ニューカッスル病ウイルス抵抗性変異株
Had-2の単離とその性質の研究

青木和久

①

ニューカッスル病ウイルス抵抗性変異株 Had-2の単離とその性質の研究

Isolation and characterization of a Newcastle disease virus-resistant mutant cell line, Had-2

平成 6 年11月

青木 和久

目次

序論 1

第一部　NDV抵抗性株Had-2の単離とその性状の解析 5

＜序＞ 5

＜材料と方法＞ 7

［１］細胞培養 7

［２］ウイルス 7

［３］試薬 8

［４］赤血球吸着試験（Hemadsorption test; Had test） 8

［５］NDV抵抗性変異株の単離 9

［６］優性劣性判定試験 10

［７］細胞のNDV抵抗性の定量的測定 10

［８］細胞のIFN産生能の定量 11

①培養上清の調製 11

②CPE（cytopathic effect; 細胞変性効果）抑制法

によるIFNの定量 11

③プラーク抑制法によるIFNの定量 12

［９］細胞のIFN感受性の測定 12

①FM3A細胞とHad-2細胞（低密度） 12

②L929細胞とFM3A細胞（高密度） 13

③CPEアッセイによるサンプル中のVSVの定量 13

④プラークアッセイによるサンプル中のVSVの定量 13

＜結果＞ 15
［1］フィコール層上での遠心によるNDV感受性細胞と
NDV抵抗性細胞の分離 15
［2］NDV抵抗性変異株の単離 16
［3］Had-2細胞のHVJ感受性 17
［4］Had-2細胞の変異の優性劣性判定 17
［5］Had-2細胞のNDV抵抗性の細胞密度依存性 17
［6］Had-2細胞の培養上清の活性 18
［7］Had-2細胞の培養上清の活性に対する
抗IFN抗体の作用 19
［8］FM3A細胞のIFN産生能およびIFN感受性 20
［9］FM3A細胞およびHad-2細胞のIFN産生能 21
［10］FM3A細胞およびHad-2細胞のIFN感受性 22
＜考察＞ 23

第二部　Had-2細胞におけるウイルス増殖阻害機構の解析 27
＜序＞ 27
＜材料と方法＞ 29
［1］細胞およびウイルス 29
［2］抗血清、プラスミド 29
［3］細胞のNDV吸着能の測定 29
［4］ウイルスタンパク質合成の免疫沈降法による検出 30
①NDV感染後の経時変化 30
②IFN処理細胞におけるNDV、HVJタンパク質合成 31
［5］細胞におけるウイルスmRNA合成の検出 31

①NDV 32
②HVJ 33
[6] 細胞へのNDVおよびHVJの同時感染とウェスタンブロッティングによる各ウイルスタンパク質の検出 33
<結果> 34
[1] Had-2細胞へのNDVの吸着 34
[2] Had-2細胞におけるNDVタンパク質の合成 34
[3] Had-2細胞におけるNDVmRNAの合成 35
[4] Had-2細胞におけるNDVmRNA合成阻害に対するシクロヘキシミドの影響 35
[5] シクロヘキシミドの除去によるNDVmRNA合成の回復 36
[6] Had-2細胞のHVJ感受性 37
[7] Had-2細胞へのNDVおよびHVJの同時感染の効果 38
<考察> 40
総合考察 43
謝辞 46
引用文献 47

略号

BSA	bovine serum albumin
CPE	cytopathic effect
FCS	fetal calf serum
Had test	Hemadsorption test
HA test	Hemagglutination test
HEPES	*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid
HVJ	Hemagglutinating virus of Japan
IFN	interferon
MEM	Eagle's minimum essential medium
MNNG	*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine
NDV	Newcastle disease virus
NRS	normal rabbit serum
PBS	phosphate-buffered saline
PFU	plaque forming unit
PKR	double-stranded RNA-dependent protein kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate
VSV	vesicular stomatitis virus

序論

ウイルスは単独では増殖できず、宿主となる細胞に感染してはじめて増殖が可能となる。すなわち、ウイルスが増殖するためには宿主細胞性の因子が必要である。また逆に、細胞には、ウイルス感染から自らを守るためのメカニズムも存在する。ウイルスの増殖とは、これら多様な細胞側の因子とウイルス由来の因子との間の複雑な相互作用の結果である。したがって、ウイルスの増殖に関して詳細な理解を得るためには、ウイルスの構成要素の同定、その作用の解明だけではなく、宿主細胞の側の因子の解析が不可欠である。一方、このような宿主因子は、本来細胞自身のための何らかの生理機能を担っているはずである。そして、このような”ウイルスの増殖にかかわる因子”という視点から、これまで見出されていなかった、あるいは注目されることの少なかった新たな因子あるいは作用に注目する契機が得られることも期待される。このような観点から、本研究においては、ウイルス増殖にかかわる宿主因子の解析を課題として取り上げた。

本研究で用いたニューカッスル病ウイルス（Newcastle disease virus; NDV）は、一本のマイナス鎖のRNAを遺伝子として持ち、6種類の構成タンパク質とエンベロープからなるパラミクソウイルス科に属する鳥類のウイルスである。NDVは、同じパラミクソウイルス科のセンダイウイルス（Hemaggulutinating virus of Japan; HVJ）や近縁のラブドウイルス科に属する水疱性口内炎ウイルス（vesicular stomatitis virus; VSV）などとともに、その構造や増殖過程が詳しく解析されており、全遺伝子配列もすでに解読されてい

る。NDVの宿主細胞への感染は以下のような経過をたどる。感染は、ウイルスの膜タンパク質の一つであるHNタンパク質が細胞表面の糖鎖末端のシアル酸をレセプターとして認識して結合することによって開始する。次に、もう一種類の膜タンパク質、Fタンパク質の作用によってウイルスエンベロープと細胞膜の融合がおこり、ウイルス粒子内の物質（ゲノムRNAを含むヌクレオキャプシド）は細胞質内に侵入する。このゲノムRNAを鋳型として、ヌクレオキャプシド中のRNA依存性RNAポリメラーゼ（Pタンパク質、Lタンパク質）の作用でウイルスmRNAが合成され、ウイルスタンパク質が合成される。その後、ゲノムRNAの複製がおこり、これらのウイルス構成要素は細胞膜直下に集合し、膜がくびれる形で新たなウイルス粒子が形成され、出芽がおこる。

このNDVの増殖の各ステップにおいて、種々の宿主細胞性因子が必要とされる。NDVの吸着には細胞側のレセプターが必要であり、mRNA合成は無細胞系において細胞の抽出液を加えることによって促進される（1）。ウイルスタンパク質の合成、輸送、修飾はすべて細胞の装置を使って行われる。しかし、これまでに同定されている宿主因子の数は少なく、多くの未知の因子がウイルスの増殖にかかわっていると考えられる。

こうした宿主細胞性因子を解析するために、ウイルスに対して抵抗性を示す細胞変異株を単離し、解析するという遺伝学的な手法が有用である。ウイルスの増殖素過程において必要とされる宿主因子のうちの一つが欠損した細胞は、ウイルスの感染に対して抵抗性を示すと考えられ、このような変異株を単離して解析することによって、欠損している因子の同定、その役割を解明することができる。

また、ウイルス抵抗性細胞の中には、ウイルスの増殖を阻害する因子を発現するものも含まれる可能性があり、こうした変異株の解析によって、細胞の感染防御システムに関して新たな情報が得られると考えられる。これまでにも、いくつかのウイルス抵抗性変異株の単離が報告されている。これらの中には、ウイルスの吸着がおこらないもの（2-4）、侵入がおこらないもの（5-12）、ウイルスタンパク質の輸送あるいは修飾がおこらないもの（11、13-18）、そして、インターフェロン（IFN）を持続的に産生するものなどがある（19-21）。しかし、変異遺伝子およびその産物が同定されている例はほとんどなく、新たな表現型を示す変異株の単離も含めて今後の詳しい解析が期待される。

本研究では、ウイルスの増殖にかかわる宿主因子の解析を目的として、マウス乳ガン由来のFM3A細胞株からNDVに対して抵抗性を示す細胞変異株の単離を試み、その解析を行った。FM3A細胞は、浮遊状態で増殖し、倍加時間が10から12時間と短いため大量の細胞を用いる生化学的解析に便利であるとともに、すでに種々の変異細胞が単離されており、技術的蓄積があること、特に、外来遺伝子の取り込みの効率が高く、変異細胞が得られた場合に、正常細胞のDNAを導入して変異を相補する遺伝子を同定することが可能であることなど遺伝的解析を行うのに有利な細胞株である。

原らは、さきに、このFM3A細胞から、NDV抵抗性変異株の単離を試みた。そして、変異原処理した細胞群にNDVを感染させ、10時間後にトリ赤血球を吸着しないものを顕微鏡下で選ぶという方法を用いて、NDVのレセプターの欠損株、Had-1を単離した（22）。Had-1細胞はゴルジ体膜のUDP-ガラクトース輸送体を欠損しているため、細胞表面

の糖鎖にガラクトース以降の糖残基の付加がおこらず、NDV受容体としてHNタンパク質が認識する糖鎖末端のシアル酸を欠損している(23)。原らの方法では、用いるウイルスの量と細胞がウイルスに感染している時間を最小限におさえることが可能であり、持続感染をおこす可能性を減らすとともに、NDVの増殖を完全には抑制しない弱い抵抗性細胞の単離も可能であると期待された。しかし、実際にはHad-1変異の出現頻度が極めて高いために(これはHad-1変異がX染色体上にあるためであることが最近明らかにされた(24))Had-1以外の変異の検出は相対的に困難であり、原らの試みにおいては、Had-1細胞以外のNDV抵抗性株を単離することはできなかった。

このような経過をふまえて、本研究は、Had-1細胞とは異なるNDV抵抗性株を単離し、その性質を解析することを目的として行った。本論文の第一部においては、まずNDV抵抗性株の選択方法の改良を行い、この方法を用いて、新たな変異株、Had-2を単離した。さらにこのHad-2細胞の解析を行い、この細胞はIFNを構成的に産生しているとともに、IFNに対する感受性も親株FM3Aに比べて増加しており、この二つの変化によってNDV抵抗性を獲得していることを明らかにした。そして、第二部においては、Had-2細胞を用いて、IFNのNDVやその近縁のHVJに対する作用について詳しい解析を行った。

第一部　NDV抵抗性株Had-2の単離とその性状の解析

＜序＞

ウイルスの感染に対して抵抗性を示す変異細胞株の単離は古くから試みられてきたが、その種類はまだ少なく、単離されているものに関しても変異している遺伝子の解明まで行われている例はほとんどない。これまでの試みでは、ほとんどが、大量のウイルスを細胞に感染させ、長時間の培養後に生き残って増殖した細胞を単離するという方法を用いており、この方法では、ウイルスに対して完全に抵抗性を示すものしか生き残らず、また、しばしばウイルスの持続感染をおこした細胞が出現することがあった。原らは、こうした問題を解決するために、新たな選択方法を開発し、マウスFM3A細胞株からNDV抵抗性変異株の単離を行った。この方法では、ウイルス感染の有無は、NDV感染10時間後の赤血球吸着能の有無によって判定される。したがって、ウイルスは感染細胞が赤血球を吸着する最小限の量を用いればよく、細胞がウイルスに接している時間も非常に短い。原らは、この方法を用いて、NDVのレセプターを欠損した変異株、Had-1を単離することに成功した（22）。しかし、このとき、変異原処理した細胞から同時に単離された13株のNDV抵抗性株はいずれも同じ相補性群に属するものであった。Had-1遺伝子はX染色体上にあるために、変異の出現頻度が極めて高く、その検出が比較的容易であったものと考えられる（24）。しかし、比較的出現頻度の低い他の

変異株を選択するためにはより大量の変異原処理細胞から出発する必要があると考えられた。

本研究は、これらの点を考慮した上で、Had-1とは異なるNDV抵抗性株を単離することを目的として行った。そして、そのために、まず変異細胞の選択法の改良を試みた。第一に、Had-1細胞の選択の際に有効であった赤血球吸着能の有無を顕微鏡下で直接判定する方法は、大量の細胞を処理するのには不向きであると考え、赤血球を吸着しない細胞を選択的に濃縮する方法を考案した。さらに、植物レクチンGS-IIで処理することによって、Had-1細胞を特異的に除去し、生き残った細胞からNDV抵抗性株の単離を行った。

新たに単離されたNDV抵抗性株Had-2の性質について検討した結果、Had-2細胞は、親株FM3Aに対して優性の変異を持ち、IFNを持続的に放出しているとともに、IFNに対する感受性もFM3A細胞より増加していることが明らかになった。

＜材料と方法＞

［１］細胞培養

変異株を単離するための親株としてC3H/Heマウス乳ガン由来のFM3A細胞（F28-7株）を用いた（25）。FM3A細胞およびFM3A由来の変異細胞は通常２％ウシ胎児血清（fetal calf serum; FCS）を含むES培地（26）中（２％FCS-ES）で、５％CO_2存在下、37℃で培養した。チミジン要求性株FSthy$^-$21（27）およびFthy$^-$oua^r（22）は２％FCS-ESに２×10^{-5}Mのチミジンを加えて培養した。寒天培地としては0.35％アガロースおよび2.5％FCSを含むES培地を用いた。ただし、融合細胞の選択の際に用いるアガロース培地ではFCS濃度を５％とした。

Ｌ929細胞は５％FCSを含むMEM培地（Eagle's minimum essential medium）中で培養した。

FM3A細胞は瀬野悍二博士（国立遺伝学研究所）より、FSthy$^-$21細胞は鮎沢大博士（東京大学分子細胞生物学研究所）より、Ｌ929細胞は平秀晴博士（岩手大学農学部）より分与を受けた。

［２］ウイルス

NDVはMiyadera株を用いた。10日発育鶏卵の尿膜腔に100 plaque forming unit（PFU）のNDVを接種し、35℃で２日間保温した後、１日間４℃に静置した。尿膜腔液を集め、700×gで５分間遠心した上清をNDV標品とした。

NDV標品中のウイルス量は赤血球凝集試験（Hemagglutination test; HA test）により定量した。NDV標品を冷phosphate-buffered saline（PBS; 137mM NaCl/2.7mM KCl/8.1mM Na_2HPO_4/1.5mM

KH_2PO_4）で2倍ずつ段階希釈し、鶏赤血球を冷PBS中に体積比0.5%で懸濁したものを各希釈液に等量加え、氷上で2時間静置した後、赤血球凝集反応陽性の限界希釈倍率を求めHA価とした。HA価2^{10}のNDVの濃度は8.1×10^{9}PFU/mlに相当する。

HVJはZ株を用い、NDVと同様に増殖させた後、シュ糖密度勾配遠心法で精製した。VSV（Indiana serotype）はBHK細胞中で増殖させたものを用いた。NDVおよびVSVは河野晴也博士（国立予防衛生研究所）より、HVJは平秀晴博士（岩手大学農学部）より分与を受けた。

［3］試薬

GS-II（*Griffonia simpliciforia*のレクチン）はE-Y Laboratories Inc.より、抗マウスIFN-αモノクローナル抗体および抗マウスIFN-βモノクローナル抗体は和光純薬より購入した。組換えマウスIFN-βは平秀晴博士（岩手大学農学部）より分与された。組換えマウスIFN-γはgenzyme社より購入した。

［4］赤血球吸着試験（Hemadsorption test; Had test）

細胞（1×10^{6}cells）を6mlの0.5%FCS-ES中で1時間培養し、ガラスシャーレ（6-cmϕ）の基面に付着させた後、培地を0.75mlの0.5%FCS-ESに交換し、NDV（1.35×10^{8}PFU）を加え、37℃で1時間吸着させた。PBSで洗浄し、吸着しなかったNDVを除去した後、さらに9時間6mlの0.5%FCS-ES中で培養した。NDV感染10時間後に細胞を冷PBSで洗浄し、6mlの2%（v/v）鶏赤血球/PBSを加え、4℃で30分間静置した。吸着しなかった赤血球を冷PBSで洗い去った後、顕微鏡下で観察した。細胞への赤血球の吸着が観察された場合を

Had(+)、赤血球の吸着が観察されなかった場合をHad(-)と判定した。

変異株の選択にこの方法を用いる際には次のようにした。細胞をガラスシャーレに低密度（1×10⁴cells/9-cmφ）で接種し、3日間培養して密集した細胞群を形成させた後、細胞群がはがれないように静かに培地を0.5%FCS-ESに交換し、さらに10時間培養して細胞をシャーレに強く付着させた後、Had testを行った。Had(-)を示す細胞群をクローニングカップで隔離し、単離した。

HVJを用いたHad testはNDVの場合と同様に行った。

［5］NDV抵抗性変異株の単離

FM3A細胞（2.5×10⁵cells/ml）を0.6μg/mlのMNNG（*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine）で3時間処理した後、6日間培養した。このMNNG処理細胞（5×10⁶cells）を9-cmφのガラスシャーレにまき、12mlの0.5%FCS-ES中で1時間培養してシャーレの基面に付着させた後、培地を1.5mlの0.5%FCS-ESに交換し、NDV（2.7×10⁸PFU）を加え、37℃で1時間吸着させた。PBSで洗浄し、吸着しなかったNDVを除去した後、さらに9時間12mlの2%FCS-ES中で培養した。NDV感染10時間後に細胞を試験管に移し、遠心によって冷PBSで洗浄し、2mlの冷PBSに懸濁した後、2mlの4%（v/v）鶏赤血球/PBS懸濁液を加え、4℃に30分間静置した。これを4mlの25%（w/v）Ficoll/PBS上に重層し、4℃、900×g、20分間遠心した後、赤血球非吸着細胞を含む境界層を約1ml採取した。採取した細胞を30mlのPBS中に懸濁し、遠心によって回収した。回収した細胞を次に、10μg/mlのGS-IIを含む培地中で4日間培養し、Had-1細胞を除去した。生き残った細胞についてHad testを行ってHad(-)の表現型を示す細

胞群を単離した後、さらに、細胞を5 cells/mlとなるように希釈し、この細胞懸濁液を96穴プレートのウェルに0.2mlずつ接種した。顕微鏡下で観察し、単一の細胞のみを含むウェルに目印をつけ、10日間増殖させた後、6種から10種のクローン細胞を採取した。

［6］優性劣性判定試験

FM3Aチミジン要求性変異株（FSthy⁻21）に、原らがウアバイン耐性の変異を導入した細胞（Fthy⁻oua^r）を親株として用いた。親株（1×10⁶cells）とHad-2細胞（1×10⁶cells）とを丸底遠沈管内で混合し、700×gで5分間の遠心を行い、底面に細胞を固着させた。そこにポリエチレングリコール溶液（50%(w/w)ポリエチレングリコール(平均分子量1500)／15mM HEPES pH7.4／ES培地）0.2mlを加え室温で2分間保持した後、HEPES緩衝液（15mM HEPES pH7.4／ES培地）1mlを加え室温で5分間保持した。さらにHEPES緩衝液を5ml加え、700×g、5分間の遠心を行い、沈澱した細胞を10%FCS-ES中で10時間培養した後、1.5mMのウアバインを含み、チミジンを加えていないアガロース培地（6-cmφプラスチックシャーレ）に1×10⁵細胞ずつ接種し、10日間培養した。出現した耐性コロニーを6クローン採取し、2%FCS-ES中で増殖させた後、Had testを行って融合細胞の表現型を判定した。

［7］細胞のNDV抵抗性の定量的測定

細胞（1×10⁶）を0.2mlの培地に懸濁して24穴プレートにまき、これに10⁷PFUのNDVを加え、1時間培養後に0.8mlの培地を加えてさらに培養した。感染16時間後に細胞を1.5ml-サンプルチューブに移

して遠心によって回収し、0.1mlの冷PBSに懸濁した後、超音波（45秒；Tomy）で破砕した。このサンプルを冷PBSで2倍ずつ段階希釈し、等量の0.5%（v/v）鶏赤血球/PBSを加えて2時間4℃で静置した後、赤血球が凝集する限界希釈倍率を求めた。細胞のNDV抵抗性の値は、この限界希釈倍率の逆数として定義した。

［8］細胞のIFN産生能の定量

①培養上清の調製

FM3A細胞およびHad-2細胞（2×10^6cells）に100PFU/cellのNDVを感染させ、1時間後にPBSで洗浄し、1mlの培地に懸濁して24穴プレートに移し、さらに培養した。感染24時間後に細胞および培養上清を1.5ml-サンプルチューブに移して遠心し、上清をサンプルとした。非感染細胞については、種々の細胞密度で24時間培養して同様に上清を調製した。低密度（2.5×10^3cells/ml）のHad-2細胞の上清は100mlを濃縮に用いた。終濃度80%飽和となるように硫酸アンモニウムを加えて終夜攪拌し、10,000×g、30分間の遠心でタンパク質を沈澱させ、HEPESを含むES培地に溶解し、同じ培地に対して終夜透析した。最終的に2.5ml（40倍の濃縮）のサンプルを得、ろ過によって滅菌した。

②CPE（cytopathic effect；細胞変性効果）抑制法によるIFNの定量

L929細胞を7.5×10^5cells/mlとなるように希釈して96穴プレートに0.1mlずつ接種し、同時に①のサンプルを2倍あるいは3倍ずつ段階希釈したものを各ウェルに0.1mlずつ加え、24時間培養した。上清を捨て、5×10^3PFU/0.1mlのVSVを加えて20時間から24時間培養した。

顕微鏡下で観察して、対照としてIFNサンプルで処理しなかったウェルの細胞が完全に死滅していることを確認し、上清を捨て、0.1mlのクリスタルバイオレット染色液（4.8mg/ml crystal violet dye／1.6mg/ml NaCl／1.13％formaldehyde／31％ethanol）を加え、室温で10分間紫外線を照射した。染色液を捨て、プレートを水で洗った後、各ウェルの細胞の染色度を観察し、既知濃度のIFNで処理した対照と比較してサンプル中のIFN量を算定した。

③プラーク抑制法によるIFNの定量

6穴プレートにL929細胞のモノレイヤーを形成させておき、培地を捨てて、①のサンプルを適当に希釈して加え、24時間培養した。培地を捨て、VSV（100PFU）を0.5ml加えた。1時間後に上清を捨て、1％アガロースおよび5％FCSを含むMEM培地を1.5ml加えて約24時間培養した。プラークが目で観察できる程度の大きさであることを確認し、0.02％ニュートラルレッド／PBS染色液を1.5ml加え、さらに2時間培養後に染色液を捨て、プラーク数を数えた。対照として、既知濃度のIFN-βで同様の処理を行い、このときのプラーク数との比較から、サンプル中のIFN量を算定した。

［9］細胞のIFN感受性の測定

①FM3A細胞とHad-2細胞（低密度）

細胞（2.5×10^3cells/ml、10ml）を10-cmφシャーレにまき、種々の濃度のIFN-βあるいはIFN-γを加えて24時間培養した後、遠心し、0.2mlの培地に懸濁して1.5ml-サンプルチューブに移した。5×10^5 PFUのVSVを加えて1時間吸着させ、遠心によってPBSで洗浄し、

1mlの培地に懸濁して24穴プレートに移してさらに培養した。感染12時間後に培養上清を採取し、1,600×g、3分間の遠心の上清をサンプルとした。

②L929細胞とFM3A細胞（高密度）

細胞（1×10^5cells/ml、1ml）を24穴プレートにまき、①と同様にIFN処理を行った。FM3A細胞は①と同様にサンプルチューブに移し、2.5×10^6PFUのVSVを加えて1時間吸着させ、PBSで洗浄後、1mlの培地に懸濁して24穴プレートに移し、さらに培養した。L929細胞はIFN処理の後、細胞がプレートに付着した状態で培地を0.2mlに交換し、NDV吸着、洗浄を行い、さらに培養した。いずれの細胞も、感染12時間後に①と同様にサンプルを調製した。

③CPEアッセイによるサンプル中のVSVの定量

L929細胞を7.5×10^5cells/mlとなるように希釈して96穴プレートに0.1mlずつまき、終夜培養して密な細胞層を作らせた。上清を捨て、①、②のサンプルおよび対照として1×10^6PFU/mlのVSVを、3倍ずつ段階希釈したものを0.1mlずつ加えて20時間から24時間培養した。細胞の染色は［8］②と同様に行い、各ウェルの細胞の染色度を観察し、対照と比較してサンプル中のVSV量を算定した。

④プラークアッセイによるサンプル中のVSVの定量

6穴プレートにL929細胞のモノレイヤーを形成させた後、培地を捨て、①、②のサンプルをVSV濃度が100～200PFU/mlとなるように適当に希釈したものを0.5ml加えた。プラークの形成および染色は［8］

③と同様に行い、プラーク数を計数した。

＜結果＞

［１］フィコール層上での遠心によるNDV感受性細胞とNDV抵抗性細胞の分離

出現頻度の低いNDV抵抗性変異株を単離するためには、変異株のスクリーニングに際して多数の細胞を扱う必要があり、そのためには、NDV感受性細胞からNDV抵抗性細胞を分離、濃縮するための簡便な方法を考案する必要がある。

NDVに対して感受性を示す細胞はNDV感染後数時間以内に細胞内でNDVの構成タンパク質の一つであるHNタンパク質を合成し、細胞膜上に発現する。HNタンパク質は、細胞表面のレセプターの認識を担うNDVの膜タンパク質であり、鶏赤血球に対しても結合性を持っている。そのため、NDV感染細胞は外から加えた赤血球を表面に吸着するようになる。一方、NDVに対して抵抗性を示す細胞、すなわちHNタンパク質を発現しない細胞は、NDV感染後にも赤血球を吸着しないと考えられる。赤血球は一般の細胞よりも密度が高いため、赤血球を吸着した細胞（NDV感受性細胞）と吸着しない細胞（抵抗性細胞）はこのとき、密度の差を利用して、適当な濃度のフィコール上で遠心することによって分離することができると考えられた。そこで、まず、NDV抵抗性細胞のモデルとしてNDVに感染していないFM3A細胞を用い、これと、NDVに感染したFM3A細胞の分離を試みた。それぞれの細胞単独およびそれらを混合したものを、赤血球存在下あるいは非存在下で25％のフィコール上に重層して遠心し、境界層に残った細胞を回収して計数した（表１）。

赤血球を加えない場合、非感染細胞の60％、感染細胞の20％が境

界層から回収され、両者を1：1で混合したときには、それぞれ単独の場合の平均の数（40%）の細胞が回収された。一方、赤血球を加えると、予想どおり、感染細胞は大部分が赤血球を吸着して沈殿し、境界層からの回収はおよそ0.4%に減少した。これに対して、非感染細胞の回収は赤血球を加えない場合とほぼ同等であり、この条件で赤血球を吸着しないことが示された。感染細胞と非感染細胞を混合して赤血球を加えて遠心した場合には、境界層から回収される細胞数は、非感染細胞が単独の場合と同じ比率で回収されると考えたときの期待値とほぼ一致し、非感染細胞は、感染細胞とともに存在してもまきこまれて沈降することはないと考えられた。したがって、この方法を用いることによって、変異原処理した細胞群中に低い頻度で現れると考えられるNDV抵抗性細胞を境界層から濃縮して回収することができると結論された。

［２］NDV抵抗性変異株の単離

親株FM3Aを変異原MNNGで処理後６日間培養した細胞について、上の方法でNDV感受性細胞と抵抗性細胞を分離し、境界層の細胞を回収した。しかし、回収されたNDV抵抗性細胞の多くは発生頻度の高いHad-1細胞であると考えられたので、これを植物レクチンGS-IIで処理した。GS-IIは糖鎖末端のGlcNAcを認識するため、ガラクトースの付加がおこらずGlcNAcが糖鎖末端に露出しているHad-1細胞はこの処理によって特異的に死滅する（22）。GS-II処理の後に生き残った細胞についてHad testを行い、赤血球を吸着しない細胞を顕微鏡下で選んで単離し、最後に限界希釈法によってNDV抵抗性変異株を単離した。

3株のNDV抵抗性株が得られたが、そのうちの2株については長期間の培養後にNDVの持続感染が認められたため、詳しい解析は行っていない。残る1株は選択圧のない状態で数カ月の培養を行っても変異は安定であり、これをHad-2と名付けた（図1）。Had-2細胞の形態および増殖速度は親株FM3Aとほとんど変わらなかった。

［3］Had-2細胞のHVJ感受性

図2はFM3A細胞およびHad-2細胞について、NDVの近縁のウイルスであるHVJを感染させ、10時間後にHad testを行った結果を示している。HVJに関しては、図1のNDVの場合とは異なり、Had-2細胞にも赤血球の吸着がみられ、したがって、Had-2細胞はHVJに対しては抵抗性を示さないことが明らかになった。

［4］Had-2細胞の変異の優性劣性判定

Had-2細胞の変異が親株に対して優性であるか劣性であるかを知るため、親株とHad-2の融合を行った。親株としては、FM3A細胞にチミジン要求性の劣性マーカーおよびウアバイン耐性の優性マーカーを導入した細胞（Fthy⁻oua^r）を用いた。Fthy⁻oua^{r}細胞とHad-2細胞をポリエチレングリコールで融合させ、ウアバインを含み、チミジンを加えない培地中で融合細胞を選択した。選択培地中で増殖したクローンを6個単離し、Had testを行ったところ、融合細胞は全てHad(-)の性質を示したことから、Had-2細胞の変異は優性であると結論した。

［5］Had-2細胞のNDV抵抗性の細胞密度依存性

Had-2細胞の性状を研究する過程で、この細胞は通常の培養条件では常にNDV抵抗性を示すが、細胞密度が非常に低い状態ではしばしばNDVに感染することが見出された。この現象を詳しく解析することによって、Had-2細胞の変異について有用な情報が得られると考え、そのために、まず、細胞のNDV抵抗性を定量的に評価する方法を考案した。一定数の細胞にNDVを感染させ、16時間後に回収した。そして、細胞を超音波で破砕し、その赤血球凝集能の限界希釈倍率を求めることによって細胞でのNDVのHNタンパク質の合成の程度を定量し、この値の逆数を細胞のNDV抵抗性の値と定義した。すなわち、細胞がNDVに対して強い抵抗性を示すほどHNタンパク質の合成量は減少し、この値はそれにしたがって増加することになる。

この方法を用いて、まず、種々の細胞密度でFM3A細胞およびHad-2細胞をまき、24時間培養した後のNDV抵抗性を測定した（図３）。その結果、Had-2細胞は通常の培養時のような高い細胞密度ではNDV抵抗性を示すが、1×10^4cells/ml以下の低密度ではNDV抵抗性を示さないことが明らかになった。親株FM3Aは細胞密度によらず常にNDV感受性を示した。

［６］Had-2細胞の培養上清の活性

前節に示したとおり、Had-2細胞はNDV抵抗性に関して密度依存性を示す。すなわち、この細胞は高密度になるとNDV抵抗性を獲得するか、あるいは、低密度になるとNDV抵抗性を失うか、いずれかの性質を持っている。そこで、この現象に、それぞれの細胞密度でHad-2細胞自身が培地中に放出している何らかの物質が関与している可能性を考え、Had-2細胞の培養上清の活性について検討した。まず、十分

に高密度（5×10^5cells/ml）でHad-2細胞を10時間培養した培養上清をとり、この中に新たにHad-2細胞を低密度（2.5×10^3cells/ml）でまいたとき、細胞がNDV抵抗性を獲得するか否かについて検討した。一方、低密度（5×10^3cells/ml）でHad-2細胞を10時間培養して培養上清をとり、その中に新たにHad-2細胞を高密度（5×10^5cells/ml）にまいて、NDV抵抗性を失うかどうかについても検討した（図4）。

その結果、低密度のHad-2細胞は新鮮な培地中ではNDV抵抗性を示さないが、高密度Had-2細胞由来の培養上清中で培養することによって、抵抗性を獲得することが示された。一方、高密度のHad-2細胞は、新鮮な培地中でも、低密度Had-2細胞由来の培養上清中でもNDV抵抗性を示した。この結果から、Had-2細胞は本来それ自身がNDV抵抗性の細胞なのではなく、高密度で何らかの物質を培地中に放出しており、これが細胞に作用することによって誘導的にNDV抵抗性を獲得するのであろうと考えられた。

［7］Had-2細胞の培養上清の活性に対する抗IFN抗体の作用

高密度のHad-2細胞の培養上清中のNDV抵抗性誘導活性は、70℃、5分間の熱処理およびトリプシン処理で失活し、一方、DNアーゼおよびRNアーゼの処理では安定であることから、タンパク質がこの活性を担っていると考えられた。この活性は、また、pH2処理に対して安定であった。これらの性質は、このタンパク質がIFNであることを示唆するものと考えられた（表2）。そこで、次に、培養上清のこの活性がIFNに対する中和抗体によって中和されるかどうかについて検討した。高密度Had-2細胞から調製した（2×10^4cells/ml、3日間）培養上清に抗IFN-αあるいは抗IFN-βモノクローナル抗体を

十分量加えて37℃で30分間保温した後、この培地中にHad-2細胞を低密度で接種し、24時間培養後にNDV抵抗性を測定した。

図5に示すとおり、培養上清のNDV抵抗性誘導活性は抗IFN-α抗体の添加によって80%減少し、抗IFN-β抗体の添加では50%減少した。そして、両者を同時に加えることによって、活性は完全に中和された。これらの結果に基づいて、Had-2細胞が培地中に放出している物質はIFN-αおよびIFN-βであると結論した。

高密度のHad-2細胞はNDVだけでなく、VSV、メンゴウイルス、シンドビスウイルスに対しても抵抗性を示した。このように、抵抗性の範囲が多様なウイルスに及ぶという事実も、上記の結果とあわせてさらにIFNの関与を支持するものである。

［8］FM3A細胞のIFN産生能およびIFN感受性

Had-2細胞は、自らIFN-αおよびIFN-βを構成的に産生し、これに自身が応答してウイルスに対する抵抗性を獲得していることが明らかになった。そこで、次に、IFNの産生あるいはIFNに対する応答のいずれが親株FM3A細胞から変化した性質であるのかを知るため、次の実験を行った。あらかじめFM3A細胞およびHad-2細胞を高密度（5×10^5cells/ml）で10時間培養してそれぞれの培養上清を回収した。次に、これらの培養上清の中に新たにHad-2細胞あるいはFM3A細胞を低密度（2.5×10^3cells/ml）で接種し、24時間培養後にNDV抵抗性を測定した（図6）。

FM3A細胞由来の培養上清中には低密度のHad-2細胞にNDV抵抗性を誘導する活性は見出されなかった。したがって、FM3A細胞はIFNを放出していないと考えられる。また、FM3A細胞は、Had-2細胞由来の培

養上清中で培養しても、NDV感受性のままであることが明らかになった。このことは、FM3A細胞が、Had-2細胞には十分NDV抵抗性を誘導する量のIFNに対して応答しないことを示している。以上の結果から、Had-2細胞は、親株では誘導刺激なしでは産生されないIFNを構成的に産生しているだけでなく、IFNに対する感受性も親株に比べて増加した細胞株であることが明らかになった。

［９］FM3A細胞およびHad-2細胞のIFN産生能

Had-2細胞が産生しているIFNの量を正確に見積もるため、マウスIFN活性の測定に多用されているマウスL929細胞を用い、VSVをチャレンジウイルスとしてIFN活性の定量を行った（表３）。

NDVによってIFN合成を誘導した場合には、FM3A細胞、Had-2細胞ともに大量のIFN（0.015～0.05U/cell）を放出した。一方、誘導刺激を与えない状態では、FM3A細胞の培養上清中にはIFN活性は検出されなかった。しかし、Had-2細胞の培養上清からは少量のIFN活性（0.00016～0.00032U/cell）が検出された。さらに、Had-2細胞を低密度で培養した培養上清についても、培地中のタンパク質を硫安沈澱法で濃縮することによって微量のIFN活性を検出することが可能であった。したがって、Had-2細胞のIFN合成は高密度になることによってはじめて開始されるのではなく、低細胞密度においても常に進行しているものと考えられる。しかし、細胞あたりのIFN放出量が少量であるために、細胞密度が高く、培地中のIFN量が抗ウイルス状態の誘導に十分なレベルに到達する条件下でのみこの細胞はウイルス抵抗性を獲得するものと考えられる。

［10］FM3A細胞およびHad-2細胞のIFN感受性

［8］節、［9］節の実験から、FM3A細胞は数十U/mlのIFNに対して応答しないことが明らかになった。このことは、FM3A細胞がIFNに対して非常に感受性の低い細胞であることを示唆している。そこで、FM3A細胞およびHad-2細胞のIFNに対する感受性をさらに詳しく検討するため、外から加えたIFNに対する応答を、IFN感受性を示すことが知られており、IFN活性の測定に常用されるマウスL929細胞の応答と比較した（図7）。各細胞を種々の濃度のIFN-βあるいはIFN-γで24時間処理した後にVSVを感染させ、12時間後までに培地中に放出されたVSVの量をL929細胞を用いたプラークアッセイで定量した。FM3A細胞とHad-2細胞の比較を行う際には、Had-2細胞自身が放出しているIFNの作用を無視できるよう、低密度の細胞を用いた。

その結果、IFN-βに関しては、Had-2細胞の応答はL929細胞の応答に近く、むしろ、FM3A細胞の方がIFN-β非感受性であることが示された。一方、IFN-γに対しては、L929細胞の感受性と比較してFM3A細胞、Had-2細胞はともに著しく低い感受性を示した。

これらの結果は、本研究で親株として用いたFM3A細胞は、IFN-β、γのいずれに対しても非感受性を示す変異株であり、Had-2細胞は、このうちIFN-βに対する感受性のみが正常に戻った部分的復帰体であることを示している。

＜考察＞

本研究では、第一に、NDV抵抗性変異株を単離するための選択方法の改良を行った。この方法では、まず、変異原処理したFM3A細胞にNDVを感染させ、感染10時間後に鶏赤血球と混合し、フィコール上に重層して遠心分離した。この操作によって、赤血球を吸着するNDV感受性細胞と吸着しない抵抗性細胞が効果的に分別され、境界層からNDV抵抗性細胞をおよそ100倍濃縮して回収することができた。この方法を用いることによって、大量の細胞を一度に選択に用いることが可能になった。さらに、回収したNDV抵抗性細胞から、その大半を占めると考えられるHad-1細胞をGS-II処理によって特異的に除去した。

この方法を用いて新たに単離された変異株Had-2は、低密度ではNDV抵抗性を示さず、高細胞密度で培養した場合にはじめて、培地中に自らが放出する物質の作用によって抵抗性を獲得することが明らかになった。この物質のウイルス抵抗性誘導活性はIFN-αおよびIFN-βに対する抗体を同時に加えることによって中和された。したがって、Had-2細胞はIFN-αおよびβを放出していると結論することができる。抗IFN-α抗体、抗IFN-β抗体で処理した培養上清は、L929細胞に対してもウイルス抵抗性を誘導しなかった。L929細胞はIFN-γ感受性の細胞であるので、このことは培養上清にIFN-γが含まれていないことを示している（データは示さず）。各抗体を単独で加えた場合の残存活性の比較から、培養上清中にはIFN-αがIFN-βよりも多量に放出されていることが示唆されている。FM3A細胞をNDVなどのウイルスの感染によって刺激してIFNを放出させた場

合にはIFN-βをより多量に放出することが知られている。また、Had-2細胞が構成的に産生するIFNは、量的にも、FM3A細胞やHad-2細胞をNDVで刺激することによって放出されるIFNに比べて非常に少ない。これらの事実は、Had-2細胞でおこっていることが、IFN産生誘導刺激を受けたFM3A細胞でおこっていることとは別の現象であることを示唆している。

Had-2細胞はIFNを構成的に産生しているだけでなく、さらに、IFN-βに対する感受性の点でもFM3A細胞と異なり、感受性が著しく増加していることが明らかになった。しかし、この点については、L929細胞のIFN感受性との比較から、Had-2細胞の応答はむしろ正常であり、FM3A細胞の方がIFN-β非感受性であると理解されるべきであることが示された。IFN-γに対してはFM3A細胞、Had-2細胞ともに非感受性であった。さらに、IFN-αおよびβを含むHad-2細胞由来の培養上清がFM3A細胞にNDV抵抗性を誘導しないことから、FM3A細胞はIFN-αに対しても非感受性であると考えられる。一方、抗IFN-β抗体で処理したこの培養上清がなおHad-2細胞にはNDV抵抗性を誘導したことは、Had-2細胞がIFN-α感受性であることを示している。したがって、親株として用いたFM3A細胞は、IFN-α、β、γのすべてに非感受性の変異株であり、各タイプのIFNに対する応答メカニズムに共通に関与する因子を欠損していると考えられる。そして、Had-2細胞においては、何らかの別の変異の結果、IFN-α、βに対する感受性だけが回復し、それと同時に、少量のIFN-α、βを構成的に産生するような変化が生じた。このことは、Had-2変異は、IFNに対する応答およびIFNの産生の両者に共通に関与する因子の変異である可能性を示唆している。

これまでに、IFNに対する応答あるいはIFN産生能に異常を持つ変異株はいくつかの種類のものが単離され、報告されている。Jarvisらは、マウス3T6細胞株から、IFNを構成的に放出している変異株、3T6-V'B2を単離している（19）。この細胞では、自ら放出しているIFNによって2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素や二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼが常に活性化されていることが見出されているが（20）、IFNの放出の原因となっている変異した因子に関しては解析はなされていない。またごく最近、McKendryらはIFNを構成的に産生するヒト細胞変異株を単離しているが、遺伝的解析は今後の課題である（28）。一方、IFNに対する感受性を喪失した変異株については特にヒト細胞を用いて、Starkらが近年詳しく解析しており、IFNに対する応答メカニズムの解明に重要な役割を果たしている（29-34）。彼らは、4種類の相補性群に属するIFN-α非感受性変異株を単離しており、これらの変異株においては、IFNレセプターと相互作用しているチロシンキナーゼであるTyk2、Jak1、あるいはその下流ではたらく転写因子ISGF3（IFN-stimulated gene factor-3）の成分が欠失していることが明らかになっている。本研究でFM3A細胞はIFN非感受性の変異株であることが示されており、この細胞において変異している因子はStarkらの変異株のいずれかで欠失している因子とマウスにおいて対応するものであるのか、あるいは、全く別の、新たな変異を持っているのかは興味深い問題である。FM3A細胞はIFN-γに対しても非感受性を示すが、上の4種の変異株のうちでは、チロシンキナーゼJak1あるいは転写因子ISGF3の構成要素である91kDaのタンパク質を欠失したものが同様にIFN-γ非感受性を示している。

Had-2細胞では、IFN感受性およびIFN産生能の両者が同時に変化し

ている。このような変異株はこれまでに報告された例がない。この細胞内では、IFNに対する応答およびIFNの発現の両者に共通に関与する因子に変異が生じている可能性がある。IRF（IFN regulatory factor）ファミリーに属する転写因子群は、IFN-β遺伝子上流の制御領域に結合し、発現を制御する因子として同定されたものであるが、その後、IFNによって誘導される遺伝子の発現にも関与することが示されている（35-38）。これらの転写因子の変異によってHad-2細胞にみられるような表現型が現れる可能性も考えられる。ただし、Had-2細胞には、IFN感受性にかかわる因子とそれとは別のIFNの産生にかかわる因子の変異が独立におこっている可能性もあり、さらに詳しい解析が必要である。

Had-2細胞はNDVだけでなく、VSV、メンゴウイルス、シンドビスウイルスなど多様なウイルスに対して抵抗性を示すことが明らかになったが、NDVの近縁のHVJに関しては、抵抗性を示さなかった。これは、この細胞の示すもう一つの注目すべき性質である。遺伝子構造の上でも極めて近縁のこれらのウイルスにの間におけるIFN感受性の著しい違いの原因を明らかにすることは、宿主－ウイルス相互作用の特異性、多様性の分子的基礎を理解するためのアプローチの一つとして有効であると考えられる。Had-2細胞はそのような研究のための有用なモデルとなるものと期待される。

第二部　Had-2細胞におけるウイルス増殖阻害機構の解析

＜序＞

本論文第一部においては、新たなNDV抵抗性変異株、Had-2の単離とそのいくつかの性質について述べた。この細胞は、親株FM3Aでは誘導刺激なしでは産生されないIFNを常に少量産生しており、同時に、親株が欠損していたIFN-α、βに対する感受性を回復していた。したがって、Had-2細胞は細胞密度が高くなり、培地中に放出されたIFNの量が十分のレベルに到達すると、自らこれに応答して、NDVを含む種々のウイルスに対する抵抗性を獲得すると考えられる。しかし、この細胞はHVJに対しては抵抗性を示さなかった。NDVとHVJは同じパラミクソウイルス科に属する非常に近縁のウイルスであり、いずれもIFNによって比較的よく抑制されると一般に考えられている。したがって、Had-2細胞でその増殖抑制の程度が大きく異なることは極めて興味深い現象であると考えられる。

IFNによる抗ウイルス状態の誘導機構に関しては、いくつかのモデルが考えられている（39-41）。一つは、二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ（PKR）がIFN処理によって誘導され、さらに、ウイルスが細胞に感染して増殖する際にできる二本鎖RNAがこの酵素を活性化するというものである。活性化されたPKRは、細胞のタンパク質合成開始因子eIF-2のαサブユニットをリン酸化することによってこれを不活化し、タンパク質合成を阻害する結果、ウイルスの増殖が抑制

されると考えられる。IFNはまた、2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素およびRNアーゼLを誘導する。ウイルス増殖時にできる二本鎖RNAは2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素を活性化し、この酵素によって合成された2'-5'オリゴアデニル酸が、RNアーゼLを活性化する。RNアーゼLはウイルスRNAを切断し、それによってウイルスの増殖を妨げると考えられる。これらのメカニズムは排他的なものではなく、協同してウイルス増殖の抑制という共通の効果をもたらしている可能性が高い。しかし、実際のIFNの作用において、個々のウイルス－宿主細胞系について吟味するとき、これらのシステムのいずれがどの程度機能しているか、他にもウイルス増殖を抑制するシステムが関与している可能性はないかなど具体的なことはいまだに明らかになっていない。

Had-2細胞においては、NDVとHVJの間にIFN感受性に関して大きな違いがみられたことから、ウイルスの特異性を認識するシステムがはたらいている可能性が示唆された。このようなウイルス特異的認識系については従来必ずしも十分な解析が行われておらず、詳細な研究を進めることによって、IFNの作用に関して新たな側面が明らかになることが期待される。そこで、この細胞におけるNDVの増殖阻害のメカニズムを詳しく検討して、IFNの抗ウイルス作用の主要な標的を明らかにすること、さらに、HVJの増殖過程においてこの標的に対応する反応がなぜ阻害されないかを明らかにするための手がかりを得ることを目的として第二部の研究を行った。

＜材料と方法＞

［１］細胞およびウイルス

FM3A、Had-2、L 929細胞の培養およびNDV Miyadera株、HVJ Z株の調製は第一部と同様の方法で行った。細胞のNDV吸着能の測定の際には発育鶏卵尿膜腔で増殖させ、ショ糖密度勾配遠心によって精製したNDV D26株を用いた。

［２］抗血清、プラスミド

抗NDVウサギ抗血清（免疫原はD26株）は永井美之博士（東京大学医化学研究所）より、抗HVJモルモット抗血清は平秀晴博士（岩手大学農学部）より分与を受けた。

プラスミドXXIV12A（NDVゲノムの3'末端からリーダー配列、NP遺伝子の全長およびP遺伝子の一部を含む）は石田らが作成したものを用いた（42）。プラスミドpSV2-LeNP（HVJゲノムの3'末端からリーダー配列、NP遺伝子の全長を含む）は岩崎憲太郎博士（東京都臨床研医化学）より分与を受けた。

［３］細胞のNDV吸着能の測定

NDV D26株をBolton-Hunter試薬（ICN）を用いて^{125}Iで標識した。^{125}I-標識NDV標品の比活性は1×10^{4}cpm/ng、濃度は1 ng/μlであった。各細胞（2×10^{6}）を0.25mlの0.5%FCS-ESに懸濁し、^{125}I-NDVを10μl（1×10^{5}cpm）加え、37℃で1時間保温した。細胞を1,600×g、5分間の遠心で回収し、0.5mlの冷PBSで3回遠心によって洗浄し、最終的に回収された沈澱を50μlの冷PBSに懸濁して、γ

カウンター（Aloka）で放射活性を測定した。対照として、^{125}I-標識NDVとともに、100倍量の非標識NDV（1μg/10μl）を同時に加えて同様の測定を行い、このとき細胞に吸着した放射活性の値を非特異的吸着によるものとして、前の値から差し引いた。

［4］ウイルスタンパク質合成の免疫沈降法による検出

①NDV感染後の経時変化

細胞（2.5×10^{6}cells）を5mlの0.5%FCS-ES中で1時間培養してシャーレ（6-cmφ）に吸着させた後、培地を0.75mlに交換してNDV（1.8×10^{9}PFU）を加え、1時間吸着させ、PBSで洗浄後、0.5%FCS-ES（5ml）中で培養した。標識開始の30分前に細胞をPBSで洗浄し、メチオニンを含まないMEM（5ml）に交換した。標識は、メチオニン不含MEMに［^{35}S］メチオニンを加えた培地（40μCi/ml、1ml）を用いて1時間行った。標識後、細胞をラバーポリスマンではがして1mlの冷PBSに懸濁し、遠心によって回収し、250μlの細胞溶解バッファー（50mM Tris-HCl pH8.0／150mM NaCl／0.5%deoxycholate／1%Nonidet P-40／0.1%sodium dodecyl sulfate(SDS)／0.1mg/ml phenylmethanesulfonyl fluoride）に懸濁し、氷上に30分間静置した後12,000×gで5分間遠心し、上清を細胞溶解液とした。溶解液のタンパク質量はBCA Protein Assay Reagent（Pierce）を用いて定量した。特異抗体を用いて免疫沈降を行う前に、タンパク質量50μg相当の溶解液を正常ウサギ血清（normal rabbit serum; NRS）およびプロテインAセファロースCL-4Bとともに4時間氷上に静置し、非特異的に吸着するタンパク質を10,000×g、2分間の遠心で沈澱させて除いた。上清を2μlの抗NDV抗血清あるいはNRSとともに1時間氷上

に静置し、1μl相当のプロテインAセファロースCL-4B（5％ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA)を含む）を加え、さらに1時間静置した。10,000×g、2分間の遠心を行い、沈澱を細胞溶解バッファーで4回洗浄した。最終的に得られた沈澱を15μlのサンプルバッファー（50mM Tris-HCl pH6.8／100mM dithiothreitol／2％SDS／0.1％bromophenol blue／10％glycerol）に懸濁して5分間煮沸し、抗原を解離させるとともに変性させ、遠心してセファロースを除いた上清を10％SDSを含むポリアクリルアミドゲル中で電気泳動して分離した。ゲルを乾燥後、イメージアナライザー（Fuji; BAS2000）を用いて解析を行った。

②IFN処理細胞におけるNDV、HVJタンパク質合成

細胞（1×10^6）を100U/mlの組換えIFN-βの存在下あるいは非存在下で24時間培養した後、FM3A、Had-2細胞は試験管に移して遠心によって集め、0.5％FCS-ES中で1時間培養してシャーレに吸着させた。（L929細胞はそのまま）培地を0.75mlに交換し（FM3A、Had-2細胞では0.5％FCS-ES、L929細胞では5％FCS-MEM）、9×10^8PFUのNDVあるいはHVJを加えて1時間吸着させ、PBSで洗浄後、それぞれの培地中でさらに培養した。感染の7.5時間後に培地をメチオニン不含MEMに交換し、感染8時間後から1時間標識を行った。回収した細胞は、0.4mlの細胞溶解バッファーに溶解した。免疫沈降は抗NDV抗血清あるいは抗HVJ抗血清を用いて①と同様に行ったが、プロテインAセファロースはBSAを含まないものを3μl相当用いた。

［5］細胞におけるウイルスmRNA合成の検出

①NDV

FM3A細胞およびHad-2細胞（6×10⁶cells）を10mlの0.5%FCS-ES中で1時間培養してシャーレ（10-cmφ）に付着させた後、培地を1.5mlに交換し、NDV（3.6×10⁸PFU）を加え、37℃で1時間吸着させた。PBSで洗浄後、10mlの0.5%FCS-ES中でさらに培養を続けた。感染3、6、9、12時間後に細胞を3mlの冷PBSで洗浄し、ISOGEN溶液（1ml、ニッポンジーン）を加えて溶解させ、ラバーポリスマンを用いて回収した。全RNAは、ISOGEN溶液の使用法にしたがって抽出した。20μgのRNAをホルムアルデヒドを含む、1.3%アガロースゲル中の電気泳動で分離し、キャピラリーブロティング法によってHybond-N+メンブレン（Amersham）に転写した。プローブとしは、NDVのNP遺伝子のcDNAを含むプラスミド（XXIV12A）からPvuIIで切り出した0.7kbの断片を、ランダムラベル法（Oligolabelling KitあるいはReady-To-Go DNA Labelling Kit: Pharmacia）で³²P標識して用いた。ハイブリダイゼーション溶液として、50mM Tris-HCl pH7.5／5×SSC（750mM NaCl／75mM sodium citrate）／50%formaldehyde／1×Denhardt's solution（0.02%BSA／0.02%Ficoll 400／0.02%polyvinylpyrrolidone）／0.1%SDS／10%sodium dextran sulfateを用い、終濃度0.2mg/mlのサケ精子DNAを加えて、プレハイブリダイゼーションを42℃で2時間行った後、ハイブリダイゼーションは終濃度0.125mg/mlのサケ精子DNAおよびプローブを加えたハイブリダイゼーション溶液中で42℃、18から24時間行った。2×SSC／0.1%SDSで65℃、10分間の洗浄を2回、0.1×SSC／0.1%SDSで65℃、30分間の洗浄を2回行い、イメージアナライザーで解析した。

シクロヘキシミド存在下（50μg/ml）でウイルス感染を行う際は、

ウイルスを加える前に細胞を1時間シクロヘキシミドを含む培地中で培養し、ウイルス吸着はシクロヘキシミドを含まない培地中、4℃で1時間行い、冷PBSで洗浄後、細胞を再びシクロヘキシミドを加えた培地中で培養した。シクロヘキシミド除去の効果をみる際には、細胞を2回冷PBSで洗浄した後、シクロヘキシミドを含まない培地中で培養を続けた。

②HVJ

HVJを感染させた細胞についてNDVの場合と同様の操作を行った。ハイブリダイゼーションのプローブとしては、プラスミドpSV2-LeNPからXhoIで切り出した1.7kbの断片（HVJのリーダー配列およびNP遺伝子の全長）をランダムラベルして用いた。

［6］細胞へのNDVおよびHVJの同時感染とウェスタンブロッティングによる各ウイルスタンパク質の検出

細胞（1×10^6）を0.2mlの培地に懸濁して1.5ml-サンプルチューブに移し、NDVおよびHVJ（1×10^6PFU）をそれぞれ単独あるいは同時に加えて37℃で1時間吸着させ、PBSによって遠心洗浄した後、細胞を1mlの培地に懸濁して24穴プレートに接種した。感染6時間後に細胞を再びサンプルチューブに回収し、冷PBSで洗浄後、50μlのサンプルバッファーを加えて溶解した。10%SDS-PAGEによって分離した後、セミドライブロッテイング装置（バイオクラフト）を用いてPVDF膜（Millipore）に転写した。一次抗体として抗NDV抗血清あるいは抗HVJ抗血清を用い、プロテインA－西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体を用いたECL法（Amersham）で検出反応を行った。

＜結果＞

［１］Had-2細胞へのNDVの吸着

Had-2細胞におけるNDVの増殖阻害のメカニズムを詳しく調べるために、NDVの増殖がどの段階で阻害されるのかについて検討した。はじめに、ウイルス増殖の最初のステップである細胞への吸着を調べる目的で以下の実験を行った。^{125}Iで標識したNDVを、親株FM3A、Had-2、および、NDVレセプター欠損株Had-1のそれぞれと混合して37℃で１時間保温し、PBSで洗浄した後に細胞に吸着して残った放射性NDVの量を測定した（図８）。その結果、Had-2細胞は、親株FM3Aと同程度のNDVを吸着することが示された。一方、Had-1細胞はほとんどNDVを吸着しなかった。したがって、Had-2細胞ではNDVの吸着のステップは正常に進行しており、その後のステップが阻害されていると考えられた。

［２］Had-2細胞におけるNDVタンパク質の合成

次に、Had-2細胞におけるNDVタンパク質の合成能を測定した。各細胞にNDVを感染させ、３、６、９時間後に［^{35}S］メチオニンを加えて１時間標識し、細胞を溶解して、抗NDV抗血清を用いて免疫沈降を行い、SDSゲル電気泳動で分析した（図９）。FM3A細胞では感染６時間後までNDVタンパク質の合成は増加していくが、Had-2細胞では、感染後期においても、NDVタンパク質の合成はほとんど認められなかった。したがって、Had-2細胞では、NDVの増殖はタンパク質合成の段階か、あるいは、それ以前の段階で阻害されていると考えられた。

［３］Had-2細胞におけるNDVmRNAの合成

Had-2細Eではタンパク質の合成が著しく阻害されることが明らかになったので、次に、NDVmRNAの合成について検討した。NDV感染３、６、９、12時間後の細胞を回収して全RNAを抽出し、NDVのNPタンパク質のcDNAの一部をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った（図10）。FM3A細胞ではNPmRNAの量は時間を追って急激に増加していくが、Had-2細胞では、タンパク質と同様mRNAの蓄積も強く阻害されることが明らかになった。

［４］Had-2細胞におけるNDVmRNA合成阻害に対するシクロヘキシミドの影響

NDV感染細胞において、NDVmRNAは２つのステップを経て増加する。まず、感染したウイルスが細胞内に持ち込んだゲノムRNAを鋳型として、同じくウイルス粒子に含まれていたRNA依存性RNAポリメラーゼが触媒するmRNAの合成、すなわち一次転写がおこる。このmRNAから新たにウイルスタンパク質が合成されて、RNA依存性RNAポリメラーゼが増えるとともに、ゲノムの複製がおこって鋳型の数も増加し、これ以降NDVmRNAの合成が飛躍的に増大する（二次転写）。すなわち、［２］節および［３］節で認められた、感染後期におけるNDVタンパク質およびmRNAの蓄積に対する強い阻害の原因としては、一次転写反応そのものが抑制されている可能性と、その後のタンパク質合成あるいはゲノムの複製が阻害されているために二次転写がおこらない可能性の２通りが考えられる。この点を明らかにするために、NDV感染後、早い時期のmRNA合成を調べた。細胞をシクロヘキシミド存在下あるいは非存在下でNDVに感染させ、１、２、３時間後のNP

mRNAの量を前節と同様にノーザンハイブリダイゼーションで調べた（図11）。FM3A細胞では感染3時間目以降シクロヘキシミド存在下では、非存在下に比べてNDVmRNA量が少なくなっていた。これは、タンパク質合成が阻害されたために二次転写がおこらない状態におけるmRNAの蓄積、すなわち、一次転写のみによるmRNA合成の量を示している。一方、Had-2細胞におけるmRNA合成量は、FM3A細胞のシクロヘキシミド存在下での量よりもさらに少なくなっていた。すなわち、Had-2細胞では、NDVの一次転写の段階での阻害が認められた。しかし、Had-2細胞にシクロヘキシミドを加えると、mRNA量が増加し、ほぼFM3Aにおける一次転写のレベルまで回復した。このことは、Had-2細胞における一次転写の阻害には、タンパク質合成が必要であるか、あるいは、この阻害にはRNアーゼが関与しており、シクロヘキシミドがmRNAからのリボソームの解離を妨げることによって、結果的にmRNAを保護することによってmRNA量の回復がおこっているかのいずれかであることを示唆している。

［5］シクロヘキシミドの除去によるNDVmRNA合成の回復

Had-2細胞ではNDVの一次転写までの段階ですでにmRNA量の減少が認められることが示されたが、この細胞でもNDVmRNAは少量合成されており、これだけでNDVタンパク質の合成量のFM3A細胞との著しい差を説明することは困難であると考えられた。そこで、Had-2細胞においてNDVの一次転写以降の段階が阻害されているかどうかを知るため、次に、シクロヘキシミド存在下で細胞にNDVを感染させ、一次転写によって合成されたmRNAが十分に蓄積した後に、感染2時間後の時点でシクロヘキシミドを除き、翻訳阻害を解除した場合に二次転写に

よるmRNAの蓄積が認められるかどうかについて検討した。図12に示すとおり、FM3A細胞ではシクロヘキシミドを除くと、急激にmRNA量が増加した。しかし、Had-2細胞では、シクロヘキシミドを除いた時点（感染2時間後）まではFM3A細胞と同等のmRNAを合成しているにもかかわらず、その後、シクロヘキシミドを除いた後にも、mRNAの量はほとんど増加しなかった。このことは、Had-2細胞では、NDVの一次転写だけでなく、感染中期以降のmRNAの増幅のステップもまた阻害されていることを示している。一次転写の阻害は部分的にしかおこらないのに対して、mRNAの増幅がこのように強く阻害されていることは、転写後の過程、すなわち、タンパク質合成あるいはゲノム複製のステップの阻害がむしろNDVの増殖阻害の主要な原因であることを示唆している。

［6］Had-2細胞のHVJ感受性

本論文の第一部において、高密度のHad-2細胞はNDVや他のいくつかのウイルスには抵抗性を示すのに対して、HVJには抵抗性を示さないことが明らかになった。Had-2細胞中におけるHVJの増殖素過程についてさらに詳しく検討するため、まず、HVJ感染細胞におけるHVJ mRNAの合成量を測定した（図13）。シクロヘキシミド存在下および非存在下で、HVJのNPタンパク質のcDNAをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションによってNPmRNA量を測定した結果、Had-2細胞では、HVJ感染のごく初期から、親株FM3Aと同程度のmRNAを合成していることが明らかになった。シクロヘキシミドを添加すると、いずれの細胞でも、特に感染4時間以降では、mRNA量が著しく減少した。すなわち、Had-2細胞でもHVJの一次転写、二次転写はともに正常に

進行していると考えられた。

次に、Had-2細胞におけるHVJタンパク質合成を検討した（図14A）。HVJ感染8時間後から1時間、[^{35}S]メチオニンで標識し、抗HVJ抗血清を用いて免疫沈降を行った結果、Had-2細胞においてもFM3A細胞と同程度のHVJタンパク質合成がおきていることが示された。また、100U/mlの組換えIFN-βで24時間処理しておいてもやはりHad-2細胞はHVJ感受性を示し、HVJの増殖はIFN感受性が非常に低いことが明らかになった。

NDVおよびHVJの増殖のIFN感受性が著しく異なることが、Had-2細胞に特有の現象であるのか、あるいは、IFNで処理した細胞に共通にみられる現象であるのかを知るため、次に、L929細胞を用いて、IFN-βで24時間処理した後、NDVおよびHVJを感染させ、感染8時間後の各ウイルスタンパク質の合成を免疫沈降によって調べた（図14B）。その結果、この細胞においても、IFN処理によってNDVタンパク質の合成は強く抑制されるが、HVJタンパク質合成はほとんど抑制されないことが示され、一般にHVJの増殖はNDVの増殖に比べてIFN感受性が低いことが示唆された。

[7] Had-2細胞へのNDVおよびHVJの同時感染の効果

HVJの増殖のIFN感受性はNDVの感受性に比べて非常に低い。その原因としては、IFNによって誘導されるウイルス増殖抑制因子に対するNDVとHVJの感受性が本来異なっている可能性もあるが、一方、IFNの作用を仲介し、ウイルスの増殖を抑制する物質がNDVの感染で特異的に現れるか、あるいは逆に、HVJ感染細胞の方に特異的にIFNの効果を打ち消す物質が発現する可能性も無視することはできない。そこ

で次に、NDVとHVJを同時に細胞に感染させ、NDVが増殖するようになるか、あるいはHVJの増殖が抑制されるようになるかについて検討した。FM3A細胞およびHad-2細胞にNDVとHVJを単独または同時感染させ、6時間後に細胞を回収して溶解し、それぞれのウイルスタンパク質の合成を別々に、各ウイルスに対する抗血清を用いてウェスタンブロッティングによって調べた（図15）。その結果、単独で感染させた場合、同時に感染した場合のいずれの場合にもFM3A細胞中ではNDV、HVJの両者ともに大量のウイルスタンパク質の合成が認められた。一方、Had-2細胞においては、単独感染か同時感染かを問わず、NDVタンパク質の合成は抑制され、HVJタンパク質はFM3Aと同程度かやや少ない程度の量の合成が認められた。このことは、Had-2細胞におけるNDVとHVJのIFN感受性の差は、NDV感染特異的にウイルス抑制因子が出現すること、あるいは、HVJ感染特異的にIFN作用阻害因子が生成することによるものではなく、IFN処理Had-2細胞中において、NDVとHVJが何らかの基準で明確に識別され、HVJの増殖が抑制を免れる特異的なメカニズムが存在することを示唆している。

＜考察＞

Had-2細胞は少量のIFNを構成的に産生しており、細胞密度が高くなり培地中のIFNの量が十分増えると自らこれに応答して種々のウイルスに対する抵抗性を獲得する。本論文第二部においては、この細胞において増殖が抑制されるNDVと、抑制を受けないHVJを用いて、IFNの作用機構の解明を試みた。

Had-2細胞では、NDVの吸着は親株と同程度におこっているが、感染後期のNDVmRNAおよびタンパク質の蓄積が強く抑制されていることが明らかになり、この間のいずれかのステップにおいてNDVの増殖が阻害されていると考えられた。ノーザンハイブリダイゼーションによってNDVmRNAの蓄積を詳しく解析した結果、Had-2細胞では、NDVの一次転写および二次転写は、両方とも阻害されていることが明らかになった。しかし、一次転写の阻害は完全ではなく、感染初期にはHad-2細胞においてもFM3A細胞の50％程度のmRNAは合成されていた。このことから、NDV増殖阻害の直接の原因は二次転写によるmRNAの蓄積の阻害であろうと考えられる。

NDVの二次転写が進行するためには、NDVタンパク質の合成およびゲノムの複製がおこり、転写反応を触媒するRNA依存性RNAポリメラーゼと鋳型となるゲノムRNAの両者が増加することが必要である。しかしながら、NDVタンパク質合成の阻害あるいはNDVゲノムの複製の阻害のいずれがHad-2細胞における二次転写の阻害をひきおこしているかは、現在までのところ明らかではない。感染初期のNDVタンパク質合成は微量であるために正確な定量は困難である。しかし、FM3A細胞と比較すると少量ながらHad-2細胞においても合成が認められて

いる（データは示さず）。一次転写によって生成するmRNAの蓄積が阻害されることは事実であるので、Had-2細胞におけるNDVタンパク質合成の抑制が単にmRNA量の差を反映したものか、タンパク質合成反応そのものが阻害されるのかについては、なお研究が必要である。一方、図12の結果を考慮すると、ゲノムの複製の過程がIFN作用の主要な標的である可能性についてもさらに検討を重ねる必要がある。タンパク質合成を阻害する要因としては、二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ（PKR）によるeIF-2のリン酸化、mRNA蓄積の阻害要因としてはRNアーゼLの寄与がそれぞれ考えられる。これらの要因と協同的にはたらく新たなウイルス増殖阻害機構がゲノムRNA複製機構の解析を通じて見出されるかどうかは興味ある課題である。

本研究では、ノーザンハイブリダイゼーションによるNDVmRNA解析のためのプローブとしてもっとも発現量の多いNDVのNPタンパク質のcDNAを用いた。Pタンパク質、Mタンパク質のcDNAをプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションでも同様の結果が得られている（データは示さず）。しかし、他の遺伝子の産物は発現量が少ないため、感染初期の段階ではFM3A細胞においても検出することができなかった。したがって、Had-2細胞において、検討したもの以外のNDV遺伝子（F、HN、Lのいずれか）の一次転写が特異的に阻害されているという可能性も現段階では否定することはできない。この点についてはより感度の良い方法を開発し、さらに詳しく検討する必要がある。このことに関連して、永井らは、ヒトHeLa細胞にNDVを感染させると同時に高濃度のIFNを加えると、感染後期において、HN、Lタンパク質の発現が特異的に阻害されることを報告している（43）。しかし、低密度のHad-2細胞を用いた実験では、同様の現象は見出さ

れていない。

Had-2細胞は、NDVだけでなく、VSV、メンゴウイルス、シンドビスウイルスなど種々のウイルスに対して抵抗性を示すが、HVJに対しては、抵抗性を示さないことが本論文第一部において示された。第二部では、これをさらに詳しく調べ、HVJの増殖は一次転写、二次転写、およびタンパク質合成のいずれのステップにおいても阻害がみられないことを確認した。また、L929細胞においてもHVJの増殖はIFNによる抑制をほとんど受けないことが示され、NDVとHVJとでは、IFN感受性が大きく異なることが明らかになった。

ワクシニアウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルスなどが細胞に感染する際には、IFNによって誘導され、ウイルスタンパク質合成の阻害に寄与すると考えられるPKRの作用を抑制することによってIFNの抗ウイルス作用を免れることが知られている（44）。HVJのIFN非感受性も同様の機構で理解することができるのではないかと考え、HVJとNDVを同時にHad-2細胞に感染させてそれぞれの増殖について検討した。しかし、二重感染細胞中においてもNDVの増殖は阻害されたが、HVJの増殖は全く影響を受けなかった。NDVとHVJのIFN感受性の違いの原因としては、NDVの増殖を抑制している因子がHVJを標的として認識できない可能性や、この因子がHVJの感染では活性化されず、NDVの感染で活性化されても、局所的にしか作用しない可能性などが考えられる。今後、Had-2細胞中におけるNDVとHVJの複製過程をさらに詳しく解析することによって、IFNの作用のウイルス特異性に関して、新たな知見が得られることが期待される。

総合考察

本研究では、ウイルスの増殖に関与する宿主細胞性の因子の解析を目的として、マウスFM3A細胞株からNDV抵抗性変異株の単離を試みた。第一部において、まず、変異株の選択方法の改良を行い、新たなNDV抵抗性株、Had-2を単離した。Had-2細胞の性質の解析を行った結果、この細胞は誘導刺激を加えない状態でも常にIFN-αおよびβを産生していると同時に、IFN-α、βに対する感受性も親株に比べて増加していることが明らかになった。ただし、IFN感受性に関しては、マウスL929細胞との比較から、本研究で親株として用いたFM3A細胞自体がIFN-α、β、γに対して非感受性の変異株であり、Had-2細胞はそのうちIFN-α、βに対する感受性のみが回復した復帰変異株であることが明らかになった。このことは、IFNの産生の制御とIFNに対する応答の両者に共通に関与する因子が存在することを示唆している。今後、Had-2細胞で変異している遺伝子およびその産物を解析することによって、IFNシステムの複雑なネットワークを解明するための手がかりが得られると考えられる。また、FM3A細胞の変異を解明することによって、IFNに対する応答のメカニズムに関して新たな知見が得られることが期待される。

Had-2細胞の解析の過程で、この細胞がHVJに対しては抵抗性を示さないことが明らかになった。HVJとNDVのIFN感受性については、L929細胞でも同様の傾向が認められているので、ここで認められた点はマウス細胞が共通に持つ性質を反映したものである可能性がある。しかし、HVJとNDVの構造上の類似点を考慮すると、この感受性の差の分子的基礎を明らかにすることは極めて興味深い課題である。

そして、本研究が開拓したこの実験系は、IFN作用のウイルス特異性という従来ほとんど開拓されたことがなかった新しい問題領域に迫るための鍵となる有用なモデルを提供することになるであろう。

第二部では、NDVの増殖に対する阻害機構の解析を試みたが、最終的に単一の主要な標的を明らかにするには至らなかった。しかし、mRNA安定性の減少、ウイルスタンパク質合成の部分的阻害などとともに、ウイルスゲノムの複製、および、ゲノムRNAの5'末端よりに位置するF、HN、L等のウイルス遺伝子の一次転写に注目して研究することがIFN作用の分子的基礎を解明するために特に重要であることを示すことができた。ウイルスゲノムの複製は、パラミクソウイルスの生活環の中で、不明な部分が最も多い段階である。ゲノムの複製に対するIFNの効果の解析は、この素過程の分子機構を解明するための手がかりとしても期待を寄せることができる。IFN作用の標的反応の同定はまた、HVJのIFN非感受性のメカニズムを明らかにする上でも重要である。これらの点の解明に向けて、今後なお一層の努力が必要である。

NDVの増殖には種々の宿主細胞性因子が関与する。このことから、当初は多くの種類のNDV抵抗性株が単離できることが期待された。しかし、本研究で新たに単離されたのはHad-2細胞のみであった。Had-2細胞の変異は優性であるため、劣性の変異を持つ株よりも出現頻度は高いと考えられる。したがって、他の変異株を単離するためには、さらに多くの細胞から選択を行う必要がある可能性がある。しかしまた、NDVの増殖に関与する因子の変異は、細胞自身にとって致命的である可能性もあり、こうした因子の変異した細胞を単離するためには、温度感受性などの条件致死変異株の単離を試みる必要が

あるであろう。これらの点を考慮して新たな変異株の単離を試みることも興味ある将来の課題の一つである。本研究において開発したNDV抵抗性株の単離方法は、このような試みを進める際にも有用であると考えられる。

謝辞

長きにわたって親身にご指導下さいました川喜田先生に心より感謝いたします。岩崎先生にも多くのことを教わり、感謝いたします。庄野先生には事務的なことまでご面倒をおかけしました。水本先生、平先生には貴重な助言とサンプルをいただきありがとうございました。服部先生、星野さんにも大変お世話になりました。原さん、高木さん、岩間さんには貴重な時間をさいて実験を教えていただき、ありがとうございました。本田さん、岩下さんには研究の手助けをしていただき感謝しています。公私にわたりお世話になった旧教養学部川喜田研の皆様、臨床研の皆様、北里大学の皆様、庄野研の皆様に感謝します。

引用文献

1. Collins PL, Hightower LE, Ball LA (1978) Transcription and translation of Newcastle disease virus mRNA's in vitro. J Virol 28: 324-336
2. Kaplan G, Levy A, Racaniello VR (1989) Isolation and characterization of HeLa cell lines blocked at different steps in the poliovirus life cycle. J Virol 63: 43-51
3. Kimura Y, Yokochi T, Miyadai T, Yoshida K, Yokoo J, Matsumoto K (1985) Characterization of a porcine kidney cell line resistant to influenza virus infection. J Virol 53: 980-983
4. Shieh M-T, WuDunn D, Montgomery RI, Esko JD, Spear PG (1992) Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. J Cell Biol 116: 1273-1281
5. Darnell JE Jr, Sawyer TK (1960) The basis for variation in susceptibility to poliovirus in HeLa cells. Virology 11: 665-675
6. Kuge O, Akamatsu Y, Nishijima M (1989) Abortive infection with sindbis virus of a chinese hamster ovary cell mutant defective in phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine biosynthesis. Biochim Biophys Acta 986: 61-69
7. Moehring JM, Moehring TJ (1983) Strains of CHO-K1 cells resistant to *Pseudomonas* exotoxin A and cross-resistant to diphtheria toxin and viruses. Infect Immun 41: 998-100
8. Moehring TJ, Moehring JM (1976) Interaction of diphtheria toxin and its active subunit, fragment A, with toxin-sensitive and toxin-resistant cells. Infect Immun 13: 1426-1432
9. Ono M, Mifune K, Yoshimura A, Ohnishi S, Kuwano M (1985) Monensin-resistant mouse Balb/3T3 cell mutant with aberrant penetration of vesicular stomatitis virus. J Cell Biol 101: 60-65
10. Robbins AR, Peng SS, Marshall JL (1983) Mutant chinese hamster ovary cells pleiotropically defective in receptor-mediated endocytosis. J Cell Biol 96: 1064-1071
11. Robbins AR, Oliver C, Bateman JL, Krag SS, Galloway CJ, Mellman I (1984) A single mutation in chinese hamster ovary cells impairs both Golgi and endosomal functions. J Cell Biol 99:

1296-1308

12.Wilson JH, DePamphilis M, Berg P (1976) Simian virus 40-permissive cell interactions: selection and characterization of spontaneously arising monkey cells that are resistant to simian virus 40 infection. J Virol 20: 391-399.

13.Banfield BW, Tufaro F (1990) Herpes simplex virus particles are unable to traverse the secretory pathway in the mouse L-cell mutant gro29. J Virol 64: 5716-5729

14.Inocencio NM, Moehring JM, Moehring TJ (1993) A mutant CHO-K1 strain with resistance to *Pseudomonas* exotoxin A is unable to process the precursor fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. J Virol 67: 593-595

15.Tufaro F, Snider MD, McKnight SL (1987) Identification and characterization of a mouse cell mutant defective in the intracellular transport of glycoproteins. J Cell Biol 105: 647-657

16.Wang R-H, Colbaugh PA, Kao C-Y, Rutledge EA, Draper RK (1990) Impaired secretion and fluid-phase endocytosis in the End4 mutant of chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 265: 20179-20187

17.Watson DG, Moehring JM, Moehring TJ (1991) A mutant CHO-K1 strain with resistance to *Pseudomonas* exotoxin A and alphaviruses fails to cleave sindbis virus glycoprotein PE2. J Virol 65: 2332-2339

18.Whealy ME, Robbins AK, Tufaro F, Enquist LW (1992) A cellular function is required for pseudorabies virus envelope glycoprotein processing and virus egress. J Virol 66: 3803-3810

19.Jarvis AP, Colby C (1978) Murine interferon system regulation: isolation and characterization of a mutant 3T6 cell engaged in the semiconstitutive synthesis of interferon. Cell 14: 355-363

20.Jarvis AP, White C, Ball A, Gupta SL, Ratner L, Sen GC, Colby C (1978) Interferon-associated, dsRNA-dependent enzyme activities in a mutant 3T6 cell engaged in the semiconstitutive synthesis of interferon. Cell 14: 879-887

21.Morgan MJ, Colby C, Hulse JLN (1973) Isolation and characterization of virus-resistant mouse embryo fibroblasts. J Gen Virol 20: 377-385

22.Hara T, Hattori S, Kawakita M (1989) Isolation and characterization of mouse FM3A cell mutants which are devoid of Newcastle disease virus receptors. J Virol 63: 182-188

23.Hara T, Endo T, Furukawa K, Kawakita M, Kobata A (1989) Elucidation of the phenotypic change on the surface of Had-1 cell, a mutant cell line of mouse FM3A carcinoma cells selected by resistance to Newcastle disease virus infection. J Biochem 106: 236-247

24.Hara T, Yamauchi M, Takahashi E, Hoshino M, Aoki K, Ayusawa D, Kawakita M (1993) The UDP-galactose translocator gene is mapped to band Xp11.23-p11.22 containing the Wiskott-Aldrich syndrome locus. Somat Cell Genet 19: 571-575

25.Koyama H, Ayusawa D, Okawa M, Takatsuki A, Tamura G (1982) Tunicamycin-resistant mutations in mouse FM3A cells. Mutat Res 96: 243-258

26.Koyama H, Kodama H (1982) Adenine phosphoribosyltransferase deficiency in cultured mouse mammary tumor FM3A cells resistant to 4-carbamoylimidazolium 5-olate. Cancer Res 42: 4210-4214

27.Ausawa D, Koyama K, Iwata K, Seno T (1981) Selection of mammalian thymidine auxotrophic cell mutants defective in thymidylate synthase by their reduced sensitivity to methotrexate. Somat Cell Genet 7: 523-534

28.McKendry R, Pellegrini S, Kerr IM, Stark GR (1994) Constitutive production of alpha and beta interferons in mutant human cell lines. J Virol 68: 4057-4062

29.Müller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur AG, Barbieri G, Witthuhn BA, Schindler C, Pellegrini S, Wilks AF, Ihle JN, Stark GR, Kerr IM (1993) The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-α/β and -γ signal transduction. Nature 366: 129-135

30.Pellegrini S, John J, Shearer M, Kerr IM, Stark GR (1989) Use of a selectable marker regulated by alpha interferon to obtain mutations in the signaling pathway. Mol Cell Biol 9:

4605-4612

31. Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S (1992) A protein tyrosine kinase in the interferon α/β signaling pathway. Cell 70: 313-322

32. John J, McKendry R, Pellegrini S, Flavell D, Kerr IM, Stark GR (1991) Isolation and characterization of a new mutant human cell line unresponsive to alpha and beta interferons. Mol Cell Biol 11: 4189-4195

33. McKendry R, John J, Flavell D, Müller M, Kerr IM, Stark GR (1991) High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both α and γ interferons. Proc Natl Acad Sci USA 88: 11455-11459

34. Müller M, Laxton C, Briscoe J, Schindler C, Improta T, Darnell JE Jr, Stark GR, Kerr IM (1993) Complementation of a mutant cell line: central role of the 91 kDa polypeptide of ISGF3 in the interferon-α and -γ signal transduction pathways. EMBO J 12: 4221-4228

35. Fujita T, Kimura Y, Miyamoto M, Barsoumian EL, Taniguchi T (1989) Induction of endogenous IFN-α and IFN-β genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. Nature 337: 270-272

36. Harada H, Willison K, Sakakibara J, Miyamoto M, Fujita T, Taniguchi T (1990) Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. Cell 63: 303-312

37. Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T, Taniguchi T (1988) Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-β gene regulatory elements. Cell 54: 903-913

38. Reis LFL, Harada H, Wolchok JD, Taniguchi T, Vilček J (1992) Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-β and IFN-inducible genes. EMBO J 11: 185-193

39. Lengyel P (1982) Biochemistry of interferons and their actions. Ann. Rev. Biochem. 51: 251-282

40.Pestka S, Langer JA (1987) Interferons and their actions. Ann. Rev. Biochem. 56: 727-777

41.Samuel CE (1988) Mechanisms of the antiviral action of Interferons. Prog.nucleic acid Res. Mol. Biol. 35: 27-72

42.Ishida N, Taira H, Omata T, Mizumoto K, Hattori S, Iwasaki K, Kawakita M (1986) Sequence of 2,617 nucleotides from the 3' end of Newcastle disease virus genome RNA and the predicted amino acid sequence of viral NP protein. Nucleic Acids Res 14: 6551-6564

43.喩忠、永井美之 (1994) 第42回日本ウイルス学会総会演説抄録 221

44.Katze MG (1992) The war against the interferon-induced dsRNA-activated protein kinase: Can viruses win? J. interferon Res. 12: 241-248

Cells applied ($x10^{-6}$)		RBC*2	Cells recovered*3 ($x10^{-6}$)
uninfected	infected*1		
5.0	—	−	2.9
—	5.0	−	1.1
2.5	2.5	−	2.0
5.0	—	+	2.1
—	5.0	+	0.018
2.5	2.5	+	0.89

表1　フィコール上での遠心による非感染FM3A細胞および NDV感染FM3A細胞の分離

*1: FM3A細胞に15PFU/cellのNDVを感染させ、10時間培養した。

*2: 鶏赤血球

*3: フィコール層と水層の境界に残った細胞を回収し、計数した。

Treatment	(–)	Heat *2	Trypsin *3	DNase *4	RNase *5	Acid *6
Activity *1	＋	－	－	＋	＋	＋

表２　高密度Had-2細胞由来培養上清の各種処理に対する安定性

*1: Had-2細胞を高密度（５×10^6cells/ml）で接種し、10時間培養後に培養上清を採取した。この培養上清に各処理を行った後、Had-2細胞を低密度（2.5×10^3cells/ml）で接種し、24時間培養後にNDV抵抗性を測定した。

*2: 70℃で10分間保温した。

*3: 10μg/mlのトリプシンを加え、37℃で１時間保温した後、１mg/mlのトリプシンインヒビターを加えた。

*4: 10μg/mlのDNaseIを加え、37℃で１時間保温した。

*5: 10μg/mlのRNaseAを加え、37℃で１時間保温した。

*6: 1/20量の35％HClを加え（pH２）、４℃で３日間静置した。

Cell Type	Cell Density	IFN concentration (U/ml)	
		−NDV*1	+NDV*2
FM3A	$2x10^5$cells/ml	0	$3x10^3$~10^4
Had-2	$2x10^5$cells/ml	64	$3x10^3$
	$5x10^4$cells/ml	8	
	$2.5x10^3$cells/ml	0.25*3	

表３　FM3A細胞およびHad-2細胞の非感染時、NDV感染時における IFN産生

*1: 各細胞を表中に示した細胞密度で24時間培養後に培養上清を採取し、IFN活性を測定した。

*2: 各細胞に100PFU/cellのNDVを感染させ、24時間後に培養上清を採取し、塩酸を加えてpH２に合わせ、４℃に３日間静置してウイルスを不活化した後、IFN活性を定量した。

*3: 硫安沈澱法で濃縮後にIFN活性を定量した。

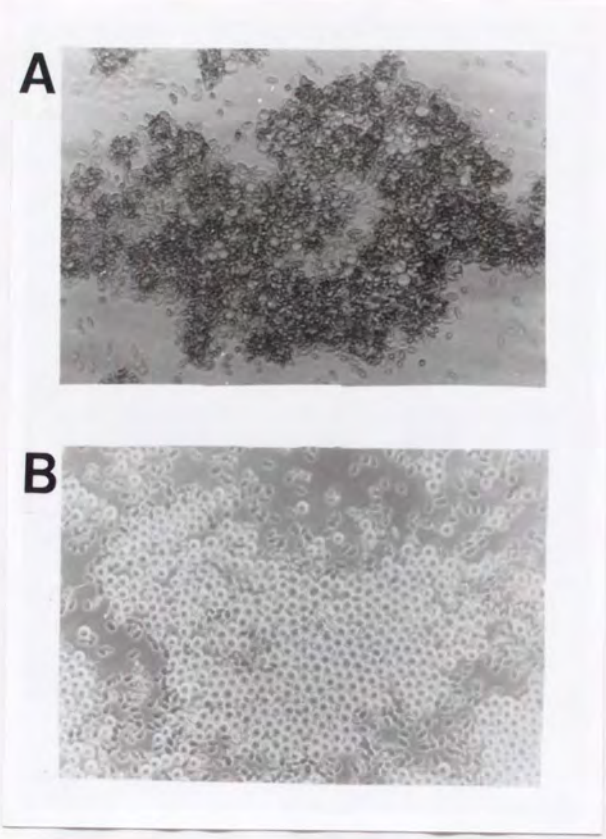


図１　FM3A細胞およびHad-2細胞のNDV感染後の赤血球吸着

各細胞（１×10⁴cells/6 -cmφdish）を0.5％FCS-ES中で４日間培養して密な細胞集団をつくらせ、15PFU/cellのNDVを感染させて10時間後にHad testを行った。FM3A細胞（Ａ）は完全に赤血球に覆われているが、Had-2細胞（Ｂ）は赤血球を吸着せず、細胞が露出して見える。

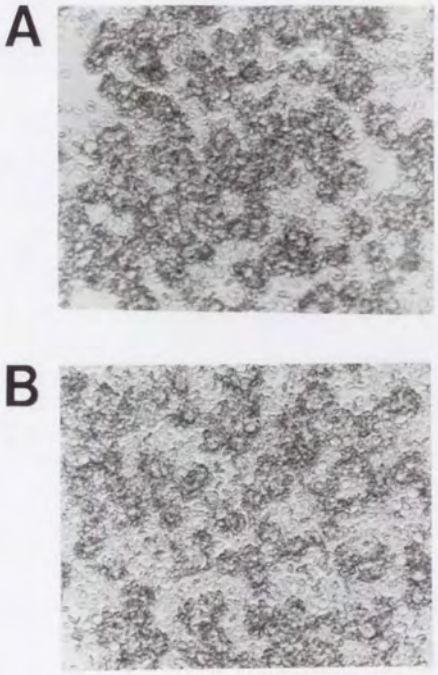


図２　FM3A細胞およびHad-2細胞のHVJ感染後の赤血球吸着

各細胞（１×10⁶cells/6 -cmφdish）を0.5%FCS-ES中で１時間培養してシャーレに付着させ、15PFU/cellのHVJを感染させて10時間後にHad testを行った。FM3A細胞（Ａ）およびHad-2細胞（Ｂ）いずれも赤血球を吸着している。

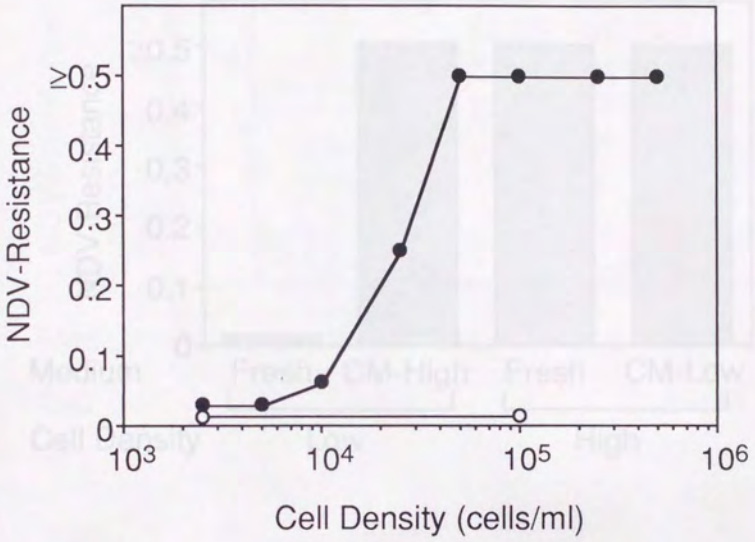


図３　Had-2細胞のNDV抵抗性の細胞密度依存性

FM3A細胞（○）およびHad-2細胞（●）を横軸に示した細胞密度で接種し　24時間培養後にそれぞれ１×10^5細胞を用いて＜材料と方法＞に記した方法でNDV抵抗性を測定した。

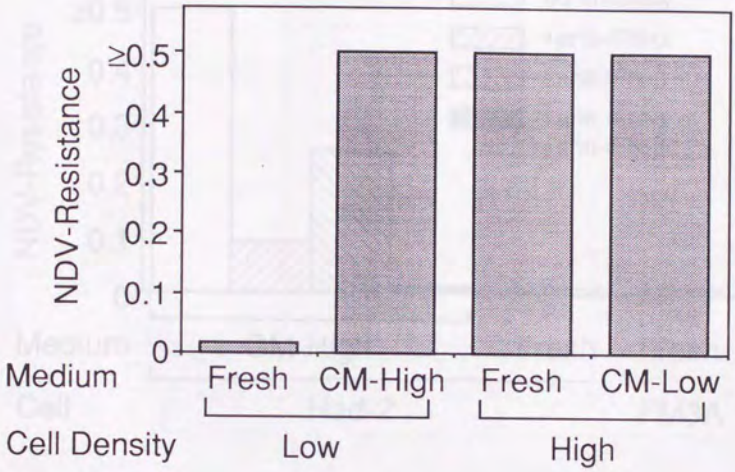


図４　高密度Had-2細胞由来の培養上清中のNDV抵抗性誘導活性

Had-2細胞を高密度（５×10^5cells/ml）あるいは低密度（５×10^3cells/ml）で接種して10時間培養した後に培地を回収し、900×g、５分間の遠心後に得られた上清を培養上清とした（CM-High; 高密度Had-2細胞由来、CM-Low; 低密度Had-2細胞由来）。これらの培地中に、図中に示した組み合わせで新たにHad-2細胞を低密度（2.5×10^3cells/ml）あるいは高密度（５×10^5cells/ml）で接種し、24時間培養後にそれぞれ１×10^5細胞を用いてNDV抵抗性を測定した。

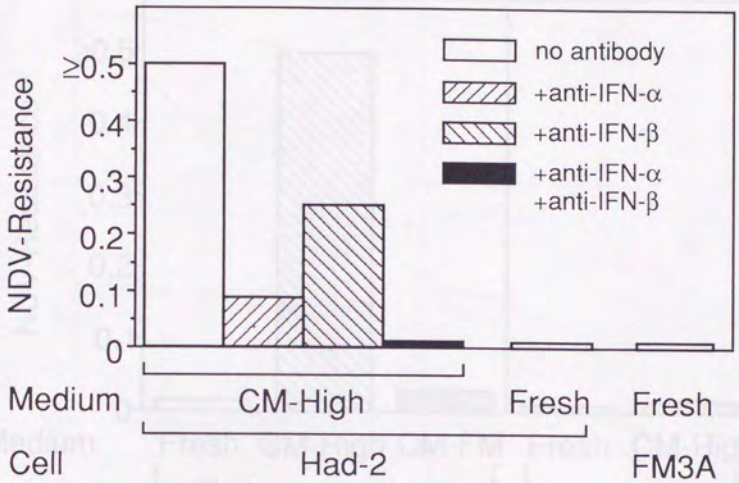


図５　高密度Had-2細胞由来の培養上清のNDV抵抗性誘導活性に対する抗IFN抗体の効果

Had-2細胞を２×10⁴cells/mlで接種し、３日間培養後に培養上清を調製した（CM-High）。この培養上清（２ml）に抗IFN-α抗体および抗IFN-β抗体を単独あるいは同時に加えて（10U）37℃で30分間保温後、培地で５倍に希釈した。図中に示した処理を行った培地中にHad-2細胞を低密度（2.5×10³cells/ml）で接種し、24時間培養後にNDV抵抗性を測定した。

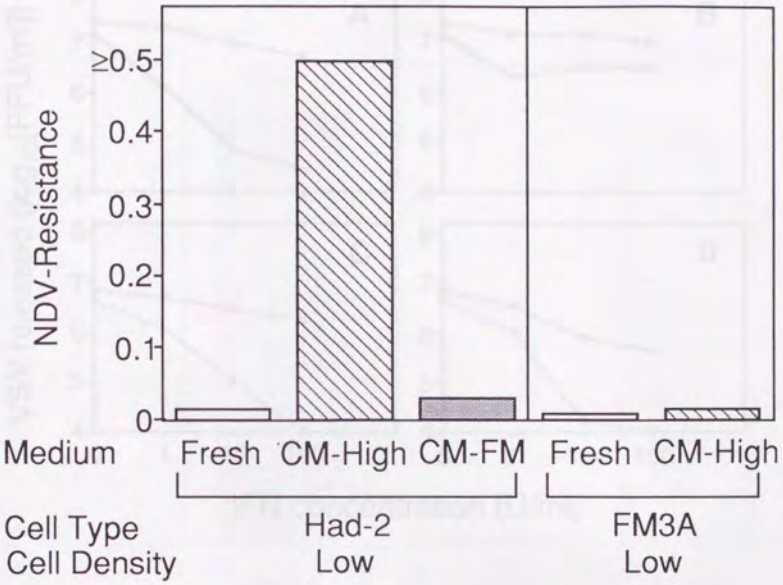


図6　FM3A細胞およびHad-2細胞由来の培養上清の各細胞に対する効果

FM3A細胞およびHad-2細胞を高密度（5×10⁵cells/ml）で10時間培養し、培養上清を調製した（CM-FM; FM3A細胞由来、CM-High; Had-2細胞由来）。これらの培地中にHad-2細胞およびFM3A細胞を図中に示した組み合わせで、低密度（2.5×10³cells/ml）で接種し、24時間培養後にNDV抵抗性を測定した。

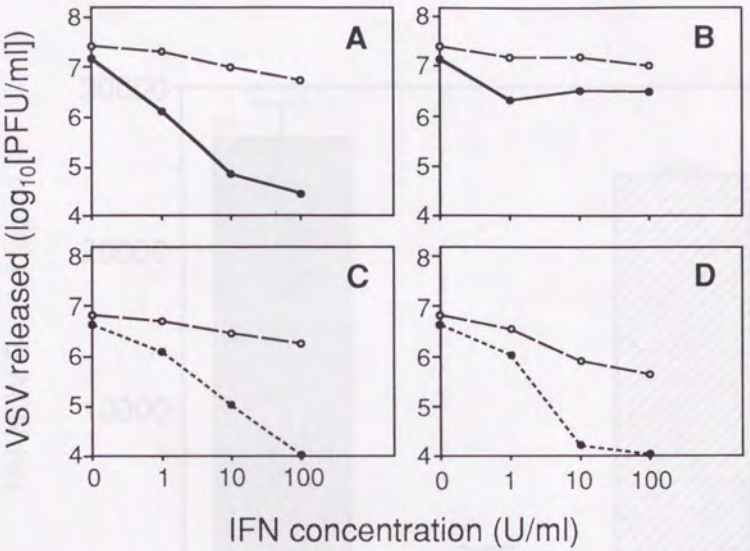


図７　FM3A細胞、Had-2細胞、およびＬ929細胞のIFN感受性

（Ａ、Ｂ）低密度（2.5×10³cells/ml）のFM3A細胞（○）およびHad-2細胞（●）を横軸に示した濃度のIFN-β（Ａ）あるいはIFN-γ（Ｂ）で24時間処理した後、VSV（５PFU/cell）を感染させ、感染12時間後に培養上清中に放出されたウイルス量を、Ｌ929細胞を用いたプラークアッセイでウイルス量を定量した。

（Ｃ、Ｄ）１×10⁵cells/mlのFM3A細胞（○）およびＬ929細胞（●）をIFN-β（Ｃ）あるいはIFN-γ（Ｄ）で処理し、（Ａ、Ｂ）と同様に放出ウイルス量の測定を行った。

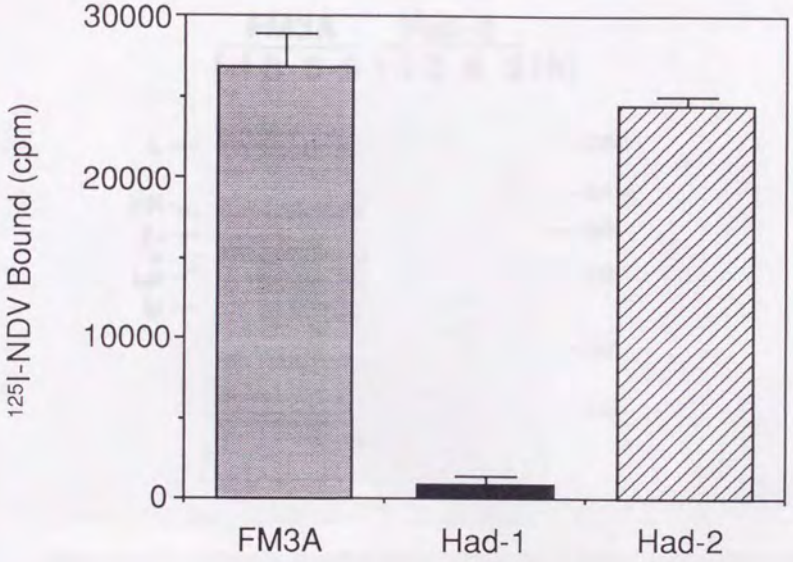


図８　Had-2細胞へのNDVの吸着

各細胞（２×10⁶）を^{125}I-標識NDV（１×10⁵cpm、10ng）とともに37℃で１時間保温し、冷PBSで洗浄した後、細胞に吸着して残った放射能量を測定した。100倍量の非標識NDVを加えて同様の測定を行い、その値を非特異的な吸着によるものとして差し引いた。各細胞について３回ずつ測定を行い、その平均値と標準偏差を示した。

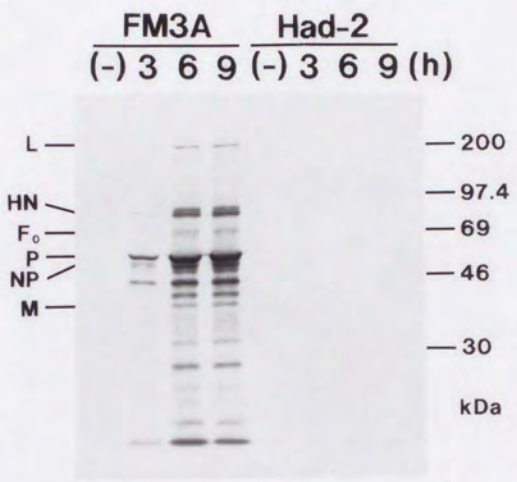


図９　Had-2細胞におけるNDVタンパク質合成

FM3A細胞およびHad-2細胞に100PFU/cellのNDVを感染させ、３、６、９時間後に［^{35}S］メチオニンで１時間標識した。細胞溶解液50μgを用い、抗NDV抗血清で免疫沈降を行い、SDS-PAGEで分離した。検出はイメージアナライザーを用いて行った。NDVタンパク質の泳動位置を左に、マーカータンパク質の位置を右に示した。

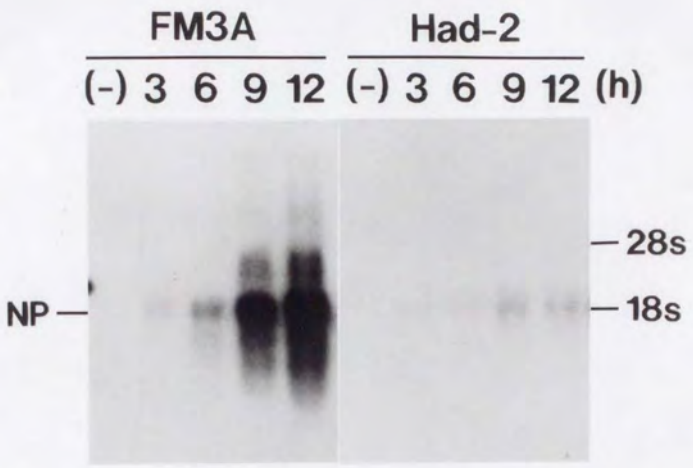


図10　Had-2細胞におけるNDVmRNAの蓄積

FM3A細胞およびHad-2細胞に20PFU/cellのNDVを感染させ、3、6、9、12時間後に細胞を回収して全RNAを抽出した。RNA（20μg）をホルムアルデヒドを含むアガロースゲル中で分離した後、ナイロン膜に転写し、NDVのNPタンパク質のcDNAの一部をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。NPmRNAの位置を左に、リボソームRNAの位置を右に示した。

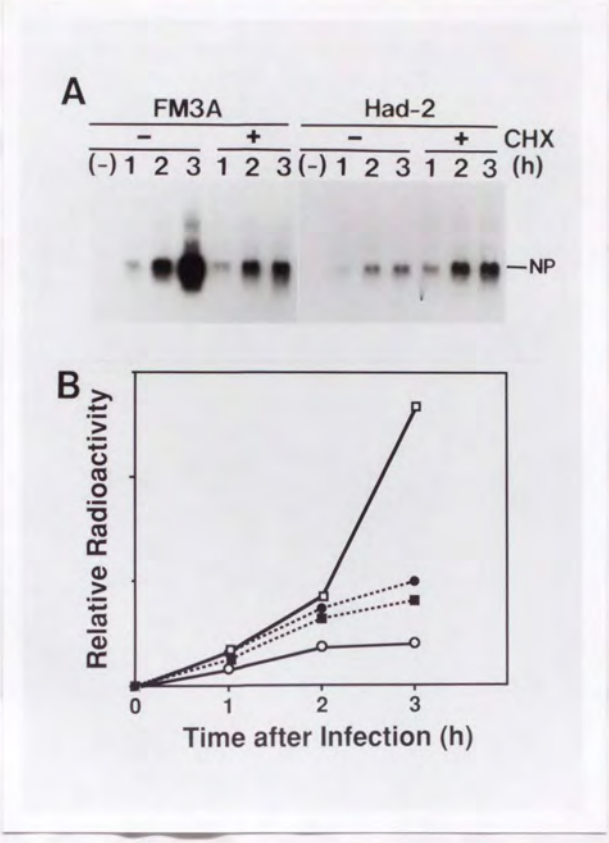


図11　Had-2細胞におけるNDVの一次転写の阻害

（A）FM3A細胞およびHad-2細胞に、シクロヘキシミド存在下（50μg/ml）あるいは非存在下でNDVを感染させ、1、2、3時間後の細胞を回収してRNAを抽出し、図10と同様にノーザンハイブリダイゼーションを行った。NPmRNAの位置を右に示した。CHX: シクロヘキシミド

（B）（A）の結果をイメージアナライザーで定量化した。

□：FM3A　　■：FM3A＋シクロヘキシミド

○：Had-2　　●：Had-2＋シクロヘキシミド

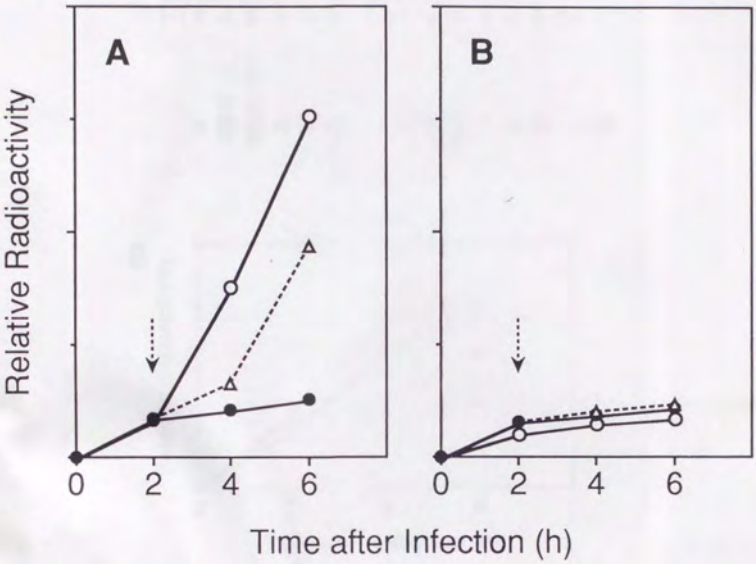


図12　Had-2細胞におけるNDVの二次転写の阻害

FM3A細胞（A）およびHad-2細胞（B）に、シクロヘキシミド存在下（●）あるいは非存在下（○）でNDVを感染させ、2、4、6時間後の細胞、および、シクロヘキシミド存在下で感染させ、2時間後にシクロヘキシミドを除き、さらに2、4時間培養した細胞（△）からRNAを抽出し、図10と同様にノーザンハイブリダイゼーションを行った。結果はイメージアナライザーで定量化し、グラフ化した。

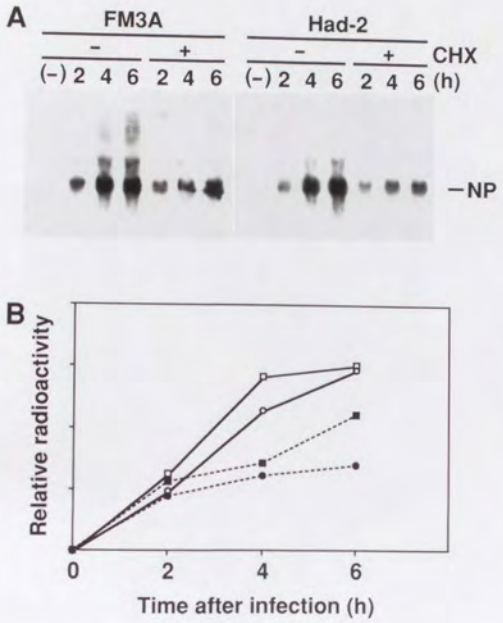


図13　Had-2細胞のHVJ感受性

（A）FM3A細胞およびHad-2細胞にシクロヘキシミド存在下あるいは非存在下で20PFU/cellのHVJを感染させ、2、4、6時間後に細胞を回収して全RNAを抽出した。図10と同様のノーザンハイブリダイゼーションを、HVJのNPタンパク質のcDNAをプローブとして行った。

（B）（A）の結果を定量化した。

□：FM3A　　■：FM3A＋シクロヘキシミド

○：Had-2　　●：Had-2＋シクロヘキシミド

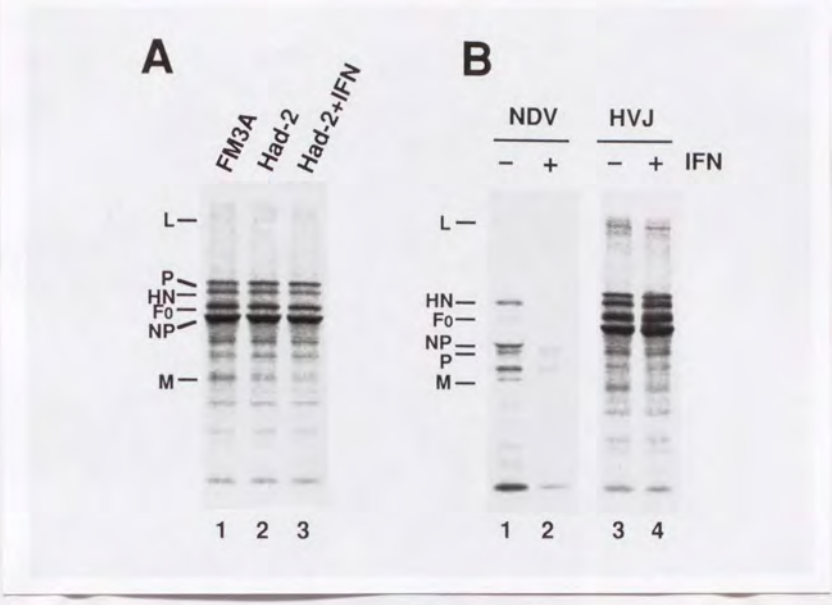


図14　Had-2細胞およびL929細胞におけるHVJタンパク質合成

（A）FM3A細胞、Had-2細胞、および、100U/mlのIFN-β で24時間処理したHad-2細胞に100PFU/cellのHVJを感染させ、感染8時間後から1時間［^{35}S］メチオニンで標識した。細胞溶解液50μgを用い、抗HVJ抗血清で免疫沈降を行い、SDS-PAGEで分離後、イメージアナライザーで解析した。HVJタンパク質の泳動位置を左に示した。

（B）IFN-β（100U/ml）で24時間処理したL929細胞（レーン2、4）、および処理していないL929細胞（レーン1、3）に100PFU/cellのNDV（レーン1、2）あるいはHVJ（レーン3、4）を感染させ、感染8時間後から1時間［^{35}S］メチオニンで標識した。細胞溶解液50μgを用い、それぞれのウイルスに対する抗血清で免疫沈降を行い、SDS-PAGEで分離後、イメージアナライザーで解析した。NDVタンパク質の泳動位置を左に示した。

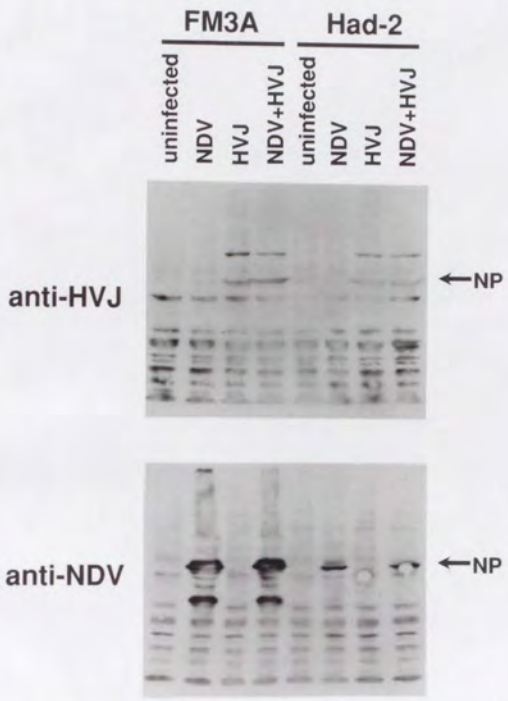
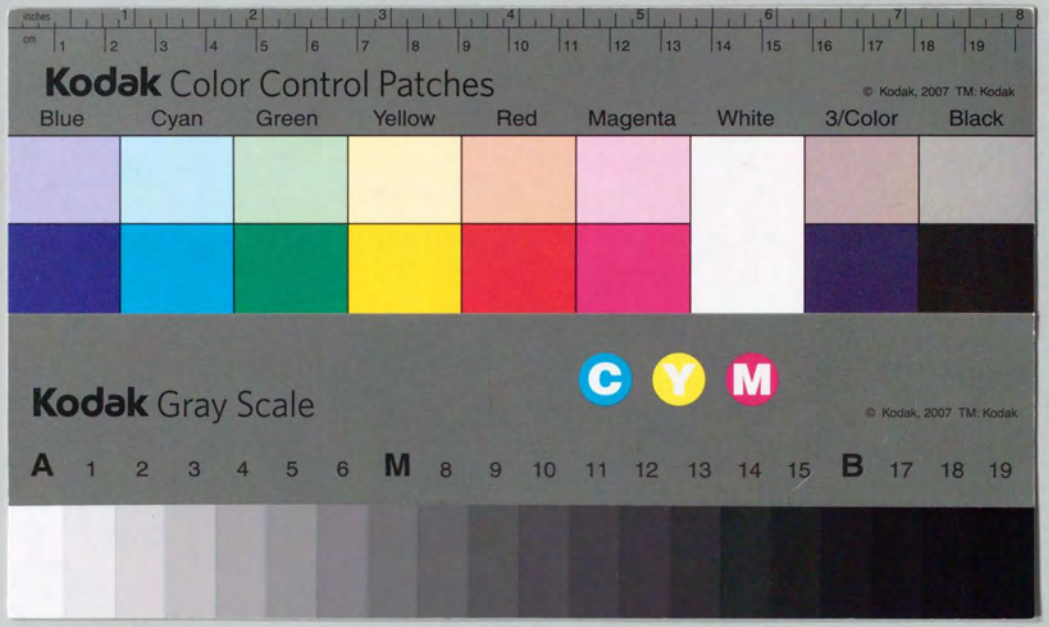


図15　Had-2細胞におけるNDVおよびHVJの同時感染

FM3A細胞およびHad-2細胞に100PFU/cellのNDVおよびHVJをそれぞれ単独あるいは同時に感染させ、感染6時間後に細胞を回収して溶解した。溶解液をSDS-PAGEで分離後PVDF膜に転写し、抗HVJ抗血清（上）あるいは抗NDV抗血清（下）を一次抗体として用い、プロテインA-HRP複合体による検出反応を行った。各ウイルスのNPタンパク質の位置を右に示した。


inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black
C Y M
Kodak Gray Scale
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19