

## 令和 3 年度 (2021 年度) 大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

国立大学法人大分大学グローバル感染症研究センター長 殿

<b>申請者に関する事項</b>	フリガナ	イトウナオト	
	氏 名	(和)伊藤直人	
		(英)Naoto Ito	
	所属機関名	(和) 岐阜大学	
		(英) Gifu University	
	部 局 名	(和)応用生物科学部	
		(英) Faculty of Applied Biological Science	
職 名	(和)教授		
	(英) Professor		
所属機関住所	〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1-1		
申請者連絡先	TEL	E-mail	
	058-293-2949	naotoito@gifu-u.ac.jp	
報告内容の公開制限 ※本報告書に記載の内容について特許出願等の理由により公開時期の希望がある場合に記載してください。		<input checked="" type="checkbox"/> 特に希望無し <input type="checkbox"/> _____年____月以降公開可	

<b>1. 研究課題名</b>			
和 名	狂犬病ウイルス P 蛋白質アイソフォームの抗インターフェロン活性		
英 名	Interferon antagonist activity of rabies virus P protein isoforms		
<b>2. 研究部門</b>	感染症病態研究部門	<b>3. 大分大学 共同研究教員</b>	西園 晃
<b>4. 研究期間</b>	令和 3 年度 ~ 令和 4 年度 : ( 1 年間)		
<b>5. 研究分野</b>	番号 : 1 分野名 : 狂犬病など神経ウイルス感染症の発症病理に関する研究		

6. 研究組織（研究分担者） ※必要に応じて行を追加してください。上段：和／下段：英	
所属機関・部局・職名	
(和)伊藤直人	(和)岐阜大学・応用生物科学部・教授
(英)Naoto Ito	(英)Professor, Faculty of Applied Biological Science, Gifu University
正谷達膳	岐阜大学・応用生物科学部・准教授
Tatsunori Masatani	Associate professor, Faculty of Applied Biological Science, Gifu University

**7. 令和3年度（2021年度）年度研究成果の概要**（本共同研究で得られた研究成果の概要やその方法について、具体的に記載してください。本センターの主要な施設・設備を使用した場合は、当該施設等が研究成果にどのように貢献したか等について記載してください。適宜、図表・見出しを配置していただいても構いません。）  
（和文：600～800字を目安に記入）

狂犬病ウイルス P 遺伝子 mRNA には同一の読み枠内に 5 つの開始コドンが存在し、各々から P 蛋白質アイソフォーム P1～5 が翻訳される。これまで、実験室株由来の P1～5 を用いた研究により、それぞれに I 型インターフェロン（IFN）産生シグナルおよび応答シグナル阻害活性の両者が存在することが確認されている。これらの知見により、各アイソフォームの抗 IFN 活性が有望な治療標的となる可能性が示された一方で、実際の治療標的となる野外株の P1 以外のアイソフォームの抗 IFN 活性に関する情報は極めて少ない。

そこで本研究では、大分大学が保有する野外株 1088 株に注目し、同株の遺伝子操作系を活用して P 蛋白質アイソフォームを発現しないウイルス株を作出し、その病原性を評価した。また、P 蛋白質アイソフォームを発現するプラスミドを構築した。

① 遺伝子操作による P 蛋白質アイソフォーム欠損ウイルス作出

大分大学で確立された 1088 株の遺伝子操作系（Isomura et al., J.Gen Virol. 2017）をもとに、P 蛋白質アイソフォーム（P2 から P5 まで）を発現しないよう、各アイソフォームの開始コドンに変異を導入したフルゲノムプラスミドを作出した。これを T7 ポリメラーゼ発現細胞に導入することで、アイソフォーム欠損株 1088 ΔP2-5 の作出に成功した。

② 1088 株アイソフォーム発現プラスミドの作出

大分大学側にて、1088 株のストックウイルスから抽出したゲノム RNA を鋳型として逆転写反応を実施し、ウイルスゲノム cDNA を合成した。上記 cDNA を鋳型として各アイソフォームをコードする遺伝子領域を PCR により増幅した上で、各増幅 DNA を発現プラスミドベクターである pCAGGS にクローニングした。

(英文：200～300wordを目安に記入)

Rabies virus (RABV) P gene mRNA contains five start codons within the same reading frame, from each of which the P protein isoforms P1-5 are translated. Studies using P1-5 from fixed RABV strain have confirmed that each isoform have inhibitory activity for type I interferon (IFN) production signal and response signal. While these findings indicate that the anti-IFN activity of each isoform may be a promising therapeutic target, there is very little information on the anti-IFN activity of isoforms other than P1 of field strains that are actual therapeutic targets.

In this study, we focused on the street RABV strain 1088 owned by Oita University and used the reverse genetics system of the strain to generate a virus strain that does not express the P isoforms and evaluated its virulence. We also constructed a plasmid expressing the P protein isoform.

(1) Generation of P protein isoform-deficient virus by reverse genetics

Based on the reverse genetics system of 1088 strain established at Oita University (Isomura et al., J.Gen Virol. 2017), a full-genome plasmid was generated by introducing mutations in the start codon of each isoform so that P protein isoforms (P2 to P5) are not expressed. By transfecting this plasmid into T7 polymerase-expressing cells, isoform-deficient strain 1088 $\Delta$ P2-5 was successfully generated.

(2) Construction of isoform expression plasmid of 1088 strain

The genomic RNA extracted from the stock virus of 1088 strain was used as a template for reverse transcription reaction at Oita University to synthesize viral genomic cDNA. Using the above cDNA as a template, the gene region encoding each isoform was amplified by PCR, and each amplified DNA was cloned into pCAGGS, an expression plasmid vector.

**8. 本共同研究による研究業績** (本共同研究の成果により、研究代表者もしくは研究分担者、指導大学院生等が令和3年度(2021年度)において発表した論文、学会発表、著書等について、査読付き論文等に限らず幅広く記載してください。ただし、総説は対象に含めませんが、学内の紀要に発表された論文・総説は除きます。) ※国際共著論文とは、国境を越えた組織間の研究者による共著論文を指します。

[謝辞に本共同研究の成果である旨の記載がある論文]

※SCI論文(JCR(Journal Citation Reports)データベースに収録された学術雑誌に掲載された論文)は赤字、国際共著論文は先頭に○を付してください。

該当なし

[上記以外の論文] ※SCI論文は赤字、国際共著論文は先頭に○を付してください。

該当なし

[学会発表]

該当なし

[著書]

該当なし

**9. 本共同研究の波及効果** (本共同研究による令和3年度(2021年度)の波及効果(外部資金の獲得や学会賞受賞、関連コミュニティ、特許出願等)について記載してください。)

[外部資金の獲得: 資金制度名、研究課題名、機関(省庁・独法等)、金額、期間、代表・分担の別]

該当なし

[学会賞等の受賞]

該当なし

[本共同研究が密接に関係する学会・研究会等名称(※複数回答可)]

該当なし

[特許権等の取得: 発明の名称、出願番号・特許番号等]

該当なし

**10. 本共同研究が発展したプロジェクト** (本共同研究が発展したプロジェクトについて、そのプロジェクト名、財源、期間、簡単な概要を記載してください。)

[プロジェクト名、財源、期間、簡単な概要]

該当なし

**11. 本共同研究により本センターを利用して学位を取得した大学院生** (本共同研究により本センターの施設・設備、データベース、資料等を利用して令和3年度(2021年度)中に学位を取得した大学院生がいる場合、その氏名等を記載してください。)

[博士号取得者(氏名、大学・研究科名、国籍)]

該当なし

[修士号取得者(氏名、大学・研究科名、国籍)]

該当なし