

厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

狂犬病の病原性解析と新興ラブドウイルスの診断法の開発

研究分担者：井上 智 国立感染症研究所 獣医科学部

研究協力者：濱本紀子、宇田晶彦、野口章、加来義浩、奥谷晶子 ( 同 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 )

研究要旨：狂犬病ウイルス ( RV ) は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、狂犬病ワクチンの標的である G 蛋白質の細胞内における発現様式・動態を明らかにして、現行の暴露後予防的治療をより効果的・安価に行える方法の開発を可能にするために、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。Kyoto 株組み換え G 蛋白質をマウス神経芽腫由来 MNA 細胞に発現させると G 蛋白質は核周囲小胞体に分布し細胞膜に分布しないが、CVS-26 株 G 蛋白質の多くは細胞膜に分布し、両株 G 蛋白質の N 型糖鎖付加を阻害させると核周囲小胞体に分布すること、また、Kyoto 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸を N 型糖鎖付加部位に置換すると細胞膜に分布することを明らかにした。固定毒化が進んでいる CVS-26 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸を N 型糖鎖付加部位に変異させても一部が細胞膜に分布したことから、第 204 位の N 型糖鎖付加は G 蛋白質の細胞膜輸送を規定するが、これ以外にも細胞膜輸送に関与する因子が存在することが示唆された。街上毒が固定毒化の過程で獲得した細胞膜からのウイルス粒子の発芽や宿主の免疫応答の亢進に、G 蛋白質 204 位への N 型糖鎖付加が大きく関与しており、糖鎖付加によって小胞体等から細胞膜への蛋白質輸送が可能になることを明らかにした。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは、ラブドウイルス科リッサウイルス属に属し、野外流行株である街上毒と街上毒を実験室内で継代することによって宿

主に対する末梢感染性が減弱して潜伏期間が短縮・一定化し、さらには免疫誘導能が増強した固定毒 ( ワクチン株・実験株 ) に分けることができる。

電子顕微鏡で感染細胞を観察すると、街上毒では細胞膜からウイルスが出芽する像が観察されないが、固定毒では細胞膜から高頻度に出芽している像が報告されており、街上毒の固定毒化に伴う培養細胞でのウイルス増殖効率の上昇やマウスに対する病原性の低下は狂犬病ウイルス G 蛋白質の糖鎖修飾と関連していると考えられている。

街上毒株と固定毒株で比較解析を行うことにより、街上毒が固定毒化する過程で獲得した表現型について弱毒化の機序を解明することができれば、狂犬病の発症機序を明らかにして、現行の暴露後予防的治療をより効果的・安価に行える方法の開発が可能になる。

本研究では、街上毒が固定毒化する過程で G 蛋白質の N 型糖鎖付加部位が増加することに着目し、分子生物学的・免疫組織学的手法を用いて街上毒 Kyoto 株と固定毒 CVS-26 株の組み換え G 蛋白質の糖鎖付加部位に種々の変異を導入し、G 蛋白質の N 型糖鎖修飾と細胞内局在について比較解析を行った。

## B. 研究方法

分子生物学的・免疫組織学的手法により、街上毒 Kyoto 株と固定毒 CVS-26 株の組み換え G 蛋白質を作製して、N 型糖鎖修飾の違いによる細胞内局在について比較解析を行った。

**細胞：**狂犬病ウイルス G 蛋白質の発現には、マウス神経芽細胞腫 (MNA) 細胞を用い、MEM-10% FBS で培養した。

**N 型糖鎖付加部位へ変異導入した組換え G 蛋白質発現プラスミドの作製：**PrimeSTAR mutagenesis Basal kit (TAKARA) を用いて、pzKyoto-G および pzC26-G の潜在的糖鎖付加部位への変異導入を行った (図 1)。変異導入の確認は遺伝子配列を決定して確認した。変異導入 G 蛋白質の cDNA を挿入したプラスミド、pzKyoto-G(S204N)、pzC26-G(N204S)、pzC26-G

(N37S)、pzC26-G(N319Q)、pzC26-G (N204S, N319Q)、pzC26-G(N37S, N204S, N319Q) を作製した。これらにより図 1 に示す変異導入 G 蛋白質が発現される。

**トランスフェクション：**6 穴プレートまたは CELLview4 分画ガラスボトムシャーレ (Greiner Bio-One) に培養した MNA 細胞に上記プラスミドトランスフェクションし、48 時間培養後に WB と IFA により発現した G 蛋白質を解析した。

## C. 研究結果

**G 蛋白質単独発現細胞における G 蛋白質の分布：**Kyoto 株および CVS-26 株の G 蛋白質発現プラスミドをトランスフェクションした MNA 細胞において、Kyoto 株由来の組換え G 蛋白質 (Kyoto rG) は細胞質内の小胞体だけに分布し、CVS-26 株由来の組換え G 蛋白質 (CVS-26 rG) は、細胞質内 (小胞体) 及び細胞膜に分布した (図 2, 3)。また、CVS-26 rG 発現時にツニカマイシンを添加すると G 蛋白質は小胞体に分布した。

**Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質の N 型糖鎖修飾：**MNA 細胞に発現させた Kyoto rG は、CVS-26 rG よりも分子量が小さかった。Kyoto rG と CVS-26 rG はツニカマイシン存在下で発現したり、発現蛋白を PNGase F 処理すると同等の分子量を示したことから、Kyoto rG よりも CVS-26 rG の方が N 型糖鎖が多いことが明らかとなった。

**第 204 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入の組換え G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響：**Kyoto 株と CVS-26 株の G 蛋白質遺伝子の配列をもとに、アミノ酸配列を確認したところ、Kyoto 株 G 蛋白質は、第 37 位アミノ酸と、第 319 位アミノ酸の 2 か所が潜在的な N 型糖鎖付加部位であるのに対し、CVS-26

株 G 蛋白質では、第 37 位アミノ酸と、第 319 位アミノ酸に加え、第 204 位アミノ酸が潜在的な N 型糖鎖付加部位(Asn-Lys-Thr)であった。Kyoto 株 G 蛋白質では、第 204 位アミノ酸はセリンで潜在的 N 型糖鎖付加部位ではない(Ser-Lys-Thr)。Genbank に登録された街上市毒の G 蛋白質では、第 204 位アミノ酸が潜在的 N 型糖鎖付加部位である株はなかった。

そこで街上市毒 Kyoto 株の G 蛋白質には存在しない第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が、G 蛋白質の細胞内局在に与える影響を調べるために、Kyoto 株 G 蛋白質の第 204 位アミノ酸をセリンからアスパラギンに変異導入して N 型糖鎖付加配列にした組換え G 蛋白質 [ Kyoto rG (S204N) ] と、CVS-26 株由来の G 蛋白質の第 204 位アミノ酸をアスパラギンからセリンに変異導入して糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [ CVS-26 rG (N204S) ] を MNA 細胞に発現させた。その結果、これらの変異導入 G 蛋白質の分子量を、それぞれ Kyoto rG および CVS-26 rG と比較した結果、Kyoto rG (S204N) は、Kyoto rG よりも分子量の大きなバンドと、Kyoto rG とほぼ同じ分子量のバンドに分かれた。CVS-26 rG (N204S) は、Kyoto rG と同程度の分子量のバンドと、CVS-26 rG と同程度の分子量のバンドに分かれた (図 4)。

また、Kyoto rG (S204N) は、細胞膜への分布が認められた。一方、CVS-26 rG(S204N)は、CVS-26 rG と同様に細胞膜への分布が依然認められたものの、細胞質内では Kyoto rG と同様に核周囲に多くの G 蛋白質の分布が見られるようになった。

**第 37 位と第 319 位アミノ酸の N 型糖鎖に影響する変異導入の CVS-26 株 G 蛋白質の分子量と細胞内分布に与える影響:** CVS-26 株 G 蛋白質の第 37 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が G 蛋白質の細胞内局在を規定しているかを明らかにするために、第 37 位アミノ酸をアスパラギンからセリンへ変異させ

N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [ CVS-26 rG (N37S) ] と第 319 位アミノ酸をアスパラギンからグルタミンに変異させ N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [ CVS-26 rG (N319Q) ] を MNA 細胞に発現させた。その結果、CVS-26 rG (N37S) は CVS-26 rG と同じ分子量であったが、CVS-26 rG (N319Q) は CVS-26 rG よりも分子量が低下していた (図 5)。さらに、第 204 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸の N 型糖鎖付加配列を欠失させた組換え G 蛋白質 [ CVS-26 rG (N204S, N319Q) ] を発現させると、ツニカマイシン存在下で発現させた CVS-26 rG と同じ分子量の蛋白質が大部分であったが、それより分子量の大きいバンドが少量認められた (図 5)。

これらの結果から、CVS-26 株の G 蛋白質の第 37 位の N 型糖鎖付加配列には効率よく N 型糖鎖修飾されていないと考えられる。

また、CVS-26 rG (N37S) と CVS-26 rG (N319Q) は細胞膜へ分布したが、CVS-26 rG (N319Q) の細胞膜への分布は CVS-26 rG と比べて減少した。CVS-26 rG (N204S, N319Q) も、細胞膜への分布は認められたが、CVS-26 rG (N319Q) と比べて細胞膜への分布はさらに減少した。3 か所の潜在的 N 型糖鎖付加部位を完全に欠失させた CVS-26 rG (N37S, N204S, N319Q) は、細胞膜へは分布しなかった。

#### D. 考察

狂犬病ウイルスの G 蛋白質を単独で MNA 細胞に発現させた場合でも、Kyoto 株と CVS-26 株を MNA 細胞に感染させた場合と同様に、Kyoto 株の rG 蛋白質は細胞膜に分布せず小胞体に局在し、CVS-26 株由来の rG 蛋白質は細胞膜に分布した (図 2, 3)。粗面小胞体で G 蛋白質が合成された後に Kyoto rG が小胞体に留まるのに対して、CVS-26 rG は細胞内の糖蛋白質輸送経路を利用してゴルジ体経由で細胞膜に輸送されると考えられる。これは、固定毒のウイルス粒子が細胞膜から主に出芽するのに

対して、街上毒のウイルス粒子は細胞膜からはほとんど出芽せず、小胞体やゴルジ体などの細胞内小器官の膜から細胞質内に出芽する知見と一致する。つまり、狂犬病の G 蛋白質がウイルス粒子形成部位を規定すると思われる。

G 蛋白質の潜在的 N 型糖鎖付加部位は、街上毒では 1~2 か所であるのに対し固定毒では 3~4 か所ある。実際、CVS-26 rG 蛋白質は Kyoto rG よりも多くの N 型糖鎖が付加されていた。

また、ツニカマイシンを培地に添加して、Kyoto rG と CVS-26 rG を発現させると、Kyoto rG はツニカマイシンの有無にかかわらず小胞体へ局在したが、CVS-26 rG ではツニカマイシン処理により細胞膜への局在がなくなり、小胞体にものみ局在したことから、CVS-26 rG に存在し Kyoto rG に存在しない N 型糖鎖付加が細胞膜局在に必要であると考えられた。

そこで、各種変異導入 G 蛋白質を発現して局在を調べた。その結果、第 204 位に N 型糖鎖付加部位を導入した Kyoto rG (S204N) は細胞膜へ分布したことから、第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加は G 蛋白質が細胞膜輸送に重要であると考えられる。一方、CVS-26 rG(N204S)では、一部の G 蛋白質の細胞膜への分布が認められたことと、CVS-26 rG(N204S)の大部分は CVS-26 rG よりも分子量が小さくなるものの、一部は CVS-26 rG と同等の分子量であることから、第 204 位の糖鎖修飾が阻害されるとほかの潜在的 N 型糖鎖付加部位へ糖鎖が付加されることが示唆された。

CVS-26 rG(N204S)の一部が細胞膜に分布した原因を明らかにするために、第 37 位アミノ酸と第 319 位アミノ酸への糖鎖付加部位を欠失させた。第 37 位アミノ酸への糖鎖付加部位を欠失させた CVS-26 rG(N37S)の分子量は、CVS-26 rG と同等の分子量を示したことから、第 37 位アスパラギンにはほとんど N 型糖鎖が付加されないことが示された。第 204 位の N 型糖鎖付加を欠失させた CVS-26 rG (N204S) と第 204 位と第 319 位の N 型糖鎖付加配列を

欠失させた CVS-26 rG(N204S、N319Q)では、糖鎖修飾のない G 蛋白質に相当する分子量とより大きい分子量の二種類の G 蛋白質が認められたことから、これらの組換え G 蛋白質では一部の第 37 位アスパラギンに N 型糖鎖が付加されていたことが示された。

CVS-26 rG(N37S)と第 319 位アミノ酸への糖鎖付加部位を欠失させた CVS-26 rG(N319Q)は細胞膜に分布したが、CVS-26 rG(N319Q)の細胞膜への分布は CVS-26 rG や CVS-26 rG(N37S)と比較して明らかに低下したことから、第 319 位アスパラギンへの N 型糖鎖付加も G 蛋白質の細胞膜への分布に関与することが示唆された。3 か所の N 型糖鎖付加配列を全て欠失させた CVS-26 rG(N37S、N204S、N319Q)は細胞膜へ分布せず、核周辺にものみ局在したことから N 型糖鎖が CVS-26 rG の細胞膜への輸送に必要不可欠であることが示された。

今後、Kyoto 株の G 蛋白質と CVS-26 株の G 蛋白質について、第 204 位アミノ酸への変異導入による蛋白質の立体構造の変化を詳細に調べることによって、固定毒化の機序をさらに究明できると考えられる。

## E. 結論

街上毒の Kyoto 株の G 蛋白質の第 204 位のアミノ酸への糖鎖付加は、G 蛋白質の局在を小胞体から細胞膜にシフトさせることからこの部位の糖鎖修飾が街上毒と固定毒の性状の違いに関わる大きな要因であると考えられた。固定毒の CVS-26 株の G 蛋白質は第 204 位のアミノ酸の N 型糖鎖付加以外にも細胞膜輸送に関与する糖鎖修飾があることも示された。

本研究によって、街上毒が固定毒化する過程で獲得した G 蛋白質の第 204 位アミノ酸への N 型糖鎖付加が、ウイルス粒子の細胞膜からの出芽や宿主の免疫応答の亢進に関与している可能性が示唆され、街上毒が固定毒化する過程で獲得した新たな N 型糖鎖付加部位がどのよう

に固定毒の中和抗体誘導に係るかを解明できれば、現行の暴露後予防的治療をより効果的・安価に行う方法の開発に寄与できると考えられた。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表

1.論文発表

1) Hamamoto N, Uda A, Tobiume M, Park C-H, Noguchi A, Kaku Y, Okutani A, Morikawa S, Inoue S. Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and N-glycosylation of the Sequon at Asn204. Japanese Journal of Infectious Diseases. In press. 2015

2.学会発表

- 1) 西條政幸．ヘルペスウイルスによる中枢神経感染症．第16回日本神経感染症学会学術集会、東京、(2011.11)
- 2) 高橋有里花、篠崎春美、矢野川祥子、君付和範、Hassadin Boonsriroj、Daria L. Manalo、井上 智、朴天鎬．狂犬病発病犬の唾液腺に関する病理学的研究．第157回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)
- 3) 篠崎春美、高橋有里花、矢野川祥子、君付和範、Hassadin Boonsriroj、Daria L. Manalo、井上 智、朴天鎬．狂犬病発病犬の口唇皮膚におけるウイルス抗原の局在と診断的有用性．第157回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)
- 4) 山田健太郎、渡辺一平、アハメド カムルデイン、Daria L. Manalo、Miranda Mary、Lapiz Stella、Tapdasan Emerson、Petspophonsakul Wilaiwan、井上 智、朴天鎬、Khawplod Pakamatz、西園 晃．イムノクロマト法をベースにした狂犬病ウイルス中和抗体価迅速検出キットのイヌ血清を用いた多国的評価．第157回日本獣医学会学術集会、第157

回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)

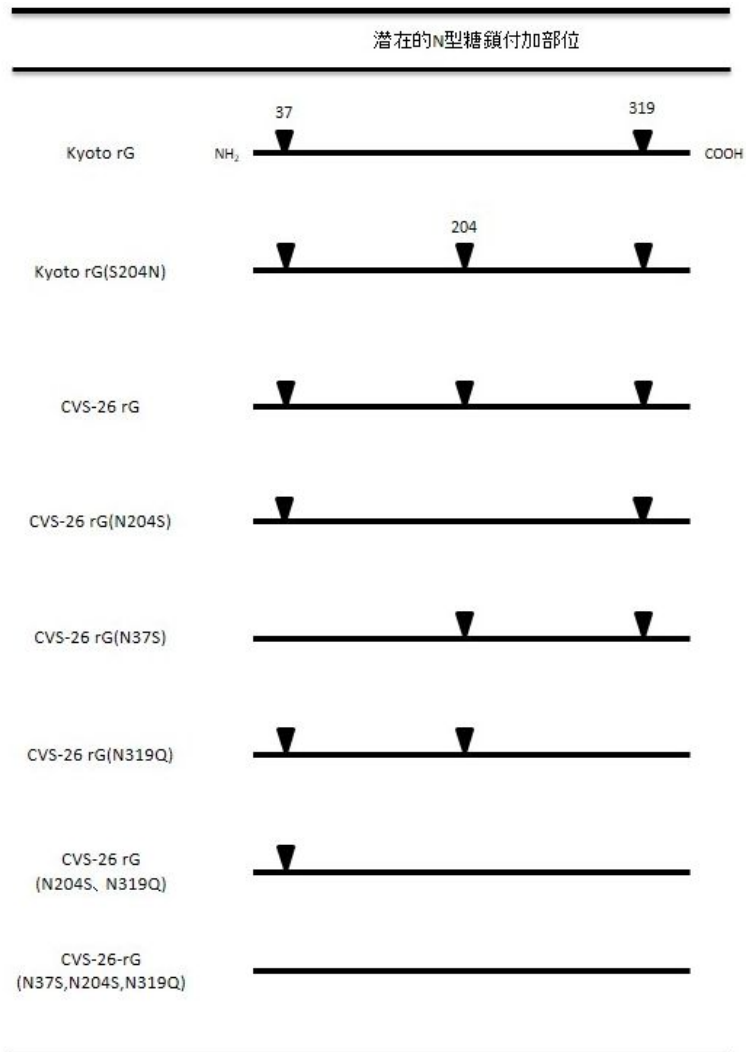
- 5) 加来義浩、奥谷晶子、河合康洋、野口 章、濱本紀子、梁瀬 徹、加藤友子、新井 智、井上 智、森川 茂．国内で分離された未分類のラブドウイルスの遺伝学的解析．第157回日本獣医学会学術集会、第157回日本獣医学会学術集会、北海道、(2014.9)
- 6) 松浦真翔、鶴田一郎、坊園慶信、山田健太郎、井上智、三澤尚明．官学連携による狂犬病診断体制の構築．平成26年度獣医学術九州地区学会、鹿児島、(2014.10)
- 7) 景岡美穂、李松熹、加来義浩、井上 智、長棟輝行、河原正浩．細胞増殖を指標とした細胞内抗体選 択法の開発 .2014年度細胞アッセイ研究会シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」、東京、(2015.1)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし．

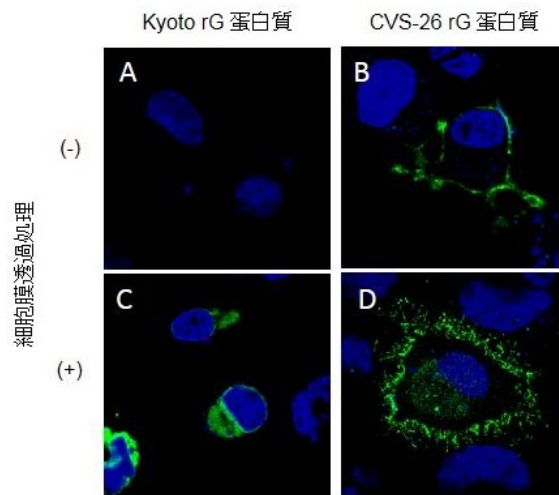
1. 特許取得  
なし．
2. 実用新案登録  
なし．
3. その他  
なし．

図 1 . 組換え G 蛋白質の糖鎖付加部位



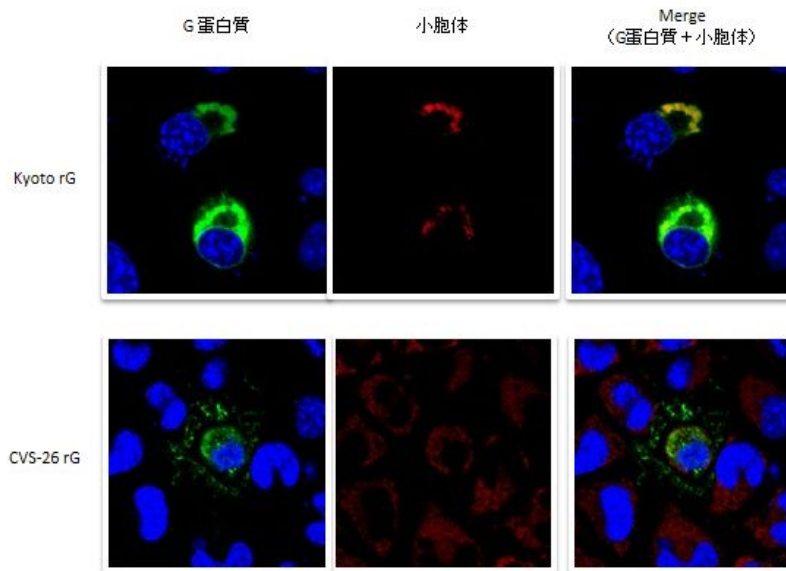
▼ N型糖鎖付加配列(N-X-SまたはN-X-T(Xはプロリン以外))のアスパラギンの位置。番号は成熟G蛋白質のN末端アミノ酸を1番として数えた。

図 2 . 組み換え G 蛋白質の細胞内分布



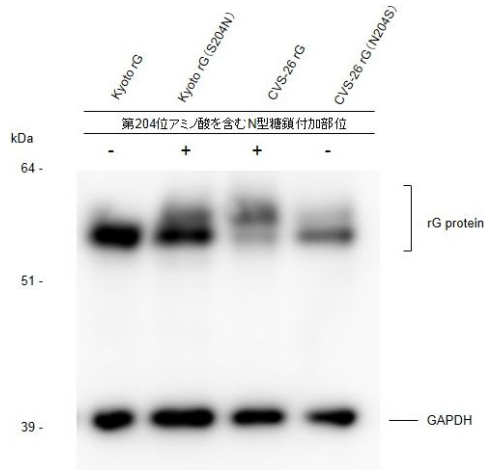
Kyoto 株の組み換え G 蛋白質発現細胞(A、C)と、CVS-26 株の組み換え G 蛋白質発現細胞(B、D)を、ホルマリン固定後、抗 G モノクローナル抗体 7-1-9 で染色したもの(A、B)と 0.2% Triton-X100 処理により細胞膜の透過処理を行い(C、D) 染色した。対比染色として DAPI で核を染色した。緑色蛍光：rG 蛋白質。青色蛍光：核。

図 3 . 組み換え G 蛋白質の細胞内分布



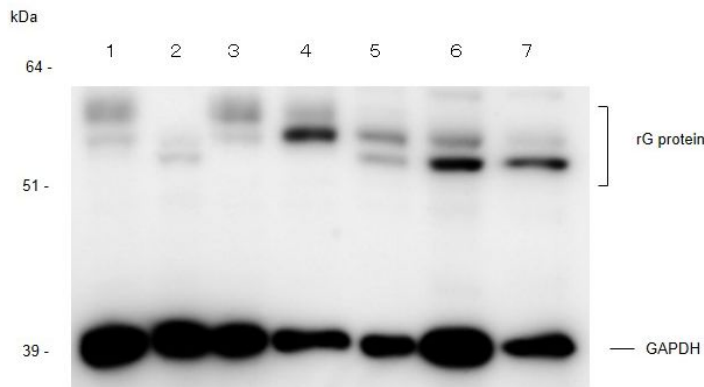
G 蛋白質発現プラスミドを MNA 細胞にトランスフェクションし、48 時間培養した後ホルマリン固定し、Triton X-100 による透過処理を行った。その後、抗 G モノクローナル抗体 7-1-9 で染色し、ER Red dye による小胞体の染色、DAPI による核染色により、G 蛋白質の局在を調べた。緑色蛍光：rG 蛋白質。赤色蛍光：小胞体。青色蛍光：核

図4 . 第 204 位アミノ酸に変異導入した組み換え G 蛋白質の分子量の変動



Kyoto 株、CVS-26 株の第 204 位アミノ酸に変異導入して N 型糖鎖付加部位を導入あるいは欠失した G 蛋白質の分子量をウェスタンブロッティングで解析した。

図5 . CVS-26 株の 37 位、319 位アミノ酸に変異導入した G 蛋白質の分子量の変動



1 : CVS-26 rG .2 : CVS-26 rG( ツニカマイシン添加 ).3 : CVS-26 rG(N37S) .  
 4 : CVS-26 rG(N204S) .5 : CVS26 rG(N319Q) .6 : CVS-26 rG(N204S、 N319Q) .  
 7 : C26 rG(N37S、 N204S、 N319Q) . MNA 細胞に rG 蛋白質を発現させてウ  
 エスタンブロッティングにより G 蛋白質を検出した。