

平成 30 年 8 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02384

研究課題名(和文)ジステンパーウイルスの細胞侵入機構の分子基盤と感染防御

研究課題名(英文)Molecular basis for cell entry of canine distemper virus

研究代表者

前仲 勝実(MAENAKA, Katsumi)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10322752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,400,000円

研究成果の概要(和文)：犬ジステンパーウイルス(CDV)の膜融合タンパク質(CDV-F)について、クライオ電子顕微鏡による観察を実施した。クライオ電子顕微鏡に特有の試料調製条件およびグリッド作製条件の検討を行ったところ、より高分解能で解析できる目処が見つかった。一方、同ウイルスの受容体結合タンパク質(CDV-H)については、ラットを用いて抗体の作製を進め、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを複数樹立した。得られた抗体のサブタイプやCDV-Hへの結合を確認したほか、膜融合活性を指標とした解析から、各抗体により結合親和性や特異性が異なることがわかった。これらにより、CDVワクチンの有効性の分子基盤を解明した。

研究成果の概要(英文)：The structural features of the membrane fusion protein (CDV-F) of canine distemper virus (CDV) were observed by cryo-electron microscopy. The sample preparation and grid manufacturing conditions were successfully optimized for high-resolution analysis. On the other hand, for the receptor-binding protein (CDV-H) of the same virus, several anti-CDV-H monoclonal antibodies were established by rat intestinal lymph node method. The subtypes and CDV-H binding properties of the obtained antibodies were examined. The membrane fusion assay showed that each antibody has different binding affinity and specificity. These results give insight on the molecular basis of viral entry and vaccine effectiveness of CDV and related viruses.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造解析 ウイルス 細胞侵入 細胞表面受容体 相互作用解析 X線結晶構造解析 膜融合 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

ジステンパーウイルス (canine distemper virus, CDV) は犬などの食肉目の動物に感染する。麻痺や痙攣等の著しい神経症状が起き、死に至る場合も多い。近縁の麻疹 (はしか) ウイルス (Measles virus, MV) と同じように、感染予防には生ワクチンが有効であるが、有効な治療薬は存在しない。最近になって、日本や中国で CDV が数百から数千頭のアカゲザルやカニクイザルに感染し、高い致死率で死亡した。そのため、宿主拡大の傾向から人への感染に進む可能性が否定できない。このような状況にも拘らず、CDV ワクチンと MV ワクチンが有効であるため、反って抗ウイルス薬の開発は進められなかった。我々は、麻疹ウイルスの細胞侵入の分子認識機構について、主たる表面抗原である H 蛋白質 (Measles Virus Hemagglutinin, MV-H) およびその受容体である SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule, CD150) との複合体の X 線結晶構造解析に世界で初めて成功した (Hashiguchi et al., *PNAS* 2007, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011 など)。さらに、細胞侵入受容体と宿主域拡大の解析 (Pratakpiriya et al., *J. Virol.* 2012, Tahara et al., *J. Virol.* 2013 など) などを行い、原子から個体レベルまで世界に先駆けて明らかにしてきた。これらの成果を基に、H 蛋白質が融合 F 蛋白質と協同的に働き、細胞侵入を促進するモデルを提唱した。また、糖鎖により MV-H 蛋白質表面の大部分が覆われ、受容体の結合部位のみ露出し、そこに集中的に中和抗体が産生されること、他方、ウイルスは受容体結合部位に変異を入れざるを得ず、免疫逃避できないこと、これが MV ワクチンの有効性を保証する分子基盤であるとの仮説を提唱し、組換えウイルス技術を駆使して裏付けた。

2. 研究の目的

上述のように食肉目動物へ感染し、致死率の高いジステンパーウイルス (CDV) は、最近サルの大規模流行が報告され、ヒト感染の脅威が懸念される。生ワクチンは幸いにも有効であるが、発症すると有効な治療法が無い。我々は、近縁の麻疹ウイルスについて侵入受容体と結合 H 蛋白質の複合体の立体構造決定などの細胞侵入機構を世界に先駆けて明らかにしてきた (*PNAS* 2007, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011 など)。そこで本課題では、CDV ワクチンの有効性を保障すると考えられる抗体応答について、MV に対する知見と比較するために構造生物学と分子免疫学の手法を組み合わせ、その分子基盤を解析し、その知見をもとに、ワクチンの合理的な設計手法の確立を目指す。次に、感染拡大の阻止に有効とされる細胞侵入について、CDV を対象としてその詳細なメカニズムを立体構造解析

により解明し、宿主域拡大の可能性の予測および中和抗体や可溶性受容体等の細胞侵入を阻害する抗ウイルス薬の開発を進める。これにより将来に CDV が狂犬病のように人獣共通感染症となり、世界的大流行となる場合に備え、対策の基盤を築くことを目指した。

3. 研究の方法

CDV の H 蛋白質と融合 F 蛋白質について、蛋白質科学的手法を駆使して、(1) 細胞侵入および宿主特異性の分子基盤、(2) ワクチンの有効性の抗体産生機構の解明、(3) 将来の世界的大流行に備えた可溶性受容体および中和抗体断片などの抗ウイルス薬候補の開発、を進め、ワクチン設計手法の構築と侵入阻害剤の開発を行う。

これまでに CDV-H および CDV-F (野生株、ワクチン株) について HEK293 細胞を用いた一過性発現系を確立済みであり、侵入受容体群も HEK293 細胞発現系あるいは蚕バキュロウイルス発現系を確立できている。これらの組換え蛋白質を用いる、あるいは必要に応じて新たに発現系を構築する。これを基盤に、蛋白質レベルで分子機構を解明するため、本課題は主に以下の項目を対象に進める。

- (1) CDV の細胞侵入に重要な H 蛋白質と F 蛋白質との機能複合体、および宿主特異性の基盤となる H 蛋白質と侵入受容体との機能複合体、に対する立体構造解析・相互作用解析、
- (2) CDV に対するラット腸管リンパ節法による抗体作成技術等を用いた免疫応答機構および中和抗体作成、
- (3) 抗ウイルス薬開発のための中和抗体の評価と高機能化。

4. 研究成果

ジステンパーウイルス CDV の融合タンパク質 (CDV-F) については、細胞外ドメインを組換えタンパク質として調製し、電子顕微鏡を用いたネガティブ染色解析により得られた構造的な特徴について、より高精度の電子顕微鏡観察による 2 次元の単粒子解析から詳細についての理解が進んだ。そのため、膜融合に伴う構造変化等についてより動的な特徴を大まかに掴むことができるめどがあった。さらに詳細なメカニズムを解明するため、大阪大学蛋白質研究所の岩崎准教授のサポートのもとで最先端クライオ電子顕微鏡解析を進めることとしたが、クライオ電子顕微鏡で得られた二次元画像は、先にネガティブ染色で得られていた単粒子画像と異なっており、これはクライオ電子顕微鏡に特有の試料調製過程に起因する現象と考えられた。そこで精製条件およびグリッド作製条件の検討を行なったところ、より高分解能で解析できる目処があった。少量のサンプルから近

原子分解能の構造解析が可能であることがわかり、今後の構造解析の手法としてのクライオ電子顕微鏡のポテンシャルの大きさを確認することができた。現在は、さらなる構造変化を追跡できるように解析条件の検討を進めている。

他方、CDV-H については、単独の結晶構造解析を進め、その立体構造の特徴をこれまでに報告済みの MV-H の結晶構造と比較が可能となり、その共通性と差異を見出すことができた。さらに、ネガティブ染色電子顕微鏡解析を進め、これまで報告のない膜融合にとって重要と考えられるユニークな高次構造を見出し、その動的挙動について考察することができた。今後は CDV-H および CDV-F の構造的特徴を基盤に、CDV-H と CDV-F のコミュニケーションと膜融合との関係を明らかにすることが期待される。

次に、宿主特異性については、サルに感染する株由来の受容体結合を担う H 蛋白質のヘッドドメインについて HEK293 細胞を用いて、調製法の検討を進めたが、X 線結晶構造解析には十分な量は得られなかった。他方、少量ではあるが、得られたサルに感染する株由来の H 蛋白質を用いて、表面プラズモン共鳴解析 (SPR) によりヌオおよびヒトの受容体 SLAM や Nectin4 との結合特異性を解析した。その結果、MV-H と CDV-H の宿主特異性が明確となった。さらに、CDV-H と SLAM および Nectin4 複合体の結晶化を目指し、遺伝子工学的に一本鎖化して複合体を調製することも検討したが、十分な発現条件が見出せなかった。しかし、CDV-F で進めている経験を生かして、これらの一本鎖化複合体の組換え蛋白質を用いて、今後クライオ電子顕微鏡解析も検討したい。

最後に、ワクチンの有効性について記述する。これについては、中和抗体がすでに得られている麻疹ウイルス (MV) を先行して進めているが、2 種類の中和抗体のうち一つは一本鎖 Fv 断片として大腸菌で封入体として発現させ、巻き戻しに成功した。この抗体について、SPR による結合活性評価を行い、断片化による結合能の低下が見られたが、特異的結合を確認した。同時に受容体との競合実験にも成功し、その生物物理的な解析が進んだ。CDV-H については、ラットを用いて抗体の作製を進め、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを複数樹立した。得られた抗体はそれぞれ精製し、膜融合活性を指標とした受容体結合の阻害能および各抗体間での交差性についても評価を進めており、分子レベルで明らかにすべく、詳細な結合解析及び構造解析に取り組んでいる。これらにより、CDV ワクチンの有効性の分子基盤を解明し、その技術を他のウイルスのワクチン開発へと活かしていく予定である。

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 11 件)

Sasaki M, Anindita PD, Ito N, Sugiyama M, Carr M, Fukuhara H, Ose T, Maenaka K, Takada A, Hall WW, Orba Y, Sawa H. The Role of Heparan Sulfate Proteoglycans as an Attachment Factor for Rabies Virus Entry and Infection. *J Infect Dis*. 査読有、2018 May 5;217(11): 1740-1749.
DOI: 10.1093/infdis/jiy081.

Anindita PD, Sasaki M, Okada K, Ito N, Sugiyama M, Saito-Tarashima N, Minakawa N, Shuto S, Otsuguro S, Ichikawa S, Matsuda A, Maenaka K, Orba Y, Sawa H. Ribavirin-related compounds exert in vitro inhibitory effects toward rabies virus. *Antiviral Res*. 査読有、2018 Mar 28;154:1-9.
DOI: 10.1016/j.antiviral.2018.03.011.

Furukawa A, Kakita K, Yamada T, Ishizuka M, Sakamoto J, Hatori N, Maeda N, Ohsaka F, Saitoh T, Nomura T, Kuroki K, Nambu H, Arase H, Matsunaga S, Anada M, Ose T, Hashimoto S, Maenaka K. Structural and thermodynamic analyses reveal critical features of glycopeptide recognition by the human PILR immune cell receptor. *J Biol Chem*. 査読有、2017 Dec 22 ;292(51): 21128-21136.
DOI: 10.1074/jbc.M117.799239

Maeda N, Maenaka K. The Roles of Matricellular Proteins in Oncogenic Virus-Induced Cancers and Their Potential Utilities as Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*. 査読有、2017 Oct 21;18(10). pii: E2198.
DOI: 10.3390/ijms18102198.

Ban T, Ishihara T, Kohno H, Saita S, Ichimura A, Maenaka K, Oka T, Mihara K, Ishihara N. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat Cell Biol*. 査読有、2017 Jul;19(7):856-863.
DOI: 10.1038/ncb3560

Kuroki K, Mio K, Takahashi A, Matsubara H, Kasai Y, Manaka S, Kikkawa M, Hamada D, Sato C, Maenaka K*. Cutting Edge: Class II-like

Structural Features and Strong Receptor Binding of the Nonclassical HLA-G2 Isoform Homodimer. *J Immunol.* 査読有、2017 May 1;198(9):3399-3403. DOI: 10.4049/jimmunol.1601296.

Tahara M, Bürckert JP, Kanou K, Maenaka K, Muller CP, Takeda M. Measles Virus Hemagglutinin Protein Epitopes: The Basis of Antigenic Stability. *Viruses.* 査読有、2016 Aug 2;8(8). pii: E216. DOI: 10.3390/v8080216.

Imai A, Tadokoro T, Kita S, Horiuchi M, Fukuhara H, Maenaka K*. Establishment of the BacMam system using silkworm baculovirus. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有、2016 Jul 29. pii: S0006-291X(16)31226-8. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.104.

Takahashi A, Kuroki K, Okabe Y, Kasai Y, Matsumoto N, Yamada C, Takai T, Ose T, Kon S, Matsuda T, Maenaka K*. The immunosuppressive effect of domain-deleted dimer of HLA-G2 isoform in collagen-induced arthritis mice. *Hum Immunol.* 査読有、2016 Jan 21. S0198-8859(16)00011-2. DOI: 10.1016/j.humimm.2016.01.010.

Maeda N, Ohashi T, Chagan-Yasutan H, Hattori T, Takahashi Y, Harigae H, Hasegawa H, Yamada Y, Fujii M, Maenaka K, Uede T. Osteopontin-integrin interaction as a novel molecular target for antibody-mediated immunotherapy in adult T-cell leukemia. *Retrovirology.* 査読有、2015 Nov 24;12(1):99. DOI: 10.1186/s12977-015-0225-x.

Yamauchi H, Matsumaru T, Morita T, Ishikawa S, Maenaka K, Takigawa I, Semba K, Kon S, Fujita Y. The cell competition-based high-throughput screening identifies small compounds that promote the elimination of RasV12-transformed cells from epithelia. *Sci Rep.* 査読有、2015 Oct 20;5:15336. DOI: 10.1038/srep15336.

〔学会発表〕(計7件)

永野悠馬、若原拓也、蔣欣欣、柳雄介、前仲勝実、尾瀬農之、麻疹ウイルスV蛋白質C末端領域の構造的特徴、日本蛋白質科学会年会、2017年

佐々木道仁、アニンディタパウリナ、伊藤直人、杉山誠、福原秀雄、尾瀬農之、尾瀬農之、前仲勝実、澤洋文、狂犬病ウイルスの細胞吸着に關与する宿主因子の解析、日本獣医学会学術集会、2017年

尾瀬農之、石塚幹広、古川敦、黒木喜美子、前仲勝実、単純ヘルペスウイルス由来糖蛋白質がヒト受容体を認識するメカニズム、日本結晶学会年会、2017年

斎藤瑞紀、福原秀雄、東端将哲、中津祐一郎、竹田誠、橋口隆生、柳雄介、前仲勝実、麻疹ウイルス表面Hタンパク質を標的とした侵入阻害剤のスクリーニング、日本ウイルス学会年会、2016年

前仲勝実、モリビリウイルス属の細胞侵入機構の構造基盤と阻害剤開発、日本薬学会(招待講演)、2016年

前仲勝実、モリビリウイルス属の細胞侵入の構造基盤と抗ウイルス薬開発、平成27年度 京都大学ウイルス研究所・再生医科学研究所 合同学術講演会(招待講演)、2016年

前仲勝実、Molecular recognition of glycopeptides by human immune receptor, PILR.、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会(招待講演)、2015年

〔図書〕(計1件)

Senda T, Maenaka K. *Advanced Methods in Structural Biology.* Springer. 2016. 340

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学薬学研究院 生体分子機能学研究室

<http://convallaria.pharm.hokudai.ac.jp/bunshi/>

北海道大学薬学研究院 創薬科学研究教育センター

<https://japanese-apricot.pharm.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

前仲 勝実 (MAENAKA, Katsumi)
北海道大学・薬学研究院・教授
研究者番号：10322752

(2)研究分担者

福原 秀雄 (FUKUHARA, Hideo)
北海道大学・薬学研究院・特任助教
研究者番号：80707191