

図2 人工吸血システムによるフィラリア感染における吸血血液中のマイクロフィラリア濃度とヤブカの生存率の関係：一定濃度以上のマイクロフィラリアを取り込むとヤブカは死亡する

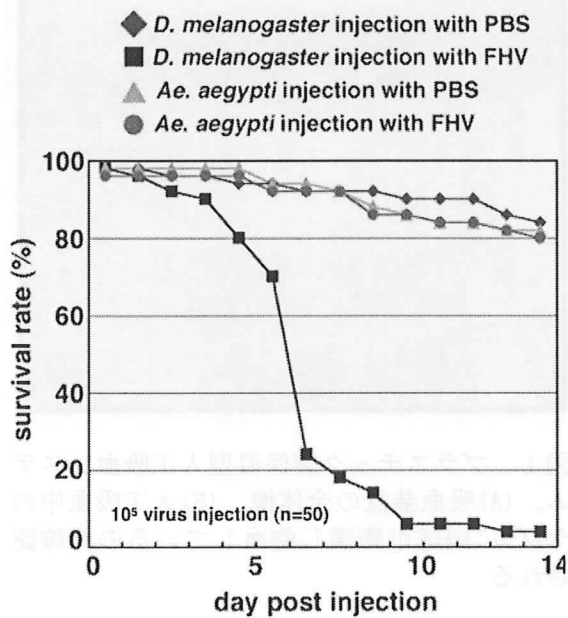


図3 ヤブカにおける flock house virus 感染経過：ヤブカでは flock house virus は致命的な病態を示さず増殖を続けるが、ショウジョウバエでは致命的な経過をたどる

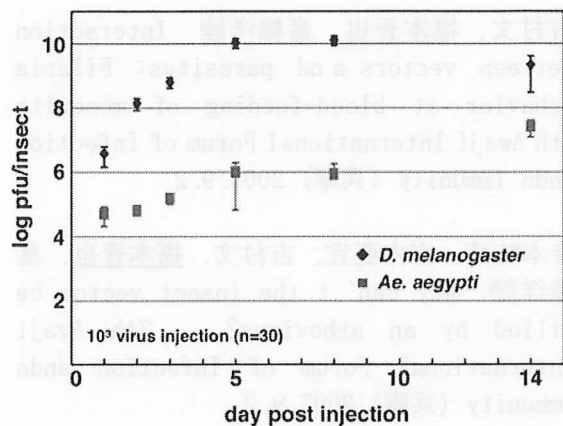


図4 ヤブカにおける flock house virus の増殖曲線：ヤブカに flock house virus を感染させるとショウジョウバエと比較して緩慢な増殖をおこなう

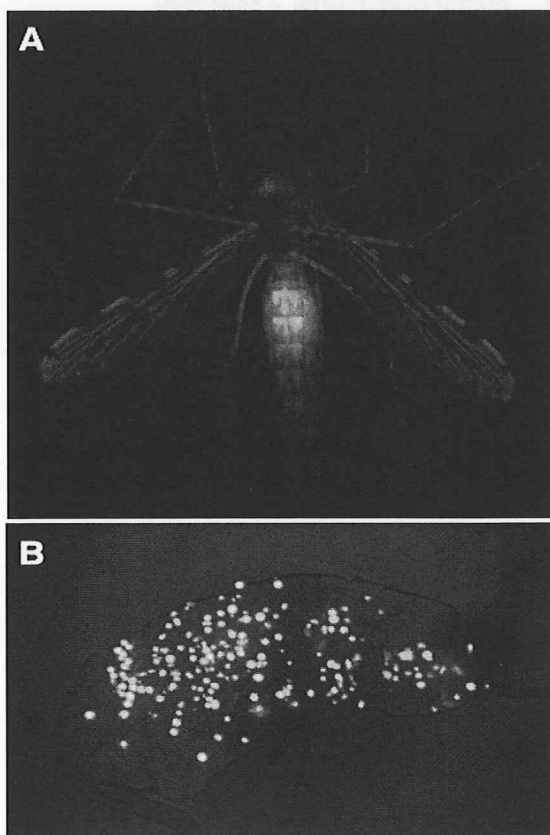


図5 ハマダラカ体内で増殖する GFP 発現マラリア原虫 (A)ハマダラカ中腸で蛍光を発するマラリア原虫オーシスト (B)解剖したハマダラカ中腸：個々のマラリア原虫オーシストを観察可能である

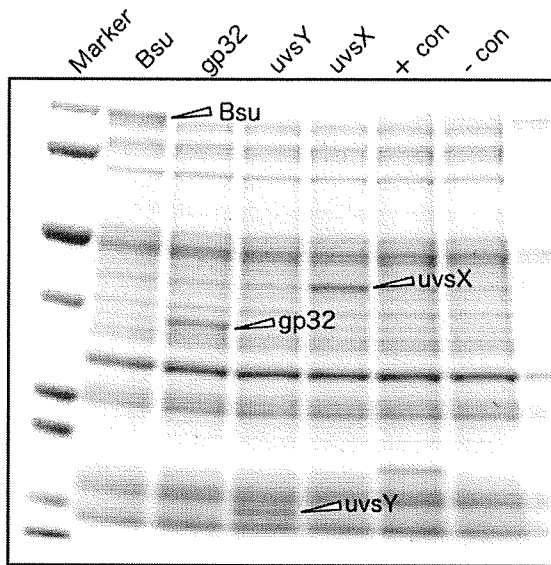


図6 小麦胚芽無細胞発現システムを用いた組換え RPA 用酵素の発現：SDS-PAGE による解析により 4 種の酵素の発現が確認された

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 293 T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 日以上培養した後でも観察された。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

Shimajima 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

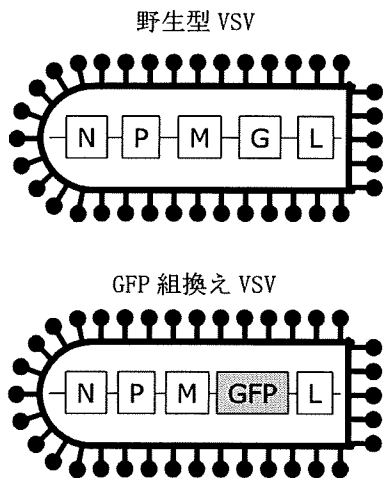
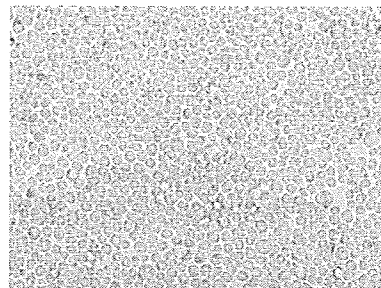


図 1 : 水疱性口内炎ウイルス (VSV) の模式図

(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

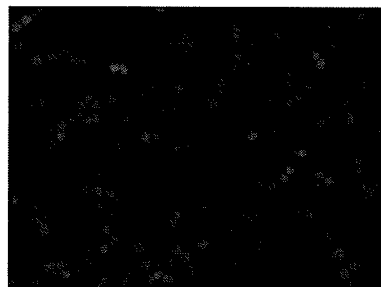


図 2 : 昆虫細胞への GFP 組換え VSV の感染

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。

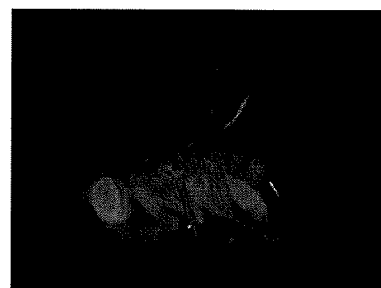


図 3 : 昆虫個体への GFP 組換え VSV の接種

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。

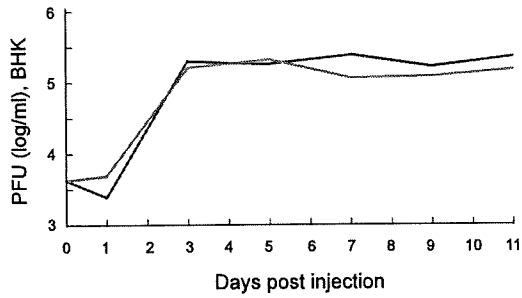
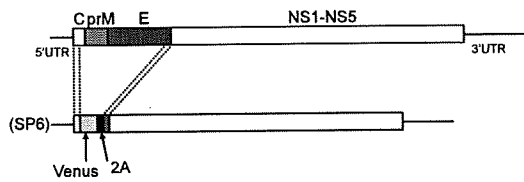


図4：シヨウジョウバエにおける野生型 VSV の増殖

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ヨ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。

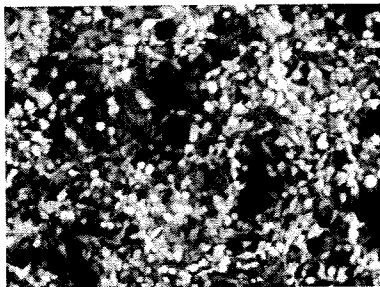


図6：西ナイル熱ウイルスのレプリコン

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、クリプトスポリジウム、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

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 50µg/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。

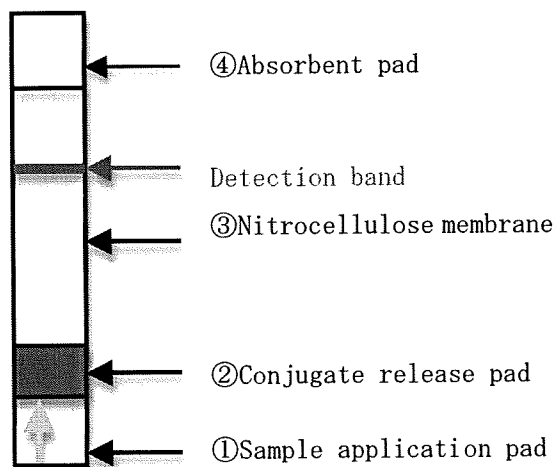


図1〔上図の説明〕

- 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やか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

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

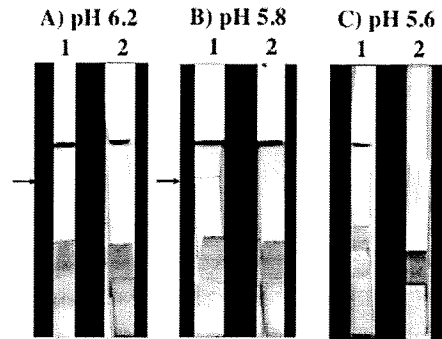


図2 バベシア原虫感染馬血清を用いたイムノクロマト・ストリップ評価 (pH 評価)
GST 融合 Be82 タンパク質の金コロイド粒子 (粒径サイズ 20 nm) を pH5.6, pH5.8 及び pH6.2 に調整した緩衝液で結合させ、イムノクロマト・ストリップ、*B. equi* 感染馬血清及び非感染馬血清を用いて評価した。レーン 1 はバベシア原虫感染馬血清、レーン 2 は非感染馬血清、矢印は陽性バンドを示す。

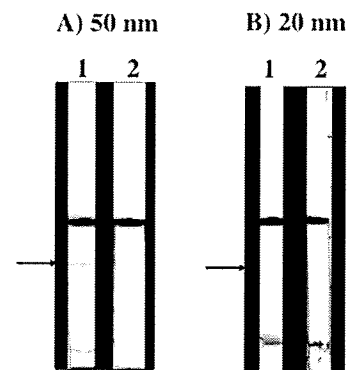


図3 バベシア原虫感染馬血清を用いたイムノクロマト・ストリップ評価 (金コロイド粒子評価)

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。

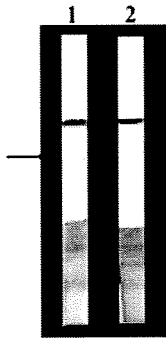


図4 バベシア原虫感染馬血清を用いたイムノクロマト・ストリップ評価（至適条件下）
GST 融合 Be82 タンパク質の金コロイド粒子を結合させる最適 pH6.2、結合させる金コロイド粒子の粒径を 20 nm としてイムノクロマト・ストリップを作製した。このストリップの *B. equi* 感染馬血清及び非感染馬血清を用いた評価を行った。1 はバベシア原虫感染馬血清、レーン 2 は非感染馬血清、矢印は陽性バンドを示す。

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 β 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 108-8539 (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-

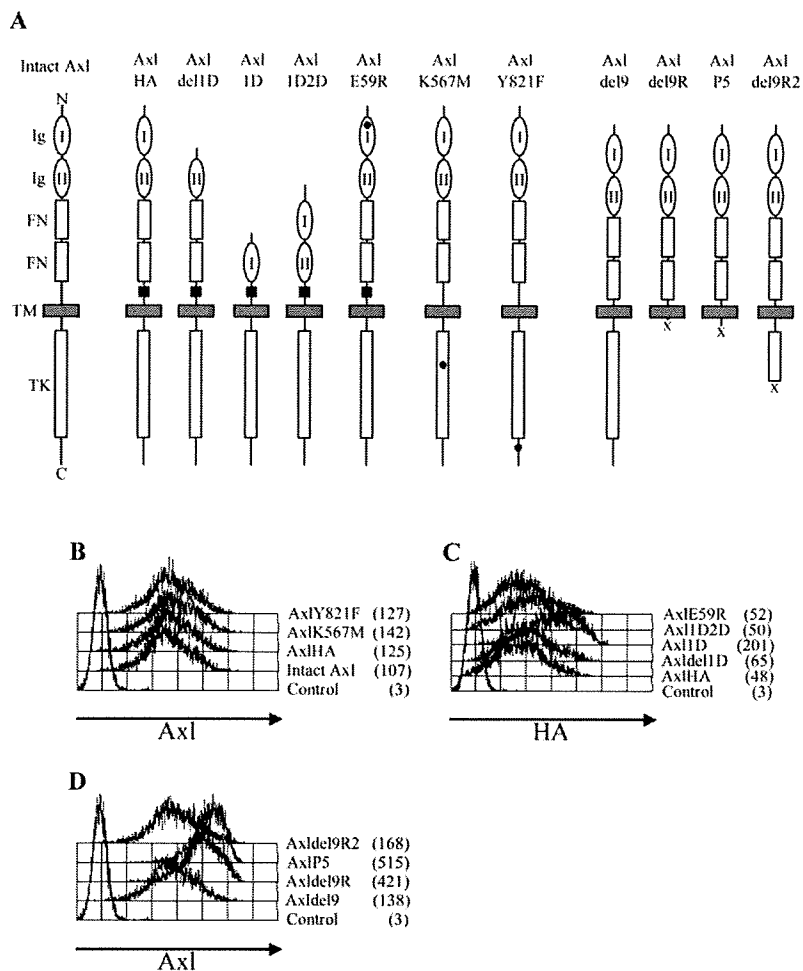


Figure 1. Schematic diagrams of the Axl mutants (A) and their cell surface expression (B–D). A, The left-most schematic of panel A is intact Axl. Black squares (■) denote hemagglutinin (HA) tags, black circles (●) denote point mutations, and X denotes an artificial stop codon. C, C-terminus; FN, fibronectin type III domain; Ig, immunoglobulin domain; N, N-terminus; TK, thymidine kinase domain; TM, transmembrane domain. B, Flow-cytometric analysis of intact Axl, AxIHA, AxIK567M, and AxIY821F expression in Jurkat cells, as detected with an anti-Axl antibody. C, Detection of AxIHA, AxIdel1D, AxI1D, AxI1D2D, and AxIE59R expression with an anti-HA tag antibody. D, Detection of AxIdel9, AxIdel9R, AxIP5, and AxIdel9R2 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 (AxIK567M and AxIY821F, 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 AxIK567M-expressing cells to the pseudotype virus carrying EBOV GP was similar to that of control molecule-transduced cells (figure 2C). The AxIY821F 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 (AxIP5; figure 1A). We also prepared 3 other mutants: AxIdel9, which lacks only the 9-aa sequence; AxIdel9R, which lacks the 9-aa sequence and has a stop codon at aa 476; and AxIdel9R2, 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 AxIP5-expressing cells was slightly, but

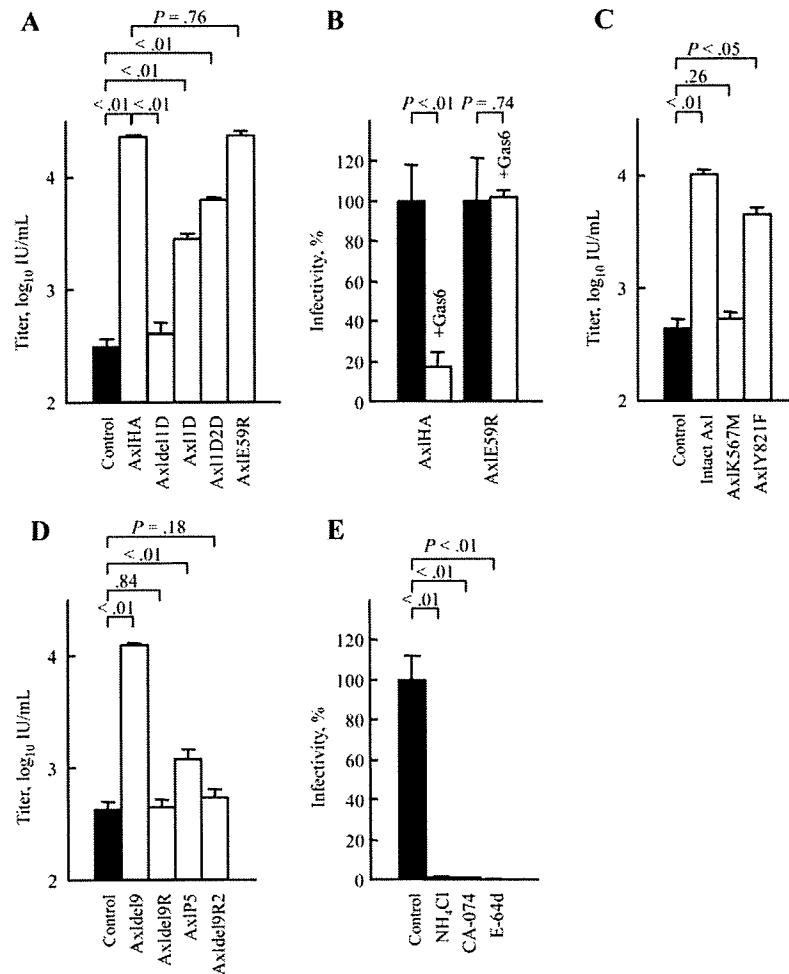


Figure 2. Susceptibility of Axl mutant-expressing cells to an HIV-based pseudotype virus carrying Ebola virus glycoprotein. *A, C, and D,* Cells infected with the pseudotype virus. Two days later, enhanced green fluorescence protein (EGFP)-expressing cells were counted (EGFP is a reporter of the virus). 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 Axldel9R and Axldel9R2 had no or negligible enhancing effect on virus titers (figure 2D). Flow cytometry revealed increased expression of AxlP5 and Axldel9R in cells, compared with that of Axldel9 and Axldel9R2 (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 AxlP5) seemed to originate from the increased expression of Axl containing an intracellular region of aa 476–506. The enhancing effect observed in Axl1D-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, AxlP5-expressing Jurkat cells [7]. Furthermore, the extent of the enhancement by AxlP5 was small when compared with that by Axldel9 (figure 2D) or by intact Axl (figure 2C). Therefore, these findings indicate that part of the Axl intracellular region that was not present in AxlP5 (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 AxlK567M; figure 2C) but not sufficient (as shown with Axldel9R2, 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 Centre 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, Tsuji 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. Shimojima 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. Shimojima 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

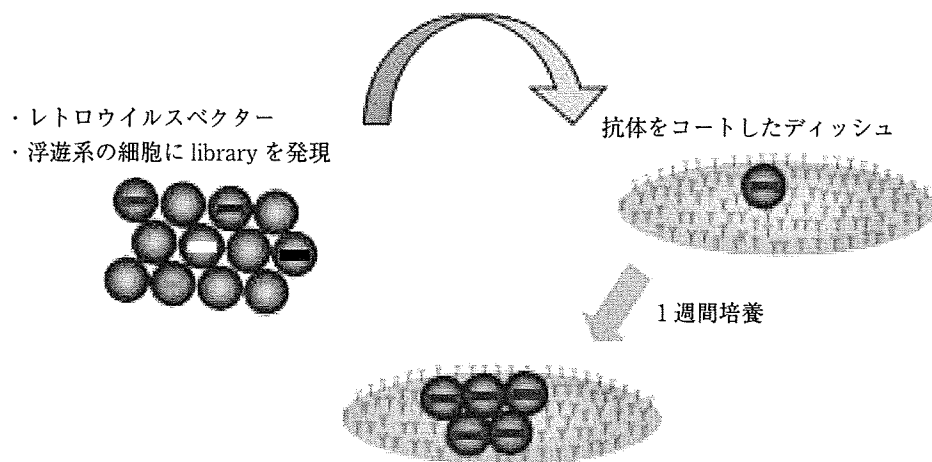


図1 改良版発現クローニング法

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。

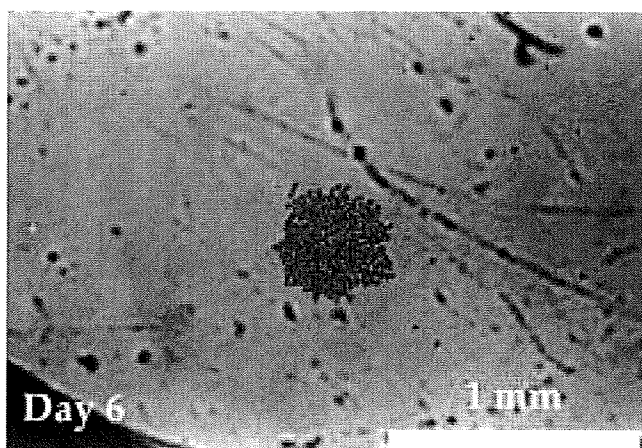


図2 浮遊系細胞によるコロニー形成

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、非常に行い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

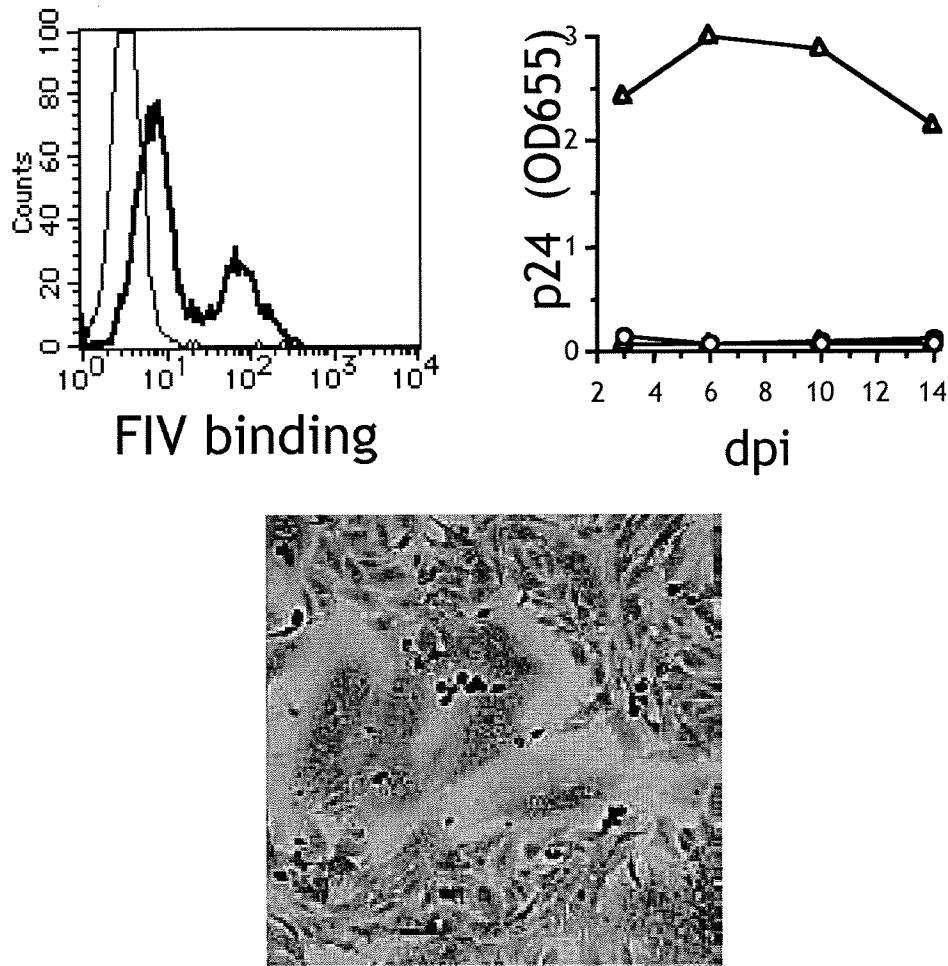


図3 CD134 分子の発現と FIV

(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.

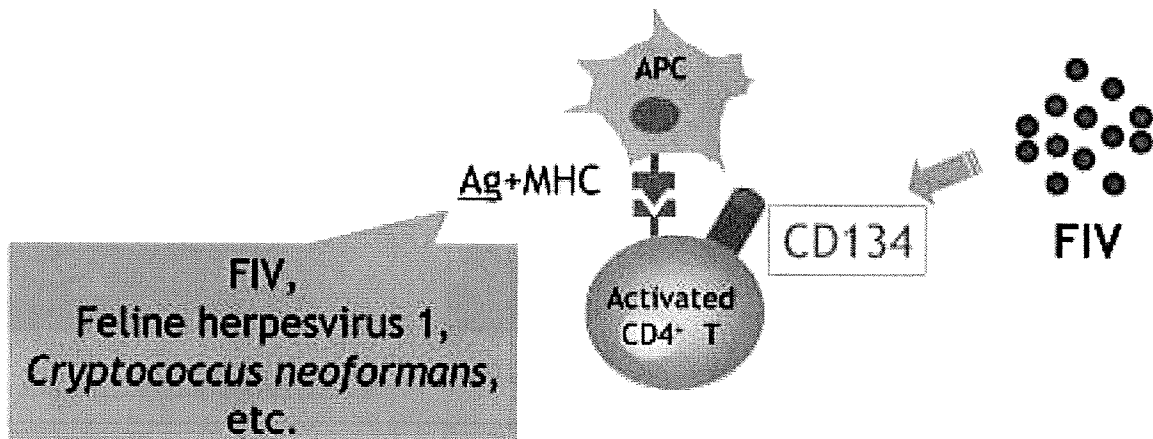
ターを用いて, 浮遊系の細胞に cDNA library を発現させ, そして細胞を, 目的とする抗体でコートしたディッシュに入れ, 付着した細胞を 1 週間ほど培養し, コロニーを形成させるという手法である. このコロニーの細胞ゲノムには狙った cDNA が安定的にインテグレートしているので, ゲノムをテンプレートとした PCR によって cDNA を取り出すことができる. 細胞の分離に特殊な器械を用いないので, 安価に行えるとも考えられた.

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て図 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

CD134 は抗原提示を受けた CD4⁺ T 細胞に発現



FIV は免疫応答を開始したヘルパー T 細胞に感染

図4 CD134 分子の分布と免疫不全

CD134 分子は抗原提示を受けた CD4 陽性細胞に発現するので、FIV は免疫応答を開始したヘルパー T 細胞に感染することができる。この時の抗原は FIV 自身であっても良いし、他の微生物・病原体であっても良い。

となり、このことがスクリーニングをわずか1週間で、しかも繰り返さずに完了することに繋がっている。

3. FIV の受容体同定

2.で紹介した改良版発現クローニング法は、本来は抗体が認識する細胞表面蛋白質を同定するものであるが、原理的には細胞表面蛋白質を認識するものは抗体である必要はない。そこで、ウイルスで蛋白質を認識させる状況を考え、ディッシュにコートしたウイルスで細胞のトラップができないかと考えた。抗 FIV Env 抗体を用いて FIV をディッシュにコートし、このディッシュに FIV 感染に高感受性である浮遊系細胞 (MYA-1 細胞株)⁶⁾ を入れたところ、細胞は浮遊系のものであるにもかかわらずディッシュに良く付着した。このことは、2.の手法がウイルスに対しても応用しうることを示している。そこで FIV 高感受性細胞 (MYA-1 細胞株) 由来 cDNA library を浮遊系の細胞に発現させ、FIV でコートしたディッシュでスクリーニングを行った結果、CD134 という分子を FIV への細胞付着をもたらす細胞表面蛋白質として同定した。

CD134 分子を細胞に発現させると、図3で示すように FIV の細胞への吸着が促進された。また CD134 発現細胞ではウイルスが非常に良く増殖した。CD134 分子と FIV Env 蛋白質を共発現させると、細胞融合が起こることが分かっ

た。つまり CD134 分子は単に FIV と結合する分子であるというだけでなく、FIV の細胞内への侵入を担う受容体であることが分かった⁸⁾。

これに先立ち、FIV の感染がケモカイン受容体 CXCR4 に対する抗体や生理的リガンド (SDF-1)、特異的拮抗剤 (AMD3100 など) により阻害されることが知られていた¹²⁾。そこで、CD134 分子の発現によって見られる FIV の感染と CXCR4 との関係について調べた。その結果、CD134 分子を介した FIV の感染は CXCR4 特異的拮抗剤によって阻害されることが分かった。また FIV と CD134 分子との結合は CXCR4 の有無に関係なく起こるが、CD134 分子なしで FIV と CXCR4 の結合を見ることはできないことも分かった。すなわち、FIV の感染に細胞側の CD134 と CXCR4 の2つの分子が関わっており、CD134 分子が第一受容体、CXCR4 分子が第二受容体であることが分かった⁸⁾。

ちなみに FIV の受容体同定に用いた cDNA library は2.で紹介した発現クローニング法で用いたものと同じである。つまり cDNA library には CD4 分子の cDNA が含まれていたが、スクリーニングで CD4 分子はクローニングされてこなかった。念のため CD4 分子を浮遊系細胞に発現させたが、この細胞と FIV との結合は認められなかった。FIV の感染には CD4 分子は特に関わっていないと考えられる。

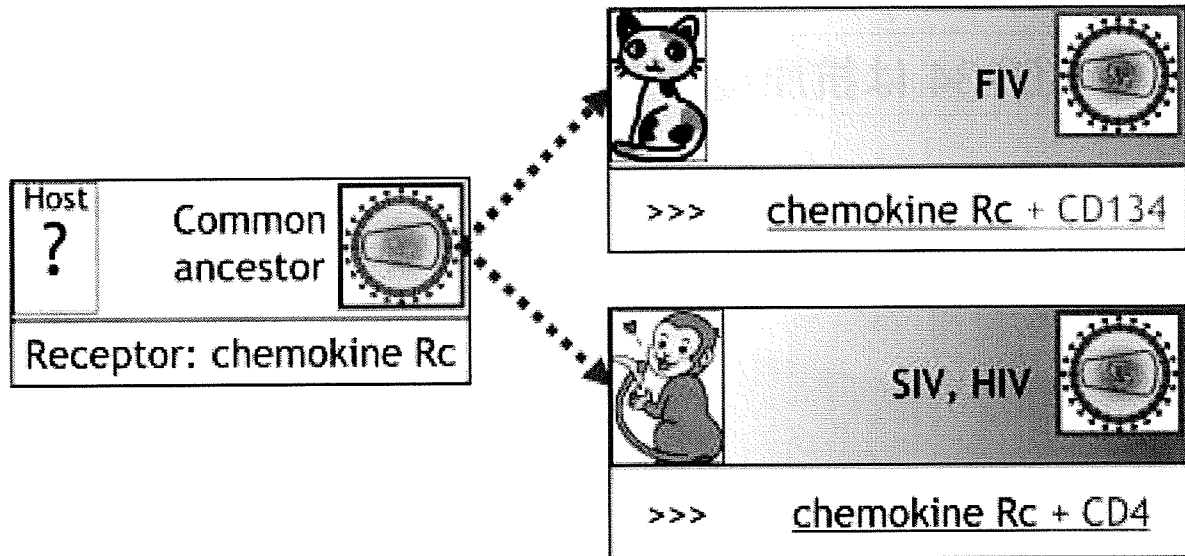


図5 ウイルスの進化と受容体（仮説）

- (左) かつてある宿主にいたレンチウイルスの祖先。このウイルスはケモカイン受容体のみで細胞に感染することができた。
 (右上) ケモカイン受容体を介してネコに感染。その後、より増殖しやすいようにケモカイン受容体とは別のCD134分子を第一受容体として選んだ。
 (右下) ケモカイン受容体を介して霊長類に感染。その後、より増殖しやすいようにケモカイン受容体とは別のCD4分子を第一受容体として選んだ。

4. CD134分子の発現分布と免疫不全

HIVやSIVがCD4分子を第一受容体とし、ヘルパーT細胞に強い感染指向性を示すことは理解しやすい。ではCD134分子ではどうだろうか。

CD134分子は活性化していないnaiveのヘルパーT細胞には発現していないが、抗原提示を受け活性化したヘルパーT細胞に発現するようになる分子である¹³⁾。CD134分子が発現されると、抗原提示細胞上のCD134L(リガンド)によりT細胞は更に活性化を受けるとなる¹⁴⁾。第一受容体がCD4ではないFIVがin vitroでCD4陽性細胞に強い感染指向性を示し、またin vivoで感染ネコのCD4陽性細胞から検出されるのは、CD134分子の発現が主にCD4陽性細胞内であるからであると考えられる。

CD134分子を第一受容体としているということはFIVの巧みな免疫回避法を思わせる(図4)。CD134発現細胞を標的に感染していくということは、その時活性化しているヘルパーT細胞すなわちFIV抗原特異的に免疫応答を開始したヘルパーT細胞にFIVは感染していくことを意味する。もう少し言い換えるならば、FIVは自分を排除するための細胞そのものに高効率で感染するのである。また、FIV感染ネコに他の微生物、例えばネコヘルペスウイルスやクリプトコッカスが感染した場合には、それらの微生物に対して免疫応答を開始したヘルパーT細胞をもFIVは感染の標的としていくことになる。恐らくはFIVはCD134分子を

第一受容体とすることでFIV自身が増殖しやすい環境を作り、また他の微生物存在下ではその微生物の増殖を促進し、二次感染や日和見感染といったエイズ様症状を引き起こすのであろう。

"FIVは活性化したFIV抗原特異的ヘルパーT細胞に感染していく"という表現に少し疑問を感じる人もいるかもしれない。(当然ではあるが)ある個体の初感染時にはFIV抗原への免疫応答は起こっていないからである。しかし周囲や体内に外来抗原が全くなく、免疫系が全く動いていないという個体の状況は考えにくい。初感染時に限っては、その時たまたま活性化していた細胞にFIVは感染していくと思われる。ここで少しワクチン研究について触れるが、不活化FIV等の投与がチャレンジ時のウイルス感染を増強したという報告が多い¹⁵⁾。恐らく抗原投与自体がFIVの感染標的を増やし(免疫系の活性化→ヘルパーT細胞の活性化=CD134発現細胞の増加となる)、十分な免疫が与えられていない場合はウイルスがよく増える結果となる、ということであろう。

このように免疫応答を行っている細胞への感染指向性は、FIVだけでなく実はHIVやSIVも有する特徴であると考えられる。ただし分子メカニズムは若干異なる。HIVやSIVは恒常的にヘルパーT細胞に発現しているCD4分子を第一受容体とするので、この段階で感染指向性に差は出ないであろうが、細胞の活性化に伴い第二受容体であるケモカイン受容体の発現量は増加するので、活性化したヘルパー