

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712024

研究課題名(和文) G蛋白質N型糖鎖が規定する狂犬病ウイルス増殖亢進機構・弱毒化機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of rabies virus propagation and pathogenicity that are determined by N-glycans on the viral glycoprotein for application to the development of therapy for rabies

研究代表者

山田 健太郎 (YAMADA, Kentaro)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：70458280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、狂犬病ウイルスのG蛋白質N型糖鎖が規定している増殖亢進機構と弱毒化機構について解明を試みた。野生型G蛋白質と相互作用し、N型糖鎖の追加による増殖亢進と関連すると想定される宿主膜蛋白質分子として22分子が得られた。また、狂犬病ウイルスの病原性解明に資するin vivoイメージング法を開発した。すなわち、近赤外蛍光蛋白質iRFP720がウイルス感染動態の蛍光イメージングに最適であること、赤方偏移型ルシフェラーゼを用いた発光イメージングでは高感度にウイルス感染動態が追跡できること、さらにN型糖鎖変異弱毒株が宿主体内で排除される過程を時空間的に追跡することが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this work, we have attempted to clarify the mechanisms of rabies virus (RABV) propagation and pathogenicity that are determined by N-glycans on the G protein. We have identified 22 host membrane proteins interacted with the wild-type G protein, which are thought to be associated with the efficient viral propagation. We have also established in vivo imaging system for RABV replication dynamics in small animals, which is useful for analysis of RABV pathogenesis. Our results indicate that the near-infrared fluorescent protein iRFP720, the most red-shifted fluorescent protein, is optimal for in vivo fluorescence imaging of RABV infection and that the bioluminescence imaging with the red-shifted firefly luciferase enables to monitoring of the viral infection dynamics with higher sensitivity. Moreover, we found that the bioluminescence imaging could track when and where the N-glycan-modified attenuated mutant began to be eliminated in mice.

研究分野：ウイルス学、獣医学

キーワード：狂犬病ウイルス N型糖鎖 膜蛋白質 蛋白質相互作用 病原性 弱毒化 近赤外蛍光蛋白質 in vivo イメージング

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、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である。発症後の治療法は未だ確立されていない。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措置を受けており、依然、公衆衛生上重大な問題である。狂犬病予防連盟 (Global Alliance for Rabies Control) によると、現在、世界全体で狂犬病対策に掛かっているコストは毎年 1240 億ドルと見積もられている。狂犬病対策にこれだけの莫大なコストを掛ける必要があるのは、狂犬病が不治の病でほぼ 100%死亡するためである。したがって、狂犬病が治療可能な疾患となれば、狂犬病による不幸なケースだけでなく狂犬病対策に掛かるコストを減少させることができる。

狂犬病の治療法については、2005 年に Willoughby 博士が発表したミルウォーキー・プロトコルがある (Willoughby et al, N. Engl. J. Med., 2005)。現在 (2013 年当時) までに 43 例の患者にこの治療が試みられ、5 例で狂犬病からの生還が確認されている。しかし、この治療法はアジアの狂犬病 (イヌ由来) については成功していない (Hemachudha et al, J. Neurovirol., 2006; Aramburo et al, Clin. Infect. Dis., 2011 等)。しかも、治療法の有効性について実験動物モデルで検証しておらず、科学的根拠にも乏しいことから、狂犬病研究の第一人者らはミルウォーキー・プロトコルを推奨していない (Jackson, Antiviral Res., 2013)。

狂犬病の治療法確立のためには、まず狂犬病ウイルスの増殖機構および病原性発現機構を解明することが重要である。これまでに、我々は狂犬病ウイルスの野外株 (街上毒) を用いて、ウイルス G 蛋白質への 1 個の N 型糖鎖の追加が、マウスにおける病原性を減少させること、培養細胞での増殖 (ウイルス粒子の放出) を亢進させることを世界に先駆けて発見し、公表してきた (Yamada et al, Virus Res., 2012; Yamada et al, J. Gen. Virol., 2013; Yamada et al, Arch. Virol., 2013; Yamada et al, Virus Res., 2013)。

街上毒の N 型糖鎖追加による病原性減少は末梢感染 (筋肉内接種) の場合にのみ認められ、脳内接種の場合は野生型と同様にマウスに致死感染を起こす。しかし、N 型糖鎖追加変異株の末梢感染時の中枢神経侵入能 (neuroinvasiveness) は損なわれていなかった。したがって、この変異株は、末梢感染時には宿主免疫反応を野生型に比べて強く惹起することが推測され、実際、G 蛋白質第 194 位に N 型糖鎖が追加された変異株では野生型に比べて中和抗体を強く誘導することが確認された (Yamada et al, Virus Res., 2012)。

しかし、第 247 位に N 型糖鎖が追加された変異株 (D247N 変異株) および第 37 位への N 型糖鎖付加が効率的となった変異株 (L38R 変異株) では末梢感染時での病原性低下が確

認されたのにもかかわらず、中和抗体誘導の亢進は認められなかった (Yamada et al, Arch. Virol., 2013; Yamada et al, Virus Res., 2013)。さらに、血液-脳関門の透過性の亢進およびそれに伴う脳内への免疫担当細胞の流入増加が、狂犬病ウイルスの末梢感染時の病原性低下に関与するという報告があるが (Phares et al, J. Immunol., 2006 等)、両変異株と野生型の間で免疫担当細胞の脳内への流入の度合いに違いは認められなかった。さらに、街上毒に比べて弱毒実験室馴化株は末梢感染後に脳内でインターフェロン・炎症性サイトカイン等の自然免疫関連遺伝子の発現を著しく上昇させるという報告もあるが (Wang et al, J. Virol., 2005)、これも我々の例には当てはまらなかった。したがって、D247N 変異株および L38R 変異株は末梢感染の際、末梢組織で何らかを活性化し、そのシグナルが脳内に伝達され、脳内が未知の機構により抗ウイルス状態となるのではないかと推測するに至った。さらに、D247N 変異株および L38R 変異株は、末梢感染においてマウスを一旦発症 (体重減少、軽度の神経症状等) させるが、その後マウスは回復することから、この弱毒化機構解明は発症後の治療法確立に直接つながるものであると考えられた。

一方、G 蛋白質への N 型糖鎖の追加によって、感染細胞からウイルス粒子の放出量が亢進することも明らかにしてきた (Yamada et al, J. Gen. Virol., 2013)。モノクローナル抗体を用いた実験から、N 型糖鎖追加による G 蛋白質の構造変化は認められなかった。これについて、野生型 G 蛋白質に特異的に相互作用する宿主分子があり、それがウイルス粒子の細胞外への放出を阻害しているのではないかと推測している。もし、これが解明できれば宿主分子を標的とした抗ウイルス薬の開発につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、上記の背景を踏まえ、G 蛋白質への N 型糖鎖追加による狂犬病ウイルス街上毒の弱毒化機構・増殖亢進機構を分子レベルで明らかにして、その成果を狂犬病治療法の確立に応用することを試みた。

3. 研究の方法

(1) G 蛋白質への N 型糖鎖追加による狂犬病ウイルス増殖亢進機構の解明

① 酵母ツーハイブリット法による G 蛋白質 (野生型) と相互作用する宿主分子のスクリーニング

酵母膜蛋白質ツーハイブリッド法の受託サービスを利用し (MBmate Y2H screen、Hybrigenics 社)、狂犬病ウイルスの野外株である 1088 株の G 蛋白質 (野生型) と相互作用する宿主膜蛋白質のスクリーニングを行った。のべ 8130 万分子との相互作用解析が

行われ、その結果、合計 67 分子との相互作用が確認されたが、これらのうち、これらのうち非特異的相互作用が強く想定されるもの、膜蛋白質でないもの、トポロジー的に正しくないものは除外した。

② スプリットルシフェラーゼを利用した G 蛋白質と宿主分子の相互作用の検証

酵母でのスクリーニング結果を哺乳類細胞で検証するため、断片化ガウシアルシフェラーゼ (split GLuc) を使用した相互作用解析を他の報告を参考にして試みた (Hashimoto et al, J. Biol. Chem., 2011; Luker and Luker, Methods Mol. Biol., 2014)。すなわち、1088 株 G 蛋白質の細胞質領域に GLuc の C 末側 (アミノ酸残基 110-185 番目) を、リンカー配列を介して融合させたものを発現するプラスミドと、GLuc の N 末側 (アミノ酸残基 17-109 番目) を、リンカー配列を介して候補分子の N 末側に融合させたものを発現するプラスミドをそれぞれ構築した。これらのプラスミドをマウス神経芽細胞種由来の NA 細胞に共導入し、一定時間培養後に細胞を溶解し、溶解液を用いてセレンテラジンを基質としたルシフェラーゼアッセイを行った。

③ CRISPR/Cas9 を利用した G 蛋白質と宿主分子の相互作用の検証

まず培養細胞で候補分子をノックアウトできる CRISPR/Cas9 プラスミドベクターの構築を行った。すなわち、オンラインツール (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) を用いて標的遺伝子に対する PAM 配列を含んだ DNA 配列を設計し、その配列を pGuide-it-ZsGreen1 プラスミド (TaKaRa 社) にクローニングした。構築したプラスミドを NA 細胞に導入し、蛍光蛋白質 (Katushka2S) 発現組換え狂犬病ウイルス 1088 株 (後述) を多重感染度 0.01 で接種し、ウイルスの拡がりを蛍光顕微鏡下で毎日観察を行った。

(2) *in vivo* イメージングによる G 蛋白質への N 型糖鎖追加による狂犬病ウイルス弱毒化機構の時空間的解析

① 狂犬病ウイルス感染の *in vivo* 蛍光イメージングの確立

リバースジェネティクス法により、長波長型蛍光蛋白質 Katushka2S、E2-Crimson、iRFP670 もしくは iRFP720 を発現する組換え 1088 株をそれぞれ作出した。これらの組換えウイルスをヌードマウスに脳内接種し (10^4 FFU)、Lumazone *in vivo* イメージングシステム (日本ローパー) により、3 種類のフィルターセット (励起フィルター/吸収フィルター; 607/697 nm、655/732 nm、および 710/785 nm) を用いて、蛍光イメージングを行った。取得したイメージは ImageJ ソフトウェアを用いてシグナル強度解析を行った。さらに、最も優れたシグナル/ノイズ (S/N) 比が得られたウイルスについては、末梢感染モデルに

よる検証を行った。すなわち、ヌードマウスの右後肢筋肉内に組換えウイルスを 5×10^5 FFU で接種し、至適フィルターセットにより経日的に全身の蛍光イメージングを行った。

② 狂犬病ウイルス感染の *in vivo* 蛍光イメージングの確立と解析

赤方偏移型ホタルルシフェラーゼ Red Firefly Luciferase (RFLuc) を発現する 1088 株を蛍光発現ウイルスと同様に作出した。加えて、G 遺伝子に L38R 変異を有する弱毒型ウイルスも (G:L38R/RFLuc) 作出した。作出した組換えウイルスを免疫系は正常であるヘアレスマウスの右後肢筋肉内に 5×10^5 FFU で接種し、経日的に D-ルシフェリンを腹腔内投与した後に、Lumazone *in vivo* イメージングシステムを用いて、画像の取得を行った。また、好中球やマクロファージなどの活性化、すなわちミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性化を可視化できる XenoLight RediJect Inflammation Probe (PerkinElmer 社) を腹腔内投与し、炎症反応のイメージングも併せて行った。

(3) 弱毒株排除における所属リンパ節の役割についての検証

BALB/c マウスの右後肢膝窩リンパ節を外科的に除去し、一週間後に R196S 変異を有する N 型糖鎖追加弱毒株 1088-N30 を高濃度で右後肢のふくらはぎに接種して、一定期間観察を行った。対照群として 1088-N30 を同様に接種した Sham 処置 (切開のみ) マウスをおいた。

4. 研究成果

(1) G 蛋白質への N 型糖鎖追加による狂犬病ウイルス増殖亢進機構の解明

① 酵母ツーハイブリット法による G 蛋白質 (野生型) と相互作用する宿主分子のスクリーニング

スクリーニングの結果、小胞体・ゴルジ装置等の膜系細胞小器官内において G 蛋白質 (野生型) と相互作用する宿主分子について、22 種類の候補分子が得られた。このうち、特に信頼性の高い 4 分子について、まずマウス神経細胞での相互作用の検証を行うこととした。

② スプリットルシフェラーゼを利用した G 蛋白質と宿主分子の相互作用の検証

構築した系について G 蛋白質との相互作用が確認されているウイルス M 蛋白質を陽性コントロールとして検証したところ、相互作用を検出することができず、別の検出系に変更する必要があることが分かった。

③ CRISPR/Cas9 を利用した G 蛋白質と宿主分子の相互作用の検証

信頼性の高い上位 4 つの分子について、CRISPR/Cas9 法によるノックアウト細胞を調

製し、それらに Katushka2S 発現 1088 株を感染させて増殖性の亢進が認められるかどうか検討したが、増殖性亢進を示す細胞を見出すことはできなかった。

(2) *in vivo* イメージングによる G 蛋白質への N 型糖鎖追加による狂犬病ウイルス弱毒化機構の時空間的解析

① 狂犬病ウイルス感染の *in vivo* 蛍光イメージングの確立

4 種類の長波長蛍光蛋白質発現組換え狂犬病ウイルスを作出し、それぞれヌードマウスに脳内接種した後、3 種類のフィルターセットを用いて、感染マウス頭部の *in vivo* 蛍光イメージングにおけるシグナル強度解析を行ったところ、最も長波長の蛍光を発する近赤外蛍光蛋白質 iRFP720 を発する組換えウイルス (1088/iRFP720) 感染マウスで、710/785nm のフィルターセットを用いた場合で最も高い S/N 比が得られた。実際に図 1 に示すように、生きた感染マウスから非常に解像度良く脳を検出することに成功した。

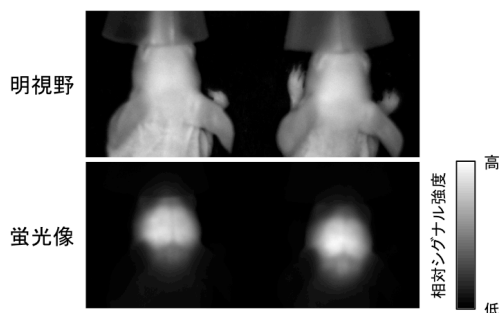


図 1 1088/iRFP720 感染ヌードマウス頭部の *in vivo* 蛍光イメージング像

続いて、この 1088/iRFP720 を用いて末梢感染モデルでの *in vivo* 蛍光イメージングの検証を行った。すなわち、本組換えウイルスをヌードマウスの右後肢筋肉内に接種し、経日的なイメージング観察を行ったところ、感染早期 (感染後 5 日目まで) にはシグナルを検出できなかったが、感染 6 日目から脊髄領域からシグナルが検出できるようになり、続いて脳からも明瞭にシグナルが検出できるようになった (図 2)。つまり、末梢感染におけるウイルス感染動態を追跡することに成功した。しかし、感染早期における検出という点で課題が残った。

② 狂犬病ウイルス感染の *in vivo* 発光イメージングの確立と解析

ウイルス感染動態を蛍光イメージングで観察しなかった理由は、ウイルス感染に伴う宿主反応を同時に発光イメージングで観察するデュアルイメージングを行いたかったためである。しかし、感度の低さは解析を行う上で問題であり、基質の特異性を利用したデュアル発光イメージングも可能であるため、当初の計画を変更して、ウイルス感染動態観察における感度向上のため、発光イメー

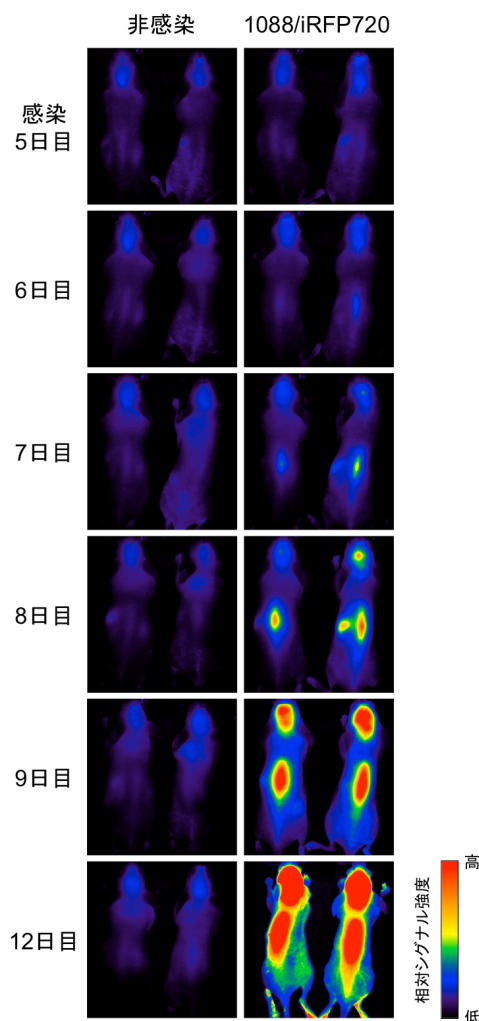


図 2 1088/iRFP720 末梢感染ヌードマウスの *in vivo* 蛍光イメージング像

ジングの確立を行った。すなわち、RFLuc を発現する 1088 株 (1088/RFLuc) を作出し、ヘアレスマウスを用いた末梢感染モデルにおいて、1088/iRFP720 感染による蛍光イメージングとの感度比較を行った。1088/iRFP720 感染ではヘアレスマウスでも感染 6 日目に脊髄領域からシグナルが検出されるようになったが、1088/RFLuc 感染における発光イメージングでは、感染 1 日目から接種部位からのシグナル検出に成功した。

そこで、RFLuc を発現する N 型糖鎖変異弱毒型ウイルス (G:L38R/RFLuc) を作出し、*in vivo* 発光イメージングによる野生型 (1088/RFLuc) 感染との比較解析を、ヘアレスマウスを用いて行った。また、同時に MPO 活性 (好中球やマクロファージの活性化) を指標とした炎症反応の発光イメージングも行った。図 3 に示すように、ウイルス感染の発光イメージングにより、弱毒型感染において感染 5 日目では脊髄領域から、野生型感染と比べてより強いシグナルが検出されたが、感染 6 日目では著しく低下することを観察することができた。さらにこれ以降、野生型感染とは異なり脳にけるシグナルの著しい増大は認められず、弱毒型ウイルス感染マウス

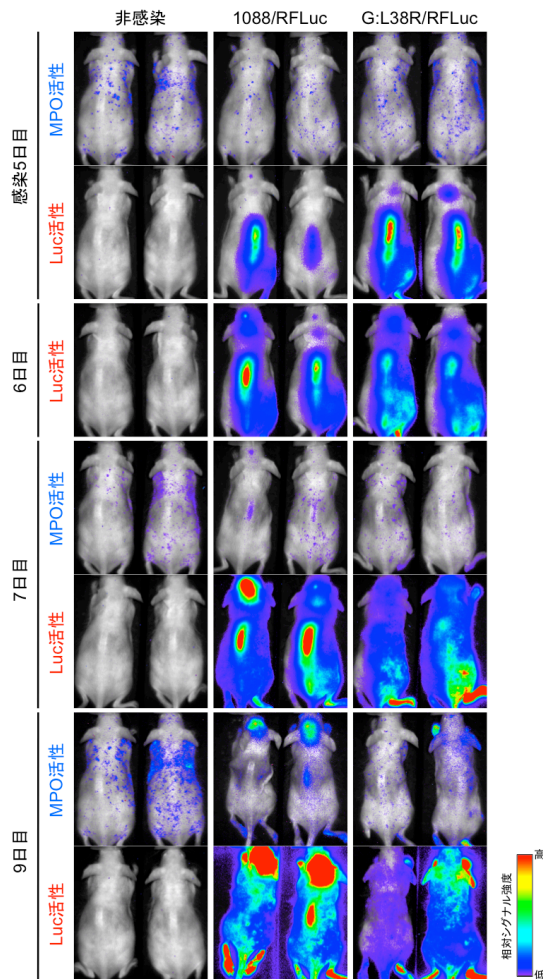


図3 1088/RFLuc(野生型・弱毒型)末梢感染ヘアレスマウスの *in vivo* 発光イメージング像

は耐過した。このことから、弱毒型ウイルス感染マウスでは、感染5~6日目に何らかのウイルス排除に働く反応が惹起されていることが推測された。しかし、MPO活性のイメージングでは、弱毒型ウイルス感染におけるウイルス増殖抑制との関連が示唆されるようなMPO活性化については認められなかった。

(3) 弱毒株排除における所属リンパ節の役割についての検証

所属リンパ節の被膜下洞マクロファージは神経侵襲性ウイルスの侵入阻害に働くという報告があるため (Junt et al, *Nature*, 2007)、それが弱毒株の病原性低下に関与しているかどうか検討を行った。しかし、膝窩リンパ節を除去した BALB/c マウスのふくらはぎに N 型糖鎖変異弱毒株 (1088-N30) を接種したが、致死感染は起こらずマウスは耐過したことから、本実験によりその関与を認めることはできなかった。

今回、G 蛋白質 N 型糖鎖が規定する狂犬病ウイルスの増殖亢進機構と弱毒化機構について、分子レベルで明らかにすることはできなかった。しかしながら、狂犬病ウイルスの本来の性状を有する野外株の遺伝子操作系を確立し、それを利用して各種レポーター遺

伝子発現組換えウイルスを作出して、狂犬病ウイルスの *in vivo* イメージング法を世界に先駆けて確立することができた。加えて、このイメージング法により弱毒株のマウスにおける感染動態の可視化、すなわち時空間的解析が可能となり、いっどこで弱毒株が排除され始めるのか突き止めることにも成功した。今後引き続き、特定した時期の組織サンプルを用いたオミクス解析により、当初の目的である狂犬病治療法開発に資する、弱毒株が誘導する宿主防御反応システムとそれに関連する宿主分子の同定を行っていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Minori Isomura, Kentaro Yamada, Kazuko Noguchi, Akira Nishizono. Near-infrared fluorescent protein iRFP720 is optimal for *in vivo* fluorescence imaging of rabies virus infection. *Journal of General Virology*. 98: 2689-2698, 2017. 査読有
DOI: 10.1099/jgv.0.000950

② Kazunori Kimitsuki, Kentaro Yamada, Nozomi Shiwa, Satoshi Inoue, Akira Nishizono, Chun-Ho Park. Pathological lesions in the central nervous system and peripheral tissues of ddY mice with street rabies virus (1088 strain). *The Journal of Veterinary Medical Science*. 79: 970-978, 2017. 査読有
DOI: 10.1292/jvms.17-0028

[学会発表] (計 7 件)

① Kentaro Yamada, Minori Isomura, Kazuko Noguchi, Akira Nishizono. iRFP720 is optimal for *in vivo* fluorescent imaging of rabies virus infection. 50th Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program (中国・深圳, 国際学会), 2018 年

② 山田健太郎, 磯村美乃里, 野口賀津子, 西園 晃. 近赤外蛍光蛋白質 iRFP720 は狂犬病ウイルスの *in vivo* 蛍光イメージング解析に適する. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪市), 2017 年

③ 山田健太郎, 磯村美乃里, 野口賀津子, 西園 晃. 近赤外蛍光蛋白質 iRFP720 は狂犬病ウイルスの *in vivo* 蛍光イメージング解析に適する. 第 160 回日本獣医学会学術集会 (鹿児島市), 2017 年

④ 山田健太郎, 磯村美乃里, 野口賀津子, 西園 晃. 赤色蛍光蛋白質 E2-Crimson 発現組換え狂犬病ウイルス街上毒の作出と *in*

vivo イメージング解析. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌市), 2016 年

- ⑤ 山田健太郎, 磯村美乃里, 野口賀津子, 西園 晃. 狂犬病ウイルスの *in vivo* 蛍光イメージング解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (藤沢市), 2016 年
- ⑥ 磯村美乃里, 山田健太郎, 野口賀津子, 西園 晃. *in vivo* 蛍光イメージングに資する赤色蛍光蛋白質 E2-Crimson 発現組換え狂犬病ウイルス街上毒株の作出. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (藤沢市), 2016 年
- ⑦ Kentaro Yamada, Minori Isomura, Kazuko Noguchi, Akira Nishizono. Generation of a recombinant street rabies virus expressing a far-red protein to be applied to *in vivo* imaging analysis. 49th Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program (米国・ベセスダ, 国際学会), 2016 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 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・准教授
研究者番号: 70458280