

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580424

研究課題名(和文) 狂犬病ウイルスの自然免疫回避および病原性におけるP蛋白質アイソフォームの重要性

研究課題名(英文) Importance of rabies virus P protein isoforms in evasion of innate immunity and pathogenicity

研究代表者

伊藤 直人 (Ito, Naoto)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20334922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：狂犬病ウイルスのP遺伝子は、同一の読み枠に複数のP蛋白質アイソフォーム(P1～3)をコードしている。P1蛋白質がウイルスRNAポリメラーゼの共因子として機能するのに対し、P2およびP3蛋白質の機能には不明な点が多い。そこで本研究では、狂犬病ウイルスの病原性における各P蛋白質アイソフォームの重要性を検討した。各アイソフォームを過剰発現あるいは欠失させた変異株を用いた解析により、P1蛋白質が本ウイルスの神経病原性に主要に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rabies virus P gene encodes several P protein isoforms (P1-P3) in the same reading frame. While P1 protein functions as a co-factor of viral RNA polymerase, little is known about the functions of P2 and P3 proteins. In this study, the importance of these P protein isoforms in viral pathogenicity was examined. The results obtained from experiments with viral mutants overexpressing or lacking each isoform suggest that P1 protein is mainly related to the viral neuropathogenicity.

研究分野：人獣共通感染症学

キーワード：狂犬病

1. 研究開始当初の背景

狂犬病ウイルスのP遺伝子mRNAからは、複数のP蛋白質アイソフォーム(P1~3蛋白質)が翻訳される。以前、研究代表者らは、強毒の狂犬病ウイルス西ヶ原株とその弱毒派生株であるNi-CE株、ならびに西ヶ原株のゲノムにNi-CE株のP遺伝子を保有する強毒のキメラウイルスCE(NiP)株の解析を実施し、西ヶ原株のP蛋白質がウイルスのインターフェロン(IFN)抵抗性および病原性に重要な機能を果たしているのに対し、Ni-CE株のP蛋白質ではこれらの機能が減弱していることを報告した(Shimizu *et al*, Microbiol. Immunol., 2006, Shimizu *et al*, Virus Res., 2007, Ito *et al*, J. Virol., 2010)。しかし、どのP蛋白質アイソフォームが西ヶ原株とNi-CE株のIFN抵抗性および病原性の違いに参与しているのかは不明である(図1)。

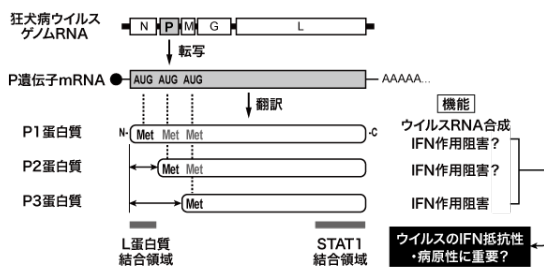


図1. 狂犬病ウイルスP蛋白質アイソフォームの発現機序と構造

2. 研究の目的

本研究の目的は、西ヶ原株およびNi-CE株のIFN抵抗性および病原性の違いに参与するP蛋白質アイソフォームを特定し、その分子機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 西ヶ原株P蛋白質アイソフォームを発現する組換えNi-CE株の作出

Ni-CE株の遺伝子操作系(Shimizu *et al*, Virus Res., 2007)を用いて、各種の西ヶ原株P遺伝子(P1、P2またはP3遺伝子領域)をG-L遺伝子間非コード領域に挿入することにより、西ヶ原株のP1~3蛋白質、P2~3蛋白質およびP3蛋白質を発現する組換えNi-CE株を作出した。

具体的には、Ni-CE株の完全長ゲノムRNAを発現するプラスミドを用いて、そのクローン化ウイルスゲノムcDNAのG-L遺伝子間非コード領域に西ヶ原株の各P遺伝子領域のcDNAを転写シグナルcDNAと共に挿入したプラスミドを構築した。このプラスミドを、N、PおよびL蛋白質発現プラスミドと同時にT7RNAポリメラーゼ恒常発現BHK細胞に導入することで各ウイルスの作出を行った。

(2) P3蛋白質低発現型ウイルス変異株の作出
強毒のキメラウイルスCE(NiP)株の遺伝

子操作により、P3蛋白質のみを特異的に低発現する変異株の作出を行った。具体的には、P3遺伝子開始コドンのKozak配列を同義置換の導入により消失させた変異株を作出した(図2A)。ウイルスの回収は、(1)に記載した方法に準じて実施した。

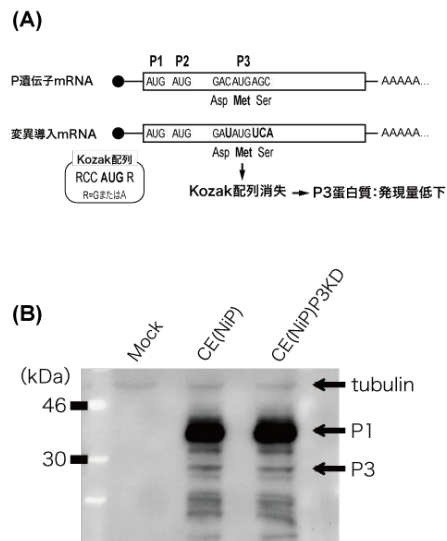


図2. P3蛋白質低発現型変異株の作出

(A) P3蛋白質の低発現化の戦略

(B) 感染細胞におけるP1およびP3蛋白質の発現

(3) P1、P2およびP3蛋白質欠損ウイルス変異株の作出

強毒のキメラウイルスCE(NiP)株の遺伝子操作により、P2あるいはP3蛋白質の発現を欠損した変異株の作出を実施した。具体的には、変異導入によりP2あるいはP3遺伝子の開始コドンを消失させた変異株を作出した。なお、この遺伝子操作の結果、両遺伝子の開始コドンがコードするメチオニンがイソロイシンに置換する。ウイルスの回収は、(1)に記載した方法に準じて実施した。

(4) 培養神経細胞における各ウイルス株の増殖性の検討

上記の遺伝子操作がウイルスの増殖性に与える影響を検証する目的で、マウス神経芽細胞腫由来NA細胞における各ウイルスの増殖性を調べた。感染多重度(moi) = 0.01で各ウイルスをNA細胞で接種した後、感染1、3および5日目に培養上清を回収し、これらに含まれるウイルスの感染価を、NA細胞を用いたフォーカス・アッセイにより決定した。

(5) 各ウイルス株に感染した培養神経細胞におけるアイソフォームの発現確認

作出した各ウイルスの感染細胞において、予想どおりのP蛋白質アイソフォームの発現上昇、発現低下あるいは発現消失が確認されるかどうか検証した。具体的には、各ウイル

スを NA 細胞に $\text{moi}=2$ で接種した後、感染 2 日目に細胞溶解液を調整した。同溶解液の中に含まれる P 蛋白質アイソフォームをウェスタン・ブロット (WB) 法により解析した。

(6) マウスに対する各ウイルス株の病原性の検討

各ウイルスの病原性を検討するため、マウスを用いた感染実験を実施した。 10^4 あるいは 10^3 フォーカス形成単位 (FFU) の各ウイルスを 6 週齢 ddY マウスに脳内接種した後、2 週間マウスを観察し、その生存率を記録した。

4. 研究成果

(1) 西ヶ原株 P 蛋白質アイソフォームを発現する組換え Ni-CE 株を用いた解析

西ヶ原株 P 蛋白質アイソフォームを発現する組換え Ni-CE 株の作出

Ni-CE 株の遺伝子操作系を用いて、西ヶ原株の P1、P2 および P3 遺伝子領域を組換えた Ni-CE 株を作出することに成功した。それぞれを Ni-CE+NiP1 株、Ni-CE+NiP2 株および Ni-CE+NiP3 株と命名した。同時に、Ni-CE 株の各遺伝子領域を組換えた Ni-CE+CEP1 株、Ni-CE+CEP2 株および Ni-CE+CEP3 株も作出し、対照として使用した。

NA 細胞における各ウイルス株の増殖性

NA 細胞における各ウイルスの増殖性を検討した結果、いずれの株も極めて類似した増殖曲線を示し、その感染価は 10^7 FFU/ml 以上に達した。以上より、これらのウイルス株に対して実施した遺伝子操作は、基本的なウイルス増殖能に影響しないことが確認された。

各ウイルス株に感染した NA 細胞における P 蛋白質アイソフォームの発現

Ni-CE+NiP1 株、Ni-CE+NiP2 株および Ni-CE+NiP3 株に感染した NA 細胞の溶解液を WB 法により解析した結果、それぞれ P1、P2 および P3 蛋白質の発現上昇が観察された。すなわち、ゲノムに組換えられた西ヶ原株 P 遺伝子領域からの蛋白質の発現が確認された。

一方、Ni-CE+CEP1 株、Ni-CE+CEP2 株および Ni-CE+CEP3 株の感染細胞では、遺伝子の挿入に起因する、明瞭な P 蛋白質の発現上昇は確認されなかった。この原因として、Ni-CE 株由来の P 蛋白質アイソフォームは、西ヶ原株のものよりも翻訳後の安定性が低いという可能性が考えられた。

マウスにおける各ウイルス株の病原性

10^4 FFU の Ni-CE+NiP1 株、Ni-CE+NiP2 株および Ni-CE+NiP3 株をマウスに脳内接種した結果、それぞれ 60%、20%および 80%の感染マウスが死亡した。一方、Ni-CE+CEP1 株、Ni-CE+CEP2 株および Ni-CE+CEP3 株を同様に接種した場合、感染マウスの致死率は、それ

ぞれ 20%、0%および 0%となった。以上の成績より、すべての P 蛋白質アイソフォームが病原性に関与するものの、中でも P1 および P3 蛋白質が重要な役割を果たすことが示唆された。

(2) P3 蛋白質低発現型ウイルス変異株を用いた解析

P3 蛋白質低発現型 CE(NiP)変異株の作出

Kozak 配列の消失により、P3 蛋白質の発現を低下させると予想される変異を CE(NiP)株に導入し、CE(NiP)-P3KD 株を作出することに成功した。また、CE(NiP)-P3KD 株は、NA 細胞において CE(NiP)株と同等の増殖性を有することが確認された。

各ウイルス株に感染した NA 細胞における P 蛋白質アイソフォームの発現

CE(NiP)-P3KD 株に感染した NA 細胞における P3 蛋白質の発現量を、CE(NiP)株感染細胞と比較した。その結果、両株感染細胞における P3 蛋白質の発現量の間に顕著な差は認められなかった (図 2B)。以上より、CE(NiP)-P3KD 株に導入した変異は、その P3 蛋白質の発現に大きな影響を与えないことが判明した。

マウスにおける各ウイルス株の病原性

10^4 FFU の CE(NiP)-P3KD 株あるいは CE(NiP)株をマウスに脳内接種した場合、両株の感染マウスとも 100%死亡した。したがって、P3 遺伝子開始コドンの Kozak 配列の消失は、ウイルスの病原性にほとんど影響しないことが明らかとなった。

(3) P1、P2 および P3 蛋白質欠損ウイルス変異株を用いた解析

P1、P2 および P3 蛋白質欠損ウイルス変異株の作出

各遺伝子開始コドンへの変異導入により、P1、P2 あるいは P3 蛋白質のそれぞれを発現しないと考えられる変異株の作出を試みた。CE(NiP)株の遺伝子操作により、P1 遺伝子開始コドンを保有しない変異株の作出を試みたものの、自己複製能を有するウイルスの回収には至らなかった。このことは、P1 蛋白質がウイルス RNA ポリメラーゼの共因子としてウイルス RNA 合成に必須な役割を果たしていることと関連していると考えられた (図 1)。

一方、P2 あるいは P3 遺伝子の開始コドンを保有しない変異株の作出には成功し、それぞれを CE(NiP) P2KO 株および CE(NiP)P3KO 株と命名した。このことは、P2 および P3 蛋白質がウイルスの複製に必須ではない、アクセサリー蛋白質であることを示している。

NA 細胞における CE(NiP)P2KO 株および CE(NiP)P3KO 株の増殖性

NA 細胞において、CE(NiP)P2KO 株および CE(NiP)P3KO 株は、親株の CE(NiP)株と同様に効率よく増殖し、培養上清中の感染価はいずれも約 10^8 FFU/ml にも達した(図 3)。以上より、P2 および P3 遺伝子開始コドンの消失は、ウイルスの基本的な増殖能に影響しないことが確認された。

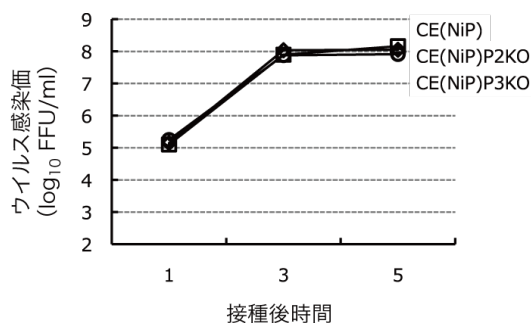


図 3. 培養神経細胞における P2 および P3 蛋白質欠損ウイルス株の増殖

CE(NiP)P2KO 株および CE(NiP)P3KO 株に感染した NA 細胞における P 蛋白質アイソフォームの発現

CE(NiP)P2KO 株および CE(NiP)P3KO 株に感染した NA 細胞の溶解液を WB 法により解析した結果、それぞれ P2 および P3 蛋白質の発現が欠損していることが確認された。

マウスにおける CE(NiP)P2KO 株および CE(NiP)P3KO 株の病原性

10^4 FFU の CE(NiP)株、CE(NiP)P2KO 株および CE(NiP)P3KO 株をマウスに脳内接種した結果、いずれのマウスも 100%死亡することが確認された。一方、 10^3 FFU の各株を接種した場合は、それぞれ 100%、80%、80%のマウスが死亡した。以上の成績より、P2 および P3 蛋白質がウイルスの病原性に関与している可能性があるものの、これらの貢献度は比較的低いことが強く示唆された。言い換えれば、P1 蛋白質が CE(NiP)株の病原性に主要に関与していることが示唆された。

(4) 考察と今後の課題

本研究では、複数の異なる手法を用いて、狂犬病ウイルスの病原性における P 蛋白質アイソフォームの重要性を検証した。このような検証をこれまで実施されておらず、本研究が初めてとなる。

西ヶ原株 P 蛋白質アイソフォームを発現する各種の組換え Ni-CE 株を用いた検証では、P1 および P3 蛋白質が病原性に重要な役割を果たすことを強く示唆する成績が得られた。一方、P2 および P3 蛋白質欠損ウイルス変異株を用いた実験では、P1 蛋白質の発現が病原

性に重要であることが示唆された。このような結論の不一致は、両実験系における各アイソフォームの発現様式の違いなどに起因すると考えられた。しかし、いずれの系においても、P1 蛋白質が病原性に重要であることが共通して見出された。

本研究では、各ウイルス株をマウスに脳内接種することで、各株が脳において感染を拡大し、致死的な症状を引き起こす能力、いわゆる神経病原性を評価した。その結果、神経病原性における P2 および P3 蛋白質の貢献がわずかであることが判明した。一方、ウイルスが末梢組織から中枢神経系に侵入する能力、いわゆる神経侵入性については、今回は評価していない。今後、各ウイルス株を筋肉内接種することで、P2 および P3 蛋白質を含む各アイソフォームが神経侵入性にどのように関与しているのかを明らかにする必要がある。

今回、狂犬病ウイルスの神経病原性に P1 蛋白質が主要に関与することを明らかにすることができた。このような知見は、これまで報告されておらず、狂犬病ウイルスの病原性発現機序を分子レベルで解明する上で極めて重要な基盤情報となる。今後は、P2 および P3 蛋白質を同時に欠損した CE(NiP)変異株および Ni-CE 変異株をそれぞれ作出し、これらの病原性ならびに IFN 抵抗性を詳細に比較・検討する予定である。

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)

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. Involvement of the rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness. *J. Virol.*, 査読あり、2013, 87:12327-12338. doi: 10.1128/JVI.02132-13.

[学会発表](計 4 件)

岡田和真、伊藤直人、中川賢人、岡寺康太、三竹博道、杉山誠、狂犬病ウイルスの神経病原性および神経侵入性における P 蛋白質アイソフォームの重要性、第 14 回狂犬病研究会、2015 年 4 月 3 日、東京都

岡田和真、伊藤直人、中川賢人、岡寺康太、三竹博道、杉山誠、狂犬病ウイルスの病原性に重要な P 蛋白質アイソフォームの同定、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 09 月 9 日 ~ 2014 年 09 月 12 日、札幌市(北海道)

岡田和真、伊藤直人、山岡理子、岡寺康太、杉山誠、狂犬病ウイルス P 蛋白質アイソフォーム(P3~5)は病原性に関与する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日~2013 年 11 月 12 日、神戸市(兵庫)

岡田和真、伊藤直人、中川敬介、山岡理子、岡寺康太、杉山誠、狂犬病ウイルスの病原性における P 蛋白質アイソフォームの重要性、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 09 月 14 日~2012 年 09 月 16 日、盛岡市(岩手)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔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 (ITO, Naoto)
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 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：