

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21780278

研究課題名（和文）狂犬病ウイルスの末梢感染を規定する分子基盤の解明

研究課題名（英文）Analysis for the molecular basis of rabies virus pathogenicity following peripheral infection

研究代表者

山田 健太郎（YAMADA KENTARO）

大分大学・全学研究推進機構・助教

研究者番号：70458280

研究成果の概要（和文）：狂犬病ウイルスは末梢の咬傷部位から中枢神経に侵入し感染動物を発症させるが、その成立機序は不明である。本研究では、野外流行株 1088 株を神経系細胞で連続継代することで、末梢感染においてのみマウスでの病原性が低下した弱毒株を確立した。解析の結果、その弱毒化にはウイルス G タンパク質への N 型糖鎖の追加が関与していることが示された。この N 型糖鎖の追加は、他の実験室馴化株でも認められるが野外流行株では認められないことから、狂犬病ウイルスの末梢感染を規定する一つの因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： It is still unclear how rabies viruses enter into the central nervous system from a bite site and then cause rabies. In this study, by serial passaging of the street rabies virus strain 1088 in a neuroblastoma cell line, we established a variant that was attenuated in mice following i.m. but not i.c. infections. We found that addition of an N-glycan to the viral G protein is related to the attenuation. Concerning the additional N-glycosylation is also found in laboratory-adapted strains but not street strains, the N-glycosylation status of the G protein is probably one of the determinants for the rabies virus pathogenicity following peripheral infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、狂犬病ウイルス、街上毒、末梢感染、病原性、N 型糖鎖

1. 研究開始当初の背景

狂犬病は狂犬病ウイルスの感染によっておこる人獣共通感染症で、ヒトおよび動物が発症した場合、重篤な神経症状を伴ってほぼ 100% 死亡する。今なお、世界では毎年約 55,000 人が狂犬病で死亡しており、公衆衛生上重要な疾患の一つとなっている。

感染動物におけるウイルスの体内動態につい

て一般的には、感染動物からの咬傷などを介して侵入したウイルスが直接、末梢神経に侵入、もしくは一端、筋細胞などへの感染を経てから末梢神経に侵入した後、中枢神経系に到達して脳炎が惹起されると理解されている。しかし、これまでの狂犬病ウイルスの病原性に関する知見のほとんどが、脳内接種によるものがほとんどであり、末梢感染の成立機序については未だ不明な

点が多い。例えば、長い潜伏期間の間、ウイルスが感染動物の体内の何処でどのように存在しているのか、どのように宿主の免疫系を回避しているのか、筋肉細胞への感染が末梢感染成立に必須か否か等について明らかになっていない。

狂犬病ウイルスの末梢感染成立機構について未解明な部分が多いことの一つに、これまで野外で流行している街上毒ではなく、動物の脳・組織等での長期継代により作製された固定毒株を使用して研究が行われてきたことが挙げられる。固定毒は街上毒に比べ末梢感染性が格段に低下しており、本来の狂犬病ウイルスの性質を反映しているとは言い難い。同時に、何故固定毒の末梢感染性は低下しているのか、その機序についてもほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、1970年代に米国でウッドチャックから分離された街上毒 1088 株を使用して、狂犬病ウイルスの末梢感染を規定する分子基盤を明らかにすることを目的とした。すなわち、1088 株を神経系細胞で連続継代することによって、マウスに脳内接種では致死感染を起こすが、末梢感染では起こさない変異株を確立し、親株と変異株の性状を比較することによりその解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 連続継代による街上毒 1088 株由来弱毒変異株の確立と比較解析

① 街上毒 1088 株の NA 細胞での連続継代: 1088 株には乳飲みマウスの脳で 2 代継代され 10% 脳乳剤上清として調整されたものを使用した。1088 株のマウス神経芽細胞腫由来 NA 細胞での連続継代において、各継代における培養上清は使用まで -80°C で保存された。

なお、不活化されていない 1088 株およびその変異株を用いた全ての実験は、厚生労働省により街上毒の使用が許可された P3 実験室内にて行われた。

② ウイルスゲノムの全塩基配列決定: RT-PCR およびダイレクトシーケンス法によりウイルスゲノムの塩基配列を決定した。ゲノムの 3' および 5' 末端領域については RACE 法により決定した。

③ マウスでの病原性の検討: 10 倍階段希釈したウイルス液を準備し、ddY マウス(6 週齢、雌)の脳内(i.c.)もしくは右後肢筋肉内(i.m.)に接種した。i.c.接種群については 28 日間、i.m.接種群については 48 日間観察した。10⁶ FFU 接種群については、感染 5、8 および 11 日後に安楽殺し、血清の分離および各臓器・組織の採取を行った。血清中の抗狂犬病ウイルス中和抗体価の測定は、WHO の標準法である RFFIT (Rapid

Fluorescent Focus Inhibition test) 法によって行われ、その力価は IU (国際標準単位)/ml で算出された。脳組織についてはホルマリンで固定後、免疫組織化学染色に供試された(北里大学獣医学部 朴天鎬博士の下で行われた)。本実験は大分大学の動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

(2) 固定毒 G タンパク質に認められる N 型糖鎖の追加がウイルス産生に及ぼす影響

① プラスミドの構築: 1088 株 G タンパク質発現プラスミドを構築し、点変異導入法により N 型糖鎖追加もしくは欠失変異体の発現プラスミドを各種構築した。

② シュードタイプウイルスアッセイ: G タンパク質への N 型糖鎖追加のウイルス産生に与える影響については、G 遺伝子欠損狂犬病ウイルス(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)を使用したシュードタイプウイルスアッセイにより評価した。すなわち、G タンパク質発現プラスミドを細胞に導入後、G 遺伝子欠損ウイルスを感染させ、一定時間培養した後、上清を回収して感染価およびウイルスタンパク質量を測定した。

4. 研究成果

(1) G タンパク質における N 型糖鎖の数は狂犬病ウイルスの末梢感染性を規定する要因の一つである

街上毒 1088 株を NA 細胞で計 30 代継代したところ、培養上清中のウイルス力価は 1 継代目では 10⁵ FFU/ml であったが、30 代目では 10⁸ FFU/ml に達した。この馴化株を 1088-N30 株(以下 N30 株)とし、全塩基配列を決定して 1088 株(GenBank Accession no. AB645847)と比較したところ、計 3 つのアミノ酸置換が認められ、そのうち 2 つは G タンパク質に認められた(P144L および R196S)(表 1)。なかでも R196S 変異は、第 194 位に N 型糖鎖付加をもたらすことが判明した(図 1)。

表 1 1088 株変異株に認められた変異

塩基番号	領域	アミノ酸番号	塩基 (アミノ酸)		
			1088	N4#14	N30
17	Leader 配列		T	T	T/C
28	Leader 配列		G	G	G/A
1187	N 遺伝子	373	G (Glu)	G (Glu)	G/A (Glu/Lys)
1695	P 遺伝子	61	G (Gly)	A (Glu)	G (Gly)
2513	M 遺伝子	6	A/G (Lys)	A (Lys)	G (Lys)
3803	G 遺伝子	144	C (Pro)	C (Pro)	T (Leu)
3960	G 遺伝子	196	A (Arg)	T (Ser)	T (Ser)
11870	Trailer 配列		A	A	G

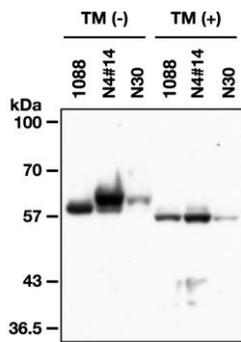


図1 Gタンパク質におけるN型糖鎖付加

1088株もしくは変異株をNA細胞に接種し、N型糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシン(TM)存在下(+)もしくは非存在下(-)で培養した。感染細胞中のGタンパク質の検出はウェスタンブロット法により行った。

興味深いことに、これまでに分離されたほとんどの街上毒のGタンパク質にはN型糖鎖付加部位が第319位の一カ所もしくは第37位・319位の2カ所しかないが、固定毒では第37位・319位に加えて、さらにもう1~2カ所(第158位、204位もしくは247位)のN型糖鎖付加部位が存在する。1088株でも他の街上毒株と同様に第37位・319位の2カ所しかN型糖鎖付加部位は存在しない。したがって、N30株で認められた第194位へのN型糖鎖付加部位の追加は、他の固定毒では認められない新規の糖鎖付加部位であるが、これがNA細胞への馴化と街上毒の病原性に関与しているのではないかと推測した。実際、R196S変異は、N30株で認められた変異のうち連続継代の過程で最も早期(4継代目)に出現した変異で、培養上清中のウイルス力価が 10^7 FFU/mlに達した時とほぼ一致していた。そこで、4継代目から限界希釈法によりR196S変異のみを有する変異株のクローニングを試み、1088-N4#14株(以下N4#14株)を得た。N4#14株はR196S変異に加えて1カ所の変異(Pタンパク質G61E)が認められたが(表1)、この変異はいくつかの街上毒株でも認められたため、街上毒の病原性への影響は小さいと考え、以後の実験に使用した。N4#14株においてもGタンパク質へのN型糖鎖の追加が確認された(図1)。

1088株、N4#14株およびN30株について各種性状の比較を行った。NA細胞での増殖性を調べたところ、N4#14株およびN30株は1088株と比べて、著しく増殖性が亢進していた(図2)。1088株はMOI(多重感染度) ≈ 1 であっても、培養上清中のウイルス力価はいずれの時点でも $10^5 \sim 10^6$ FFU/ml程度であった。したがって、Gタンパク質へのN型糖鎖の追加が1088株のNA細胞への馴化に強く関与していることが示唆された。

続いて、マウスでの病原性について検討した。脳内接種においては、いずれも成熟マウスに致死感染を起こし、1088株、N4#14株および

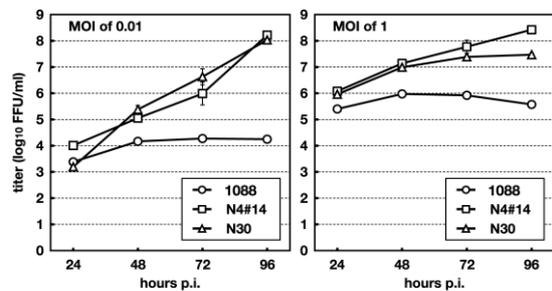


図2 NA細胞における増殖性

1088株もしくは変異株をNA細胞にMOI=0.01もしくは1で接種し、37°Cで培養した。感染24~96時間後に培養上清を回収し、ウイルス力価をフォーカス法により測定した。

N30株の50%致死量はそれぞれ6.8、6.8および5.0 FFUであり、ほぼ同程度であった。一方、末梢感染(右後肢筋肉内接種)においては、1088株に比べて、N4#14株およびN30株の病原性は低下しており、特にN30株では顕著であった(表2)。末梢感染時のマウス脳内でのウイルス抗原の分布を調べたところ、感染5日目、いずれの感染においても大脳皮質にウイルス抗原が検出された(図3)。感染8・11日目では、1088株感染ではウイルス抗原が脳全体に拡がっていたが、N30株感染では大脳皮質(一部は視床まで)に限局したままであった。一方、N4#14感染マウスにおけるウイルス抗原の分布は、1088株感染とN30株感染の中間型を示した。さらに、末梢感染時の血中ウイルス中和抗体価の推移についても調べたところ、感染5日後で、1088株感染に比べて、変異株感染ではともに有意に高いウイルス中和抗体価の誘導が認められ、同様の傾向が感染8日後でも認められた(図4)。

表2 マウスにおける各株の病原性(i.m.)

用量 (FFU)	死亡数/試験数		
	1088	N4#14	N30
10^6	10/10	5/10	0/10
10^5	7/10	5/10	1/10
10^4	8/10	0/10	3/10
10^3	5/10	2/10	1/10
計	30/40	12/40	4/40

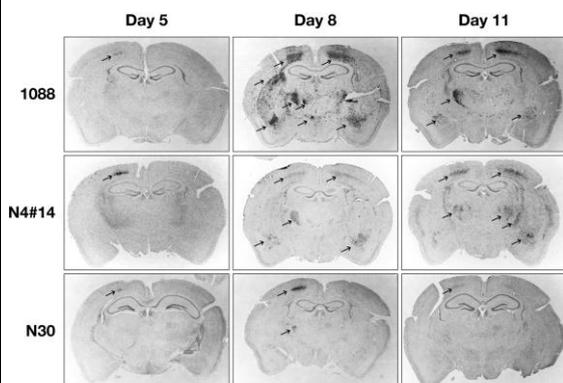


図3 i.m.接種時のマウス脳内におけるウイルス抗原の分布

1088株もしくは変異株 10^6 FFUをマウスの右後肢筋肉内に接種した。感染5、8および11日後に安楽殺し、脳組織を採取・固定後、抗Pタンパク質抗体により免疫組織化学的染色を行った。矢印はウイルス抗原陽性部位を示す。

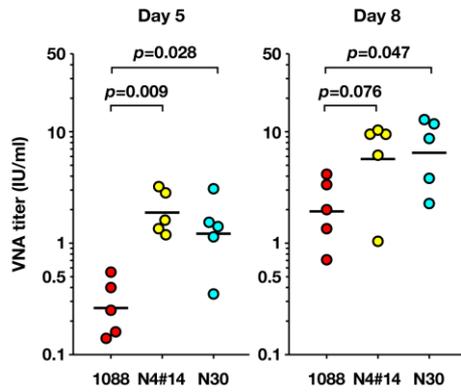


図 4 i.m. 接種マウスにおける血中ウイルス中和抗体価
1088 株もしくは変異株 10^6 FFU をマウスの右後肢筋肉内に接種した。感染 5、8 日後に採血し、血清を分離して非動化した後、RFFIT 法により血清中の抗狂犬病ウイルス中和抗体価 (VNA) を測定した。図中の○は各個体の中和抗体価を、バーは幾何平均値を示す。P 値は Mann-Whitney の U 検定により算出した。

以上に示したように、本研究において当初の目論見通り、街上毒 1088 株を神経系細胞で連続継代することにより、神経病原性は保たれているが、末梢からの接種において病原性の低下した変異株を確立することに成功した。変異株と親株である 1088 株の比較解析の結果、R196S 変異による G タンパク質第 194 位への N 型糖鎖の追加が、神経系細胞への馴化と病原性の低下に強く関与していることが示唆された。

末梢感染において、変異株感染マウスでは共に 1088 株感染マウスと比べて、脳におけるウイルス抗原の拡がり制限されており、一方で、感染早期から高い中和抗体の誘導が認められた。また、感染 5 日目の時点で、いずれの接種群で大脳皮質にウイルス抗原が認められ、抗原の分布の程度について差は認められなかったことから、変異株の末梢部位から中枢神経系へ侵入する能力は 1088 株と遜色ないことが示唆された。両変異株は脳内接種ではマウスに致死感染を起こせることから、神経病原性も損なわれていない。したがって、変異株の末梢感染における病原性の低下は、脳内に侵入する過程で宿主の防御免疫反応を強く誘導し、そのため脳内に侵入後その拡がり抑制されるためであると考えられた。

(2) 街上毒 G タンパク質における N 型糖鎖の追加は感染細胞におけるビリオン産生を促進する

R196S 変異による G タンパク質第 194 位への N 型糖鎖の追加が培養神経系細胞への馴化および末梢感染時の病原性低下に関与することを示したが、他の固定毒で認められる N 型糖鎖追加部位 (第 158 位、204 位、247 位) も同様の影響があるのかについては依然不明であった。そこで、街上毒 G タンパク質において固定毒の N 型糖鎖追加部位が培養細胞への馴化に関与し

ているかどうかについてシュードタイプウイルスアッセイにより検討を行った。

図 5 に示すように、1088 株 G タンパク質およびその N 型糖鎖追加もしくは欠失変異体発現プラスミドを構築し、その発現を NA 細胞で確認したところ、過去の報告にもあるように (Wunner 1985, Shakin-Eshleman 1992)、第 37 位の N 型糖鎖付加と第 204 位への N 型糖鎖の追加は効率的ではないことが分かった。

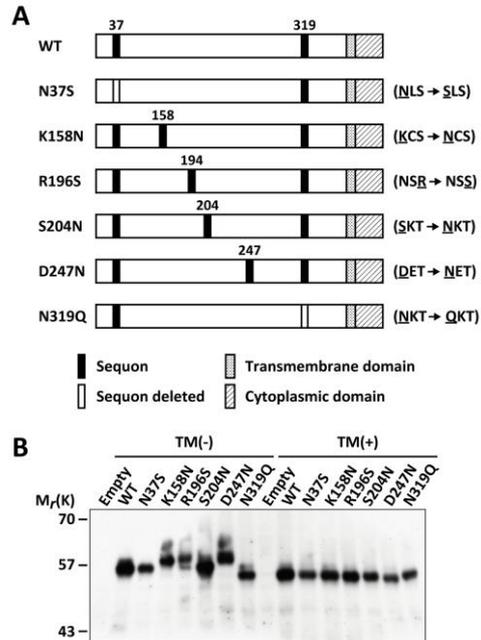


図 5 各種 G タンパク質発現プラスミドの構築とその発現確認

A) 1088 株 (WT) G タンパク質とその N 型糖鎖追加 / 欠失変異体の構造を示す。導入したアミノ酸変異は図中右に下線で示した。
B) 各発現プラスミドを NA 細胞に導入し、TM 存在下 (+) もしくは非存在下で一定時間培養した。細胞中の G タンパク質の検出はウェスタンブロット法により行った。

続いて、構築した発現系を用いて NA 細胞にてシュードタイプウイルスアッセイを行ったところ、野生型 1088 株 G タンパク質 (WT) に比べて、糖鎖が追加された G タンパク質では、培養上清中への感染性ウイルス粒子 (ビリオン) 放出の亢進が認められ、それは特に R196S および D247 変異体で顕著であった (図 6)。N 型糖鎖追加によるビリオン産生の亢進は非神経系細胞である L929 (マウス線維芽細胞系) 細胞でも認められた (図 7)。

さらに、N 型糖鎖の成熟を阻害する各種グルコシダーゼ阻害剤を使用した解析において、R196S および D247 変異体によるビリオン産生は、WT の場合と比べて阻害剤による抑制効率が高かったことから、1088 株 G タンパク質への N 型糖鎖追加によるビリオン産生亢進には、N 型糖鎖の成熟が重要である可能性が示唆された。

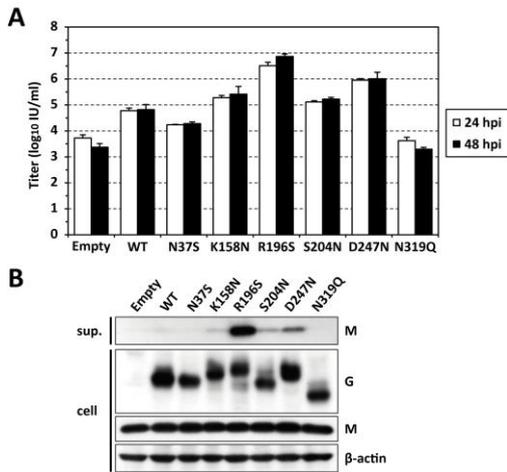


図6 NA細胞におけるシュードタイプウイルスアッセイ
 A) 野生型もしくは変異型 G タンパク質を発現させた NA 細胞に G 欠損ウイルスを $moi=1$ で感染させ、24 もしくは 48 時間培養後に上清を回収し、感染価を測定した。
 B) 細胞中のウイルスタンパク質 (M および G)、上清中のウイルス M タンパク質はウェスタンブロット法により検出された。

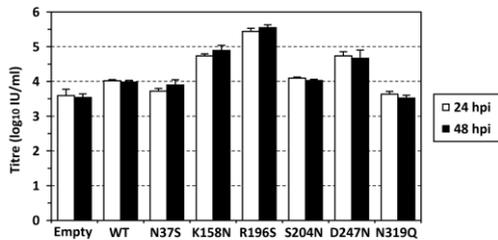


図7 L929細胞におけるシュードタイプウイルスアッセイ
 野生型もしくは変異型 G タンパク質を発現させた L929 細胞に G 欠損ウイルスを $moi=1$ で感染させ、24 もしくは 48 時間培養後に上清を回収し、感染価を測定した。

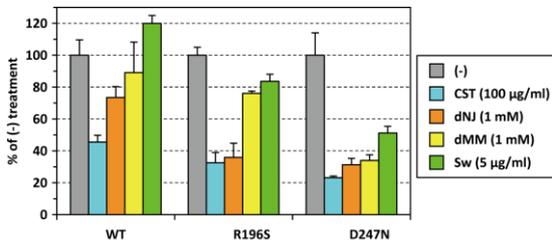


図8 各種グリコシダーゼ阻害剤のウイルス産生に対する影響
 野生型もしくは変異型 G タンパク質を発現させた NA 細胞に G 欠損ウイルスを $moi=1$ で感染させ、カスチノスペルミン (CST)、デオキシジリマイシン (dNJ)、デオキシマンノジリマイシン (dMM) もしくはスワインソニン (Sw) の含まれた培地を添加した。24 時間培養後に上清を回収し、感染価を測定した。

以上、本研究により、狂犬病ウイルス街上市毒の細胞での増殖性と末梢感染における病原性に G タンパク質への N 型糖鎖追加が関与することが初めて実証された。すなわち、狂犬病ウイルスの末梢感染を規定する一つの因子として、G タンパク質 N 型糖鎖を同定することができた。さらにシュードタイプウイルスアッセイにより、他の固定毒で認められる N 型糖鎖追加も細胞での増殖性亢進に関与していることが明らかとなった。末梢感染における病原性の発現は、狂犬病ウイルスの自然界における感染環の成立および存

続に重要であることは想像に難くない。ほとんどの街上市毒の G タンパク質において N 型糖鎖の追加が認められないのは、その追加が狂犬病ウイルスの自然界での存続において不利であるためであることが想像される。したがって、他の固定毒で認められる N 型糖鎖追加も末梢感染時の病原性の低下をもたらすことが期待されるが、今回その実証までにはいたっていない。また、再度 NA 細胞での連続継代およびクローニングを行ったところ、第 247 位や他の部位に N 型糖鎖付加部位を持つ 1088 株変異体を得ることに成功した。今後、これら変異体の解析やリバースジェネティクスにより、N 型糖鎖と狂犬病ウイルスの病原性発現の関連についてより明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① Yamada K., Park C.H., Noguchi K., Kojima D., Kubo T., Komiya N., Matsumoto T., Mitui M.T., Ahmed K., Morimoto K., Inoue S., Nishizono A., Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus, *Virus Research*, 査読有, 165 巻, 1 号, 2012, 34-45

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① Yamada K., Noguchi K., Matsumoto T., M. Mitsui M.T., Ahmed K., Nishizono A., A candidate for a viral element related to street rabies virus pathogenicity following peripheral infection., *International Union of Microbiological Societies*, 2011 年 9 月 15 日, 札幌コンベンションセンター
- ② 山田健太郎、野口賀津子、西園 晃. 狂犬病ウイルス街上市毒 G タンパク質における N 型糖鎖の追加は細胞からのウイルス粒子の放出を促進する, *日本ウイルス学会九州支部総会*, 2011 年 8 月 27 日, 北九州市門司港ホテル
- ③ 山田健太郎、野口賀津子、松本昂、他. 狂犬病ウイルス街上市毒の MNA 細胞での連続継代による末梢感染性減弱変異株の樹立, *日本ウイルス学会*, 2010 年 11 月 8 日, 徳島県郷土文化会館
- ④ Kentaro Y., Attenuation of neuroinvasiveness of street rabies virus after serial passage in mouse neuroblastoma cells, *日米医学ウイルス部門*, 2010 年 6 月 30 日, 北海道大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健太郎 (YAMADA KENTARO)

大分大学・全学研究推進機構・助教

研究者番号: 70458280