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_summary.pdf, 全文の要約

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

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。加えて、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複合体の三次元情報を取得し、両者の相互作用の理解に不可欠な知見を得た。

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。これにより、ウイルスが STAT1 を標的として不活化する機構を理解する上で、STAT1 四量体の存在を考慮する必要があることが示された。