

氏 名	カンカナムゲ プシュパ ジネテ Kankanamge Pusbhpa Jenette
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 510 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the Epitope of Rabies Virus Glycoprotein Recognized by a Monoclonal Antibody #1-30-44 (狂犬病ウイルス糖タンパク質に対するモノクローナル抗体 #1-30-44 が認識 するエピトープに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 河 合 明 彦 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 市 川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

狂犬病ウイルス (RV) 感染は発症すると治療不可能な致命的脳炎を引き起こすが, RV の感染後にワクチンや抗 RV 免疫グロブリンを投与することにより発症を免れることができる。不活化ウイルスを用いて作成されたワクチンは種々の体液性免疫応答を誘導するが, 糖タンパク質 (G) に対する応答が最も重要である。G タンパク質は中和抗体の産生を促進するだけでなく細胞の特異的なレセプターの認識や低 pH により誘導されるウイルスのエンベロープとエンドソーム膜の融合といった役割を担っている。これまでに種々のモノクローナル抗体 (mAbs) が認識する RV の糖タンパク質の抗原部位 (コンフォメーションや配列を認識する) について解明されてきた。さらにモノクローナル抗体が G タンパク質の異なるコンフォメーションを認識することが可能であることが報告されており, 低 pH により誘導される G タンパク質の構造変化を捉えるために用いられた。モノクローナル抗体により G タンパク質は pH 依存的なコンフォメーション変化をとることが可能であることが示された。しかしながら現在のところ, 抗原部位の構造とコンフォメーションの変化との関係を示す十分な研究は行われていない。本研究では, 酸により誘導される G タンパク質の抗原性及び機能的構造変化についての解明を試みた。

第 1 章 モノクローナル抗体 #1-30-44 が認識するエピトープの特性とマッピング

狂犬病ウイルス糖タンパク質 (G) の酸性誘導性の構造変化と関連した機能について研究するため, 筆者は中性ならびに酸性条件下でホルマリン固定した感染細胞の表面 G 抗原の認識に基づいて, G タンパク質の中性でのコンフォメーションと酸性でのコンフォメーションを識別する mAb (モノクローナル抗体) を見つけることを試みた。14種類の抗 G mAb のうち, #1-30-44 が G タンパク質の酸性誘導性のコンフォメーション変化を認識することを見いだした (細胞表面に露出している G タンパク質の抗原性が, 感染細胞を pH5.8 の環境に曝露すると消失した)。次に, エピトープ陽性の HEP-Flurry 株とエピトープ陰性 CVS 株の G タンパク質, 及びこれらのキメラタンパク質, ならびに mAb 抵抗性 escape 突然変異から得られたタンパク質のアミノ酸配列を比較して, 低 pH 感受性コンフォメーションエピトープをマッピングすることを試みたところ, Lys-202 ならびに Asn-336 を含む離れた 2 カ所がエピトープ形成に関与していることが示された。これらのサイトのうち 1 カ所は蛇毒ニューロトキシン様の領域に存在しており, もう一カ所は抗原サイトⅢに存在している。これらの結果に基づいて, ニューロトキシン様ドメインと, 抗原サイトⅢが互いに接近して mAb #1-30-44 のコンフォメーションエピトープを形成すること, 酸性条件下に曝露されるとそのような構造が消失し G タンパク質の低 pH 依存性の機能 (おそらく細胞膜融合能) を発揮するという仮説を筆者はたてた。

第 2 章 狂犬病ウイルス糖タンパク質のモノクローナル抗体 #1-30-44 に対するエピトープ形成と機能的成熟の相関性

この章では, #1-30-44 を含む種々の抗 G mAbs を用いて GcDNA をトランスフェクトした哺乳動物細胞が産生する G タンパク質の抗原構造および機能的成熟について解析した。GcDNA を単独で発現させた場合には G タンパク質は大部分の抗 G mAb が認識できる抗原として成熟したが, #1-30-44 は認識しなかった。さらに T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を組

み込んだ組換えワクシニアウイルス (RVV-T7) の助けを借りることで G 遺伝子の発現が促進された場合には、そのようなタンパク質の一部が mAb #1-30-44 で認識されるようになることを認めた (RVV-T7 は T7 プロモーターの制御下で G 遺伝子を発現させるため T7 RNA ポリメラーゼを供給するために用いた)。この観察結果は、GcDNA の発現だけでは、折り畳みが正しく行われていない G タンパク質のみが生じるが、RVV-T7 が介在する G 遺伝子発現の場合には、一部が適切に折り畳まれることを示唆している。融合活性をもつ G タンパク質の産生条件を明らかにするため、組み換えウイルス (RVV-T7) の存在下あるいは非存在下で G cDNA をトランスフェクトさせた細胞に産生される G タンパク質やウイルス感染細胞が産生する G タンパク質の抗原的成熟および機能的成熟を比較した。その結果 #1-30-44 エピトープ形成ならびに BHK-21 細胞に対する低 pH 依存融合活性の獲得が互いに密接な関係にあることが示された。また、G タンパク質の機能的成熟には狂犬病ウイルスの感染によって誘導される細胞の機能的変化に依存するものと思われ、ワクシニアウイルスの感染によっても同様の結果が一部生じるものと思われる。

第3章 G cDNA をトランスフェクトさせた動物細胞における G タンパク質の成熟に必要な条件

G タンパク質が機能的に成熟するのに必要な条件を調べるため、筆者はテトラサイクリン制御発現ベクター (pTet-G) を用いた誘導可能な G-BHK 細胞株を作成した。様々な試みを行った結果、GcDNA をトランスフェクトさせた細胞の培養液に 2.5mM 酪酸ナトリウムを添加することで G タンパク質の成熟条件が得られ、低 pH 依存性細胞融合活性を発揮することを見いだした。酪酸ナトリウムは G タンパク質の産生を促進したが、融合活性の獲得はタンパク質の産生量の増加によるものではなく、酪酸ナトリウムによって賦活化された転写後の何らかの働きによるものであった。さらに、酪酸ナトリウム処理した G-BHK 細胞での低 pH 融合活性は、mAb #1-30-44 の存在下で細胞を培養することでブロックされた。mAb #1-30-44 ならびに #1-46-12 との比較免疫共沈実験で、酪酸ナトリウム処理条件下でタンパク質を産生させた場合は、可溶化した G タンパク質の大部分は mAb #1-30-44 でも沈降したが、酪酸ナトリウムが存在しない条件下で、合成された G タンパク質はほとんど沈降しなかった。言い換えれば、酪酸ナトリウムを投与した後に誘導された G タンパク質は #1-30-44 エピトープを有すると同時に低 pH 融合能をも有するという点で酪酸ナトリウムを添加せずに培養して誘導された G タンパク質とは質的に異なっていた。以上の結果は、細胞融合活性の獲得が、1-30-44 エピトープの形成と関係しているというわれわれの仮説に合致するものであり、酪酸ナトリウムで処理することによって、感染細胞でみられるような狂犬病ウイルスの G タンパク質が成熟するのに必要な条件が提供されることも示唆している。

総括

以上、本研究では狂犬病ウイルス糖タンパク質遺伝子 (cDNA) の単独発現系において機能的に成熟した G タンパク質の構造的特性及び産生条件を明らかにしたもので、今後、GcDNA 発現系をワクチン開発や遺伝子導入ベクターの開発に利用する上で有用な条件を与えることが期待される。

論文審査の結果の要旨

狂犬病ウイルスの研究は、ウイルスの取り扱いや研究技術の応用など、様々な面で困難な問題があり、また研究人口も少ないため、古くから知られている病原体であるにも関わらず他のウイルスと較べて研究が遅れている。特にウイルス糖蛋白質は機能的な面だけでなく、免疫応答と関連する重要な抗原物質でもあり防御的な面での利用が期待されているが、そのためにはより詳細な理解が必要である。本研究ではウイルス糖蛋白質の機能と関連する構造変換および生合成過程における構造的成熟に関して、モノクローナル抗体や cDNA 発現系を用いて種々の観点から解析している。

第1章では、まずモノクローナル抗体ストックの再調査を行い、ウイルス糖蛋白質の酸性条件下で起こる構造変換を認識する抗体 #1-30-44 を見出した。次に、このモノクローナル抗体が認識するエピトープ構造を明らかにした。すなわち、1-30-44 エピトープは立体構造的エピトープで、ウイルス糖蛋白質を酸性条件 (pH5.8) に曝すと立体構造が変換し、抗体との反応性を失う。比較に種々のモノクローナル抗体 (特に本実験では #1-46-12 を代表として用いている) との反応性を見たが、#1-30-44 以外のものに対しては酸性に曝しても反応性が変わらなかった。また、抗原決定基は2つの離れた部位から構成され、一つの部位は CVS 株がこのエピトープを欠如することがら、HEP 株や他の株との比較により、202位のアミノ酸の変異が抗原性を決定することが分かった。もう一つの部位はエスケープ変異の分離により、その変異アミノ酸の解析

から336位近辺がエピトープ形成に関わっていることが分かった。以上の結果から、202位と336位のアミノ酸を含む離れた二つの領域が会合することにより1-30-44 エピトープが形成され、酸性条件下ではこの二つの領域が解離することが強く示唆された。このエピトープ形成に関わる二つの領域は神経病原性の決定に関わることが示唆されている部位に含まれるかあるいは非常に近い部位に存在する点から、機能的に非常に重要な部位の構造変換を認識する抗体であることが示唆された。

第2章では、ウイルス糖蛋白質をコードするcDNAを発現させる方法により、#1-30-44 抗体を含む種々のモノクローナル抗体を用いて生合成過程における構造的成熟あるいは抗原性の成熟過程を解析した。従来からcDNA発現系で作られたウイルス糖蛋白質が機能的に欠陥があり、酸性条件下で発揮されるべき膜融合活性を欠如することが報告されている。今回、#1-30-44 モノクローナル抗体を用いた解析から、1-30-44 エピトープ形成と発現ウイルス糖蛋白の機能的成熟（特に酸性条件下で発揮される膜融合活性獲得）とが密接に関連していることが示された。また、ウイルス糖蛋白の成熟には狂犬病の感染により引き起こされる細胞側の機能的な変化が必要で、cDNAの発現に補助的に用いられた組換えワクチニアウイルス（T7 RNAポリメラーゼの供給のため）によってもその条件が部分的に満たされることが分かった。少なくともウイルス糖蛋白遺伝子のみを単独で発現させた場合には、機能的なものが作られ難い、すなわち正確な折り畳みが起こり難いことが示された。

第3章では、モノクローナル抗体#1-30-44を用いて、ウイルス糖蛋白の発現系における機能的な成熟条件を調べた。本実験では一時的な発現方法でなく、テトラサイクリン制御系を用いた樹立細胞系で、テトラサイクリンを除去することで発現を誘導させる実験条件下で糖蛋白を発現させ、種々の成熟条件の効果を調べる方法を採用した。一般的に行われるゴルジ体内部のpHを上げる条件（塩化アンモニウム処理）や、狂犬病ウイルスのマトリックス蛋白質の共発現等の効果を見たが、誘導発現糖蛋白の機能的な成熟は見られなかった。しかし、遺伝子発現や細胞増殖に影響を与えることが知られている酪酸ソーダの効果を見たところ糖蛋白遺伝子の発現の増強に続いて、膜融合活性の獲得に至る成熟が見られた。この発現実験条件下で、モノクローナル抗体#1-30-44に対する抗原性の獲得と膜融合活性とが密接に関連していること、さらに#1-30-44 抗体がウイルス糖蛋白による膜融合を抑制することも示された。

以上、本研究は狂犬病ウイルス糖蛋白の立体構造の違いを認識、識別するモノクローナル抗体を用いた研究により、糖蛋白の機能的な構造の特性、特に成熟過程における構造的成熟過程やその条件を明らかにしたもので、今後狂犬病ワクチンの品質の評価や、cDNAを用いた糖蛋白発現系をワクチン開発や遺伝子導入ベクター開発に応用する上で極めて有用な知見を与えるものといえる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに平成15年2月27日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果、優秀と認定した。