



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Studies on Molecular Biological Characteristics of Antigenic Structure of Rabies Virus Glycoprotein(内容の要旨)
Author(s)	羅, 廷榮
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第054号
Issue Date	1998-03-13
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2108

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	罗廷荣（中華人民共和国）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第54号
学位授与年月日	平成10年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Studies on Molecular Biological Characteristics of Antigenic Structure of Rabies Virus Glycoprotein
審査委員	主査 岐阜大学教授 源 宣之 副査 帯広畜産大学教授 品川 森一 副査 岩手大学教授 松坂 尚典 副査 東京農工大学教授 本多 英一 副査 岐阜大学教授 平井 克哉

論文の内容の要旨

狂犬病ウイルスは人を含むほとんど全ての哺乳動物に感染する。本ウイルスは致死的な神経症状を引き起こし、一度発症すると、感染した人及び動物はほぼ100%死亡する。本病は現在も多くの国々で毎年多数の発生を人や動物で繰り返しており、特に発展途上国では公衆衛生上の重要な問題となっている。狂犬病ウイルスはN、NS、M、糖（G）及びL蛋白質の5つより構成されている。そのうちG蛋白質は中和抗体の産生を誘導し、感染防御能に密接に関わっていることから、その分子生物学的性状はよく研究されている。しかし、G蛋白質の抗原領域とそれらの機能との関係は、これまでのところよく知られていない。また、感染防御能に関与する主要なエピトープの数や位置など不明な点も多い。そこで、著者は日本の動物用の狂犬病ワクチン製造株のRC-HL株を用いて、G蛋白質の抗原構造の分子生物学的な性状の研究を行った。

1、モノクローナル抗体による狂犬病ウイルスG蛋白質の抗原及び機能の解析

RC-HL株のG蛋白質に対する35例のモノクローナル抗体(MAb)を確立した。これらのMAbを用いた競合結合試験によって、RC-HL株のG蛋白質上にはおおよそ2つの抗原領域の存在することが明らかになり、そのうちMAb1例のみが抗原領域Iのエピトープを、34例は抗原領域IIのエピトープを認識した。抗原領域IIは、これらのMAbの競合パターンにより、さらに10

に細分化された。抗原領域Ⅱに対応するMAbは5例から23例の片側競合を示した。各MAbと狂犬病及び狂犬病関連ウイルスとの蛍光抗体法(IFA)による反応性から、35例のMAbのうち6例は用いた狂犬病及び狂犬病関連ウイルスのすべてと結合し、8例のMAbは狂犬病ウイルスとのみ結合した。このことから、前者はリッサ属特異抗原に、後者は狂犬病ウイルス特異抗原に関連するエピトープに対応すると思われた。各種の生物活性の測定から、35例のMAbのうち28、31及び18例はそれぞれ中和、赤血球凝集抑制(HI)及び免疫溶解(IL)活性を持つことが判った。中和エピトープを認識するMAbは少なくとも3種類に区分された。すなわち中和活性のみ、中和・HI両活性及び3つすべての活性を持つものに分かれた。抗原領域Ⅰを認識する唯一のMAb15-13のみがウエスタンブロットにより変性したG蛋白質と反応した。このことから、このMAbが認識するエピトープはリニアな構造をしていると考えられた。以上の結果から、狂犬病ウイルスのG蛋白質上のエピトープのほとんどはコンホメーションな構造をしており、狂犬病ウイルスのG蛋白質は極めて複雑な抗原構造を呈していることが示唆された。

2、狂犬病ウイルスG蛋白質における251番目のトリプトファンを含む領域は中和リニアエピトープである

各種狂犬病固定毒株に高い中和活性を示すMAb15-13に対応する抗原領域Ⅰのリニアエピトープのマッピングを試みた。まず、MAb15-13の存在下で親株のRC-HL株から中和耐性のNR15-13株を選択した。NR15-13株はその選択に用いたMAb15-13に中和されず、ウエスタンブロットでもMAb15-13と反応しなかった。NR15-13株のG蛋白質の251番目のアミノ酸は親株のそれに比べてトリプトファンからアルギニンに変化していた。親株のRC-HL株のG蛋白質の251番目のアミノ酸をトリプトファンからアルギニンに置換し、哺乳動物細胞で発現させた変異G蛋白質とMAb15-13とでウエスタンブロットを行ったところ、その反応は消失した。一方、NR15-13株の251番目のアルギニンをトリプトファンに戻したところ、MAb15-13との反応性が復帰した。これらの結果から、G蛋白質の251番目のトリプトファンがMAb15-13に対応するリニアエピトープの形成に必須なアミノ酸であることが判った。

3、狂犬病ウイルスG蛋白質における中和コンホメーションエピトープのマッピング

G蛋白質上に存在するコンホメーションエピトープをマッピングするために、RC-HL株に高い中和、HIおよびIL活性があり、コンホメーションエピトープを認識するMAb5例を用いて親株のRC-HL株から常法に従って5つの中和耐性株をそれぞれに作出した。各中和耐性株はそれぞれの作出に用いたMAbに中和されず、IFAによっても反応しなかった。各中和耐性株のG蛋白質は親株のそれらと比較して、それぞれ4から5ヶ所のアミノ酸が同時に変異していた。変異したアミノ酸のどれが中和抗体の誘導に関与しているのかを調べるために、それぞれの中和耐性株におけるアミノ酸の変異部位について、各種固定毒株のアミノ酸と比較し、中和耐性株を作出したMAbによる各株に対する中和能との関連を調べた。その結果、36、253、333、336及び367番目のアミノ酸がそれぞれ各MAbに対応するエピトープの形成に関与していると推定された。そこで推定されたアミノ酸の各変異箇所に変異を導入して、

それぞれ親株のRC-HL株のアミノ酸に戻し、各MABとのIFAによる反応性を調べたところ、その反応はいずれも復帰した。従って、36、253、333、336及び367番目のアミノ酸はそれぞれ各MABに対応するエピトープの形成に関連することが確認された。そのうち、253と367番目のアミノ酸は種々の抗体の誘導に関わる新たな抗原領域に含まれることが示唆された。

以上の結果から、狂犬病ウイルスのG蛋白質上に新たに1つのリニアエピトープと2つのコンホメーションエピトープを含む抗原領域が存在すると考えられた。

これらの成績は、G蛋白質の基礎的な研究に有益なデータを提供し、今後、より有効な狂犬病ワクチンの開発およびウイルスの病原性の研究などに役立つと思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者 羅 廷 榮 君の学位論文は、日本で現在使用されている動物用狂犬病ワクチンの製造株であるRC-HL株を用いて、狂犬病ウイルスの糖蛋白質における各種抗原性状をモノクローナル抗体(MAB)及び遺伝子解析により分子生物学的に検討した結果をまとめたものである。

氏は、まずRC-HL株糖蛋白質に対するMABを多数作出し、それらの抗体を用いて糖蛋白質に存在する抗原領域とそれらの機能を明らかにした。次いで、高い中和活性を持つMABによってRC-HL株から作出した中和耐性株及び点変異を導入した糖蛋白質を用いて、種々のリニア及びコンホメーションエピトープのマッピングを行い、各種機能を同時に持ったエピトープを新たに同定した。

得られた成績は次の3つに大別することが出来る。

1、モノクローナル抗体による狂犬病ウイルス糖蛋白質の抗原及び機能の解析

RC-HL株の糖蛋白質に対する35例のMABを確立した。これらのMABを用いた競合結合試験によって、RC-HL株の糖蛋白質上にはおおよそ2つの抗原領域(I及びII)の存在することが明らかになり、これらのうちMAB 1例のみが抗原領域Iのエピトープを、34例は抗原領域IIのエピトープを認識した。抗原領域IIに対応するMABは5例から23例の片側競合を示した。各MABと狂犬病及び狂犬病関連ウイルスとの蛍光抗体法(IFA)による反応性から、35例のMABのうち6例は用いた狂犬病及び狂犬病関連ウイルスのすべてと結合し、8例のMABは狂犬病ウイルスとのみ結合した。このことから、前者はリッサ属特異抗原に、後者は狂犬病ウイルス特異抗原に関連するエピトープに対応すると思われた。各種の生物活性の測定から、35例のMABのうち28、31及び18例はそれぞれ中和、赤血球凝集抑制(HI)及び免疫溶解(IL)活性を持つことが判った。中和エピトープを認識するMABは少なくとも3種類に区分された。すなわち中和活性のみ、中和・HI両活性及び3つすべての活性を持つものに分かれた。抗原領域Iを認識する唯一のMAB15-13のみがウェスタンブロットにより変性した糖蛋白質と反応した。このことから、このMABが認識するエピトープはリニアな構造をしていると考えられた。以上の結果から、狂犬病ウイルスの糖蛋白質上のエピトープのほとんどはコンホメーション構造をしており、狂犬病ウイルスの糖蛋白質は極めて複雑な抗原構造を呈していることが示唆された。

2、狂犬病ウイルス糖蛋白質における251番目のトリプトファンを含む領域は中和リニアエピトープである。

各種狂犬病固定毒株に高い中和活性を示す MAb15-13に対する抗原領域 I のリニアエピトープのマッピングを試みた。まず、MAb15-13の存在下で RC-HL 株から中和耐性の NR15-13 株を選択した。NR15-13 株はその選択に用いた MAb15-13 に中和されず、ウェスタンブロットでも反応しなかったが、IFA では反応した。NR15-13 株の糖蛋白質の 251 番目のアミノ酸は親株のそれに比べてトリプトファンからアルギニンに変化していた。そこで、親株の RC-HL 株の糖蛋白質の 251 番目のアミノ酸をトリプトファンからアルギニンに置換し、哺乳動物細胞で発現させた変異糖蛋白質と MAb15-13 とでウェスタンブロットを行ったところ、その反応は消失した。一方、NR15-13 株の 251 番目のアルギニンをトリプトファンに戻したところ、MAb15-13 との反応性が復帰した。これらの結果から、糖蛋白質の 251 番目のトリプトファンが MAb15-13 に対応するリニアエピトープの形成に必須なアミノ酸であることが判った。

3、狂犬病ウイルス糖蛋白質における中和 コンホメーションナル エピトープのマッピング

糖蛋白質上に存在するコンホメーションナルエピトープをマッピングするために、RC-HL 株に高い中和、HI 及び IL 活性があり、コンホメーションナルエピトープを認識する MAb 5 例を用いて親株の RC-HL 株から常法に従って 5 つの中和耐性株をそれぞれに作出した。各中和耐性株はそれぞれの作出に用いた MAb に中和されず、また IFA によっても反応しなかった。各中和耐性株の糖蛋白質は親株のそれらと比較して、それぞれ 4 から 5 ヶ所のアミノ酸が同時に変異していた。変異したアミノ酸のどれが中和抗体の誘導に関与しているのかを調べるために、それぞれの中和耐性株におけるアミノ酸の変異部位について、各固定毒株のアミノ酸と比較し、中和耐性株を作出した MAb による各株に対する中和能との関連を調べた。その結果、36、253、333、336 及び 367 番目のアミノ酸がそれぞれ各 MAb に対応するエピトープの形成に関与していると推定された。そこで各 MAb に対応するエピトープの形成に関与すると推定したアミノ酸の変異箇所を点変異を導入して、それぞれ親株の RC-HL 株のアミノ酸に戻し、各 MAb との IFA による反応性を調べたところ、その反応はいずれも復帰した。従って、36、253、333、336 及び 367 番目のアミノ酸はそれぞれ各 MAb に対応するエピトープの形成に関連することが確認された。そのうち、253 と 367 番目のアミノ酸は種々の抗体の誘導に関わる新たな抗原領域に含まれることが示唆された。

以上の結果から、狂犬病ウイルスの糖蛋白質上に新たに 1 つのリニアエピトープと 2 つのコンホメーションナルエピトープを含む抗原領域が存在すると考えられた。

これらの成績は、糖蛋白質の基礎的な研究に有益なデータを提供し、今後、狂犬病ワクチンの開発やウイルスの病原性の研究などに役立つと思われる。

以上について、審査委員全員一致で本論分が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値有るものと認めた。