



Title	狂犬病ウイルスの細胞侵入に寄与する糖タンパク質RABVGの特性解析
Author(s)	湯本, 航平
Citation	北海道大学. 博士(生命科学) 甲第14844号
Issue Date	2022-03-24
DOI	10.14943/doctoral.k14844
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/85670
Type	theses (doctoral)
File Information	Kohei_Yumoto.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

狂犬病ウイルスの細胞侵入に寄与する 糖タンパク質 RABVG の特性解析

湯本 航平

北海道大学大学院 生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
生体分子機能学研究室

令和4年3月

目次

略語一覧	2
バッファー及び培地の組成	4
1 章 序文	5
1-1 狂犬病	5
1-2 狂犬病ウイルス	7
1-3 狂犬病ウイルス糖タンパク質	10
1-4 研究目的	13
2 章 材料と方法	14
2-1 組換え RABVG の調製	14
2-2 中和抗体断片の調製	17
2-3 Biolayer interferometry 法による相互作用解析	20
2-4 DSF 法による熱安定性の評価	20
2-5 負染色法による構造観察	21
2-6 クライオ電子顕微鏡による構造解析	21
2-7 高速原子間力顕微鏡による動態解析	22
3 章 結果	24
3-1 組換え RABVG の調製	24
3-2 中和抗体断片の調製	32
3-3 Biolayer interferometry 法による相互作用解析	40
3-4 DSF 法による熱安定性の評価	43
3-5 rRABVG の構造解析	45
3-6 rRABVG-Fab 複合体の構造解析	55
4 章 考察	57
4-1 組換え RABVG の調製	57
4-2 中和抗体断片の特性	58
4-3 負染色法及びクライオ電子顕微鏡による構造観察	59
4-4 高速原子間力顕微鏡による動態解析	60
5 章 総括	63
参考文献	64
謝辞	70

略語一覽

6x His tag	Hexahistidine tag
aa	Amino acid
AIEX	Anion exchange chromatography
Amp	Ampicillin
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus
bp	base pair
CBB	Coomassie brilliant blue
CDV-F	Canine distemper virus fusion protein
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHAPSO	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonate
CIEX	Cation exchange chromatography
CV	Column volume
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltoside
DM	<i>n</i> -Decyl- β -D-maltoside
DOC	Sodium deoxycholate
DSF	Differential scanning fluorometry
DTT	Dithiothreitol
ECD	Extracellular domain
EDTA	Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Fab	Antigen-binding fragment
Gen	Gentamycin
HRP	Horseradish peroxidase
HRV-3C	Human rhinovirus 3C
IFA	Indirect immunofluorescent antibody
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalacopyranoside
LB	Luria-Bertani
LMNG	Lauryl maltose neopentyl glycol
Km	Kanamycin
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid

Ni-AFC	Ni ²⁺ affinity chromatography
OG	<i>n</i> -Octyl- β -D-glucoside
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Size exclusion chromatography
Tet	Tetracycline
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick End Labeling
Tween 20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
V _H	Variable region of heavy chain
V _L	Variable region of light chain
WB	Western blotting
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
YT	Yeast trypton

バッファー及び培地の組成

2xYT	Tryptone 16 g/L, Yeast Extract Dried 10 g/L, NaCl 5 g/L,
2xYT/Km/Gen	2xYT + Kanamycin 50 µg/mL, Gentamycin 7 µg/mL
LB 寒天培地	Tryptone 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L, NaCl 5 g/L, Agar 14 g/L
LB/Amp 寒天培地	LB 寒天培地 + Ampicillin 100 µg/mL
LB/Km/Gen/IPTG/X-Gal 寒天培地	LB 寒天培地 + Kanamycin 50 µg/mL, Gentamycin 7 µg/mL, 200 µM IPTG, X-Gal 40 µg/mL
PBS (-)	137 mM NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄
PBST	137 mM NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , 0.1% (v/v) Polyethylene (20) Sorbitan Monolaurate

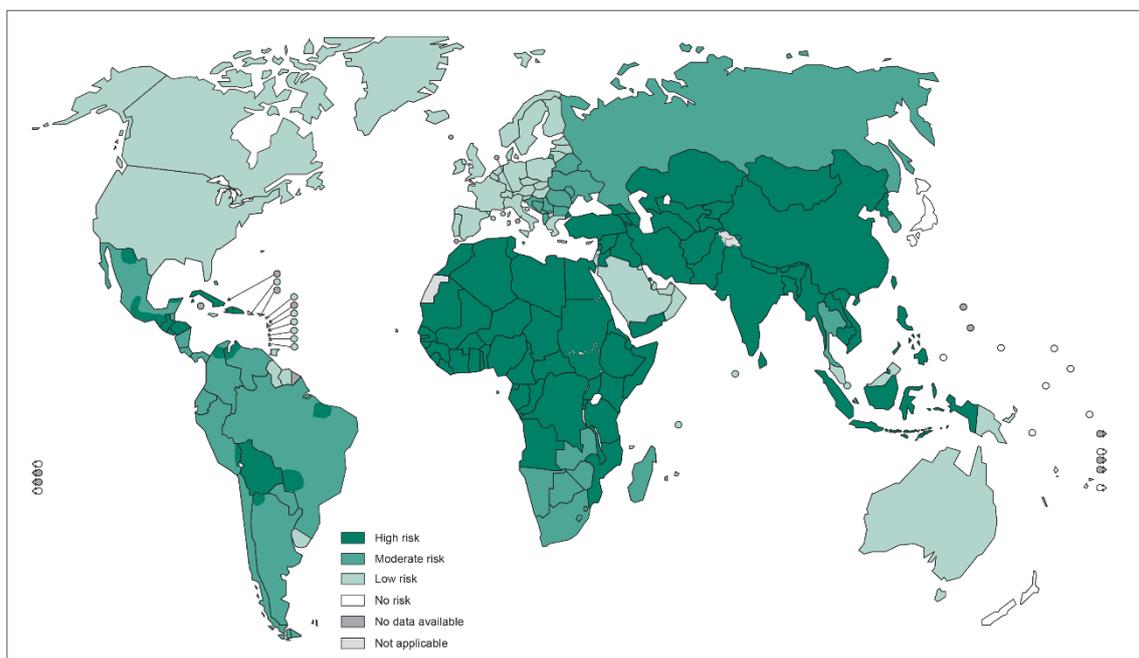
1 章 序文

1-1 狂犬病

狂犬病は狂犬病ウイルス (RABV, rabies virus) によって引き起こされる人獣共通感染症である¹。ヒトを含めた全ての哺乳動物が感染し、致死的な神経症状を引き起こすといった特徴が見られる。特にイヌが主要な感染媒介動物であるが、キツネ、アライグマやコウモリといった野生動物によっても感染が媒介される。狂犬病が発症した動物は狂躁状態となり、他の個体に咬傷を加える。その唾液中には多量のウイルスが分泌されているため、咬傷口からウイルスが侵入することによって個体間の感染が成立する。また、ウイルス粒子を含んだコウモリの唾液をエアロゾルとして吸い込むことで発症する可能性についても報告がある^{2,3}。ただし、ヒトからヒトへと狂犬病が感染する危険性はほとんどなく、狂犬病患者からの臓器移植を除いて報告がない⁴。

本病を発症すると発熱、頭痛、倦怠感などの症状が見られるほか、咬傷部位の付近の疼痛や知覚異常、筋攣縮を伴う。また、脳炎症状は興奮、不安狂躁から始まり、幻覚錯乱、恐水及び恐風症状などの筋痙攣が生じ、最終的には昏睡状態から呼吸停止で死に至る。ウイルスに暴露してから発症するまでの潜伏期間は咬傷部位によって異なり、脳組織に近いほど短くなる傾向があるが一般的には 1-3 カ月である。本病を発症した際の治療法は依然として確立されておらず、発症した場合はほぼ 100%が死に至る。これまでに実験的処置法であるミルウォーキー・プロトコルによって発症後に快復した患者も数名報告されているが、その多くは成功していない^{5,6}。しかし、19 世紀にヒト用のワクチンがパスツールによって開発されて以降は、ワクチンによる暴露前予防や、ウイルス暴露後から発症までの間にワクチンや狂犬病免疫グロブリン製剤 (RIG, rabies immunoglobulin) を連続投与することで (PEP, post-exposure prophylaxis)、免疫を獲得させて本病の発症を防ぐことが可能となった⁷。それにも関わらず、日本、オーストラリアやイギリスといった一部の清浄国を除いた全世界において依然として流行が見られており (図 1-1)、世界保健機関 (WHO, World Health Organization) は狂犬病を公衆衛生上の重要な疾患であると考え、制圧すべき「顧みられない熱帯病」の一つとして挙げている。特に、アジアやアフリカを中心として年間 6 万人近くが狂犬病により亡くなっており、PEP を受けている者も 2,500 万人以上いると推定されている^{7,8}。この問題の背景には、発症後の治療法が確立されていない他に、ワクチンや RIG のコスト高 (表 1-1)、流行地域への輸送や保管期間の問題や、イヌの狂犬病の管理不足、政治的意思の欠如などによってワクチン接種率が抑制されていることがあると考えられている⁹⁻¹²。2030 年までに流行地域においてイヌを媒介としたヒト狂犬病の症例数をゼロにするという WHO の目標を達成するためにもこれらの問題を解決する必要がある。

Distribution of risk levels for humans contacting rabies, worldwide, 2013



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2014. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



図 1-1 世界における狂犬病リスクレベルの分布 (2013) Available online:

https://www.who.int/rabies/Global_distribution_risk_humans_contracting_rabies_2013.png
(accessed on 20 December 2021)

表 1-1 ブータンにおけるワクチンや RIG 接種にかかるコスト (保健省調べ)¹³

Parameters	Estimates (US\$)
患者一人当たりの暴露後接種 (x5) にかかる総費用	35.65
ERIG 注射剤一回分の費用	19.48
HRIG 注射剤一回分の費用	397.76
患者一人当たりの総費用	
ワクチン及び ERIG 一回分の合計費用	55.13
ワクチン及び HRIG 一回分の合計費用	433.31

1-2 狂犬病ウイルス

狂犬病ウイルス (RABV, rabies virus) はラブドウイルス科リッサウイルス属に属し、全長約 12 kbp のマイナス鎖一本鎖 RNA をもつ RNA ウイルスである。リッサウイルス属は 7 つの遺伝子型があり、RABV は遺伝子型 1 に分類される。遺伝子型 2-7 のリッサウイルスについても多くはコウモリから分離されており、狂犬病と同様の症状を引き起こすことが知られている^{14,15}。

ウイルス粒子は長径 180 nm、短径 75 nm の弾丸型構造をしており、Nucleo- (N) protein, RNA polymerase component (L), matrix (M) protein, phospho- (P) protein, glyco- (G) protein の 5 つの構造タンパク質から構成されている (図 1-2)^{16,17}。その構造は大きくエンベロープとヌクレオカプシドに区別され、エンベロープは宿主細胞由来の脂質膜表面に G タンパク質が、膜内に M タンパク質が局在して形成されている。G タンパク質は宿主細胞受容体との結合や pH 依存的な膜融合といったウイルスの侵入機構に関与しており、M タンパク質は子孫ウイルスの出芽や弾丸型構造の粒子形成に重要な役割を担っている。一方でヌクレオカプシドは RNA ゲノムとそれを包み込む N タンパク、P タンパク質と L タンパク質から構成される。N タンパク質は螺旋状のヌクレオカプシドとして機能し、リボ核タンパク質 (ribonucleoprotein, RNP) を形成する。L タンパク質は P タンパク質の制御の元で RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能し RNA の転写・複製を担っている。

感染細胞における RABV の生活環を端的に示すと、RNA ゲノムの細胞への送達、ウイルス構成要素の産生、複製したウイルス粒子の放出 3 つの段階に大きく分けることができる。最初に、G タンパク質によって宿主細胞膜に付着したウイルス粒子はクラスリンを介したエンドサイトーシス経路を経て細胞内へと侵入する¹⁸。初期エンドソームの低 pH 環境は G タンパク質の構造変化を誘導し、その結果エンベロープとエンドソーム膜の融合が促進される¹⁹。その後 RNP が細胞質へと放出されることで 5 つの構造遺伝子の転写や RNA ゲノムの複製が開始し、最終的に形成されたウイルス粒子が細胞外へと出芽する (図 1-3)。これによって新しく感染が開始され、創傷部位のウイルスは筋組織から末梢神経へと伝播していく。末梢神経へ感染した RABV はウイルス粒子あるいはヌクレオカプシドとして、ダイニンモーターを介した逆行性軸索輸送によって中枢神経系 (central nervous system, CNS) へと到達し²⁰⁻²³、ウイルス性脳炎を誘導するとともに神経症状を引き起こす (図 1-4)。一方で感染末期になると RABV は順行性に軸索輸送され、唾液腺を含む全身局所に移動し、唾液中にウイルスが分泌されるようになる。これらの創傷感染の成立からウイルス性脳炎の発症までの全てのステップが狂犬病ウイルスの病原性に密接に関わっていると考えられているが、その制御は非常に複雑であり詳細は未解明な点も多い。

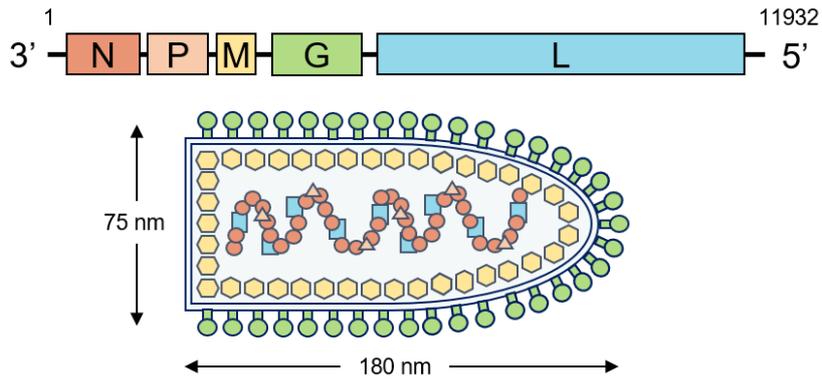


図 1-2 狂犬病ウイルスのゲノム構造及び粒子の模式図

狂犬病ウイルスは長径 180 nm、短径 75 nm ほどの弾丸型の形状を取る。ゲノムは約 12,000 b 前後の長さのマイナス鎖一本鎖 RNA であり、5つの構造タンパク質 (N, P, M, G, L) をコードしている。

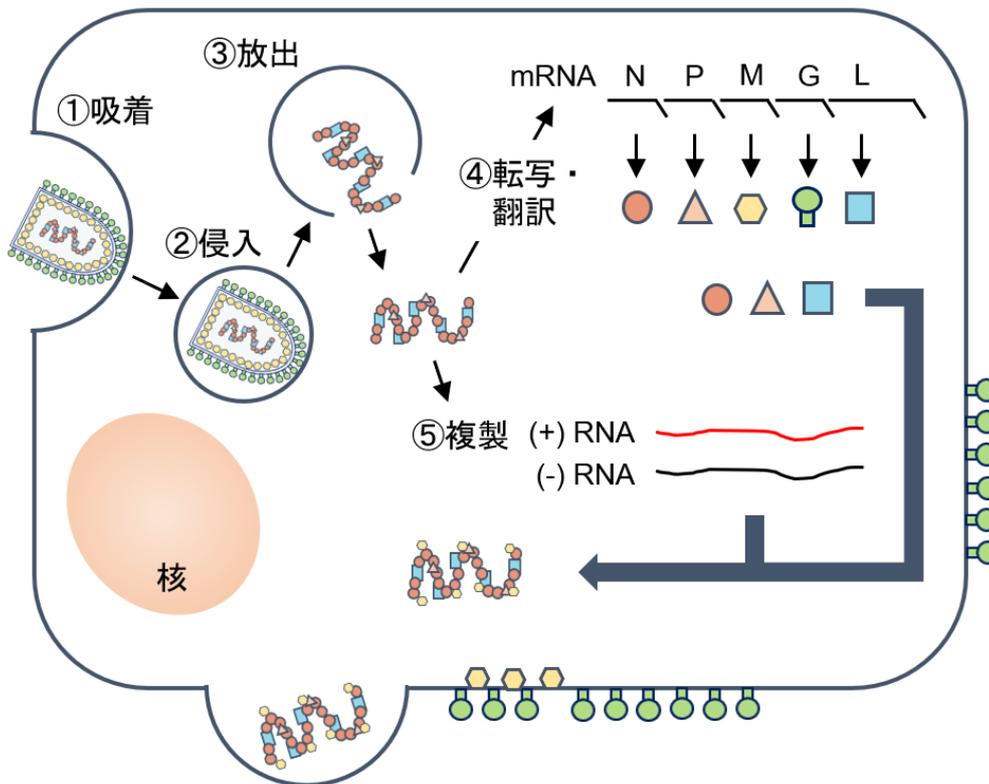


図 1-3 狂犬病ウイルスの生活環

RABV は G タンパク質を介して宿主細胞膜へと吸着し (step 1)、エンドサイトーシス経路を経て細胞内へと侵入する (step 2)。初期エンドソームの低 pH 環境によって G タンパク質の構造変化が生じ、膜融合が誘導された後に細胞質へ RNP が放出される (step 3)。その後、個々の遺伝子の転写、翻訳や (step 4)、ゲノムの複製 (step 5) が進行し、細胞質内にウイルスタンパク質及びゲノム RNA が十分に蓄積すると成熟ウイルス粒子が形成され、細胞外へと出芽する。

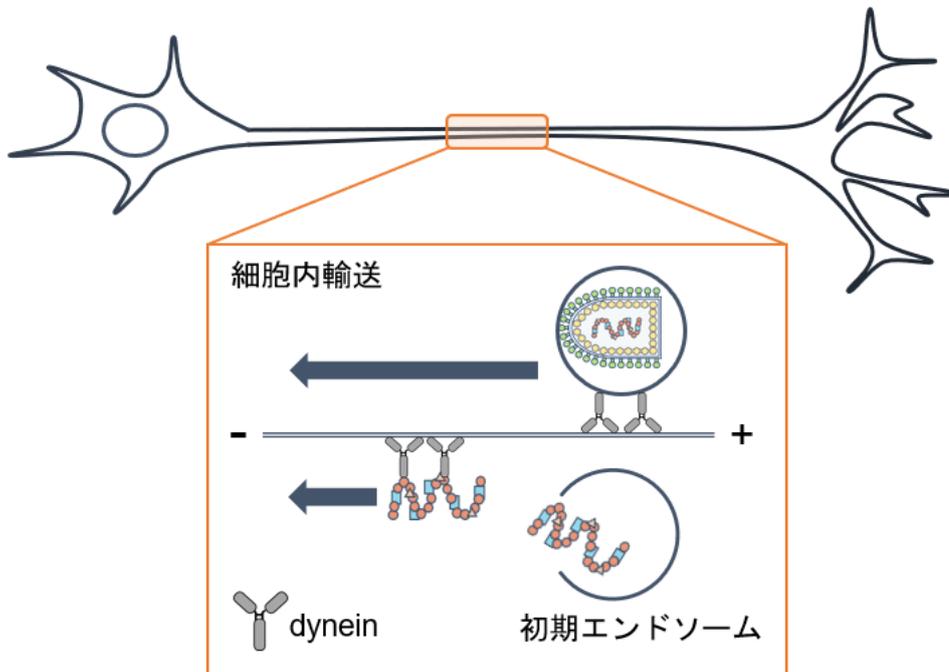


図 1-4 狂犬病ウイルスの細胞内輸送モデル

逆行性軸索輸送にはダイニンモーターが関与しており、エンドソームに内包されたウイルス粒子、あるいは膜融合後に細胞質へと放出されたヌクレオカプシドが単独で輸送されることが考えられている。

1-3 狂犬病ウイルス糖タンパク質

1-3-1 狂犬病ウイルス糖タンパク質の病原性

本研究で着目している狂犬病ウイルスの G タンパク質 (rabies virus glycoprotein, RABVG) はエンベロープ膜表面に発現するホモ三量体タンパク質であり、クラス III の膜融合タンパク質に分類される²⁴。クラス I の膜融合タンパク質のような宿主細胞由来のプロテアーゼによる開裂を受けず、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)、低親和性神経成長因子受容体 (low affinity nerve growth factor receptor, p75NTR) や神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) をはじめとした複数の宿主細胞受容体²⁵⁻²⁸ と結合した後、エンドソーム内の酸性 pH 依存的な構造変化によって膜融合を誘導することでウイルス感染を成立させている²⁹。宿主細胞受容体との結合はウイルスの生活環における最初のステップであり、狂犬病ウイルスの病原性にも密接に関わっていることから病原性決定因子の同定に関する研究も多数行われてきた。1983 年には Dietzschold らが、強毒の固定株である CVS 株や ERA 株は RABVG の 333 位にアルギニンあるいはリジン残基を持つことで強毒性を示していることを明らかにした³⁰。その後、333 位の弱毒型変異株では神経細胞への吸着や侵入、細胞間伝播の効率が固定株より劣っていることが示された³¹。しかし、RABVG の 333 位が唯一の病原性決定因子ではないことが明らかとなっており、他にも 37, 194, 242/255/268, 349 位などの複数のアミノ酸残基が病原性に関与していることが示されている³²⁻³⁶。他にも、感染細胞における RABVG の発現量が神経細胞のアポトーシス、CNS における炎症性病変や RABV に対する免疫誘導と逆相関していることが報告されている^{37,38}。RABVG を過剰発現するような組換え RABV を感染させた神経細胞は、感染細胞における RABVG の発現量上昇に並行して細胞死が著しく増加しており、アクチンフィラメントの脱重合や TUNEL 陽性細胞の増加といったアポトーシスに特徴的な現象が見られた³⁷。しかしどのような機構でアポトーシスを誘導しているのかは明らかとなっておらず、RABVG の発現がある閾値を超えると細胞膜への障害が生じ、その結果アポトーシスを誘導するようなタンパク質が活性化されると推測されている。

1-3-2 狂犬病ウイルス糖タンパク質を標的とした中和抗体

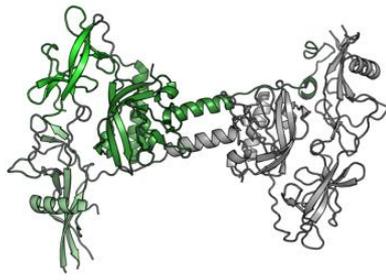
また、RABVG はエンベロープ膜表面に唯一発現するタンパク質であることから、中和抗体の標的としても注目されている。1-1 にて述べた通り、狂犬病の発症は不活化ワクチンと RIG を併用することで予防されている。現在主に使用されている RIG は human RIG (HRIG) と equine RIG (ERIG) であるが、それぞれ使用するにあたり次のような問題が懸念されている^{13,39}。例えば、HRIG は ERIG と比較して価格が 10 倍以上であり、狂犬病死亡率の大半を占めているアフリカやアジアの貧困地域では手が届かない価格となっている (表 1-1)。一方で ERIG は価格こそ

安いものの、血清を製造するためにウマを使用することに倫理的問題があることや、ERIG 生産者が市場から続々と撤退しているために供給不足が生じている⁴⁰。また、RIG 全体の問題として保存期間が短いことやポリクローナルな性質であることも挙げられる。従って、これらの RIG に代わる、RABVG を標的としたモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) の探索研究が進められており、2018年には mAb を使用することを推奨するといった声明が WHO によって出された^{10,41}。現在までに合計 5 つの mAb 製品が臨床試験に到達しており、そのほとんどが複数の RABV 株に対して中和能を持つような抗体カクテルである⁴²⁻⁴⁴。

1-3-3 狂犬病ウイルス糖タンパク質の立体構造

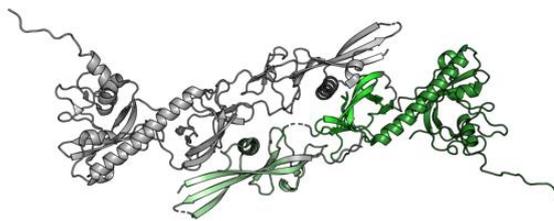
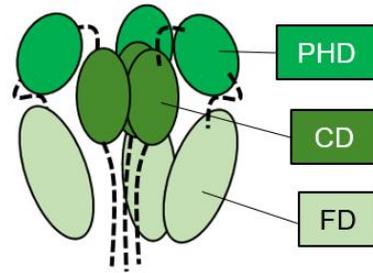
このように RABVG は狂犬病において重要な病原性決定因子であることから創薬標的として注目されてきたが、長年その立体構造に関する詳細な情報は得られていなかった。しかし、近年 X 線結晶構造解析によって膜融合前後の RABVG 単量体構造が明らかとなった⁴⁵。RABVG は CD (central domain), FD (fusion domain), PHD (pleckstrin homology domain) の 3 つのドメインから形成され、pH8.0 の塩基性条件では CD が PHD/FD 接合領域に被さるように折り返されたヘアピン構造を形成しており、pH6.5 の酸性条件では 3 つのドメインが直線状に配置された細長い構造を形成していることが明らかとなった (図 1-5 A)。それぞれの条件における各ドメインの位置関係は、RABV と同じラブドウイルス科のウイルスである水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus, VSV) の糖タンパク質 (VSV-G)^{46,47} から想定される三量体モデル構造と一致していた (図 1-5 A)。宿主細胞受容体と結合した RABVG は初期エンドソーム内の酸性条件によって構造変化を引き起こし、FD 先端が宿主細胞膜へ接触する。その後、宿主細胞と RABV の二つの膜を手繰り寄せるように RABVG が折りたたまれることで膜融合が成立すると考えられている (図 1-5 B)⁴⁸。しかし、同じラブドウイルス科の糖タンパク質であるが VSV-G では膜融合前、膜融合後の両方の構造で C 末端部位が FD 近傍に向かって沿うように伸びている一方で、RABVG では FD から離れて伸ばしているといった差が見られた (図 1-5 C)。これは得られた RABVG が二量体を非対称単位として結晶パッキングが行われていたためであり、生理的条件下で見られる三量体構造²⁴ でなかったためと考えられる (図 1-5 A)。

A



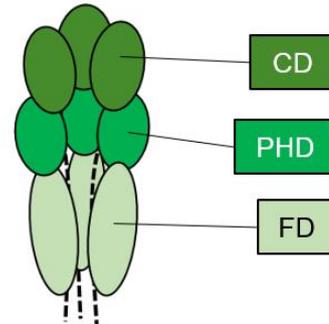
RABVG (塩基性条件, pH8.0)
PDB ID: 6LGX

三量体モデル構造 (塩基性条件)

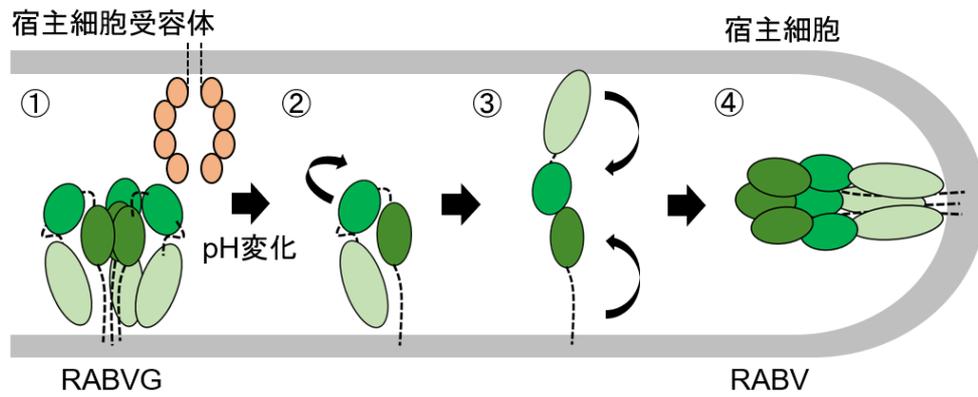


RABVG (酸性条件, pH6.5)
PDB ID: 6LGW

三量体モデル構造 (酸性条件)



B



C

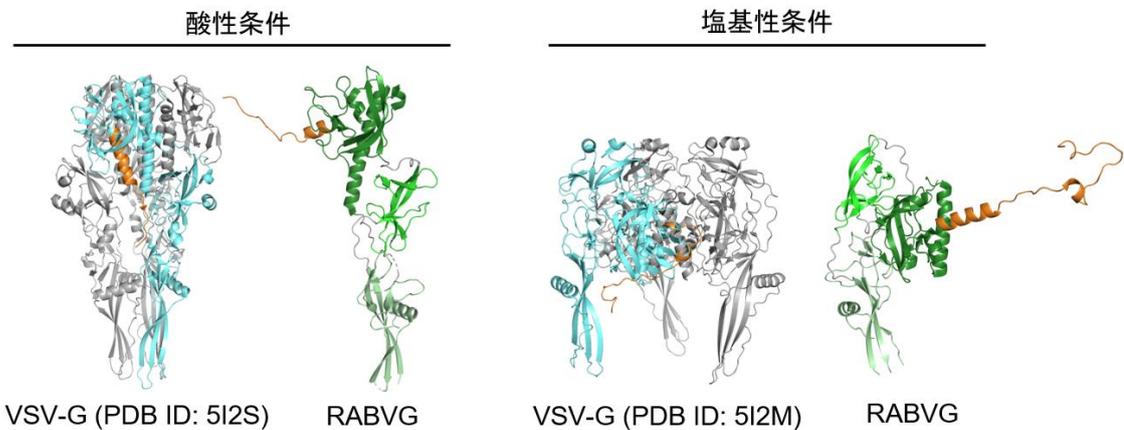


図 1-5 ラブドウイルス科の糖タンパク質の立体構造

(A) 塩基性条件 (pH8.0) 及び酸性条件 (pH6.5) における RABVG 単量体の結晶構造 (PDB ID: 6LGX, 6LGW)。塩基性条件ではヘアピン構造を、酸性条件では直線状構造を形成している。

(B) RABVG による宿主細胞との膜融合の模式図。宿主細胞受容体と結合した RABVG は (step1)、初期エンドソーム内の酸性条件によって構造変化を引き起こし、FD を宿主細胞膜へと接触させる (step2)。その後、RABVG は二つの膜を手繰り寄せるように折りたたまれ (step3)、膜融合が成立する (step4)。

(C) 塩基性条件及び酸性条件での VSV-G (PDB ID: 5I2S, 5I2M) と RABVG の構造の比較。VSV-G では膜融合前後の構造で C 末端部位 (橙色) が FD 近傍に向かって沿うように伸びている一方で、RABVG では FD から離れて伸ばしている。

1-4 研究目的

上述の通り、RABVG は狂犬病の発症において重要な役割を担っていることから創薬標的として注目されており、RIG に代わる中和抗体の開発や立体構造の決定が多数行われてきた。しかし、現在得られている構造情報は二量体を非対称単位とした結晶構造や一部のドメイン構造のみである^{45,49}。宿主細胞受容体との結合を阻害するような分子の設計などに一部使用できる可能性はあるが、膜融合及びその前後の構造変化においては三量体を機能単位としている。従って、RABVG による膜融合やその構造変化を標的とした創薬や、より安全で効果的なワクチンの開発を行うには、エンベロープ膜表面において形成されている三量体構造や溶液中での構造動態といった生理的条件下での構造特性について明らかにする必要がある。そこで本研究では RABVG を三量体として調製し、RABVG 単体や中和抗体との複合体の構造解析を行うことで中和抗体の結合様式や RABVG の生理的条件下での構造特性の解析を目指した。

2 章 材料と方法

2-1 組換え RABVG の調製

組換え RABVG (rRABVG) は Bac-to-Bac/BmNPV バキュロウイルス発現系を用いて三量体タンパク質として発現させた。

2-1-1 rRABVG 発現コンストラクトの作製

北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 分子病態・診断部門の澤 洋文 教授より提供して頂いた RABVG CVS-11 starin (GenBank: ADJ29911.1) を当研究室にて pFastBac1 へと組み込んだものを基に rRABVG 発現コンストラクトの作製を行った。テンプレートとなるプラスミドには RABVG CVS-11 strain の細胞外ドメイン (1-429 aa) がサブクローニングされており、N 末端にはミツバチ・メリチン由来の分泌シグナル配列を、C 末端には HRV-3C プロテアーゼ認識配列、T4 fibritin 由来の三量体形成タンパク質ドメイン foldon^{50,51}、6x His tag をそれぞれ融合発現するように付加されていた。これに加え、さらに安定なタンパク質として発現させることができるように fusion loop 1 (73-79 aa) 及び fusion loop 2 (117-125 aa) の二か所を Gly-Gly-Ser-Gly-Gly 配列に置換した。RABVG_ECD をテンプレートとして用いて、pFastBac1_F と RABVG_ECDm_FL1R, pFastBac1_R と RABVG_ECDm_FL1F のプライマーの組み合わせによって fusion loop1 に、pFastBac1_F と RABVG_ECDm_FL2R, pFastBac1_R と RABVG_ECDm_FL2F のプライマーの組み合わせによって fusion loop2 に、overlap extension PCR 法によってそれぞれ変異を導入した。PCR 反応は DNA 合成酵素 KOD Plus (TOYOBO) を用いて行い、KOD plus buffer 5 μ L、2 mM dNTPs 5 μ L、25 mM MgSO₄ 3 μ L、10 mM プライマー各 1.5 μ L、テンプレート DNA 50 ng、DMSO 2 μ L、KOD plus 0.5 μ L を超純水で 50 μ L に調製した。サーマルサイクラーを使用し 94°C で 2 分間反応後させた後、94°C で 10 秒、50°C で 30 秒、68°C で 1 分/kbp の反応を 30 サイクル繰り返し、最後に 68°C で 5 分間反応させた。得られた PCR 産物と pFastBac1 は *Nhe* I と *Xho* I で制限酵素処理を施し、アガロースゲル電気泳動によって分離した。インサートとベクターのモル比が 10:1 となるように混合した溶液と等量のライゲーション試薬 Ligation High Ver.2 (TOYOBO) を加えて 16°C で 1 時間インキュベートすることでライゲーション反応を行った。ライゲーション後のプラスミドを用いて *E. coli* DH5 α ケミカルコンピテントセルを形質転換し、LB/Amp 寒天培地に塗布した。得られたシングルコロニーをピックアップし、コロニー PCR 法によって目的遺伝子の挿入を確認した。PCR 酵素 Go Taq Green Master Mix (Promega) 4 μ L にプライマー各 0.5 μ L と超純水 3 μ L を加えた反応液にコロニーを懸濁し、95°C で 2 分間反応させた後、95°C で 30 秒、50°C で 30 秒、72°C で 1 分/kbp の反応

を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 1 分間反応させた。遺伝子導入が確認されたシングルコロニーを Amp (100 mg/ml) を含む 2xYT 培地へと植菌し、一晚振盪培養した後に QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。その後、Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて増幅させた DNA フラグメントをエタノール沈殿により精製し、Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems) を加え、シーケンサー 3130 Genetic Analyzed (Applied Biosystems) によって目的の変異が導入されていることを確認した。

2-1-2 組換えバクミドの調製

2-1-1 にて作製したドナープラスミド 1 µg を *E. coli* DH10Bac/BmNPV ケミカルコンピテントセルに添加し、30 分間氷上でインキュベートした後、42°C で 40 秒間のヒートショックを行った。5 mL の 2xYT 培地中で 1 時間、37°C で回復培養を行った後、Tetracycline (10 µg/mL) を加えて同条件で一晩振盪培養した。その後 Gentamicin (7 µg/mL) を添加し 2 時間、37°C で振盪培養した後に LB/Kan/Gen/IPTG/X-Gal 寒天培地に塗布し、ブルーホワイトセレクションを行った。得られた白コロニーをピックアップし、コロニーPCR 法によって目的遺伝子導入の有無を評価した。PCR 酵素として Go Taq® Green Master Mix (Promega) を使用し、M13 forward 及び M13 reverse のプライマーの組み合わせで増幅を行い、アガロースゲル電気泳動によって分析した。非組換えバクミドが混入しているコロニーを精製するために LB/Kan/Gen/IPTG/X-Gal 寒天培地で画線培養を行い、再度コロニーPCR 法によって遺伝子の導入を評価した。目的遺伝子の導入が見られたコロニーを選出し、2xYT/Km/Gen 培地にて一晚、37°C で振盪培養して菌体を回収した。プラスミド精製キット NucleoBond®Xtra Midi (Takara-Bio) を用いて得られた菌体から組換えバクミドを抽出及び精製した。

表 2-1 rRABVG 発現コンストラクト作製に用いたプライマー配列 (下線: 変異導入部位)

変異導入用プライマー	
pFastBac1 F	5'- CCTATAAATATTCGGATTA-3'
pFastBac1 R	5'- CAAATGTGGTATGGCTGATT-3'
RABVG_ECDm_FL1F	5'- <u>GGAGGATCTGGAGGA</u> ACCACATTCAAGAG -3'
RABVG_ECDm_FL1R	5'- <u>TCCTCCAGATCCTCC</u> GGTGTAGGTCTCTGC -3'
RABVG_ECDm_FL2F	5'- <u>GGTGGTAGTGGTGGT</u> AGAACCACCAAAGAG -3'
RABVG_ECDm_FL2R	5'- <u>ACCACCACTACCACCG</u> TATGGATTGTGTAG -3'
遺伝子導入確認用プライマー	
M13 forward	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3'
M13 reverse	5'- CAGGAAACAGCTATGA -3'

2-1-3 カイコ-バキュロウイルス発現系による rRABVG 発現

20 ng/ μ L に調製した組換えバクミド 50 μ L あたり、3 μ L の DMRIE-C (Invitrogen) を混合し、室温で 40 分間インキュベートした。五齢のカイコ幼虫 (愛媛蚕種) の腹部の節から組換えバクミド混合液を投与し、人工飼料 (日本農産工業) を与えながら 7 日間、25°C のインキュベーター (MIR-254-PJ, Panasonic) にて飼育した。カイコ幼虫の体表が黒くなりウイルスの感染が確認された後に、足に注射針付シリンジを刺して穴をあけ、体液を回収した。この時、昆虫体液に特有のメラニン化を防ぐために終濃度が 0.5% となるように 5% チオ硫酸ナトリウム水溶液を添加した。5,000g で 10 分間遠心することで細胞片を取り除いた後、さらに 40,000 g で 30 分間超遠心することで組換えウイルスを沈殿させた。これを 1 mL の PBS (-) で再懸濁し、以降は組換えバクミドの代わりに組換えウイルスを接種することで rRABVG を調製した。

2-1-4 rRABVG の精製

・ 硫酸分画

回収したカイコ体液に終濃度が 1x PBS (-) となるように 10x PBS (-) を添加したのち、30% 飽和硫酸度となるように飽和硫酸アンモニウム水溶液を 4°C の条件下で攪拌しながら滴下した。更に 4°C で 1 時間攪拌した後に 8,000 g で 10 分間遠心することで沈殿を回収した。沈殿させたタンパク質はカイコ 50 頭分あたり 200 mL の Resuspension buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl) で再懸濁し、Millex-GV (0.22 μ m, PVDF, Millipore) でフィルター濾過した。

・ Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィー

Resuspension buffer で平衡化を行った HisTrap FF 5 mL (GE Healthcare) に、ペリスタルティックポンプ (ATTO) を用いてタンパク質溶液を送液し、Resuspension buffer でカラムの洗浄を行った後に、液体クロマトグラフィーシステム AKTA pure (GE Healthcare) で精製した。A Buffer として 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl を、B Buffer として 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole を用い、ステップワイズ溶出とグラジエント溶出を組み合わせて精製した。rRABVG の凝集を抑制するために精製後の溶出画分に終濃度 1% となるように CHAPS を添加した。溶出したタンパク質は 12.5% のアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で展開し、CBB 染色及びウエスタンブロッティングによって検出した。

・ ゲル濾過クロマトグラフィー

Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーの溶出画分を回収し、Amicon® Ultra-15 50K (Millipore) で 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl にバッファー置換及び限外濾過濃縮した。AKTA pure でゲル濾過クロマトグラフィーカラム Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) を

用いて精製した。Running buffer として 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl を使用して、0.5 mL 画分で溶出した。溶出したタンパク質は SDS-PAGE で展開し、CBB 染色及びウエスタンブロットティングによって精製度を評価した。

・ SDS-PAGE、ウエスタンブロットティング

泳動サンプルはタンパク質溶液 12 μ L に対して 3 μ L の 5x sample buffer を加え、94°C で 2 分間加熱することで調製した。還元条件にて泳動する際は 2-mercaptethanol を 5x sample buffer に 10% (v/v) となるように添加した。セミドライブロットティング装置に Transfer buffer に浸した濾紙、PVDF 膜、ゲル、濾紙の順番に重層し、150 mA で 45 分間転写した。その後、5%スキムミルク-PBST 10 mL を加えて 1 時間振盪させ、ブロッキングを行った。PBST で PVDF 膜を洗浄後、終濃度 0.4 μ g/mL となるように調製した HisProbe-HRP Conjugate (Thermo Fisher Scientific) を添加し、1 時間振盪させた。再度 PBST で PVDF 膜を洗浄後、ECL prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) で基質反応を行い、ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) あるいは Amersham ImageQuant 800 (GE Healthcare) で検出した。

2-2 中和抗体断片の調製

本研究では Fab 断片と scFv の 2 つの中和抗体断片をそれぞれ調製した。Fab 断片は共同研究先の岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 人獣共通感染症学研究室の伊藤 直人 教授より提供して頂いた全長抗体から調製し、scFv は大腸菌発現系を用いて発現させた。

2-2-1 Fab 断片の調製

・ 硫安分画

ハイブリドーマを腹腔注射したマウスから採取した腹水に終濃度が 1x PBS (-) となるように 10x PBS (-) を添加し、さらに 1x PBS (-) を加えて容量を 10 mL とした。50%飽和度となるように飽和硫酸アンモニウム水溶液を 4°C の条件下で攪拌しながら滴下し、1 時間転倒攪拌した後に 8,000 g で 10 分間遠心することで沈殿を回収した。沈殿させたタンパク質は Binding buffer (20 mM sodium phosphate pH7.0) に再懸濁し、Millex-GV (0.22 μ m, PVDF) で濾過した。

・ Protein G アフィニティークロマトグラフィー

Binding buffer で平衡化した Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) を用いてバッチ法によって精製した。担体 1 mL と抗体溶液を 50 mL チューブ に加え、Binding buffer で全量を 40 mL とした。4°C で一晩転倒混和した後、内容物をエコノパックカラム (Bio-Rad) に流

し、担体を 10 mL の Binding buffer で洗浄した。その後 10 mL の Elution buffer (100 mM glycine-HCl pH2.7) で抗体を溶出させ、溶出画分は 2 mL の Neutralization buffer (1M Tris-HCl pH9.0) で中和した。

・パパイン消化

Protein G アフィニティクロマトグラフィーで得られた溶出画分を Amicon® Ultra-4 10K (Millipore) を用いて Sample buffer (20 mM sodium phosphate pH7.0, 10 mM EDTA) にバッファー置換し、濃度が 20 mg/mL となるまで限外濾過濃縮した。濃縮した全長抗体 0.5 mL に対して等量の Digestion buffer (20 mM sodium phosphate pH7.0, 10 mM EDTA, 20 mM Cystein) を加えた後に、同様のバッファーで置換した 0.5 mL の Immobilized papain (Thermo Fisher Scientific) と混合して 15 mL チューブへと移した。37°C、200 rpm の条件下で一晩振盪させ消化反応を行った後、内容物を全てエコノパックカラムへと流し、Wash buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5) でビーズを洗浄することで消化物と immobilized papain を分離した。Digestion buffer に含まれるシステインを除くために透析膜 Spectra/Por7 (MWCO: 10,000 Da, Spectrum Laboratories) を用いて、Binding buffer (20 mM sodium phosphate pH7.0) へと一晩かけてバッファー置換を行った。

・Protein A アフィニティクロマトグラフィー

Binding buffer で平衡化した r Protein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) を用いてバッチ法によって精製した。担体 1 mL と抗体溶液を 50 mL チューブに加え、Binding buffer で全量を 40 mL とした。4°C で一晩転倒混和した後、内容物をエコノパックカラムに流し、担体を 10 mL の Binding buffer で洗浄した。その後 10 mL の Elution buffer (100 mM sodium citrate-NaOH pH3.0) で溶出し、溶出画分は 2 mL の Neutralization buffer (1M Tris-HCl pH9.0) で中和した。各精製ステップの洗浄及び溶出画分は SDS-PAGE で展開し、CBB 染色で検出することで精製や消化の評価を行った。

・イオン交換クロマトグラフィー

Protein A アフィニティクロマトグラフィー後の溶出画分を Amicon® Ultra-4 10K を用いて、20 mM Tris-HCl pH9.0 あるいは 20 mM sodium citrate pH5.2 へとバッファー置換した。陰イオン交換クロマトグラフィーでは Resource Q 1 mL (GE Healthcare) を AKTA pure へ接続して精製した。A buffer として 20 mM Tris-HCl pH9.0 を、B buffer として 20 mM Tris-HCl pH9.0, 1 M NaCl を使用し、グラジエント溶出により精製した。一方で陽イオン交換クロマトグラフィーでは Resource S 1 mL (GE Healthcare) を AKTA pure へ接続して精製した。A buffer は 20 mM sodium citrate pH5.2 を、B buffer には 20 mM sodium citrate pH5.2, 1 M NaCl を使用し、

同様に塩濃度のグラジエントで溶出した。溶出画分は SDS-PAGE で展開し、CBB 染色で検出することで精製度を評価した。

2-2-2 大腸菌発現系による scFv の調製

・ scFv 封入体の調製

pET-22b(+) ベクターに scFv の配列がサブクローニングされたプラスミドで *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL を形質転換し、LB/Amp 寒天培地へ塗布した後、37°C で一晩培養した。得られたコロニーのうち 10 個を釣菌し、Ampicillin (100 µg/mL) を添加した 2xYT 培地 10 mL へ植菌し、37°C, 150 rpm で 2 時間前培養を行った。その後全量を Ampicillin (100 µg/mL) を添加した 2xYT 培地 1L へと植え継ぎ、OD₆₀₀ = 0.5 となるまでさらに振盪培養を行った。目的の OD₆₀₀ に到達したところで終濃度 1 mM となるように 1 M IPTG を添加し、37°C, 150 rpm で 4 時間振盪培養することで scFv の発現を誘導した。培養後、菌液を回収し 5,000 g で 10 分間遠心することで大腸菌を回収した。沈殿した菌体は Resuspension buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl) で再懸濁し、SONIFIER 450 (Branson) を用いて、output control 5, duty cycle 40% の設定で 30 分間冷却しながら超音波破碎を行った。破碎後の菌液を 8,000 rpm で 5 分間遠心することで得られた沈殿は Triton buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) で洗浄する操作を 3 回行った。その後、Triton X-100 を除くために Resuspension buffer による洗浄操作を更に 3 回行った。沈殿として得られた封入体は Guanidine buffer (6 M Guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) を加え、一晩 4°C で転倒混和することで可溶化した。

・ 希釈法による巻き戻し

濃度が 5 mg/mL となるように Guanidine buffer を加えて希釈した封入体に 1 M DTT を終濃度 10 mM となるように添加し、室温で 1 時間インキュベートし還元処理を行った。グアニジン濃度が 1.5 M となるように 4°C に冷却した Refolding buffer (100 mM Tris-HCl pH8.0, 400 mM L-Arginine, 2 mM EDTA, 3.73 mM Cystamine, 6.73 mM Cysteamine) を攪拌しながら封入体へと滴下した。続いて希釈した封入体溶液を終濃度が 1 µM となるように大容量の Refolding buffer へと一滴ずつ滴下し、4°C で 3 日間緩やかに攪拌した。

・ ゲル濾過クロマトグラフィー

巻き戻し溶液を Vivaflow 50 (10,000 Da MWCO, Satorius) と Amicon® Ultra-15 10K を用いて限外濾過濃縮及び Running buffer (50 mM MES pH6.0, 500 mM NaCl) へのバッファー置換を行った。濃縮した scFv は AKTA prime あるいは AKTA purifier (GE Healthcare) でゲル濾過クロマトグラフィーカラム HiLoad 26/600 Superdex 75 column (GE Healthcare) を用いて精製

した。溶出したタンパク質は SDS-PAGE で展開し、CBB 染色によって精製度を評価した。

2-3 Biolayer interferometry 法による相互作用解析

rRABVG の速度論的解析は BLItz (ForteBio) を用いた biolayer interferometry (BLI) 法によって行った。測定は advanced kinetics mode の設定で、サンプルチューブの振動速度を 1,000 rpm、室温の条件にて実施した。センサーは Ni-NTA (NTA) Biosensor (ForteBio) を使い、Running buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl) で 10 分間親水化を行った後に、0.1 mg/mL rRABVG, 4 μ L に 120 秒間浸すことでリガンドの固定化を行った。余分な rRABVG は Running buffer で洗浄することで取り除き、同様のバッファーで段階希釈した 4 μ L の抗体断片溶液に浸すことで結合の評価を行い、その後 Running buffer へ浸すことで解離を測定した。センサーの再生は 100 mM glycine pH2.7 で洗浄しリガンドを解離させた後、0.1 M NiSO₄ 溶液に浸すことで行った。また、ベースラインドリフトの影響を除くために、結合ステップにおいて抗体断片溶液の代わりに Running buffer を用いたリファレンスランの結果を差し引いて解析を行った。得られたレスポンスに対して BLItz Pro version1.2.1.3 を使い、1:1 結合モデルでのカーブフィッティングを行うことで解離定数 (K_D)、結合速度定数 (k_{on})、解離速度定数 (k_{off}) を算出した。

2-4 DSF 法による熱安定性の評価

Fab 断片及び scFv の熱安定性は示差走査蛍光定量法 (differential scanning fluorometry, DSF) によって評価した。Running buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl) を用いて 2 μ M に調製した抗体断片溶液 30 μ L に、31.25 倍希釈した SYPRO orange (Invitrogen) 2 μ L を加えて混合後、Hard-shell 96-well PCR plates (HSP9655, Bio-Rad) に分注した。CFX96 Touch qPCR System (Bio-Rad) を用いて、測定範囲 20-90°C、温度変化速度 0.5°C/30 sec の設定で測定を行った。蛍光は HEX channel によって検出し、得られたデータは Bio-Rad CFX manager ver2.1 を用いて解析を行った。各抗体断片の T_m 値は蛍光強度を温度で微分した曲線の極小値から算出した。

2-5 負染色法による構造観察

rRABVG 並びに rRABVG-Fab 断片複合体について、構造や粒子の均一性、単分散性を評価するために透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope, TEM) による構造観察を行った。

2-5-1 測定サンプルの調製

グリッドはエクセルサポートフィルム (日新 EM) を使用した。イオンスパッタ装置 (E-1045, 日立ハイテクノロジーズ) を用いて、5 mA で 180 秒間の条件でグリッド表面を親水化した。サンプルは 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl あるいは 20 mM sodium citrate pH4.0, 150 mM NaCl のバッファーで 0.1 mg/mL の濃度に調製した。グリッド表面に調製したサンプル 10 μ L を滴下し、1 分間インキュベートすることでカーボン膜へ吸着させた。グリッド表面を完全に乾燥させないように余剰なサンプルを濾紙で吸い取り、20 μ L の超純水での洗浄を 2 回行った。その後、パラフィルム上に作った 20 μ L の 1% 酢酸ウランあるいは 1% モリブデン酸アンモニウムの水滴に、グリッド表面を上から被せるように接触させることで染色を行った。余剰な染色液を濾紙で吸い取った後、同様の手順で二度目の染色を行い、30 分以上乾燥させた後に透過型電子顕微鏡による観察を行った。

2-5-2 透過型電子顕微鏡による観察

観察は透過型電子顕微鏡 (H-7650, 日立ハイテクノロジーズ) を用いて、加速電圧 80 kV で実施した。TEM 画像は 20,000 x から 25,000 x の倍率で記録した。

2-6 クライオ電子顕微鏡による構造解析

透過型電子顕微鏡による構造観察によって粒子の均一性及び単分散性が十分高いことが示されたサンプルに関して、より高分解能の画像を取得するために、クライオ電子顕微鏡による構造観察及び単粒子解析を行った。

2-6-1 グリッドの作製

グリッドは Quantifoil R1.2/1.3 Cu300 を使用した。プラズマイオンボンバーダ (PIB-10, 真空デバイス) を HARD に設定し 90 秒間運転し、グリッド両面の親水化処理を行った。サンプルは 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 4 mM CHAPSO のバッファーで 0.30 mg/mL に調製し、

3 μL をグリッドに載せた。余剰なサンプルは Vitrobot (Thermo Fisher Scientific) に Whatman 定性濾紙グレード 1 を装着し、blotting force 5、blotting time 15 秒でブロットングすることで除き、液体エタンで瞬間凍結させた。その後、液体窒素中でオートグリッドを作製し、クライオ電子顕微鏡による構造観察に用いた。

2-6-2 クライオ電子顕微鏡による構造観察

観察は Glacios (Thermo Fisher Scientific) にカメラとして Falcon3 EC を搭載し、加速電圧 200 kV、倍率 92,000 x で実施した。詳細な観察条件は以下に示すとおりである (表 2-2)。

表 2-2 Glacios による観察条件

Mode	Linear
Dose	46.46 e/Å
Measure	27.03 e/px/s 20.93 e/Å/s
Exposure time	2.22 s
Fractions	44 Nr
Frames	88 Nr
Defocus	-2.0, -2.5, -3.0, -3.5 μm

2-7 高速原子間力顕微鏡による動態解析

2-7-1 高速原子間力顕微鏡による rRABVG の観察

高速原子間力顕微鏡 (high-speed atomic force microscope, HS-AFM) による測定は nano explorer high-speed atomic force microscope (SS-NEX, RIBM) 及び module system nano explorer high-speed atomic force microscope (MS-NEX, RIBM) を用いた。カンチレバーは BL-AC10DS-A2、BL-AC10FS-A2 (Olympus) あるいは、USC-F1.2-k0.15 (NanoWorld) を使用し (表 2-3)、タッピングモードにて動作させた。カンチレバーの湾曲は赤外線レーザー (0.5 mW) を用いた光ビーム偏光検出器で検出した。出力された赤外線レーザーは対物レンズを通して金膜で被覆されたカンチレバー裏面に集光され、その反射光は 2 分割フォトディテクターによって検出した。HS-AFM のフィードバック制御のための振幅は自由振動振幅の 80% に設定した。ガラス台の上に固定化したマイカ基板を劈開し、5-10 ng/ μL に調製したサンプル 2 μL を乗せ、湿潤環境下で 5 分間インキュベートすることでマイカ基板へと吸着させた。基板へ吸着しなかった余剰なサンプルは観察用バッファーである 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl、あるいは 20 mM MES-NaOH pH6.0, 150 mM NaCl で洗浄することで取り除いた。その後、マイカ表面を観

察用バッファに浸漬させ、室温にて観察を行った。画像は 250x250 nm², 200x200 nm²あるいは 100x100 nm²の観察範囲を 200x200 pixels でスキャン速度 0.5 frame/sec で取得した。

表 2-3 本研究にて用いた各カンチレバーの仕様

カンチレバー	共振周波数 (kHz)	バネ定数 (N/m)	先端曲率半径 (nm)
BL-AC10DS-A2	1500	0.1	24
BL-AC10FS-A2	1500	0.1	7
USC-F1.2-k0.15	1200	0.15	< 10

2-7-2 画像解析

本研究で得られた全ての HS-AFM 画像は IGOR Pro (Ver. 6.3.7.2) あるいは ImageJ (Ver. 1.53f51) を用いて解析を行った。初めに、xy 平面全体を平坦にするために IGOR Pro にて画像出力時に傾斜補正を行い、以降は ImageJ を用いて解析を進めた。まず、 $\sigma=2.0$ でガウシアンフィルターを適用し、スパイクノイズを除去した。その後、画像を 8-bit 化した後に二値化させ、白黒画像を得た。得られた白黒の粒子画像を分水嶺によって分離させ、各要素の質量中心を算出した。最後に各要素の X 座標、Y 座標から二点間距離を算出し、これを鎖間距離 (D_{cc}) とした。

粒子の軌道については ImageJ に内蔵されているプラグインである TrackMate を用いて算出した。8-bit 化した画像に LoG (Laplacian of Gaussian) フィルターを適用し、半径 3.5 nm、閾値 0.01-0.05 の設定で粒子を検出した。

3 章 結果

3-1 組換え RABVG の調製

X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡による構造観察を行うには大量のサンプルを必要とする^{52,53}。タンパク質発現系で広く使用されているのは大腸菌発現系や哺乳動物細胞発現系、昆虫細胞発現系などである。このうち、スケールアップが容易で最も大量発現に向いている系は大腸菌発現系である。しかし、RABVGをはじめとしたマルチドメインの糖タンパク質は不溶性の封入体として発現し、希釈法や透析法による巻き戻しも困難である。また、翻訳後修飾も受けられないため機能的なタンパク質として調製することができない。哺乳動物細胞発現系は活性を持ったタンパク質を調製することができる可能性が最も高いが、細胞の維持や遺伝子導入にかかるコストが高く、タンパク質発現量が低いといった問題がある。一方で、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞発現系は、糖鎖修飾、脂質付加、リン酸化などといった哺乳動物細胞発現系に近い翻訳後修飾が行われ、強力なプロモーターの下流で目的タンパク質を発現させるために発現量も比較的多いことが知られている。また、バキュロウイルスは脊椎動物には感染しないため、安全性が高いといった利点もある。バキュロウイルス発現系には昆虫細胞とカイコを使用するものがあるが、本研究ではウイルス力価を増強するための細胞培養を必要としないカイコバキュロウイルス発現系⁵⁴を用いて rRABVG 調製系を構築した。

3-1-1 rRABVG 発現コンストラクトの作製

組換えバクミドの作製には、北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 分子病態・診断部門の澤洋文教授より提供して頂いたドナープラスミド pFastBac1 を用いた。RABV の固定毒の一つである CVS-11 株の RABVG 細胞外ドメインがポリヘドリンプロモーターの下流にサブクロニングされており、全長配列において膜貫通領域が位置していたところに三量体形成ドメインの foldon 配列を付加することで三量体タンパク質として発現させている。N 末端にミツバチ・メリチン由来のシグナル配列を付加することで rRABVG をカイコ体液中に分泌発現させ、C 末端に付加した 6x His tag によって、Ni²⁺アフィニティクロマトグラフィーによる精製、ウエスタンブロッティングでの検出と相互作用解析でのセンサーへの固定化を可能としている。これらに加えて本研究では、既報を参考にエンベロープ膜近傍に位置する fusion loop 1 (73-79 aa) 及び fusion loop 2 (117-125 aa) に Gly-Gly-Ser-Gly-Gly 変異を導入し、rRABVG 三量体の性状の安定化を図った⁴⁵ (図 3-1)。

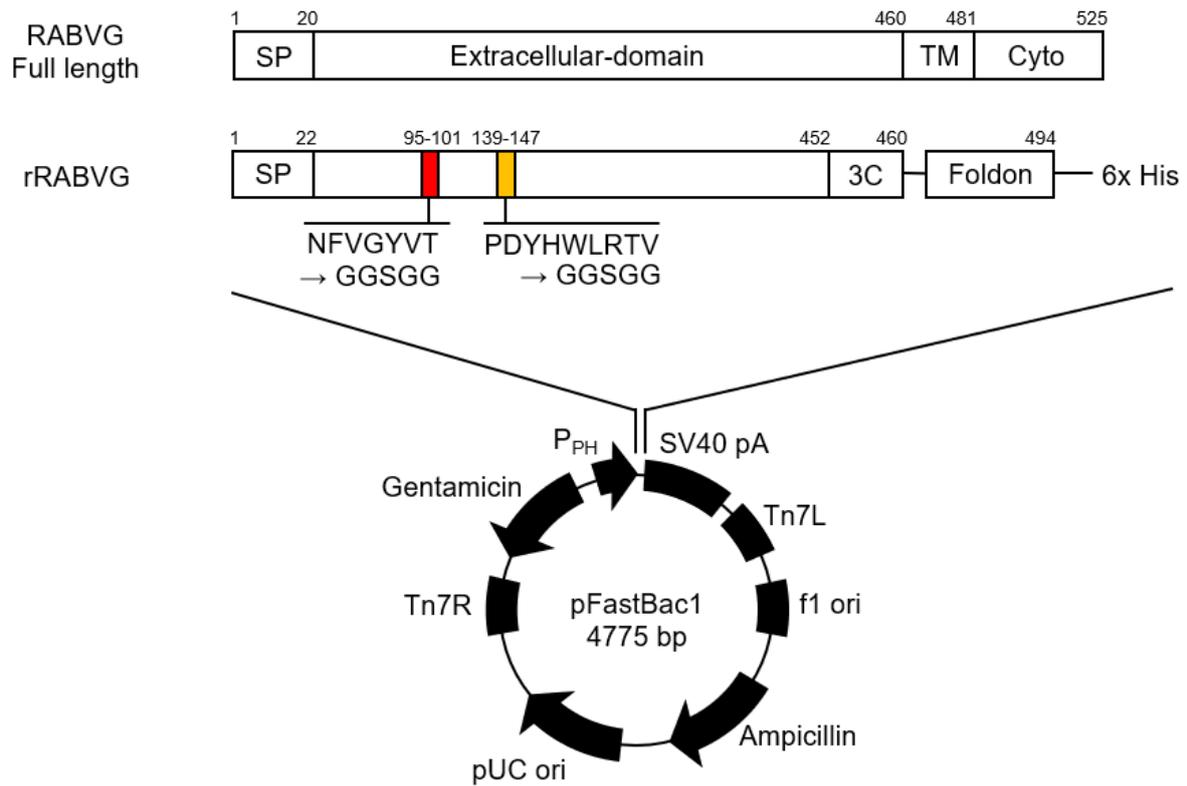


図 3-1 rRABVG ドナープラスミドマップ

rRABVG は fusion loop 1 (73-79 aa) 及び fusion loop 2 (117-125 aa) を Gly-Gly-Ser-Gly-Gly 配列に置換し、ドナーベクターである pFastBac1 のポリヘドリンプロモーター (P_{PH}) 下流にサブクローニングした。SP: シグナル配列、TM: 膜貫通領域、Cyto: 細胞質ドメイン、3C: HRV-3C プロテアーゼ認識配列

3-1-2 組換えバクミドの調製

3-1-1にて作製したドナープラスミド pFastBac1 を用いて、組換えバクミドの調製を行った。pFastBac1 で *E. coli* DH10Bac/BmNPV ケミカルコンピテントセルを形質転換し、ブルーホワイトセレクションとコロニーPCR によって目的遺伝子がバクミドへ挿入されているかを評価した。pFastBac1 が持つ Tn7 様トランスポゾンがバクミド上の *lacZ*-mini-*att*Tn7 を認識し、ヘルパープラスミド存在下で転移が生じる。転移に成功すると *lacZ* が破壊され、白コロニーが得られる。遺伝子導入確認用プライマーの M13 forward 及び M13 reverse はバクミド上の *lacZ*-mini-*att*Tn7 の上流と下流をそれぞれ認識する。目的遺伝子が導入されていなかった場合は 300 bp の DNA 断片が増幅され、導入されていた場合は約 4,000 bp の DNA 断片が増幅される (図 3-2 A)。寒天培地に形成された白コロニーのうち 7 つを釣菌し、コロニーPCR を行ったところ、No. 1, 3, 7 の 3 つのコロニーで rRABVG 配列の導入が確認された (図 3-2 B)。しかし、これら 3 つのコロニーにおいても 300 bp の DNA 断片が確認されたことから、一部、非組換えバクミドが混入していることが考えられた (図 3-2 B)。そこで、No. 1 のコロニーを画線培養することで精製し、再度コロニーPCR を行った (図 3-2 C)。釣菌した 8 つのコロニーのいずれにおいても 300 bp 近傍のバンドが消失したことから、非組換えバクミドの混入はないと判断し、No. 5 を精製して発現に用いた。

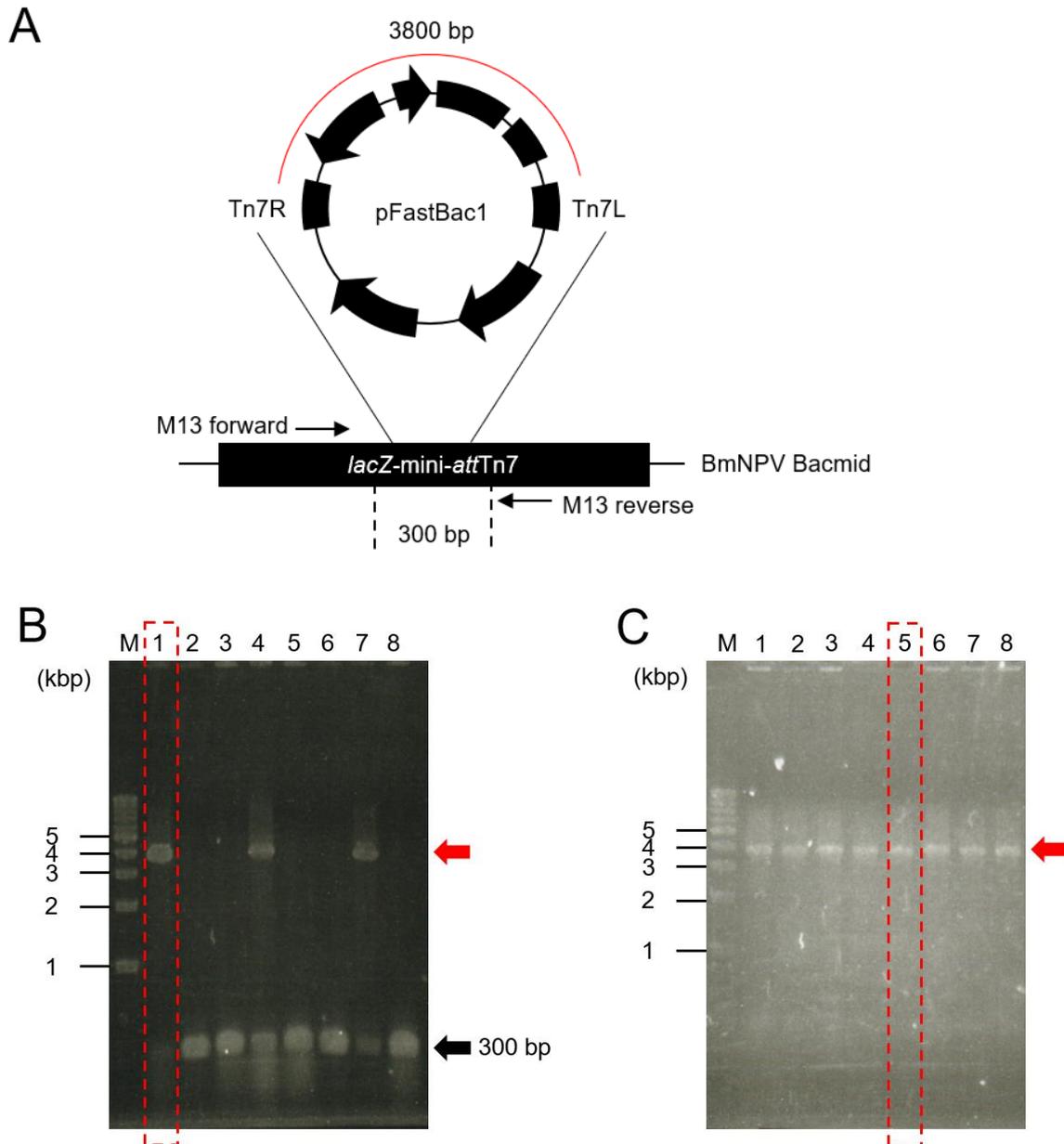


図 3-2 組換えバクミドの作製

(A) 組換えバクミド作製の模式図。遺伝子が導入されている場合、M13 forward と M13 reverse の組み合わせでコロニーPCRを行うことで約 4,000 bp の DNA 断片が得られる。

(B) 1 回目コロニーPCR のアガロースゲル電気泳動図。M: DNA 分子量マーカー。No.1-7 は白コロニー、No.8 は青コロニーを釣菌し、コロニーPCR によって得られた DNA 断片を泳動した。赤破線で囲った No.1 を画線培養に用いた。赤矢印は遺伝子が挿入された時のバンドの位置、黒矢印は非挿入時のバンドをそれぞれ示している。

(C) 画線培養後のコロニーPCR の結果。8 つの白コロニーを釣菌し、コロニーPCR を行った後に泳動した。No.5 を精製し、rRABVG の発現に用いた。赤矢印は遺伝子挿入時のバンドの位置を示している。

3-1-3 rRABVG の発現及び精製

・ 硫安分画

作製した組換えバクミドあるいは組換えバキュロウイルスを 5 齢のカイコ幼虫に接種し、接種から 7 日後を目安に体液を回収した。カイコ体液中には遊離ヒスチジンが大量に含まれているため、Ni²⁺アフィニティクロマトグラフィーの効率が低下することが懸念された。そこで 1 次精製の前に粗精製として硫安分画を行った。10x PBS (-) を添加したカイコ体液に 20-80%飽和度となるように飽和硫酸アンモニウム水溶液をそれぞれ加え、4 °C で 1 時間攪拌後、遠心し沈殿と上清に分離した。各飽和硫安度で得られた沈殿と上清をそれぞれ SDS-PAGE で展開し、ウェスタンブロッティングによって検出したところ、30%飽和硫安度ですべての rRABVG を沈殿として回収可能であることが示された (図 3-3)。

・ Ni²⁺アフィニティクロマトグラフィー

硫安分画によって得られた沈殿をバッファーで再懸濁し、Ni²⁺アフィニティクロマトグラフィーによって精製した。rRABVG の他に、硫安分画によって沈殿したカイコ体液由来のタンパク質がカラムに吸着したが、50 mM 及び 100 mM のイミダゾールを含むバッファーでステップワイズ溶出を行うことで rRABVG と分離することができた (図 3-4 A-C)。100 mM から 500 mM イミダゾールにかけてのグラジエント溶出によって得られた rRABVG を回収し、限外濾過濃縮及びバッファー交換を行った。Amicon® Ultra-15 50K を用いて濃縮を行うと、フィルター付近が高濃度となるため凝集が生じた。これを抑制するため、RABVG のエンベロップ膜からの可溶化での使用が報告されていた両イオン性界面活性剤の CHAPS²⁴ を 1% (w/v) となるように加え、濃縮操作を行った。

・ ゲル濾過クロマトグラフィー

続いて二次精製としてゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。rRABVG と同じ精製条件にて溶出させた標準タンパク質の溶出位置から、rRABVG は三量体タンパク質に相当する分子量であることが示唆された (図 3-5 A)。また、SDS-PAGE で精製度を評価したところ、後の相互作用解析や構造解析に十分な純度であることが示唆された (図 3-5 B)。本研究においてはカイコ 1 頭から約 20 µg あたりの rRABVG を得ることができた。

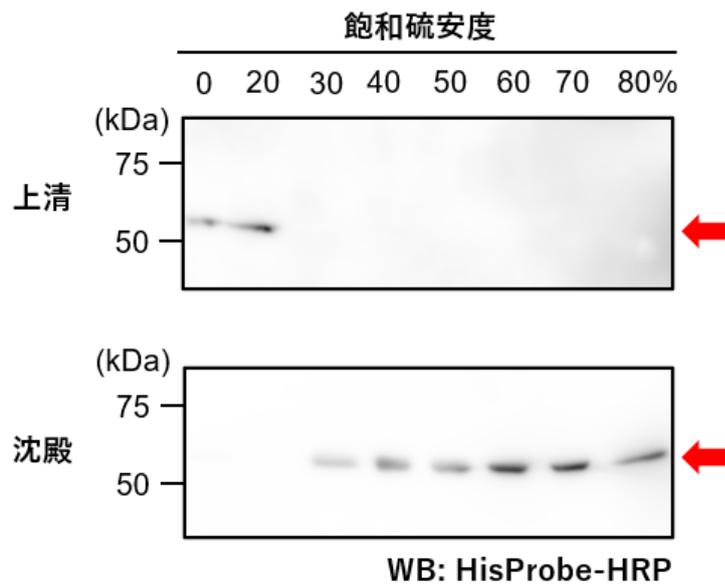


図 3-3 硫酸分画による rRABVG の粗精製

PBS (-) を加えたカイコ体液に硫酸アンモニウム溶液を各飽和度となるように添加し、1 時間攪拌後に、沈殿と上清をそれぞれ SDS-PAGE (12.5% アクリルアミドゲル、還元条件) で展開し、rRABVG を HisProbe-HRP Conjugate で検出した。赤矢印は単量体 rRABVG のバンドの位置を示している。

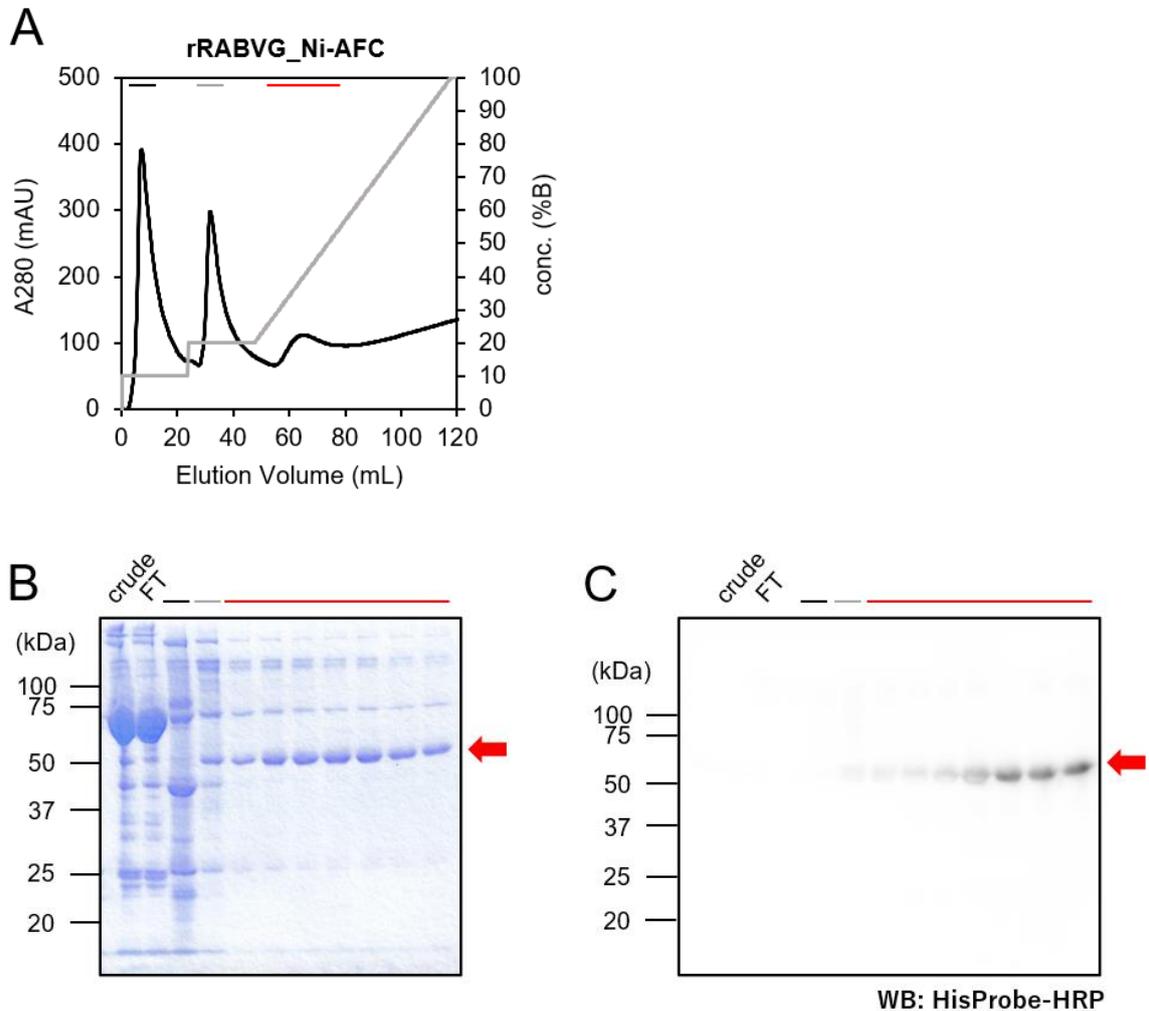


図 3-4 rRABVG の Ni²⁺アフィニティクロマトグラフィー

(A) 硫酸分画によって粗精製した rRABVG を Ni²⁺アフィニティクロマトグラフィーによって精製した。20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 50 mM Imidazole で 5CV、20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 100 mM Imidazole で 5CV のステップワイズ溶出を行った後、20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 100-500 mM Imidazole を 15CV かけてグラジエント溶出した。黒線: A280 (mAU), 灰線: conc. (%B)。

(B) SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、還元条件) によりピークが見られる溶出位置を検出した。クロマトグラムの上部に示した各色の線が SDS-PAGE のレーンと対応している。赤矢印は単量体 rRABVG のバンドの位置を示している。 FT: Flow through

(C) SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、還元条件) により溶出画分を展開し、HisProbe-HRP Conjugate で検出した。赤矢印は単量体 rRABVG のバンドの位置を示している。

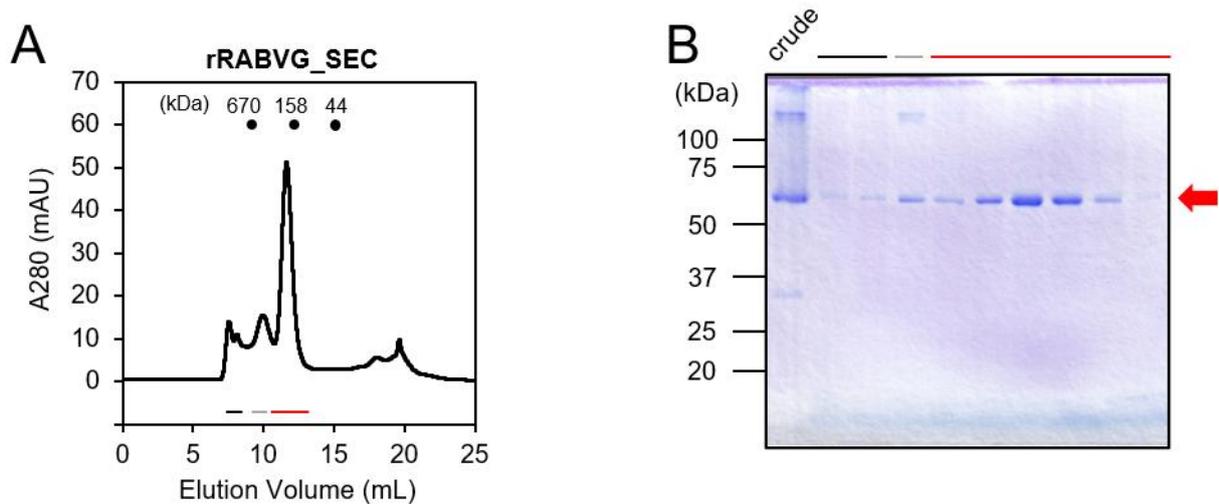


図 3-5 rRABVG のゲル濾過クロマトグラフィー

(A) Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーによって精製した rRABVG を回収し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって 2 次精製を行った。クロマトグラム上部の点は同じ精製条件で Gel Filtration Standard (Bio-Rad) を溶出させた際の各標準タンパク質の溶出位置を示している。

(B) SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、還元条件) により溶出画分を検出した。クロマトグラム下部に示した各色の線が SDS-PAGE のレーンと対応している。赤矢印は rRABVG 単量体のバンドの位置を示している。

3-2 中和抗体断片の調製

本研究の共同研究先である岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 人獣共通感染症学研究室では RABVG を認識する 35 種類のマウスモノクローナル抗体を樹立している⁵⁵。表 3-1 は 35 種類の抗体のうち、エピトープや認識する RABV 株、中和活性の異なる 8 種類の抗体の中和活性及び間接免疫蛍光抗体法 (indirect immunofluorescent antibody, IFA) の結果を示す。ウイルス感染阻害試験の結果、35 種類のうち 28 種類の抗体が中和活性を有しており、IFA によって固定毒、街上毒を含む複数の RABV 株を認識することが明らかとなった。また、その多くが構造的エピトープを持ち、互いに競合していることが示された。しかし、ほとんどの抗体の抗原部位、結合特性や中和活性の分子基盤については未解明であった。

そこで本研究ではまず、35 種類の抗体のうち幅広い RABV 株に対して高い中和活性を示した 15-13 及び 12-22 の二つの抗体を使用し、その結合特性を評価した。15-13、12-22 共にサブクラスは IgG_{2b} であり、臨床試験が実施された抗体カクテル⁴²⁻⁴⁴のように固定毒と街上毒を含めた複数の RABV 株に対して有効であった (表 3-1)。15-13 については認識部位に関する研究も行われており、Trp251 近傍の線状エピトープを認識することが示されている⁵⁶。一方で 12-22 のエピトープは未解明であるが、少なくとも 15-13 とは異なる部位の構造的エピトープを認識することが示されている⁵⁵。全長抗体ではヒンジ領域によって高い構造柔軟性を持つほか、分子を跨いだ二価結合を形成する可能性があるためアビディティ効果などを加味する必要があり、構造情報からの中和活性の分子基盤の解析を複雑にする恐れがある。そこで機能評価を行うにあたり、これらの抗体は Fab 断片や scFv といった抗体断片として調製した。

表 3-1 各 RABV 株に対する中和抗体の IFA titer⁵⁵

MAb	固定毒 (実験室株)						街上毒 (野外株)		Neutralization
	RC-HL	Ni	ERA	HEP-F	CVS-CE	CVS	1088	K	
15-13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	High
15-10	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	Low
12-14	++	++	++	++	-	-	+	+	-
12-1	++++	+++	+++	+++	-	-	++	+++	-
12-22	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	Medium
11-1	++++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	High
12-3	++++	+++	+++	+	+++	++	+++	+++	High
13-22	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	High

IFA titer: -, <100; +, 100-<1,000; ++, 1,000-<10,000; +++, 10,000-<100,000; +++++, ≥100,000

3-2-1 Fab 断片の調製

Fab 断片はハイブリドーマを腹腔注射したマウスから全長抗体を精製し、パパインで消化することで得た。まず、腹水に含まれる脂質やアルブミンなどのカラムを目詰まりさせる原因となる成分を硫酸分画によって除いた。pH の急激な変化を抑制するために 10x PBS (-) を添加後、50%飽和硫酸度となるように飽和硫酸アンモニウム水溶液を滴下して、1 時間攪拌後に沈殿を回収した。沈殿をバッファーで再懸濁し、フィルター濾過を行った後、protein G アフィニティークロマトグラフィーによって全長抗体を精製した。その後、Immobilized papain を用いて抗体の断片化を行った。パパインは還元剤存在下で抗体とインキュベートすることで、可変領域近傍のヒンジ領域内のペプチド結合を切断し、2 つの Fab 断片と 1 つの Fc 断片を生成する。本研究では還元剤として 20 mM Cystein を添加し、一晩かけて消化を行った。その後、抗体の過剰消化を防ぐためにエコノパックカラムで Immobilized papain を分離し、透析によってシステインを取り除いた。パパイン消化によって得られた Fab 断片と Fc 断片は、Fc 断片のみが結合できる protein A アフィニティークロマトグラフィーによって分離した。各クロマトグラフィーの精製度やパパイン消化効率は、各操作後のサンプルを SDS-PAGE で展開し、CBB 染色を行うことで評価した (図 3-6 A, B)。15-13 Fab と 12-22 Fab は還元処理を行ったことでジスルフィド結合が切断され、protein A_FT のレーンにて V_H-C_{H1} 及び V_L-C_L 由来の 2 つのバンドが確認された (図 3-6 A, B)。一方で protein A_溶出のレーンには同様にジスルフィド結合が切断された Fc 断片由来のバンドが見られたことから、Fab 断片と Fc 断片を分離できたことが明らかとなった (図 3-6 A, B)。最後にイオン交換クロマトグラフィーによって精製することで、高純度な Fab 断片を調製することができた (図 3-7 A-D)。マウス腹水 1 mL あたり 1.91 mg の 15-13 Fab と、0.40 mg の 12-22 Fab を得ることができた。

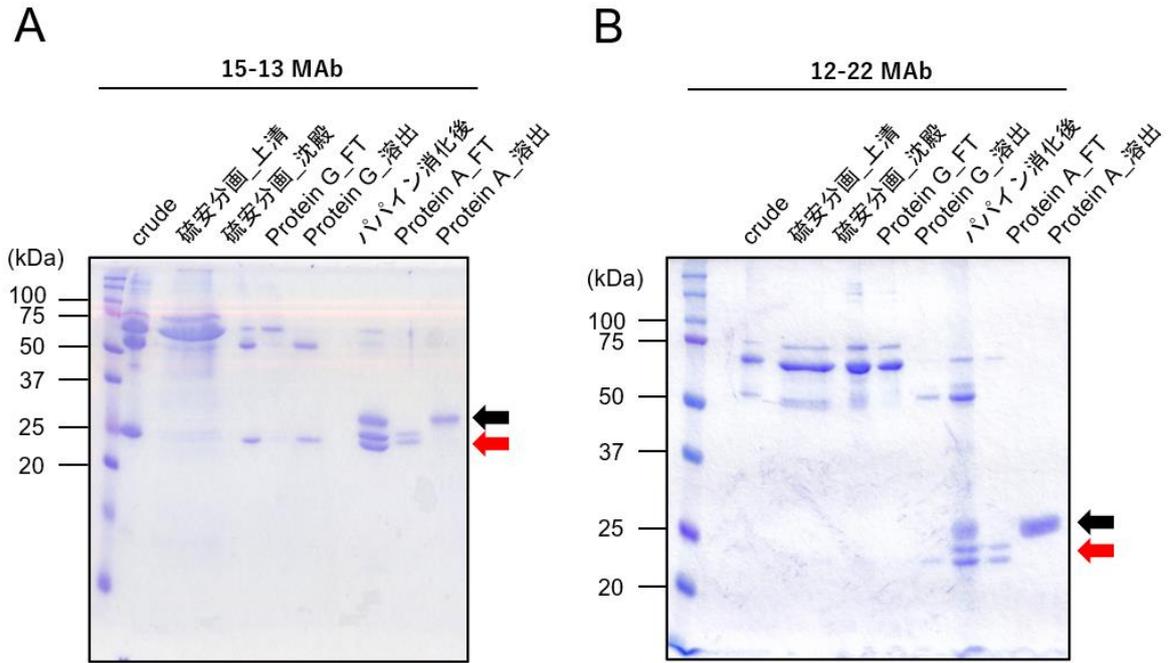


図 3-6 硫安分画から protein A アフィニティクロマトグラフィーまでの SDS-PAGE

(A) 15-13 mAb の各クロマトグラフィーの精製度やパパイン消化効率を SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件) によって評価した。赤矢印は V_H-C_{H1} 及び V_L-C_L 由来のバンドの位置を示しており、黒矢印は Fc 断片由来のバンドの位置を示している。

(B) 12-22 mAb の各クロマトグラフィーの精製度やパパイン消化効率を SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、還元条件) によって評価した。V_H-C_{H1} 及び V_L-C_L 由来のバンドの位置を示しており、黒矢印は Fc 断片由来のバンドの位置を示している。

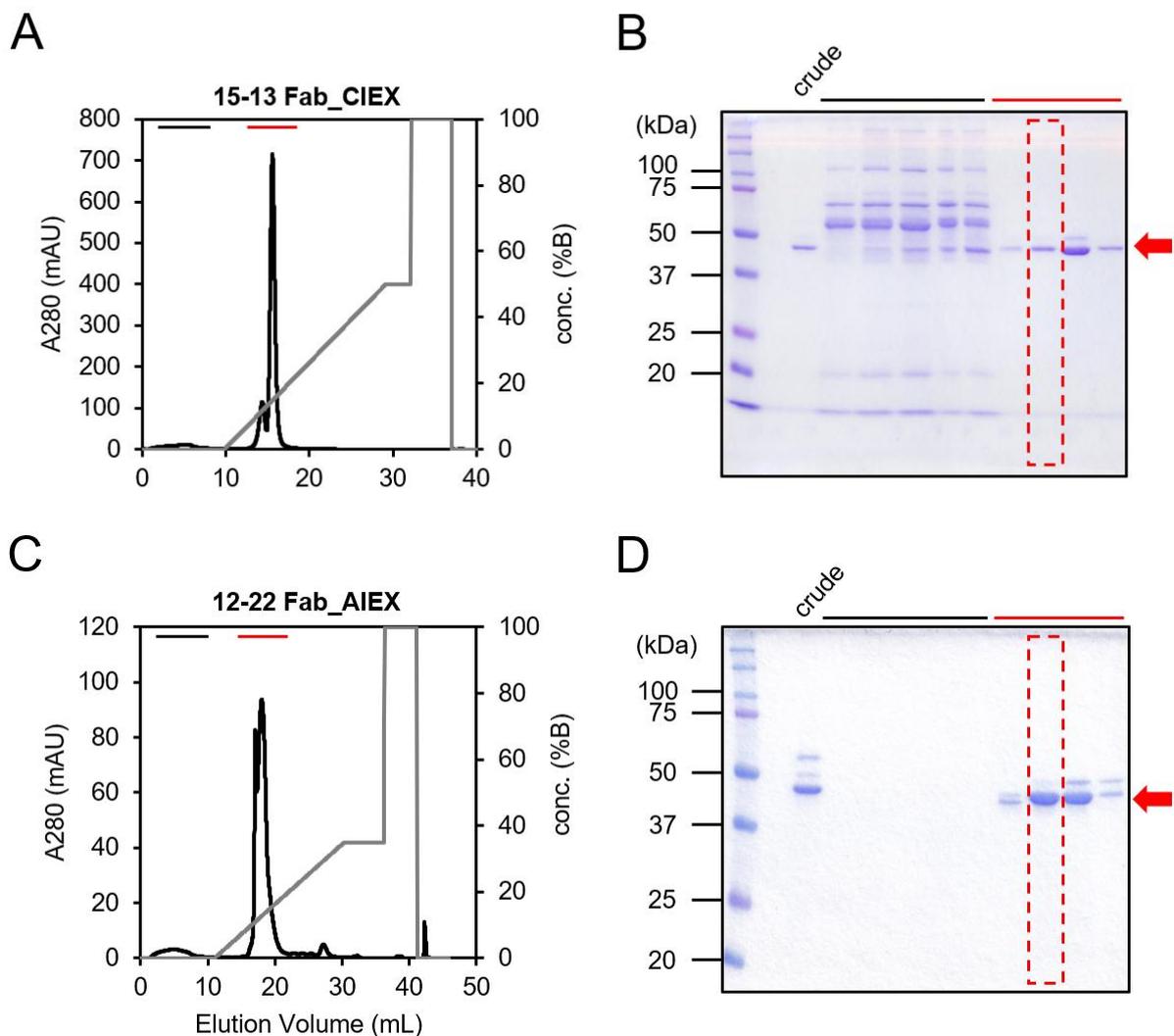


図 3-7 Fab 断片のイオン交換クロマトグラフィー

(A) 15-13 Fab の陽イオン交換クロマトグラフィー。20 mM sodium citrate pH5.2 で 10CV 洗浄後、20 mM sodium citrate pH5.2, 0-500 mM NaCl で 20CV かけてグラジエント溶出した。黒線: A280 (mAU), 灰線: conc. (%B)。

(B) SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、非還元条件) により溶出画分を検出した。クロマトグラム上部に示した各色の線が SDS-PAGE のレーンと対応している。赤矢印は Fab 断片のバンドの位置を示しており、赤破線で囲ったフラクションを以降の解析に用いた。

(C) 12-22 Fab の陰イオン交換クロマトグラフィー。20 mM Tris-HCl pH9.0 で 10CV 洗浄後、20 mM Tris-HCl pH9.0, 0-350 mM NaCl で 20CV かけてグラジエント溶出した。黒線: A280 (mAU), 灰線: conc. (%B)。

(D) SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、非還元条件) により溶出画分を検出した。クロマトグラム上部に示した各色の線が SDS-PAGE のレーンと対応している。赤矢印は Fab 断片のバンドの位置を示しており、赤破線で囲ったフラクションを以降の解析に用いた。

3-2-2 scFv の調製

scFv は抗体が抗原を認識するために必要な最小単位である V_H 及び V_L をフレキシブルなペプチドリンカーで接続した単鎖可変領域フラグメントであり、大腸菌によって大量発現が可能である。scFv はドメイン配向によって活性や調製効率に差が出るといった報告があることから^{57,58}、本研究では 15-13、12-22 共に V_H-linker-V_L の順で連結させた scFv HL と、V_L-linker-V_H の順に連結させた scFv LH の両方を調製した (図 3-8)。scFv 配列がサブクローニングされた pET-22b (+) で *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL を形質転換することで得られた封入体は、希釈法によって *in vitro* で巻き戻した⁵⁹。巻き戻し後の scFv は限外濾過濃縮を行った後に、HiLoad 26/600 Superdex 75 column を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した (図 3-9 A, C, 図 3-10 A, C)。ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出位置と SDS-PAGE による精製度評価によって、いずれの scFv も単量体として高純度に精製されていることが示されたため、以降の解析に用いることにした (図 3-9 A-D, 図 3-10 A-D)。巻き戻しに用いた封入体量とゲル濾過クロマトグラフィー後の最終収量から巻き戻し効率を算出したところ、15-13 scFv HL と 15-13 scFv LH はそれぞれ 12.2% と 14.5% であった。一方、12-22 scFv HL と 12-22 scFv LH はそれぞれ 1.4% と 3.0% であったことから、15-13 scFv、12-22 scFv 共に scFv LH の方がより効率的に調製できることが明らかとなった (表 3-2)。

表 3-2 各 scFv の巻き戻し効率

scFv	Inclusion body (mg/L)	Refoldong efficiency (%)	Final yields (mg/L)
15-13 scFv HL	43.6	12.2	5.3
15-13 scFv LH	85.8	14.5	12.4
12-22 scFv HL	57.4	1.4	0.8
12-22 scFv LH	73.6	3.0	2.2

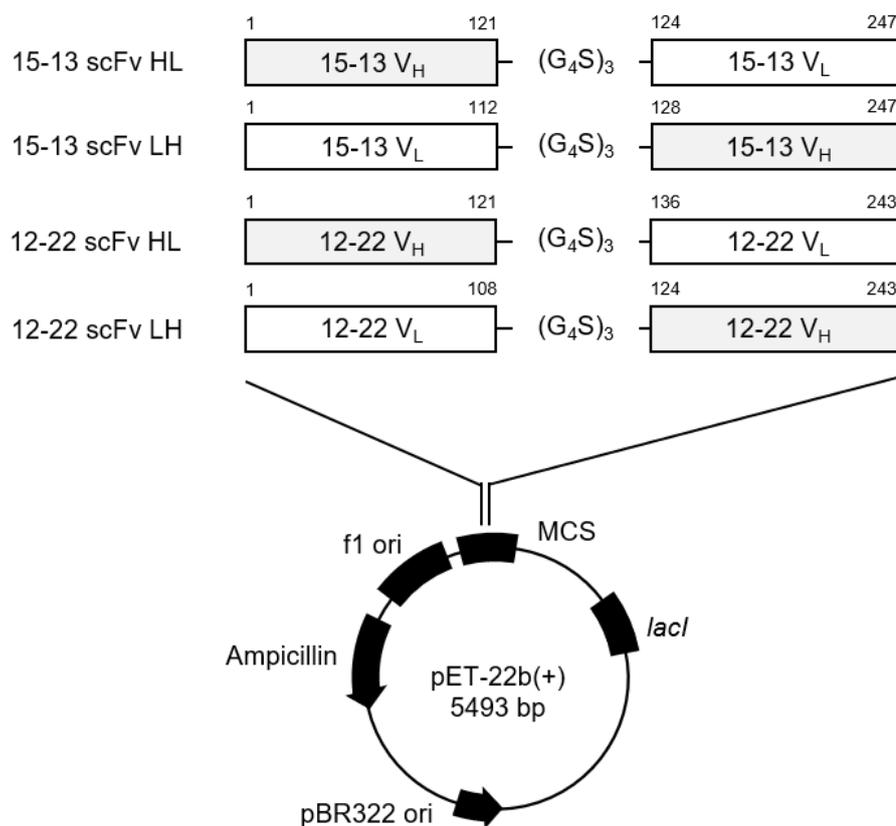


図 3-8 scFv 発現ベクターマップ

scFv は V_H と V_L を (G₄S)₃ リンカー配列で接続し、pET-22b(+) にサブクローニングされている。

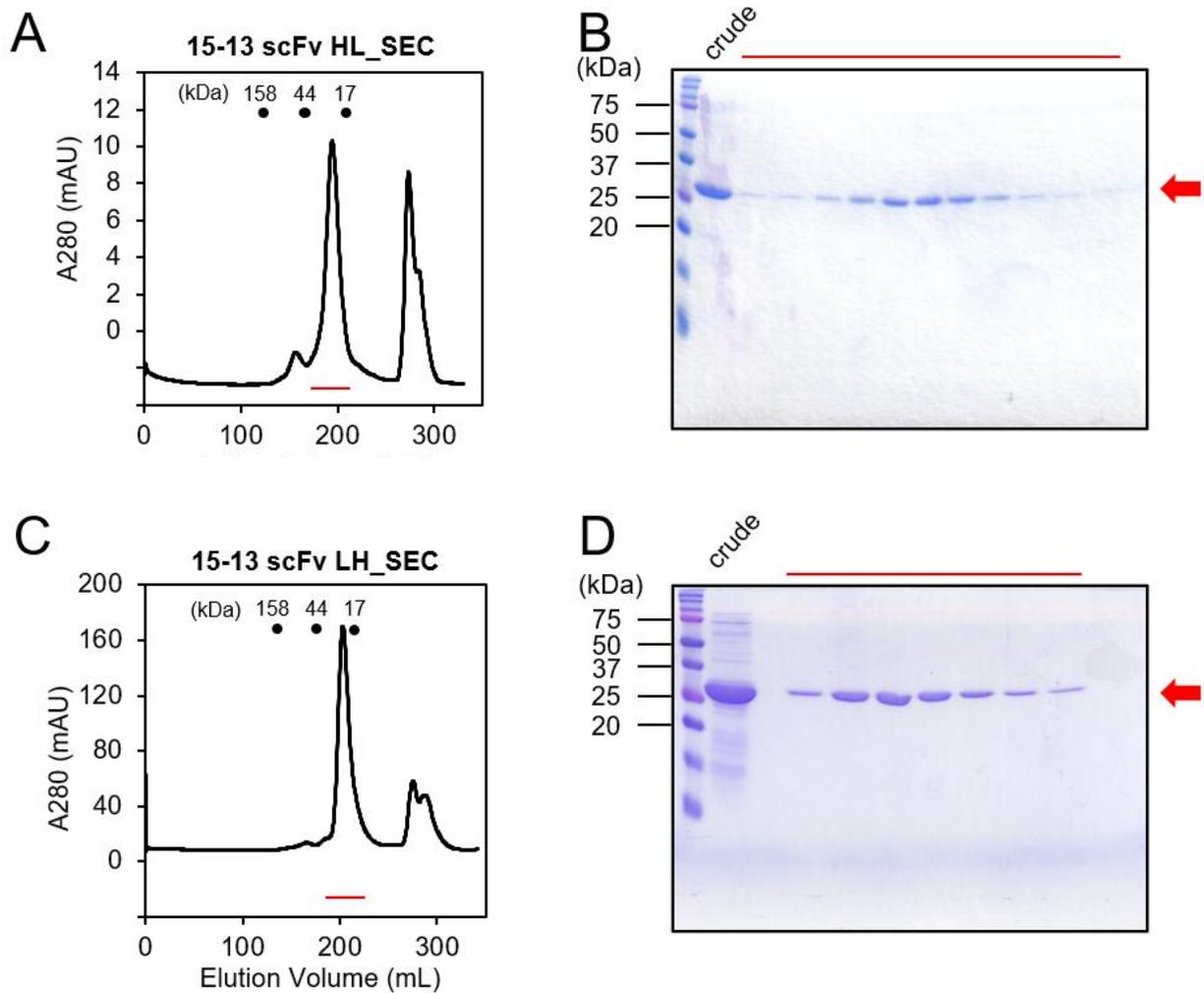


図 3-9 15-13 scFv のゲル濾過クロマトグラフィー

(A, C) (A) scFv 15-13 HL, (C) scFv 15-13 LH のゲル濾過クロマトグラフィー。クロマトグラム上部の点は同条件で Gel Filtration Standard (Bio-Rad) を流した際の各標準タンパク質の溶出位置を示している。

(B, D) SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件) により溶出画分を検出した。クロマトグラム下部に示した赤線に位置する溶出画分を展開している。赤矢印は (B) scFv 15-13 HL, (D) scFv 15-13 LH のバンドの位置を示している。

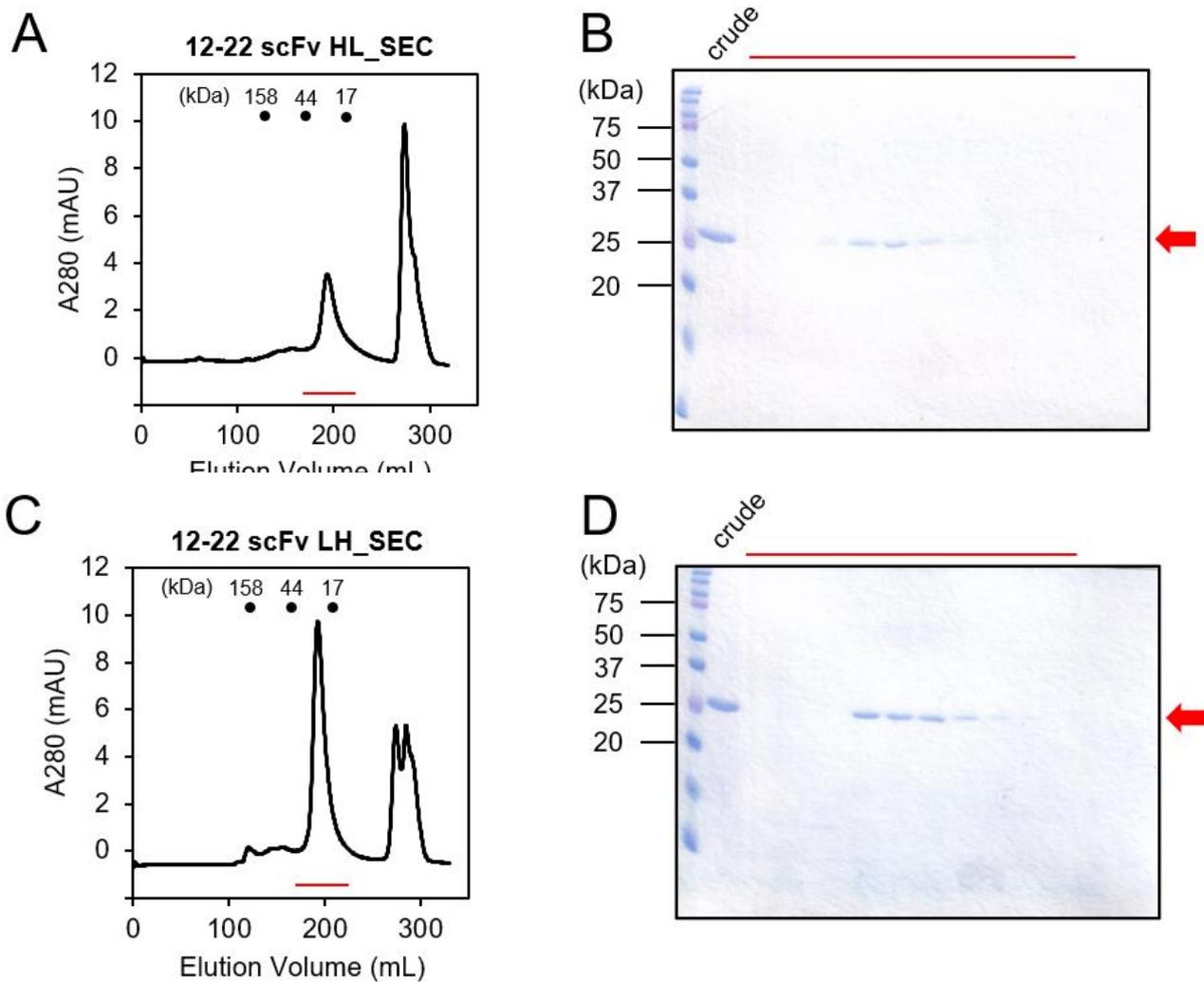


図 3-10 12-22 scFv のゲル濾過クロマトグラフィー

(A, C) (A) scFv 12-22 HL, (C) scFv 12-22 LH のゲル濾過クロマトグラフィー。クロマトグラム上部の点は同条件で Gel Filtration Standard (Bio-Rad) を流した際の各標準タンパク質の溶出位置を示している。

(B, D) SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件) により溶出面分を検出した。クロマトグラム下部に示した赤線に位置する溶出面分を展開している。赤矢印は (B) scFv 12-22 HL, (D) scFv 12-22 LH のバンドの位置を示している。

3-3 Biolayer interferometry 法による相互作用解析

調製した scFv 及び Fab 断片が rRABVG との特異的な結合を保持しているか解析するために、Biolayer interferometry 法による相互作用解析を行った。rRABVG は 6x His tag を介して Ni-NTA (NTA) Biosensor の表面に固定化し、段階希釈した中和抗体断片溶液にセンサーを浸すことで結合を観察し、その後バッファーに浸すことで解離を評価した。

15-13 Fab は rRABVG に特異的に結合し (図 3-11 A)、得られたカーブレスポンスに対して 1:1 結合モデルでのカーブフィッティングを行うことで結合速度定数 k_{on} は 9.43×10^4 ($M^{-1} \cdot s^{-1}$), 解離速度定数 k_{off} は 5.31×10^{-4} (s^{-1}) で K_D 値は 5.60 nM と算出され、高い結合親和性を示した。一方で 15-13 scFv HL 及び 15-13 scFv LH の K_D 値はそれぞれ 24.9 nM と 17.7 nM であり Fab 断片と比較すると結合親和性の低下が見られたが、rRABVG との特異的な結合を示した (図 3-11 B, C)。これら 15-13 scFv の k_{on} の値は Fab 断片と比較して小さくなっており、 k_{off} の値は大きくなっていることから、Fab 断片よりも結合が遅く、解離が早い性質であることが示唆された (表 3-3)。

12-22 Fab、12-22 scFv HL 及び 12-22 scFv LH についても同様に相互作用解析を行ったところ、 K_D 値はそれぞれ 1.30 μ M, 2.65 μ M 及び 5.85 μ M といずれも μ M レベルであるが、rRABVG との特異的な結合を示した (図 3-12 A-C)。速度論的解析の結果、15-13 のいずれの抗体断片よりもさらに結合が遅く、解離が速い性質であることが明らかとなった (表 3-3)。また、構造的エピトープを持つ 12-22 に抗体断片が rRABVG に結合したことから、カイコバキュロウイルス発現系にて調製した rRABVG は抗原性を保持していることが示唆された。

表 3-3 Biolayer interferometry 法による相互作用解析から算出した速度論的パラメータ

Analyte	K_D (M)	k_{on} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
15-13 Fab	5.60×10^{-9}	9.43×10^4	5.31×10^{-4}
15-13 scFv HL	2.49×10^{-8}	3.90×10^4	9.71×10^{-4}
15-13 scFv LH	1.77×10^{-8}	6.38×10^4	1.13×10^{-3}
12-22 Fab	1.30×10^{-6}	1.02×10^4	1.33×10^{-2}
12-22 scFv HL	2.65×10^{-6}	3.48×10^3	9.22×10^{-3}
12-22 scFv LH	5.85×10^{-6}	2.57×10^3	1.50×10^{-2}

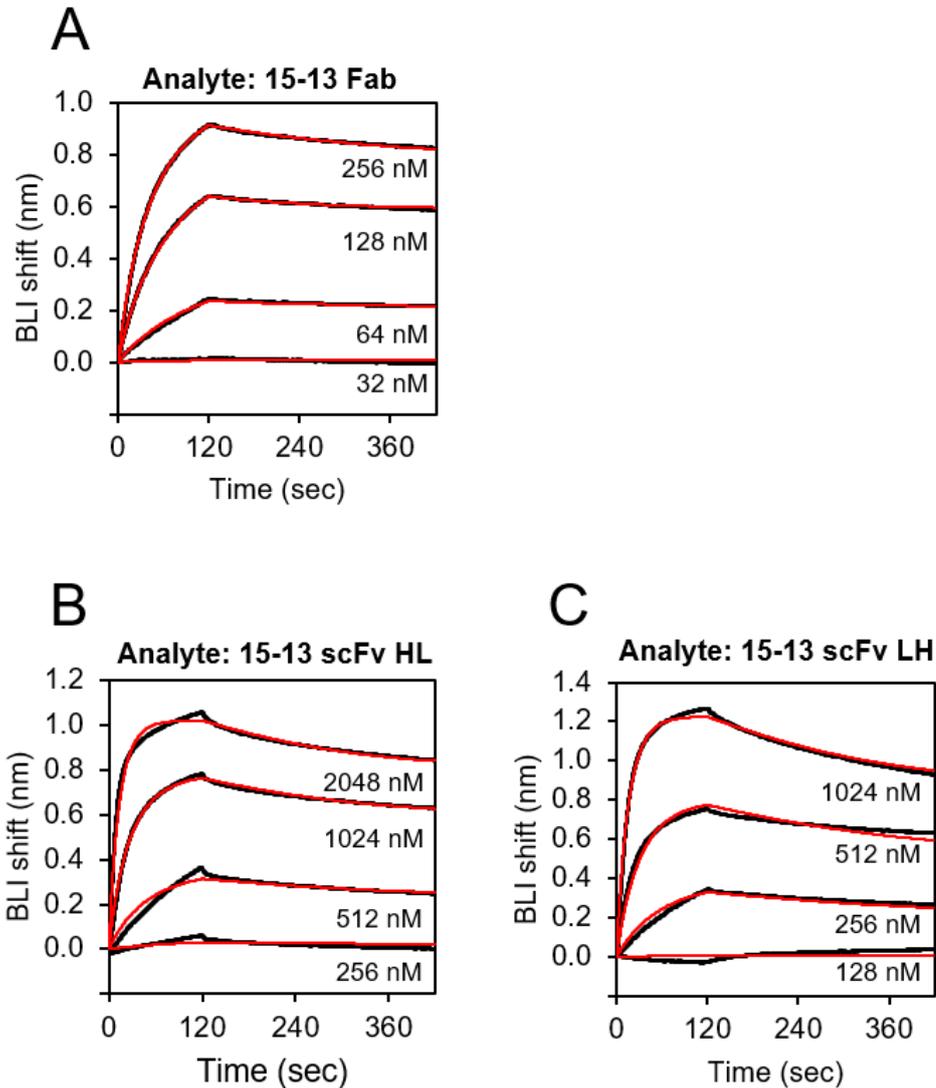


図 3-11 BLI 法による 15-13 抗体断片と rRABVG の相互作用解析

BLItz を用いて、Ni-NTA (NTA) Biosensor に固定化した rRABVG と 15-13 抗体断片の相互作用解析を行った。(A) 15-13 Fab, (B) 15-13 scFv HL, (C) 15-13 scFv LH と rRABVG の結合によって得られたカーブレスポンス (黒線) を示している。得られたカーブレスポンスに対して BLItz Pro version 1.2.1.3 を用いて 1:1 結合モデルでのカーブフィッティングを行い (赤線)、解離定数 K_D 、結合速度定数 k_{on} 、解離速度定数 k_{off} をそれぞれ算出した。

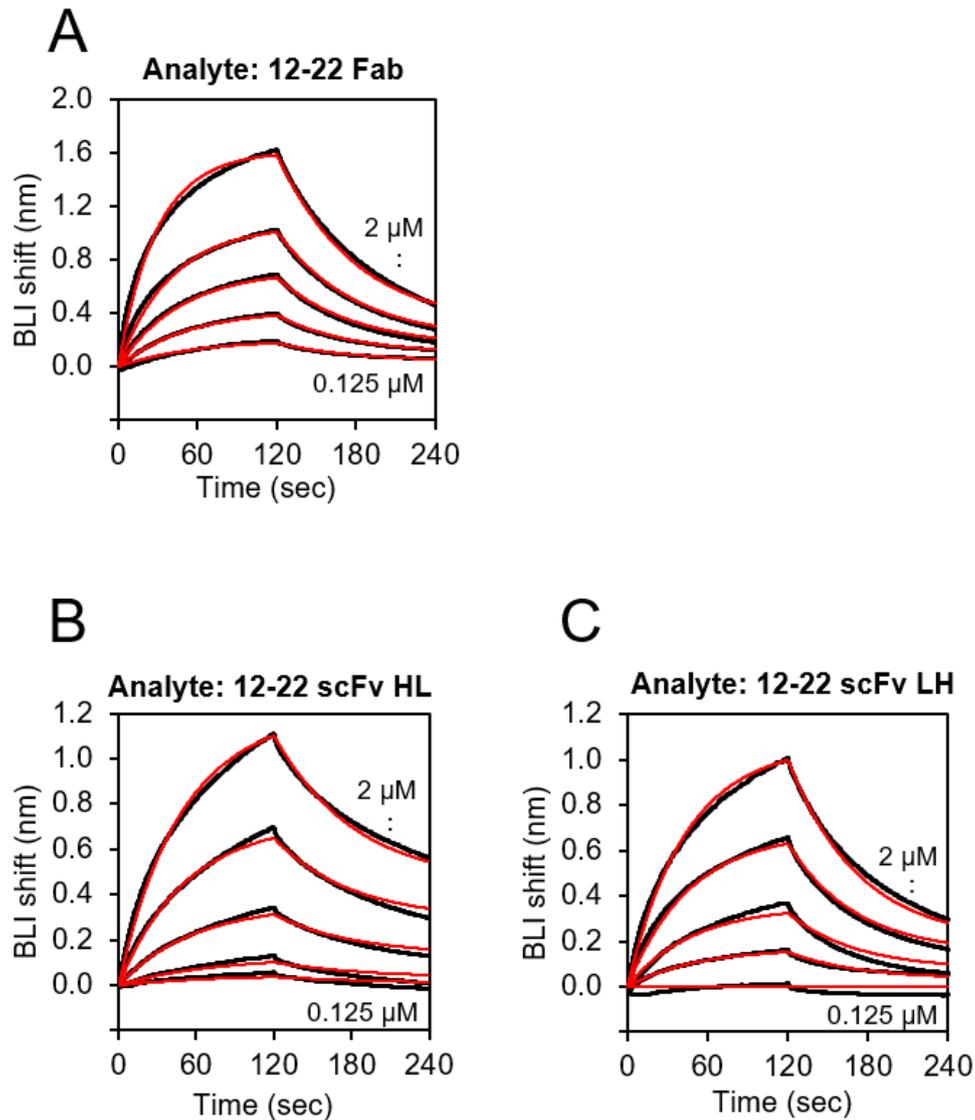


図 3-11 BLI 法による 12-22 抗体断片と rRABVG の結合解析

BLItz を用いて、Ni-NTA (NTA) Biosensor に固定化した rRABVG と 12-22 抗体断片の相互作用解析を行った。(A) 12-22 Fab, (B) 12-22 scFv HL, (C) 12-22 scFv LH と rRABVG の結合によって得られたカーブレスポンス (黒線) を示している。得られたカーブレスポンスに対して BLItz Pro version 1.2.1.3 を用いて 1:1 結合モデルでのカーブフィッティングを行い (赤線)、解離定数 K_D 、結合速度定数 k_{on} 、解離速度定数 k_{off} をそれぞれ算出した。

3-4 DSF 法による熱安定性の評価

調製した各抗体断片の凝集性や収量に差が見られたことから安定性に差があると考え、DSF法による熱安定性の評価を行った(図 3-12)。測定範囲 20-90°C、温度変化速度 0.5°C/30 sec の設定で測定を行い、各抗体断片の T_m 値は蛍光強度を温度で微分した曲線の極小値から算出した(図 3-12 B, D)。15-13 Fab の T_m 値は 62.5 °C であり、15-13 scFv HL と 15-13 scFv LH はそれぞれ 41.0 °C と 43.5 °C と算出された(図 3-12 B)。一方で 12-22 Fab の T_m 値は 63.0 °C であり Fab 断片同士の差はほとんどなかった。また、12-22 scFv LH は 42.5 °C と算出されたが、12-22 scFv HL の T_m 値は極小値のピークが得られなかったために算出できなかった(図 3-12 D)。これは 12-22 scFv HL の DSF プロットは 20 °C における RFU が高く、温度上昇に伴う RFU の変化が緩やかであったためと考えられる(図 3-12 C)。同様の傾向が 15-13 scFv HL においても示されており(図 3-12 A)、巻き戻し効率が悪かった scFv HL は疎水性領域が露出しやすい状態にあるため、20 °C において SYPRO Orange がより多く結合していることが示唆された。

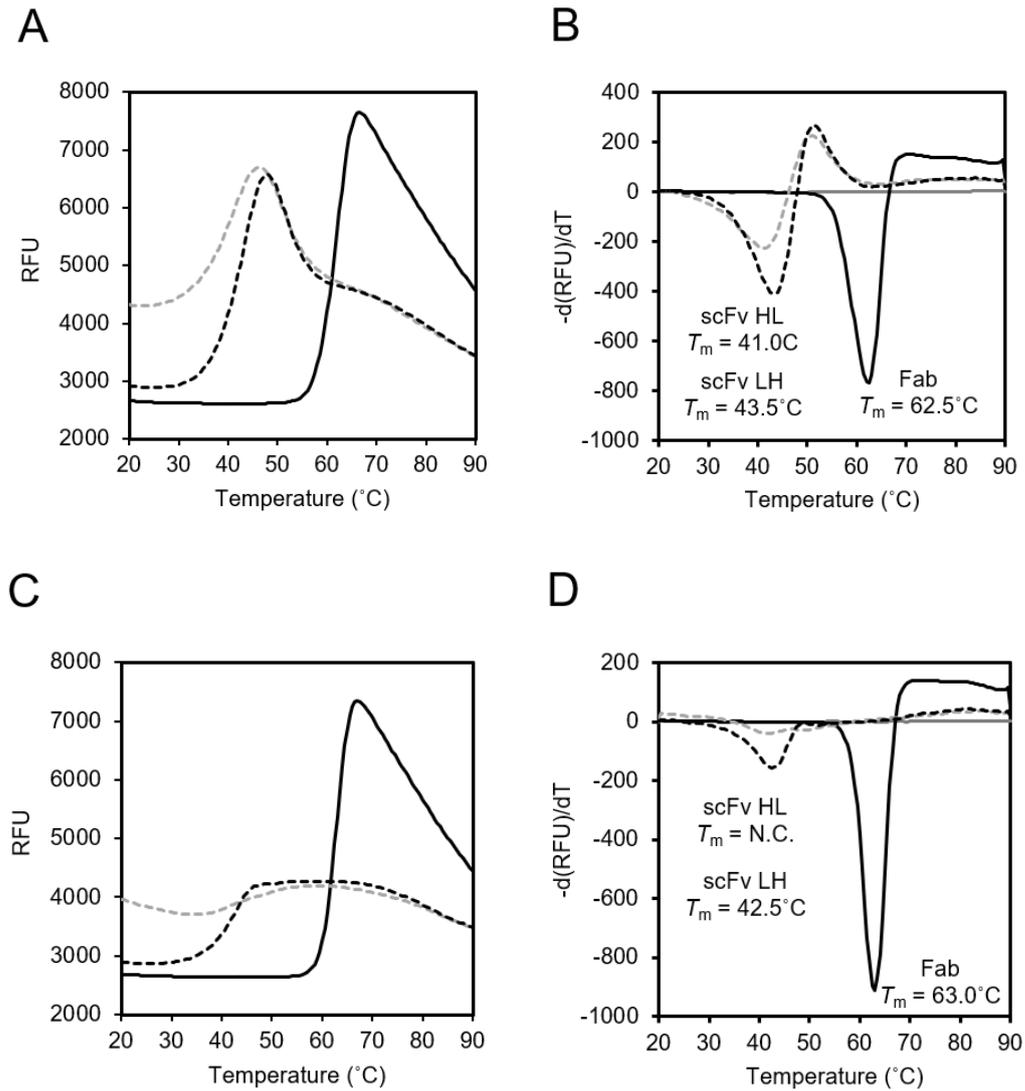


図 3-12 各抗体断片の熱安定性の評価

(A, B) 15-13, (C, D) 12-22 抗体断片の DSF 法による熱安定性解析の結果。それぞれ測定結果 (A, C) と Bio-Rad CFX manager ver2.1 による解析後の結果 (B, D) を表している。黒色実線は Fab 断片の結果を示している。破線はそれぞれ scFv HL (灰色) と scFv LH (黒) の結果を示している。 T_m 値はいずれも RFU を温度で微分することで得られた曲線の極小値から算出した。N.C. は "could not be calculated" を意味している。

3-5 rRABVG の構造解析

3-5-1 負染色法による構造観察

中和抗体断片との相互作用解析により本研究で調製した rRABVG は抗原性を保持していることが示唆されたため、これを用いて構造解析を行った。クライオ電子顕微鏡による構造観察、そして単粒子解析によって高分解能のタンパク質立体構造を得るには、粒子が均一であり、単分散性を示し、異なる配向の投影された粒子像を数十万個以上必要とする。そこで初めに、クライオ電子顕微鏡よりも少量でタンパク質の性状評価が可能な負染色法による構造観察を行った。

相互作用解析に使用した際と同様の手順で発現及び精製した rRABVG を、膜融合前構造を取るとされる塩基性条件 (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl) と、膜融合後構造を取るとされている酸性条件 (20 mM sodium citrate pH4.0, 150 mM NaCl) の 2 条件において濃度 0.1 mg/mL で調製し、観察用グリッドを作製した。透過型電子顕微鏡 (H-7650) を用いて加速電圧 80 kV で撮影したところ、両条件において分散性の良い粒子像が得られた (図 3-13 A, 図 3-14 A)。塩基性条件での観察で得られた粒子像はいずれも粒子径がほぼ均一であり、拡大すると 3 つの白円が集合して三量体を形成している様子が観察された (図 3-13 B)。その長径は約 10 nm であり、これは VSV-G の膜融合前構造から想定される構造モデルの長径と一致する (図 3-13 B)。一方で、酸性条件で得られた観察像中には塩基性条件でも見られたような粒子と、細長い形態をした粒子が混在している様子が観察された (図 3-14 A)。その短径は 9 nm ほどであり、長径は 20 nm 以上であった。VSV-G の膜融合後構造から想定される構造モデルの長径は約 13 nm、短径は約 7 nm であり、観察された構造はモデル構造より大きいことが明らかとなった (図 3-14 B)。どちらの条件でも分散性の良い観察像が得られたが、粒子の形態がより均一であった塩基性条件にてクライオ電子顕微鏡による構造観察を行うことにした。

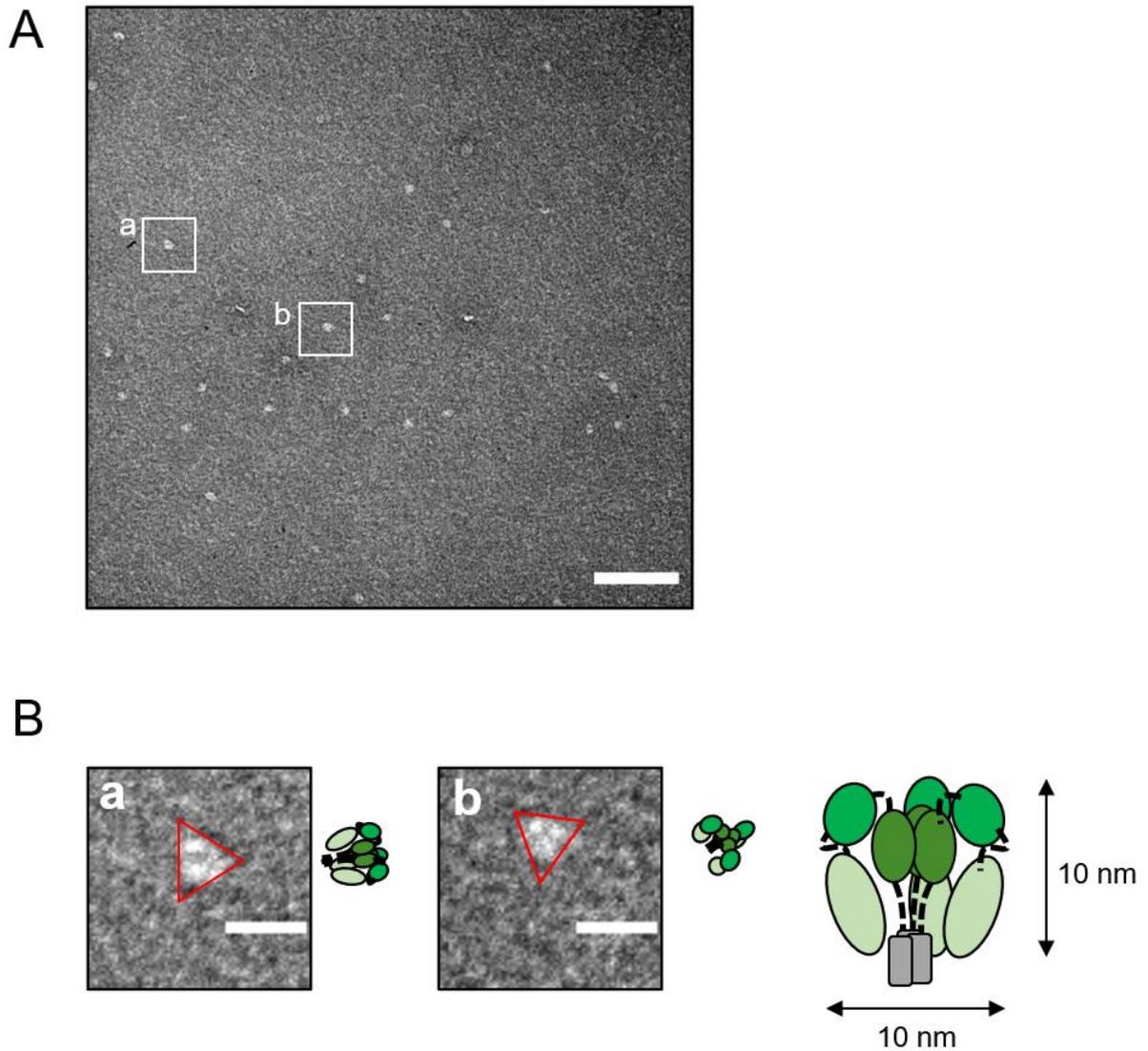


図 3-13 負染色法による塩基性条件下での rRABVG 構造観察

(A) 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl のバッファーで調製した 0.1 mg/mL rRABVG を 1% モリブデン酸アンモニウムで染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7650) を用いて倍率 25,000 x で撮影することで得られた観察像 (scale bar: 100 nm)。

(B) (A) の負染色像のうち、a と b の粒子を拡大した撮影像 (scale bar: 20 nm)。赤線で粒子像を囲っており、横に配置したモデル構造は予想される投影方向を示している。右に示したモデル構造は想定される塩基性条件において想定される rRABVG 三量体の粒子径を示している。

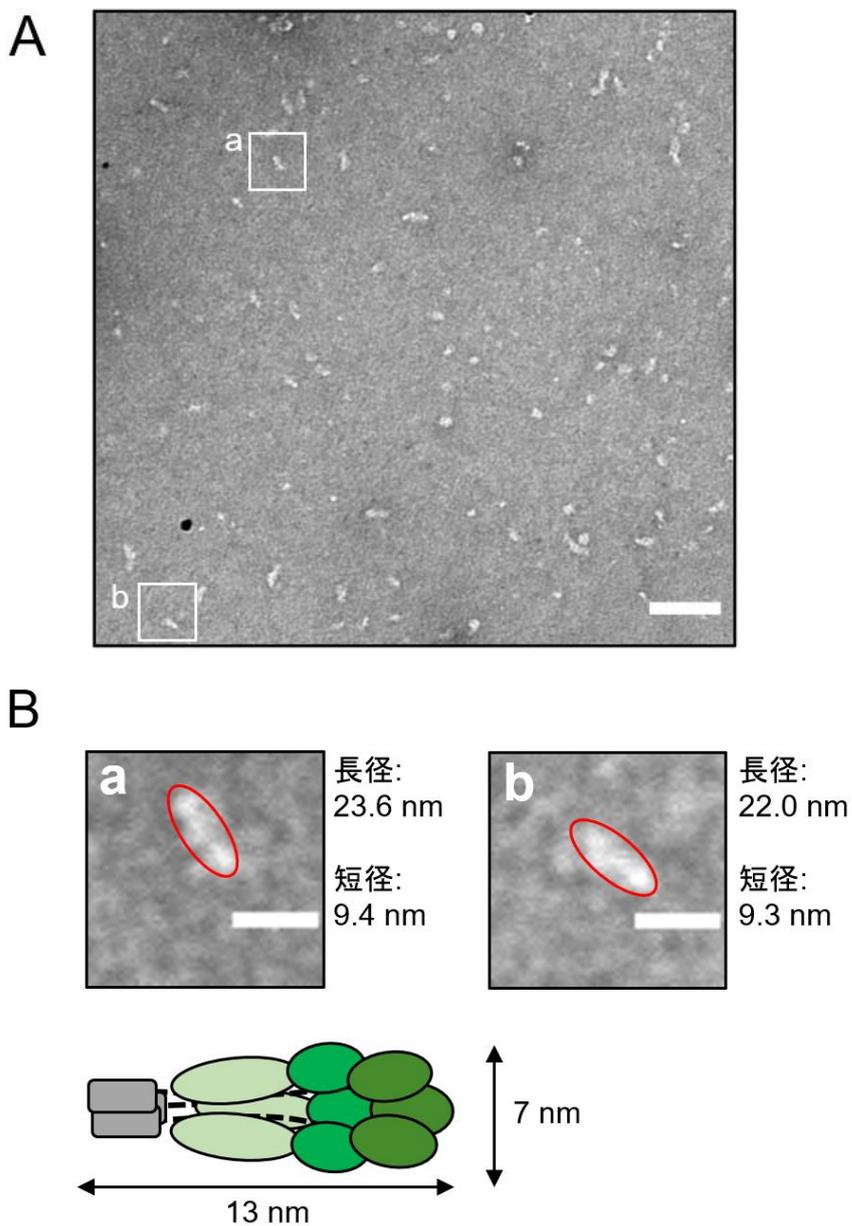


図 3-14 負染色法による酸性条件下での rRABVG 構造観察

(A) 20 mM sodium citrate pH4.0, 150 mM NaCl のバッファーで調製した 0.1 mg/mL rRABVG を 1% 酢酸ウランで染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7650) を用いて倍率 20,000 x で撮影することで得られた観察像 (scale bar: 100 nm)。

(B) (A) の負染色像のうち、a と b の粒子を拡大した撮影像 (scale bar: 20 nm)。赤線で粒子像を囲っている。下に示したモデル構造は酸性条件において想定される rRABVG 三量体の粒子径を示している。

3-5-2 クライオ電子顕微鏡による構造観察

クライオ電子顕微鏡による構造観察ではグリッドに載せたサンプルを液体エタン (-188°C) 中で急速凍結することで非晶質の氷膜の中に埋め込み、タンパク質を生理的な状態で固定化する。観察像のコントラストを高めるためにも、基本的に氷膜はできる限り薄く、粒子径に近い厚さであることが好ましい。加えて、氷膜内のタンパク質構造が均一で単分散性を示し、異なる配向であることが重要である。しかし、完全にランダムな配向を示すようなタンパク質は少なく、気液界面や隣接する粒子、支持膜との相互作用が働くことで特定の配向が優先されてしまう。また、気液界面でかかる力によってタンパク質の変性や不安定な複合体の解離が生じることが報告されている⁶⁰⁻⁶²。これを防ぐための方法としては界面活性剤の使用が広く知られている。サンプル中に適量で含まれる界面活性剤は気液界面に単層を形成することで、タンパク質と気液界面との接触によって受ける影響を遮断することができる^{60,63}。

そこで本研究においてもクライオ電子顕微鏡による構造観察にあたり、サンプル中に加える界面活性剤の条件検討を行った(表 3-4)。20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl のバッファーで調製した rRABVG に対して、グリッド作製直前に表 3-4 に示した終濃度となるように各界面活性剤を添加した。その結果、4 mM CHAPSO を添加することで rRABVG 三量体構造由来の粒子を観察することができた(図 3-15 A, B)。しかし、得られた観察像を用いて、電子顕微鏡用画像処理ソフトウェアの RELION⁶⁴ による単粒子解析を試みたが、二次元クラス平均像を得ることができなかった。150 kDa 以下のタンパク質の構造をクライオ電子顕微鏡によって解明した報告例⁶⁵こそあるが、rRABVG 三量体(約 167kDa)の分子量は小さい部類であるうえに、fusion domain が分子内相互作用面から浮いた位置にあると想定されるために非常に揺らぎやすい状態であることが考えられる(図 3-15 C)。これらの理由によって観察像のシグナルノイズ比が悪いために、二次元クラス平均像が得られなかったと考えられた。そこで rRABVG の生理的条件下での動的構造を解析するために高速原子間力顕微鏡による解析を行った。

表 3-4 界面活性剤の条件検討

界面活性剤	濃度	結果
NP40	0.01% (w/v)	凝集体が観察された
DOC	1 mM	凝集体が観察された
CHAPSO	4 mM	粒子像が少数見られた
Tween 20	0.05% (v/v)	凝集体が観察された
OG	1.30×10 ⁻⁶	粒子像が見られなかった
DDM	0.85 mM	粒子像とミセル像が混在していた
DM	0.085 mM	粒子像とミセル像が混在していた
LMNG	0.01 mM	凝集体が観察された

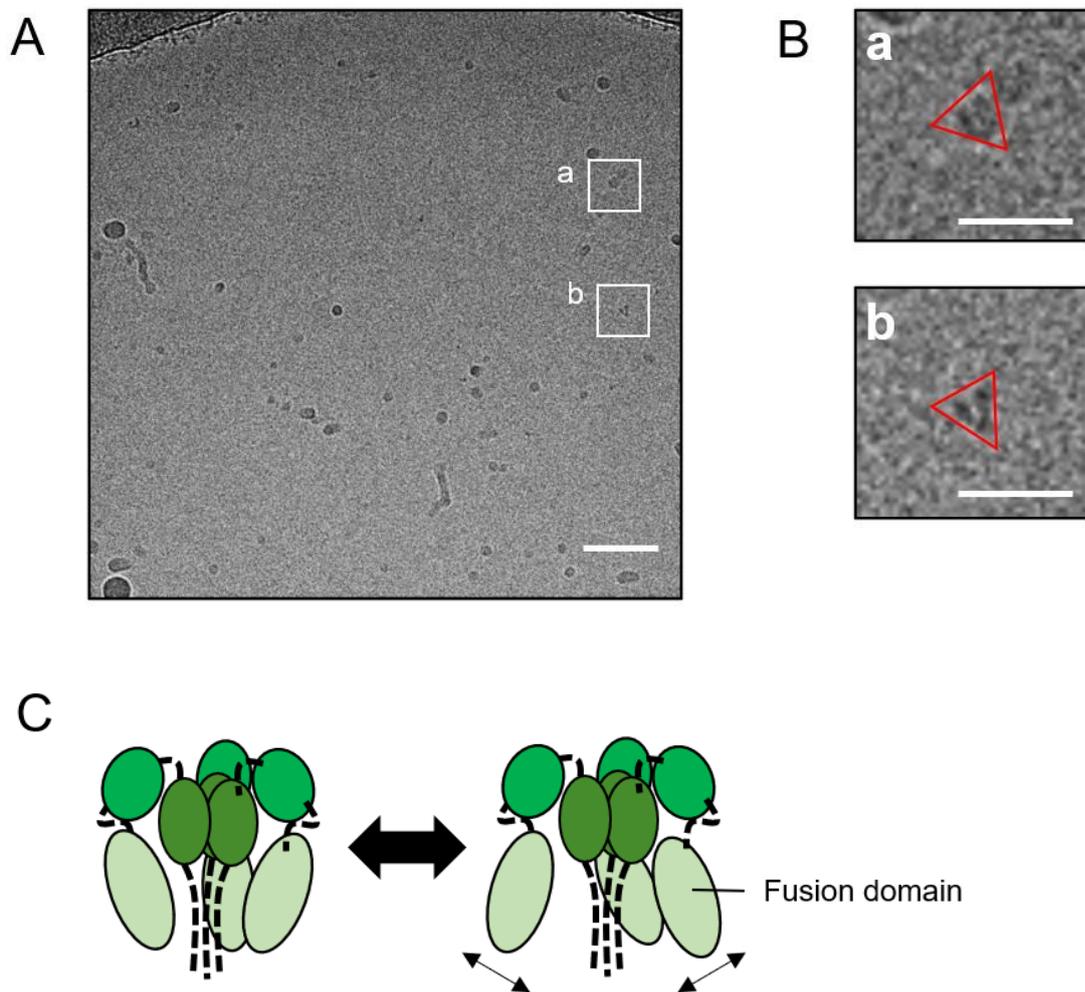


図 3-15 塩基性条件下の rRABVG クライオ電子顕微鏡観察像

(A) 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 4 mM CHAPSO のバッファーで調製した 0.3 mg/mL rRABVG を、Glacios を使用して倍率 92,000 x で撮影したことで得られた観察像 (scale bar: 50 nm)。

(B) (A) の観察像のうち、a と b の粒子を拡大した像 (scale bar: 20 nm)。赤線で粒子像を囲っている。

(C) 塩基性条件において想定される rRABVG 三量体構造の模式図。Fusion domain が浮いているため、揺らいでいる可能性が考えられる。

3-5-3 高速原子間力顕微鏡による rRABVG の動態解析

高速原子間力顕微鏡 (High-speed atomic force microscope, HS-AFM) は溶液中の生体分子の動態をナノメートル分解能で観察することができる走査型プローブ電子顕微鏡である。その最大の利点はカンチレバー探針を共振周波数で振動させながら試料表面をなぞることで、生理的条件下での動的構造をサブ秒時間分解能で観察することができる点にある (図 3-16 A)。そこで rRABVG の Fusion domain が溶液中において揺らぎやすい状態にあるかを評価するため、HS-AFM による動態解析を行った。解析では画像処理ソフトウェアの ImageJ によって、三量体の各サブユニットの二次元平面状における質量中心を記録した。その後、二点間を鎖間距離 (D_{cc}) として測定することで観察試料どの程度揺らぎうるかの動態解析を行った (図 3-16 B)。

rRABVG の観察はいずれも、SS-NEX あるいは MS-NEX にカンチレバー USC-F1.2-k0.15 (NanoWorld) を使用し、タッピングモードにて行った。塩基性条件 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) と酸性条件 (20 mM MES-NaOH pH6.0, 150 mM NaCl) の 2 条件で調製した rRABVG を、劈開したマイカ基板表面に吸着させ 2 frame/sec で観察を行ったところ、三量体を形成している rRABVG を観察することができた (図 3-17 A-D)。各条件で得られた観察像から 3 つの異なる粒子を合計 200 フレームとなるようにピックアップし、鎖間距離を測定した (図 3-18 A, B)。この時サブユニット間の識別が不可能な場合は鎖間距離を 0 として集計した。その結果、塩基性条件では 10.94 nm を、酸性条件では 12.05 nm を平均として大きく振れていることが明らかとなった。一方でコントロールとして観察したイヌジステンパーウイルス三量体膜融合タンパク質の CDV-F は rRABVG と比べてかなり安定な構造であり、一時的に構造が緩むことはあったが、その後すぐに元の位置に収まること示された (図 3-18 C, D)。

図 3-18 で示された結果は 200 フレーム分の観察像から得られた鎖間距離の数値を集計したものであり、時系列に並べた時の鎖間距離の推移については明らかとなっていない。そこでフレーム間の粒子の軌道を ImageJ に搭載されているプラグインの TrackMate で追跡し、鎖間距離の時間推移を評価した (図 3-19)。図 3-18 と同様に ImageJ によって連続した 70 フレームにおける各サブユニットの質量中心の座標を決定した後、TrackMate によってサブユニットごとの軌道を追跡した。3 つのサブユニットを A, B, C と設定し、二点間距離 AB, BC, CA をフレーム毎に算出した後、辺ごとに時系列順に並べて示した (図 3-19 A-C)。その結果、塩基性条件と酸性条件共に一定の鎖間距離を長時間維持することはなく、常に大きく振れていることが明らかとなった (図 3-19 B, C)。

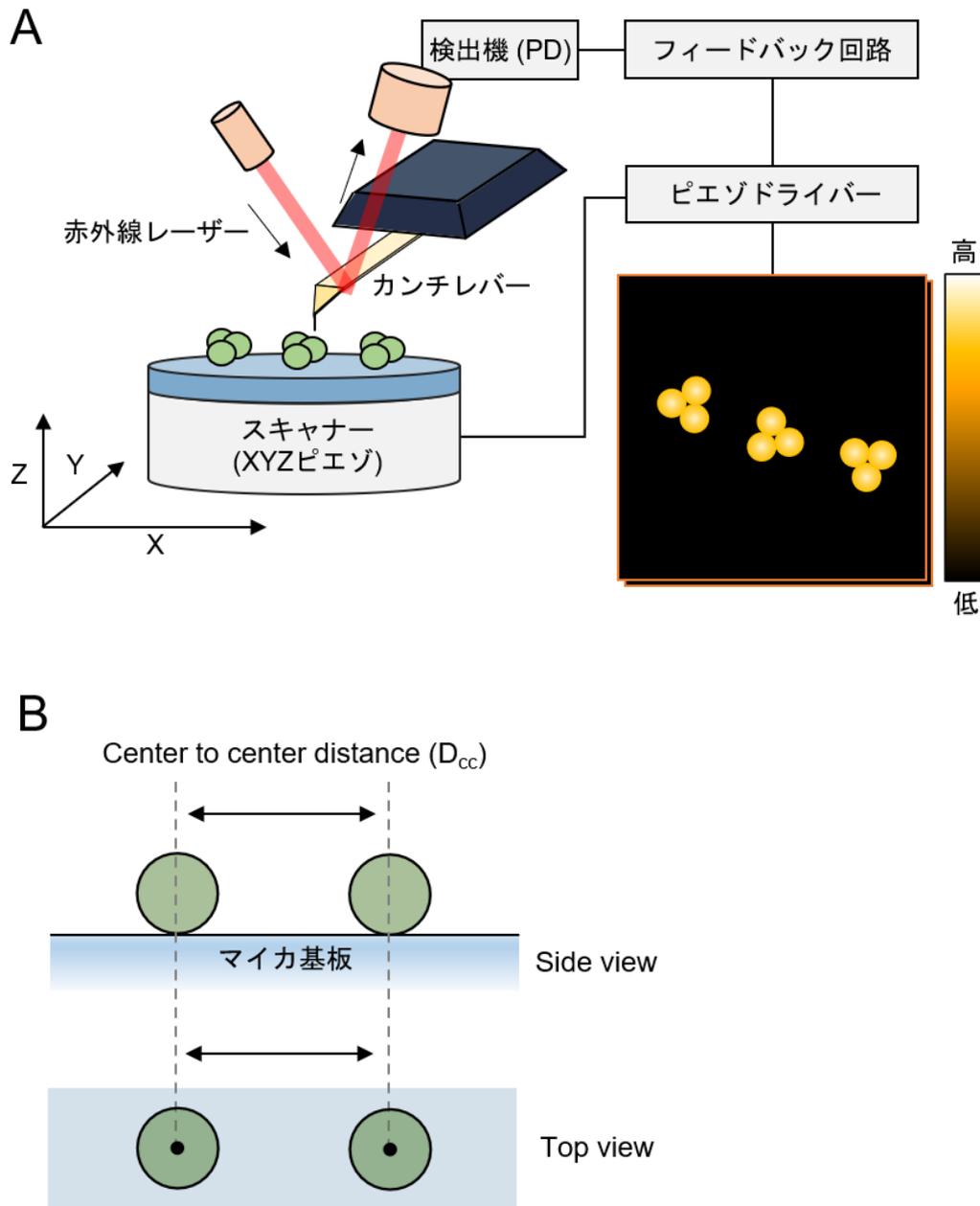


図 3-16 HS-AFM による rRABVG の動態解析

(A) HS-AFM 原理模式図。試料を載せたスキャナーを XY 方向に走査し、カンチレバー先端の探針を振動させながら試料表面をなぞる。試料に探針が乗り上げるとカンチレバーがたわみ、振幅が変化する。これを常に一定に維持するように Z 軸方向を制御することで表面形状を表すことができる。

(B) 観察画像の解析手法模式図。サブユニットを二次元平面上に投影した際の質量中心を記録し、その二点間を鎖間距離 (D_{cc}) として測定する。

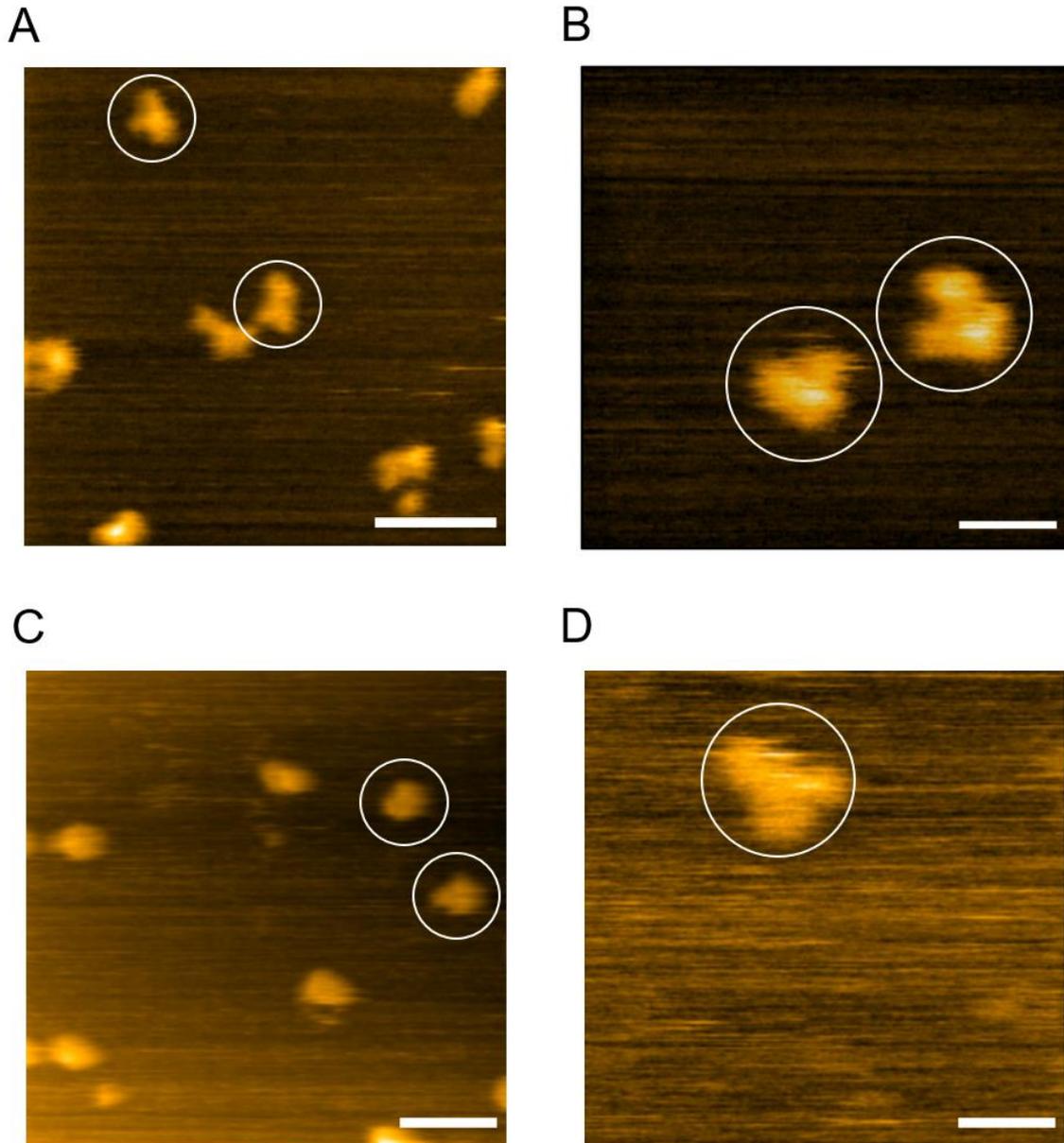


図 3-17 各条件における rRABVG の HS-AFM 観察像

三量体構造が明瞭な粒子像を白色円で示している。

(A, B) 塩基性条件 (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl) における rRABVG の HS-AFM 観察像 (A) 200x200 nm², scale bar: 50 nm (B) 100x100 nm², scale bar: 10 nm

(C, D) 酸性条件 (20 mM MES-NaOH pH6.0, 150 mM NaCl) における rRABVG の HS-AFM 観察像 (C) 250x250 nm², scale bar: 50 nm (D) 100x100 nm², scale bar: 10 nm

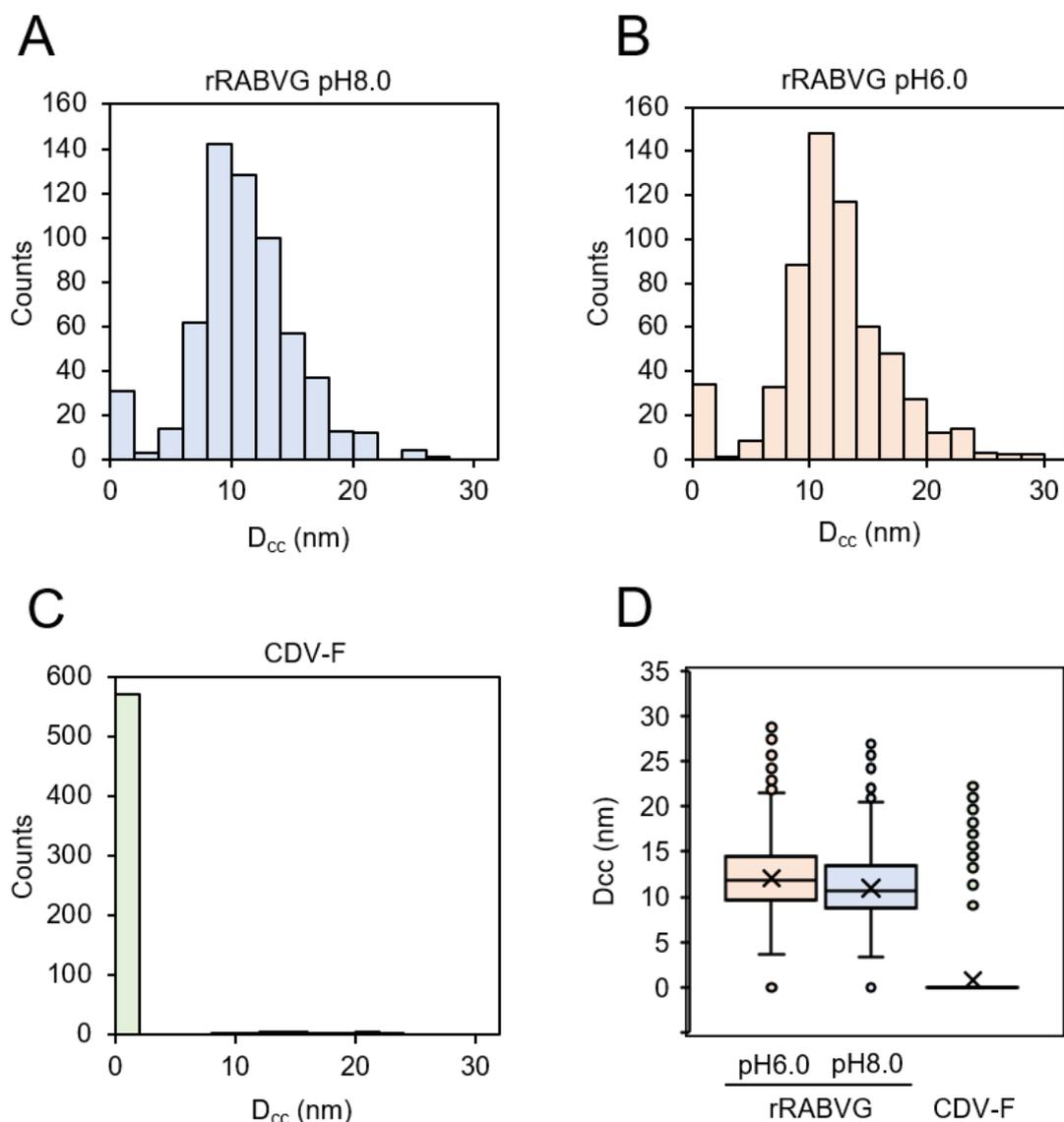


図 3-18 各抗体断片の熱安定性の評価

(A) 塩基性条件 (pH8.0), (B) 酸性条件 (pH6.0) にて 200 フレーム観察中に見られた rRABVG の鎖間距離の分布図を示している。

(C) コントロールとして用いた CDV-F を 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl のバッファー中で観察した際の鎖間距離の分布図を示している。サブユニット間の識別ができなかった場合の鎖間距離は 0 としている。

(D) (A)-(C) の各条件で得られた鎖間距離の分布を箱ひげ図として示して比較した。×は平均値、○は外れ値を示している。

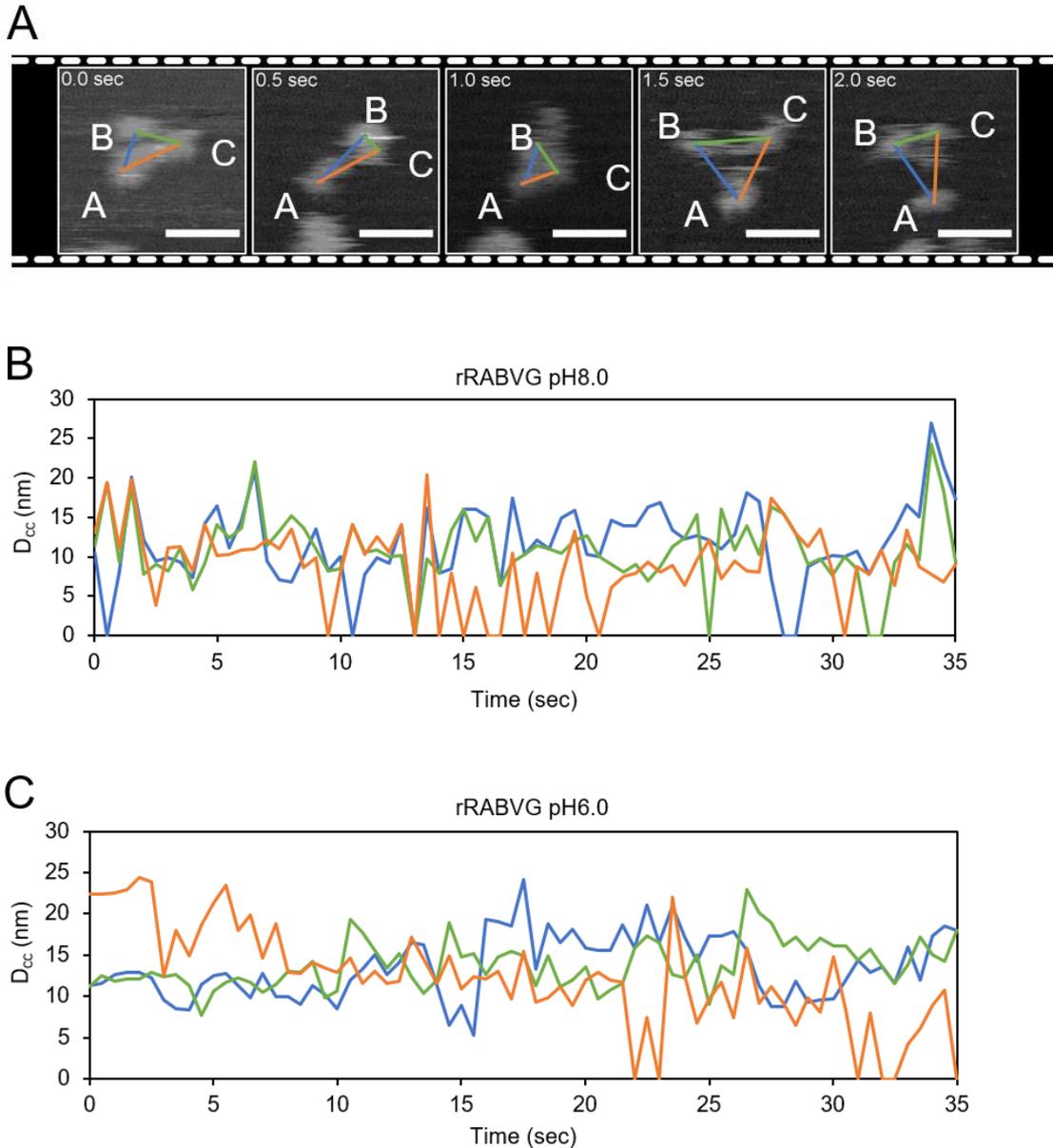


図 3-19 各条件における rRABVG 鎖間距離の推移

(A) 塩基性条件 (pH8.0) における rRABVG の HS-AFM 観察像。鎖間距離の推移を解析するにあたり使用した画像のうち、最初の 5 フレームを示している。TrackMate によってサブユニットの軌道を追跡し、3 つをそれぞれ A, B, C と設定している。二点間距離 AB, BC, CA をそれぞれ青線、緑線、橙線で示している。

(B, C) rRABVG を (B) 塩基性条件、(C) 酸性条件で観察した際の鎖間距離の推移。縦軸が鎖間距離 (D_{cc})、横軸が時間 (sec) を表している。

3-6 rRABVG-Fab 複合体の構造解析

高速原子間力顕微鏡を用いた動態解析によって rRABVG は生理的条件下においてサブユニット間が常に揺らいだ状態にあることが示唆された。しかし単粒子解析によって高分解能の構造を得るにはタンパク質の構造安定化が必須である。構造の安定化方法としては分子内相互作用を強固にする変異を導入する方法などが候補として挙げられるが、RABVG に関して、抗体との結合によって膜融合前構造で安定化させるといった報告がある⁴⁹。そこでまず、3-2 にて調製した rRABVG との相互作用解析によって特に高い結合親和性を示し、分子量も大きい 15-13 Fab との複合体構造として調製し、解析を進めた。

3-6-1 rRABVG-Fab 複合体の調製

3-1 及び 3-2 にて示した通りに調製した rRABVG と 15-13 Fab を 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl の条件下で 1:1 のモル濃度比で混合し、室温で 1 時間インキュベートすることで複合体を調製した。混合後のサンプルをゲル濾過クロマトグラフィーにかけたところ、rRABVG と比較して溶出位置が高分子量側へとシフトしていた (図 3-20 A)。また該当するピークを SDS-PAGE で展開し、銀染色によって評価したところ rRABVG 由来のバンドと 15-13 Fab 由来のバンドが観察されたことから、複合体として調製されたことが示唆された (図 3-20 B)。

3-6-2 負染色法による構造観察

調製した複合体を用いて負染色法による構造観察を行った。条件は rRABVG を塩基性条件下で観察した時と同様である。rRABVG 単体の観察像と比較して、複合体観察像では rRABVG の側面に突起状の像が観察された (図 3-20 C, D)。塩基性条件下において観察された rRABVG 三量体像と比較すると、rRABVG-Fab 複合体では rRABVG のサブユニット側面に突起状の像が見られた。また、複数の突起をもつ像が見られることから、一つの rRABVG に対して、複数の 15-13 Fab が結合可能であることが示唆された。

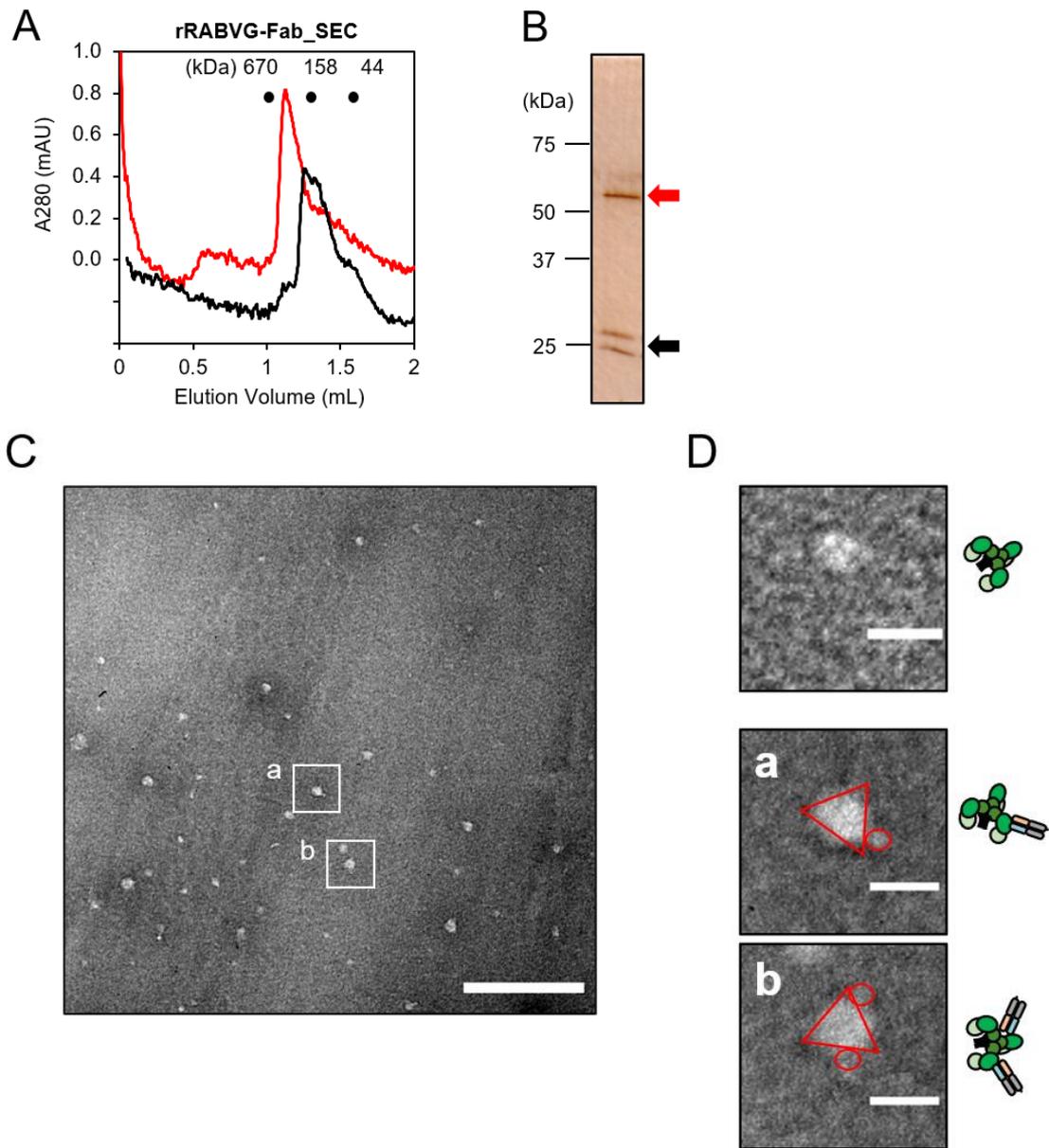


図 3-20 負染色法による rRABVG-Fab 断片複合体の構造観察

- (A) rRABVG (黒線) 及び rRABVG-Fab 複合体 (赤線) のゲル濾過クロマトグラフィー。
- (B) rRABVG-Fab 複合体のゲル濾過クロマトグラフィーのピークを SDS-PAGE で展開し、銀染色によって検出した。赤矢印は rRABVG、黒矢印は 15-13 Fab 由来のバンドを示している。
- (C) 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl のバッファーで調製した 0.1 mg/mL rRABVG-Fab 複合体を 1% モリブデン酸アンモニウムで染色し、TEM を用いて倍率 20,000 x で撮影することで得られた観察像 (scale bar: 200 nm)。
- (D) (A) の負染色像のうち、a と b の粒子を拡大した撮影像及び rRABVG 単体像 (scale bar: 20 nm)。赤線で粒子像を囲っており、モデル構造は予想される投影方向を示している。

4 章 考察

4-1 組換え RABVG の調製

本研究ではカイコバキュロウイルス発現系を用いて rRABVG 三量体を安定して調製することに成功した。rRABVG には三量体化ドメインである foldon 配列が導入されていたのに加えて、エンベロープ膜近傍に位置する fusion loop 1 (73-79 aa) 及び fusion loop 2 (117-125 aa) に Gly-Gly-Ser-Gly-Gly 変異を導入した⁴⁵。その結果、野生型 rRABVG では精製途中で完全に凝集することがあったところを、比較的安定して高純度で調製することができた (図 3-5 A, B)。本研究ではその理由を得ることは叶わなかったが、Gly と Ser のみで形成される GS リンカーの小さくて柔軟性の高い性質が貢献しているのではないだろうか。また、粗精製として行った硫酸分画において 30%飽和度で rRABVG を沈殿させたことで、以降の精製操作への夾雑物の持ち込みを最低限に抑えられたことも高純度な rRABVG を調製することができた一つの要因であると考えられる。これまでに RABVG や VSV-G は弱酸性条件下において、塩基性条件での構造よりも疎水性の高い活性化状態への構造変化を引き起こすことが報告されている^{19,66,67}。Yang らによって明らかとなった RABVG 単量体構造においては central domain (CD) 周辺に疎水性領域のパッチは見られないが (図 3-21)⁴⁵、本研究の HS-AFM による動態解析によって rRABVG は溶液中においてサブユニット間の解離が頻繁に生じているということが明らかとなったことから (図 3-19 B, C)、rRABVG の構造変化の過程や高い動的性質によって疎水性の高い三次元構造を形成している可能性が考えられる。これによって rRABVG 同士やカイコ体液由来の夾雑物との非特異的結合を引き起こし凝集体が生じているのだと予想される。実際、ゲル濾過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE の結果においても、灰色線で示した溶出画分では rRABVG 由来のバンドと 150 kDa 付近のカイコ体液由来の夾雑物のバンドが共存しており、黒色線で示した溶出画分 (ボイドボリューム画分) にも rRABVG の溶出が確認された (図 3-5 A, B)。従って、精製後期に持ち込まれる夾雑物の比率が増えるほど夾雑物との凝集体が生じ、最終的な rRABVG の収量が低下すると予想される。

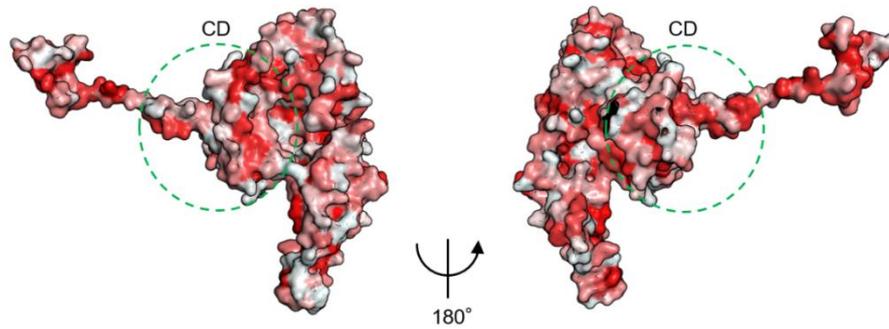


図 3-21 RABVG の疎水性、親水性残基の分布モデル

RABVG (塩基性条件、pH8.0) (PDB ID: 6LGX) の構造において各アミノ酸残基を疎水性度、親水性度によって色分けして示している。白色は親水性残基を示しており、濃い赤色になるにつれて疎水性度が高くなる。central domain (CD) の部分を緑破線で囲っている。

4-2 中和抗体断片の特性

rRABVG に対する結合特性や中和活性の分子基盤の解明のために調製した Fab 断片及び scFv の結合親和性の評価を行ったところ、15-13 Fab の K_D 値は 5.6 nM と算出された。臨床試験に進んだ既報の抗体カクテル CL184 を構成する CR57、CR4098 mAb の K_D 値はアビディティ効果を含めて 2.4 nM と 4.5 nM と報告されており⁶⁶、15-13 Fab は一価の結合でありながらもこれらのモノクローナル抗体に匹敵する高い結合親和性を示した。一方で、15-13 scFv HL 及び 15-13 scFv LH の K_D 値はそれぞれ 24.9 nM と 17.7 nM であり、15-13 Fab と比較して結合親和性が低下していた。DSF 法による熱安定性評価を行ったところ Fab 断片の T_m 値が 60°C 以上であったのに対し、scFv の T_m 値はいずれも 40°C 前後であった (図 3-12 B, D)。これは C_{H1} と C_L によるドメイン間相互作用が存在しないことから抗体断片の安定性が低下しているためであり、これによって結合親和性の低下が見られたと考えられる。15-13 抗体断片がいずれも nM レベルの結合を示したのに対して 12-22 の抗体断片の結合親和性はいずれも μ M レベルであったが、複数の RABV 株に対して 15-13 と同程度の IFA titer を示す結果が得られていることから⁵⁵、全長抗体ではアビディティ効果によって強い結合を示していると予想される。本研究に用いたこれらの抗体はマウスモノクローナル抗体であるため、臨床での使用に向けてはヒト化する必要がある。また、Fc 依存性エフェクター機能を阻害する変異を導入したモノクローナル抗体はウイルス感染阻害試験によって中和活性を保持していたことが明らかになったものの、in vivo 試験においてはマウスを保護することができなかったことから、脳内の RABV のクリアランスには全長抗体が必要であると考えられている⁶⁷。このように抗体を狂犬病の治療に使用するには多数の問題があるが、結合親和性の高さや有効性の広さの観点からすると 15-13 は良い抗体候補となる可能性はある。

4-3 負染色法及びクライオ電子顕微鏡による構造観察

調製した rRABVG について負染色法による構造観察を行ったところ、塩基性条件ではモデル構造に類似した三量体構造を形成している粒子像が得られた一方で (図 3-13 B)、酸性条件で得られた粒子像では長径がモデル構造から算出した 13 nm より大きい 20 nm 以上と推定された。(図 3-14 A)。粒子像が反映している構造には二つの候補が考えられ、一つは膜貫通領域の疎水性部分を介して二つの粒子が相互作用している構造である。RABV エンベロープ膜から可溶化した RABVG について負染色法による構造観察を行ったところ、膜貫通領域近傍を介した **Doublets of trimer** 構造が多数観察されたという報告がある²⁴。しかし本研究で調製した rRABVG は膜貫通領域及び細胞質ドメインを除いているため、同様の構造を取る可能性は低いと考えられた。もう一つの候補は C 末端側の **foldon** を軸として三量体を形成し、開いた構造を取っていることが考えられる。本研究で行った高速原子間力顕微鏡による動態解析によっても rRABVG は酸性条件においてサブユニット間が大きく解離することが明らかとなったことから (図 3-18 B)、酸性条件で見られた 20 nm 以上の細長い構造は各サブユニットが **foldon** を軸に大きく開いた形態を反映していると予想される。塩基性条件においてもサブユニット間の解離は見られたため、負染色像においても同様の解離形態が観察されうると考えられる。しかし、塩基性条件において RABVG 単量体はヘアピン構造を形成しているため⁴⁵、直線状構造を形成する酸性条件とは異なり、解離時と非解離時の粒子像としての差が少ないと予想される。

クライオ電子顕微鏡による構造解析では両イオン性界面活性剤である CHAPSO をバッファ中に添加することで氷膜中に粒子を観察することができた (図 3-15 A, B)。しかし、rRABVG 濃度は 0.30 mg/mL とそこまで低くないにもかかわらず、氷膜中に観察された粒子数は少ない傾向にあった (図 3-15 A)。グリッドのホール外のカーボン支持膜上に吸着している様子も見られなかったことから、グリッド作製時のプロッティング操作において、濾紙に多くの rRABVG が吸われてしまったと考えられる。得られた rRABVG 観察像を用いて単粒子解析を試みたが二次元クラス平均像を得ることができなかった。良い二次元クラス平均像を得るためにはシグナルノイズ比の良い粒子像を得る必要がある。しかし、rRABVG の分子量が小さいことや、後の高速原子間力顕微鏡による観察で明らかとなったサブユニットの揺らぎが障害となっている。そこで分子量を増大させ、シグナルノイズ比を改善するとともに、構造の安定性向上の両方を期待して抗体との複合体として調製した (図 3-20)。

まず、特に高い結合親和性を示して分子量も大きい 15-13 Fab との複合体を調製し、負染色法による構造観察を行った。その結果、塩基性条件で観察された rRABVG 粒子像の各サブユニットの側面に 15-13 Fab 由来の突起がある粒子が複数観察された (図 3-20 C, D)。観察像より、一つの rRABVG に対して複数の Fab 断片が結合できることが示唆されたため、rRABVG-Fab 複合体の最大の分子量は 300 kDa 以上になると予想される。一方で、12-22 についてはその結合親

和性の低さや解離の速さといった特性から複合体解析には向いてないと考えられる。クライオ電子顕微鏡による構造観察で使用するグリッドは通常 0.05-5 μM の濃度のタンパク質溶液を用いて作製する。従って、結合親和性が μM レベルの 12-22 では多くのタンパク質で複合体の解離が生じてしまうと想定される。架橋剤を用いて共有結合を形成することで解離を防ぐ方法も広く知られているが^{68,69}、サブユニット間解離が大きい rRABVG では rRABVG 間の架橋が多数形成されると考えられる。従って、今後は得られた RABVG-15-13 Fab 複合体についてクライオ電子顕微鏡による構造観察を進めていくと同時に、複合体構造解析に適した他の抗体候補の探索も進めていきたい。

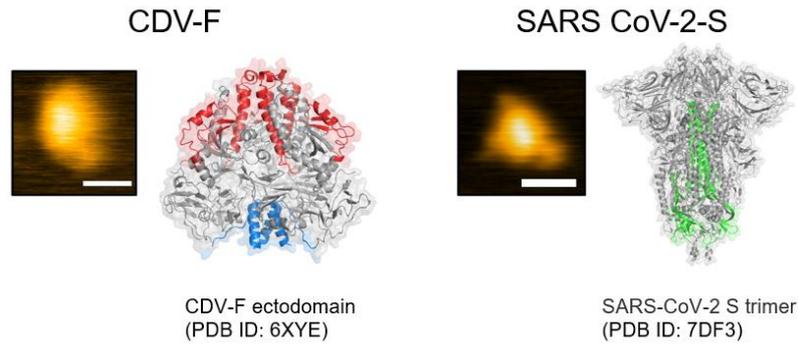
4-4 高速原子間力顕微鏡による動態解析

高速原子間力顕微鏡による rRABVG では塩基性条件と酸性条件の溶液中において、三量体を構成する各サブユニットが常に振れている状態であることが示唆された (図 3-19 B, C)。当研究室ではこれまでに RABVG や CDV-F の他にも SARS CoV-2-S の溶液中での動態観察に取り組んできたが、SARS CoV-2-S も CDV-F と同様に溶液中において三量体構造が非常に安定な状態である様子が観察されている (図 3-22)。これらのタンパク質は Heptad repeat によって形成される helix bundle によって構造が安定しているために HS-AFM 観察像において解離が見られないと考えられる。一方で RABVG は先日、プレプリントとして三量体構造が公開され⁷²、central domain helix とその周辺に形成される bracket loop 及び corkscrew loop によって三量体構造を形成しているということが示された。加えて、fusion loop 間の相互作用や fusion loop と脂質膜との相互作用も膜融合前型の三量体構造を維持するのに重要であることが示唆された。本研究で調製した rRABVG は fusion loop に変異を導入しており、マイカ上にランダムな配向で吸着している rRABVG の動態を HS-AFM によって観察していたため、central domain 間の弱い相互作用のみが形成され、サブユニット間の解離が頻繁に見られたのだと予想される。膜融合前型の構造から膜融合後型の構造へとシフトする際には fusion loop が RABV 膜から離れることや (図 1-5 B)、調製した rRABVG の疎水性の高さから、本研究で得られた rRABVG の動的性質は RABVG の活性化状態から構造変化の過程を反映しているのだと想定される (図 3-23)。マイカ上に脂質膜を構築したところへタンパク質を埋めて、その動態を評価するといった解析法も技術的に可能であるため^{70,71}、今後は脂質膜上に構築した RABVG の動態について解析を進めて、今回得られた結果と比較したい。

より良い中和抗体を誘導するためのアプローチの一つに多くの中和抗体エピトープを露出させ、非中和抗体エピトープを閉塞させるような安定な抗原を作製する方法がある。2020 年始めから全世界にて脅威となっている SARS-CoV-2-S に対するワクチンとして使用されている Moderna TX 社製の mRNA-1273 には S タンパク質を膜融合前構造に安定化させるような S-2P 変異が導入されている⁷²。また、HIV-1 の中和抗体の免疫原となる Env についても安定な三量

体タンパク質の設計に関する研究が行われている⁷⁶。本研究の高速原子間力顕微鏡を用いた動態解析によって **rRABVG** は生理的条件下においてサブユニットが大きく振れていることが明らかになり、これは **RABVG** の活性化状態あるいは構造遷移の過程の動態を反映している可能性が考えられる。これを抑制するように改変した **RABVG** はネイティブな構造より良い免疫原となる可能性がある。今後、**RABVG** の構造や動態に関する理解を深めることで新しい治療及び予防法の開発戦略に大きな知見を与えると期待される。

クラスI 膜融合タンパク質



クラスIII 膜融合タンパク質

RABVG

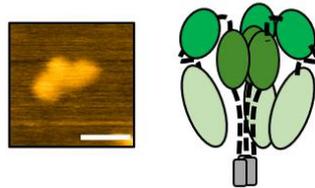


図 3-22 各膜融合タンパク質の HS-AFM 観察像及び立体構造

HS-AFM 画像 scale bar: 20 nm。立体構造において色が付いている箇所はヘリックスによる相互作用が形成されている部分を示している。

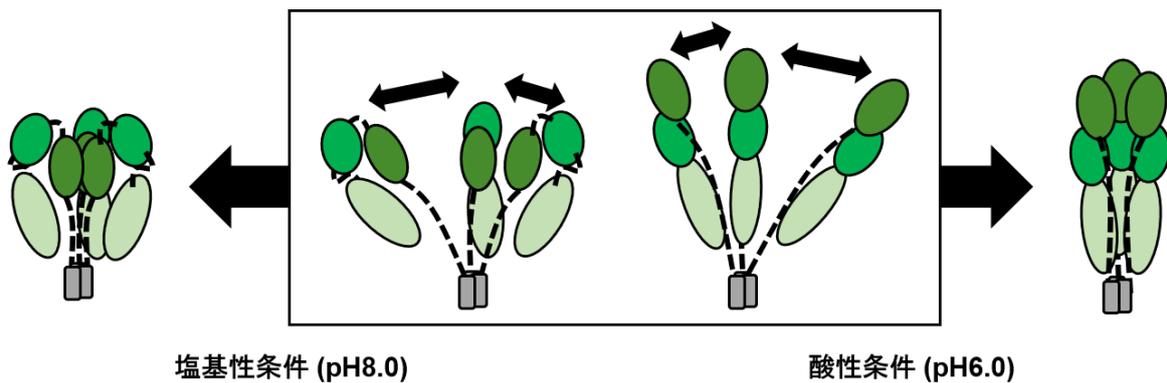


図 3-23 rRABVG の生理的条件下での動態モデル

高速原子間力顕微鏡による rRABVG の動態解析によって得られた結果から想定される生理的条件下での動態モデルを示している。

5章 総括

本研究ではカイクバキュロウイルス発現系を用いて組換え RABVG (rRABVG) を三量体タンパク質として安定して調製することに成功した。また、実験室株や野生株を含む多様なウイルス株由来の RABVG を認識する中和抗体 15-13 mAb と 12-22 mAb を scFv や Fab 断片といった抗体断片として調製することに成功した。調製した中和抗体断片が rRABVG との特異的な結合を保持しているか解析するために Biolayer interferometry 法による相互作用解析を行った。15-13 Fab 及び scFv は rRABVG に特異的に結合し、速度論的パラメータを算出したところ nM レベルの高い結合親和性を示した。これは臨床試験に進んだ既報の抗体カクテル CL184 を構成する CR57、CR4098 mAb の K_D 値に匹敵するほど高い結合親和である。一方で 12-22 の抗体断片の結合親和性は μM レベルであったものの 15-13 と同様に rRABVG に特異的に結合した。また、構造エピトープを持つ 12-22 抗体断片が rRABVG に結合したことから、本研究で調製した rRABVG が抗原性を保持していることが示唆された。

調製した rRABVG を用いて負染色法による構造観察を行ったところ、塩基性条件では膜融合前型のモデル構造に類似した構造を、酸性条件では膜融合後型構造に特徴的な細長い形態をとった構造が観察された。更なる高分解能の構造を得るためにクライオ電子顕微鏡による構造観察を行ったところバッファーに 4 mM CHAPSO を添加することで氷膜内に粒子を観察することができた。しかし、単粒子解析を行ったところ二次元クラス平均像が得られず、構造情報が得られなかった。この原因として rRABVG は揺らぎやすい状態にあるために観察像のシグナルノイズ比が悪くなっていると考えた。これを検証するため高速原子間力顕微鏡による rRABVG の動態解析を行ったところ、rRABVG は結晶構造などでみられるような硬い構造とは異なり、塩基性条件、酸性条件の両方において、三量体を形成する各サブユニット間が常に大きく振れていることが明らかとなった。マイカ表面上で観察された rRABVG の動態は、膜融合前型の構造から膜融合後型の構造へとシフトする際には fusion loop が RABV 膜から離れることや、その疎水性の高さから、RABVG の活性化状態から構造変化への過程を反映しているのだと考えられた。クライオ電子顕微鏡での構造解析にはタンパク質の構造安定化が必須であるため、本研究では 15-13 Fab と rRABVG の複合体として調製することで、構造の安定化を目指した。調製した複合体について負染色法による構造観察を行ったところ、rRABVG の側面に複数の 15-13 Fab が結合しているような観察像が得られた。これを用いてクライオ電子顕微鏡による構造観察を進めることや、今後脂質膜上に再構築した rRABVG の動態解析に取り組むことで、中和抗体の結合様式や生理的条件下に存在する RABVG 三量体構造の特性に関する理解が深まり、RABVG に着目した治療及び予防法の開発戦略に大きな知見を与えると期待される。

参考文献

1. Cox, J. H., Dietzschold, B. & Schneider, L. G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect. Immun.* **16**, 754 (1977).
2. Winkler, W. G., Fashinell, T. R., Leffingwell, L., Howard, P. & Conomy, J. P. Airborne Rabies Transmission in a Laboratory Worker. *JAMA* **226**, 1219–1221 (1973).
3. CONSTANTINE, D. G. Rabies transmission by nonbite route. *Public Health Rep.* **77**, 287 (1962).
4. Helmick, C. G., Tauxe, R. V & Vernon, A. A. Is There a Risk to Contacts of Patients with Rabies? **9**, 511–518.
5. Aramburo, A., Willoughby, R. E., Bollen, A. W., Glaser, C. A., Hsieh, C. J., Davis, S. L., Martin, K. W. & Roy-Burman, A. Failure of the Milwaukee Protocol in a Child With Rabies. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 572–574 (2011).
6. Willoughby, R. E., Tieves, K. S., Hoffman, G. M., Ghanayem, N. S., Amlie-Lefond, C. M., Schwabe, M. J., Chusid, M. J. & Rupprecht, C. E. *brief report Survival after Treatment of Rabies with Induction of Coma.* www.nejm.org (2005).
7. Hampson, K., Coudeville, L., Lembo, T., Sambo, M., Kieffer, A., Attlan, M., Barrat, J., Blanton, J. D., Briggs, D. J., Cleaveland, S., Costa, P., Freuling, C. M., Hiby, E., Knopf, L., Leanes, F., Meslin, F.-X., Metlin, A., Miranda, M. E., Müller, T., Nel, L. H., Recuenco, S., Rupprecht, C. E., Schumacher, C., Taylor, L., Vigilato, M. A. N., Zinsstag, J., Dushoff, J. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003709 (2015).
8. Rabies. https://www.who.int/health-topics/rabies#tab=tab_1. (accessed on 8 October 2021)
9. Wilde, H., Tipkong, P. & Khawplod, P. Economic issues in postexposure rabies treatment. *J. Travel Med.* **6**, 238–242 (1999).
10. Rabies vaccines: WHO position paper – April 2018 *Wkly. Epidemiol. Rec.* **93**, 201–219 (2018).
11. Khawplod, P., Wilde, H., Tepsumethanon, S., Limusanno, S., Tantawichien, T., Chomchey, P., Ayuthaya, A. B. N. & Wangroonsarb, Y. Prospective immunogenicity study of multiple intradermal injections of rabies vaccine in an effort to obtain an early immune response without the use of immunoglobulin. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 1562–1565 (2002).
12. Warrell, M. J. Current rabies vaccines and prophylaxis schedules: preventing rabies before and after exposure. *Travel Med. Infect. Dis.* **10**, 1–15 (2012).
13. Tenzin, Wangdi, K. & Ward, M. P. Human and animal rabies prevention and control cost in Bhutan, 2001–2008: The cost–benefit of dog rabies elimination. *Vaccine* **31**, 260–270 (2012).
14. Hanlon, C. A., Kuzmin, I. V., Blanton, J. D., Weldon, W. C., Manangan, J. S. & Rupprecht, C. E. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res.* **111**,

- 44–54 (2005).
15. Kuzmin, I. V., Novella, I. S., Dietzgen, R. G., Padhi, A. & Rupprecht, C. E. The rhabdoviruses: Biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 541–553 (2009).
 16. Conzelmann, K.-K., Cox, J. H., Schneider, L. G. & Thiel, H.-J. Molecular Cloning and Complete Nucleotide Sequence of the Attenuated Rabies Virus SAD 819.
 17. Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G. & Rougeon, F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 3914–3918 (1986).
 18. Piccinotti, S. & Whelan, S. P. J. Rabies Internalizes into Primary Peripheral Neurons via Clathrin Coated Pits and Requires Fusion at the Cell Body. *PLoS Pathog.* **12**, e1005753 (2016).
 19. Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Knossow, M. & Flamand, A. Low-pH Conformational Changes of Rabies Virus Glycoprotein and Their Role in Membrane Fusion. *J. Virol.* **67**, 1365–1372 (1993).
 20. Kelly, R. M. & Strick, P. L. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J. Neurosci. Methods* **103**, 63–71 (2000).
 21. Deinhardt, K., Reversi, A., Berninghausen, O., Hopkins, C. R. & Schiavo, G. Neurotrophins Redirect p75^{NTR} from a clathrin-independent to a clathrin-dependent endocytic pathway coupled to axonal transport. *Traffic* **8**, 1736–1749 (2007).
 22. Mentis, G. Z., Gravell, M., Hamilton, R., Schneider, N. A., O'Donovan, M. J. & Schubert, M. Transduction of motor neurons and muscle fibers by intramuscular injection of HIV-1-based vectors pseudotyped with select rabies virus glycoproteins. *J. Neurosci. Methods* **157**, 208–217 (2006).
 23. Klingen, Y., Conzelmann, K.-K. & Finke, S. Double-Labeled Rabies Virus: Live Tracking of Enveloped Virus Transport. *J. Virol.* **82**, 237–245 (2008).
 24. Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Tuffereau, C., Knossow, M. & Flamand, A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* **182**, 627–632 (1992).
 25. Tuffereau, C., Bénéjean, J., Blondel, D., Kieffer, B. & Flamand, A. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75^{NTR}) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* **17**, 7250 (1998).
 26. Thoulouze, M.-I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H. & Lafon, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J. Virol.* **72**, 7181–7190 (1998).
 27. Lentz, T. L., Burrage, T. G., Smith, A. L., Crick, J. & Tignor, G. H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science (80-)*. **215**, 182–184 (1982).
 28. Wang, J., Wang, Z., Liu, R., Shuai, L., Wang, X., Luo, J., Wang, C., Chen, W., Wang, X., Ge, J., He, X., Wen, Z. & Bu, Z. Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus. *PLoS Pathog.* **14**, (2018).

29. Gaudin, Y., Tuffereau, C., Sefretain, D., Knossow, M. & Flamand, A. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* **65**, 4853–4859 (1991).
30. Dietzschold, B., Wunner, W. H., Wiktor, T. J., Lopes, A. D., Lafon, M., Smith, C. L. & Koprowski, H. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 70–74 (1983).
31. Dietzschold, B., Wiktor, T. J., Trojanowski, J. Q., Macfarlan, R. I., Wunner, W. H., Torres-Anjel, M. J. & Koprowski, H. Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. *J. Virol.* **56**, 12–18 (1985).
32. Yamada, K., Noguchi, K. & Nishizono, A. Efficient N-glycosylation at position 37, but not at position 146, in the street rabies virus glycoprotein reduces pathogenicity. *Virus Res.* **179**, 169–176 (2014).
33. Takayama-Ito, M., Ito, N., Yamada, K., Sugiyama, M. & Minamoto, N. Multiple amino acids in the glycoprotein of rabies virus are responsible for pathogenicity in adult mice. *Virus Res.* **115**, 169–175 (2006).
34. Takayama-Ito, M., Inoue, K. ichi, Shoji, Y., Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., Kurane, I. & Morimoto, K. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Res.* **119**, 208–215 (2006).
35. Faber, M., Faber, M.-L., Papaneri, A., Bette, M., Weihe, E., Dietzschold, B. & Schnell, M. J. A Single Amino Acid Change in Rabies Virus Glycoprotein Increases Virus Spread and Enhances Virus Pathogenicity. *J. Virol.* **79**, 14141 (2005).
36. Luo, J., Zhang, B., Wu, Y. & Guo, X. Amino Acid Mutation in Position 349 of Glycoprotein Affect the Pathogenicity of Rabies Virus. *Front. Microbiol.* **11**, 481 (2020).
37. Faber, M., Pulmanusahakul, R., Hodawadekar, S. S., Spitsin, S., McGettigan, J. P., Schnell, M. J. & Dietzschold, B. Overexpression of the Rabies Virus Glycoprotein Results in Enhancement of Apoptosis and Antiviral Immune Response. *J. Virol.* **76**, 3374 (2002).
38. Morimoto, K., Hooper, D. C., Spitsin, S., Koprowski, H. & Dietzschold, B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J. Virol.* **73**, 510–518 (1999).
39. Nigg, A. J. & Walker, P. L. Overview, prevention, and treatment of rabies. *Pharmacotherapy* **29**, 1182–1195 (2009).
40. Both, L., Banyard, A. C., van Dolleweerd, C., Horton, D. L., Ma, J. K. C. & Fooks, A. R. Passive immunity in the prevention of rabies. *Lancet Infect. Dis.* **12**, 397–407 (2012).
41. O'Brien, K. L., Nolan, T. & Rabies, on behalf of the S. W. on. The WHO position on rabies immunization – 2018 updates. *Vaccine* **37**, A85 (2019).
42. Sparrow, E., Torvaldsen, S., Newall, A. T., Wood, J. G., Sheikh, M., Kieny, M. P. & Abela-

- Ridder, B. Recent advances in the development of monoclonal antibodies for rabies post exposure prophylaxis: A review of the current status of the clinical development pipeline. *Vaccine* **37**, A132–A139 (2019).
43. Chao, T.-Y., Ren, S., Shen, E., Moore, S., Zhang, S., Chen, L., Rupprecht, C. E. & Tsao, E. SYN023, a novel humanized monoclonal antibody cocktail, for post-exposure prophylaxis of rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0006133 (2017).
 44. Bakker, A. B. H., Python, C., Kissling, C. J., Pandya, P., Marissen, W. E., Brink, M. F., Lagerwerf, F., Worst, S., van Corven, E., Kostense, S., Hartmann, K., Weverling, G. J., Uytdehaag, F., Herzog, C., Briggs, D. J., Rupprecht, C. E., Grimaldi, R. & Goudsmit, J. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus: Safety, tolerability, and neutralizing activity. *Vaccine* **26**, 5922–5927 (2008).
 45. Yang, F., Lin, S., Ye, F., Yang, J., Qi, J., Chen, Z., Lin, X., Wang, J., Yue, D., Cheng, Y., Chen, Z., Chen, H., You, Y., Zhang, Z., Yang, Y., Yang, M., Sun, H., Li, Y., Cao, Y., Yang, S., Wei, Y., Gao, G. F., Lu, G. Structural Analysis of Rabies Virus Glycoprotein Reveals pH-Dependent Conformational Changes and Interactions with a Neutralizing Antibody. *Cell Host Microbe* **27**, 441-453.e7 (2020).
 46. Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F. A. & Gaudin, Y. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **313**, 187–191 (2006).
 47. Roche, S., Rey, F. A., Gaudin, Y. & Bressanelli, S. Structure of the Prefusion Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science (80-.)*. **315**, 843–848 (2007).
 48. Harrison, S. C. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008 157** **15**, 690–698 (2008).
 49. Hellert, J., Buchrieser, J., Larrous, F., Minola, A., de Melo, G. D., Soriaga, L., England, P., Haouz, A., Telenti, A., Schwartz, O., Corti, D., Bourhy, H. & Rey, F. A. Structure of the prefusion-locking broadly neutralizing antibody RVC20 bound to the rabies virus glycoprotein. *Nat. Commun.* **11**, 1–8 (2020).
 50. Meier, S., Güthe, S., Kiefhaber, T. & Grzesiek, S. Foldon, the natural trimerization domain of T4 fibritin, dissociates into a monomeric A-state form containing a stable β -hairpin: Atomic details of trimer dissociation and local β -hairpin stability from residual dipolar couplings. *J. Mol. Biol.* **344**, 1051–1069 (2004).
 51. Sissoëff, L., Mousli, M., England, P. & Tuffereau, C. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTRreceptor. *J. Gen. Virol.* **86**, 2543–2552 (2005).
 52. Passmore, L. A. & Russo, C. J. *Specimen Preparation for High-Resolution Cryo-EM. Methods in Enzymology* vol. 579 (Elsevier Inc., 2016).
 53. Dessau, M. A. & Modis, Y. Protein Crystallization for X-ray Crystallography. *J. Vis. Exp.* (2011) doi:10.3791/2285.
 54. Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. &

- Furusawa, M. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nat. 1985 3156020* **315**, 592–594 (1985).
55. Luo, T. R., Minamoto, N., Hishida, M., Yamamoto, K., Fujise, T., Hiraga, S., Ito, N., Sugiyama, M. & Kinjo, T. Antigenic and functional analyses of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.* **42**, 187–193 (1998).
 56. Luo, T. R., Minamoto, N., Ito, H., Goto, H., Hiraga, S., Ito, N., Sugiyama, M. & Kinjo, T. A virus-neutralizing epitope on the glycoprotein of rabies virus that contains Trp251 is a linear epitope. *Virus Res.* **51**, 35–41 (1997).
 57. Bühler, P., Wetterauer, D., Gierschner, D., Wetterauer, U., Beile, U. E. & Wolf, P. Influence of structural variations on biological activity of anti-PSMA scFv and immunotoxins targeting prostate cancer. *Anticancer Res.* **30**, 3373–3379 (2010).
 58. Kim, Y. J., Neelamegam, R., Heo, M. A., Edwardraja, S., Paik, H. J. & Lee, S. G. Improving the productivity of single-chain Fv antibody against c-Met by rearranging the order of its variable domains. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1186–1190 (2008).
 59. Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V. M., Allan, D. S. J., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E. Y., Merwe, P. A. van der, Kumagai, I. & Maenaka, K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8856–8861 (2003).
 60. Glaeser, R. M. & Han, B.-G. Opinion: hazards faced by macromolecules when confined to thin aqueous films. *Biophys. Reports* **3**, 1–7 (2017).
 61. Postel, C., Abillon, O. & Desbat, B. Structure and denaturation of adsorbed lysozyme at the air–water interface. *J. Colloid Interface Sci.* **266**, 74–81 (2003).
 62. Taylor, K. A. & Glaeser, R. M. Retrospective on the early development of cryoelectron microscopy of macromolecules and a prospective on opportunities for the future. *J. Struct. Biol.* **163**, 214–223 (2008).
 63. Glaeser, R. M., Han, B. G., Csencsits, R., Killilea, A., Pulk, A. & Cate, J. H. D. Factors that Influence the Formation and Stability of Thin, Cryo-EM Specimens. *Biophys. J.* **110**, 749–755 (2016).
 64. Scheres, S. H. W. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* **180**, 519–530 (2012).
 65. Zhang, K., Li, S., Kappel, K., Pintilie, G., Su, Z., Mou, T. C., Schmid, M. F., Das, R. & Chiu, W. Cryo-EM structure of a 40 kDa SAM-IV riboswitch RNA at 3.7 Å resolution. *Nat. Commun.* **2019 101** **10**, 1–6 (2019).
 66. Puri, A., Winick, J., Lowy, R. J., Covell, D., Eidelman, O., Walter, A. & Blumenthal, R. Activation of vesicular stomatitis virus fusion with cells by pretreatment at low pH. *J. Biol. Chem.* **263**, 4749–4753 (1988).
 67. Matlin, J. & Helenius, K. Physical Properties of a Soluble Form of the Glycoprotein of

- Vesicular Stomatitis Virus at Neutral and Acidic pH1". *J. Cell Biol* **22**, 674–679 (1983).
68. Bakker, A. B. H., Marissen, W. E., Kramer, R. A., Rice, A. B., Weldon, W. C., Niezgodna, M., Hanlon, C. A., Thijsse, S., Backus, H. H. J., de Kruif, J., Dietzschold, B., Rupprecht, C. E. & Goudsmit, J. Novel Human Monoclonal Antibody Combination Effectively Neutralizing Natural Rabies Virus Variants and Individual In Vitro Escape Mutants. *J. Virol.* **79**, 9062–9068 (2005).
 69. Melo, G. D. de, Sonthonnax, F., Lepousez, G., Jouvion, G., Minola, A., Zatta, F., Larrous, F., Kergoat, L., Mazo, C., Moigneu, C., Aiello, R., Salomoni, A., Brisebard, E., Benedictis, P. De, Corti, D. & Bourhy, H. A combination of two human monoclonal antibodies cures symptomatic rabies. *EMBO Mol. Med.* **12**, e12628 (2020).
 70. Stark, H. *GraFix: Stabilization of fragile macromolecular complexes for single particle Cryo-EM. Methods in Enzymology* vol. 481 (Elsevier Inc., 2010).
 71. Hauer, F., Gerle, C., Fischer, N., Oshima, A., Shinzawa-Itoh, K., Shimada, S., Yokoyama, K., Fujiyoshi, Y. & Stark, H. GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM. *Structure* **23**, 1769–1775 (2015).
 72. Callaway, H. M., Zyla, D., Hastie, K. M., Avalos, R. D., Agarwal, A., Bourhy, H., Corti, D. & Sapphire, E. O. Structure of the rabies virus glycoprotein trimer bound to a pre-fusion specific neutralizing antibody. *bioRxiv* 2021.11.16.468852 (2021) doi:10.1101/2021.11.16.468852.
 73. Sumino, A., Uchihashi, T. & Oiki, S. Oriented Reconstitution of the Full-Length KcsA Potassium Channel in a Lipid Bilayer for AFM Imaging. *J. Phys. Chem. Lett.* **8**, 785–793 (2017).
 74. Sumino, A., Sumikama, T., Uchihashi, T. & Oiki, S. High-speed AFM reveals accelerated binding of agitoxin-2 to a K⁺ channel by induced fit. *Sci. Adv.* **5**, eaax0495 (2019).
 75. Hsieh, C. L., Goldsmith, J. A., Schaub, J. M., DiVenere, A. M., Kuo, H. C., Javanmardi, K., Le, K. C., Wrapp, D., Lee, A. G., Liu, Y., Chou, C. W., Byrne, P. O., Hjorth, C. K., Johnson, N. V., Ludes-Meyers, J., Nguyen, A. W., Park, J., Wang, N., Amengor, D., Lavinder, J. J., Ippolito G. C., Maynard J. A., Finkelstein I. J., McLellan J. S. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science (80-.)*. **369**, 1501–1505 (2020).
 76. Sanders, R. W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J. P., Yasmeen, A., de Val, N., Kim, H. J., Blattner, C., de la Peña, A. T., Korzun, J., Golabek, M., de los Reyes, K., Ketas, T. J., van Gils, M. J., King, C. R., Wilson, I. A., Ward, A. B., Klasse, P. J. & Moore, J. P. A Next-Generation Cleaved, Soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, Expresses Multiple Epitopes for Broadly Neutralizing but Not Non-Neutralizing Antibodies. *PLOS Pathog.* **9**, e1003618 (2013).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 教授 前仲勝実 先生に深く感謝申し上げます。

本研究に関して、直接の御指導、御助言を賜りました北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 准教授 福原秀雄 先生に 心より感謝申し上げます。

本論文を査定していただきました北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室 教授 小川美香子 先生、講師 高倉 栄男 先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、研究試料の御提供、御協力並びに御助言くださいました岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 人獣共通感染症学研究室 教授 伊藤直人 先生、准教授 正谷達膳 先生、杉山誠 先生、並びに北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 分子病態・診断部門 教授 澤洋文 先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、日々丁寧な研究の御指導、御鞭撻を受け賜りました北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 准教授 黒木喜美子 先生、助教 喜多俊介 先生 並びに山陽小野田市立山口東京理科大学 薬学部 講師 田所高志 先生 並びに金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 准教授 古川敦 先生 並びに北海道大学大学院先端生命科学研究院 X線構造生物学研究室 准教授 尾瀬農之 先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、様々な面で御助言、御協力を頂きました北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 並びに 創薬科学教育研究センターの皆様心より感謝申し上げます。

最後に、日頃の研学生生活を様々な面で支えてくださった家族、友人に心より感謝申し上げます。