

D. 考察

H 蛋白質と SLAM の複合体の構造が明らかになったことで、抗ウイルス薬の標的となる構造、ワクチンの有効性や終生免疫の構造基盤、ウイルスの細胞侵入機構について重要な情報を得ることができた。

E. 結論

麻疹ウイルスの受容体結合蛋白質である H 蛋白質と細胞受容体 SLAM の複合体の結晶構造を明らかにした。H 蛋白質上の SLAM 結合領域は、中和抗体のエピトープとして報告されている領域と重なっていた。ウイルスの生存上この領域は変異しにくいと考えられ、麻疹ウイルスが抗体からの回避を起こさず、単一血清型を示すことをうまく説明できる。これは、麻疹排除に向けて行われている生ワクチン接種の有効性を強く支持するものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular

receptor SLAM. *Nat Struct. Mol. Biol* 18:135-141, 2011

Shirogane Y, Takeda M, Tahara M, Ikegame S, Nakamura T, Yanagi Y. Epithelial- mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus. *J Biol Chem* 285:20882-20890, 2010

Koga R, Ohno S, Ikegame S, Yanagi Y. Measles Virus-Induced Immunosuppression in SLAM Knock-In Mice. *J Virol* 84:5360-5367, 2010

2. 学会発表

橋口隆生、白銀勇太、前仲勝実、柳雄介. 麻疹ウイルスと受容体 SLAM の相互作用と膜融合. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム 2010 年 11 月 9 日 徳島

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
（分担）研究報告書

麻疹ウイルスの抗原エピトープの構造解析と効果的なワクチン維持のための研究

研究分担者 前仲勝実 北海道大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨

麻疹（はしか）ウイルスは2007年に日本で爆発的に流行し、その脅威が社会的に大きな問題となったが、麻疹ウイルスに対するワクチンは大変有効であり、ワクチン接種で十分に予防できる。しかし、何故ワクチンがこれほど効果的に働くのかは不明であった。我々は、主たる麻疹ウイルス抗原であるH蛋白質(measles virus hemagglutinin, MV-H)のX線結晶構造解析に世界で初めて成功し、その立体構造から効果的な中和抗体産生に糖鎖が重要であることを提唱した(Hashiguchi et al. PNAS 2007)。今年度は、麻疹ウイルスH蛋白質とその受容体SLAMとの複合体の結晶構造解析に成功した。その立体構造では、単体構造で提唱した糖鎖の重要性を支持するように、SLAMが糖鎖に覆われていない限られた領域をほとんど覆うように結合していた。さらに、麻疹ウイルスの近縁にあたる犬ジステンパーウイルス(CDV)のH蛋白質の構造解析に取り組み、初期段階の構造ではあるが、糖鎖が効果的なワクチン維持に重要である共通の機構がわかってきた。今後、中和抗体を完全に逃避できる、あるいは中和抗体の効果を減弱することのできる麻疹ウイルスが将来的に生まれる可能性があるのかについて、さらにMV-HとMV-Fおよび中和抗体との相互作用解析や構造解析を進め、結論に迫りたい。

A. 研究目的

麻疹（はしか）ウイルスに対するワクチンは大変有効であり、ワクチン接種で十分に予防できると考えられてきたが、その分子機構については不明であった。本研究分担者は、同じく分担者である柳教授と研究代表者の竹田部長との共同研究グループで、麻疹ウイルスの表面抗原

であるH蛋白質(measles virus hemagglutinin, MV-H)のX線結晶構造解析に世界で初めて成功した。その結果、MV-H蛋白質が糖鎖で表面の大部分が覆われていることにより、受容体の結合部位に集中的に抗体が産生されるため、ウイルス侵入を防ぐ中和抗体ができやすくなることがわかり、効果的な中和抗体産生に糖鎖が

重要であることを提唱した(Hashiguchi et al. PNAS 2007)。これが、麻疹ワクチンが有効であることを保証する分子基盤と考えられた。

本研究では、ウイルス表面蛋白質(MV-HやMV-F)と受容体あるいは中和抗体との相互作用解析、結晶化、構造解析を進め、ワクチンによる麻疹ウイルスに対する高い中和活性効果の分子基盤を明らかにする。研究代表者の竹田部長のグループと密に情報を共有しながら、抗原性変化に対するワクチン効果の予測を目指す。さらに麻疹ウイルス近縁のジステンパーウイルスについても知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

麻疹ウイルス MV-H 蛋白質および受容体 SLAM 蛋白質については、ヒト細胞を用いた大量培養系を確立済みであり、MV-H 単独では X 線結晶構造解析に成功している。本年度は、MV-H と SLAM との複合体の結晶構造解析を進めるため、様々な複合体作成のための工夫を行う。具体的には、(1) 受容体分子のヒト以外の種の検討、(2) 化学修飾による蛋白質の可溶性向上、(3) 一本鎖形成による複合体の安定化、などを念頭に、十分な分解能のデータを収集できる結晶の作製を目指す。得られた結晶は、高エネルギー研究所あるいは Spring8 の放射光施設ビームラインにてデータ収集を行う。これを基にまず MV-H の構造を基に分子置換法による構造決定を目指す。他方、中和抗体については、分担者の柳教授から提供された候補となる MV-H 抗体産生細胞から、組換え抗体作成のため、中和抗体の遺伝子クローニングを進める。さらに、犬ジステンパーウイルス(CDV)についても、麻疹ウイルスワクチン株の MV-H 蛋白質の構造を決定した経験を踏まえて、CDV-H 蛋

白質の結晶化を試み、構造解析可能な結晶が得られる条件の最適化を試みる。十分な回折データが得られれば、MV-H の構造を基に分子置換法による構造決定を目指す。次に、SLAM 分子との相互作用解析について、表面プラズモン共鳴解析や滴定型カロリメーターを用いて行う。

C. 研究結果

今年度は、柳教授との共同研究により麻疹ウイルス H 蛋白質とその受容体 SLAM との複合体の結晶構造解析に成功した。その立体構造では、単体構造で提唱した糖鎖の重要性を支持するように、SLAM が糖鎖に覆われていない限られた領域をほとんど覆うように結合していた。

MV-H 蛋白質に対する中和抗体 2 種類の遺伝子クローニングを進め、典型的な可変領域の遺伝子増幅に成功した。

麻疹ウイルスの近縁に当たる犬ジステンパーウイルス(CDV) の H 蛋白質の構造解析に取り組み、初期段階の構造が得られた。これらの結果から、糖鎖が効果的なワクチン維持に重要である共通の機構がわかってきた。また、SLAM 結合実験から、これまでの SLAM 特異性について分子レベルでの検証を進めた。

D. 考察

麻疹ウイルス H 蛋白質とその受容体 SLAM との複合体の立体構造と犬ジステンパーウイルス(CDV) の H 蛋白質の立体構造から、糖鎖が効果的なワクチン維持に重要である共通の機構が見えてきた。同時に MV-H 蛋白質と CDV-H との構造の類似性から、MV と CDV との交差反応性についても考察できる段階にきた。

また、中和抗体を完全に逃避できる、あるいは中和抗体の効果を減弱することのできる麻疹

ウイルスが今後生まれる可能性があるのかについて、さらなる構造と機能情報を収集する。

E. 結論

(1)柳教授との共同研究により麻疹ウイルス受容体結合蛋白質と受容体 SLAM との結晶構造解析に成功した。

(2)麻疹ウイルス受容体結合蛋白質に対する中和抗体の遺伝子クローニングを進めた。

(3)ジステンパーウイルス受容体結合蛋白質の構造解析に成功しつつあり、SLAM 結合実験を進めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1.

Construction, Expression, and Characterization of a Single-Chain Variable Fragment Antibody Against 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in the Hemolymph of Silkworm Larvae.

Sakamoto S, Pongkitwitoon B, Nakamura S, Sasaki-Tabata K, Tanizaki Y, Maenaka K, Tanaka H, Morimoto S.

Appl Biochem Biotechnol. 2011 Jan 29. In press

2.

Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM.

Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y.

Nat Struct Mol Biol. 2011 Feb;18(2):135-41.

3.

Efficient silkworm expression of single-chain variable fragment antibody against ginsenoside Re using Bombyx mori nucleopolyhedrovirus bacmid DNA system and its application in enzyme-linked immunosorbent assay for quality control of total ginsenosides.

Sakamoto S, Pongkitwitoon B, Nakamura S, Maenaka K, Tanaka H, Morimoto S.

J Biochem. 2010 Sep;148(3):335-40.

4.

Long-term control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101.

Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T,

Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M.

J Virol. 2010 Jul;84(14):7151-60.

2.学会発表

1. 前仲勝実 麻疹ウイルスの細胞侵入機構、日本蛋白質科学会・ワークショップ、招待講演 札幌 2010.6

2. 前仲勝実 モルビリウイルス属のワクチンの有効性の分子基盤、日本ウイルス学会年会 招待講演 徳島 2010.11

3. 前仲勝実 モルビリウイルス属の細胞侵入と免疫制御の分子基盤、日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 ワークショップ、招待講演、神戸 2010.12

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

III. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号頁	出版年
長野秀樹, 駒込理佳, 井上真紀, 工藤伸一, 岡野素彦	2009 年度の北海道における麻疹 PA 抗体保有状況	道衛研所報	60 : 79-80	2010
菊地正幸, 村椿絵美, 扇谷陽子, 伊藤はるみ, 高橋広夫, 三觜雄, 長野秀樹, 駒込理佳, 三好正浩, 岡野素彦	中国からの H1 型麻疹ウイルス輸入症例—札幌市.	病原微生物検出情報	31 (7): 203	2010
安井善宏, 伊藤雅, 小林慎一, 山下照夫, 藤浦明, 皆川洋子, 柴田陽子, 水野周久, 土屋啓三, 櫛原和貴子, 長野友, 片岡泉, 犬塚君雄	愛知県内で検出された D9 型麻疹ウイルス—輸入例を発端とした感染事例	病原微生物検出情報	31(9): 271-272	2010
安井善宏, 藤原範子, 水谷絵美, 安達啓一, 伊藤雅, 小林慎一, 山下照夫, 藤浦明, 皆川洋子, 土屋啓三, 柴田陽子, 水野周久, 土屋啓三, 櫛原和貴子, 長野友, 片岡泉, 犬塚君雄	フィリピンからの D9 型輸入麻疹および関連症例の発生—愛知県	病原微生物検出情報	32: 45-46	2011
庵原俊昭	麻疹	小児科	51:544-545	2010
庵原俊昭	麻疹	小児内科	42:s301-s304	2010
赤地重宏, 田沼正路, 大熊和行, 堀内功一, 田中孝明, 一見良司, 菅秀, 庵原俊昭, 駒瀬勝啓	三重県内における麻疹患者の発生—帰国者を発端とした D9 型麻疹ウイルス検出事例	病原微生物検出情報	31(9):327-328	2010
岩田眞美, 紺野美貴, 椎葉桂子, 市川英毅, 修理淳, 七種美和子, 宇宿秀三, 池淵守, 高	麻疹か伝染性紅斑か診断に迷った症例	病原微生物検出情報	31(9):265-266	2010

野つる代、蔵田英志、 多屋馨子、駒瀬勝啓				
駒瀬勝啓	日本の麻疹・風疹の現状と問題点	総合臨床	59:435-440	2010
染谷健二、駒瀬勝啓、 竹田誠	麻疹の検査診断法と全数検査診断に向けた取り組み	小児科	51:1311-1318	2010
染谷健二、駒瀬勝啓、 竹田誠	麻疹風疹実験室ネットワーク	臨床検査	54(11):1322-1327	2010
竹田誠、駒瀬勝啓	世界麻疹排除計画と世界麻疹風疹実験室ネットワーク	病原微生物 検出情報	31、 35-36	2010
田原舞乃、染谷健二、 竹田誠	ウイルスのリバースジェネティクス	化学療法の 領域	26(7)	2010
駒瀬勝啓、竹田誠	麻しん排除を目指した麻しん検査診断体制の問題点	病原微生物 検出情報	32、 41-42	2011
竹田誠、駒瀬勝啓、森 嘉生	世界麻疹排除計画の現状と世界麻疹風疹実験室ネットワークの役割	病原微生物 検出情報	32、 33-34	2011
Ito M, Suga T, Akiyoshi K, Nukuzuma S, Kon-no M, Umegaki Y, Kohdera U, Ihara T,	Detection of measles virus RNA by SYBR green real time RT-PCR assay.	Pediatr Intern	52:611-615	2010
Akiyoshi K, Suga S, Nukuzuma S, Kon-no M, Shibata M, Itoh M, Ito Masahiro, Ihara T	Reevaluation of laboratory methods for diagnosis of measles.	Jpn J Infect Dis	63:225-228	2010
Xin JY, Ihara T, Komase K, Nakayama T.	Amino Acid Substitutions in Matrix, Fusion and Hemagglutinin Proteins of Wild Measles Virus for Adaptation to Vero Cells	Intervirology		2011 Jan 13. [Epub ahead of print]
Sawada A, Komase K, Nakayama T.	AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats	Vaccine.	29(7):1481-90	2011
Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y.	Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM.	Nat Struct. Mol. Biol	18:135-141	2011

Shirogane Y, Takeda M, Tahara M, Ikegame S, Nakamura T, Yanagi Y.	Epithelial–mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus.	J Biol Chem	285:2088 2– 20890	2010
Koga R, Ohno S, Ikegame S, Yanagi Y.	Measles Virus-Induced Immunosuppression in SLAM Knock-In Mice.	J Virol.	84:5360– 5367	2010
Sakamoto S, Pongkitwitoon B, Nakamura S, Sasaki-Tabata K, Tanizaki Y, Maenaka K, Tanaka H, Morimoto S.	Construction, Expression, and Characterization of a Single-Chain Variable Fragment Antibody Against 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in the Hemolymph of Silkworm Larvae.	Appl Biochem Biotechnol.		2011 Jan 29. [Epub ahead of print]
Sakamoto S, Pongkitwitoon B, Nakamura S, Maenaka K, Tanaka H, Morimoto S.	Efficient silkworm expression of single-chain variable fragment antibody against ginsenoside Re using Bombyx mori nucleopolyhedrovirus bacmid DNA system and its application in enzyme-linked immunosorbent assay for quality control of total ginsenosides.	J Biochem.	148(3):3 35–340	2010
Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M.	Long-term control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101.	J Virol.	84(14):7 151–716 0	2010
Ayata, M., Takeuchi, K., Takeda, M., Ohgimoto, S., Kato, S., Sharma, LB., Tanaka, M., Kuwamura, M., Ishida, H., Ogura, H.	The F gene of the osaka-2 strain of measles virus derived from a case of subacute sclerosing panencephalitis is a major determinant of neurovirulence.	J Virol.	84(21):1 1189–11 199	2010
Bankamp, B., Takeda, M., Zhang, Y., Xu, W., Rota, PA.	Genetic characterization of measles vaccine strains.	J Infect Dis.		(in press)
Otsuki, N., Abo, H.,	Elucidation of the full genetic	Vaccine	29(10):1	2011

Kubota, T., Mori, Y., Umino, Y., Okamoto, K., Takeda, M., Komase, K.	information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine phenotypes.		863-73	
---	---	--	--------	--

