HOKKAIDO UNIVERSITY

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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	湯本，航平
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14844号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85669
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Yumoto_abstract.pdf，論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏　名　　湯　本　航　平

学 位 論 文 題 名

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

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。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。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。しかし、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。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、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いる。

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 compornent (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。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、複数の宿主細胞受容体と結合した後に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。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。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。

このように 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り、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は未解明となっている。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。

本研究ではカイコ-バキュロウイルス発現系を用いて組換えRABVG (rRABVG) を調製した。具体的にはRABVGにT4 fibritin 由来の三量体形成タンパク質ドメインfoldonを導入し、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 配列に置換することで三量体タンパク質と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を用いてネガティブ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。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。そこで本研究では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ネガティブ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で、中和抗体の結合様式や生理的条件下に存在するrRABVG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。