に有意な差は認められないことが明らかとなった (図 2)。このことは、両株の RIG-I 活性化回避能の違いにゲノム RNA の産生量は関係ないことを示している。

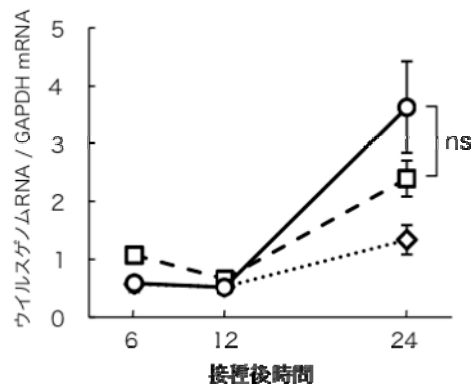


図 2. 各ウイルス株に感染した培養神経細胞 (SYM-1 細胞) におけるゲノム RNA 量

◇ : 西ヶ原株、□ : Ni-CE 株、○ : CE(NiN) 株、ns : 有意差なし

(4) 狂犬病ウイルスのゲノム RNA の両末端配列には、ゲノム複製に必須なシグナルが存在する。したがって、必然的に DI RNA にもこのゲノム両末端配列が存在する。この考えに基づき、狂犬病ウイルスのゲノム末端配列に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い、Ni-CE 株及び CE(NiN)株感染細胞中に DI RNA が存在するかどうか検討した。その結果、いずれの株の感染細胞からも DI RNA の存在を示唆する約 1.2~1.5kb の DNA が増幅された (図 3)。

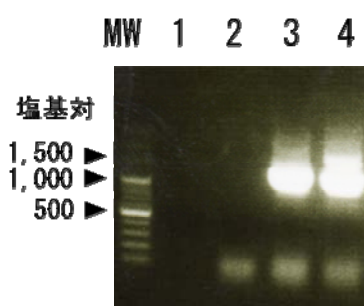


図 3. Ni-CE 株および CE(NiN)株感染培養神経細胞 (293T 細胞) から、RT-PCR 法によって増幅された DI RNA に相補的な DNA 断片

MW : 分子量マーカー、1 : 陰性対照 (鋳型 RNA なし)、2 : 非感染細胞、3 : Ni-CE 株感染細胞、4 : CE(NiN)株感染細胞

(5) 増幅された DNA 断片をクローニング・ベクターに挿入し、塩基配列を決定した結果、Ni-CE 株および CE(NiN)株感染細胞のそれぞれに 1303~1461 塩基及び 1200~1305 塩基からなる種々の長さの DI RNA が存在することが分った。これらの分子構造は、基本的に「3'ゲノム末端配列-N 遺伝子 (部分) -[L 遺伝子 (部分) クローンによっては存在しない]-5'ゲノム末端配列」であった (図 4)。以上より、今後、狂犬病ウイルス感染細胞中の DI RNA 定量法を確立するために必要な基盤情報が得られた。

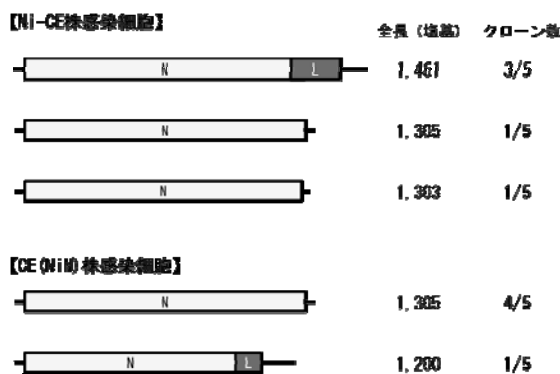


図 4. Ni-CE 株および CE(NiN)株感染培養神経細胞 (293T 細胞) から、RT-PCR 法によって検出された DI RNA の分子構造

(6) dsRNA を特異的に認識する抗体を用いて Ni-CE 株および CE(NiN)株感染細胞の免疫染色を実施した結果、蛍光シグナルの細胞内局在および強度に顕著な違いは認められなかった。

#### 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 1 件)

- ① Masatani, T., Ito, N., et al. (計 8 名, 2 番目) Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity. *Virus Res.* 155: 168-174, 2011. 査読あり。

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 中川敬介, 伊藤直人 他 (計 6 名, 2 番目). N 遺伝子への変異導入による狂犬病ウイルス弱毒株の作出. 第 153 回日本獣医学会学術集会. 2011 年 9 月 19 日. 大阪府立大学 (堺市)
- ② 正谷達膳, 伊藤直人 他 (計 6 名, 2 番目). 狂犬病ウイルス N 蛋白質の病原性決定基の違いがマウス脳内におけるウイルス感染動態及びインターフェロン応用に及ぼす影響. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 2010 年 11 月 8 日. あわぎんホール (徳島市)
- ③ 正谷達膳, 伊藤直人 他 (計 5 名, 2 番目). 狂犬病ウイルス N 蛋白質がマウス脳内におけるインターフェロン応用及びウイルス感染動態に及ぼす影響. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 2010

年 9 月 16 日. 帯広畜産大学 (帯広市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 直人 (NAOTO ITO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20334922

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし