

学 位 論 文 題 名

# Effects of Chondroitin Sulfate-E on Japanese Encephalitis Virus Infection

(日本脳炎ウイルス感染におけるコンドロイチン硫酸Eの影響)

## 学位論文内容の要旨

Glycosaminoglycans (GAGs) have diverse functions in the body and are involved in viral infection. However most recent studies on the function of GAGs in viral infection have been focused on heparan sulfate, thus the interaction between chondroitin sulfate (CS) and viral infection are not widely recognized so far. Therefore this study was performed to evaluate the role that CS plays in Japanese encephalitis virus (JEV) infection, particularly related to neural infection.

In chapter I, the effect of soluble CS (sCS) on JEV infection was investigated in African green monkey kidney-derived Vero cells and baby hamster kidney-derived BHK cells. Unlike other sCS preparations, sCS-E (derived from squid cartilage) exclusively inhibited JEV infection in Vero and BHK cells. This inhibitory effect arose from interfering with viral attachment on these cells.

In chapter II, the influence of sCS on JEV infection was examined in the mouse neuroblastoma cell line Neuro-2a. Unlike Vero and BHK cells, sCS-E enhanced JEV infection in Neuro-2a, despite the fact that viral attachment to Neuro-2a cells was inhibited by sCS-E. This enhancement effect in Neuro-2a cells seemed to be related to increased viral RNA replication due to inhibited JEV-induced interferon (IFN)- $\beta$  synthesis by sCS-E. In Neuro-2a cells, knockdown of *N*-acetyl-D-galactosamine 4-sulfate 6-*O*-sulfotransferase, which synthesizes E-disaccharide units (GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4,6-*O*-disulfate)) from precursor A-disaccharide units (GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4-*O*-sulfate)) in CS chains by catalyzing the transfer of sulfate from 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, increased the level of constitutive IFN- $\beta$  expression and reduced susceptibility to JEV infection.

In chapter III, it was investigated whether these alterations in the amounts of E-units contribute to JEV neurovirulence in brains. In high-performance liquid

chromatography (HPLC) analysis, the amount of E-disaccharide units of CS was larger in the brains of 4-day-old rats, which are highly susceptible to JEV infection, than in those of 17-day-old JEV-resistant rats. Intracerebral co-administration of sCS-E with JEV in 17-day-old rats resulted in higher brain viral loads relative to rats infected without sCS-E administration.

Together, these results showed the paradoxical effects of sCS-E on JEV infection in different cell types. Especially in neural cells, E-disaccharide units enhanced JEV infection through the reduction of IFN- $\beta$  expression. Furthermore, this study suggested that the amount of E-disaccharide in the brain CS might influence host susceptibility to JEV infection.

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	澤	洋	文
副査	教授	大	橋	和彦
副査	教授	菅	原	一幸 (先端生命科学研究院)
副査	准教授	荻	和	宏明
副査	准教授	木	村	享史

## 学位論文題名

# Effects of Chondroitin Sulfate-E on Japanese Encephalitis Virus Infection

(日本脳炎ウイルス感染におけるコンドロイチン硫酸Eの影響)

グリコサミノグリカン (GAGs) はプロテオグリカンの構成成分であり、二糖構造の繰り返しからなる基本構造と硫酸基の付加パターンによって分類される。GAGsはその構造に基づき、生体内で様々な機能を示す。本研究では神経突起生成と神経細胞の遊走に関与するコンドロイチン硫酸Eユニットに着目し、神経向性ウイルスである日本脳炎ウイルス (JEV) の感染においてコンドロイチン硫酸Eユニットが果たす役割に関して検討を行った。

イカ軟骨由来の可溶性コンドロイチン硫酸E (sCS-E) は非神経系株化細胞であるVeroとBHK-21へのJEVの吸着を阻害することによりウイルス感染を阻害した。sCS-Eは神経芽細胞腫由来株化細胞であるNeuro-2aへのJEVの吸着をVero及びBHK-21と同様に阻害したが、Neuro-2a細胞のJEV感受性を増強した。この感染増強効果はウイルス感染によって誘導されるインターフェロンβ

(IFN-β) の産生抑制により、ウイルスゲノムの複製が亢進することに起因していた。コンドロイチン硫酸AユニットからEユニットへの生合成に関与する硫酸化酵素N-acetyl-D-galactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferaseの発現をノックダウンしたNeuro-2a細胞では、IFN-βの恒常的な発現が増強し、JEVに対する感受性が低下した。

JEVに対し高感受性を示す4日齢のラットの脳にはJEV感染に抵抗性を示す17日齢のラットの脳に比べてより多量のコンドロイチン硫酸Eユニットが含まれていた。sCS-EとJEVの混合物を脳内接種した17日齢のラットは、JEVのみを脳内接種した同日齢のラットに比較して、脳内のウイルス量が高値を示した。

本研究によって、sCS-EのJEV感染に及ぼす影響は、細胞の種類によって異なることが明らかとなった。神経系細胞ならびにラット感染モデルにおいて、コンドロイチン硫酸EユニットはIFN-βの産生を抑制することによりJEV感染増強効果を示した。脳内コンドロイチン硫酸に含まれるEユニットが、宿主のJEV感受性に影響を及ぼすことが明らかになり、これはJEVの感染機構の解明

において極めて重要な知見であると考えられる。

審査委員一同は、上記博士論文提出者 金 恩美氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。