

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業  
ワクチンの品質確保のための国家検定に関する研究

分担研究報告書

パキキュロウイルスを用いた狂犬病ウイルス N タンパク質および M タンパク質の  
発現性系の構築

研究分担者 倉根 一郎 国立感染症研究所 所長  
研究協力者 林 昌宏 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長  
伊藤(高山)睦代 国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官  
堀谷まどか 国立感染症研究所 ウイルス第一部  
西條 政幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部 部長

研究要旨：狂犬病は世界 150 カ国以上の国と地域で年間 55,000 人以上発生している。我が国では狂犬病ワクチンは流行地域への渡航者用曝露前ワクチン，あるいは狂犬病ウイルス (RV) 曝露者の狂犬病発症抑制のための曝露後ワクチンとして重要である。RV の N タンパク質 (RV-N) はウイルス粒子形成においてウイルスゲノムと相互作用することが知られており、また防御免疫応答を惹起する抗原の 1 つであることが報告されている。RV の M タンパク質 (RV-M) はウイルスエンベロープの形成および RV-N と RV の G タンパク質 (RV-G) との相互作用により粒子形成において重要な働きを示し、RV-N タンパク質の安定性に関与することが示唆される。したがって RV-N および RV-M は重要な免疫抗原となりうる。そこで本研究においてはパキキュロウイルス発現系を用いて組換え RV-N および RV-M タンパク質を作出した。その結果約 56 kDa 付近に RV-N が、約 25 kDa 付近に RV-M の発現がそれぞれ観察された。さらに RV-M の発現においては約 50kDa 付近に二量体も観察された。本タンパク質発現系を用いることにより、それぞれのタンパク質の性状解析が可能となると共に、目的タンパク質を大量調整することにより、新規ワクチン開発の検討が可能となることが示唆された。

**A. 研究目的**

ヒトの狂犬病は狂犬病を発症したイヌ，ネコ，コウモリ等の野生動物による咬傷等を介した狂犬病ウイルス (RV) の感染により発症する急性進行性の神経疾患である。現在でもアジア，アフリカを中心に年間約 55,000 人が感染し，うち約 40%は子供である。狂犬病は，ひとたび発症すると急性に進行し，ほぼ 100%死亡する。日本では 1950

年頃まで年間数十例の患者が報告されていたが，1950 年に狂犬病予防法が施行され，1956 年の患者を最後に国内発生例は報告されていない。しかしながら 1970 年にはネパールからの輸入症例が 1 例，2006 年にはフィリピンからの輸入症例が 2 例報告され，いずれも予後不良であった。したがって海外に渡航した場合は狂犬病の危険性を認識しイヌや野生動物との接触を避け，現地の

流行状況や活動範囲などから必要があれば暴露前ワクチンの接種を受けることが勧められている。

狂犬病に対する特異的治療法はないが、狂犬病のイヌと接触した場合、速やかな傷口の石鹸による洗浄および暴露後ワクチンの接種により狂犬病の発症を予防することができる。全世界で毎年 15,000,000 人以上が暴露後ワクチンを受けており、毎年 327,000 人の狂犬病の発症を防いでいると推定されている。

現在我が国で承認されている乾燥組織培養不活化狂犬病(乾組狂犬)ワクチンは SFP 鶏から採取した発育鶏卵のニワトリ胚初代培養細胞を用いて培養された狂犬病ウイルスを 0.02% (v/v) プロピオラクトンで不活化した凍結乾燥製剤である。乾組狂犬ワクチンの製造に用いられている RV 株はヒト患者由来の RV をニワトリ胚初代培養細胞に馴化した HEP-Flury 株である。ところで現行の不活化狂犬病ワクチンは暴露前予防および暴露後予防に有効であるが、多くの地域において暴露後接種による治療法は高コストである。

そこでこれまでに我々は防御免疫応答を惹起する主要抗原である RV-G を用いたサブユニットワクチンの開発を行い、RV-G を発現するバキュロウイルスを作出した。サブユニットワクチンは 1) 病原体を含まず、2) ワクチンの作製において高度封じ込めレベルの施設を必要としない。また 3) サブユニットワクチンは高い精製度を確保でき、4) その作製においては生産調整が容易である。

ところで RV の N タンパク質 (RV-N) はウイルス粒子形成においてウイルスゲノムと

相互作用することが知られており、また防御免疫応答を惹起する抗原の 1 つであることが報告されている。また RV の M タンパク質 (RV-M) はウイルスエンベロープの形成および RV-N と RV の G タンパク質 (RV-G) との相互作用により粒子形成において重要な働きを示し、RV-N タンパク質の安定性に関与することが示唆されている。したがって RV-N および RV-M は重要な免疫抗原となりうる。

そこで本研究ではバキュロウイルス発現系を用いた組換え RV-N および RV-M タンパク質を作出することを目的とした。本タンパク質発現系を用いることにより、それぞれのタンパク質の性状解析が可能となると共に、目的タンパク質を大量調整することにより、新規ワクチン開発の検討が可能となる。

## B. 研究方法

**RV-N および RV-M タンパク質の発現コンストラクトの作製**：RV HEP-flury 株の N タンパク質の全長に His タグ及び FLAG タグを付加 (RV-NF) した配列および M タンパク質の全長に His タグ及び FLAG タグを付加 (RV-MF) した配列 (図 1A) をトランスファープラスミド pBacPAK9 にクローニングした。

**組換えバキュロウイルスの作製**：RV-NF および RV-MF を挿入したトランスファープラスミド (pBacPAK-NF および -MF) と BacPAK6 バキュロウイルスベクターを sf9 細胞に共トランスフェクトし、RV-NF および RV-MF を発現する組換えバキュロウイルスを作製した。

**組換えタンパク質の発現確認**：組換えタ

ンパク質の発現は抗 His 抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。

### C. 研究結果

**RV-NF および RV-MF のクローニング：**RV HEP-flury 株を鋳型として RT-PCR を行い、RV-N および RV-M の遺伝子をそれぞれ増幅した。このとき増幅した RV-N および RV-M の領域をトランスファーベクター-pBacPAK9 にそれぞれクローニングした (pBacPAK-NF および pBacPAK-MF)。pBacPAK-NF あるいは pBacPAK-MF と BacPAK6 バキュロウイルス DNA をそれぞれ sf9 細胞に共トランスフェクトした結果、RV-NF および RV-MF を発現する組換えバキュロウイルスをそれぞれ作出した。

**リコンビナントタンパク質の発現確認：**作製したリコンビナントバキュロウイルスを sf9 細胞に接種し、1~4 日後に経時的に回収した。回収後、感染細胞を遠心分離法により分取し、1% NP-40 下で処理後 SDS-PAGE および抗 His 抗体を用いたウエスタンブロット法によりその発現を確認した。その結果可溶化された RV-NF が約 56 kDa の位置に観察された (図 1 B)。また可溶化された RV-MF は約 25 kDa の位置に単量体が、約 50 kDa 付近に二量体が観察された (図 1 B)。

### D. 考察

本研究により約 56 kDa 付近に RV-N が、

約 25 kDa 付近に RV-M の発現がそれぞれ観察された。さらに RV-M の発現においては約 50kDa 付近に二量体も観察された。RV-M の二量体は SDS 存在下において観察されたことからその安定性が示された。RV-M および RV-N は共に 1% NP40 存在下で可溶化された状態で検出されたことから、大量調整が可能であることが示唆された。可溶化されたタンパク質の精製は比較的容易に行えることから大量に高純度の RV-N および RV-M 抗原を調整することが可能であることが期待される。

### E. 結論

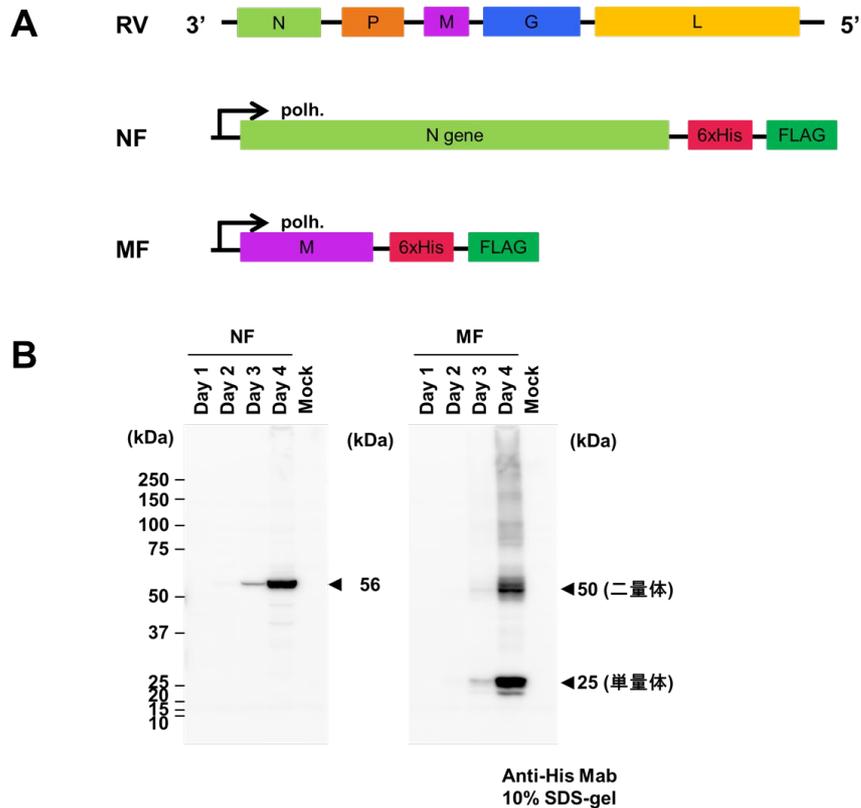
本研究においては RV-NF および RV-MF のバキュロウイルスを用いた発現系を開発した。その結果バキュロウイルス発現系を用いて可溶化 RV-NF および RV-MF を発現することが可能であることが示された。今後は RV-NF および RV-MF の性状解析と精製および抗原性の検討を行う。

### F. 研究発表

- |         |    |
|---------|----|
| 1. 論文発表 | なし |
| 2. 学会発表 | なし |

### G. 知的財産権の出願・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 |



**図1. 狂犬病ウイルスNタンパク質およびMタンパク質の発現組換えバキュロウイルスの作製:** (A) 狂犬病ウイルスNタンパク質の3'端にHisタグおよびFLAGタグを付加したコンストラクトRV-NFおよびMタンパク質の3'端にHisタグおよびFLAGタグを付加したコンストラクトRV-MFを設計した。(B) RV-NFおよびRV-MFタンパク質の発現を抗His-MAbを用いて確認した。目的遺伝子を組み替えたバキュロウイルス接種後day1からday4にかけて経時的に目的タンパク質の発現を確認した。その結果day4において約56kDa目的タンパク質の発現が認められた。またこのときRV-M発現細胞においては約50kDa付近に二量体が、25kDa付近に単量体が認められた。