

等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作成

分担研究者 下島 昌幸 東京大学医科学研究所ウイルス感染分野 助教

研究要旨 蚊媒介性感染症の RPA 法による遺伝子検出法の確立には病原体の蚊感染モデルの構築が必要である。そして蛍光蛋白質による病原体感染の検出はこのモデル構築を大いに手助けすると考えられる。本年度は哺乳類の病原体（水疱性口内炎ウイルス）を用い、昆虫での本ウイルスの検出に蛍光蛋白質が有用であるか否か検討した。さらに西ナイル熱ウイルスの遺伝子を入手し、そのレプリコン（蛍光蛋白質遺伝子を含んだ擬似ウイルスゲノムの自己増幅系）の作製に取り組んだ。蛍光蛋白質の有用性を確認でき、またレプリコンの作製に成功した。

A. 研究目的

マラリア、西ナイル熱、デング熱等の蚊媒介性感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、RPA 法による迅速・簡便病原体検出法の確立を目的としている。検出法の確立には確かな感染モデルの構築が必要であり、ウイルスの調製や組換えウイルスの作製を分担した。

本研究の最終目的である RPA 法による病原体検出は遺伝子を検出するものであるが、感染モデルの構築においては別の検出法による感染の有無の判定が望まれる。ウイルスの検出法としてはウイルス遺伝子の（PCR 等による）検出、感染価の測定、ウイルス抗原の検出などが考えられるが、遺伝子操作技術によりマーカー遺伝子を持たせた組換えウイルスの作製が可能であるので、本モデル構築においては蛍光蛋白質（GFP など）の遺伝子を持たせたウイルスの使用がモデル構築を容易にできるのではないかと考えた。感染個体の生死も判定しやすい指標ではあるが、本研究が対象とする病原体の場合は蚊に対しては特別な症状は示さないと考えられるので良い指標にはならない。

まず感染検出のマーカーとしての蛍光蛋白質の有用性を水疱性口内炎ウイルス—ショウジョウバエ実験系で検討し、続いて西ナイル熱ウイルスゲノムの遺伝子操作を行った。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒト胎児腎由来 293T 細胞及びハムスター

腎由来 BHK 細胞は DMEM 培地に非働化ウシ胎児血清及び抗生物質を加えたものを用いて 37°C・5% CO₂ 存在下で培養した。ショウジョウバエ由来 D. Mel-2 細胞は Drosophila-SFM 培地に L グルタミン及び非働化ウシ胎児血清を加えたものを用いて 25°C で培養した。

2. 水疱性口内炎ウイルス (VSV)

GFP 遺伝子を組み込んだ VSV (図 1 参照) は Dr. Mike Whitt らが作製したシュードタイプウイルス (VSV のゲノムを遺伝子操作し、G 蛋白質遺伝子部分を緑色蛍光蛋白質 GFP の遺伝子に置き換えたもの。自立的増殖能を持たない) を用いた (Takada et al., PNAS, 1997)。293T 細胞に VSV の G 蛋白質発現プラスミドを導入し、24 時間後にシュードタイプウイルスを感染させ、更に 24 時間後の培養上清を GFP 組換え VSV として用いた。GFP 組換え VSV の感染価の測定は D. Mel-2 細胞および BHK 細胞を用いて行った。

野生型の VSV は Indiana 株を用い、増殖及び感染価の測定は BHK 細胞を用いて行った。

3. 昆虫感染実験

ショウジョウバエへのウイルスの接種は腹腔内投与により行った。GFP 組換え VSV の感染の判定は蛍光実体顕微鏡を用いて GFP を検出することにより行った。野生型 VSV の増殖は、ウイルス投与個体をリン酸緩衝液 (PBS) 内ですりつぶし、その上清の感染価を BHK 細胞で測定することにより評価した。

4. 西ナイル熱ウイルス

1999年にニューヨークで流行した NY99 株のゲノムの cDNA (4 つに分断されたもの) を Canadian Science Centre for Human and Animal Health より入手し、これをもとにレプリコン (擬似ウイルスゲノムの自己増幅系) の作製を行った。マーカーとしては黄色蛍光蛋白質変異体 Venus を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究に関わる遺伝子組換え実験の承認は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. 昆虫細胞株への GFP 組換え VSV の接種

ショウジョウバエ由来 D. Mel-2 細胞株に GFP 組換え VSV を接種したところ、図 2 に示すように 18 時間後には十分な GFP の発現が観察された。GFP の発現は接種細胞を 30 日以上培養した後も観察された。D. Mel-2 細胞株における GFP 組換え VSV の感染価は 2.95×10^7 IU/ml で、哺乳類細胞株 (BHK 細胞等) での結果と同等であった。

2. 昆虫個体への GFP 組換え VSV の接種

ショウジョウバエの腹腔内に 1×10^4 IU の GFP 組換え VSV を投与したところ、図 3 に示すように 48 時間後には十分な GFP の発現が観察された。GFP の発現は接種 11 日後にも認められた。GFP 組換え VSV 投与によるショウジョウバエの死亡は認められなかった。

3. ショウジョウバエへの野生型 VSV の投与

ショウジョウバエの腹腔内に野生型 VSV を投与したところ、図 4 に示すように 26 PFU/匹の低投与量においても VSV の増殖が認められた。VSV 投与によるショウジョウバエの死亡は 2.6×10^6 PFU/匹の高投与量でも認められなかった。

4. 西ナイル熱ウイルスのレプリコンの作製

分断された cDNA をもとに、西ナイル熱ウイルスの遺伝子をマーカー (蛍光蛋白質 Venus) 遺伝子と共に図 5 に示すように連結した。SP6 プロモーターを用いて RNA を *in vitro* で合成し 293T 細胞に導入したところ、図 6 に示すように 48 時間後にはマーカー蛋白質 (Venus) の十分な発現が認められた。

D. 考察

哺乳類に対する病原体である水疱性口内炎ウイルス (VSV) が昆虫細胞に感染することや、遺伝子操作によってゲノムに組み込んだマーカーが哺乳類細胞での VSV 感染の検出に有用であることは既に知られていた。今回の結果から、VSV が昆虫個体にも感染して増殖でき (研究結果の 3、図 4)、また感染の検出に組み込んだマーカーが昆虫 (細胞) でも有用であること (研究結果の 1、2、図 2、3) が判明した。このことは本研究で対象とする蚊媒介性ウイルス (西ナイル熱ウイルスやデングウイルス) の蚊感染モデルの構築に、ウイルスゲノムへのマーカーの組み込みというものが極めて役立つものとなることを示していると考えられた。

この VSV での結果を踏まえ、本研究で対象としている病原体の一つ、西ナイル熱ウイルスに対し、そのゲノムへのマーカーの組み込みを行い、レプリコンの作製に成功した (研究結果の 4、図 6)。このレプリコンでは西ナイル熱ウイルスの増殖に必須の構造蛋白質 (C-prM および E 蛋白質) を欠損している (図 5 参照) ので、発現プラスミド等によって構造蛋白質を *trans* に供給すれば VSV の場合と同様の感染実験および感染検出が出来ると考えられる。またマーカー遺伝子部分を本来の C-prM-E 遺伝子とすれば野生型の西ナイル熱ウイルスが得られるはずである。さらに、西ナイル熱ウイルスとデングウイルスは同じフラビウイルス科に属するので、同様の方法はデングウイルスに対しても可能なはずである。

本研究の目的とは少し外れるが、GFP 組換え VSV を感染させた昆虫細胞や昆虫個体では予想以上に長期にわたる GFP の発現が認められた (研究結果の 1、2)。このことは VSV の (ゲノムの) 増殖が昆虫の細胞や個体に低 (あるいは無) 傷害であることの結果であると考えられ、昆虫 (細胞) における VSV の蛋白質発現ベクターあるいは遺伝子導入ベクターとしての可能性を示している。また VSV は本来哺乳類に感染するウイルスであるので、一つで昆虫・哺乳類の双方に使えるベクターという言い方もできる。ベクターとしての更なる研究は意味があるかも知れない。

E. 結論

本研究成果により、感染モデルの構築に役立つ組換えあるいは野生型ウイルスの供給がより確実になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

Shimojima M, Ikeda Y, and Kawaoka Y. The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection. J Infect Dis 196 Suppl 2: S259-S263, 2007

下島昌幸 ネコ免疫不全ウイルスの感染指向性に関する研究 ウイルス 第 57 巻第 1 号 p75-82, 2007

2. 学会発表

下島昌幸、河岡義裕 ラッサウイルスの細胞侵入機構 第 55 回日本ウイルス学会（名古屋）2007. 10. 22

下島昌幸、河岡義裕 エボラウイルスおよびラッサウイルスに共通する細胞侵入機構 第 30 回日本分子生物学会（横浜）2007. 12. 15

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

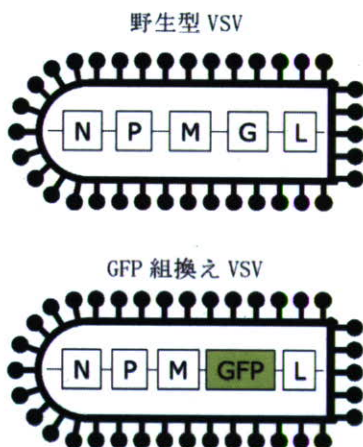
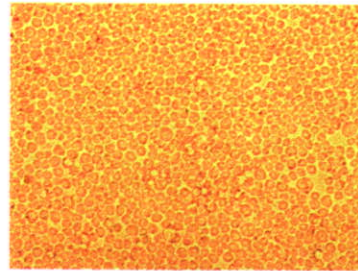


図 1：水疱性口内炎ウイルス（VSV）の模式図
（上）野生型 VSV。N、P、M、G、L は VSV が持つ遺伝子を示す。G 遺伝子は VSV の表面に存在する糖蛋白質 G 蛋白質をコードしている。
（下）GFP 組換え VSV。VSV の G 遺伝子を遺伝子操作により緑色蛍光蛋白質 GFP の遺伝子に置き換えたもの。この VSV に感染した細胞では GFP が他のウイルス蛋白質とともに発現すると考えられる。このウイルスの増殖は G 蛋白質を発現プラスミド等で trans に供給して行う。

明視野



暗視野



図 2：昆虫細胞への GFP 組換え VSV の感染
GFP 組換え VSV をショウジョウバエ由来 D. Mel-2 に接種し、18 時間後に接種細胞を蛍光顕微鏡で撮影した。



図 3：昆虫個体への GFP 組換え VSV の接種
ショウジョウバエの腹腔内に 1×10^4 IU の GFP 組換え VSV を投与し、48 時間後にショウジョウバエを蛍光実体顕微鏡で撮影した。

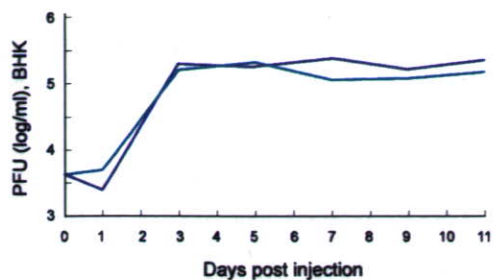
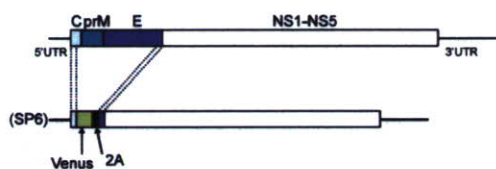


図4：ショウジョウバエにおける野生型 VSV の増殖

腹腔内に野生型 VSV を 26 PFU 投与し (day 0)、横軸で示した接種日後にショウジョウバエ体内の VSV の感染価を測定した。一点は 10 匹分の VSV 量より求め、実験を 2 度行なった。

図5：西ナイル熱ウイルスのゲノムの模式図

(上) 野生型の西ナイル熱ウイルスのゲノム構造。プラス鎖の RNA であり、構造蛋白質



(C, prM, E) および非構造蛋白質 (NS1-NS5) をコードしている。UTR は非翻訳領域を示す。

(下) 蛍光蛋白質 Venus の遺伝子を組み込んだ擬似ウイルスゲノム。2A は Foot-Mouse disease virus の 2A プロテアーゼの遺伝子。この擬似ゲノムは mRNA として機能し、Venus 蛋白質を他のウイルス蛋白質とともに産生させる。またこのゲノムは NS1-NS5 蛋白質の作用によりレプリコンとして自己複製される。

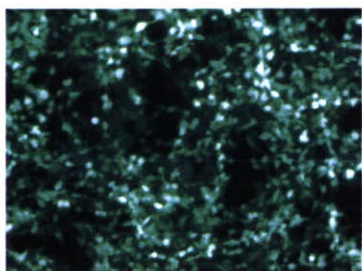


図6：西ナイル熱ウイルスのレプリコン

図5の下に示した RNA を合成し、293T 細胞に導入し、48 時間後に RNA 導入 293T 細胞を蛍光顕微鏡により撮影した。

等温遺伝子増幅産物の検出に向けたイムノクロマト・ストリップ作成法の確立

分担研究者 平田 晴之 東京大学大学院 医学系研究科 疾患生命工学センター 助教

研究要旨 マラリア、西ナイル熱、デング熱などの蚊媒介性の感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、RPA 法による迅速・簡便病原体検出法の確立を目的とした。分担研究者は RPA 法により増幅された増幅産物を目視により判定が可能であるイムノクロマト法開発のため、既存の病原体組換えタンパク質を用いてイムノクロマト・ストリップの作成、目視による判定などの検討を行った。本研究により、病原体組換えタンパク質を抗原としたストリップを作成することに成功し、増幅遺伝子を用いた病原体検出法の応用への基礎データを得ることができた。

A. 研究目的

現在、酵素免疫測定法 (ELISA) を代表とする免疫学的診断法の多くは野外での利用は特殊な設備の必要性など容易なことではない。病原体流行地においては大量のサンプル、及び広大なエリアを診断するために、迅速かつ簡便な病原体検出法が必要である。最近の研究において、迅速・簡便な診断法として、イムノクロマト・ストリップを用いてマラリア原虫、クリプトスポリディウム、あるいはリーシュマニアの診断法の開発が報告されている。これらの報告は病原体を予め固相化したストリップに感染血清を用いて病原体を検出する方法であるがサンプルの量、反応条件、感染血清中の抗体価によって判定が非常困難となることが短所である。本研究における RPA 法により増幅された増幅産物を目視により判定可能であるイムノクロマト法開発をすることによって、病原体を直接的に検出することを意味しており、RPA 法による増幅産物のコピー数が少なくても検出可能である。また、増幅遺伝子の長期保存であり本イムノクロマト・ストリップの開発は感染症の早期発見、本邦への侵入防除に寄与するものと考えられる。

そこで、研究分担者は準備基盤の確立を目的として既存の病原体組換えタンパク質を用いたイムノクロマト・ストリップの作成、目視による判定および検討を行った。

B. 研究方法

1. *Babesia equi* Be82/236-381 遺伝子の大

腸菌を用いた組換えタンパク質の精製

既に報告されているウマピロプラズマ病の病原体である *Babesia equi* (*B. equi*) の Be82/236-381 遺伝子 (H. Hirata et. al., Journal of Clinical Microbiology, 2003) を用いて、この遺伝子発現組換えタンパク質 GST/ Be82/236-381 を 50 μ g/ml 精製した。

2. GST/ Be82/236-381 タンパク質の金コロイド粒子を結合させる最適 pH の検討

金コロイド粒子 (British BioCell International) (赤色) と GST/ Be82/236-381 タンパク質の最適 pH の検討を行った。GST/ Be82/236-381 を pH 5.6、pH 5.8、及び pH 6.2 に調整した緩衝液で金コロイド粒子と GST/ Be82/236-381 タンパク質を結合させ、結合に最適 pH の検討を行った。

3. GST/ Be82/236-381 タンパク質と結合させる金コロイド粒子サイズの検討

一般的に金コロイド粒子の粒径が大きいほど目視しやすいが非特異反応が出やすい、一方粒径が小さいものは非特異反応が出にくいが目視による判定が困難になる。そこで金コロイド粒子のサイズを 20 nm と 50 nm の 2 種類の粒径を用意し、それぞれ最適 pH の条件下で GST/ Be82/236-381 と結合させ最適な金コロイド粒子の粒径を検討した。

3. イムノクロマト・ストリップの作成

ストリップは以下の図1に示したように作成した。

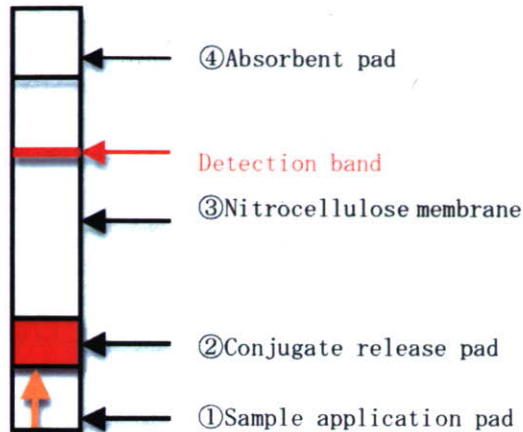


図1 [上図の説明]

- ① サンプルを入れるフィルターでサンプル中に含まれる大きい分子を取り除く役割がある。
- ② 上記方法2の最適 pH で作製した GST/Be82/236-381 タンパク質と金コロイド粒子の結合タンパク質をグラスファイバーパッド (Schleicher & Schuell) に染みこませて乾燥させたパッドを作製した。
- ③ ニトロセルロースメンブレン (Schleicher & Schuell) に上記方法1で作製・精製した組換えタンパク質 GST/ Be82/236-381 タンパク質を 500 μ l (1mg/ml) BioDot's BioJet 3050 quanti dispenser (BioDot Inc.) を用いて検出バンドとして最適 pH に調整し 1mm 固相化を行った。検出バンドを固相化させたニトロセルロースメンブレンは 0.5% カゼイン含 50 mM ホウ酸緩衝液により 30 分 50 $^{\circ}$ C でブロッキングを行い、さらに洗浄液 (0.5% sucrose、50 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.05% cholanic acids) で 3 回洗浄を行った。
- ④ ①でアプライしたサンプルの残液を吸収するパッド (Schleicher & Schuell)

以上、①から④のパッドをプラスチックプレートにそれぞれテープで貼り付け 5 mm 幅に

カットした。作製したイムノクロマト・ストリップは使用するまで乾燥剤をいれて室温にて保存した。

4. イムノクロマト・ストリップを用いた *B. equi* 感染馬の検出

上記3で作製したイムノクロマト・ストリップを *B. equi* 感染血清を用いた検出の評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は病原体検出法の確立を目指すものであり、特段の倫理上の配慮事項を含まない。

C. 研究結果

1. *B. equi* Be82/236-381 遺伝子の大腸菌を用いた組換えタンパク質の精製と精製タンパク質の原虫由来タンパク質であることの確認

Be82/236-381 遺伝子が大腸菌によって発現させ精製した。精製したタンパク質は SDS-PAGE によって分子量を確認し、ウェスタンブロット法によって *B. equi* 由来の遺伝子であることを確認した。

2. GST/ Be82/236-381 タンパク質の金コロイド粒子を結合させる最適 pH の決定

GST/ Be82/236-381 タンパク質の金コロイド粒子 (粒径サイズ 20 nm) を pH5.6、pH5.8 及び pH6.2 に調整した緩衝液で結合させ、イムノクロマト・ストリップ、*B. equi* 感染馬血清及び非感染馬血清を用いて評価した (図2)。

その結果、pH6.2 で調整した緩衝液では *B. equi* 感染血清で検出バンドが認められ、非感染血清では反応が認められなかった。しかしながら、pH5.8 で調整した緩衝液では感染血清および非感染血清共に検出バンドは認められ、pH5.6 で調整した緩衝液では感染血清および非感染血清共に検出バンドは認められなかった。以上の結果より、GST/ Be82/236-381 タンパク質の金コロイド粒子を結合させる最適 pH は pH6.2 の緩衝液を利用することに決定した。

3. GST/ Be82/236-381 タンパク質と結合させる金コロイド粒子サイズの決定

金コロイド粒子のサイズを 20 nm と 50 nm の 2 種類の粒径を用意し、それぞれ最適 pH6.2 緩衝液の条件下で GST/ Be82/236-381 と結合させ、イムノクロマト・ストリップ、*B. equi*

感染馬血清及び非感染馬血清を用いて評価した(図 3)。その結果、金コロイド粒子の粒径が 20 nm において、*B. equi* 感染血清で検出バンドが認められ、非感染血清では反応が認められなかった。しかしながら、金コロイド粒子の粒径が 50 nm において、感染血清および非感染血清共に検出バンドは認められた。以上の結果より、*B. equi* 感染馬の検出に有用な金コロイド粒子粒径を 20 nm を利用することに決定した。

3. 最適条件下でのイムノクロマト・ストリップを用いた検出

研究成果 1, 2 の結果から、GST/Be82/236-381 タンパク質の金コロイド粒子を結合させる最適 pH6.2、結合させる金コロイド粒子の粒径を 20 nm としてイムノクロマト・ストリップを作製した。このストリップの *B. equi* 感染馬血清及び非感染馬血清を用いた評価を行った(図 4)。

この結果より、感染馬血清を有用に検出する可能であることを確認した。

D. 考察

研究分担者は準備基盤の確立を目的として既存の病原体組換えタンパク質を用いたイムノクロマト・ストリップの作成、目視による判定および検討を行った。本研究における反応の検討課題として、タンパク質と金コロイドの結合パットの色が鮮明な赤色ではなく濃い紫色である。このことは結合が不十分であるために凝集反応を起こしていると考えられる。このことより、さらに詳細な条件検討が必要であり、増幅遺伝子の検出の場合での検討事項でもある。

E. 結論

本研究により、イムノクロマト・ストリップ法を利用した増幅遺伝子を用いた病原体検出法の応用への基礎データを得ることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sasaki M, Omobowale O, Tozuka M, Ohta K, Matsuu A, Nottidge HO, Hirata H, Ikadai H, and Oyamada T. Molecular survey of *Babesia canis* in dogs in Nigeria. J Vet Med Sci

69(11): 1191-1193, 2007

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

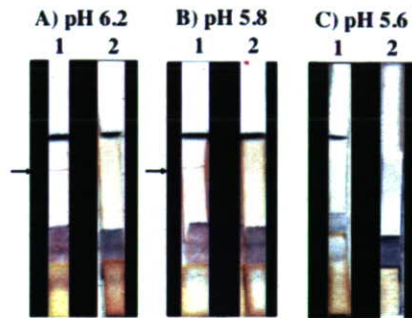


図2 バベシア原虫感染馬血清を用いたイムノクロマト・ストリップ評価 (pH 評価)
GST 融合 Be82 タンパク質の金コロイド粒子 (粒径サイズ 20 nm) を pH5.6, pH5.8 及び pH6.2 に調整した緩衝液で結合させ、イムノクロマト・ストリップ、*B. equi* 感染馬血清及び非感染馬血清を用いて評価した。レーン 1 はバベシア原虫感染馬血清、レーン 2 は非感染馬血清、矢印は陽性バンドを示す。

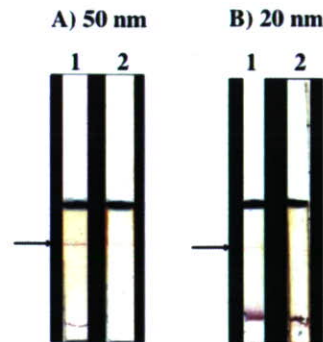


図3 バベシア原虫感染馬血清を用いたイムノクロマト・ストリップ評価 (金コロイド粒子評価)

金コロイド粒子のサイズを 20 nm と 50 nm の 2 種類の粒径を用意し、それぞれ最適 pH6.2 緩衝液の条件下で GST 融合 Be82 タンパク質と結合させ、イムノクロマト・ストリップ、*B. equi* 感染馬血清及び非感染馬血清を用いて評価した。1 はバベシア原虫感染馬血清、レー

ン2は非感染馬血清、矢印は陽性バンドを示す。



図4 バベシア原虫感染馬血清を用いたイムノクロマト・ストリップ評価（至適条件下）GST融合Be82タンパク質の金コロイド粒子を結合させる最適 pH6.2、結合させる金コロイド粒子の粒径を 20 nm としてイムノクロマト・ストリップを作製した。このストリップの *B. equi* 感染馬血清及び非感染馬血清を用いた評価を行った。1はバベシア原虫感染馬血清、レーン2は非感染馬血清、矢印は陽性バンドを示す。

[外国の研究機関等への委託事業]
(新興・再興感染症研究推進事業)

委託成果報告書

1. 委託申込書

所属機関職名 : 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授
氏 名 : 嘉糠 洋陸

2. 委託実施者

所属・職名 (和文) : 国立マラリア研究・研修センター・ユニット長 (Ph. D.)
(英文) : Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme
氏 名 (和文) : ヌファーレ サグノン
(英文) : N'Fale Sagnon

3. 委託期間 : 平成19年10月1日～平成20年3月31日 (183日間)

4. 委託課題 : ブルキナファソ地域における熱帯熱マラリア原虫保有ハマダラカの
サンプル収集及び病原体検出の準備研究

5. 委託の成果

上記2の機関に「ブルキナファソ地域における熱帯熱マラリア原虫保有ハマダラカのサンプル収集及び病原体検出の準備研究に関する研究」について委託した結果、以下に示す成果を得ることに成功した。

マラリア、西ナイル熱、デング熱等の蚊媒介性の再興感染症は世界的に大きな脅威となっている。本委託研究では、これらの感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、単一温度遺伝子増幅法による迅速・簡便病原体検出法の確立へ向けた準備研究として、熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) 流行地域におけるハマダラカ (*Anopheles gambiae*) のサンプリングを実施した。このマラリア原虫を有する媒介蚊の入手は通常極めて困難であるため、西アフリカ・ブルキナファソ国において、実際の流行地域から蚊の採集をおこなった。それらのサンプル群をベースに、病原体検出のためのDNAテンプレート・ライブラリーとして確保し、単一温度遺伝子増幅法による病原体検出法の開発の準備基盤を構築することに成功した。

本委託研究では、ブルキナファソ地域における熱帯熱マラリア原虫保有ハマダラカのサンプル収集を中心に、病原体検出法開発の準備研究を目指すものである。主任研究者 (嘉糠洋陸 : 帯広畜産大学原虫病研究センター) と、西アフリカ・ブルキナファソ国にある国立

マラリア研究・研修センター（研究委託実施者：ヌファーレ・サグノン・分子生物学ユニット長）が協力し、本研究を実施した。委託内容は、以下の各ステップに則り遂行された。

（１）ブルキナファソ国内の熱帯熱マラリア流行地域における、ハマダラカ（*Anopheles gambiae*）の定点採集、（２）採集したハマダラカの解剖および熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）の観察・評価、（３）解剖後の蚊サンプルの不活性化および採集地域とそれらの地域における prevalence にもとづく分類、（４）蚊サンプルの安全かつ迅速な日本への輸送、および（５）DNA テンプレート・ライブラリーの作成、の５段階に分類した。蚊の採集に当たっては CDC トラップを主に利用し、効率的かつ多岐に渡るサンプル収集を試みた。今回の採集にあたり、調査はその目的には含まれず、単一温度遺伝子増幅法による迅速・簡便病原体検出法に向けた DNA 試料の確保が最優先事項であることから、大規模な個体数の収集よりも、多点捕獲によるサンプルの多様性の維持に重点を置いた。ハマダラカの収集には、現地機関の常勤および臨時職員を雇用して動員し、蚊体内におけるマラリア原虫数の評価まで国立マラリア研究・研修センターに完全に委託した。蚊サンプルからの DNA 抽出および DNA テンプレート・ライブラリーの作成については、主任研究者および研究分担者が現地に赴き、確実な技術指導および作成試料の運搬を担当した。

主任研究者が展開する研究課題では、その試料として熱帯熱マラリア原虫を媒介するハマダラカが必須である。ハマダラカ（*Anopheles gambiae*）は、西アフリカ・中央アフリカ・東アフリカの限られた地域に分布し、委託研究機関であるブルキナファソ国・国立マラリア研究・研修センターは、そのハマダラカを扱った研究において熟練した技術と経験を有している。研究委託実施者であるヌファーレ・サグノン博士（分子生物学ユニット長）は、これまでに「ハマダラカにおける病原体の相互作用に関する研究」を主任研究者と共同で展開しており、相方の研究協力体制が既に構築されている。

マラリアはハマダラカによって媒介される感染症であり、熱帯、亜熱帯地域の 70 ヶ国以上に分布している。全世界で年間 3～5 億人、累計で約 8 億人の患者、100～150 万人の死者があると報告されている。日本ではかつて土着マラリアが存在したが、現在では絶滅している。しかし海外から帰国した人が感染した例（いわゆる輸入感染症）が年間 100 例以上ある。また、熱帯熱マラリアが増加傾向にある。もっとも影響が甚大な地域はサハラ砂漠以南のアフリカ諸国であり、ブルキナファソにおけるマラリアは、保健医療施設での死亡原因の 45.8% を占め重大な死亡要因となっている。ブルキナファソは、西アフリカに位置し、総人口が 1,360 万人（2006 年）で、一人当たり GNI（国民総所得）は 460 米ドル（2006 年）である。

ブルキナファソ地域において、熱帯熱マラリアの流行がある村落三カ所（Balonguen 村・Koubri 村・Monomtenga 村）を蚊サンプル採集場所として設定した。その理由として、主だった媒介蚊である *Anopheles gambiae* について、その遺伝子型が S 型（Balonguen 村）、M 型（Koubri 村）、S 型と M 型の混成（Monomtenga 村）と異なるパターンに分類されるからである。一般的に、ハマダラカのマラリア原虫伝播効率において、S 型は高く、M 型は低いことが明らかとなっている。すなわち、マラリア原虫保有率の異なる蚊サンプルの採集が

期待された。委託実施期間中に、各村落において定点採集を実施した結果、総計約 4000 個体の雌ハマダラカを得た。このうち、マラリア原虫が発現する CSP タンパク質に対する抗体を用いて、ELISA 法によるマラリア原虫数の測定・評価をおこなった。各群からそれぞれお 409 匹 (Balonguen 村)、1090 匹 (Koubri 村)、および 372 匹 (Monomtenga 村) の雌ハマダラカを無作為に抽出し、細胞溶解液を調整、ELISA 反応に供した。その結果、Balonguen 村では 10-27%、Koubri 村では 0-11%、Monomtenga 村では 0-25% のマラリア原虫陽性ハマダラカが存在することが明らかとなった (数値の範囲は採集時期による個体群の差異を示す)。この採集の一部には、主任研究者 (嘉糠洋陸: 帯広畜産大学原虫病研究センター) および研究分担者 (福本晋也: 同所属) が参加し、委託研究の実施状況視察ならびに技術指導、研究打ち合わせをおこなった。

以上の過程によって得られた蚊サンプルは、乾燥による蚊および内部マラリア原虫の不活化の後、プラスチックチューブにシリカゲルとともに厳重に封入し、委託実施機関名による研究材料譲渡書を携え、主任研究者と研究分担者が航路にて運搬を担当した。これらの蚊サンプルは、現在帯広畜産大学原虫病研究センターにて管理・保管中である。現在、これらの各蚊サンプルからの DNA 抽出を継続的に実施しており、DNA テンプレート・ライブラリーとして実験に供与する。

外国の研究機関に委託したことによって得られたこれらの成果は、以下のように実施中の研究に反映されると考える。病原体としての熱帯熱マラリア原虫に加え、媒介蚊であるハマダラカは、それぞれ国内の複数研究機関で維持され、実験に供与されている。しかし、安全確保を熟慮した道義的問題から、熱帯熱マラリア原虫のハマダラカへの導入実験は、極めて困難であることは自明である。主任研究者の研究課題は、「蚊」体内における「病原体」の“検出・診断”を試みるものであり、国内では入手不可能な「蚊+病原体」サンプルの重要性は高い。そこで、本研究委託により、西アフリカ地域のマラリア流行国にある現地研究グループと協力し、実際に熱帯熱マラリア原虫を有するハマダラカをサンプルとして入手することに成功した今回の成果は、病原体媒介節足動物における迅速・簡便診断法の開発を強力に推進することが期待される。この委託研究により構築される DNA テンプレート・ライブラリーは、主任研究者の研究課題である「RPA 法による迅速・簡便病原体検出法の確立」において、実際の病原体を検出する際の極めて有用なマテリアルとして供与され、研究の実質的推進に大いに寄与すると考えられる。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

The Mechanism of Axl-Mediated Ebola Virus Infection

Masayuki Shimojima,^{1,3} Yasuhiro Ikeda,⁴ and Yoshihiro Kawaoka^{1,2,3,5}

¹Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, and ²International Research Center for Infectious Diseases, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, and ³Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan; ⁴Molecular Medicine Program, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, Minnesota; ⁵Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison

We previously reported that expression of the receptor-type tyrosine kinase Axl, which regulates cell survival and activation, enhances both pseudotype and live Ebola virus (EBOV) infection. To clarify the mechanistic basis of this enhancement, we created a series of Axl mutants and identified amino acids/domains necessary for this function, by using a pseudotype virus carrying the EBOV glycoprotein (GP). Analyses of the Axl mutants showed the importance of extracellular and intracellular regions for Axl functions, including ligand binding and signal transduction, in EBOV GP-mediated infection. These data suggest that EBOV uses the physiological functions of Axl to enter cells.

Ebola virus (EBOV), a member of the family *Filoviridae*, causes severe hemorrhagic fever in humans and non-human primates [1]. The virus can be detected in virtually all organs of infected primates [1]. Furthermore, pseudotype viruses carrying EBOV glycoproteins (GPs)—the only surface protein of the virus that mediates viral attachment and entry into cells—infect many types of cells in vitro [2, 3]. Thus, EBOV has broad cell tropism. Several cell surface molecules, including calcium-dependent lectins [4, 5] and $\beta 1$ integrin [6], have been shown to be involved in EBOV infection, but these molecules do not fully account for

this broad cell tropism. Recently, we found that the Tyro3 family members—the receptor-type tyrosine kinases (RTKs) Axl, Dtk, and Mer—are involved in EBOV cell entry [7]. Their ectopic expression in lymphocytes, which normally are highly resistant to EBOV infection, enhances EBOV GP-mediated infection [7]. In general, ligand binding to the extracellular domain of RTK activates the intracellular tyrosine kinase, resulting in cytoplasmic signal transduction and in endocytosis to reduce the levels of cell surface expression of RTKs. The Axl RTK has a number of cell-type-specific roles, including growth induction of and antiapoptotic effects on endothelial cells, the activation of platelets, and the deactivation of antigen-presenting cells [8–11].

To further understand the role of Axl in EBOV cell entry, we introduced a series of deletions/mutations into the Axl molecule and assessed their effects on infection of a pseudotype virus carrying EBOV GP. The results suggest that EBOV activates Axl to enter cells through endocytosis.

MATERIALS AND METHODS

Cells and pseudotype virus. 293T and Jurkat cells were cultured as described elsewhere [7]. HIV-based pseudotype virus carrying EBOV GP was prepared by triple transfection of the following plasmids into 293T

Potential conflicts of interest: none reported.

Presented in part: *Filoviruses: Recent Advances and Future Challenges*, International Centre for Infectious Diseases Symposium, Winnipeg, Manitoba, Canada, 17–19 September 2006 (poster 25).

Financial support: Core Research for Evolutional Science and Technology Agency of the Japan Science and Technology Agency; Japanese Ministry of Education, Culture, Sports Science and Technology; Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare; National Institutes of Health (NIH)/National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (Public Health Service research grant); NIH/NIAID Regional Center of Excellence for Biodefense and Emerging Infectious Diseases Research Program. Supplement sponsorship is detailed in the Acknowledgments.

Reprints or correspondence: Dr. Yoshihiro Kawaoka, Div. of Virology, Dept. of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639 (kawaoka@ims.u-tokyo.ac.jp).

The Journal of Infectious Diseases 2007;196:S259–63

© 2007 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2007/19610S2-0021\$15.00

DOI: 10.1086/520594

cells: pCAGGS-EBOVGP, p8.9QV, and pHR-SIN-CSGW. pCAGGS-EBOVGP is an expression plasmid for EBOV GP (Zaire EBOV '76 Mayinga); p8.9QV provides the structural proteins, except envelope, of HIV; and pHR-SIN-CSGW provides RNA for an HIV-packaging signal, as well as the enhanced green fluorescence protein gene (*EGFP*) under the internal spleen focus-forming virus U3 promoter. Three days after transfection, culture supernatants were collected, clarified through 0.45- μ m filters, and then stored at -80°C until use.

Axl mutants. cDNAs encoding mutant Axl were obtained by polymerase chain reaction-based mutagenesis and were then used to replace the *EGFP* gene in pHR-SIN-CSGW. In some mutants, 9 consecutive amino acids (GQAQPVHQL) present between the fibronectin type III (FN) and transmembrane (TM) domains of Axl were replaced with a hemagglutinin (HA) tag (YPYDVPDYA), to detect their cell surface expression by flow cytometry. Because deletion of this 9-aa sequence within Axl has been observed during RNA splicing and seems to have no effect on Axl function [8], we considered it unlikely that its replacement with the HA tag or its deletion would affect the enhancing effect of Axl on EBOV GP-mediated infection. Feline CD2 (fCD2) cDNA was used as a negative control [12]. To obtain HIV vectors for the expression of Axl mutants or fCD2, pHR-SIN-CSGW was transfected with p8.9QV and the vesicular stomatitis virus G protein-expression plasmid pMD-G into 293T cells. Jurkat cells were incubated with the HIV vectors for 2 days and then used for further analyses.

Flow cytometry. Cell surface expression of Axl mutants was analyzed by flow cytometry as described elsewhere [7]. Anti-Axl (R&D Systems) and anti-HA tag (Sigma) monoclonal antibodies were used as primary antibodies.

Infection of Jurkat cells with EBOV GP pseudotype virus. Jurkat cells (4×10^5 cells/mL) were inoculated with 200 μ L of pseudotype virus carrying EBOV GP; 2 days later, EGFP-expressing cells were counted by use of a fluorescent microscope (TE300; Nikon). For the inhibitory experiments, cells were suspended in culture medium containing ammonium chloride (Wako), CA-074 methyl ester (Sigma), or E-64d, (Sigma), and the final concentration of dimethyl sulfoxide (vehicle; Wako) was adjusted to 0.1%.

Statistical analysis. Student's *t* test was used to measure differences between sample means.

RESULTS AND DISCUSSION

Expression of Axl mutants. The Axl mutants constructed in this study are illustrated in figure 1A. Each mutant was designated as shown at the top of the figure. Flow-cytometric analysis with anti-Axl or anti-HA tag antibodies revealed the cell surface expression of each mutant (figure 1B–1D). The

expression of Axl1D, Axl1e9R, and AxlP5 was 3–4 times higher than that of the other mutants (figure 1C and 1D).

Effects of extracellular mutations of Axl on EBOV GP-mediated infection. When cells expressing Axl mutants were infected with the pseudotype virus carrying EBOV GP, the susceptibility of AxlHA-expressing cells was similar to that of intact Axl-expressing cells (data not shown), indicating that the region between the FN and TM domains was not important for Axl enhancement of EBOV GP-mediated infection. Our previous finding that pretreatment of Axl-expressing cells with a ligand for Axl (Gas6) decreased the enhancing effect of Axl on EBOV GP-mediated infection [7] suggested that the ligand-binding domains of Axl, the 2 immunoglobulin domains [13], play important roles in the enhancement. Therefore, we deleted the first immunoglobulin domain from Axl (Axl1e1D; figure 1A) and found that the deletion reduced the susceptibility of cells to the pseudotype virus carrying EBOV GP to the level observed in control molecule-transduced cells (figure 2A). To test whether the immunoglobulin domains were sufficient for the enhancement of viral infection, 2 Axl mutants were constructed: Axl1D, which has only the first immunoglobulin domain, and Axl1D2D, which has only the 2 immunoglobulin domains in the extracellular regions (figure 1A). The infectivity of the pseudotype virus carrying EBOV GP was higher in cells expressing these mutant Axls than in control molecule-transduced cells but lower than that in AxlHA-expressing cells (figure 2A). These results indicated that the ligand-binding domains in the extracellular region of Axl were important for the enhancement EBOV GP-mediated infection, although the FN domains may have a supportive role.

Sasaki et al. [13] reported that a point mutation (E \rightarrow R) at aa 59 in the first immunoglobulin domain of Axl dramatically reduced ligand binding. E59 interacts with a Gas6 ligand [13]. Therefore, we constructed a mutant Axl (AxlE59R; figure 1A) with the same point mutation and measured the virus titer in AxlE59R-expressing cells. The infectivity of the pseudotype virus carrying EBOV GP was similar between AxlE59R- and AxlHA-expressing cells (figure 2A). Pretreatment of cells with the Gas6 ligand (5 μ g/mL for 30 min at room temperature) reduced the virus titer in AxlHA-expressing cells, as reported elsewhere [7], but not in AxlE59R-expressing cells (figure 2B). These findings indicated that the region required for enhanced EBOV GP-mediated infection overlaps the ligand-binding region, but the specific amino acid(s) required for the enhancement are not identical to those for the ligand binding.

Effects of intracellular mutations of Axl on EBOV GP-mediated infection. The binding of the Gas6 ligand down-regulates Axl expression to control the duration and intensity of Axl-mediated signaling [9]. This signaling pathway involves ligand-induced internalization by endocytosis, and phospho-

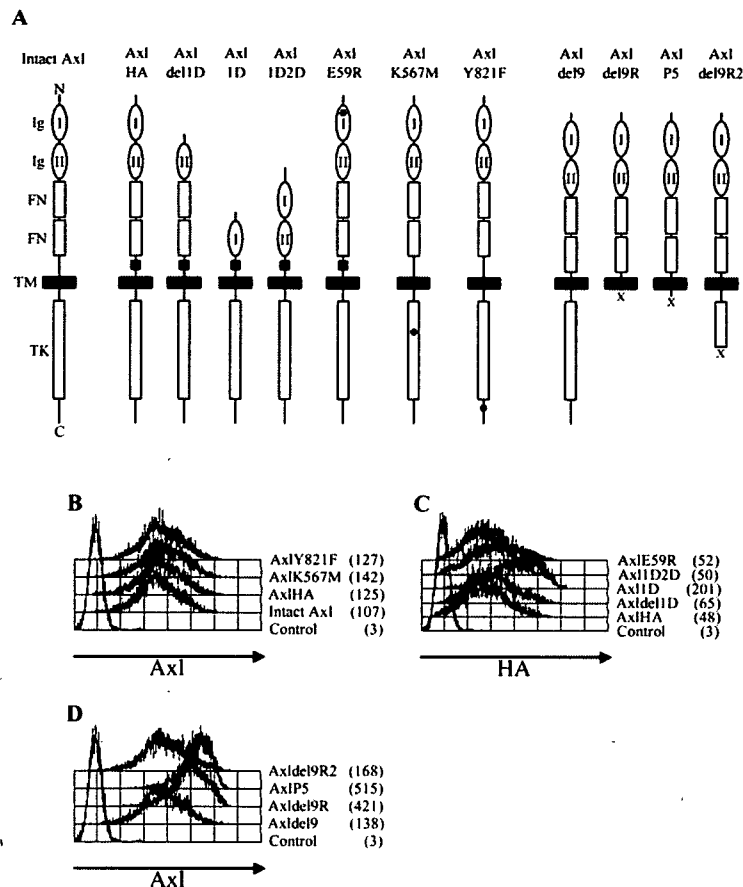


Figure 1. Schematic diagrams of the Axl mutants (A) and their cell surface expression (B–D). A, The left-most schematic of panel A is intact Axl. Black squares (■) denote hemagglutinin (HA) tags, black circles (●) denote point mutations, and X denotes an artificial stop codon. C, C-terminus; FN, fibronectin type III domain; Ig, immunoglobulin domain; N, N-terminus; TK, thymidine kinase domain; TM, transmembrane domain. B, Flow-cytometric analysis of intact Axl, AxlHA, AxlK567M, and AxlY821F expression in Jurkat cells, as detected with an anti-Axl antibody. C, Detection of AxlHA, Axl del11D, Axl1D, Axl1D2D, and AxlE59R expression with an anti-HA tag antibody. D, Detection of Axl del9, Axl del9R, AxlP5, and Axl del9R2 expression with an anti-Axl antibody. Nos. in parentheses are mean fluorescence intensity values.

rylation of the intracellular region of Axl plays an important role [9]. Several amino acid residues are involved in the phosphorylation of Axl [14]. To test whether Axl phosphorylation is important to EBOV GP-mediated viral infection, 2 point mutations, K→M at aa 567 and Y→F at aa 821, were introduced in Axl (AxlK567M and AxlY821F, respectively; figure 1A). The K567M mutation is known to destroy an ATP-binding site and to inhibit Axl phosphorylation, and Y821 is a major target for phosphorylation [14]. We found that the susceptibility of AxlK567M-expressing cells to the pseudotype virus carrying EBOV GP was similar to that of control molecule-transduced cells (figure 2C). The AxlY821F mutant, by contrast, moderately enhanced viral infection (figure 2C). These results indicate the importance of K567 and the involvement of Y821 in Axl enhancement of EBOV GP-mediated infection.

This finding, however, is not consistent with our previous finding that a simian Axl clone (P5) lacking most of the intracellular region, including both K567 and Y821, enhances viral infection [7]. To resolve this discrepancy, we constructed additional Axl mutants. Because the above-described P5 clone is of simian origin and lacks the 9-aa sequence proximal to the cellular TM domain present in human Axl, we constructed a human counterpart that lacks the 9-aa sequence and has a stop codon at aa 507 (AxlP5; figure 1A). We also prepared 3 other mutants: Axl del9, which lacks only the 9-aa sequence; Axl del9R, which lacks the 9-aa sequence and has a stop codon at aa 476; and Axl del9R2, which lacks the 9-aa sequence and has a stop codon at aa 615 (figure 1A). The deletion of the 9 aa had no significant effect on Axl enhancement (compare figure 2C and 2D). The virus titer in AxlP5-expressing cells was slightly, but

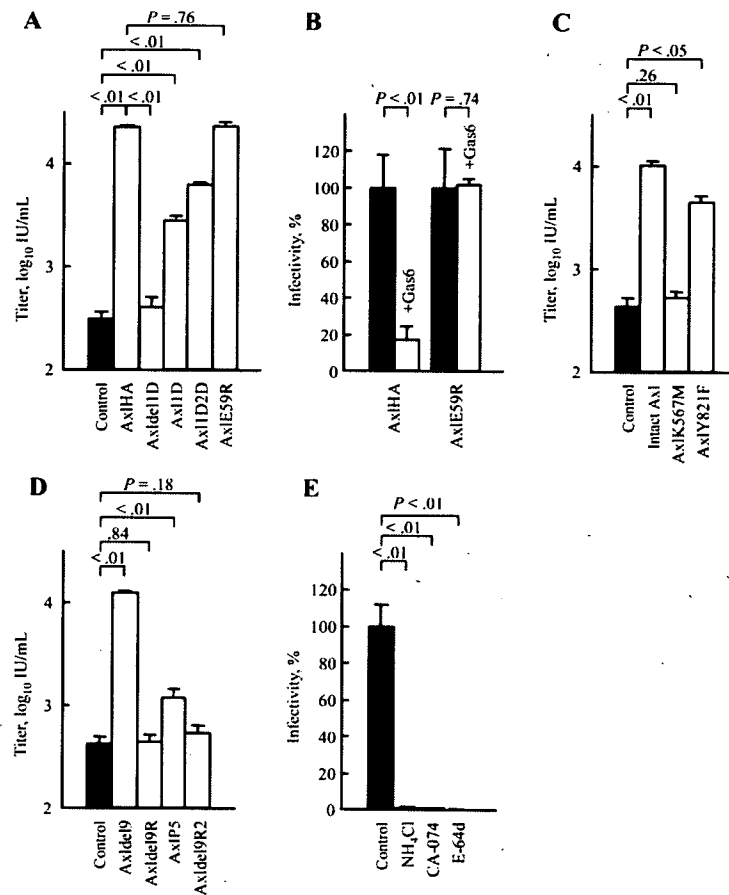


Figure 2. Susceptibility of Axl mutant-expressing cells to an HIV-based pseudotype virus carrying Ebola virus glycoprotein. *A, C, and D*, Cells infected with the pseudotype virus. Two days later, enhanced green fluorescence protein (EGFP)-expressing cells were counted (EGFP is a reporter of the virus). Results shown are virus titers. Data are mean \pm SD ($n = 3$). IU, infectious unit. *B*, Cells treated with a ligand for Axl (Gas6) or untreated and then infected with the pseudotype virus. EGFP-expressing cells were counted 2 days later, and the percentage infectivity was calculated as follows: (no. of EGFP-positive cells among Gas6-treated cells)/(no. of EGFP-positive cells among untreated cells) \times 100. *E*, Intact Axl-expressing cells infected with the pseudotype virus in the presence of ammonium chloride (NH₄Cl), CA-074, and E-64d. The percentage infectivity was assessed as described for panel B. Data are mean \pm SD ($n = 3$). A Student's *t* test was performed.

appreciably, higher than that in control cells (figure 2D). The expression of Ax1del9R and Ax1del9R2 had no or negligible enhancing effect on virus titers (figure 2D). Flow cytometry revealed increased expression of Ax1P5 and Ax1del9R in cells, compared with that of Ax1del9 and Ax1del9R2 (figure 1D). A similar increase in simian P5 expression had been observed [7].

Thus, the enhancing effect of EBOV GP-mediated infection by the simian clone (and Ax1P5) seemed to originate from the increased expression of Axl containing an intracellular region of aa 476–506. The enhancing effect observed in Ax1ID-expressing cells (figure 2A) might also be due, in part, to this same mechanism (i.e., the increased expression of the molecule). In Axl-positive adherent cell lines (e.g., Vero E6, a cell line highly susceptible to wild-type EBOV infection), however,

such an enhancing mechanism seems to be unlikely, because Axl expression levels in adherent cells are not as high as those in, for example, Ax1P5-expressing Jurkat cells [7]. Furthermore, the extent of the enhancement by Ax1P5 was small when compared with that by Ax1del9 (figure 2D) or by intact Axl (figure 2C). Therefore, these findings indicate that part of the Axl intracellular region that was not present in Ax1P5 (i.e., aa 507 to the C-terminus) is more important than aa 476–506 for enhancement. The fact that K567 was important (as shown with Ax1K567M; figure 2C) but not sufficient (as shown with Ax1del9R2, figure 2D) for enhancement may indicate that some concerted action or interaction between K567 and the region between aa 615 and the C-terminus is required. Because this latter region contains 14 tyrosine residues (including 3 major

targets of phosphorylation: Y779, Y821, and Y866 [14]), phosphorylation of tyrosine residues involving K567 is probably necessary for efficient enhancement of viral infection by Axl.

Endosomal low pH and cathepsin dependency of the effect of Axl. EBOV GP-mediated infection is reported to be endosomal low pH dependent and cathepsin dependent [2, 15]. To test whether the Axl-enhancing effect on infection was influenced by pH or cathepsin, intact Axl-expressing Jurkat cells were infected in the presence of ammonium chloride (20 mmol/L), which raises the intracellular pH, and in the presence of the cathepsin inhibitors CA-074 (100 μ mol/L) or E-64d (50 μ mol/L). Each reagent dramatically reduced EBOV GP-mediated infection (figure 2E).

EBOV cell entry is thought to be initiated by attachment of viral particles to the cell surface, followed by internalization through endocytosis [1]. The results of this study strongly suggest a mechanism for Axl-enhancing EBOV-mediated infection in which viral particles attach to the cell surface and activate Axl via interaction with its immunoglobulin domains, resulting in endocytosis with the activated Axl. Our finding that Axl-enhancing infection was endosomal low pH dependent and cathepsin dependent supports this hypothesis. Because Axl signaling stimulates tyrosine phosphorylation of integrin complexes, via PI3K and Akt [10, 11], the inhibitory effects of anti- β 1 integrin on EBOV GP-mediated infection that we observed previously [6] may also be associated with Axl signaling.

Acknowledgments

We thank Susan Watson for editing the manuscript.

Supplement sponsorship. This article was published as part of a supplement entitled "Filoviruses: Recent Advances and Future Challenges," sponsored by the Public Health Agency of Canada, the National Institutes of Health, the Canadian Institutes of Health Research, Cangene, CUH2A, Smith Carter, Hemisphere Engineering, Crucell, and the International Center for Infectious Diseases.

References

1. Feldmann H, Geisbert TW, Jahrling PB, et al. Family Filoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus taxonomy*. 8th ed. London: Elsevier/Academic Press, 2004:645–53.
2. Takada A, Robison C, Goto H, et al. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14764–9.
3. Wool-Lewis RJ, Bates P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol* 1998;72:3155–60.
4. Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, et al. DC-SIGN and DC-SIGNR bind Ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* 2003;305:115–23.
5. Takada A, Fujioka K, Tsuiji M, et al. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol* 2004;78:2943–47.
6. Takada A, Watanabe S, Ito H, Okazaki K, Kida H, Kawaoka Y. Down-regulation of β 1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* 2000;278:20–6.
7. Shimajima M, Takada A, Ebihara H, et al. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol* 2006;80:10109–16.
8. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, et al. *axl*, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1991;11:5016–31.
9. Valverde P. Effects of Gas6 and hydrogen peroxide in Axl ubiquitination and down regulation. *Biochem Biophys Res Comm* 2005;333:180–5.
10. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest* 2005;115:237–46.
11. D'Arcangelo D, Ambrosino V, Giannuzzo M, Gaetano C, Capogrossi MC. Axl receptor activation mediates laminar shear stress anti-apoptotic effects in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006;71:754–63.
12. Shimajima M, Nishimura Y, Miyazawa T, et al. A feline CD2 homologue interacts with human red blood cells. *Immunology* 2002;105:360–6.
13. Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, et al. Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J* 2006;25:80–7.
14. Braunger J, Schleithoff L, Schulz AS, et al. Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene* 1997;14:2619–31.
15. Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 2005;308:1643–5.

2. ネコ免疫不全ウイルスの感染指向性に関する研究

下島 昌幸

東京大学医科学研究所感染免疫部門ウイルス感染分野

ネコ免疫不全ウイルスはネコに免疫不全を引き起こすのであるが、そのウイルス受容体はCD4ではない。我々はこのウイルスが結合するT細胞上の膜分子を探索し、その結果CD134分子を受容体として同定した。CD134分子の発現は、ウイルスの細胞への吸着を促進し、非感受性細胞を感受性とし、ウイルスEnv蛋白質による膜融合を引き起こした。CD134分子は主として抗原提示を受けたヘルパーT細胞に発現する分子なので、ネコ免疫不全ウイルスによる免疫不全は、免疫応答を開始したヘルパーT細胞を感染標的とすることによって起こると考えられる。このことは共通の祖先を持つとされる免疫不全レンチウイルス（ネコ、ヒトおよびサル免疫不全ウイルス）が、必ずしもCD4分子を第一受容体としなくても免疫不全を起こしうることも意味しており、免疫学的にもウイルス進化的にも興味深い。このネコ免疫不全ウイルスの受容体同定には新規の探索方法を用いたのであるが、その方法をエボラウイルスに応用した。その結果、受容体型チロシンキナーゼであるAxlおよびDtkを同定した。この分子がエボラウイルスの感染を促進させるメカニズムは解析中であるが、生体内での発現分布はエボラウイルスの感染指向性とよく一致している。

1. はじめに

ネコに感染するウイルスの一つにネコ免疫不全ウイルス(FIV)がある。レトロウイルス科レンチウイルス属のウイルスである。長期感染により消瘦、貧血、神経症状、日和見感染や二次感染などのいわゆるエイズをネコに引き起こすウイルスである¹⁾。

ウイルス感染による病気というのは、そのウイルスが体のどの細胞に感染しているのかということと深く関わっている。そして特定の細胞に感染するかしないかというのは、ウイルスが細胞侵入時に使う分子（受容体という）がその細胞にあるかないかということに大きく依存している。

FIVは主として感染ネコのCD4陽性細胞から検出される²⁾³⁾。

CD4分子はMHC（主要組織適合抗原複合体）によって提示された抗原をT細胞受容体が認識する際の補助受容体であり、CD4発現T細胞はいわゆるヘルパーT細胞として他の免疫系細胞をコントロールする位置にある。つまりFIVは免疫系の要（かなめ）であるヘルパーT細胞に感染しているのである。そしてこのことがFIVによるエイズ様症状の主要因であると考えられる。

では、FIVがヘルパーT細胞に感染する時の受容体は何なのだろうか。最大のヒントはFIVと同じレンチウイルス属のヒト免疫不全ウイルス(HIV)やサル免疫不全ウイルス(SIV)から得られたが、ネコCD4分子をCD4陰性の細胞に発現させてもFIVは感染できず⁴⁾、また様々な抗ネコCD4抗体について調べてもFIVの感染を阻害できるものはなかった⁵⁾。つまり、HIVやSIVとは異なり、CD4分子がFIVの受容体であることを明示する実験結果は得られなかった。CD4陽性T細胞への強い感染指向性は*in vitro*においても確かに認められるのに、である⁶⁾。ではFIVの受容体は何なのだろうか。なぜヘルパーT細胞に感染することができるのだろうか。

私たちは近年、非常に簡便かつ効率のよい発現クローニング法を見出した⁷⁾。この方法を応用することにより、FIVの受容体としてT細胞活性化抗原CD134(OX40ともいう)

連絡先

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1
東京大学医科学研究所
感染免疫部門ウイルス感染分野
TEL : 03-5449-5281
FAX : 03-5449-5408
E-mail : shimoji-@ims.u-tokyo.ac.jp

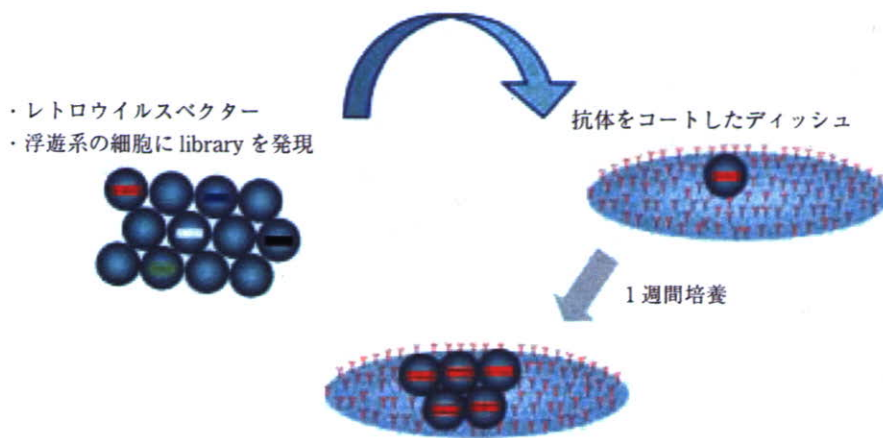


図1 改良版発現クローニング法

レトロウイルスベクターを用いて、浮遊系の細胞に cDNA library を発現させる。そして目的とする抗体でコートしたディッシュに細胞を入れ、附着した細胞を1週間ほど培養し、コロニーを形成させる。コロニーを形成した細胞から library 由来の cDNA を取り出す。

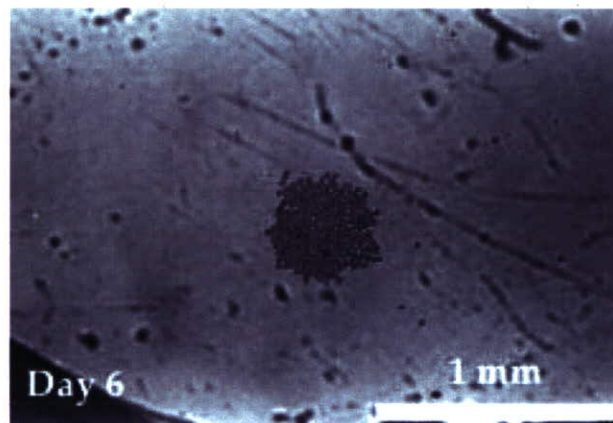


図2 浮遊系細胞によるコロニー形成

cDNA library をレトロウイルスベクターにより浮遊系細胞に発現させ、これと CD4 分子に対する抗体を組み合わせると図1の方法を行った。写真は CD4 の抗体でコートしたディッシュ上に出現した、本来浮遊系である細胞が作ったコロニーである。

を同定することができた⁸⁾。本稿では、この発現クローニング法と FIV 受容体同定への応用について紹介し、さらに他のウイルス受容体への応用についても触れたい。

2. 発現クローニング法の改良

発現クローニング法は1980年代より特に抗体が認識する細胞表面蛋白質の cDNA を単離する場合に用いられてきた手法である（現在では配列が不明の蛋白質や cDNA は皆無に近く、また質量分析法等も発展したため、このような目的での出番は少ないかも知れない⁹⁾）。cDNA library をプラスミドに入れたものを COS 細胞等にトランスフェクションし、いわゆる panning によって目的の抗体が認識する

細胞を回収し、その細胞からプラスミドを回収する、という事を何度も繰り返すというのが当初行われていた手法であった。この20年の間にレトロウイルスベクターなどの遺伝子導入法の改良や、磁気ビーズやフローサイトメトリーによる細胞回収法の改良などが行われた¹⁰⁾。その結果、標的細胞の幅が広がり、また微弱な抗原抗体反応であっても陽性細胞の回収が可能となり、非常にやりやすくなった実験であるといえる。しかし、この実験はそれでも一つの cDNA クローンに辿り着くために3、4回前後スクリーニングを繰り返すという煩雑な操作を必須としていた。

私たちはこの煩雑なステップをもっと簡略にできないかと考え、図1のような手法を考えた。レトロウイルスベク

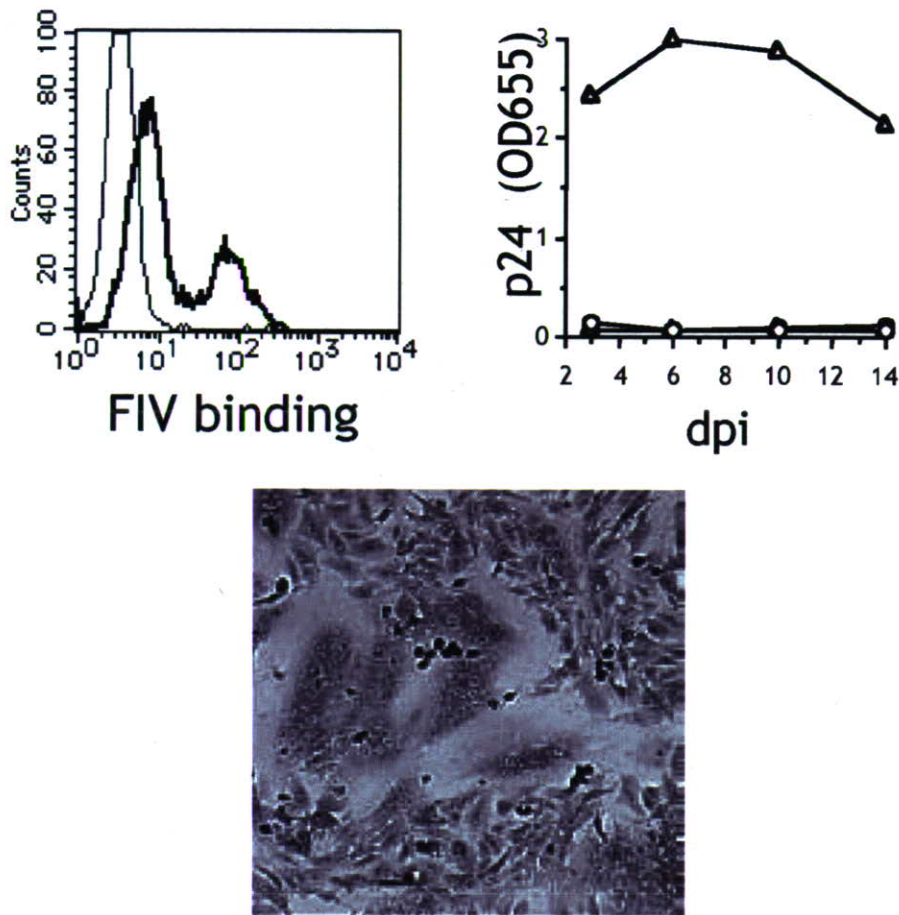


図3 CD134分子の発現とFIV

(左上) CD134発現細胞(太線)とコントロール細胞(細線)へのFIV吸着。CD134分子の発現によりFIVの吸着が明らかに増加した。

(右上) CD134発現細胞(三角)とコントロール細胞(丸)におけるFIVの増殖。CD134発現細胞でのみFIVの増殖が認められた。

(下) CD134分子とFIV Env蛋白質の共発現。細胞融合(多核巨細胞)が認められた。

ターを用いて、浮遊系の細胞にcDNA libraryを発現させ、そして細胞を、目的とする抗体でコートしたディッシュに入れ、付着した細胞を1週間ほど培養し、コロニーを形成させるという手法である。このコロニーの細胞ゲノムには狙ったcDNAが安定的にインテグレートしているので、ゲノムをテンプレートとしたPCRによってcDNAを取り出すことができる。細胞の分離に特殊な器械を用いないので、安価に行えるとも考えられた。

この手法が実際にワークするかどうか確認するためモデル実験を行った。つまり、ネコのCD4陽性リンパ球細胞(MYA-1細胞株)から作製したcDNA libraryをレトロウイルスベクター(マウス白血病ウイルス)により浮遊系の細胞(P3U1細胞株)に発現させ、これとCD4分子に対する抗体を組み合わせ、図1の方法を行った。図2はCD4の

抗体でコートしたディッシュ上に出現した、本来浮遊系である細胞が作ったコロニーである。このようなコロニーが13個形成され、ランダムに5個選んで調べたところ、いずれのコロニーからもネコCD4のcDNAのみが単離された。つまり図1に示す発現スクリーニング法が実行可能である上、効率もよいこと(100%)が確認できた⁷⁾。

実際この手法で認識分子を同定することに成功した抗体があるが¹¹⁾、応用の際にはいくつか必要な条件があると考えられる。①抗体のターゲットが細胞表面蛋白質であること、②細胞をディッシュにとどめておくのに十分な結合力が得られること、③抗体の結合が細胞死や増殖阻止を誘導しないこと(Fas抗原などには応用不可と考えられる)、などである。細胞培養によるコロニー形成はポジティブであることを確実にすると同時に細胞のクローニングを行うこ