



| | |
|---------------------|--|
| Title | Study on the molecular basis of rabies virus P-protein targeting inhibition of the human JAK-STAT pathway [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | 杉山, 葵 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(生命科学) |
| Dissertation Number | 甲第15609号 |
| Issue Date | 2023-09-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/90790 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Aoi_Sugiyama_review.pdf, 審査の要旨 |



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏名 杉山 葵

| | | |
|-------|----|-----------|
| 審査担当者 | 主査 | 教授 尾瀬 農之 |
| | 副査 | 教授 西村 紳一郎 |
| | 副査 | 准教授 上原 亮太 |

学位論文題名

Study on the molecular basis of rabies virus P-protein targeting inhibition of the human JAK-STAT pathway
(狂犬病ウイルス P 蛋白質がヒト JAK-STAT 経路を阻害する分子機構の解明)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の例が示すとおり、ウイルスはゲノム変異により宿主指向性や病原性が常に変化する可能性を孕んでいる。この変化は、宿主細胞受容体との親和性や、宿主の免疫機構を阻害できるか否かに起因する。従って、弱毒ウイルスが強毒化する可能性を考える上で、宿主免疫阻害機構を理解することは緊喫の課題といえる。宿主のインターフェロン (IFN) 経路において中心的な役割を担う STAT1 は、ウイルスが宿主の免疫を阻害する機構“Counteraction”の標的の一つとして有名である。一方、幅広い宿主に対し致死性を示す狂犬病ウイルス (rabies virus, RABV) は、自身のウイルス RNA にコードされた P 蛋白質を用いて STAT1 を阻害することで、RABV が増殖しやすい環境を整えている。

先行研究により、RABV の P 蛋白質は、C 末端ドメイン (RVP CTD)を用いて STAT1 を不活化することが報告されていた。不活化機構の解明のため、これまでの研究では共免疫沈降法等の細胞生物学手法が用いられてきた。本来 STAT1 は、抗ウイルス状態の細胞内で①非リン酸化二量体 (U-STAT1)、②Y701 がリン酸化された四量体 (pYSTAT1) に続く核移行を経て、③抗ウイルス遺伝子のプロモーター領域 (GAS) に結合することで、抗ウイルス活性を示す。しかしながら、細胞生物学手法では、①から③のうち、どの状態の STAT1 をターゲットとし、どのような分子機構で RVP CTD による不活化が行われるのか不明であった。RVP CTD は、RABV 粒子の増殖を可能にし、RABV の宿主指向性(どの生物種に感染可能か)を決定する重要な因子であるため、RVP CTD と STAT1 の相互作用を分子レベルで解明することは、狂犬病の病原性の発現理解に極めて重要であるにも関わらず、両者の相互作用基盤は未だ不明である。杉山葵氏は、RVP CTD と STAT1 の相互作用分子基盤の解明を目的とし、大腸菌発現系を用いて RVP CTD 並びに STAT1 の組み換え蛋白質を高純度・高濃度で精製し、以下の3点を行った。(A) 蛍光偏光解消法を用いた両者の相互作用定量法の確立、(B) 致死性を示さない(弱毒性の) リッサウイルスである Duvenhage ウイルス (DUVV) P 蛋白質 C 末端ドメイン (DUVVP CTD) の X 線結晶構造解析、(C) クライオ電顕を用いた RVP CTD-STAT1 複合体構造解析である。

(A) 蛍光偏光解消法を用いた RVP CTD, STAT1 の相互作用定量: STAT1 は前述の通り、細胞内で3つの状態(U-STAT1, pYSTAT1, DNA 結合体)が存在しており、運動性の低い Core ドメインに、運動性の高いループを有する C 末端および N 末端ドメインがそれぞれ付加された全体構造をとる。他種ウイルスにおいても、STAT1 の N 末端ドメインのみを標的とする例や、U-STAT1 を主な

標的とする例など、STAT1 阻害領域の報告は様々なウイルス種で多岐に渡る。このことから、RVP CTD が標的とする、STAT1阻害領域特定のためには、ドメイン欠損体を含む各種 STAT1 との相互作用解析が不可欠であると考えた。まず、U-STAT1 及び pYSTAT1 に対し、蛍光偏光解消法を用いて RVP CTD との結合親和性(K_D 値)を定量・比較した結果、pYSTAT1 と RVP CTD の相互作用が、U-STAT1 に比べて 200 倍上昇した。さらに、N, C 末端をどちらか一方または両方欠損させた各 pYSTAT1 変異体 ($\Delta N, \Delta C, \Delta N\Delta C$) に対し K_D 値を比較した所、pYSTAT1 全長に比べ、 $\Delta N, \Delta C$ に対する RVP CTD の相互作用は 10 倍弱く、 $\Delta N\Delta C$ に対しては 30 倍以上弱い相互作用を示すことが分かった。つまり、RVP CTD の標的はリン酸化四量体 pYSTAT1 であり、その相互作用には STAT1 の N,C 末端が重要であることが明らかとなった。

(B) 弱毒性リッサウイルス DUVV P CTD の X 線結晶構造解析:細胞を用いた先行研究により、致死性を示す狂犬病ウイルス RVP CTD の W265 を G に変異させると STAT1 との相互作用が低下し、致死性が無くなることが報告されていた。さらに、狂犬病ウイルスと同じラブドウイルスである DUVV は、265 番目のアミノ酸残基が G である天然 P 蛋白質を保持しており、弱毒性であることが知られている。実際に、当研究室における相互作用解析の結果から、RVP CTD W265G 変異体は、WT に比べ pYSTAT1 との相互作用が 30 倍弱くなり、W265 の STAT1 認識における重要性が、細胞・試験管両アッセイにより示されている。そこで、本研究では、W265 の重要性を立体構造の観点から考察するために、弱毒性 DUVV P CTD の結晶構造を 2.2Å で決定し、265 番目付近の立体構造を、既知の致死性リッサウイルス P 蛋白質 CTD 4 種 (RVP CTD Nishigahara 株, RVP CTD CVS 株, RVP CTD PV 株, Mokola virus) と比較した。その結果、265 番目に位置する疎水性残基の表面形状が、弱毒性 DUVV では窪んでいたのに対し、致死性ウイルス 4 種では嵩高かった。驚くべきことに、265 番周辺の疎水性領域を構成する他の残基は、致死性・弱毒性でよく一致し、立体構造に大きな差がなかったことから、265 番残基のみの嵩高さが、ウイルスの毒性決定要因に寄与することが分かった。

(C) クライオ電顕を用いた複合体構造解析: RVP CTD と STAT1 の相互作用領域を特定するため、複合体の構造解析に着手した。RVP CTD との相互作用が最も強かった pYSTAT1 全長を、複合体形成に用いた。当初は X 線結晶構造解析を試みたが、STAT1 の N, C 末端ドメインの高い運動性の影響で、結晶を得ることが困難だったため、クライオ電顕を用いた複合体構造解析に着手した。ネガティブ染色を用いた電顕観察結果から、粒子形状が一様に観測できることが期待された pYSTAT1-DNA-RVP CTD 三者複合体を、電顕サンプルとして採用した。撮影した数百万粒子の画像を元に、二次元像の平均化を経て、三者複合体の 3D 像を再構築した。現時点で RVP CTD の電顕マップは得られず、運動性が高い影響で pYSTAT1 N 末端のマップも観測困難であったものの、初の四量体の pYSTAT1-DNA 複合体マップを、分解能 3 Å で観測できた。

これらの結果から杉山葵氏により、RVP CTD と STAT1 の相互作用領域を絞り込むことができた。既知の pYSTAT1 core 領域-DNA 複合体結晶構造から、リン酸化 STAT1 の Y701 を介した二量体化において、Y701 は STAT1 構造の内部に埋もれており、RVP CTD が直接認識することは困難であった。pYSTAT1 と選択的に結合する RVP CTD の結合様式は、リン酸化後にはじめて形成される、pYSTAT1 の二量体界面の疎水性領域を、RVP CTD の W265 が認識すると考えられる。

以上、杉山葵氏は狂犬病ウイルス P 蛋白質 CTD とヒト STAT1 との相互作用・構造生物学的研究により、具体的な宿主免疫経路阻害機構を論じることに成功した。

本研究を通して杉山葵氏は、リン酸化修飾を含む各種蛋白質科学・構造生物学の研究において専門知識や技術を有し、科学的な思考に基づいて仮説を立て、実証する行動力に秀でていることが見受けられた。

本研究により明らかになった相互作用情報は、将来的に弱毒ウイルスが強毒化する可能性を論じることや、高価な既存ワクチンの問題点を解決する、安価かつ高安全性を合わせ持つ弱毒ウイルス生ワクチン開発に繋がる。

故に審査員一同は、杉山葵氏に北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格があると認めた。