

伝子導入し、pAPN 発現マウス細胞株を樹立、TGEV および PRCV の感染性について解析した。

B. 研究方法

① pAPN-FLAG 発現 NIH3T3 細胞株の樹立；豚小腸上皮細胞より RNA を抽出し、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、3'末に FLAG 抗原配列を付加した pAPN 配列 (pAPN-FLAG) を PCR により増幅、クローニング後、ほ乳類細胞発現ベクター pCAGGS 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/PRCV 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 および PRCV に対する感受性：

i) 抗 TGEV 血清を用いた IFA；各細胞に $moi=0.01$ で TGEV To163 株または PRCV CH45 株を接種、12, 24, 36 時間後にアセトン固定し抗 TGEV 兔血清を用いウイルス抗原を検出した。ウイルス産生性；12 穴プレートに各細胞を播き、 $moi=0.01$ で TGEV To163 株または PRCV CH45 株を接種し、培養上清と培養細胞中のウイルス感染力価を CPK 細胞を用いて経時的に測定した。

ii) ウイルス RNA 合成効率の経時的観

察；24 穴プレートに各細胞を播いた後、 $moi=0.01$ で TGEV To163 株または PRCV CH45 株を接種し、接種後 0,4,8,12 時間で細胞より RNA を抽出し cDNA を作製、S, M および N 遺伝子の subgenomic mRNA、genomic RNA を RT-PCR により検出した。

iii) 各ウイルス構造蛋白の産生性 24 穴プレートに各細胞を播いた後、 $moi=5$ で TGEV To163 株または PRCV CH45 株を接種、0 から 48 時間まで経時的に細胞溶解液を回収し、各ウイルス構造蛋白の産生性を抗 TGEV 兔血清を用いたウエスタンブロットティングにより観察した。

(倫理面への配慮)

TGEV および PRCV 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 をマウス 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 細胞株間には pAPN-FLAG 発現様態の差違があることが認められた (図 1)。pAPN-FLAG 発現細胞株 7A および 7B、陰性対照株 VB、TGEV/PRCV 感受性豚腎由来 CPK 細胞の 4 種の細胞を以後の解析に供した (平成 16 年度)。

② 樹立した pAPN-FLAG マウス細胞株における TGEV TO163 株と PRCV CH45 株のウイルス産生性は感受性である CPK 細胞にくらべ低かった。特に PRCV は TGEV よりも産生さ

れる力価がより低かった(図2)。(平成16,17年度)

③ pAPN-FLAG 発現マウス細胞株における TGEV または PRCV 接種後のウイルス抗原陽性細胞数の増加は豚 CPK 細胞での増加よりも遅く推移した。TGEV と PRCV を比較すると、PRCV 接種時に抗原陽性細胞数の少なさがより顕著であった(図3)。(平成16,17年度)

④ pAPN-FLAG 発現マウス細胞株における TGEV と PRCV のウイルス産生性の差がウイルス増殖のどの段階で生じるか解析を行った。各細胞に TGEV または PRCV を 4℃30 分で反応させ、ウイルスの結合性を観察した結果、受容体遺伝子を導入していない陰性対象細胞株 VB をはじめすべての細胞株で TGEV および PRCV の結合が同程度に確認された。次にウイルスを接種後培養し、S、M および N 遺伝子の subgenomic mRNA を検出する RT-PCR を行うことにより、ウイルス RNA の合成効率を観察した。その結果 pAPN-FLAG 発現マウス細胞株 7A および 7B と CPK 細胞において、TGEV と PRCV の各 mRNA の合成は同時期から同程度に確認された。(平成16,17年度)

⑤ ウイルス蛋白合成段階について解析した結果、TGEV 接種後の APN-FLAG 発現マウス細胞株 7A および 7B と CPK 細胞においてウイルス蛋白の合成が確認でき、その合成速度、合成開始時期は同程度であった。PRCV 接種後についてもほぼ同様の結果であったが、pAPN-FLAG 発現マウス細胞株 7B において、M 蛋白質に相当する分子量の蛋白の合成効率が他のウイルス蛋白合成効率に比べ低い結果が得られた(図4)。(平成16,17年度)

D. 考察

ブタコロナウイルスの受容体である pAPN を発現するマウス細胞株 2 株を樹立、TGEV TO163 株と PRCV CH45 株の感染性について

解析を行った。

まずウイルス接種後のウイルス産生性について解析を行ったところ、受容体発現マウス細胞株における両ウイルスの産生性は感受性である CPK 細胞にくらべ低いものであった。特に PRCV は TGEV よりも産生される力価がより低い傾向がみられた。また間接蛍光抗体法でウイルス抗原陽性細胞数の増加を観察したところ、受容体発現マウス細胞株では CPK 細胞に比べ増加速度が遅い傾向がみられ、ここでも PRCV でその傾向が顕著であった。

そこでウイルス増殖のどの段階でウイルス産生性に差が生じるのかを明らかにするために、まず細胞への TGEV および PRCV の結合性を解析した。両ウイルスの結合は受容体発現細胞だけではなく陰性対象細胞株でも同程度に確認され、両ウイルスのマウス NIH3T3 細胞への非特異的な結合能が示唆された。しかしウイルス RNA の合成、増加は CPK 細胞と受容体発現マウス細胞 2 株のみで同じ時期から同程度に確認されたことから両ウイルスの進入から RNA 合成にいたる過程には受容体の存在が不可欠であると考えられた。次にウイルス蛋白合成段階について解析をおこなった。TGEV 接種後のウイルス蛋白合成速度、合成量には CPK 細胞と受容体発現マウス細胞 2 株間に大差はみられなかった。しかし PRCV 接種後の受容体発現マウス細胞 1 株において、M 蛋白質に相当する分子量の蛋白の合成効率が他のウイルス蛋白合成効率に比べ低い結果が得られた。

M 蛋白質はヌクレオカプシドとの結合、viral core の形成やウイルス粒子形成の誘起などに関与しているとされている。TGEV と PRCV の受容体発現マウス細胞株と感受性 CPK 細胞におけるウイルス増殖の各ステップにおける増殖能は、M 蛋白質の合成効率の低下以外がほとんど同程度であることが今回確認されたことから、CPK 細胞にくらべ受容体発現マウ

ス細胞株で PRCV の産生ウイルス力価が低い原因のひとつとしてこの M 蛋白質の合成効率の低下が関与している可能性が考えられた。

E. 結論

TGEV と PRCV の臓器指向性機構を解明することを目的とし、受容体発現マウス細胞株を樹立、TGEV および PRCV の感染性について解析した結果、受容体発現マウス細胞株では PRCV 産生量が低かった。感受性の CPK 細胞と受容体発現マウス細胞株を用い TGEV と PRCV のウイルス増殖の各段階について比較解析を行った結果、ウイルス結合、ウイルス RNA 合成効率では TGEV と PRCV 間に差は認められなかったが、ウイルス蛋白合成について解析したところ、受容体発現マウス細胞株 1 株において PRCV 接種時の M 蛋白合成効率低下が観察された。M 蛋白質はウイルス粒子形成に関与するとされていることから、

PRCV の産生ウイルス力価が低い原因のひとつとしてこの M 蛋白質の合成効率の低下が関与している可能性が考えられた。

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, 2005

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

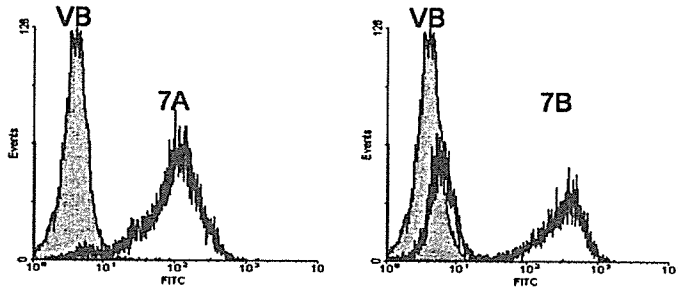


図1. pAPN-FLAG遺伝子導入細胞株の細胞表層におけるpAPN-FLAG分子を抗APN抗体を用いてフローサイトメーターによって検出した。VB; vector導入細胞, 7A, 7B; pAPN-FLAG遺伝子導入細胞株

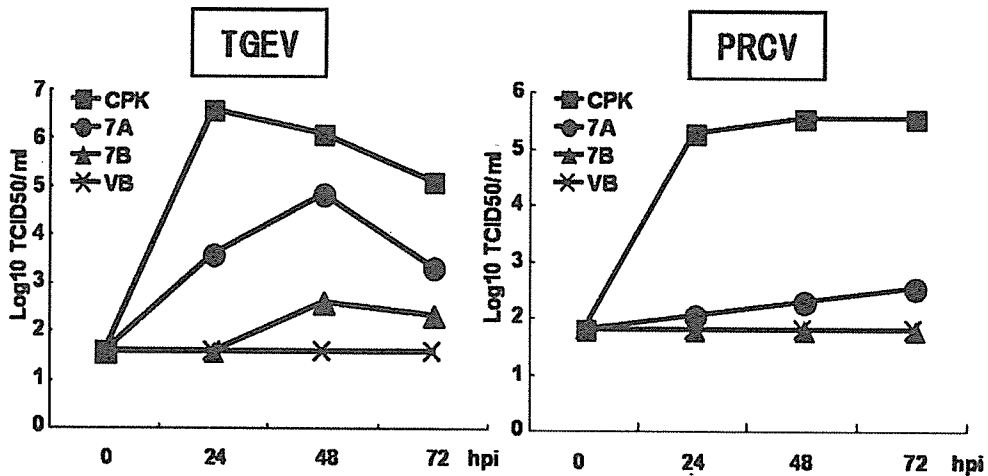


図2 各細胞株によるウイルス産生の経時的力価測定。TGEV(左図)またはPRCV(右図)をmoi=0.01で各細胞に接種後、0, 24, 48, 72時間目で培養上清を回収し培養液中のウイルス力価を測定した。

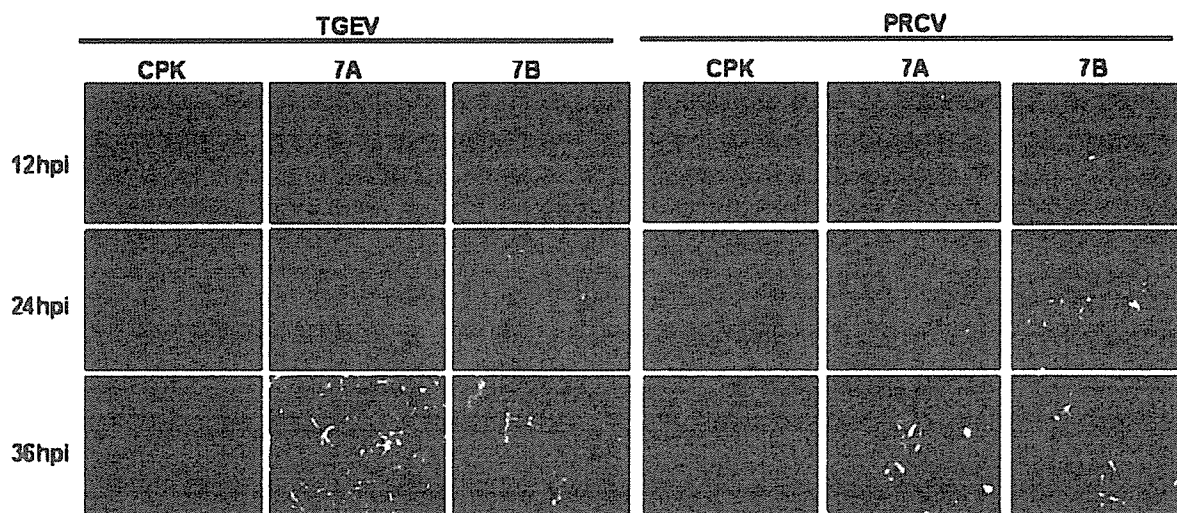


図3 間接蛍光抗体法によるTGEVまたはPRCV接種各細胞におけるウイルス抗原の経時的検出。各細胞に $moi=0.01$ でウイルスを接種後 12, 24, 36時間 で細胞を固定。抗TGEVウサギ血清にてウイルス抗原を検出した。

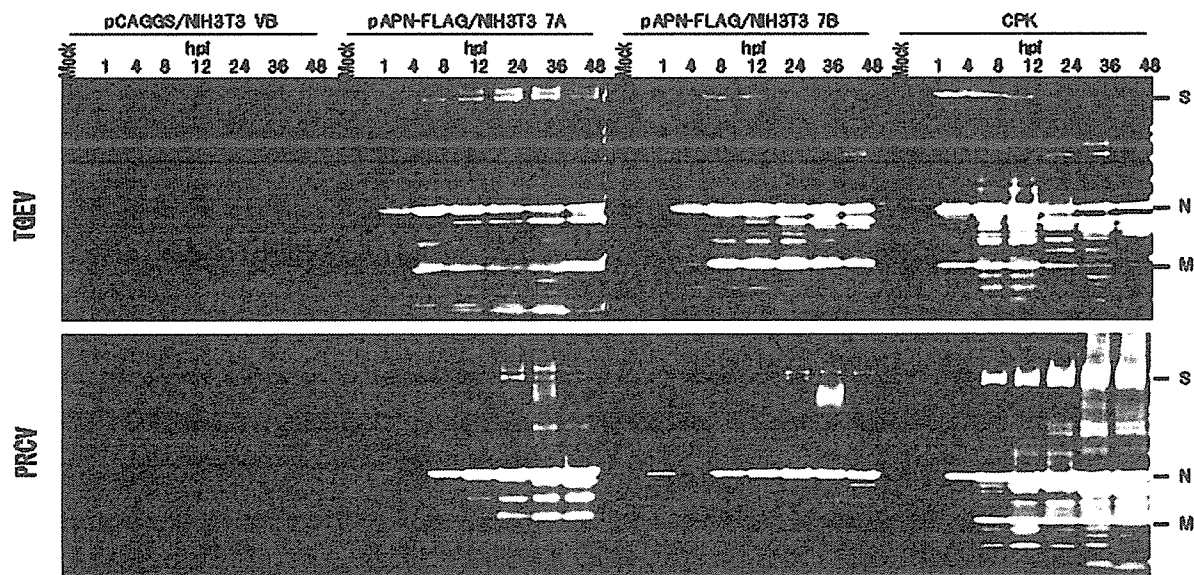


図4 ウェスタンブロット法によるTGEVまたはPRCV接種各細胞株内におけるウイルス蛋白合成の経時的観察。各細胞に $moi=5$ でウイルスを接種後 1, 4, 8, 12, 24, 36, 48時間 で細胞を回収。抗TGEVウサギ血清にてウイルス性蛋白を検出した。