

学位論文題名

日本脳炎ウイルス高感受性細胞および
低感受性細胞におけるウイルス吸着、侵入の解析

学位論文内容の要旨

目的

日本脳炎ウイルス(JEV)はヒトに重篤な脳炎を引き起こす節足動物媒介性ウイルスであるが、その組織特異性、細胞特異性のメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。一方、ウイルスの細胞への感染過程の初期段階、特にウイルス外被蛋白と細胞表面に存在するウイルス特異的レセプターの結合は、ウイルスの組織特異性を決定する因子のひとつであることが知られている。本研究においては、種々の株化培養細胞を用いて、細胞のJEV感受性とウイルス吸着、侵入量との相関の有無を検討し、さらにJEV高感受性細胞に特異的に存在するウイルスレセプター分子の検出を試みた。

方法

株化培養細胞におけるJEV感受性の検討

JEV(JaGAR-01株)を実験に使用した。8穴のチャンバースライドにモノレイヤーを形成し、100 PFU/cellでウイルスを感染させ、2日間培養の後、細胞を固定し、抗JEVウサギ血清を用いた蛍光抗体法によって染色を行った。蛍光顕微鏡による観察で、全細胞中のうち蛍光陽性細胞の占める割合を感染率として算出した。

ウイルス吸着量のアッセイ

48穴のマイクロタイタープレートにモノレイヤーを形成し、30 PFU/cellの ^{35}S メチオニン標識JEVを4°C下で吸着させ、経時的に細胞を回収して洗浄後、SDSで溶解、放射活性を測定した。

ウイルス侵入量のアッセイ

12穴のマイクロタイタープレートに形成したモノレイヤーに、30 PFU/cellの ^3H ウリジン標識JEVを4°C下90分吸着させ、その後に培養を37°Cに移してから経時的に細胞を回収し、細胞表面に結合したウイルスをトリプシン処理によって除いた後に放射活性を測定した。

JEV RNAのマイクロインジェクション

精製JEVより抽出したゲノムRNAを細胞に注入し、注入後48時間培養の後に上清を採取してプラークアッセイを行った。

細胞の蛋白分解酵素処理

蛋白分解酵素として、proteinase K、pronase、papainを使用した。細胞を酵素希釈液に懸濁して37°C1時間インキュベートし、洗浄の後に20 PFU/cellの ^{35}S メチオニン標識JEVを4°C下120分吸着させた。洗浄後、細胞に吸着した放射活性を測定した。

細胞膜画分に存在するJEV結合蛋白の検出

細胞をホモゲナイズ、分画遠心して得られた粗膜画分を、陰イオン交換クロマトグラフィーで粗精製した。カラムからの溶出画分をSDS-PAGEで分離後、PVDFメンブレンに転写し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン標識JEVと反応させ、オートラジオグラフィーを行った。

抗JEVモノクローナル抗体によるJEVの細胞への結合阻害

JEV E蛋白に反応するモノクローナル抗体のウイルス吸着に及ぼす影響が細胞によって異なるかどうかを検討するため、 $[^{35}\text{S}]$ 標識JEVをMAb 301(HI抗体)、MAb 503(中和抗体)と4°C2時間プレインキュベートし、細胞に吸着させた。なお、Fcの影響を除くため、Fabフラグメントを調整して使用した。

モノクローナル抗体によるJEVの細胞蛋白への結合阻害

抗JEV E蛋白モノクローナル抗体および抗JEV血清から精製したIgG(抗JEV IgG)を $[^{35}\text{S}]$ 標識JEVと4°C2時間プレインキュベートした。この標識ウイルス粒子-IgG混合液をSDS-PAGEの後メンブレンに転写したカラム溶出画分と反応させた。

結果

各種株化培養細胞におけるJEV感染率

14種類の株化細胞にJEVを感染させ、抗JEVウサギ血清を用いた蛍光抗体法によって求めた感染率をJEV感受性として比較した結果、感染率は0.2%から100%と細胞によってかなり異なる値をしめした。このうちJEV高感受性細胞としてVero(感染率100%)を、低感受性細胞としてNRK(感染率0.2%)を選び、種々の解析を行った。

ウイルス吸着量、侵入量のカイネティクス

Vero、NRKに $[^{35}\text{S}]$ メチオニン標識した精製ウイルスを4°C下で吸着させ、細胞に吸着した放射活性を経時的にグラフにすると、Veroのウイルス吸着量はNRKに比べて多かった。また、 $[^3\text{H}]$ ウリジン標識した精製ウイルスを4°C下でプレインキュベートし吸着させ、その後培養を37°Cに移すことによって細胞内に取り込ませ、細胞内に取り込まれた放射活性を経時的にグラフにすると、VeroはNRKよりも多くのウイルスを細胞内に取り込んでいた。

感染性RNAのマイクロインジェクション

JEVゲノムRNAをJEV低感受性細胞NRKにマイクロインジェクションによって直接導入すると、RNA注入後48時間目の培養上清中に感染性ウイルス粒子が認められた。

細胞の蛋白分解酵素処理のウイルス結合に対する影響

Vero、NRKを蛋白分解酵素で37°C1時間処理した後に $[^{35}\text{S}]$ 標識JEVを反応させると、Vero、NRKともに使用した3種の酵素によって用量依存性にウイルス吸着量が減少した。

JEV結合蛋白の検出

粗膜画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにかけ、溶出画分をSDS-PAGEで分離後メンブレンに転写し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン標識JEVを反応させると、Vero

では74 KD、NRKでは39 KDのJEV結合蛋白が検出された。

抗JEVモノクローナル抗体によるJEVの細胞への結合阻害

MAb 301によってVero、NRKどちらにおいてもウイルス吸着が阻害されたが、MAb 503およびコントロールとして用いたマウスIgGによる吸着阻害は認められなかった。

モノクローナル抗体によるウイルスの細胞性蛋白への結合阻害

Veroで検出された74 KD蛋白へのウイルス結合は、MAb 301および抗JEV IgGによって阻害されたが、MAb 503は阻害を引き起こさなかった。NRKで検出された39 KD蛋白へのウイルス結合は、抗JEV IgGによって阻害されたが、MAb 301、MAb 503による阻害は認められなかった。

考察

JEV感受性は検索した株化細胞間でかなり異なり、高感受性細胞Veroでは低感受性細胞NRKに比べてより多くのウイルス吸着、侵入が認められたが、このことは細胞へのウイルス吸着、侵入の過程がJEV感受性を決定する因子のひとつであることを示している。細胞をあらかじめ蛋白分解酵素処理すると、ウイルス吸着量が顕著に減少することから、Vero、NRKは共に蛋白質分子を介してJEVを吸着することが考えられる。本研究ではVeroの膜画分中に74 KD、NRKの膜画分中に39 KDのJEV結合蛋白が検出された。JEVの74 KD蛋白への結合は、HI活性を持つMAb 301によって阻害された。MAb 301はJEVの細胞への結合も阻害することから、74 KD蛋白はJEVに対するレセプターのひとつ、もしくはレセプターの一部であることが示唆される。また、NRKでは74 KD蛋白は検出されず、Veroで検出されなかった39 KD蛋白が認められたことから、VeroとNRKではレセプターが異なっていることが考えられ、これらの結果はJEVが細胞への吸着に2種類以上のレセプターを利用することを示唆している。

結語

日本脳炎ウイルス(JEV)の組織親和性を検討する目的で種々の株化培養細胞を用いて検索した結果、ウイルスの吸着と侵入の過程が細胞のJEV感受性に関連していることが示された。高感受性細胞であるVeroでは74 KDのJEV結合蛋白が検出され、JEVと74 KD蛋白との結合はJEVのエンベロップ蛋白に対するモノクローナル抗体で阻害された。従って新しく同定された結合蛋白はVeroにおけるJEVレセプターもしくはそのcomponentであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 生 田 和 良
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

日本脳炎ウイルス高感受性細胞および

低感受性細胞におけるウイルス吸着、侵入の解析

目的：日本脳炎ウイルス(JEV)はヒトに重篤な脳炎を引き起こす節足動物媒介性ウイルスであるが、その組織特異性、細胞特異性のメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。一方、ウイルスの細胞への感染過程の初期段階、特にウイルス外被蛋白と細胞表面に存在するウイルス特異的レセプターの結合は、ウイルスの組織特異性を決定する因子のひとつであることが知られている。そこで種々の株化培養細胞を用いて、細胞のJEV感受性とウイルス吸着、侵入量との相関の有無を検討し、さらにJEV高感受性細胞に特異的に存在するウイルスレセプター分子の検出を試みた。

実験方法：14種類の株化培養細胞に100 PFU/cellでJEV(JaGAR-01株)を感染させ、2日間培養の後、抗JEVウサギ血清を用いた蛍光抗体法によって染色を行ってウイルス感受性を比較した。高感受性細胞と低感受性細胞に30 PFU/cellの ^{35}S メチオニン標識JEVを4°C下で吸着させ、経時的に細胞を回収して洗浄後、放射活性を測定し、ウイルス吸着量の比較を行った。また、30 PFU/cellの ^3H ウリジン標識JEVを4°C下90分吸着させ、その後に培養を37°Cに移してから経時的に細胞を回収し、細胞表面に結合したウイルスをトリプシン処理によって除いた後に、放射活性を測定してウイルス侵入量の比較を行った。精製JEVより抽出したゲノムRNAを低感受性細胞に注入し、ウイルス粒子産生の有無を検討した。細胞をproteinase K、pronase、papainの3種の蛋白分解酵素と37°C1時間反応させ、洗浄の後に20 PFU/cellの ^{35}S メチオニン標識JEVを4°C下120分吸着させることにより、細胞表面のウイルス吸着物質の性質を検討した。細胞膜画分に存在するJEV結合蛋白を検出するため、細胞から粗精製した膜画分をSDS-PAGEで分離後、PVDFメンブレンに転写し、 ^{35}S メチオニン標識JEVと反応させ、オートラジオグラフィを行った。JEVエンベロップ蛋白に反応するモノクローナル抗体のウイルス吸着に及ぼす影響を検討するため、 ^{35}S 標識JEVをMAb 301(HI抗体)、MAb 503(中和抗体)と4°C2時間プレインキュベートし、細胞に吸着させた。同モノクローナル抗体によるJEVの細胞蛋白への結合阻害を検討するため、MAb301とMAb503を ^{35}S 標識JEVと4°C2時間プレインキュベートし、この標識ウイルス粒子-MAb混合液をSDS-PAGEの後メンブレンに転写した膜画分と反応させた。

結果：(1)検索した14種類の株化細胞においては、細胞によってかなり異なるJEV感受性を示した。(2)JEV高感受性細胞Vero、低感受性細胞NRKに標識

JEVを4℃下で吸着させ、細胞に吸着した放射活性を経時的にグラフにすると、Veroのウイルス吸着量はNRKに比べて多かった。また、標識JEVを37℃下で細胞内に取り込ませ、細胞内に取り込まれた放射活性を経時的にグラフにすると、VeroはNRKよりも多くのウイルスを細胞内に取り込んでいた。(3)JEVゲノムRNAをNRKにマイクロインジェクションすると、RNA注入後48時間目の培養上清中に感染性ウイルス粒子が認められた。(4)Vero、NRKを蛋白分解酵素処理すると、共に使用した3種の酵素によって用量依存性にウイルス吸着量が減少した。(5)SDS-PAGEで分離後メンブレンに転写した膜画分から、Veroでは74 KD、NRKでは39 KDのJEV結合蛋白が検出された。(6)MAb 301によってVero、NRKどちらにおいてもウイルス吸着が阻害されたが、MAb 503による吸着阻害は認められなかった。(7)Veroで検出された74 KD蛋白へのウイルス結合は、MAb 301によって阻害されたが、MAb 503は阻害を引き起こさなかった。NRKで検出された39 KD蛋白へのウイルス結合においては、MAb 301、MAb 503による阻害は認められなかった。

JEV感受性は検索した株化細胞間でかなり異なり、高感受性細胞Veroでは低感受性細胞NRKに比べてより多くのウイルス吸着、侵入が認められたが、このことは細胞へのウイルス吸着、侵入の過程がJEV感受性を決定する因子のひとつであることを示している。細胞をあらかじめ蛋白分解酵素処理すると、ウイルス吸着量が顕著に減少することから、Vero、NRKは共に蛋白質分子を介してJEVを吸着することが考えられる。本研究ではVeroの膜画分中に74 KD、NRKの膜画分中に39 KDのJEV結合蛋白が検出された。JEVの74 KD蛋白への結合は、HI活性を持つMAb 301によって阻害された。MAb 301はJEVの細胞への結合も阻害することから、74 KD蛋白はJEVに対するレセプターのひとつ、もしくはレセプターの一部であることが示唆される。

口頭発表にあたり、生田教授より精製エンベロープ蛋白とJEV結合蛋白の反応、および抗エンベロープ抗体のそれに及ぼす影響等について、また皆川教授より過去に脳組織から分離精製されているHA阻害物質とJEV結合蛋白との関連、74KD蛋白のウイルス感染防御能の有無等について質問がなされたが申請者はおおむね適切な回答をした。また、副査の生田、皆川両教授には個別の審査を受け合格と判定された。

以上、本研究はJEVの株化培養細胞への吸着、侵入過程を解析することにより、細胞のJEV感受性がウイルス吸着、侵入過程により規定されることを明らかにし、さらにウイルスレセプターの一成分と考えられる蛋白を同定したもので、JEV感染機序の解明に大きく寄与したものである。よって博士(医学)の学位授与に充分値するものと思われる。