

分担研究報告書

シンドビスウイルスレセプターの検出

主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部）

協力研究者：奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所寄生体部）

研究要旨 ウイルス感染はウイルスが細胞表面のレセプターに結合することにより始まる。感染を防御するために、ウイルスのレセプターへの結合を阻害することは有効な治療のひとつである。そのためにはレセプター分子の同定は必須であり、種々のウイルスによってその同定が行われている。我々は広範な宿主域を有するシンドビスウイルス（以下、SIN と略す）を用いて、Slot blot assay および Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) を行い、ニワトリ胎児線維芽細胞（以下、CEF と略す）上のレセプターの検出を試みた。その結果、Slot blot assay で biotin-SIN で CEF 膜タンパク $1\mu\text{g}$ まで結合が検出でき、VOPBA では 35S-SIN、biotin-SIN とともに 95kDa のバンドが検出され、さらに 35S-SIN は 175kDa の高分子量のタンパクにも結合した。また、Competition assay で 175kDa のタンパクへの結合が特異的であることが明らかになった。

A. 研究目的

SIN はアルファウイルスの一種であり、ヒトに感染すると発熱、頭痛、関節痛および発疹を引き起こす。SIN は細胞での増殖が良好であり、感染性クローンを用いた遺伝子の機能解析が詳細に行われている。また、動物モデルが確立されており、脳炎の病態解明に貢献している。ウイルス感染の最初のステップはウイルスの細胞表面のレセプターへの結合であり、この結合を阻害できればウイルス感染の予防や治療につながる。そのためには、レセプターの同定が必須であり、本研究は SIN のニワトリ胎児線維芽細胞 (CEF) 上のレセプターの検出を目的とした。

B. 材料と方法

CEF 膜タンパクは SEAT buffer に懸濁した細胞をホモジナイザーにて破碎後、遠心操作により精製し、SDS-PAGE と Plaque Reduction Assay で解析した。全 CEF 膜タンパクは NP-40 で細胞を可溶化し、遠心後上清を回収した。ウイルスは SIN の HR、wt および AR339 の 3 株を用いた。ウイルスのラベルは 35S-SIN（放射性プローブ）が protein labeling mix の培養液への添加にて、biotin-SIN（非放射性プローブ）は精製ウイルスをビオチン化することにより行った。BHK 細胞で増殖させたウイルスは 10~40% ショ糖密度勾配に重層後、遠心操作により精製した。SIN の CEF 膜タンパクへの結合感

度の検定は各濃度の CEF 膜タンパクを PVDF 膜にブロットングし、Slot blot assay にて行った。セプターの検出は VOPBA にて行った (図 1)。つまり、7.5% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、PVDF 膜に CEF 膜タンパクおよび全 CEF タンパクをブロットングし 35S-SIN および biotin-SIN を反応させた後、未結合のウイルスを洗浄により除去した。バンドは 35S-SIN はそのままオートラジオグラフィーし、biotin-SIN は二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ビオチン抗体を用いて発光法にて検出した。さらに、未標識の 8 倍量のウイルスを 4 時間 preincubate した後、35S-SIN で Competition assay を行い、結合の特異性について検討した。

C. 研究結果

1. 精製膜タンパクの解析

SDS-PAGE 後の CBB 染色より精製した CEF 膜タンパクには 50、63、95 および 200kD に主なバンドが認められた。また、精製した CEF 膜タンパクと SIN を反応させ Plaque Reduction Assay を行ったところ、2 μ g で 35.9%、20 μ g で 51.6% のプラーク形成阻害がみられ、精製した CEF 膜タンパクにレセプター分子が含まれていることが明らかになった。

2. SIN の CEF 膜タンパクへの結合感度の検定

Slot blot assay は biotin-SIN wt 50 μ g をプローブとして、CEF 膜タンパク 0.1~20 μ g をブロットした PVDF 膜に

4 $^{\circ}$ C 一昼夜反応させた後、発光反応で検出したところ、1 μ g まで結合の検出が可能であった。

3. VOPBA によるレセプター分子の検出

VOPBA は CEF 膜タンパク (0.1~20 μ g) および全 CEF タンパク 200 μ g を 7.5% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、PVDF 膜にタンパクをブロットングし 35S-SIN および biotin-SIN を反応させた後、未結合のウイルスを洗浄により除去した。電気泳動でのタンパクの処理は 2つの条件で行った。つまり、常法の sample buffer で処理した条件 (Normal condition) と sample buffer 中の SDS を 0.1% にし、メルカプトエタノールを除き、boiling を行わない条件 (Native condition) である。biotin-SIN wt 50 μ g をプローブした VOPBA では 95kDa のバンドが検出され、CEF 膜タンパク 5 μ g まで明瞭なバンドが認められた (図 2)。また、35S-SINAR339 (6.0 \times 10⁸PFU, 2.4 \times 10⁷cpm) をプローブした VOPBA では 95kDa のバンドとともに 175kDa の高分子量のタンパクにも結合した (図 3)。さらに、Normal condition と Native condition の両方でバンドが検出可能であった。

4. Competition assay による結合特異性

VOPBA で検出されたレセプター分子の結合特異性を検討するために、Competition assay を行った。35S-SIN wt に対して 8 倍量の未標識の SIN wt (2.0 \times 10⁸ PFU) を全 CEF タンパク 200 μ g を Normal condition で処理し電気泳動後、ブロットングした PVDF 膜と 4 時間

preincubate した。さらに、35S-SIN wt (2.5×10^7 PFU, 7.5×10^6 cpm) を 4 時間反応させ、未結合のウイルスを洗浄により除去した後、オートラジオグラフィーしたところ、175kDa のバンドの消失が認められた (図 4)。

D. 考察

SIN は広範な宿主域を有しており、レセプターの同定が精力的に行われている。CEF のレセプターについては以前、Wang らにより抗イディオタイプ抗体 49 をプローブとして用いて、63kDa の膜タンパクが検出されている。ところが、この抗体を用いても CEF へ吸着が阻害されない variant (v49) が見い出され、複数のレセプターの存在が示唆された。本研究において、VOPBA で 35S-SIN、biotin-SIN のプローブとともに 95kDa のバンドが検出され、さらに 35S-SIN は 175kDa の高分子量のタンパクにも結合した。また、Competition assay で 175kDa のタンパクへの結合が特異的であることが明らかになった。過去の報告によると SIN のレセプター分子として、リンパ球細胞で 90kDa、神経芽細胞腫細胞 N18 細胞で 74kDa と 110kDa および BHK 細胞では 67kDa のタンパクが同定されている。特に、BHK 細胞

表面の 67kDa のタンパクはラミニンレセプターであり、この分子はほ乳類細胞に共通レセプターであることが明らかにされた。しかし、CEF のレセプターはラミニンレセプターでなく、今後本研究で検出されたタンパクも含め詳細な解析が必要と考えられる。

E. 結論

VOPBA で 35S-SIN、biotin-SIN のプローブとともに 95kDa のバンドが検出され、さらに 35S-SIN は 175kDa の高分子量のタンパクにも結合した。また、Competition assay で 175kDa のタンパクへの結合が特異的であることが明らかになった。

F. 研究発表

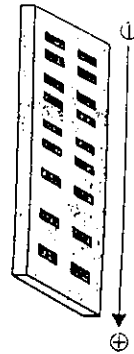
1. 学会発表

奴久妻聡一、奴久妻智代子、佐藤高遠：シンドビスウイルスレセプターの検出の試み。第 6 回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会 (1999)。

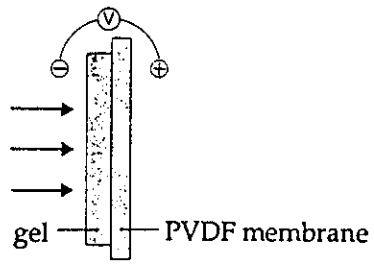
奴久妻聡一、奴久妻智代子、大石英明、林皓三郎：Virus Overlay Protein Binding Assay によるシンドビスウイルスレセプターの検出。第 47 回日本ウイルス学会学術集会総会 (1999)。

Virus overlay protein binding assay (VOPBA)

SDS-PAGE

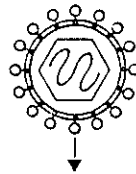


Blotting



Reaction

³⁵S-labeled SIN



Autoradiography

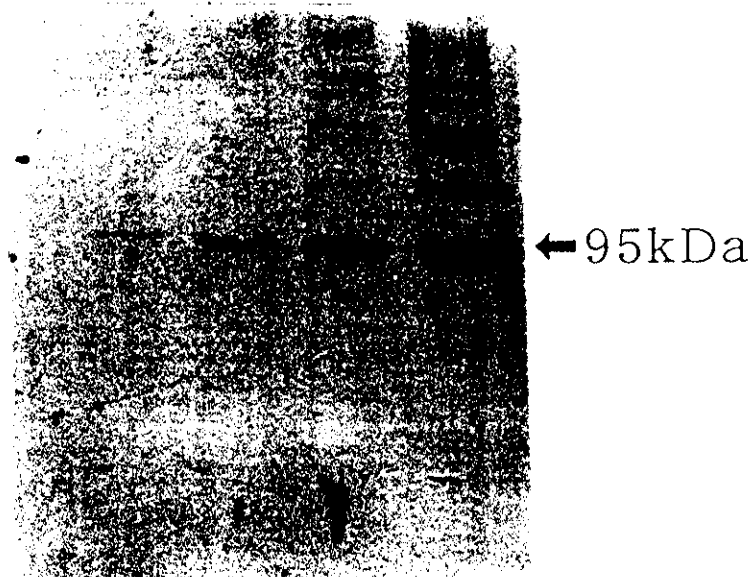


図 1 . VOPBAの模式図

VOPBA

μg CEF membrane protein

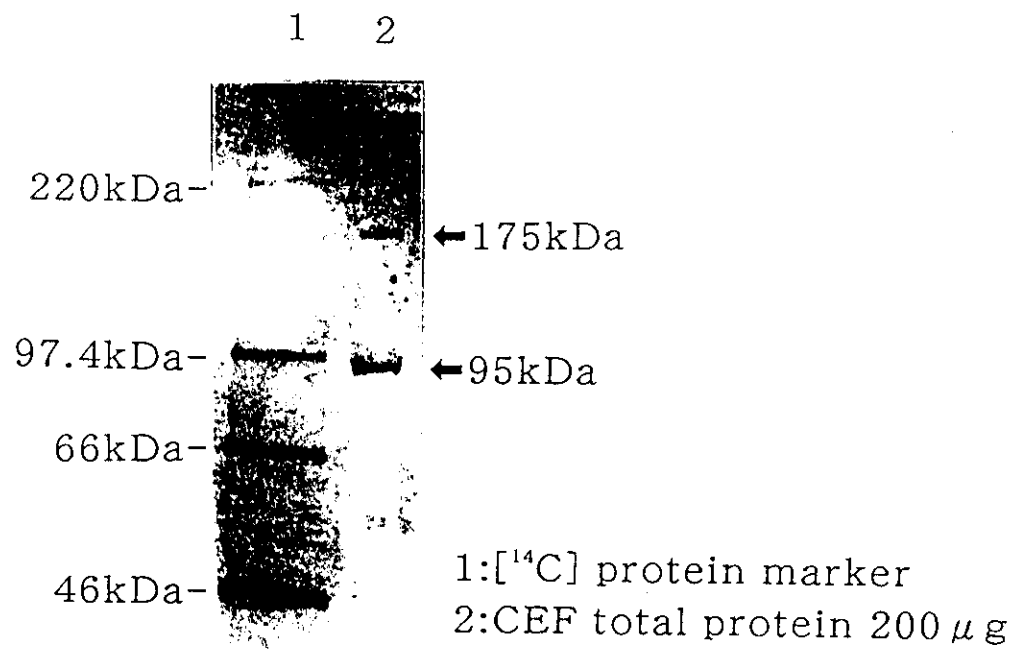
0.1 5 10 20



Native condition
biotinylated SIN wt 50 μg

図2. ビオチン化SINをプローブとして用いたVOPBA

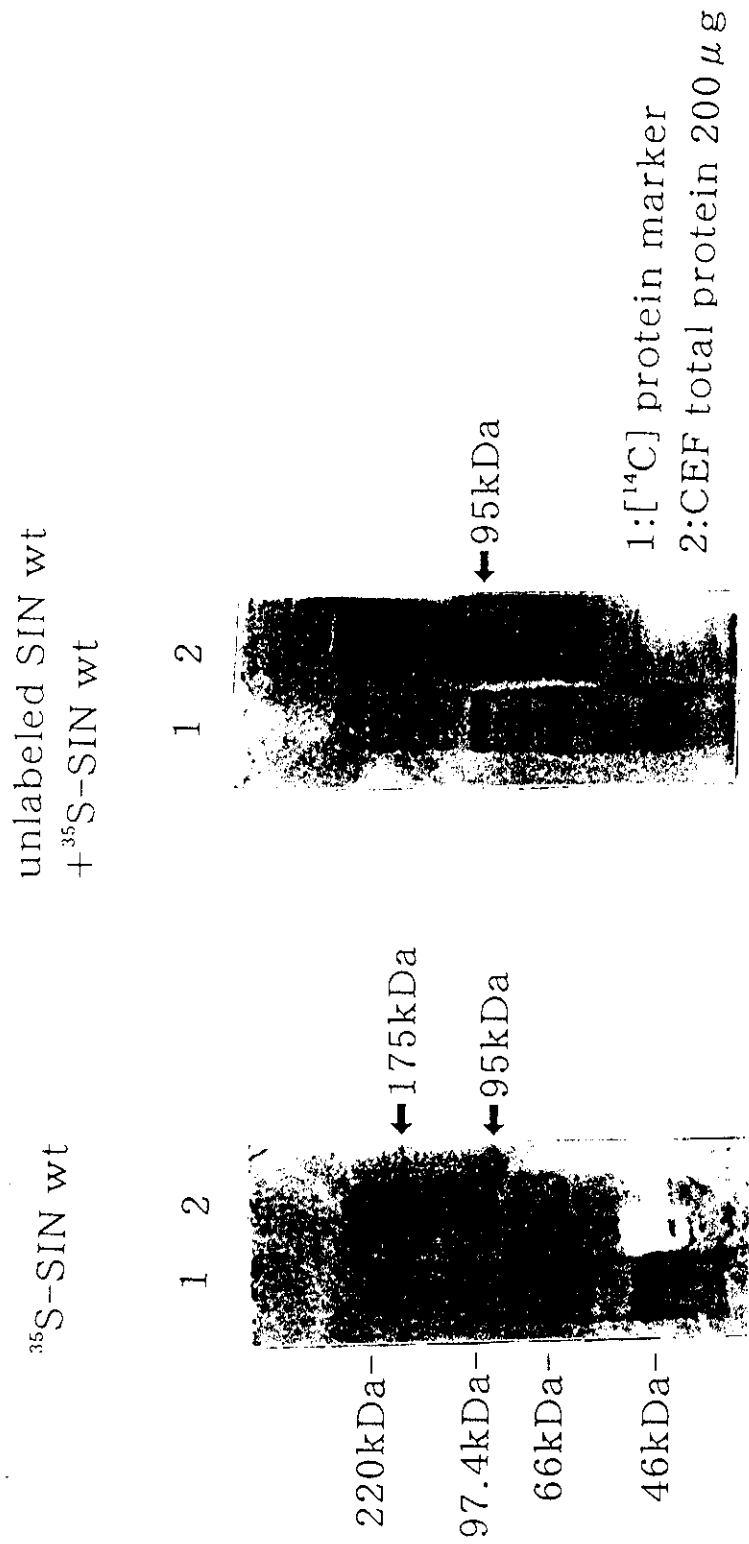
VOPBA



Normal condition
³⁵S-labeled SIN AR339
 6×10^8 PFU, 2.4×10^7 cpm

図3. ³⁵SでラベルしたSINをプローブとして用いたVOPBA

Competition assay



Normal condition

³⁵S-labeled SIN wt
2.5 × 10⁷ PFU, 7.5 × 10⁶ cpm
unlabeled SIN wt
2.0 × 10⁸ PFU

図4. Competition assayによるSIN結合の特異性