



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏名 湯本 航平

審査担当者	主査	教授	前 仲 勝 実
	副査	教授	小 川 美 香 子
	副査	講師	高 倉 栄 男
	副査	准教授	福 原 秀 雄（人獣共通感染症国際共同研究所）

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

最初に、本研究の研究背景を述べた後、狂犬病ウイルス(RABV, rabies virus)の細胞侵入機構に向けたタンパク質発現系の構築と抗体の機能解析更に構造解析の結果について述べられている。狂犬病は狂犬病ウイルス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、致命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が、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。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。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。そこで著者は 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。

著者はカイコバキュロウイルス発現系を用いて組換え RABVG を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も成功した。調製した中和抗体断片が RABVG 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結果、15-13 Fab 及び scFv は RABVG に特異的に結合し、nM レベルの高い結合親和性を示した。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 RABVG に特異的に結合した。また、コンフォメーションナルエピトープを持つ 12-22 抗体断片が RABVG に結合したことから、本研究で調製した RABVG が抗原性を保持していることが示唆された。

次に、著者は RABVG の構造解析を実施した。調製した RABVG 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構造情報が得られなかった。この原因として RABVG 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、高速原子間力顕微鏡による RABVG の動態解析を行ったところ、RABVG 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 RABVG 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、RABVG 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。

本論文によって、狂犬病ウイルスの糖 G タンパク質が大きな構造の揺らぎを有することを見出すことに成功した。更に、特異的抗体の結合解析に成功し、その機能的特徴の解明と抗体断片の開発への基盤を構築できた。今後は、クライオ電子顕微鏡による構造観察を進めることで、RABVG 三量体構造の特性に関する理解が深まり、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。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。