HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Structural insights into rabies virus-mediated host immune evasion via STAT1 inhibition by the P protein
Author(s)	南, 未来
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16782号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16782
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99627
Type	doctoral thesis
File Information	Miku_Minami_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称: 博士 （生命科学） 氏 名 南 未来

学 位 論 文 題 名

Structural insights into rabies virus–mediated host immune evasion
via STAT1 inhibition by the P protein
（狂犬病ウイルスが P タンパク質をもちい
STAT1 阻害を介したヒト免疫逃避をする機構の分子基盤）

狂犬病ウイルスが引き起こす狂犬病は致死的な神経症状を特徴とする人獣共通感染症である。現在も有効な治療薬は存在せず，発症後の致死率はほぼ 100％であり、毎年約 5 万 9 千人が命を落としている。狂犬病ウイルスのゲノム RNA にコードされている P タンパク質は病原性決定因子であることが知られており、ヒトの免疫からの回避に関与することで自身の増殖に有利な環境を作り出している。細胞生物学を用いた先行研究により、狂犬病ウイルスの P タンパク質の C 末端ドメイン（P-CTD）がヒトの転写因子である STAT1 と相互作用することで、インターフェロンによって誘導される抗ウイルス遺伝子の発現を阻害することが報告されている。しかし、先行研究の多くは細胞生物学的な知見にとどまり、分子基盤の理解は進んでいなかった。そこで、本研究では精製した組み換えタンパク質を用いた構造生物学的及び生化学的解析を通じて、P-CTD がどのように STAT1 認識し阻害するのかという分子機構を解明することを目指した。特に P-CTD と STAT1 の相互作用様式を明らかにすることは、安全で安価な弱毒化した生ワクチン株の開発や、この相互作用を阻害する治療薬の開発につながる。

まず、P-CTD が標的とする STAT1 の状態と領域を絞り込むために、P-CTD と各種 STAT1 の定量的な相互作用解析を行った。当初は等温滴定型カロリメトリーを用いて相互作用を定量化することを試みたが、P-CTD を pY-STAT1 に滴定した際、測定条件下で沈殿が生じ、定量精度に影響が出ることが判明した。そこで、蛍光偏光解消法を用いて相互作用を定量化した。N 末端ドメイン（NTD）を欠損した STAT1 の単量体である非リン酸化状態（U-STAT1-ΔN）と二量体であるリン酸化状態（pY-STAT1-ΔN）の STAT1 と P-CTD との結合親和性（解離平衡定数 K_D 値）を比較した。その結果、pY-STAT1-ΔN と P-CTD の相互作用が U-STAT1-ΔN に比べて 74 倍上昇した。さらに、pY-STAT1 の NTD と C 末端領域のいずれかあるいは両方の欠損体(pY-STAT1-ΔN、pY-STAT1-ΔC、pY-STAT1-ΔN/C)と全長 pY-STAT1 の K_D 値を比較した。その結果、全長 pY-STAT1 の K_D 値に比べ、pY-STAT1 欠損変異体はすべて P-CTD との相互作用が低下していた。加えて、NTD に変異を加えて四量体を形成できない pY-STAT1

二量体変異体（pY-STAT1 F77A/L78A）と pY-STAT1 四量体の K_D 値を比較した。その結果、四量体 pY-STAT1 全長の K_D 値と比較し、pY-STAT1 二量体変異体の K_D 値は P-CTD との相互作用が 2 倍低下していた。これらの結果から、P-CTD が STAT1 を認識するためには、pY-STAT1 が NTD、C 末端領域を含むすべての領域を持ち、四量体を形成できる必要があることが示唆された。言い換えると、P-CTD がリン酸化による二量体界面及び NTD による四量体化を認識していることが明らかになった。

次に、pY-STAT1 四量体がどのように会合しているのかを明らかにするために、クライオ電子顕微鏡を用いて pY-STAT1 四量体/DNA 複合体の構造解析を行った。その結果、pY-STAT1 四量体構造を分解能 3.8 Å で決定することに成功した。pY-STAT1 四量体構造はリン酸化による 2 つの二量体が二回回転対称の位置関係で相互作用していた。得られた pY-STAT1/DNA 複合体の四量体構造からは，細胞内で一本の DNA に 2 箇所で pY-STAT1 が結合するモデルを立てることができた。

さらに、pY-STAT1 と P-CTD の相互作用様式を理解するために、クライオ電子顕微鏡を用いて pY-STAT1/P-CTD 複合体の構造解析を行った。その結果、分解能 2.9Å で構造を決定することに成功し、アミノ酸レベルで両者の相互作用様式を明らかにした。得られた構造から pY-STAT1 四量体に対して P-CTD は 2 分子結合することを明らかにした。また、P-CTD は pY-STAT1 の 2 つの領域と相互作用していた。1 つ目の領域は pY-STAT1 の DNA 結合ドメインであり、P-CTD による STAT1 の DNA への結合阻害が構造からも説明できた。この領域はリン酸化によって形成される pY-STAT1 の二量体界面であり、P-CTD が pY-STAT1 の二量体化を認識していることが証明できた。2 つ目の領域は pY-STAT1 の NTD であった。この NTD は四量体を構成するもう一方の二量体に由来しており、P-CTD は pY-STAT1 を四量体として認識しているという相互作用解析の結果を構造からも説明することができた。加えて、pY-STAT1 の核内移行に重要である核局在化シグナルのアミノ酸残基は P-CTD との相互作用界面の近くに位置しており、pY-STAT1 の核輸送タンパク質の結合を阻害することが示唆された。

加えて、P-CTD が pY-STAT1 の平衡状態に与える影響を明らかにし、さらに四量体認識に関わるアミノ酸残基の重要性を生化学的に検証するために、mass photometry を用いて pY-STAT1 の量体状態を解析した。その結果、野生型 P-CTD は pY-STAT1 の四量体形成を促進する一方、構造解析で特定された 1 つまたは 4 つの四量体認識残基に変異を導入した P-CTD 変異体では四量体形成促進能が低下していた。これらの結果から、P-CTD が pY-STAT1 四量体を安定化させることが示唆された。

以上の結果から、P-CTD は STAT1 のリン酸化及び NTD による STAT1 の多量体化を認識していることを明らかにした。さらに、P-CTD が pY-STAT1 を阻害する機構を以下のような分子機構に基づくと結論付けた。P-CTD は pY-STAT1 の DNA 結合部位近傍に結合することで DNA への結合を阻害する。加えて、P-CTD は四量体を認識して pY-STAT1 四量体を安定化させことで、STAT1 の二量体への解離や機能的な四量体への移行を妨げ、結果としてタンデム DNA への協調的結合を抑制する。さらに、P-CTD は pY-STAT1 に結合することで核局在化シグナルを不活化し、pY-STAT1 の核内輸送を阻害することが示唆された。