

牛パラインフルエンザウイルス 3 型の増殖機構の解析

高田 麻里奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 竹内 薫 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

呼吸器ウイルスには、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RS ウイルスなどがある。これらのウイルスは、鼻腔、咽頭、喉頭を含む上気道、また気管支や肺などの下気道といった呼吸器にのみ感染する。しかし、これら呼吸器ウイルスの感染機構、病原性発現機構には不明な点が多い。呼吸器にのみ感染し、他の組織には感染しないメカニズムは依然として不明である。そして、インフルエンザウイルス除けば、ヒト用のワクチンも未だ開発されていないのが現状である。

パラインフルエンザウイルス (Parainfluenzavirus: PIV) は、パラミクソウイルス科パラミクソウイルス亜科に属し、非分節のマイナス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。PIV は、脂質二重層 (エンベロープ) に囲まれた粒子で、エンベロープにはウイルス表面タンパク質がスパイク状に突き出ている。この糖タンパク質は HN (赤血球凝集素ノイラミニダーゼ) と F (融合) タンパク質である。HN タンパク質は宿主細胞上のレセプターへの結合を担い、F タンパク質は細胞膜との融合を担っている。つまり、これらのタンパク質が宿主細胞への感染や出芽に重要な働きをし、また、PIV が全身では増殖せず、呼吸器の細胞でのみ増殖する臓器特異性に関っていると想定される。

本研究では、増殖力が強く、取り扱いが容易な牛パラインフルエンザウイルス 3 型 (Bovine PIV type3: BPIV3) をモデルとして用い、当研究室で開発された BPIV3 の遺伝子操作系を用いて F タンパク質欠損型ウイルスを作製し、BPIV3 の細胞への感染と出芽における F タンパク質の機能を解析することを目的とした。

【材料と方法】

(1) F 遺伝子欠損 EGFP 発現 BPIV3 の作製

T7 プロモーターの下流に F 遺伝子欠損 EGFP (Enhanced green fluorescent protein) 発現 BPIV3 完全長ゲノムを持つプラスミド (pBPIV3 Δ F-EGFP) は、EGFP 発現 BPIV3 発現完全長ゲノムプラスミド (pBPIV3-EGFP) (Ohkura et al. Virology, 2015, in press) を鋳型にして F 遺伝子を除いた断片を PCR で合成し、ライゲーションで連結し、大腸菌 (Stbl2) を形質転換することによって構築した。

F 遺伝子欠損 EGFP 発現 BPIV3 (rBPIV3 Δ F-EGFP) は、T7 RNA ポリメラーゼ発現ワクチニアウイルス株 (MVA-T7) を感染させた HeLa 細胞に pBPIV3 Δ F-EGFP、T7 プロモーターの下流に N, P, L タンパク質の遺伝子を持つ N, P, L タンパク質発現プラスミド、欠失した F タンパク質を供給するための F タンパク質発現プラスミド (pCAGGS-F) を同時にトランスフェクションし、pCAGGS-F をトランスフェクションして F タンパク質を発現させた Vero 細胞と共培養しながら継代することによって回収した。EGFP 発現 BPIV3 (rBPIV3-EGFP) は当研究室の大倉らによって調製されたものを用いた。

得られたウイルスは、MDBK 細胞を用いて TCID₅₀ (Tissue culture infectious dose) を行い、力価を決定した。

(2) 走査型電子顕微鏡での感染細胞の観察

感染細胞でのウイルスの出芽の様子を観察するため、rBPIV3-EGFP、または rBPIV3 Δ F-EGFP を感染させた Vero 細胞と非感染 Vero 細胞を、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。まず、ウイルス感染後二日目の細胞を、2% グルタルアルデヒドおよび 0.1 M リン酸バッファーで 4°C にて 30 分以上置いて前固定した。次に、0.1 M リン酸バッファーで 5 回洗浄し、1% OsO₄ で後固定した。その後再び、洗浄を 5 回行い、エタノール脱水した試料を t-ブチルアルコール凍結乾燥法を用いて凍結乾燥させた。翌日、金属膜コーティングを行い、走査型電子顕微鏡 (日本電子 JSM-6320F) にて観察を行った。

【結果】

(1) HeLa 細胞と Vero 細胞と共培養し始めて二回目の継代後 4 日目で、およそ 50% の細胞に rBPIV3 Δ F-EGFP が感染していることが EGFP の蛍光により確認できた。また、感染後 4 日目のウイルスを上清から回収し、MDBK 細胞に感染させ、TCID₅₀ 法により力価を決定したところ、rBPIV3 Δ F-EGFP のウイルス力価は 2.2×10^7 TCID₅₀/ml に達したことがわかった。また、予想されるように MDBK 細胞での rBPIV3 Δ F-EGFP の感染は広がらなかった。

(2) rBPIV3 Δ F-EGFP も、非欠損型と同様に細胞から出芽していることがわかった。また、その形状は、どちらも球状ではなくフィラメント状になっていることがわかった。

【考察】

F 遺伝子欠損ウイルスの MDBK 細胞への感染は広がらなかったことから、二次感染は起こらなかったと考えられる。さらに、走査型電子顕微鏡での観察ではフィラメント状の粒子が出芽していることが確認できたことから、F タンパク質は感染には重要であるが出芽には必須ではないと考えられる。

また出芽しているウイルス粒子の形状がフィラメント状であったことは、現在報告されているパラミクソウイルス粒子の形状が球状であることから、興味深い結果である。出芽時にはフィラメント状であり、その後粒子状に成熟するのかもしれない。

応用面としては、この F 遺伝子欠損ウイルスは、増殖制限型のウイルスであり、いわゆる半生ワクチンとしての活用が見込まれる。一度感染することができるが、二次感染を起こすことができず、ワクチンとして安全性が高いと想定される。また、一度は細胞に感染し、細胞内でゲノムの複製、ウイルスタンパク質の発現が起こるので、液性免疫だけでなく細胞性免疫の誘導も期待されるため、有効性も高いのではないかと考えられる。