

ヒトおよびマウスと比較したフェレット ACE2 の SARS-CoV レセプターとしての機能

分担研究者 山田靖子（国立感染症研究所）

協力研究者 座本 綾（国立感染症研究所）

研究要旨 SARS-CoV を実験的に動物に接種した場合、マウス等では臨床症状を示さないが、フェレットは致死的であると報告されている。16 年度はフェレットのウイルスレセプターと考えられるアンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）の塩基配列を解析し、その塩基配列のホモロジーがヒトに近いこと、また、発現細胞を用いて SARS-CoV のレセプターとして機能することを明らかにした。本年度は、フェレット ACE2 のレセプターとしての機能をマウス、およびヒトのそれと比較するため、ACE2 発現細胞クローンを作成し、SARS-CoV の感受性を比較検討した。その結果、フェレット ACE2 がマウスより高く、また、ヒトと同等の感受性を有していることが示唆された。

A. 研究目的

SARS 関連コロナウイルス（SARS-CoV）は SARS（重症急性呼吸器症候群）患者から分離された病因ウイルスである。野外では広東省のハクピシン、イタチアナグマ、タヌキから SARS-CoV ゲノムまたはこれに対する抗体が検出されている。一方実験的には、Osterhaus らが、フェレットやネコに SARS-CoV を経気道接種した場合、2 日目から 8 日目に咽頭からウイルスが分離され、特にフェレットでは致死的であることを報告した。SARS-CoV に対する感受性が高いフェレットは、ワクチン開発、病態解析、治療法の研究に感染モデルとして使用されている。一方、アンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）はレニンアンギオテンシン系カスケードに含まれる ACE のホモログであり、心機能や高血圧との関連が認められているが、SARS-CoV のレセプターが ACE2 であることが明らかとなり、SARS-CoV が細胞へ侵入する過程で重要な役割を果たすことが確認された。マウスでは SARS-CoV の感染は成立するが発症することはない、これはマウス ACE2 の SARS-CoV 結合部位がウイルスに低親和

性であることに起因すると考えられている。平成 16 年度、我々はフェレットの ACE2 を同定し、そのアミノ酸配列がヒトとホモロジーが高いこと、また、SARS-CoV レセプターとして機能することを明らかにした。本年度はレセプターとしての機能をさらに解析するため、フェレット ACE2 発現細胞をクローン化し、SARS-CoV の増殖を、ヒトおよびマウスと比較した。

B. 材料と方法

1. フェレット ACE2 発現クローンの作成

HeLa229 細胞にフェレットの ACE2 全長を含む哺乳類細胞発現ベクター（pDisplay, invitrogen）を導入し、Geneticin にて恒常的に発現させた細胞からクローニングを行った。次に、得られたクローンについて発現部位とそのサイズを、Goat anti-humanACE2（R&D systems）を用いた IFA およびウエスタンブロットで確認した。

2. ウイルス接種

発現状態が良好であったフェレット ACE2 発現細胞 3 クローンおよびマウス、ヒト ACE2 発

現細胞各 1 クローンを用いて感染実験を行った。SARS-CoV Frankfrut-1 株を、細胞 1.2×10^4 に MOI 0.1/cell で接種した。1 および 2 日後の培養上清中のウイルス力価を、VeroE6 を用いたプラークアッセイにて測定した。

C. 研究結果

1. フェレット ACE2 発現細胞クローン

フェレット ACE2 恒常的発現細胞のクローンを、Goat anti-humanACE2 を用いた IFA およびウエスタンブロットにて発現状態を確認した。クローン#1、#17、#23 で発現が良好であり、感染実験に用いた (図 1, 2)。

2. SARS-CoV の増殖

ウイルス接種後 1 日目 (図 3 左) の培養上清 50 μ l 中のウイルス力価はフェレット ACE2 発現細胞 (1, 2 および 3 レーン) で、 4.9×10^5 pfu, 1.8×10^5 pfu, 3.9×10^5 pfu であり、マウスのウイルス力価 (3.8×10^4 pfu, 6 レーン) より 10 倍以上高く、ヒト (3.1×10^6 pfu, 5 レーン) とは同等あるいはそれより高い価を示した。接種後 2 日目 (図 3 右) でも 1 日目と同様の傾向が認められ、フェレット ACE2 発現クローン#1 (2.6×10^6 pfu) で最も高いウイルス力価を示した。

D. 考察

本研究でフェレットの ACE2 発現細胞を用いたウイルス増殖はヒトと同様に高かったことから、フェレット ACE2 と SARS-CoV の親和性が高い事が示唆される。動物実験において致死性である理由として、心臓、腎臓など殆どの臓器で ACE2 の発現が認められること (16 年度に報告) に加え、フェレットのウイルスレセプターにウイルスが効率よく吸着することが、考えられる。

E. 結論

フェレット ACE2 はレセプターとしての親和

性が高く、SARS-CoV 感染に関して、ヒトと同様の機能を持つことが強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

Aya Zamoto, Fumihiko Taguchi, Shuetsu Fukushi, Shigeru Morikawa and Yasuko K Yamada.
Identification of ferret ACE2 and its receptor function for SARS-coronavirus. Xth International Nidovirus Symposium. Colorado. 2005 年 6 月

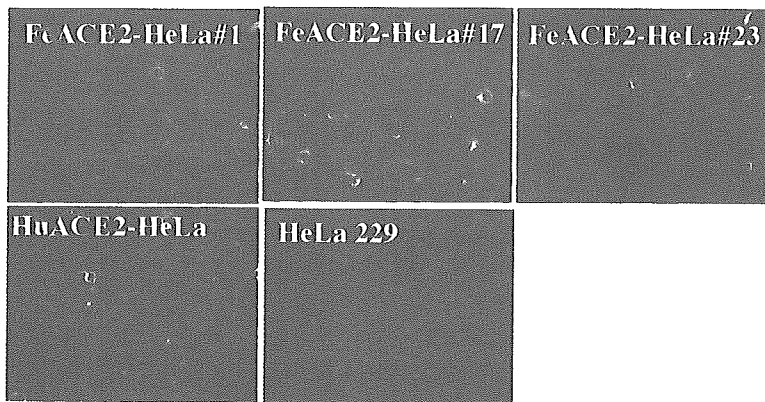


図1. フェレットACE2発現細胞を用いたIFAの結果

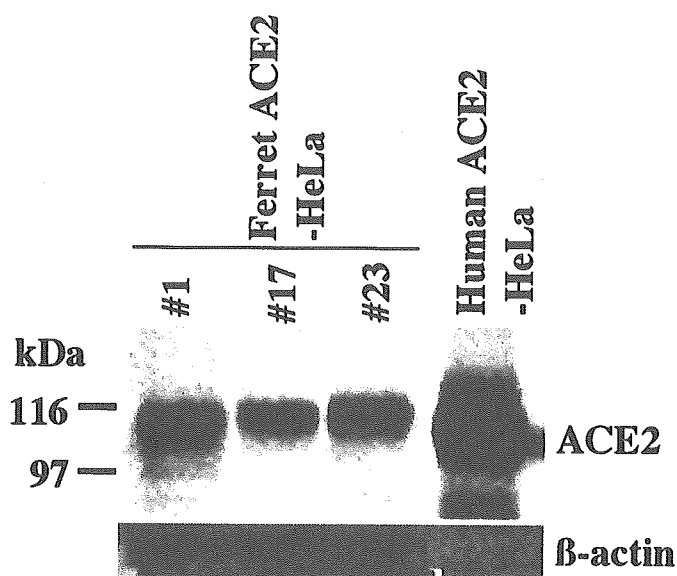


図2. フェレットACE2発現細胞を用いたウエスタンプロットの結果

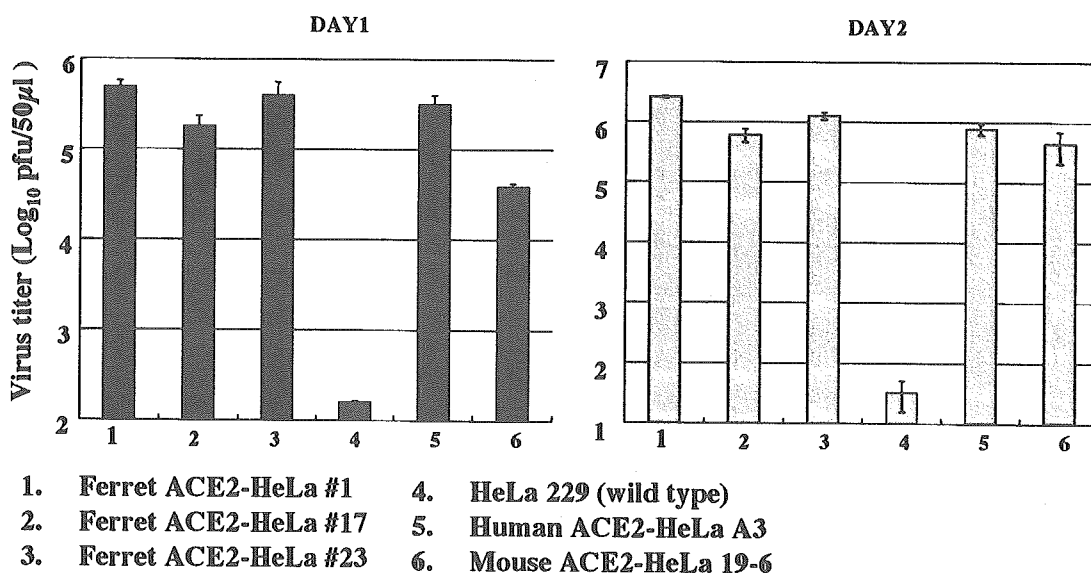


図3. フェレットACE2発現細胞でのSARS-CoV増殖

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

猫コロナウイルス感染症に関する研究
—猫伝染性腹膜炎ウイルス感染における apoptosis 誘導と抗体介在性感染増強作用—

分担研究者：宝達 勉（北里大学獣医畜産学部）

協力研究者：高野友美（北里大学獣医畜産学部）

研究要旨 猫伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）は、抗体の介在によりその感染が増強される。また、猫伝染性腹膜炎（FIP）発症猫では lymphopenia が認められる。本研究で、この lymphopenia が peripheral blood mononuclear cells(PBMC)の apoptosis に起因することおよびマクロファージから産生される TNF- α が apoptosis 誘導因子の一つであることを明らかにした。また、抗体介在性感染増強（ADE）の発現によってウイルス産生量だけでなくマクロファージからの TNF- α 産生量も増加し、リンパ球の apoptosis 誘導が強まることを明らかにした。この apoptosis の誘導は、B 細胞(CD21⁺ 細胞)よりも T 細胞、特に CD8⁺ 細胞で顕著に認められた。FIP 発症猫由来の PBMC あるいは FIP 発症猫由来腹腔滲出細胞（PEC）培養上清と共培養した SPF 猫の PBMC では、TNF receptor(TNFR)1 および TNFR2 の mRNA 発現量がいずれも増加していた。特に、PEC 培養上清と共培養した CD8⁺ 細胞では TNFR1 および TNFR2 の mRNA 発現量が増加していた。すなわち、CD8⁺ 細胞は他のリンパ球サブセット、特に B 細胞(CD21⁺ 細胞)に比べて TNF- α による apoptosis 誘導を受けやすいことを示していた。以上の結果から、FIPV 感染マクロファージから産生された TNF- α によりリンパ球に apoptosis が誘導され、それが原因で lymphopenia が誘導されることが示唆された。この apoptosis 誘導が、ADE 発現によって増強されることおよび CD8⁺ 細胞が apoptosis 誘導を受けやすいという結果は、FIP の病態形成過程における ADE 発現と細胞性免疫低下の関連性を示唆するものである。

A. 研究目的

猫伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）は、抗体の介在によりその感染が増強される。FIPV 感染における抗体介在性感染増強（ADE）は、ウイルス抗体複合体が抗体の Fc 部分に対する Fc レセプターを介して細胞に侵入することによって起こる。また、猫伝染性腹膜炎（FIP）発症猫では、末梢血のリンパ球、特に T 細胞の減少が著しい。FIPV は末梢血リンパ球では増殖しないことから、この lymphopenia は、リンパ球へのウイルス感染による直接的な破壊によるものとは考えにくく、その原因は明らかでない。FIP 発症猫のリンパ組織では apoptosis 細胞が増加することが報告されている。FIP 発症は、宿主の免疫機能と深く関わっていることから、lymphopenia のメカニズムを明らかにすることは FIP 病態発生の機序の解明に重要である。

そこで、本年度の研究では、1) FIP 発症猫

で見られる lymphopenia と apoptosis の関係を調べると共に、2) ADE 発現とリンパ球への apoptosis 誘導の関係を調べた。

B. 研究方法 および 研究成果

1. FIP 発症猫の lymphopenia と apoptosis の関係

(1) FIP 発症猫と FIP 発症を耐過した猫の PBMC における apoptosis 細胞の検出：

FIPV を実験感染後、FIP を発症した猫と発症を耐過した猫の PBMC を用いて TUNEL 法により apoptosis 細胞を検出し、SPF 猫での値と比較した。FIP 発症猫の PBMC では、apoptosis 細胞の陽性率が 23.4 \pm 16.7%であり、FIP の発症を耐過した猫の 0.9 \pm 1.3%および SPF 猫の 2.5 \pm 2.8%と比較して有意に高かった。

(2) FIP 発症猫由来材料の末梢血 CD4⁺ 細胞, CD8⁺ 細胞および CD21⁺ 細胞に対する apoptosis 誘導能:

SPF 猫の PBMC から CD4⁺ 細胞, CD8⁺ 細胞および CD21⁺ 細胞を magnetic beads 法により分離した。それらの細胞 (2×10^6 cells) を FIP 発症猫から採取した腹水 (最終濃度 1:40)、血漿 (最終濃度 1:40) および腹腔滲出細胞 (PEC) の培養上清 (最終濃度 1:2) と共に 4 時間培養し、apoptosis が誘導されるか否かを検討した。その結果、すべての FIP 発症猫由来材料は、PBMC およびそのリンパ球サブセットである CD4⁺ 細胞, CD8⁺ 細胞および CD21⁺ 細胞に対して容易に apoptosis を誘導した (図 1)。特に、CD8⁺ 細胞において強く apoptosis が誘導されており、CD21⁺ 細胞と比較して有意な差が認められた (腹水および PEC 培養上清では $p < 0.01$ 、血漿では $p < 0.05$)。また、PEC 培養上清では、CD4⁺ 細胞と CD8⁺ 細胞との間にも有意差が認められた ($p < 0.05$)。

腹水および PEC 培養上清の SPF 猫の PBMC に対する apoptosis 誘導能が apoptosis の細胞内シグナル伝達物質に対する阻害剤によって抑制されるか否かを調べた。阻害剤としては、caspase-3 inhibitor、caspase-8 inhibitor および p38-MAPK inhibitor を使用した。その結果、いずれの阻害剤においても濃度依存的に apoptosis の誘導が抑制された (図 2)。

(3) FIP 発症猫の PEC および PBMC における TNF- α mRNA の発現と PEC 培養上清および plasma 中の TNF- α の検出:

FIP 発症猫の PEC と PBMC、SPF 猫の肺胞マクロファージと PBMC における TNF- α mRNA の発現量を測定した。TNF- α mRNA 発現量は、FIP 発症猫 ($n=7$) の PEC で顕著に増加しており、SPF 猫 ($n=6$) の肺胞マクロファージと比較して有意な差 ($p < 0.01$) が認められた。PBMC の比較でも同様の結果が得られ、SPF 猫に比べ FIP 発症猫でその発現量が有意に増加していた (図 3 A)。

FIP 発症猫由来の PEC 培養上清および血漿中に TNF- α が含まれるか否かを、TNF- α に感受性である WEHI-164 細胞に対する細胞傷害活性を指標として測定した。その結果、FIP cats 由来の PEC 培養上清および血漿は、いずれも濃度依存的に WEHI-164 細胞に対して細胞傷害活性を示した。しかし、SPF 猫由来の肺胞マクロファージと血漿では細胞傷害活性が認められなかった (図 3 B)。

(4) FIP 発症猫および SPF 猫の PBMC における TNF receptor (TNFR) 1 および 2 mRNA 発現量の解析:

TNF- α は、細胞表面の TNFR1 および TNFR2 に結合し、apoptosis や細胞増殖活性を誘導する。そこで、FIP 発症猫および SPF 猫の PBMC における TNFR1 および TNFR2 の mRNA 発現量を比較した。その結果、FIP 発症猫の PBMC では、TNFR1 および TNFR2 のいずれの mRNA 発現量も SPF cats と比較して増加していた (図 4)。

(5) PBMC における TNFR1 および TNFR2 mRNA 発現に対する PEC 培養上清の効果:

SPF 猫の PBMC と FIP 発症猫由来 PEC 培養上清を共培養して PBMC における TNFR1 および TNFR2 mRNA の経時的な発現量を測定した。その結果、TNFR1 および TNFR2 のいずれも、培養 1 時間後からその mRNA 発現量が増加し、4 時間後には減少した (図 5)。

さらに、SPF 猫の PBMC から magnetic beads 法によって分離した CD4⁺ 細胞, CD8⁺ 細胞および CD21⁺ 細胞における PEC 培養上清の TNFR1 および TNFR2 mRNA 発現に対する効果を調べた。CD4⁺ 細胞と CD8⁺ 細胞では、PEC 培養上清との 2 時間の共培養によって、TNFR1 と TNFR2 の両 mRNA 発現量が共に増加した。しかし、CD21⁺ 細胞では、TNFR1 と TNFR2 の両 mRNA 発現量に変化は認められなかった (図 6)。

2. ADE 発現とリンパ球への apoptosis 誘導の関係

FIP 発症猫における apoptosis 誘導因子として同定された TNF- α のマクロファージでの発現が、FIPV の抗体を介したマクロファージへの感染により増強するか否かを調べた。すなわち、S 蛋白質に対する抗体と反応させた FIPV を、SPF 猫の肺胞マクロファージに接種し、経口的にウイルス産生量を測定すると共に、マクロファージからの TNF- α 産生量を測定した。その結果、ウイルス単独接種より抗体とウイルスを反応させて接種した場合に、ウイルス産生量と共に TNF- α mRNA 発現量および WEHI-164 細胞に対する細胞障害を指標とした TNF- α 産生量が増加した (図 7, 図 8)。

さらに、これらのマクロファージの培養上清の SPF 猫 PBMC に対する apoptosis 誘導能を比較したところ、ウイルスと抗体を反応させて接種した場合に apoptosis 誘導率が明らかに増加していた (図 8)。

C. 考察

FIP の病態形成は、宿主の免疫状態、特に細胞性免疫 (TH1 活性) 誘導の有無に強く依存すると考えられている。すなわち、細胞性免疫が強く誘導されると FIP 発症が阻止される。FIP 発症猫では末梢血中の CD4⁺ 細胞や CD8⁺ 細胞を含む T 細胞数の減少が著しい。液性免疫 (TH2 活性) の誘導は無効かむしろ病状を悪化させると考えられている。ウイルスの感染によって産生された抗体は血中や血管周囲に存在する遊離ウイルスと結合して免疫複合体を形成する。この免疫複合体が小血管内やその周囲に沈着し、そこに補体が結合することによって脈管組織が障害され脈管炎や血栓形成をきたす。本研究で、FIP 発症猫で認められる lymphopenia が apoptosis に起因すること、さらに、この apoptosis 誘導には、マクロファージから放出される TNF- α とリンパ球での TNFR1 および TNFR2 mRNA の発現が深く関与していることを明らかにした。

これまでも、FIP 発症猫のリンパ節や脾臓において apoptosis が検出されることが報告されているが、末梢血リンパ球での検出は行われていなかった。この報告で得られた結果は、FIP 発症猫の lymphopenia が apoptosis に起因することを直接的に証明した最初の報告と思われる。FIP 発症猫のリンパ節や脾臓におけるリンパ球の apoptosis が末梢血リンパ球の apoptosis と関連することも考えられるが、Influenza virus や HIV 感染症などではリンパ節や脾臓の apoptosis 陽性率と末梢血リンパ球の apoptosis 陽性率が相関しないことが報告されている。今後 FIPV 感染症でも、リンパ節や脾臓と末梢血リンパ球の apoptosis 陽性率を比較し、リンパ組織での apoptosis 誘導が末梢血リンパ球に反映されているのか否かの検討が望まれる。

FIP 発症猫で認められる apoptosis 誘導メカニズムの詳細は明らかでなかった。FIPV はリンパ球では増殖しないことから、このリンパ球での apoptosis 誘導は、FIPV 感染により直接誘導されるものではなく、他の間接的な要因で誘導されることが考えられる。今回の報告で、1) FIP 発症猫の PEC および PBMC において、TNF- α mRNA の発現量が増加していること、2) FIP 発症猫の PEC 培養上清および血漿は、TNF- α に感受性である WEHI-164 細胞に対して細胞傷害活性を示すこと、3) FIP 発症猫の腹水および PEC 培養上清の SPF 猫 PBMC に対する apoptosis 誘導能は caspase-3 inhibitor、caspase-8 inhibitor および p38-MAPK inhibitor で抑制されることを明らかにした。すなわち、FIP 発症猫におけるリンパ球への apoptosis 誘導は TNF- α が主要因であることを示唆するものである。

FIP 発症猫の腹水中にはマクロファージ、リンパ球、好中球などの細胞が含まれる。これらの細胞はいずれも TNF- α を産生する。我々が用いた PEC は、腹水中の細胞から non-adherent cells を除去した後得られる adherent cells を使用した。この adherent cells は、マクロファージの形態を示し、さらにこの細胞から RT-

PCR により FIPV 遺伝子が検出された。FIPV はマクロファージを標的細胞の 1 つとしており、この FIPV のマクロファージへの感染が、FIP 病態形成にとって重要な要因の 1 つと考えられている。おそらく、FIPV に感染したマクロファージから TNF- α が産生され、それがリンパ球、特に CD8⁺ T 細胞に apoptosis を誘導することが示唆される。さらに、ADE の発現によってウイルス産生量だけでなくマクロファージからの TNF- α 産生量も増加し、リンパ球の apoptosis 誘導が強まることが明らかとなった。

TNF- α は TNFR と結合することにより、細胞内に apoptosis のシグナルを誘導する。我々はこの報告で、FIP 発症猫の PBMC あるいは PEC 培養上清と共培養した SPF 猫の PBMC において、TNFR1 および TNFR2 の mRNA 発現量がいずれも増加していることを示した。特に、PEC 培養上清と共培養した CD8⁺ 細胞は TNFR1 および TNFR2 の mRNA 発現量が増加していた。すなわち、CD8⁺ 細胞は他のリンパ球サブセットに比べて TNF- α による apoptosis 誘導を受けやすいことを示唆するものである。CD21⁺ 細胞 (B 細胞) は CD8⁺ 細胞や CD4⁺ 細胞と比較して、FIP 発症猫由来材料による apoptosis 誘導率が低かった。FIP 発症猫の腹水や PEC 培養上清で IL-6 活性が有意に上昇していることが報告されている。IL-6 は、B 細胞の分化・増殖や apoptosis 抑制に関与することが知られている。従って、CD21⁺ 細胞の apoptosis 誘導率が低いのは、FIP 発症猫由来材料に含まれる IL-6 が影響していることが考えられる。また、PEC 培養上清と共培養した CD21⁺ 細胞では TNFR1 および TNFR2 の mRNA 発現量に変化が認められず、このこと

も TNF- α による apoptosis 誘導率に関与していることが考えられた。

以上のことから、FIP 発症猫では、FIPV 感染マクロファージから産生された TNF- α によってリンパ球、特に CD8⁺ 細胞の apoptosis が誘導され、その結果、細胞性免疫の低下を招くことが示唆された。また、CD8⁺ 細胞が apoptosis 誘導を受けやすいという結果とこの apoptosis 誘導が、ADE 発現によって増強されるという結果は、FIP の病態形成過程における ADE 発現と細胞性免疫低下の関連性を示唆するものである。

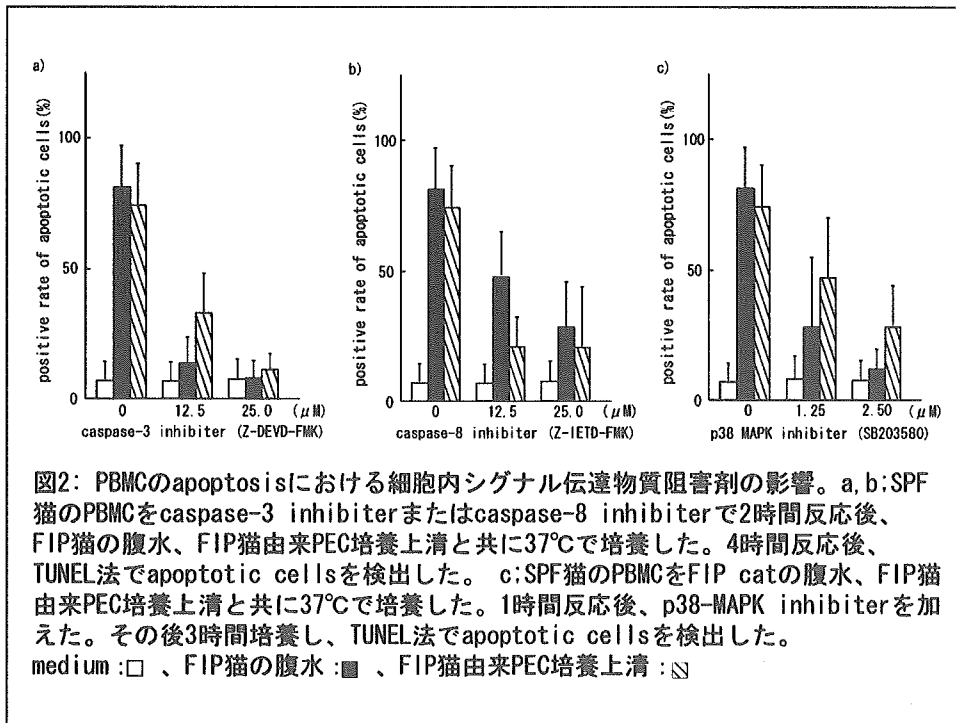
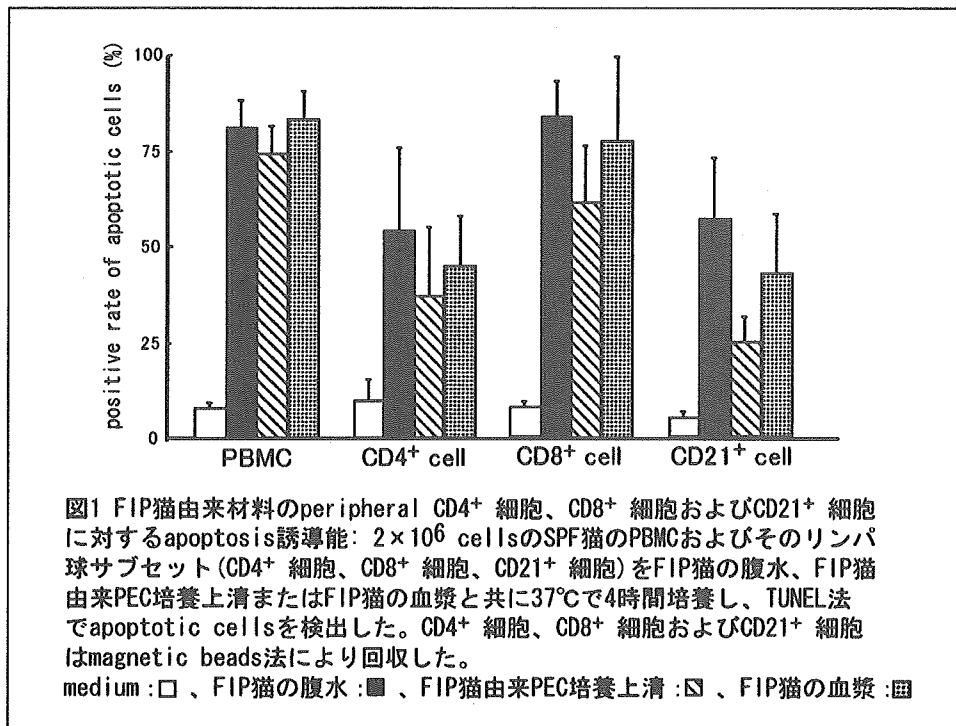
D. 結論

FIP 発症猫で見られる lymphopenia が PBMC の apoptosis に起因することおよびマクロファージから産生される TNF- α が apoptosis 誘導因子の一つであることを明らかにした。また、抗体介在性感染増強 (ADE) の発現によってウイルス産生量だけでなくマクロファージからの TNF- α 産生量も増加し、リンパ球の apoptosis 誘導が強まることを明らかにした。この apoptosis の誘導は、B 細胞 (CD21⁺ 細胞) よりも T 細胞、特に CD8⁺ 細胞で顕著に認められた。

E. 研究発表

1. 学会発表

高野友美、宝達 勉、橋田好兼、金子泰広、田邊真紀、小山弘之：猫伝染性腹膜炎 (FIP) 発症ネコにおける apoptosis 因子の検出 第 140 回日本獣医学会学術総会、鹿児島、2005 年 9 月。



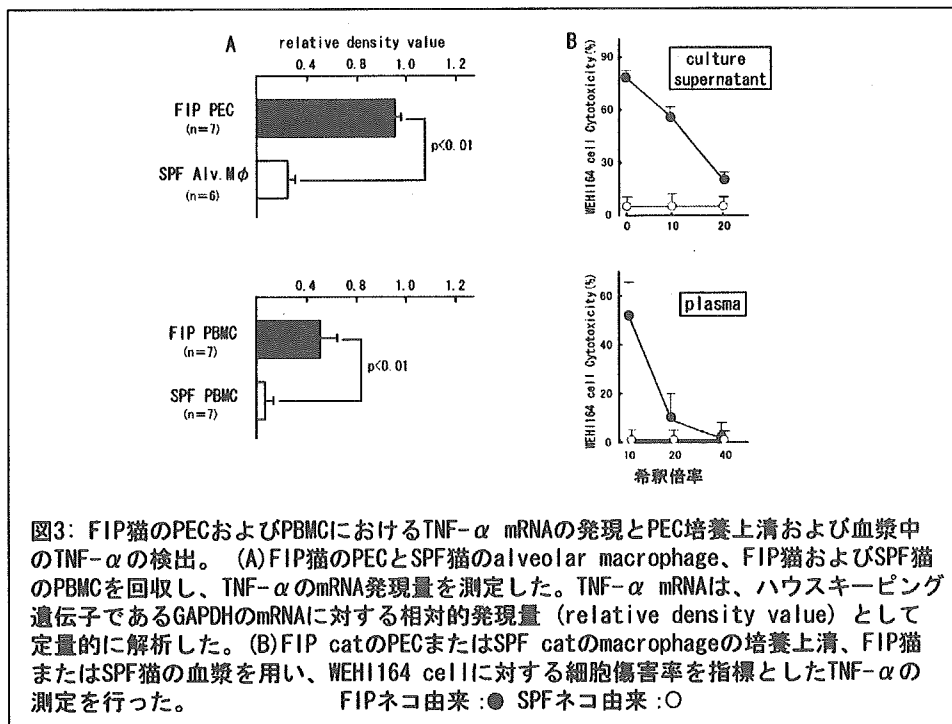


図3: FIP猫のPECおよびPBMCにおけるTNF- α mRNAの発現とPEC培養上清および血漿中のTNF- α の検出。(A)FIP猫のPECとSPF猫のalveolar macrophage、FIP猫およびSPF猫のPBMCを回収し、TNF- α のmRNA発現量を測定した。TNF- α mRNAは、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHのmRNAに対する相対的発現量 (relative density value) として定量的に解析した。(B)FIP catのPECまたはSPF catのmacrophageの培養上清、FIP猫またはSPF猫の血漿を用い、WEHI164 cellに対する細胞傷害率を指標としたTNF- α の測定を行った。 FIPネコ由来:● SPFネコ由来:○

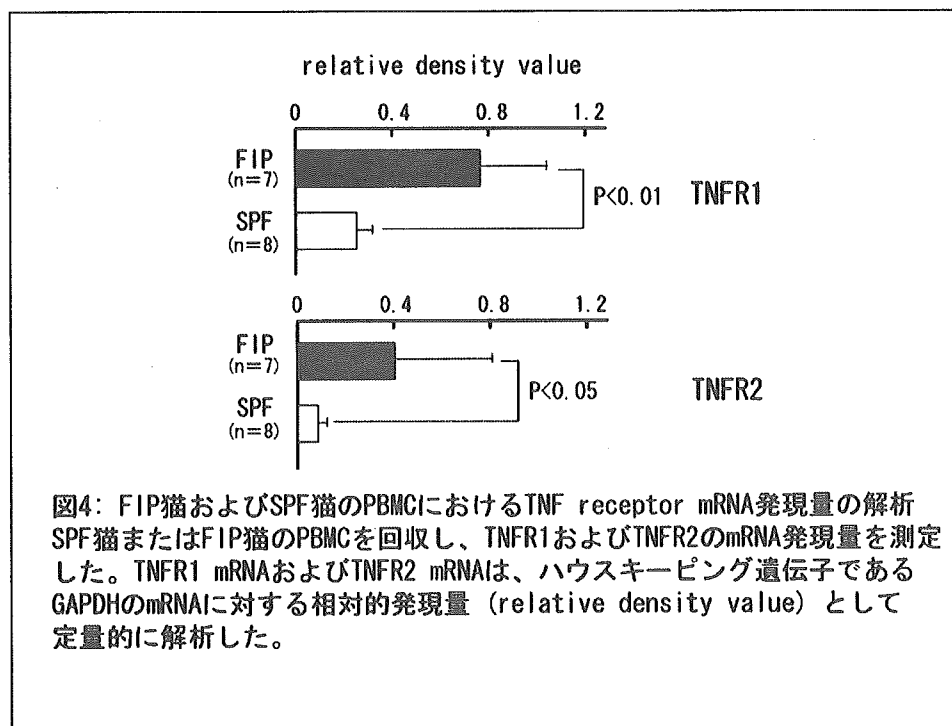


図4: FIP猫およびSPF猫のPBMCにおけるTNF receptor mRNA発現量の解析 SPF猫またはFIP猫のPBMCを回収し、TNFR1およびTNFR2のmRNA発現量を測定した。TNFR1 mRNAおよびTNFR2 mRNAは、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHのmRNAに対する相対的発現量 (relative density value) として定量的に解析した。

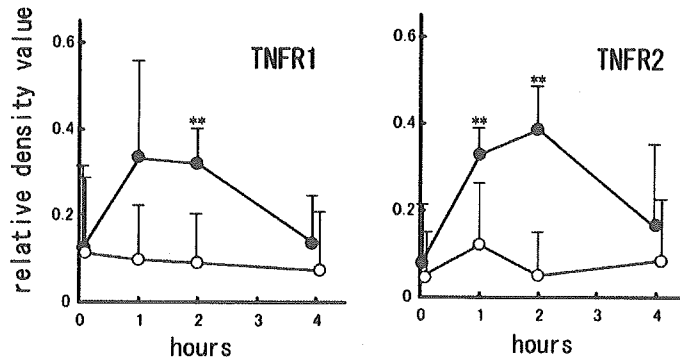


図5: PBMCにおけるTNFR1およびTNFR2 mRNA発現に対するPEC培養上清の効果。SPF猫のPBMC (n=5) をFIP猫由来PEC培養上清と共に培養した。培養後0h、1h、2h、4hのTNFR1およびTNFR2のmRNA発現量を測定した。TNFR1 mRNAおよびTNFR2 mRNAは、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHのmRNAに対する相対的発現量 (relative density value) として定量的に解析した。FIP猫由来PEC培養上清: ●、medium: ○ ** : p<0.01

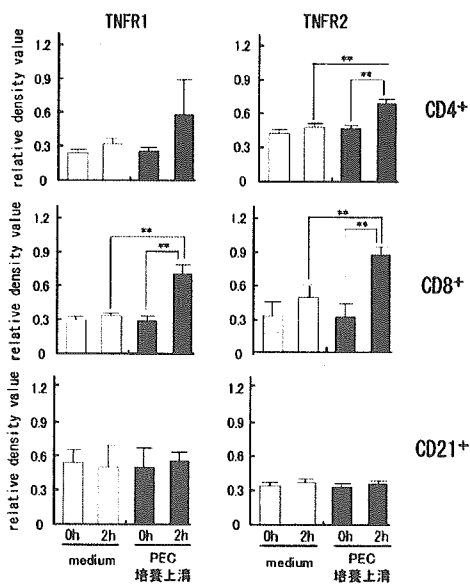
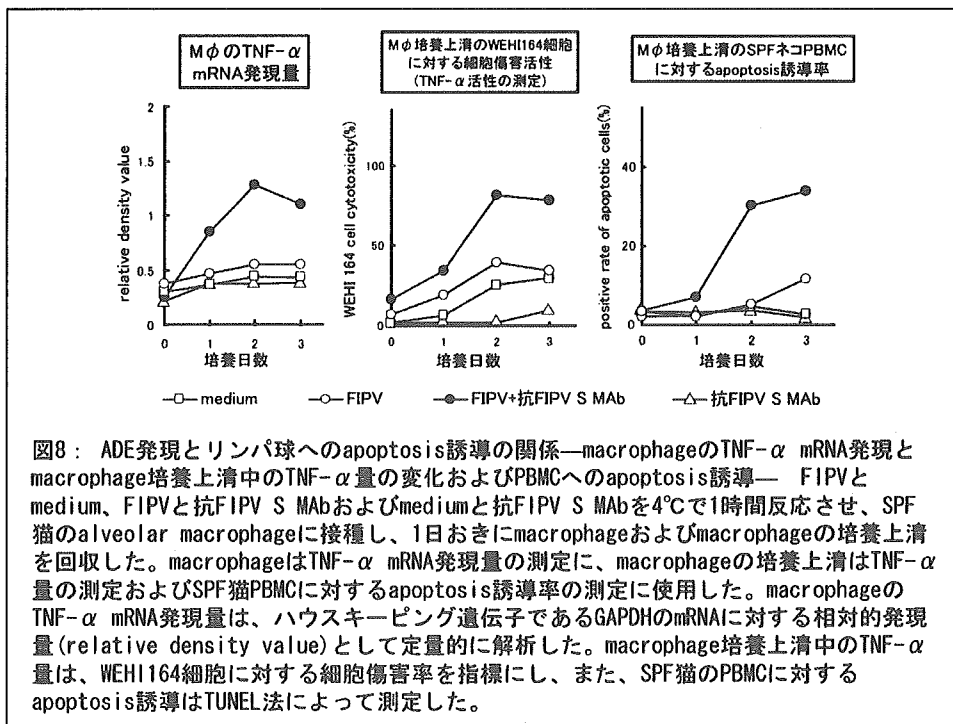
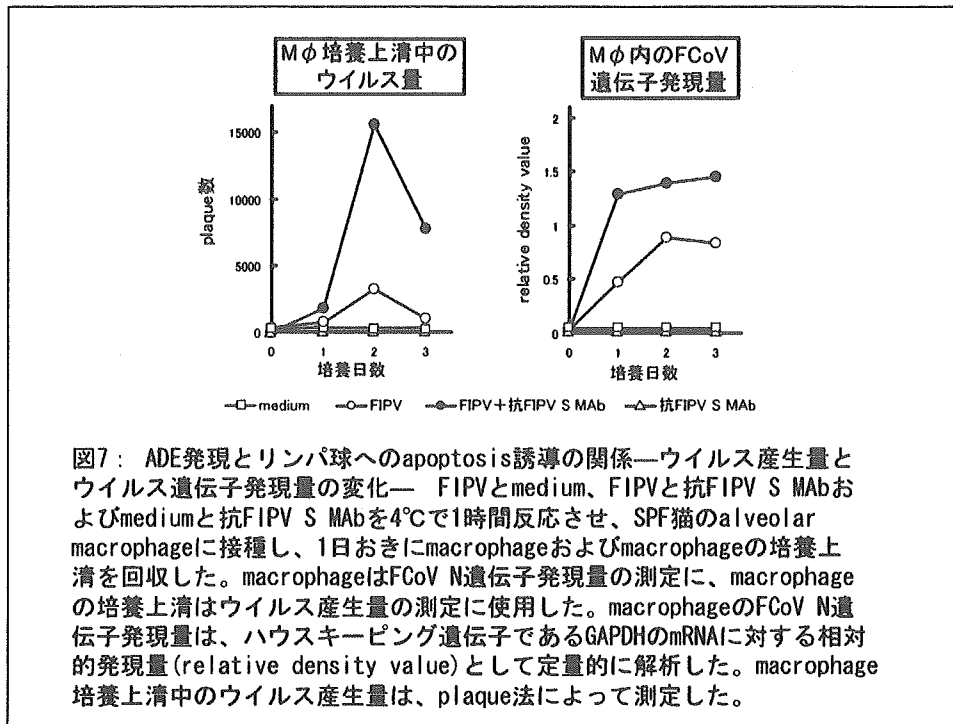


図6: CD4⁺ 細胞、CD8⁺ 細胞およびCD21⁺ 細胞におけるTNFR1およびTNFR2 mRNA発現に対するPEC培養上清の効果。SPF猫のPBMCからmagnetic beads法によってCD4⁺ 細胞、CD8⁺ 細胞およびCD21⁺ 細胞を回収した。そして、FIP猫由来PEC培養上清と共に培養した。培養時 (0h) および培養後2hのTNFR1、TNFR2のmRNA発現量を測定した。TNFR1 mRNAおよびTNFR2 mRNAは、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHのmRNAに対する相対的発現量 (relative density value) として定量的に解析した。** : p<0.01



受容体遺伝子導入マウス細胞株を用いた豚伝染性胃腸炎ウイルス感染性の解析

分担研究者 池田 秀利 (動物衛生研究所 感染症研究部)
協力研究者 宮崎 綾子 (動物衛生研究所 感染症研究部)

研究要旨 ウイルスの宿主指向性や臓器指向性を決める要因の一つは、宿主側のウイルス受容体とウイルス側の受容体結合蛋白との結合性である。本研究では豚のコロナウイルスである豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) の宿主指向性や臓器指向性機構の解明を目的とし、TGEV 受容体であるブタアミノペプチダーゼ N (pAPN) 遺伝子を TGEV 非感受性マウス細胞株に遺伝子導入し、pAPN 発現マウス細胞株を樹立、TGEV との相互作用を解析した。pAPN 遺伝子導入細胞株における TGEV の RNA 合成速度、ウイルス蛋白合成速度については TGEV 感受性の豚株化 CPK 細胞と差違は認められなかったが、遺伝子導入細胞におけるウイルス抗原陽性細胞の増加は CPK 細胞に比べて遅く、また産生されたウイルス力価も低かった。pAPN は TGEV 感受性を決定する主要因子であることが確認できたが、感染効率の違いなどについてはさらに解析中である。

A. 研究目的

動物では様々な動物種固有のコロナウイルスが知られている。SARS コロナウイルスとその他一部のコロナウイルスを除いて、一般的にコロナウイルスの感染する宿主域は狭いとされている。このようなウイルスの宿主指向性や臓器指向性を決める要因の一つは、宿主側のウイルス受容体とウイルス側の受容体結合蛋白との結合性である。

豚のコロナウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス (Transmissible Gastroenteritis Virus; TGEV) はあらゆる日令のブタに感染するが、特に哺乳豚において激しい下痢を引き起こし高率に死に至らしめることが知られている。また TGEV は腸管だけではなく、呼吸器にも指向性を持っており、特に弱毒化した TGEV で呼吸器指向性を示すことが知られている。TGEV で観察されるこの臓器指向性の違いを生むウイルス側の要因は受容体結合蛋白である S 蛋白の特定の部位に存在するアミノ酸の点変異にあるということが報告されている。

一方、1980 年代後半、TGEV の S 蛋白遺伝子が一部欠失した変異体で呼吸器指向性を持つ豚呼吸器コロナウイルス (PRCV) が分離され、臓器指向性のウイルス側要因解明の一助となった。しかし宿主側のウイルス受容体との相互作用がブタコロナウイルスの臓器指向性にもたらす影響については解明がなされていない。

本研究では TGEV の宿主受容体、ブタアミノペプチダーゼ N (pAPN) と TGEV との相互作用を分子レベルで解析することから TGEV の臓器指向性や病原性を解明することを目的とし、本年度は TGEV 非感受性のマウス由来 NIH3T3 細胞に、Tag 抗原である FLAG 抗原遺伝子を付加した pAPN-FLAG 遺伝子を TGEV 非感受性マウス細胞に遺伝子導入し、pAPN-FLAG 発現マウス細胞株を作製、TGEV との相互作用を解析した。

B. 研究方法

① pAPN-FLAG 発現 NIH3T3 細胞株の樹

立；豚小腸上皮より mRNA を精製し、RT-PCR によって pAPN 遺伝子の cDNA を増幅、pCR2.1-Topo[®] にクローニングした。このプラスミドを鋳型として pAPN 遺伝子 5'末に *Xho*I サイトを付加したセンスプライマー（1S *Xho*I）、pAPN 遺伝子 3'末に Tag 抗原である FLAG 配列、*Bgl*III サイトを付加したアンチセンスプライマー(2913FLAG R)を用いた PCR を行い、3'末に FLAG 抗原配列を付加した pAPN 配列 (pAPN-FLAG) を得た。この遺伝子配列を pCR[®]-Blunt II-Topo[®]へクローニング、*Xho*I、*Bgl*III 消化後、ほ乳類細胞発現ベクター pCAGGS の *Xho*I、*Bgl*III サイトへ組み込み、pAPN-FLAG 発現ベクター (pAPN-FLAG/pCAGGS) を得た。その後、pAPN-FLAG/pCAGGS、陰性対象として遺伝子を挿入していない pCAGGS をネオマイシン耐性遺伝子供与プラスミド pSV/neo と共に、遺伝子導入試薬 Lipofectamine を用い TGEV 非感受性のマウス NIH3T3 細胞に導入した。G-418 sulfate による選択を行った後、得られた細胞株の pAPN-FLAG 発現を抗 FLAG モノクローナル抗体、抗 pAPN 兔血清を用いた間接蛍光抗体法 (IFA)、ウエスタンブロット法 (WB)、フローサイトメトリー法 (FACS) によって確認した。

② pAPN-FLAG 遺伝子導入細胞株の TGEV に対する感受性：

- i) 抗 TGEV 血清を用いた IFA；各細胞に moi=1 で TGEV To163 株を接種、12、24 時間後にアセトン固定し抗 TGEV 兔血清を用い TGEV 抗原を検出した。
- ii) TGEV 産生能力； 12 穴プレートに各細胞を播き、moi=0.01 で TGEV To163 株を接種し、経時的に培養上清と培養細胞中のウイルス感染力価を CPK 細胞を用いて測定した。
- iii) ウイルス RNA の転写効率、各ウイルス構造蛋白産生の経時的観察；それぞれ経時的に viral subgenomic RNA の RT-PCR、抗 TGEV

血清を用いた TGEV 感染細胞の WB を行うことにより観察した。

(倫理面への配慮)

TGEVの感染実験、組換え実験は動物衛生研究所微生物等管理要領、遺伝子組み換え生物等使用規定に準拠し、P2レベルで行った。

C. 研究結果

① pAPN-FLAG/pCAGGS を NIH3T3 細胞に導入し 2 株の pAPN-FLAG 発現細胞株 (7A, 7B)、同様にして pCAGGS ベクターのみを遺伝子導入し陰性対照株 (VB) を得た。7A, 7B の 2 株は IFA により pAPN-FLAG の発現を確認した後、さらに抗 pAPN 血清と抗 FLAG 抗体を用いた WB、FACS 解析により期待した分子量での発現、細胞膜上における発現を確認した。また FACS 解析によってこれら 2 細胞株間の pAPN-FLAG 発現様態の差が認められた (図 1A, B)。

② TGEV TO163 株を用いて 7A, 7B の TGEV に対する感受性を解析した。IFA では感染後の時間経過に従って抗原陽性細胞数の増加が見られたものの、その増加速度は TGEV 感受性の CPK 細胞に比べて遅かった (図 2)。また、培養上清および培養細胞中のウイルス力価は 7B では CPK に比べ著しく低いかまたは検出できなかったものの、7A では培養細胞中のウイルス力価は CPK にくらべ低めから同程度であった (図 3)。ウイルス増殖のどの段階で CPK と 7A, 7B の TGEV 産生性に差が生じるのかを調べるために、ウイルス RNA の転写効率、各ウイルス構造蛋白の産生について経時的に観察した結果、どちらについても CPK と 7A,7B 間に大差は見られなかった (図 4)。

D. 考察

非感受性のマウス NIH3T3 細胞に TGEV 受

容体である pAPN 遺伝子を導入したことにより NIH3T3 細胞は TGEV への感受性を獲得したことから、受容体が TGEV 感染性を決定する主要因子であることが確認できた。

pAPN は小腸だけではなく、近位尿細管上皮、肝臓、膵臓、脳、肺に様々なレベルで発現していることが分かっている。今回 pAPN の発現様態の異なる 2 つの遺伝子導入細胞株間では、TGEV 感染後のウイルス RNA の転写・蛋白合成においては差が見られなかったものの、産生するウイルス力価に差が見られた。このような受容体の発現様態の差によるウイルス産生性の違い、また感受性細胞である CPK 細胞と pAPN-FLAG 遺伝子導入細胞株間で観察された感染効率の違いが TGEV の臓器指向性にどのような影響を与えているのか、次年度はさらなる解析を進めていく。また受容体結合蛋白である S 蛋白遺伝子が一部欠失し、腸管で増殖せず呼吸器で増殖する豚呼吸器コロナウイルス (PRCV) についても同様の解析を行ってゆき、臓器指向性機構を明らかにしてゆく。

E. 結論

TGEV 非感受性のマウス NIH3T3 細胞に受容体遺伝子を導入したことにより、NIH3T3 細胞は TGEV への感受性を獲得したことから受容体が TGEV 感染性を決定する主要因子であることが確認できた。しかし感染効率の違いなどについてはさらなる解析が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 学会発表

Miyazaki, A. et al. First evidence of a high prevalence of porcine respiratory coronavirus infection in Japan. 40th UJNR

2) 論文発表

なし

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

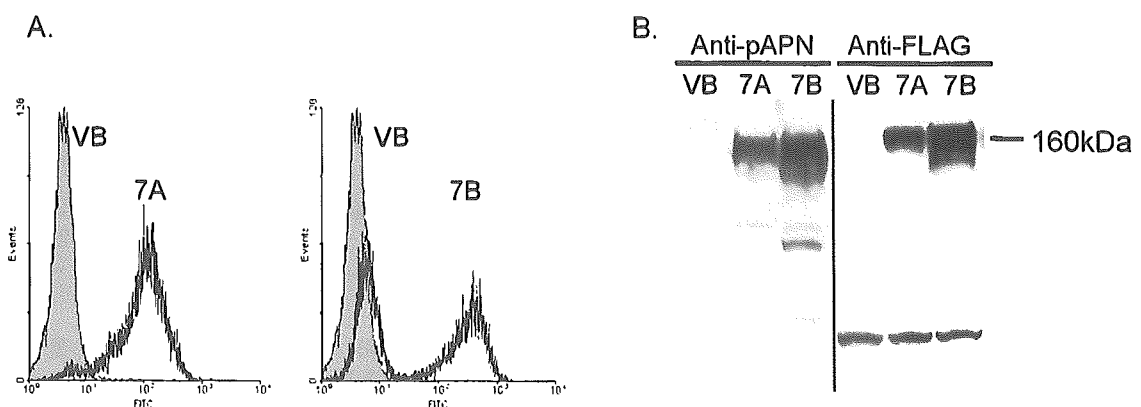


図 1. pAPN-FLAG 遺伝子導入細胞の pAPN-FLAG 発現解析。(A) 抗 pAPN 兔血清を用いたフローサイトメトリー法による解析細胞表面における発現解析。(B) 抗 FLAG-tag モノクローナル抗体、抗 pAPN 兔血清を用いたウエスタンブロッティング法による発現 pAPN-FLAG の分子量の解析。pCAGGS 導入細胞 (VB), pAPN-FLAG 導入細胞 (7A, 7B)。

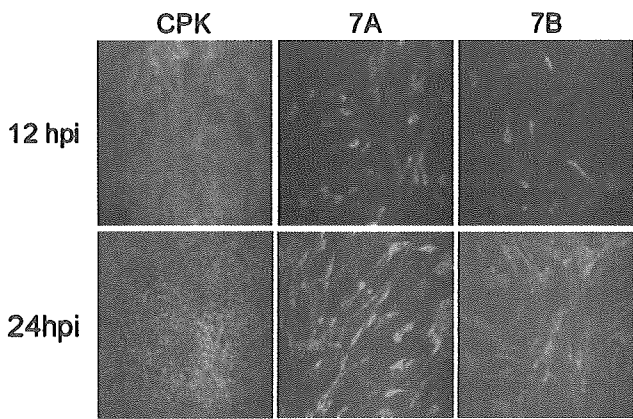


図2. 抗TGEV兔血清を用いたIFA法. $Moi=1$ でTGEVを接種後、各時間においてアセトン固定、TGEV抗原を検出した。

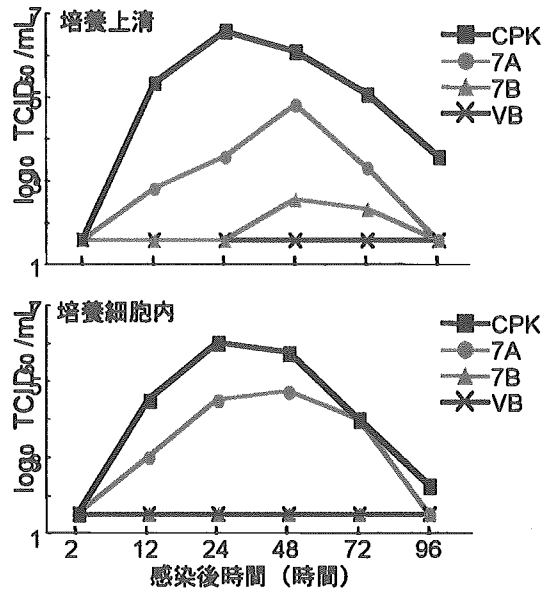


図3. pAPN-FLAG遺伝子導入細胞のTGEV産生性. $Moi=0.01$ でTGEVを接種し、各感染後時間に培養上清、培養細胞内のウイルス感染価をCPK細胞で測定した。

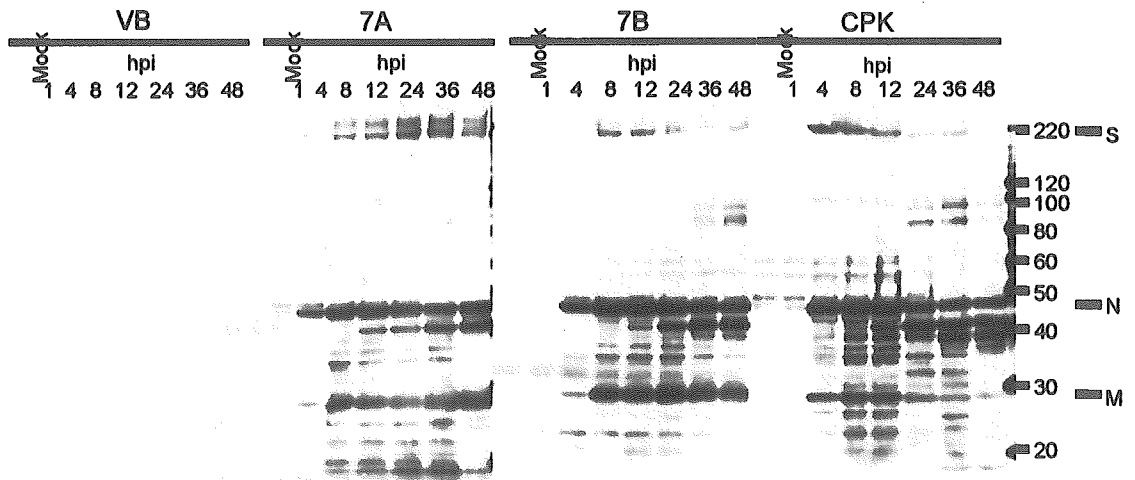


図4. TGEV接種後pAPN-FLAG遺伝子導入細胞株におけるTGEV抗原の経時的変化. TGEV接種($Moi=5$)後各時間に細胞を可溶化し、還元条件下でSDS-PAGE後ニトロセルロース膜に転写、抗TGEV兔血清を用いてTGEV抗原を検出した。