

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658258

研究課題名(和文)糖鎖修飾改変による高増殖性・高免疫原性狂犬病ウイルスワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of a rabies vaccine seed with high productivity and immunogenicity by modification of glycosylation

研究代表者

山田 健太郎 (YAMADA, Kentaro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70458280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、狂犬病ワクチンに応用可能な性質を有するGタンパク質をN型糖鎖修飾改変により見出すことを目的とした。街上毒株Gタンパク質へのN型糖鎖の単独追加はウイルス産生性を亢進させたが、複数個追加してもさらに亢進することはなかった。5個追加ではウイルス産生性は著しく低下するものの、糖鎖関連酵素阻害剤処理によりウイルス産生性は回復し、制限増殖性型の安全な生ワクチン株作出への応用が期待できた。街上毒株Gタンパク質へのN型糖鎖の追加は免疫原性を亢進させ、特に第194位への追加では顕著に亢進させることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this work, we aimed to identify the rabies virus G protein applicable for an effective rabies vaccine by modification of the N-glycosylation. We found that the street virus G proteins with the multiple N-glycosylation additions did not enhance virus production compared with the G proteins with the single addition. The G protein with five additional N-glycosylation sites was able to produce few progeny viruses, but it recovered the function to produce progeny viruses in the presence of an inhibitor of cellular enzymes associated with N-glycosylation, indicating that this modified G protein may be applicable for development of a safe live vaccine strain with limited replication. Moreover, we found that the N-glycan addition, especially addition at position 194, enhanced the immunogenicity of the street virus G protein.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：狂犬病 ウイルス ワクチン N型糖鎖 免疫原性

## 1. 研究開始当初の背景

狂犬病は狂犬病ウイルスにより引き起こされる疾患で、ヒトを含めた全てのほ乳類が感染し、一旦発病した場合には重篤な神経症状を伴いほぼ 100%死亡する極めて恐ろしい人獣共通感染症の一つである。発症後の治療法は未だ確立されていない。日本では狂犬病が根絶されてから 50 年以上経つが、ほとんど世界中で今もなお狂犬病は流行している。現在、世界では毎年少なくとも約 55,000 人が狂犬病で死亡し、1,500 万人以上が曝露後予防治療を受けており、依然、公衆衛生上重大な問題である。

しかし、狂犬病はワクチンで予防可能な感染症である。「狂犬病予防法」により、狂犬病の流行の主な原因となるイヌにワクチン接種を徹底したことが日本で狂犬病を根絶できた大きな要因の一つとなっている。しかしながら、途上国・新興国ではイヌの狂犬病の流行はコントロールされておらず、実際、狂犬病による死亡者の発生の約 90%はアジアとアフリカで起こっている。ワクチンによるイヌの狂犬病のコントロールが進んでいない原因としては経済的理由が挙げられ、現行の狂犬病ワクチンは不活化ワクチンであることがその一因として考えられる。一般的に、生ワクチンに比べて、不活化ワクチンは、開発コストは低いが製造コストは高く、さらに十分な免疫を得るためにより多くの接種回数を必要とする。

我々は最近、狂犬病ウイルス野外株(街上市毒)1088株を用いて、ウイルスGタンパク質第194位へのN型糖鎖追加(R196S変異)が培養細胞における増殖性を亢進させること、マウスにおいて末梢感染後の病原性を低下させることを発見した(Yamada et al., *Virus Res.*, 2012)。さらに、その病原性の低下には、感染後の強い中和抗体産生の誘導が関与していることも判明した。興味深いことに、ほとんどの街上市毒株のGタンパク質にはN型糖鎖付加部位が第37位と319位の2箇所しかないが、実験室馴化株でワクチン株としても使用されている固定毒株のGタンパク質にはその2箇所のN型糖鎖付加部位に加え、第158位、204位もしくは247位にN型糖鎖付加部位が認められる。我々は、これら固定毒に認められる第158位、204位もしくは247位へのN型糖鎖追加も培養細胞における増殖性亢進に関与することも明らかにした(Yamada et al., *J. Gen. Virol.*, 2013)。以上のことから、我々はGタンパク質にN型糖鎖を複数個付加すれば、増殖性と免疫原性が顕著に亢進したワクチン株として相応しい狂犬病ウイルス株が出来るのではないか、と着想するに至った。不活化ワクチンの製造において、ワクチンのシードとなる株が高免疫原性・高増殖性を有することはワクチンの低コスト化に寄与することができる。したがって、そのようなワクチン株の開発は、世界規模での狂犬病制圧に資するものとなると

思われた。

## 2. 研究の目的

研究背景を踏まえ、本研究では、狂犬病ウイルスに高増殖性・高免疫原性を付与するN型糖鎖修飾を有するGタンパク質を見出すことを目的とした。

また、Gタンパク質N型糖鎖付加部位第319位は狂犬病ウイルスで完全に保存されており、この部位のN型糖鎖は街上市毒Gタンパク質の機能発現に極めて重要であり、第319位のN型糖鎖欠失はGタンパク質のウイルス産生能を消失させることを以前に示した(Yamada et al., *J. Gen. Virol.*, 2013)。ここで我々は、第319位N型糖鎖を欠失させても他の部位にN型糖鎖を複数箇所付加することで、Gタンパク質によるウイルス産生能は回復するが病原性は喪失した、生ワクチンとして使用可能な変異狂犬病ウイルス株を確立できるのではないかと考え、検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 1088株変異株の解析

既に得られていた2株の1088株N型糖鎖追加変異株(N5C#7およびN5C#8)について、マウス神経芽細胞種由来NA細胞での増殖性(多段階増殖曲線)およびマウス接種試験を行った。マウス接種試験ではddYマウス(6週齢、)を使用し、脳内接種および筋肉内接種によりウイルスの病原性を評価した。また筋肉内接種したマウスより採血し、中和抗体応答を調べた。中和抗体価の測定は、迅速蛍光フォーカス阻止試験(Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, RFFIT)により行った。

### (2) N型糖鎖修飾改変1088株Gタンパク質発現プラスミドの作製

1088株Gタンパク質野生型(WT)およびN型糖鎖追加および欠失変異体(K158N、R196S、S204N、D247N、N319Q)については既に構築したものをを用いた(Yamada et al., *Virus Res.*, 2012; Yamada et al., *J. Gen. Virol.*, 2013)。N型糖鎖追加変異体L38RおよびD146Nについては、それぞれ変異株N5C#7およびN5C#8を基にRT-PCRによりG遺伝子断片を増幅し、pCI vector (Promega) に挿入することで構築した。その他変異体については、QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Agilent) を用いた点変異導入法により構築した。

### (3) Gタンパク質の性状解析

各Gタンパク質におけるN型糖鎖付加状況は、発現プラスミドを導入したNA細胞を用いたウェスタンブロット法により調べた。N型糖鎖付加状況はGタンパク質の分子量の違いで判定し、N型糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシン(Sigma-Aldrich)存在下では、

各 G タンパク質の分子量にほとんど違いのないことを確認した。

各 G タンパク質の構造性については、発現プラスミドを NA 細胞に導入後、構造エピトープを認識するモノクローナル抗体 4-12 およびリニアエピトープを認識するモノクローナル抗体 15-13 (岐阜大学応用生物科学部 杉山誠博士より分与) を用いた間接蛍光抗体法 (IFA) により調べた。

また、発現プラスミドを導入した NA 細胞を低 pH (pH 5.8) の培養液で処理することで、細胞融合の有無を指標にした G タンパク質の低 pH 依存性膜融合活性についても検討を行った。

#### (4) G 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを用いた G タンパク質相補試験による増殖性解析

各 G タンパク質が有するウイルス増殖活性は、EGFP (緑色蛍光タンパク質) 発現 G 遺伝子欠損狂犬病ウイルス (RABV G) (岐阜大学応用生物科学部 杉山誠・伊藤直人両博士より分与) を用いた相補試験により評価した。すなわち、各 G タンパク質発現プラスミドを NA 細胞に導入して一定時間培養後、RABV G を多重感染度 0.005 (1 細胞あたり 0.005 個の感染性ウイルス) で接種した。接種後は 37 °C で培養し、EGFP 発現による蛍光を蛍光顕微鏡により経日的に観察した。

#### (5) マウスへの DNA 免疫による N 型糖鎖修飾改変 G タンパク質の免疫原性の評価

DNA 免疫用のプラスミドは NucleoBond PC 10000 EF (Macherey-Nagel) を用いてエンドトキシンフリーグレードで大量調整し、滅菌超純水に 1 µg/µl で溶解して使用まで -20 °C で保存した。

Balb/c マウス (6 週齢、 ) に、イソフルランで麻酔後、針無し注射器を用いて、1 匹あたり 50 µg ずつプラスミドを大腿筋に接種した。プラスミド接種は 2 週間間隔で行い、接種 1 週間後には部分採血し、血清を回収した。血清は RFFIT 法により中和抗体価を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 1088 株 N 型糖鎖追加変異株の解析

狂犬病ウイルス G タンパク質第 37-39 位は N 型糖鎖付加配列 (NLS) であるが、その部位への N 型糖鎖付加は非効率であることは以前に明らかにされていた (Yamada et al., J. Gen. Virol., 2013; Shakin-Eshleman et al., J. Biol. Chem., 1992)。我々は 1088 株の NA 細胞での連続継代および限界希釈によるクローニングより、G タンパク質第 37-39 位の配列が NRS となり、N 型糖鎖付加が効率的となり、かつ NA 細胞での増殖性が亢進した変異株 N5C#7 株を得ていた。さらに同様の法にて、第 146 位がアスパラギン酸からアスパラギンとなり (D146N)、第 146 位に N 型糖鎖が追加され、かつ NA 細胞での増殖性が亢進

した変異株 N5C#8 株も得ていた。RABV G を用いた相補試験でも、第 37 位への N 型糖鎖付加の効率化および第 146 位への N 型糖鎖付加はウイルスの増殖性亢進に寄与することを明らかにした。

そこで、この両株の病原性についてマウスで評価したところ、両株とも脳内接種では親株 (1088 株) と同様に致死感染を起こした。一方、後肢筋肉内接種では N5C#8 株は親株と同程度の致死性を示したが、N5C#7 株は致死率が著しく低下していた。しかしながら、筋肉内接種時の中和抗体誘導能は、第 194 位への N 型糖鎖が追加された変異株 (R196S 変異株) の場合 (Yamada et al., Virus Res., 2012) とは異なり、両変異株とも親株と同程度であった。したがって、R196S 変異株感染時の中和抗体誘導亢進は、増殖性亢進よりも G タンパク質の免疫原性亢進による可能性が考えられた。

以上の結果については、論文として公表した (Yamada et al., Virus Res., 2014)。

### (2) 第 319 位 N 型糖鎖付加欠失 G タンパク質の評価

1088 株 G タンパク質第 319 位の N 型糖鎖を N319Q 変異により欠失させ、L38R、D146N、K158N、R196S、D247N、K158N/D247N、R196S/D247N もしくは L38R/D146N/K158N/R196S/D247N 変異導入し N 型糖鎖付加を追加した一連の N319Q 変異 G タンパク質発現プラスミドを構築し、RABV G を用いた相補試験により各 G タンパク質のウイルス産生能を検討したところ、ほとんどの N319Q 変異体でウイルス産生能は認められなかった。L38R/N319Q、R196S/N319Q、D247N/N319Q および R196S/D247N/N319Q 変異体ではわずかにウイルス産生能が認められたが、ウイルス産生能の低い WT よりもはるかに低かった。構造エピトープを認識するモノクローナル抗体で反応が認められた N319Q 変異体は、R196S/N319Q および R196S/D247N/N319Q 変異体のみであった。また、N319Q 変異体はいずれも膜融合活性が認められなかった。以上に示すように、安全で効果的な生ワクチン開発に資する第 319 位 N 型糖鎖欠失 G タンパク質の開発は成功しなかった。

### (3) N 型糖鎖付加部位を複数箇所追加した G タンパク質の評価

1088 株 G タンパク質 (WT) に K158N/D247N もしくは R196S/D247N 変異を導入した G タンパク質を発現するプラスミドを構築し、RABV G を用いた相補試験にウイルス産生能を評価したが、いずれも K158N、R196S および D247N の単独追加を超えるウイルス産生能は認められなかった。

さらに、L38R/D146N/K158N/R196S/D247N 変異を導入した 1088 株 G タンパク質は、5 個の N 型糖鎖の追加が認められるようになったが、RABV G を用いた相補試験においてウイルス

産生能は完全に消失していた。この変異体は構造エピトープを認識するモノクローナル抗体に反応したことから、構造は保たれていることは示唆された。しかしながら、この変異体の膜融合活性も損なわれていた。ところが、糖鎖関連酵素阻害剤存在下でこの変異体を発現させたところ、膜融合能が回復し、ウイルス産生能も回復した。これは、正常な細胞では増えないが、特殊な培養細胞では増殖可能なウイルスを作出可能であること示している。そして、このような制限増殖性を示すウイルス株は非常に安全な生ワクチン株となり得る。しかし、この変異体の阻害剤存在下でのウイルス産生能はあまり効率的ではなかったため、N型付加効率は低いものの第204位へのN型糖鎖追加も含めて、様々なN型糖鎖付加の組み合わせについて検討したところ、阻害剤非存在下ではある程度ウイルス産生性が抑制され、阻害剤存在下ではある程度ウイルス産生性が回復するN型糖鎖追加の組み合わせを見出し(5箇所追加)、生ワクチン候補株への適用が期待された。

(4) N型糖鎖がGタンパク質の免疫原性に与える影響：DNA免疫法による評価

N型糖鎖追加がGタンパク質の免疫原性に与える影響を、プラスミドDNA免疫法によりマウスを用いて検討した。単独追加ではN型糖鎖追加の効率の悪いS204N変異体を除いて、WT比べて中和抗体誘導能の亢進が認められ、特にR196S変異体で顕著であった。ワクチン株PV株で認められる第158位と第247位への追加(K158N/D247N)では、第158位と第247位への単独追加と同程度であった。また前述の生ワクチン株への適用が期待された5箇所のN型糖鎖追加を有するGタンパク質はR196S変異を含んでおり、中和抗体誘導能はR196S単独変異体と同程度であった。したがって、第194位へのN型糖鎖追加は少なくとも1088株Gタンパク質の免疫原性を著しく亢進させることが分かり、これは過去の我々の観察(Yamada et al., Virus Res., 2012)とも矛盾しないと考えられた。

以上、本研究によりGタンパク質N型糖鎖修飾改変による、より効果的な狂犬病ワクチン株の開発が可能であることが示された。今後は、他の狂犬病ウイルス株でも適用可能なのかについても検証し、さらには実際にN型糖鎖修飾を改変したウイルスを作出し、ワクチン株としての有効性について評価する必要があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

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 Research,

179, 169-176, 2014. (査読有り)  
doi: 10.1016/j.virusres.2013.10.015.

[学会発表](計2件)

山田健太郎、野口賀津子、西園晃 . G蛋白質第37位へのN型糖鎖の効率的な付加は狂犬病ウイルス街上毒の病原性を低下させる . 第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20～22日、岐阜市 .

山田健太郎、野口賀津子、西園晃 . 狂犬病ウイルス街上毒においてG蛋白質第37位へのN型糖鎖の効率的な付加は末梢感染後の病原性を低下させる . 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10～12日、神戸市 .

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

出願予定

取得状況(計0件)

[その他]

特になし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健太郎(YAMADA, Kentaro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70458280