

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：狂犬病ウイルスの街上毒と固定毒の病原性の差を規定すると考えられる
G 蛋白等の細胞内局在を決定する蛋白部位の解明

研究分担者：井上 智（国立感染症研究所・獣医科学部）

研究要旨：狂犬病ウイルス（RV）は神経組織に親和性が強い（-）鎖の一本鎖 RNA ウィルスであり、感染すると数カ月の潜伏期後に致死性の脳炎を引き起こす。自然感染では潜伏期間中に RV に対する抗体は産生されずウイルスも検出できないが、野外株である街上毒を実験室内継代等で弱毒化させた固定毒は容易に中和抗体を誘導し、潜伏期間の短縮と一定化、免疫誘導能の増強といった特徴を示す。本研究では、RV の G 蛋白質糖鎖修飾が街上毒と固定毒で異なることに注目して Kyoto 株（街上毒）と CVS-26 株（固定毒）の G 蛋白質の細胞内発現とその局在を *in vitro* で比較解析したところ、MNA 細胞内に感染した Kyoto 株（街上毒）と CVS-26 株（固定毒）で見られた G 蛋白質局在の違いが G 蛋白質のみを MNA 細胞に発現させた場合でも見られたことから、固定毒に特徴的な細胞膜からの RV 出芽は固定毒化で獲得された RV の G 蛋白質 204 位への N 型糖鎖付加が大きく関与していることが明らかとなり、街上毒と固定毒の G 蛋白質を詳細に比較解析することによって固定毒の中和抗体誘導能や潜伏期間の短縮や一定化の機序を明らかにすることが可能になると期待された。

研究協力者：浜本紀子、宇田晶彦、野口章
加来義浩、奥谷晶子（国立感染症研究所・
獣医科学部）、飛梅実（同・感染病理部）、
朴天鎬（北里大学・獣医病理学研究室）

A. 目的：

狂犬病ウイルス（RV）は神経組織に親和性が強い（-）鎖の一本鎖 RNA ウィルスであり、感染すると数カ月の潜伏期後に致死

性の脳炎を引き起こす。自然感染では潜伏期間中に RV に対する抗体は産生されずウイルスも検出できないが、野外株である街上毒を実験室内継代等で弱毒化させた固定毒は容易に中和抗体を誘導し、潜伏期間の短縮と一定化、免疫誘導能の増強といった特徴を示す（図 1）。本研究の目的は、RV の G 蛋白質糖鎖修飾が街上毒と固定毒で異なる（図 2）ことに注目して Kyoto 株（街

上毒)と CVS-26 株(固定毒)の G 蛋白質の細胞内発現とその局在を in vitro で比較解析して街上毒が固定毒化によって獲得したと考えられる防御免疫の誘導機序等を明らかにすることである。

B. 材料と方法:

ウイルス: 狂犬病ウイルス Kyoto 株(街上毒), CVS-26 株(固定毒)を用いた。

細胞: ウイルス感染にはマウスニューロblastoma 由来の MNA 細胞を用いた。蛋白質発現にはヒト胎児腎細胞由来の HEK293T 細胞および MNA 細胞を用いた。間接蛍光抗体法(IFA): ウイルス感染細胞およびウイルス蛋白質発現細胞を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。固定後に, 0.2% Triton-X100 による細胞膜透過処理を行うか否かで細胞質内および細胞膜上でのウイルス蛋白質の局在を調べた。G 蛋白質の検出には抗 G 蛋白質マウスモノクローナル抗体 7-1-9 を一次抗体に, FITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体を二次抗体に用いた。小胞体の染色には ER-ID Red assay kit(Enzo)を用いた。細胞内の G 蛋白質と小胞体の局在は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

ウェスタンブロット(WB): 細胞を 5% SDS で可溶化後, 蛋白質を SDS-PAGE (8% ポリアクリルアミドゲル) で分離し, PVDF メンブレンに電気泳動的に転写した。G 蛋白質は 7-1-9 抗体を一次抗体に, HRP 標識抗マウス IgG ヤギ抗体を二次抗体として反応させ, ECL Plus Western Blotting

Detection System (GE Health care) を用いて検出した。

感染実験: MNA 細胞にウイルス(multiplicity of infection; MOI=0.01) を接種し, Kyoto 株接種細胞では接種 5 日後に, CVS-26 株接種細胞では接種 3 日後にホルマリン固定して, IFA により G 蛋白質の局在を解析した。

G 蛋白質の発現: Kyoto 株および CVS-26 株の G 蛋白質をコードする cDNA を組み込んだ発現プラスミドを MNA 細胞にトランスフェクトし, 2 日後に細胞を固定して IFA により G 蛋白質の局在を解析した。また, G 蛋白質発現プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクトし, 2 日後に細胞を可溶化して WB を行った。

糖鎖付加阻害: G 蛋白質発現プラスミドをトランスフェクトした HEK293T 細胞および MNA 細胞を, それぞれツニカマイシン (1 μ g/ml) 存在下で培養し, G 蛋白質への糖鎖付加を阻害した。培養 2 日後に G 蛋白質の糖鎖付加は WB で解析し, 細胞内局在は IFA で解析した。

変異導入 G 蛋白質の発現: G 蛋白質の N 型糖鎖付加部位のアミノ酸を置換する変異を導入した G 蛋白質発現プラスミドをそれぞれ HEK293T 細胞および MNA 細胞にトランスフェクトし, 変異導入 G 蛋白質を発現した。変異導入 G 蛋白質は, 変異導入部位及び置換アミノ酸に応じて以下の様に命名した。 Kyoto-G(N37S), Kyoto-G(N319Q), CVS-26-G(N37S), CVS-26-G(N204S), CVS-26-G(N319Q), CVS-26-G (N204S,

N319Q), CVS-26-G (N37S, N204S, N319Q) は 1 箇所から 3 箇所の糖鎖付加部位を欠失した G 蛋白質で、Kyoto-G(S204N)は糖鎖付加部位を追加した G 蛋白質である。G 蛋白質の糖鎖付加は WB で解析し、細胞内局在は IFA で解析した。

組み換え狂犬病ウイルス： CVS-26 株の G 遺伝子を Kyoto 株の G 遺伝子に入れ替えた組み換え狂犬病ウイルス rCVS-26(Kyoto-G)を、reverse genetics により作出した。rCVS-26(Kyoto-G)感染細胞における G 蛋白質の局在：MNA 細胞に Kyoto 株、CVS-26 株および rCVS-26(Kyoto-G)を感染させて、G 蛋白質の局在を IFA により解析した。

C. 研究成果：

MNA 細胞に感染した CVS-26 株の G 蛋白質は細胞膜に局在し、Kyoto 株では細胞内小胞器官に局在していた（図 3）。この G 蛋白質の局在は CVS-26 株と Kyoto 株の組換え G 蛋白質を MNA 細胞で発現した場合にも同様に見られた（図 4）。また、Kyoto 株 G 蛋白質の N 型糖鎖付加変異体 (S204N) も細胞膜で G 蛋白質の局在が促進された（図 5）。CVS-26 株 G 蛋白質の N 型糖鎖欠失変異体 (N204S) では細胞内小胞器官と細胞膜の両方で G 蛋白質が見られた（図 6）。Kyoto 株 G 蛋白質の N 型糖鎖付加変異 (S204N) と CVS-26 株 G 蛋白質の N 型糖鎖欠失変異 (N204S) については tunicamycin 処理によって確認を行った（表 1、図 7）。

D. 考察：

MNA 細胞内に感染した Kyoto 株(街上毒)と CVS-26 株(固定毒)で見られた G 蛋白質局在の違いが G 蛋白質のみを MNA 細胞に発現させた場合でも見られたことから、固定毒に特徴的な細胞膜からの RV 出芽は固定毒化で獲得された RV の G 蛋白質 204 位への N 型糖鎖付加が大きく関与していると考えられた。今後、街上毒と固定毒の G 蛋白質を詳細に比較解析することによって固定毒の中和抗体誘導能や潜伏期間の短縮や一定化の機序を明らかにすることが可能になると期待された。

E. 結論

本研究では、RV の G 蛋白質糖鎖修飾が街上毒と固定毒で異なることに注目して Kyoto 株(街上毒)と CVS-26 株(固定毒)の G 蛋白質の細胞内発現とその局在を in vitro で比較解析したところ、MNA 細胞内に感染した Kyoto 株(街上毒)と CVS-26 株(固定毒)で見られた G 蛋白質局在の違いが G 蛋白質のみを MNA 細胞に発現させた場合でも見られたことから、固定毒に特徴的な細胞膜からの RV 出芽は固定毒化で獲得された RV の G 蛋白質 204 位への N 型糖鎖付加が大きく関与していることが明らかとなり、街上毒と固定毒の G 蛋白質を詳細に比較解析することによって固定毒の中和抗体誘導能や潜伏期間の短縮や一定化の機序を明らかにすることが可能になると期待

された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 小宮拓巳、山田健太郎、君付和範、井上 智、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス (1088-N4#14) に感染後耐過した ddY マウスの中樞神経系に関する病理学的研究。第 156 回日本獣医学会学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 2) 君付和範、小宮拓巳、井上 智、山田健太郎、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス (1088-NO) を後肢筋肉内に接種したヌードマウスの中樞神経系および末梢組織病変。第 156 回日本獣医学会学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 3) Nguyen Thi Kieu Anh, Nguyen Vinh Dong, Nguyen Tuyet Thu, Satoshi Inoue, Ngo Chau Giang, Nguyen Thi Hong Hanh, Nguyen Tran Hien. Genetic characterization of rabies virus circulated in Vietnam, 2007- 2012. 第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 4) 濱本紀子、飛梅実、加来義浩、宇田晶

彦、朴天鎬、野口章、森川茂、井上智。

狂犬病ウイルス固定毒 (CVS-26 株) で見られる G 蛋白質 204 番目の N 型糖鎖付加は固定毒に特徴的な細胞からの出芽に関与している。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県

- 5) 飛梅 実、佐藤由子、長谷川秀樹、濱本紀子、井上 智、野口 章。街上毒狂犬病ウイルスの宿主動物内局在の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. 狂犬病

- すべての哺乳類に感染する人獣共通感染症。
- 主に感染動物から受けた咬傷を介して感染する。
- 発症すると重篤な神経症状を呈し、ほぼ100%死亡する。

病原ウイルス：狂犬病ウイルス

- 街上毒：自然感染動物から分離されたウイルス株
- 固定毒：実験室内で継代を繰り返して作出された株

	街上毒	固定毒
潜伏期	長く、不定	短く、一定
末梢感染性	強い	弱い
病原性	強い	弱～強
免疫誘導能	低い	高い

図2. 狂犬病ウイルスG蛋白質のN型糖鎖付加部位の違い

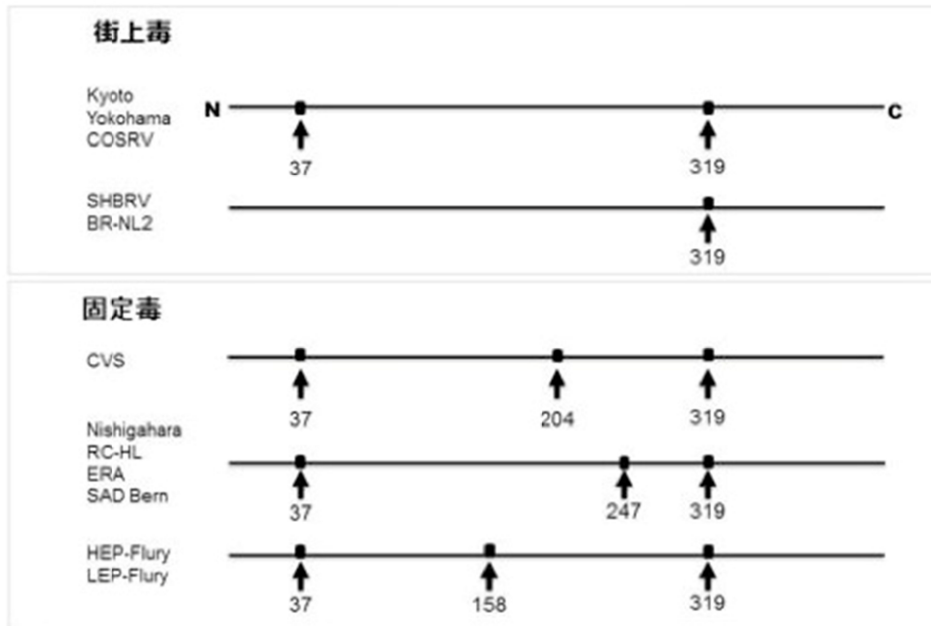


図3. 感染細胞内のG蛋白質の局在

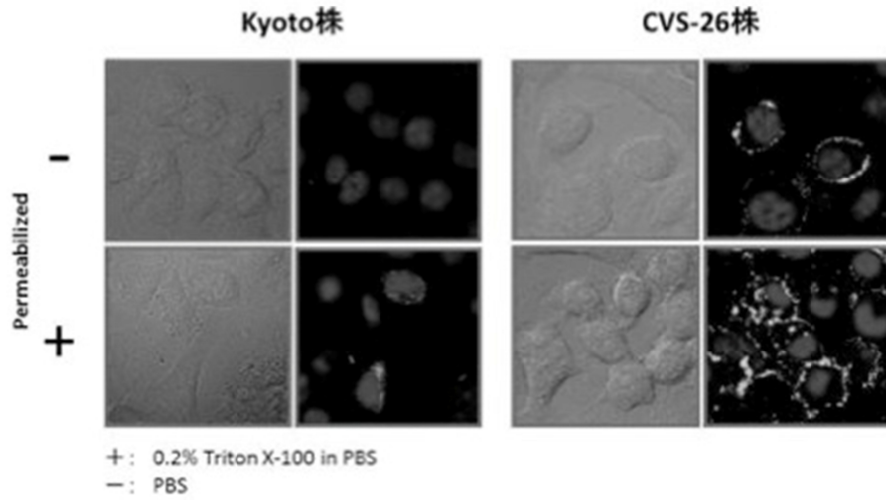


図4. 組換えG蛋白質の細胞内発現

発現ベクター: pcDNA3.1/Zeo

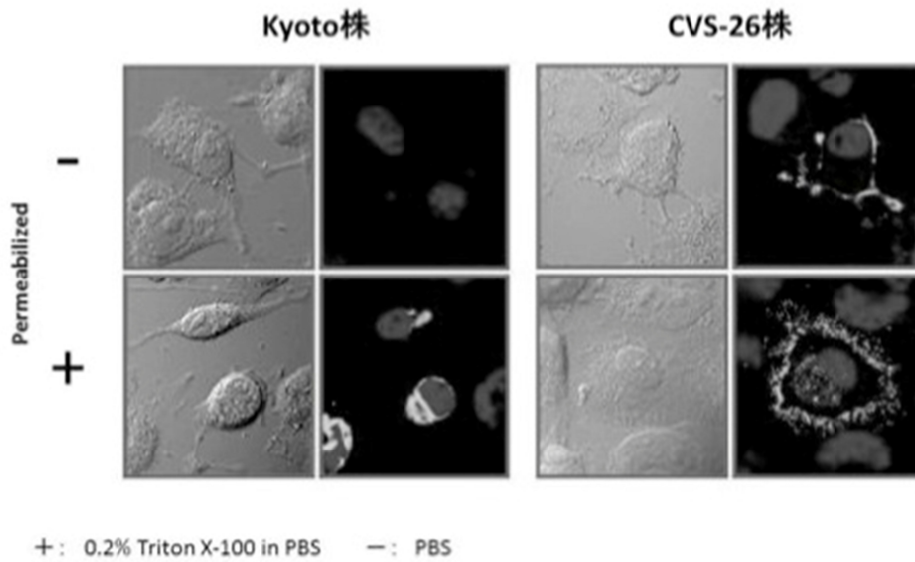
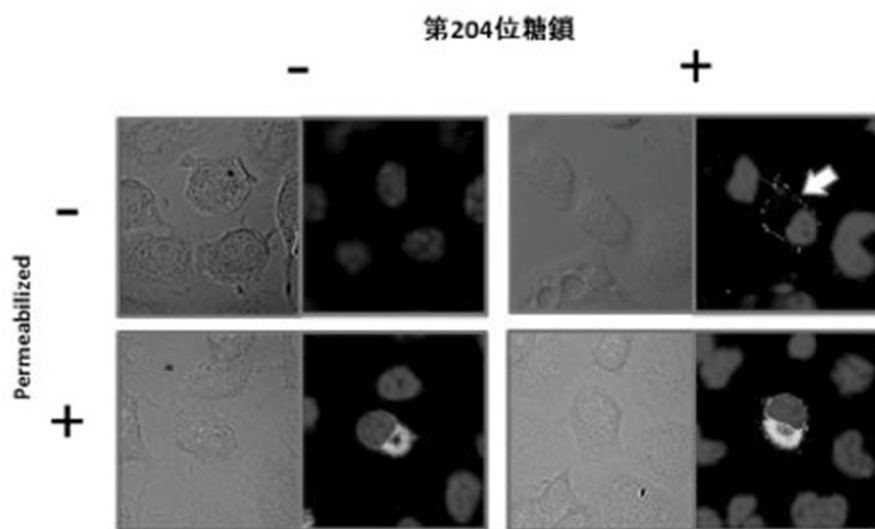


図5. Kyoto株のG蛋白質の第204位N型糖鎖の付加

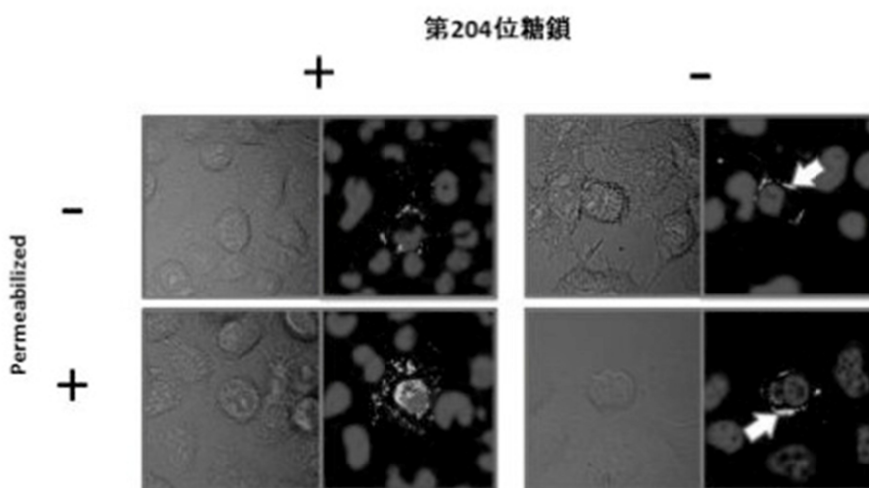
発現ベクター：pcDNA3.1/Zeo



+ : 0.2% Triton X-100 in PBS, - : PBS

図6. CVS-26株G蛋白質の第204位N型糖鎖の欠損

発現ベクター：pcDNA3.1/Zeo



+ : 0.2% Triton X-100 in PBS, - : PBS

図7. G蛋白質のN型糖鎖付加をtunicamycin処理で確認

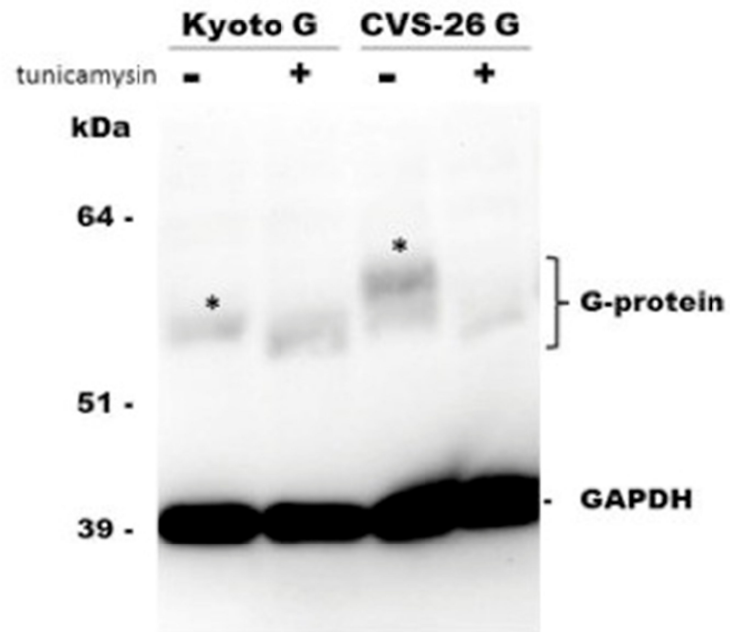


表1. Gタンパク質の糖鎖変異導入部位

G protein	37	204	319
Kyoto G	+	-	+
Kyoto G (S204N)	+	+	+
CVS-26 G	+	+	+
CVS-26 G (N204S)	+	-	+