

200400055A

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業
バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成17(2005)年4月

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成 17 (2005) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	
バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発 松浦 善治	1
II. 分担研究報告書	
1. バキュロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの開発 松浦 善治・森石 恆司	5
2. 組換え E 型肝炎ウイルス中空粒子形成に必須なアミノ酸配列の同定 武田 直和	7
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
IV. 研究成果の刊行物・別冊	別添

バキュロウイルスを利用した新規遺伝子治療ベクターの開発

主任研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：本研究事業により以下の点を明らかにした。1)gp64 を完全に欠損させ、目的のリガンドだけを被った組換えウイルスの作製系を構築し、ターゲッティング可能なバキュロウイルスベクター系を開発した。2)バキュロウイルスをマウスの鼻腔内に接種すると、致死量のインフルエンザウイルスの攻撃を完全に防御できる強力な自然免疫を誘導機構を解析し、バキュロウイルスゲノムが Toll-like receptor 9 を介して自然免疫を強力に誘導することを明らかにした。3)HEV-LP の表面に外来抗原エピトープを提示でき、さらに、HEV-LP そのものを経口投与することによって中和抗体を誘導できることを明らかにした。

分担研究者

森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授
武田直和 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

遺伝子治療は細胞医療や再生医療とともに、現行療法の限界を超える画期的な治療法として期待され、欧米を中心に活発な研究開発が行われている。外来遺伝子の導入方法としてはウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターがあるが、効率的にはウイルスベクターに勝るものはない。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスやレトロウイルスなどが開発され、一部の遺伝子治療の臨床試験で使用されている。レトロウイルスは遺伝子を染色体内に導入する為、宿主遺伝子の挿入部位によっては細胞を癌化させる欠点が指摘されており、フランスでの臨床試験で白血病の発症が報告されている。アデノウイルスはほとんどのヒトが既に中和抗体を持っており、投与量が多くなる欠点が指摘されている。また、他のヒト病原ウイルスは弱毒化や無毒化が施されているとはいえ、安全性の問題が皆無とは言えない。さらに、現行のベクター技術では目的の遺伝子を目的の細胞にいかにして効率的よく導入するかという点に多くの問題点が残されている。このような問題点を克服するには新しいウイルスベクターの開発が必須である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスに注目している。

バキュロウイルスは、環状二本鎖 DNA を遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。バキュロウイルスベクターの長所としては以下のような点が考えられる。1) ウイルス遺伝子は 130kbp もあり、大きな (<

15kbp) 外来遺伝子を挿入できる、2) ウイルスの遺伝子は全く哺乳動物細胞では発現しないため、細胞傷害性がほとんどなく有害な免疫応答の誘導もない、3) 組換えウイルスを短時間で作製できる、4) ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない、5) 各種ウイルスの構造蛋白を組換えウイルスとして昆虫細胞で発現すると、中空なウイルス様粒子を大量に産生できる等の利点が考えられる。一方、欠点としては、バキュロウイルスは生体の補体系で不活化され易いことが指摘されている。

本研究はバキュロウイルスの特性を再考し、目的のリガンドを被ったターゲッティングベクターや昆虫細胞で産生させたウイルス様粒子を利用した新しいベクター系の開発を目的とする。

B. 研究方法

1)ターゲッティング可能なバキュロウイルスベクターの開発

他のウイルス蛋白質を組み込むことによって広範な細胞に高率よく遺伝子導入できるバキュロウイルスの開発と平行して、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質のみを提示させることによって、狙った細胞だけに遺伝子を導入できるターゲッティングベクターの開発を試みた。gp64 蛋白質は動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して侵入するため、このままでは遺伝子導入に特異性を持たせることは困難である。そこで、バキュロウイルスの gp64 遺伝子を欠損させ、ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示できるベクター系を構築した。

2)バキュロウイルスによる宿主応答

初代ラット培養細胞にバキュロウイルスを接種すると TNF- α , IL-1 α , IL-1 β の誘導が惹起されることが報告されており、さらに、バキュロウイルスの感染細胞のエンベロープ蛋白質画分をマウスの腹腔内に投与することによりインターフェロンの誘導が見られ、脳心筋炎ウイルスの致死感染からマウスが防御されることが報告されている。そこで、バキュロウイルスの自然免疫誘導活性を詳細に解

析した。

3) ウイルス様粒子の作製

a) 組換え HEV : VLPHEV はエンベロープを持たない直径約 30nm の小型の球形ウイルスである。ゲノムは約 7.2kb のプラス一本鎖 RNA で、5' 末端に Cap を、3' 末端にポリアデニル酸をもつ。HEV 感染カニクイザルの胆汁から RNA を抽出し、RT-PCR 法で構造蛋白領域をコードする ORF2 全領域を増幅した。ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失させたフラグメントをトランスファーベクター pVL1393 にクローニングし、組換えバキュロウイルスを作出した。プラーククローニングで純化後、昆虫細胞 Tn5 細胞を感染させた。およそ 7 日間培養し、上清に遊離してきた浮上密度 1.285g/cm³、直径約 23-24nm のウイルス様中空粒子 (Virus-like particles, VLP) を塩化セシウム平衡密度勾配遠心で精製し、純度の高い粒子を得た。

b) VLP を経口投与したカクイザルの免疫応答 : HEV の ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失させたフラグメントを pVL1393 にクローニングし、組換えバキュロウイルスを作出し、昆虫細胞 Tn5 細胞に感染させた。培養上清から、浮上密度 1.285g/cm³、直径約 23-24nm のウイルス様中空粒子が大量に得られた。7 日目の培養上清を 1000 x g で遠心して、組換えバキュロウイルスを除き、塩化セシウム平衡密度勾配遠心で純度の高い粒子を得た。カニクイザルに精製した HEV VLP を経口投与し、マウス同様血中 IgM、IgG および腸管 IgA の産生を ELISA 法で測定した。

c) HEV 構造蛋白を産生する形質転換植物の作製 : 組換えバキュロウイルスの作製に用いたアミノ末端 111 アミノ酸を欠失させた ORF2 (Δ N101)、およびアミノ末端のほかにカルボキシ末端 52 アミノ酸を欠失させた ORF2 (Δ N101 Δ C52) ををカセットベクター pIBT210 の Sma I 部位にクローン化した。さらにこのプラスミドからカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、タバコエッチウイルス 5'-UTR、目的とする遺伝子、及び 3' Soybean vegetative storage protein を含む Hind III-Eco RI fragment を binary vector pGPTV-Kan にクローン化し、Disarmed Ti plasmid をもつアグロバクテリアを形質転換した。ポテトの若葉にこのアグロバクテリアを感染させ、定法にしたがって形質転換体を抗生物質で選択し、幼植物体を得た。発現効率の高い植物体を選択し形質転換ポテトを作製した。

d) 発現蛋白の解析 : 幼植物体の葉を採取し、プロテアーゼ阻害剤を含む PBS(-)を加えてダウンスホモジナイザーで破碎して 10% ホモジネートを調製した。蛋白を SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。常法に従ってウエスタンブロット法で発現蛋白を検出した。一次抗体には HEV VLP をウサギに免疫して作製した高力価血清を用いた。また抗原 ELISA でホモジネート中の発現蛋白を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存した。実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

C. 研究結果

1) ターゲッティング可能なバキュロウイルスベクターの開発 : バキュロウイルスのエンベロープ蛋白質 gp64 の代わりに、VSVG を被ったウイルスの遺伝子導入は、抗 gp64 抗体では阻止できず、抗 VSVG 抗体で中和されたことから、設計どおりに粒子表面に発現させた VSVG を介して遺伝子が導入されていることが確認された。また、麻疹ウイルスの受容体を搭載したウイルスは麻疹ウイルスのエンベロープ蛋白質を発現する細胞に特異的に遺伝子導入が可能であった。この様にウイルスのリセプター分子や癌抗原に対する単鎖抗体を粒子表面に提示すれば、ウイルスに感染してエンベロープ蛋白質を発現している細胞や癌細胞だけに自殺遺伝子を導入することによって目的の細胞だけを生体から排除することが可能となると思われる。

2) バキュロウイルスによる宿主応答 : バキュロウイルスを 24 時間前に鼻腔内投与したマウスは、A 型および B 型インフルエンザウイルスの致死量の鼻腔内攻撃から防御されることが明らかとなった。これまで多くのウイルスエンベロープ蛋白質が自然免疫を誘導できることが報告されており、これまでのバキュロウイルスでの成績もエンベロープ蛋白質が自然免疫を誘導することを支持するものであった。しかしながら、バキュロウイルスによる自然免疫の誘導はエンベロープ蛋白質よりも、細胞内に取り込まれたウイルスゲノムが Toll-like receptor 9 (TLR9) を介してシグナルを核に伝達していることが示唆された。エンベロープ蛋白質の細胞融合活性によって細胞内に侵入したバキュロウイルスは、主に分解経路に輸送され、分解されたゲノム DNA が、細胞内に局在する TLR9 にシグナルを伝達しているものと思われる。この成績は、バキュロウイルスが遺伝子導入ベクターとしてだけでなく、接種経路によってはアジュバント活性を併せ持った新しいワクチンベクターとしての可能性を示唆するものである。

3) ウイルス様粒子の作製 : カニクイザル一頭

当たり 10mg の HEV の VLP を経口投与した。IgG 抗体は 3 週目には上昇し始めたが、抗体価はマウスに比べ低かった。80 日を経過した時点で、腸管 IgA 抗体が検出できなかったため、84 日目に追加免疫を行った。その結果、血中 IgG 抗体の急激な上昇がみられた。そこで IgG 抗体がピークに達した直後の 100 日目に 10,000MID50 の感染性 HEV でチャレンジしたところ、VLP を経口投与した 2 頭では、血中からは全くウイルス抗原が検出されずチャレンジに対して抵抗性を示した。

D. 考察

バキュロウイルスが哺乳動物細胞に遺伝子を導入できることが明らかとなり、これまでに多くのグループによって効果的な利用法が検討されてきた。本研究により、自在にバキュロウイルスの粒子表面に目的のリガンドだけを提示できる系が開発された。また、バキュロウイルスの鼻腔内接種によって、感染防御可能な自然免疫も誘導できることが明らかとなり、遺伝子治療用ベクターとしてばかりでなく、呼吸器感染症に対するワクチンベクターとしても応用も期待できる。

以前にマウスを用いた実験から、HEV VLP は経口投与によって血中 IgM 抗体、IgG 抗体のみならず、腹腔内注射では誘導できない腸管 IgA 抗体を誘導できること、したがって、腸管特異的な粘膜ワクチンとしての可能性があることを示した。本年度は同様な実験を HEV に対して感受性があるカニクイザルで行なったところ、経口投与によってネイティブな感染性 HEV のチャレンジに対して感染防御、もしくは発症を阻止できる抗体が産生されることが明らかになった。したがって、HEV VLP は「食べるワクチン」としての機能を有する分子である。今後、サルから定期的に採取した血清、糞便等を詳細に解析することによってこの VLP が誘導した抗体が感染防御に効果があるのか、あるいは発症阻止だけに効果があるのかを明らかにしたい。

HEV 構造蛋白を産生する形質転換ポテトが得られた。マウスやサルに投与した抗原量をヒトに当てはめると、組換えバキュロの系で VLP を産生する限り極めて高価なワクチンになってしまう。形質転換植物はこの問題を解決するための手段の一つである。ポテト塊茎における HEV 構造蛋白の発現量は以前に行なわれたノロウイルス構造蛋白のそれと同等である。ノロウイルスではポランテシアによる実験で、粘膜アジュバントを用いてはいるが、形質転換ポテトでノロウイルスに対する特異的抗体を誘導することに成功している。ノロウイルスの場合は形質転換ポテト塊茎で全てではないが、発現蛋白は VLP の形態をとっている。したがって、HEV の場合も VLP としてポテト塊茎内で発現している場合には「食べるワクチン」としての可能性が一層高まる。今後、発現蛋白を詳細に解析する必要がある。

E. 結論

1) gp64 を完全に欠損させ、目的のリガンドだけを絞った組換えウイルスの作製系を構築し、ターゲット可能なバキュロウイルスベクター系を開発した。2) バキュロウイルスをマウスの鼻腔内に接種すると、致死量のインフルエンザウイルスの攻撃を完全に防御できる強力な自然免疫を誘導できることを発見し、バキュロウイルスゲノムが TLR9 を介して自然免疫を強力に誘導することを明らかにした。3) HEV の VLP の表面に外来抗原エピトープを提示でき、さらに、VLP そのものを経口投与することによって中和抗体を誘導できることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.*, 79, 2847-2858 (2005).
- Kitagawa Y., Tani H., Limn C.K., Matsunaga T.M., Moriishi K., and Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.*, 79, 3639-3652(2005).
- Tamura M., Natori K., Kobayashi M., Miyamura T., Takeda N., Natori K., Kobayashi M., Miyamura T., Takeda N. Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J. Virol.*, 78, 3817-3826 (2004).
- Li T.C., Suzaki Y., Ami Y., Dhole T.N., Miyamura T., Takeda N. Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine*, 22, 370-377(2004).
- 松浦善治、バキュロウイルスベクター「哺乳動物細胞への遺伝子導入」、細胞工学会誌、82, 592-594(2004)
- Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, Li T-C, Umemura T, Yoshizawa K, Miyakawa Y, Miyamura T, Kiyosawa K: Age-specific Antibody to Hepatitis E Virus Stays Constant during the Past 20 Years in Japan. *J. Viral Hepatitis 2005*: in press.
- Nilsson J, Miyazaki N, Xing L, Wu B, Hammar L, Li T-C, Takeda N, Miyamura T, Cheng HR: Assembly Principles in Human Polyomavirus BK: Structure and Assembly of a T=1 VP1 Particle. *J. Virol.* 2005: in press.
- Maloney BJ, Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine* 2005;23: 1870-1874.
- Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived

from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther* 2004;11: 628-35.

Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H: Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004;44: 934-40.

2. 学会発表

Tani H., Limn C-K., Abe T., Matsunaga T., Kitagawa Y., Miyamoto H., Mori Y., Moriishi K., and Matsuura Y. Gene delivery by recombinant baculovirus. 10th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, August 2004, Tokyo

松浦善治、バキュロウイルスを用いた新しいワクチン開発、第8回日本ワクチン学会学術集会、2004年10月、札幌

阿部隆之、森石恆司、高久洋、田村慎一、審良静男、松浦善治：バキュロウイルスによる Toll-like receptor 非依存的な IFN 誘導機構、第52回日本ウイルス学会総会、2004年11月、横浜

北川善紀、谷 英樹、林 昌宏、松永朋子、田鍬修平、森石恆司、松浦善治：バキュロウイルスを用いたターゲッティングベクターの開発、同上

李 天成、恒光 裕、永田 典代、宮村 達男、武田 直和。3型 HEV 構造蛋白の発現と抗原性の解析。第52回日本ウイルス学会学術集会。横浜市、2004年11月

伊藤 雅、三好龍也、田中智之、山下照夫、小林 慎一、藤浦 明、李 天成、武田直和、宮村達男、榮 賢司。野生動物のE型肝炎ウイルス (HEV)および HEV 抗体保有状況。同上

影山 努、小嶋 慈之、李 天成、片山 和彦、武田 直和。蛍光プローブを用いた HEV の高

感度検出法および遺伝子型識別法の開発。同上
Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Risk factors for hepatitis E virus infection. Symposium on Hepatitis E Virus Epidemiology, Virology and Control of an Emerging Pathogen, New Delhi, India, 2005 Feb.
Miyamura T, Li T-C, Takeda N: haracterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Genotype III and IV Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. 同上

Li T-C, Takeda N, Miyamura T: Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Genotype III and IV Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. 40th Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program, Kyoto, Japan, 2005 Dec.

Xing L, Wang J, Li T-C, Takeda N, Miyamura T, Anderson D, Purcell R, Cheng H: Role of ORF2 C-terminal region in assembly of HEV virus-like particle. Seventh International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, San Francisco, 2004 May.

武田 直和。わが国における E 型肝炎。平成 16 年度獣医公衆衛生学会。新潟、2005 年 2 月

李 天成、武田直和、宮村達男。HEV 感染の現状と検査法。衛生微生物技術協議会第 25 回研究会。さいたま市、2004 年 7 月。

武田直和。わが国の E 型肝炎とリスクファクター。第 45 回日本臨床ウイルス学会。大阪市、2004 年 6 月

武田直和。食習慣の落とし穴：わが国の E 型肝炎とリスクファクター。第 23 回和歌山感染症化学療法研究会。和歌山市、2004 年 3 月

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

バキュロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの開発

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授
森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授

研究要旨：バキュロウイルスの粒子表面に目的のリガンド分子を自在に提示できるシュードタイプウイルスの作製系を構築し、広範な動物細胞に、あるいは、標的細胞だけに遺伝子導入できるベクター系を構築した。また、バキュロウイルスが自然免疫を誘導できることを明らかにした。

A. 研究目的

遺伝子治療は細胞医療や再生医療とともに、現行療法の限界を超える画期的な治療法として期待され、欧米を中心に活発な研究開発が行われている。外来遺伝子の導入方法としてはウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターがあるが、効率的にはウイルスベクターに勝るものはない。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスやレトロウイルスなどが開発され、一部の遺伝子治療の臨床試験で使用されている。レトロウイルスは遺伝子を染色体内に導入する為、宿主遺伝子の挿入部位によっては細胞を癌化させる欠点が指摘されており、フランスでの臨床試験で白血病の発症が報告されている。アデノウイルスはほとんどのヒトが既に中和抗体を持っており、投与量が多くなる欠点が指摘されている。また、他のヒト病原ウイルスは弱毒化や無毒化が施されているとはいえ、安全性の問題が皆無とは言えない。さらに、現行のベクター技術では目的の遺伝子を目的の細胞にいかにして効率的よく導入するかという点に多くの問題点が残されている。このような問題点を克服するには新しいウイルスベクターの開発が必須である。

バキュロウイルスは、環状二本鎖 DNA を遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。

本研究はバキュロウイルスの特性を再考し、バキュロウイルスによる哺乳動物細胞への遺伝子導入と宿主応答を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) ターゲッティング可能なバキュロウイルスベクターの開発：ウイルス粒子表面に任意の蛋白質のみを提示させることによって、狙った細胞だけに遺伝子を導入できるターゲッティング

ベクターの開発を試みた。2) バキュロウイルスによる宿主応答：バキュロウイルスの自然免疫誘導活性を詳細に解析した。

（倫理面への配慮）

本研究における実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」（昭和 55 年総理府公示第 6 号）の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」（文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号）の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

C. 研究結果

1) ターゲッティング可能なバキュロウイルスベクターの開発：バキュロウイルスのエンベロープ蛋白質 gp64 の代わりに、VSVG を被ったウイルスの遺伝子導入は、抗 gp64 抗体では阻止できず、抗 VSVG 抗体で中和されたことから、設計どおりに粒子表面に発現させた VSVG を介して遺伝子が導入されていることが確認された。また、麻疹ウイルスの受容体を搭載したウイルスは麻疹ウイルスのエンベロープ蛋白質を発現する細胞に特異的に遺伝子導入が可能であった。この様にウイルスのリセプター分子や癌抗原に対する単鎖抗体を粒子表面に提示すれば、ウイルスに感染してエンベロープ蛋白質を発現している細胞や癌細胞だけに自殺遺伝子を導入することによって目的の細胞だけを生体から排除することが可能となると思われる。2) バキュロウイルスによる宿主応答：バキュロウイルスを 24 時間前に鼻腔内投与したマウスは、A 型および B 型インフルエンザウイルスの致死量の鼻腔内攻撃から防御されることが明らかとなった。これまで多くのウイルスエンベロープ蛋白質が自然免疫を誘導できることが報告されており、これまでのバキュロウイルスでの成績もエンベロープ蛋白質が自然免疫を誘導することを支持するものであった。しかしながら、バキュロウイルスによる自然免疫の誘導はエンベロープ蛋白質よりも、細胞内に取り込まれたウイルスゲノムが Toll-like receptor 9 (TLR9) を介してシグナルを核に伝達していることが示唆され

た。エンベロープ蛋白質の細胞融合活性によって細胞内に侵入したバキュロウイルスは、主に分解経路に輸送され、分解されたゲノム DNA が、細胞内に局在する TLR9 にシグナルを伝達しているものと思われる。この成績は、バキュロウイルスが遺伝子導入ベクターとしてだけでなく、接種経路によってはアジュバント活性を併せ持った新しいワクチンベクターとしての可能性を示唆するものである。

D. 考察

バキュロウイルス粒子表面に目的分子を自在に搭載する方法論を確立して特許化できた。また、バキュロウイルスが免疫担当細胞に TLR9 を介して自然免疫を誘導できることが明らかとなった。バキュロウイルスの特性を活用した新しいウイルスベクターの開発は、先天性・後天性疾患の遺伝子治療用ベクターとしてばかりでなく、新規 DNA ワクチンとしての可能性も秘めており、医療・福祉への貢献度も極めて高いものと思われる。

E. 結論

1gp64 を完全に欠損させ、目的のリガンドだけを被った組換えウイルスの作製系を構築し、ターゲティング可能なバキュロウイルスベクター系を開発した。2) バキュロウイルスをマウスの鼻腔内に接種すると、致死量のインフルエンザウイルスの攻撃を完全に防御できる強力な自然免疫を誘導できることを発見し、バキュロウイルスゲノムが TLR9 を介して自然免疫を強力に誘導することを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.*, 79, 2847-2858 (2005).

Kitagawa Y., Tani H., Limn C.K., Matsunaga T.M., Moriishi K., and Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.*, 79, 3639-3652(2005).

2. 学会発表

Tani H., Limn C-K., Abe T., Matsunaga T., Kitagawa Y., Miyamoto H., Mori Y., Moriishi K., and Matsuura Y. Gene delivery by recombinant baculovirus. 10th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, August 2004, Tokyo

北川善紀、谷 英樹、林 昌宏、松永朋子、田鍛修平、森石恆司、松浦善治：バキュロウイルスを用いたターゲティングベクターの開発、第52回日本ウイルス学会学術集会・総会、横浜、2004年11月21-23日

阿部隆之、森石恆司、高久洋、田村慎一、審良静男、松浦善治：バキュロウイルスによる Toll-like receptor 非依存的な IFN 誘導機構、同上

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

組換え E 型肝炎ウイルス中空粒子形成に必須なアミノ酸配列の同定

分担研究者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨：中空粒子（VLPs）を形成するために必須の領域を同定するため、N 末端、および C 末端を様々に欠失した ORF2 を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞 Sf9 および Tn5 で産生される蛋白を解析した。Sf9 細胞で VLPs が形成させるためには、あらかじめ C 末端の 52 個のアミノ酸を欠損させたコンストラクトを発現することが必須であった。クリオ電顕と画像解析による粒子の三次構造の解析から、上記の Sf9 と Tn5 で産生された VLPs に形態学上の差はみられなかった。N 末端、および/あるいは C 末端を欠失した蛋白の発現と性状解析から、VLPs 形成には 601 より前のアミノ酸残基と 125 より後のアミノ酸残基、すなわち 125-601 のアミノ酸残基が必須であることが明らかとなった。

協力研究者 李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究官

協力研究者 Holland Cheng カロリンスカ研究所

協力研究者 Li Xing カロリンスカ研究所

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（HEV）遺伝子は、Cap 構造を 5' 末端に、ポリアデニル酸を 3' 末端に持つ 7.2kb のプラス一本鎖 RNA である。この遺伝子上にはウイルス複製に必須な非構造蛋白をコードする ORF1、660 アミノ酸の構造蛋白をコードする ORF2、および調節機能が想定されている 13.5kb 蛋白をコードする ORF3 が別々の読み取り枠で配置されている。N 末端の 111 アミノ酸を欠失させた ORF2 蛋白を組換えバキュロウイルスで発現すると、この蛋白はネイティブな HEV と同様な抗原性や免疫原性を有するウイルス様中空粒子（Virus-like particles、VLPs）として大量に発現、回収することができる。VLP のカクツイザルへ経口投与し、その後の感染性 HEV でチャレンジすると HEV 感染に対する感染防御と発症阻止が観察されることから腸管特異的な粘膜ワクチンとしての可能性が示唆されている。また、クリオ電顕と画像解析による三次構造の解析から、VLP はダイマー分子が 30 個集合することによって 1 個の粒子が形成されることも明らかになっている。粒子内部は完全中空であって、この粒子の解離と再構成によって粒子内部に DNA を取り込むことも可能になっている。E 型肝炎ウイルス粒子は腸管上皮細胞と肝細胞に高い親和性を有していると考えられることから、組換え HEV VLPs はこれらの臓器への特異的遺伝子導入に有用な DNA 搬送体としての可能性を有している。

本研究では、N 末端、および C 末端を様々に欠失した ORF2 を発現する組換えバキュロ

ウイルスを作製して昆虫細胞 Sf9 および Tn5 で産生される蛋白を解析し、中空粒子構造を形成するために必須の領域を同定することを目的とした。

B. 研究方法

1) 組換え構造蛋白の発現

N 末端の 111 アミノ酸を欠失した ORF2 蛋白を発現する組換えバキュロウイルス Ac[n111] を基本に、Ac[n111c52]、Ac[n111c58]、Ac[n111c59]、Ac[n111c60]、Ac[n111c64]、Ac[n111c72]、Ac[c52]、Ac[n123]、Ac[n124]、Ac[n125]、Ac[n126]、Ac[n130] および Ac[n125c59] の 13 種類の組換えバキュロウイルスを作製した。n および c の後ろの数字は欠失した N 末端および/あるいは C 末端のアミノ酸数である。昆虫細胞 Sf9 および/あるいは Tn5 に感染後、およそ 7 日間培養し、上清に遊離してきた VLPs をショ糖密度勾配遠心、および塩化セシウム平衡密度勾配遠心で精製濃縮した。クリオ電顕とコンピュータによる画像解析で三次構造を推定した。

2) ウェスタンブロット法

感染細胞内および細胞上清の 5% を 10% SDS-PAGE で分離し、定法通りニトロセルロース膜に転写した。E 型肝炎患者から得た急性期血清を反応後、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体で発現蛋白を検出した。

3) クリオ電子顕微鏡

精製した 3% の VLP 溶液をグリッドに滴下し、液体エタン中で瞬間氷結し、Gatan 626 cryo-transfer system を装着した Philips CM120 で観察した。各粒子をスキャナーで取り込んでデジタル化し、EMPFT プログラムで正二十面体の角度と中心を計測し、パラメータを変えて構造の安定性を計算し、最終的に 353 のイメージを用い、解像度 23 Å で解析してモデルを作成した。

4) マススペクトロメトリ

Reflex III mass spectrometer を用いて 0.5 μ l のサンプルを解析した。データは XMASS ソフトウェアで解析した。

C. 研究結果

1) Sf9 細胞での VLPs 形成

N 末端側 111 個のアミノ酸を欠失させた HEV 構造蛋白遺伝子を持つ組換えバキュロウイルス Ac[n111] を昆虫細胞 Tn5 に感染させると培養上清から VLPs を大量に回収できることが明らかになっている。N 末端部分のアミノ酸解析から、VLPs の N 末端は 112 番目であること、C 末端は 52 個のアミノ酸が欠損していることも明らかになっている。しかしながら、組換えバキュロウイルス感染細胞として繁用されている Sf9 に Ac[n111] を感染させても、粒子形成には至らない。また、培養上清にも HEV 構造蛋白は遊離してこない。そこで C 末端の 52 個のアミノ酸をあらかじめ欠損させたコンストラクトを発現するバキュロウイルス Ac[n111c52] を作製し、Sf9 細胞での発現をみたところ、構造蛋白は細胞上清に遊離し、粒子形成も確認された。

2) 組換えバキュロウイルス Ac[n111c52] 感染 Sf9、および Tn5 で産生された VLPs の構造

2 種類の昆虫細胞で発現した中空粒子を塩化セシウム平衡密度勾配遠心、およびショ糖密度勾配遠心で精製濃縮し、透過型電子顕微鏡で観察した。どちらの細胞で発現した VLPs も電子顕微鏡像でその形態に差はみられなかった。また、353 の画像を用い、23 μ m の解像度のクリオ電子顕微鏡で高次構造を詳細に解析したが、明瞭な差はみられなかった。HEV VLPs は正二十面体の 2 回対称軸上に突出したダイマーをもつ T=1 粒子の三次構造を融資、中空粒子の中心から 50 オングストロームの蛋白殻底から 135 オングストロームの最大突出部を占める蛋白殻はダイマーが 30 ユニット集合して形成されていた。また、内部は完全な中空であった。

3) VLPs 形成に必須の C 末端アミノ酸配列

VLPs 形成に必須のアミノ酸配列を同定するために C 末端のアミノ酸を欠損させた組換えバキュロウイルス Ac[n111c52]、Ac[n111c58]、Ac[n111c59]、Ac[n111c60]、Ac[n111c64]、Ac[n111c72] を Sf9 および Tn5 に感染させ、発現する蛋白を解析した。Ac[n111c52]、Ac[n111c58]、および Ac[n111c59] 感染細胞では、Sf9、Tn5 共に培養上清に 54k の蛋白が遊離し、VLPs が回収された。一方、Ac[n111c60]、Ac[n111c64]、Ac[n111c72] 感染細胞では、細胞質内には蛋白が産生されるものの、上清には全く遊離してこなかった。また、VLPs の形成もみられなかった。したがって、VLPs 形成には 601 より前のアミノ酸残基が必須であった。

4) VLPs 形成に必須の N 末端アミノ酸配列
同様に、VLPs 形成に必須のアミノ酸配列を同定するために N 末端のアミノ酸を欠損させた

組換えバキュロウイルス Ac[n111]、Ac[n123]、Ac[n124]、Ac[n125]、Ac[n126]、および Ac[n130] を Tn5 に感染させ解析した。これらのバキュロウイルス感染細胞では全て培養上清に C 末端の 52 アミノ酸が欠失を受けた 53-54k の蛋白が遊離してきた。しかしながら、VLPs の形成は Ac[n111]、Ac[n123]、Ac[n124]、および Ac[n125] で起こり、Ac[n126] および Ac[n130] ではみられなかった。

また、これらのバキュロウイルス感染 Sf9 細胞では、細胞質内には蛋白の発現はみられるものの、上清への 53-54k 蛋白の遊離は全くみられなかった。VLPs 形成には 125 より後のアミノ酸残基が必須であることが明らかとなった。

5) VLPs 形成に必須のアミノ酸配列の確認

VLPs 形成に必須のアミノ酸配列を確認する目的で、125-601 のアミノ酸残基を発現するバキュロウイルス Ac[n125c59] を作製した。Sf9 および Tn5 に感染させ産生される蛋白を解析したところ、両方の細胞の上清に 53k 蛋白が遊離し、VLPs の形成が確認できた。

D. 考察

HEV VLPs の形成には 125-601 のアミノ酸残基は必須であることが明らかになった。580-610 まで欠損させた蛋白では折り畳みが正常に進行せず、ホモオリゴマーが形成されない。蛋白の二次構造の予測から、アミノ酸 580-610 には 580-589 と 593-601 の 2 箇所のベータバレル構造が想定されている。したがって、アミノ酸 601 のロイシンの欠失によってベータバレル構造が形成されず、その結果 VLPs の形成も阻害されると考えられる。一方、N 末端を欠失させずに構造蛋白を発現すると、蛋白は全て膜分画へ移行することが明らかになっており、111 アミノ酸の欠損は、細胞質内の膜構造から蛋白が遊離する上で必須であると考えられる。また、ノロウイルスノ構造蛋白がそうであるように、112-125 のアミノ酸は粒子を形成するシェルドメインから粒子の内部へアーム状に突き出た構造であると考えられる。

組換えバキュロウイルス Ac[n111] は Tn5 細胞では粒子を形成するが、Sf9 では形成できない。しかしながら、あらかじめ C 末端を欠損しておくとも Sf9 でも粒子が形成されるようになる。このことは、蛋白翻訳後の修飾が Sf9 細胞ではうまく機能していないことを意味し、C 末端アミノ酸配列は細胞内での局在に影響を与え、細胞上清への遊離を阻害しているのかもしれない。粒子形成のメカニズムは依然として不明な点が多い。しかしながら、本実験からアミノ酸 125-601 が構造蛋白単量体同士の相互作用に主要な役割を演じていることが明らかになった。

E 型肝炎ウイルスの中空粒子は、この分子自体が E 型肝炎の優れたワクチンとしての可能性を秘めているが、ウイルス遺伝子を有しない、

ウイルス様粒子として産生されるため、内部に核酸を封入することが可能である。また、N 末端、C 末端に外来性蛋白のエピトープを挿入することも可能である。したがって、DNA ワクチン、および遺伝子治療用ベクターとしての応用が十分に期待できる分子である。

E. 結論

組換え E 型肝炎ウイルス様中空粒子の形成には、125-601 のアミノ酸残基が必須である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, Li T-C, Umemura T, Yoshizawa K, Miyakawa Y, Miyamura T, Kiyosawa K: Age-specific Antibody to Hepatitis E Virus Stays Constant during the Past 20 Years in Japan. *J. Viral Hepatitis* 2005: in press.

Nilsson J, Miyazaki N, Xing L, Wu B, Hammar L, Li T-C, Takeda N, Miyamura T, Cheng HR: Assembly Principles in Human Polyomavirus BK: Structure and Assembly of a T=1 VP1 Particle. *J. Virol.* 2005: in press.

Maloney BJ, Takeda N, Suzuki Y, Ami Y, Li T-C, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine* 2005;23: 1870-1874.

Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther* 2004;11: 628-35.

Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishihiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H: Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004;44: 934-40.

2. 学会発表

国際学会

Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Risk factors for hepatitis E virus infection. Symposium on Hepatitis E Virus Epidemiology, Virology and Control of an Emerging Pathogen, New Delhi, India, 2005 Feb.

Miyamura T, Li T-C, Takeda N: haracterization of

Self-Assembled Virus-Like Particles of Genotype III and IV Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. Symposium on Hepatitis E Virus Epidemiology, Virology and Control of an Emerging Pathogen, New Delhi, India, 2005 Feb.

Li T-C, Takeda N, Miyamura T: Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Genotype III and IV Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. 40th Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program, Kyoto, Japan, 2005 Dec.

Xing L, Wang J, Li T-C, Takeda N, Miyamura T, Anderson D, Purcell R, Cheng H: Role of ORF2 C-terminal region in assembly of HEV virus-like particle. Seventh International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, San Francisco, 2004 May.

国内学会

武田 直和。わが国における E 型肝炎。平成 16 年度獣医公衆衛生学会。新潟、2005 年 2 月

李 天成、恒光 裕、永田 典代、宮村 達男、武田 直和。3 型 HEV 構造蛋白の発現と抗原性の解析。第 52 回日本ウイルス学会学術集会。横浜市、2004 年 11 月

伊藤 雅、三好龍也、田中智之、山下照夫、小林慎一、藤浦 明、李 天成、武田直和、宮村達男、榮 賢司。野生動物の E 型肝炎ウイルス (HEV) および HEV 抗体保有状況。同上

影山 努、小嶋 慈之、李 天成、片山 和彦、武田 直和。蛍光プローブを用いた HEV の高感度検出法および遺伝子型識別法の開発。同上
李 天成、武田直和、宮村達男。HEV 感染の現状と検査法。衛生微生物技術協議会第 25 回研究会。さいたま市、2004 年 7 月

武田直和。わが国の E 型肝炎とリスクファクター、第 45 回日本臨床ウイルス学会。大阪市、2004 年 6 月

武田直和。食習慣の落とし穴：わが国の E 型肝炎とリスクファクター。第 23 回和歌山感染症化学療法研究会。和歌山市、2004 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

著書
無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y.	Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus.	J. Virol.	79	2847-2858	2005
Kitagawa Y., Tani H., Limn C.K., Matsunaga T.M., Moriishi K., and Matsuura Y.	Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses.	J. Virol.	79	3639-3652	2005
Maloney BJ, Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS.	Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E.	Vaccine	23	1870-1874	2005
Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y.	DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration.	Gene Ther.	11	628-635	2004
Li T.C., Suzaki Y., Ami Y., Dhole T.N., Miyamura T., Takeda N.	Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles.	Vaccine	22	370-377	2004

Involvement of the Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathway in the Induction of Innate Immunity by Baculovirus†

Takayuki Abe,¹ Hiroaki Hemmi,² Hironobu Miyamoto,¹ Kohji Moriishi,¹ Shinichi Tamura,³ Hiroshi Takaku,⁴ Shizuo Akira,² and Yoshiharu Matsuura^{1*}

Research Center for Emerging Infectious Diseases,¹ Department of Host Defense,² and Laboratory of Prevention of Viral Diseases,³ Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, and Department of Industrial Chemistry and High Technology Research Center, Chiba Institute of Technology, Chiba,⁴ Japan

Received 11 July 2004/Accepted 6 October 2004

We have previously shown that mice inoculated intranasally with a wild-type baculovirus (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [AcNPV]) are protected from a lethal challenge by influenza virus. However, the precise mechanism of induction of this protective immune response by the AcNPV treatment remained unclear. Here we show that AcNPV activates immune cells via the Toll-like receptor 9 (TLR9)/MyD88-dependent signaling pathway. The production of inflammatory cytokines was severely reduced in peritoneal macrophages (PECs) and splenic CD11c⁺ dendritic cells (DCs) derived from mice deficient in MyD88 or TLR9 after cultivation with AcNPV. In contrast, a significant amount of alpha interferon (IFN- α) was still detectable in the PECs and DCs of these mice after stimulation with AcNPV, suggesting that a TLR9/MyD88-independent signaling pathway might also participate in the production of IFN- α by AcNPV. Since previous work showed that TLR9 ligands include bacterial DNA and certain oligonucleotides containing unmethylated CpG dinucleotides, we also examined the effect of baculoviral DNA on the induction of innate immunity. Transfection of the murine macrophage cell line RAW264.7 with baculoviral DNA resulted in the production of the inflammatory cytokine, while the removal of envelope glycoproteins from viral particles, UV irradiation of the virus, and pretreatment with purified baculovirus envelope proteins or endosomal maturation inhibitors diminished the induction of the immune response by AcNPV. Together, these results indicate that the internalization of viral DNA via membrane fusion mediated by the viral envelope glycoprotein, as well as endosomal maturation, which releases the viral genome into TLR9-expressing cellular compartments, is necessary for the induction of the innate immune response by AcNPV.

The baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) has long been used as a biopesticide and as an efficient tool for recombinant protein production in insect cells (39, 42). Subsequently, its efficacy for the delivery of high-level expression of foreign genes under the control of mammalian promoters in infected mammalian cells was also demonstrated (12, 26, 48). Since it causes no visible cytopathic effects, even at high titers, and does not replicate in mammalian cells (49), this baculovirus is now recognized as a useful viral vector, not only for the expression of foreign proteins in insect cells, but also for gene delivery to mammalian cells (4, 9, 12, 16, 26, 28, 37, 45, 48, 49, 53, 54).

AcNPV was also shown to be capable of stimulating interferon (IFN) production in mammalian cell lines and can confer protection from lethal encephalomyocarditis virus infections in mice (18). We demonstrated that intranasal inoculation with AcNPV induces a strong innate immune response and protects mice from a lethal challenge of influenza A and B viruses (1). Furthermore, inoculation with baculovirus induces the secretion of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor

alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and IL-12, in RAW264.7, a murine macrophage cell line. However, the precise mechanism of induction of the protective immune response by a pretreatment with AcNPV remained unclear.

Members of the IL-1 receptor/Toll-like receptor (TLR) superfamily are key mediators of innate and adaptive immunity (5). Toll, the first member of this superfamily to be identified, was initially discovered as a factor involved in dorsoventral axis formation in fly embryos and was later shown to participate in host defense mechanisms (38). A family of TLRs exists in mammals and has been shown to play an important role not only in the recognition of a wide variety of infectious pathogens and their products, but also in protection of the host from infections with pathogens. So far, 11 TLR family members and their corresponding ligands have been identified, with TLR1 being the only orphan receptor among them. Different TLRs have been shown to mediate immune responses to a variety of different pathogen-derived elements. For example, TLR4, TLR5, and TLR9 are essential for the recognition of lipopolysaccharides (LPS), bacterial flagellin, and bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs, respectively (21, 24, 27, 46). TLR2 is implicated in the recognition of peptidoglycan (PGN) and lipopeptides (7, 13, 50, 57), while TLR6 can associate with TLR2 and recognize PGN and lipopeptides derived from mycoplasma (44). On the other hand, TLR3 has been shown to activate immune cells in response to virus-derived double-stranded RNA (6). Although synthetic imidazoquinoline com-

* Corresponding author. Mailing address: Research Center for Emerging Infectious Diseases, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Phone: 81-6-6879-8340. Fax: 81-6-6879-8269. E-mail: matsuura@biken.osaka-u.ac.jp.

† This study is dedicated to the memory of Ikuko Yanase.

pounds and guanosine analogs with antiviral activities have been shown to activate TLR7 and TLR8 (25, 36), it was recently demonstrated that single-stranded RNAs from RNA viruses are the natural ligands of these receptors (17, 23). The most recently identified TLR, termed TLR11, senses bacteria that cause infections of the bladder and kidney (60). In summary, TLRs recognize specific components derived from pathogens and activate a signaling cascade that causes proinflammatory cytokine production and subsequent immune responses.

TLRs share a common cytoplasmic Toll-IL-1 receptor (TIR) domain. MyD88, also a TIR domain-containing protein, associates with TLRs and acts as an adapter that recruits IL-1 receptor-associated kinase and TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) to TLRs. Macrophages isolated from MyD88-deficient mice fail to activate NF- κ B and Jun N-terminal protein kinase or to produce inflammatory cytokines in response to microbial components such as lipopeptides, LPS, and CpG-rich bacterial DNA (20, 52), indicating that MyD88 is a critical component in the signaling pathway that leads to the production of inflammatory cytokines.

Viruses are obligate intracellular parasites; accordingly, viral proteins synthesized in host cells bear modifications that reflect the identity and characteristics of the host. Therefore, viral particles do not display exclusively pathogen-associated molecular patterns. Although the mechanisms by which the innate immune response is induced by viral infection are poorly understood, there is increasing evidence suggesting that TLRs function to detect viruses and trigger inflammatory responses. For instance, respiratory syncytial virus and mouse mammary tumor virus activate innate immunity through TLR4 (22, 34, 47), which is a signaling receptor for LPS. Similarly, hemagglutinin from wild-type measles virus was reported to activate TLR2 (10), which also recognizes certain elements of gram-positive bacteria and fungi. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and human cytomegalovirus have also been shown to recognize TLR2 (15, 35), while vaccinia virus encodes proteins containing amino acid sequences similar to the Toll/IL-1 receptor domain and inhibits IL-1, IL-18-, and TLR4-mediated signal transduction (11).

It was recently shown that HSV-1 and -2, whose genomes contain abundant CpG motifs, can induce angiogenesis and a variety of diseases, including herpes stromal keratitis, that produce chronic inflammatory responses via a TLR9/MyD88-dependent signaling pathway (33, 40, 61). HSV-1 and -2 are also able to trigger alpha interferon (IFN- α) secretion from plasmacytoid dendritic cells through TLR9/MyD88-dependent signaling (33, 40). The TLR9-mediated recognition of HSV by immunocompetent cells suggests that this recognition pathway may be important for the recognition of other DNA viruses.

For this study, we characterized the innate immune response induced by AcNPV. Peritoneal macrophages and splenic CD11c⁺ dendritic cells obtained from TLR9 or MyD88 knockout mice exhibited severe reductions in proinflammatory cytokine production following stimulation with AcNPV, whereas a significant amount of IFN- α was still detectable in these cells. In addition, the frequency of CpG motifs in the AcNPV genome was similar to that of bacterial DNA and significantly higher than that of mammalian DNA. Furthermore, stimulation by AcNPV was eliminated by a treatment with inhibitors

of endosomal acidification. These results indicate that the internalization of viral AcNPV DNA via membrane fusion by envelope glycoproteins found in the endosome is required for the induction of a TLR9/MyD88-dependent innate immune response.

MATERIALS AND METHODS

Mice and cell culture. C57BL/6 mice were purchased from Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan. MyD88-deficient (MyD88^{-/-}) mice were established as previously described (2) and backcrossed more than eight times with C57BL/6 mice. TLR9^{-/-} mice were generated as previously described (24). The mice were injected intraperitoneally with 2 ml of 4% thioglycolate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), and cells were harvested 3 days later by peritoneal lavage. The mouse macrophage cell line RAW264.7 was purchased from Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1.5 mM L-glutamine, 100 U of penicillin/ml, and 100 μ g of streptomycin/ml at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

Viruses and reagents. AcNPV was propagated in *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) cells in Sf-900II insect medium supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated FCS. A mutant baculovirus, AcNPV Δ 64, which lacks the gp64 envelope protein and possesses the green fluorescent protein gene under the control of the polyhedrin promoter in the gp64 gene locus, was generated (Y. Kitagawa et al., unpublished data). AcNPV and AcNPV Δ 64 were purified as previously described (1). The inactivation of AcNPV was performed with a Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, Calif.) using short-wavelength UV radiation (UVC, 254 nm) at a distance of 5 cm for 30 min on ice (1.6×10^4 mJ/cm²). The inactivation of infectivity was verified by a plaque assay with Sf-9 cells.

AcNPV DNA was isolated from the purified virions by a treatment with 10 mg of proteinase K (Sigma-Aldrich)/ml and 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) in sterile phosphate-buffered saline (PBS) for 2 h at 55°C. The viral DNA was purified by phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction, precipitated at 12,000 \times g, and resuspended in sterile endotoxin-free Tris-buffered saline. RNAs were removed by incubation with RNase A (10 mg/ml) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) for 1 h at 37°C, and the viral DNA was extracted as described above. The resultant DNA exhibited a single band by electrophoresis, and neither protein nor chromosomal DNA of insect cells was detected.

Phosphorothioate-stabilized mouse CpG (mCpG) oligodeoxynucleotides (ODN1668) (TCC-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-CT) and human CpG (hCpG) oligodeoxynucleotides (ODN2006) (TCG-TCG-TTT-TGT-CGT-TTT-GTC-GTT) were purchased from Invitrogen (Tokyo, Japan). Guanoxine, 2'-deoxy-G, 8-bromo-G, 7-methyl-G, 7-allyl-8-oxo-G (loxoribine) was purchased from InvivoGen (San Diego, Calif.). LPS derived from *Salmonella enterica* serovar Minnesota (Re-595), PGN derived from *Staphylococcus aureus*, monodansylcadaverine (MDC), and chloroquine were purchased from Sigma-Aldrich. Bafilomycin A1 and ammonium chloride were purchased from Wako Pure Chemical Industries. An anti-p39 mouse monoclonal antibody was kindly provided by G. F. Rohrmann. The virus stocks and the other TLR ligands were free of endotoxin (<0.01 endotoxin units/ml), as determined by use of a Pyrodict endotoxin measure kit (Seikagaku Co., Tokyo, Japan).

Production of authentic and truncated forms of gp64 proteins. cDNAs encoding a deletion mutant of gp64 lacking the transmembrane region (gp64 Δ TM) as well as a wild-type version of gp64 were obtained by PCRs with AcNPV DNA as a template. The same 5' primer (5'-CATAAGCTTATGGTAAGCGCTATTGTTTATAT-3') was used to amplify the gp64 and gp64 Δ TM cDNAs, and the 3' primers were 5'-GATTCTAGAATATATTGCTATTACGGTTTCT-3' and 5'-GATTCTAGAATCGAAGTCAATTTAGCGGCCAA-3', respectively. cDNAs were subcloned into HindIII and XbaI sites in pIB/V5-His (Invitrogen). The sequences of the recombinant plasmids, pIBgp64/V5-His and pIBgp64 Δ TM/V5-His, were confirmed by DNA sequencing. These plasmids were transfected into Sf-9 cells by the use of Unifector (B-Bridge International, Inc., San Jose, Calif.). After 3 days of incubation, the recombinant gp64 proteins were purified from cell lysates or supernatants by use of a column of nickel-nitrilotriacetic acid beads (QIAGEN, Valencia, Calif.). The protein concentrations were determined by use of a Micro BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, Ill.). The recombinant proteins were analyzed by SDS-12.5% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-12.5% PAGE) under reducing conditions, stained with GelCord Blue staining reagent (Pierce), and detected by immunoblotting analysis with an antihexahistidine monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.).

Isolation of peritoneal cells and cytokine production. To evaluate cytokine production from macrophages in vitro, we seeded thioglycolate-elicited perito-

neal cells (PECs) into 96-well plates at a concentration of 2×10^5 cells/well and stimulated them with various doses of AcNPV and Ixoribine. After 24 h of incubation, the culture supernatants were collected and analyzed for cytokine production. The concentrations of IL-12 p40 and IFN- α in culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). ELISA kits for OptEIA mouse IL-12 p40 Set and mouse IFN- α were purchased from BD PharMingen (San Diego, Calif.) and PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, N.J.), respectively. Total RNAs were isolated by the use of Sepazol-RNA I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), electrophoresed, and transferred to nylon membranes. Hybridization was performed with the indicated cDNA probes as previously described (2). cDNA probes specific for IL-12 p40 were established as previously described (31). To determine the effects of infection with AcNPV on cytokine production, we seeded the mouse macrophage cell line RAW264.7 into six-well plates at a concentration of 10^6 cells/well and stimulated them with various TLR ligands, with or without endosomal inhibitors such as chloroquine, bafilomycin A1, MDC, and ammonium chloride. For cell stimulation, AcNPV (5 μ g/ml), LPS (10 ng/ml), PGN (2.5 μ g/ml), and mCpG (200 ng/ml) were used.

Preparation of splenic dendritic cells and cytokine secretion. To prepare splenocytes containing dendritic cells (DCs), we cut spleen tissues into small fragments and incubated them with RPMI 1640 containing 400 U of collagenase (Wako)/ml and 15 μ g of DNase (Sigma-Aldrich)/ml at 37°C for 20 min. For the last 5 min, 5 mM EDTA was added, and single-cell suspensions were prepared after red blood cell lysis. CD11c⁺ cells were purified by magnetic cell sorting with anti-CD11c microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions and were used as splenic DCs. Enriched cells containing >90% CD11c⁺ cells were seeded into 96-well plates at a concentration of 10^5 cells/well and stimulated with various doses of AcNPV or Ixoribine. Culture supernatants were collected, and the production of IL-12 p40 and IFN- α was determined by ELISAs.

Indirect immunofluorescence assay and flow cytometric analysis. 293T cells transfected with a plasmid encoding human TLR9 were dislodged with PBS containing 5 mM EDTA 48 h after transfection. The cells were incubated with PBS containing 2% FCS and an anti-Flag (M2) monoclonal antibody (1:1,000) (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at 4°C, washed twice with PBS containing 2% FCS, and further incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (Sigma-Aldrich) in PBS containing 2% FCS for 1 h at 4°C. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, and the surface expression of human TLR9 was observed by fluorescence microscopy (UFX-II microscope; Nikon, Tokyo, Japan). Intracellular staining was examined after permeabilization with 0.5% Triton X-100. Stained cells were also analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur instrument (Becton Dickinson, San Jose, Calif.), and the data were analyzed with CellQuest software (Becton Dickinson).

NF- κ B-luciferase reporter gene assays with 293T cells. 293T cells were transfected with an NF- κ B-dependent luciferase reporter plasmid (pELAM-Luc) together with human TLR9 expression vectors by the use of Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Grand Island, N.Y.). pELAM-Luc (kindly provided by D. T. Golenbock) contains a human E-selectin promoter introduced into the pGL3 reporter plasmid (Promega, Inc., Madison, Wis.). The human TLR9 expression vector (kindly provided by T. H. Chuang) consists of a preprotrypsin signal peptide and a Flag epitope tag followed by an in-frame human TLR9 cDNA sequence (14). At 24 h posttransfection, the cells were stimulated with hCpG DNA (10 μ g/ml) or AcNPV DNA (10 μ g/ml) for 24 h. The luciferase activity was determined as previously described (49) and calculated as the degree of induction compared with an untreated control.

Detection of AcNPV capsid protein in murine macrophage cells by Western blot analysis. RAW264.7 murine macrophage cells (10^6 cells/well) infected with AcNPV at a dose of 40 μ g/ml were washed extensively after 1 h of adsorption and harvested after 4 or 6 h of incubation. The cells were lysed in buffer containing 1% Triton X-100, 135 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% glycerol, and protease inhibitor cocktail tablets (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). The lysed sample was separated by SDS-12.5% PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Tokyo, Japan). An anti-p39 mouse monoclonal antibody was used to detect the AcNPV capsid protein, which was visualized with the SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce).

RESULTS

Immune system activation by AcNPV is not mediated by viral envelope glycoprotein. It was previously reported that an IFN-stimulating preparation purified from Sf-9 cells infected with AcNPV exhibited IFN production both in vitro and in vivo

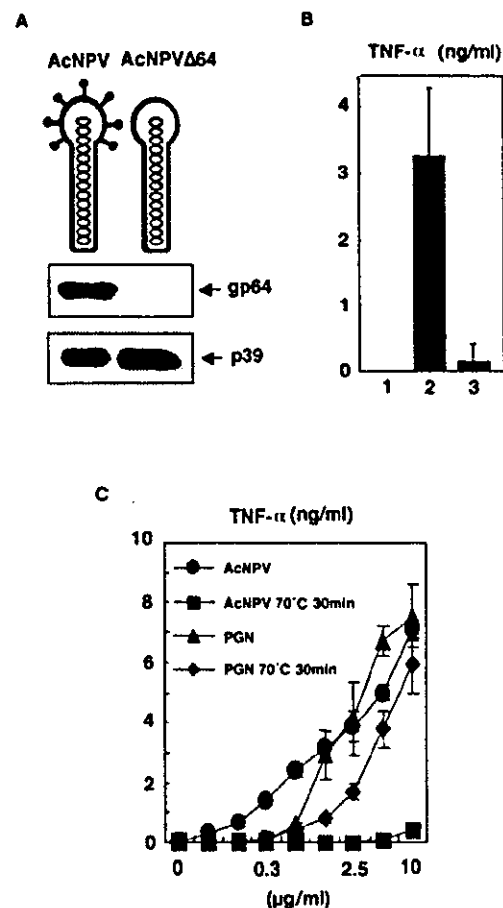


FIG. 1. Immune system activation of macrophages by heat-denatured or gp64-deficient AcNPV. (A) Purified particles of the mutant virus, AcNPV Δ 64, lack gp64, as assayed by immunoblotting. (B) The production of TNF- α in RAW264.7 cells (10^6 cells/well) inoculated with AcNPV (5 μ g/ml) (bar 2) or AcNPV Δ 64 (5 μ g/ml) (bar 3) was determined 24 h after inoculation by a sandwich ELISA. 1 is an uninfected control. Data are shown as means \pm SD. (C) AcNPV and PGN were incubated at 70°C for 30 min. Treated and untreated samples were inoculated into RAW264.7 cells (10^6 cells/well) and incubated for 24 h. The production of TNF- α was determined by a sandwich ELISA. Data are shown as means \pm SD.

and that induction was inhibited by monoclonal antibodies against the AcNPV envelope glycoprotein gp64 (18). To verify these observations, we constructed a mutant baculovirus lacking gp64, which we called AcNPV Δ 64, and examined its ability to stimulate an immune response in RAW264.7 cells, which are highly sensitive to TLR stimulation and respond by producing inflammatory cytokines at a level comparable to that observed in primary macrophages (1). The absence of gp64 in purified particles of AcNPV Δ 64 was confirmed by immunoblotting (Fig. 1A). The mutant virus lost the ability to induce TNF- α production in inoculated RAW264.7 cells (Fig. 1B), a result that is consistent with the previous observation that gp64 appears to play an important role in the induction of the immune response by AcNPV (18). Because some microbial products are known to induce cytokine production in macrophages, it was important to eliminate the possibility that contamination with microbial products contributed to the immune system

activation by AcNPV. Although the stimulation of macrophages by AcNPV was completely eliminated by incubation at 70°C for 30 min (Fig. 1C), stimulation by the bacterial components PGN and LPS was resistant to heat treatment (Fig. 1C and data not shown). These data indicate that the activation of macrophages by AcNPV is mediated by heat-labile viral components rather than by LPS and PGN.

To further verify the involvement of gp64 in immune system stimulation by baculovirus, we prepared expression plasmids encoding both wild-type gp64 and a C-terminally truncated gp64 protein (gp64 Δ TM) with a C-terminal His₆ tag to allow for purification. Upon transfection of Sf9 cells, both recombinant proteins were detected, while gp64 Δ TM was efficiently secreted into the culture supernatant (Fig. 2A). The protein from cells expressing gp64 Δ TM was purified by column chromatography, producing a single band corresponding to gp64 Δ TM and comparable to viral gp64 (Fig. 2B). We also tried to obtain the wild-type gp64 protein from the cell lysates but could not purify it to a homogeneous band (data not shown).

The activities of AcNPV, gp64 Δ TM, and PGN on RAW264.7 cells were then examined. A dose-dependent induction of TNF- α and IL-6 was observed for RAW264.7 cells treated with AcNPV and PGN, whereas cytokine production was not observed for cells treated with gp64 Δ TM (Fig. 2C). In addition, gp64 Δ TM was not able to induce IFN- α production in RAW264.7 cells (Fig. 2D). Furthermore, the pretreatment of macrophage cells with gp64 Δ TM inhibited immune system activation by AcNPV but had no effect on the activation by PGN (Fig. 2E), suggesting that the gp64 Δ TM protein still retained some of the biological functions of the wild-type gp64 protein, at least in terms of its interaction with host cells. These results indicated that gp64 is an essential element of AcNPV-induced immune system activation in RAW264.7 cells but that it does not directly participate in the reaction. Viral components other than gp64 may be more directly involved in this process.

AcNPV induces inflammatory cytokine production through a MyD88/TLR9-dependent pathway. Immune cells from MyD88- or TLR-deficient mice are unresponsive to TLR ligands, as assayed by their levels of cytokine production (5). Therefore, we used PECs and splenic CD11c⁺ DCs obtained from MyD88- and TLR-deficient mice to determine whether or not the TLR signaling pathway is responsible for the activation by AcNPV. Thioglycolate-elicited PECs were isolated from wild-type, MyD88^{-/-}, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR9^{-/-} mice and examined by ELISA and Northern blot analysis for the induction of IL-12 following exposure to AcNPV. Wild-type macrophages inoculated with AcNPV produced large amounts of IL-12 in a dose-dependent manner, whereas MyD88- or TLR9-deficient macrophages had severely reduced IL-12 production (Fig. 3A). PECs from TLR2^{-/-} and TLR4^{-/-} mice produced IL-12 at wild-type levels in response to AcNPV (Fig. 3A).

Loxoribine is a potent inducer of cytokine production in macrophages and functions through a TLR7-dependent pathway (36). PECs from wild-type, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR9^{-/-} mice all produced IL-12 in response to loxoribine, whereas no IL-12 production was observed in PECs from MyD88^{-/-} mice (Fig. 3A). The transcription of IL-12 p40

mRNA was also impaired in MyD88- and TLR9-deficient macrophages stimulated with AcNPV (Fig. 3B). We further examined the response of splenic CD11c⁺ DCs to AcNPV and loxoribine. Wild-type and TLR4^{-/-} splenic CD11c⁺ DCs produced IL-12 in response to AcNPV in a dose-dependent manner, whereas the production of IL-12 was severely impaired in MyD88^{-/-} and TLR9^{-/-} mice (Fig. 3C). In response to loxoribine, splenic CD11c⁺ DCs from TLR4^{-/-} and TLR9^{-/-} mice exhibited higher IL-12 production levels than wild-type cells, whereas the production of IL-12 was completely inhibited in MyD88^{-/-} mice (Fig. 3C). These results indicate that AcNPV induces the production of inflammatory cytokines in immunocompetent cells through a MyD88/TLR9-dependent pathway.

AcNPV produces IFN- α through a MyD88/TLR9-independent pathway. IFNs are important mediators of the early host defense against various viral infections. Since AcNPV has also been shown to be a potent inducer of IFN- α (Fig. 2D) (18), we investigated whether IFN- α production induced by AcNPV is dependent on the MyD88 and TLR9 signaling pathways. Although IFN- α induction by the TLR9 ligand, CpG oligonucleotides, was completely abolished in PECs and splenic CD11c⁺ DCs derived from MyD88^{-/-} or TLR9^{-/-} mice (data not shown), IFN- α production in response to AcNPV was less impaired (Fig. 4A). This contrasted sharply with the complete loss of IL-12 production observed for these cells (Fig. 3). Macrophages from MyD88^{-/-} and TLR9^{-/-} mice exhibited a slight reduction in IFN- α and IFN- β mRNA transcription in response to AcNPV (Fig. 4B). These results indicate that AcNPV induces the production of inflammatory cytokines in immunocompetent cells through a MyD88/TLR9-dependent pathway, while other MyD88/TLR9-independent pathways are also involved in the production of IFNs.

AcNPV DNA stimulates immune system activation in macrophage cell lines. CpG motifs present in the genomes of many bacteria are unmethylated, whereas eukaryotic genomes are much more likely to undergo methylation. Previous work demonstrated that bacterial DNAs and certain oligonucleotides containing unmethylated CpG dinucleotides can stimulate PECs and DCs (19, 32). In addition, TLR9 is essential for the immune response to CpG-rich DNA, since TLR9-deficient mice are refractory to such stimulation (24). The frequency of bioactive CpG motifs in the AcNPV genome was similar to that observed for *Escherichia coli* and HSV DNAs (61) and significantly higher than that in murine and entomopoxvirus DNAs (Table 1).

To determine the methylation status of the AcNPV genome, we digested DNAs isolated from AcNPV, Sf-9 cells, *E. coli*, and 293T cells with the restriction enzyme HpaII, which cannot cleave when the cytosine adjacent to the cleavage site (CC↓GG) is methylated. While DNA isolated from 293T cells was refractory to HpaII digestion, DNAs from AcNPV, Sf-9 cells, and *E. coli* were sensitive to HpaII digestion, indicating that most of the CpG dinucleotides in AcNPV were unmethylated (Fig. 5A).

To determine the ability of AcNPV DNA to stimulate an immune response *in vitro*, we purified the viral DNA from virions. RAW264.7 cells were then treated with purified viral DNA or PGN with or without liposomes (Fig. 5B). The transfection of viral DNA with liposomes resulted in the production

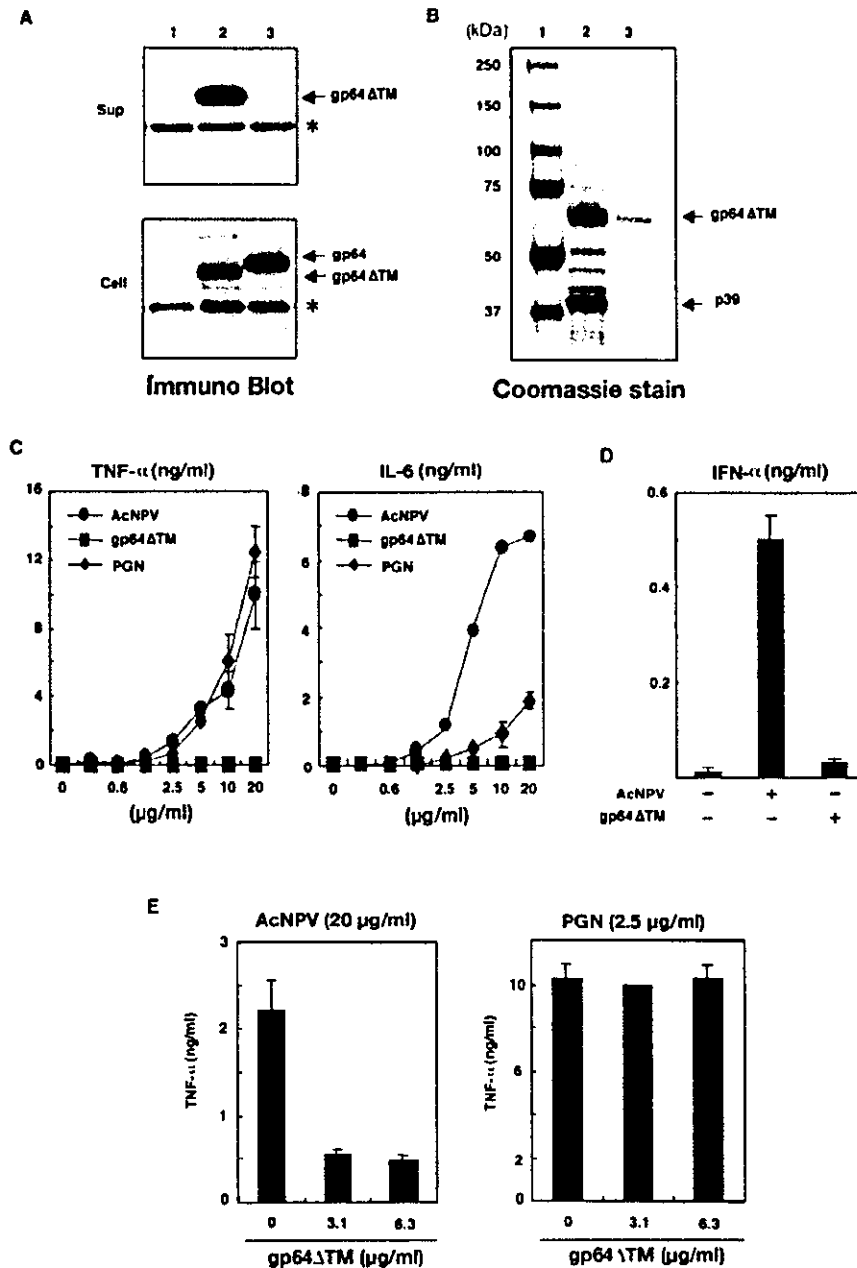


FIG. 2. Immune system activation by AcNPV in macrophages is not mediated by gp64. (A) Wild-type gp64 and a deletion mutant lacking the transmembrane region of the gp64 envelope protein (gp64ΔTM) were expressed in Sf-9 cells. Whole-cell lysates and culture supernatants were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and visualized by immunoblotting with an anti-hexahistidine monoclonal antibody. Lane 1, cells transfected with pIB/V5-His; lanes 2 and 3, cells transfected with pIBgp64ΔTM/V5-His and pIBgp64/V5-His, respectively. The heavy chains of the antibody are indicated by asterisks. (B) Purified AcNPV virions (lane 2) and gp64ΔTM (lane 3) were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Lane 1, molecular mass markers. (C) Activation of mouse macrophage RAW264.7 cells (10⁶ cells/well) treated with the indicated amounts of AcNPV or gp64ΔTM. The production of TNF-α and IL-6 in culture supernatants after 24 h of incubation was determined by sandwich ELISAs. PGN was used as a positive control. Data are shown as means ± SD. (D) Production of IFN-α in RAW264.7 cells (10⁶ cells/well) inoculated with AcNPV (5 μg/ml) or gp64ΔTM (5 μg/ml), as determined by a sandwich ELISA after 24 h of incubation. Data are shown as means ± SD. (E) Production of TNF-α in RAW264.7 cells (10⁶ cells/well) inoculated with AcNPV (20 μg/ml) or PGN (2.5 μg/ml), with or without a pretreatment with the indicated amounts of gp64ΔTM for 2 h at 37°C. After 24 h of incubation, the production of TNF-α in culture supernatants was determined by a sandwich ELISA. Data are shown as means ± SD.

of TNF-α, but this effect was not observed in the absence of liposomes. The enhancement of TNF-α production by liposomes was not observed in cells treated with PGN, and the addition of liposomes alone did not elicit TNF-α production

(Fig. 5C). These results indicate that the internalization of viral DNA is necessary for the activation of the AcNPV-mediated TLR9 signaling pathway. Thus, the impaired immune system activation by AcNPVΔ64 in macrophages may result from a

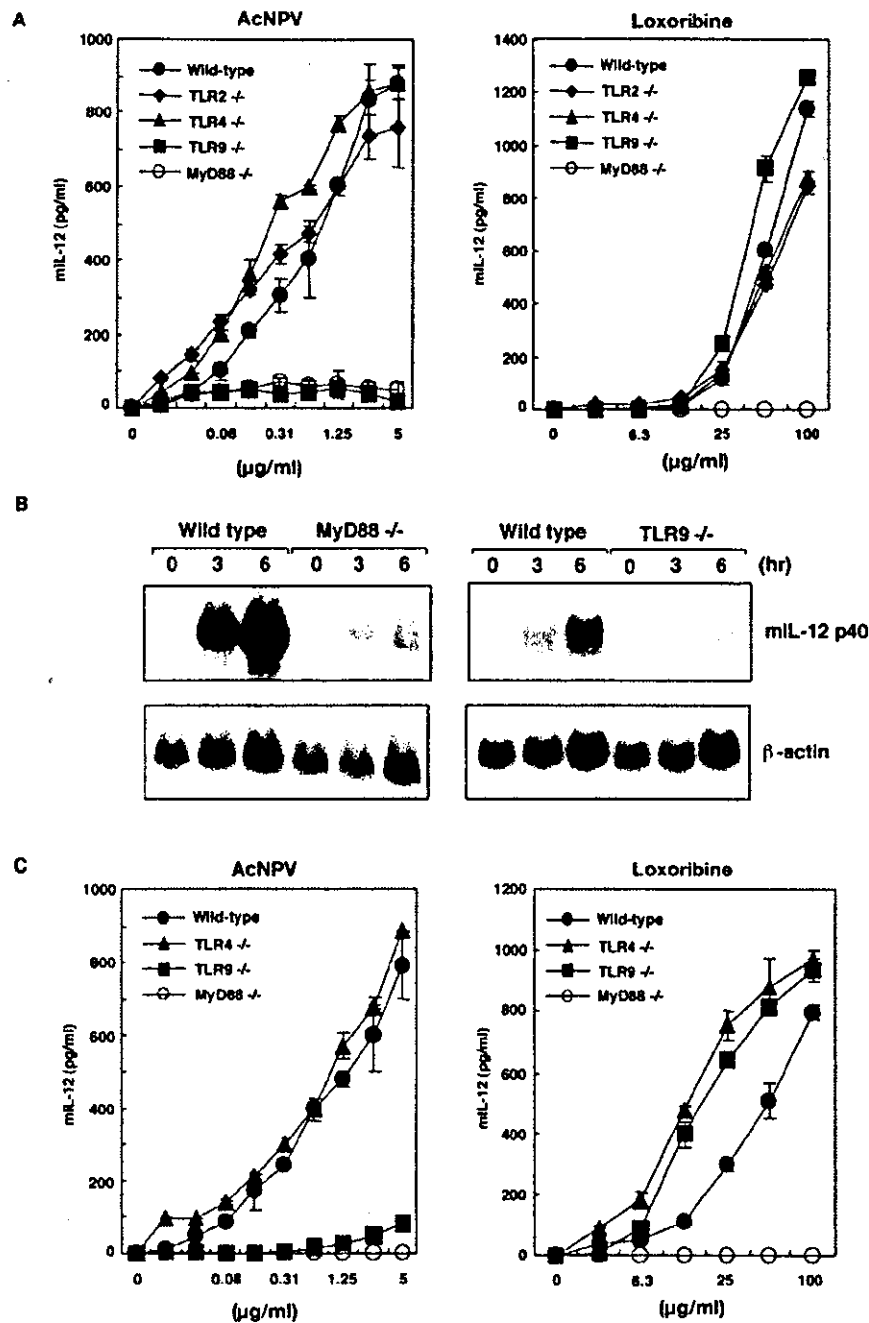


FIG. 3. AcNPV activates PECs and DCs in a MyD88/TLR9-dependent manner. (A) PECs (2×10^5 cells/well) from wild-type (C57BL/6) or MyD88-, TLR2-, TLR4-, or TLR9-deficient mice were stimulated with the indicated amounts of AcNPV or loxoribine. The production of IL-12 p40 in culture supernatants was measured by a sandwich ELISA. Data are shown as means \pm SD. (B) Northern blot analysis of murine macrophage cells stimulated with AcNPV. PECs (6×10^6 cells/well) from wild-type or MyD88- or TLR9-deficient mice were stimulated with AcNPV (10 μ g/ml) for the indicated times. Total RNAs were extracted and subjected to Northern blot analysis. (C) Splenic CD11c⁺ DCs were prepared from wild-type or MyD88-, TLR4-, or TLR9-deficient mice and enriched by magnetic cell sorting. Splenic DCs (10^5 cells/well) were stimulated with the indicated amounts of AcNPV or loxoribine for 24 h. The production of IL-12 p40 in supernatants was measured by a sandwich ELISA. Data are shown as means \pm SD.

failure to internalize viral DNA via gp64-mediated membrane fusion.

To further confirm that viral DNA activates the signaling pathway following internalization via gp64, we inactivated

AcNPV by UV irradiation and examined the production of TNF- α in RAW264.7 cells. UV irradiation diminished the AcNPV-mediated induction of TNF- α , but the addition of liposomes restored the activation (Fig. 5C). These results

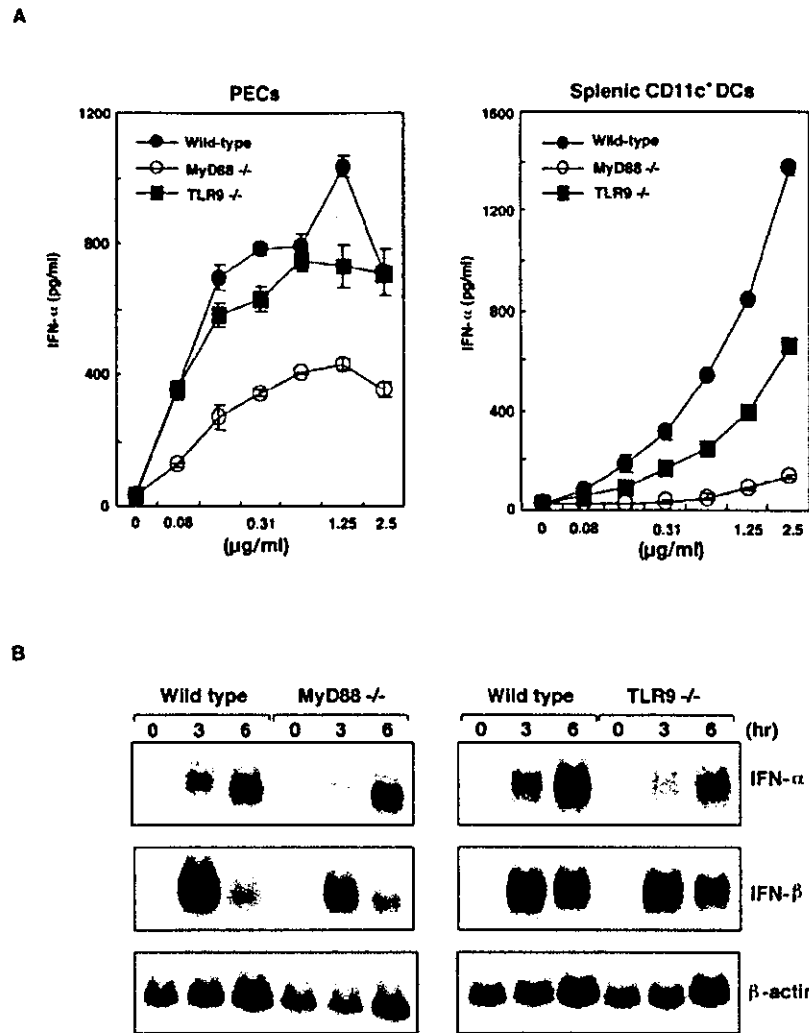


FIG. 4. IFN production by AcNPV is mediated by a MyD88/TLR9-independent process. (A) PECs (2×10^5 cells/well) and splenic CD11c⁺ DCs (1×10^5 cells/well) were prepared from wild-type or MyD88- or TLR9-deficient mice and stimulated with the indicated amounts of AcNPV or loxoribine for 24 h. The production of IFN-α in culture supernatants was measured by a sandwich ELISA. Data are shown as means \pm SD. (B) Northern blot analysis of murine macrophage cells stimulated with AcNPV. PECs (6×10^6 cells/well) from wild-type or MyD88- or TLR9-deficient mice were stimulated with AcNPV (10 μg/ml) for the indicated times. Total RNAs were then extracted and subjected to Northern blot analysis.

suggest that the denaturation of gp64 by UV irradiation impaired the fusion capability of the envelope protein, thus inhibiting the internalization of viral DNA into the cell via membrane fusion.

AcNPV DNA induces NF-κB activation through human TLR9. Signaling via TLRs occurs through the sequential recruitment of the adapter molecule MyD88 and the serine-threonine kinase IL-1 receptor-associated kinase, which leads to the activation of mitogen-activated protein kinases and the nuclear factor NF-κB (51). To assess whether or not the expression of human TLR9 confers cellular responsiveness to AcNPV DNA, we transfected 293T cells with a human TLR9 expression plasmid and a pELAM luciferase reporter plasmid together with AcNPV or hCpG, which was used as a positive control (Fig. 6A). Although NF-κB activation was not observed for cells transfected with undigested AcNPV DNA,

TABLE 1. CpG motif frequencies in AcNPV and other genomes^a

Motif	Frequency of appearance				
	<i>E. coli</i>	Mouse	HSV-1	AcNPV	AmEPV
CACGTT	1.30	0.11	0.76	0.90	0.17
AGCGTT	1.70	0.17	0.42	1.12	0.15
AACGTC	0.60	0.11	0.73	0.98	0.17
AGCGTC	1.30	0.15	0.85	0.85	0.15
GGCGTC	1.40	0.15	4.0	1.10	0.02
GGCGTT	2.50	0.15	1.51	1.37	0.10
Average	1.53	0.14	1.38	1.05	0.13

^a The frequency at which each CpG hexamer appeared in the *E. coli*, mouse, HSV-1, AcNPV, and *Amsacta moorei* entomopoxvirus genomes was determined by using published sequence data. The GenBank accession numbers for the complete genomes of AcNPV and AmEPV are NC 001623 and NC 002520, respectively. The complete genomes of *E. coli* K-12 and HSV-1 and mouse chromosome sequences were described previously (61).