



Title	Moesin Is Not a Receptor for Measles Virus Entry into Mouse Embryonic Stem Cells
Author(s)	土井, 喜宣
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40789
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	土 井 喜 宣
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 7 2 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Moesin Is Not a Receptor for Measles Virus Entry into Mouse Embryonic Stem Cells. (モエシンは ES 細胞において麻疹ウイルスのレセプターではない)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松澤 佑次 (副査) 教 授 高井 義美 教 授 山西 弘一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

モエシンは、微絨毛、細胞分裂時の分裂溝などアクチンフィラメントが細胞膜に密に結合しているところに濃縮し、細胞膜とアクチンフィラメントのクロスリンカーとして機能していると考えられている。一方、ウイルス学の分野において、1994年に Dunster らのグループは、ヒト、サル、マウスの様々な細胞株で抗モエシンモノクローナル抗体が麻疹ウイルスの感染を阻害することから、モエシンを CD46 以外の麻疹ウイルスレセプターであると考え、さらにモエシンと CD46 が細胞表面で協調して機能しているというモデルを提案した。しかし、最近、Devaux らにより、抗モエシン抗体が CD46 と cross-react することにより麻疹ウイルス感染に対する阻害効果をもたらしているのではないかという否定的な報告がなされ、モエシンが麻疹ウイルスレセプターであるかどうかについては論争中であった。そこで、本研究では、この論議に対して最終的な結論を見い出すことを目的として、ジーンターゲティング法により単離したモエシン欠失 ES 細胞と wild-type の ES 細胞およびこれらにヒト CD46 を導入した細胞を用いて、麻疹ウイルスの感染効率に違いがあるかどうかを検討した。

【方法ならびに成績】

1) ターゲティングベクターの作製

すでに得られているモエシンの cDNA をプローブにして、129マウスの genomic library からモエシンのゲノムを単離し、これをもとに replacement type のターゲティングベクターを作製した。エクソン 3 の 3' 側を含む 0.7kb fragment を抜いて LoxP-PGKneo カセットを挿入しポジティブセレクションをかけ、さらにこのすぐ 3' 側にスプライシングアクセプターとポリ A シグナルを挿入した。また 3' 末に DT-A カセットを付けてネガティブセレクションをかけた。

2) モエシン欠失 ES 細胞の単離

ターゲティングベクター DNA を ES (J1) 細胞にエレクトロポレーション法で導入し、G418 で選別した。スクリーニングは 3' プローブを用いたサザンブロットで行い、470 個の G418 耐性クローン中 2 個のポジティブクローンを得た。これら 2 つのクローンは、さらに 5' プローブおよび neo プローブを用いたサザンブロットでターゲティングベクター

が相同な位置に1コピーのみ組み込まれていることを確認した。また、RT-PCR およびウエスタンブロットでモエシンが発現していないことを確認した。

3) ヒトCD46発現ES細胞の単離

CD46のcDNA (STc / CYT2) を発現ベクター PCXN2に組み込み、これと PGK^{hph} を wild-type のES細胞と2つのモエシン欠失ES細胞クローンにエレクトロポレーション法を用いて共発現させ、ハイグロマイシンBで選別した。耐性クローンの中からCD46の発現量が同レベルのクローンをフローサイトメトリーで単離した。

4) 麻疹ウイルス感染実験

i) 合胞体形成: Vero細胞を用いて調整した高タイターの Nagahata strain を段階希釈し、wild-type のES細胞とモエシン欠失ES細胞およびこれらにヒトCD46を発現させたES細胞への麻疹感染効率を合胞体形成をマーカーとして測定した。CD46を発現していないES細胞は、麻疹ウイルス感染に対し抵抗性であり、感染成立には極めて多いウイルスdoseを必要とした。CD46を発現させたES細胞では、CD46を発現していないES細胞に比べ約100倍感染効率を高めた。いずれの場合もモエシン発現の有無による感染効率の違いはなかった。モエシン発現の有無による唯一の違いは合胞体の形態であった。CD46の発現にかかわらず、wild-type のES細胞では他の細胞でも観察される典型的な合胞体の形態を示したが、モエシン欠失ES細胞では断片化した形態を示した。

ii) ウイルスの複製: 3つのstrain (Edmonston, Toyoshima, Nagahata) をdoseを変えて (1000 or 25000pfu / well) wild-type のES細胞、モエシン欠失ES細胞、およびこれらにヒトCD46を発現させたES細胞に感染させた後、培養上清の plaque forming activity を測定した。CD46を発現していないES細胞では、いずれのstrain でも1000pfu / well のウイルス感染後の培養上清に plaque forming activity はなかったが、CD46を発現させたES細胞では plaque forming activity を認めた。またヒトCD46を発現していないES細胞でもウイルスdoseを25000pfu / well に上げると plaque forming activity を認めた。いずれの場合もモエシン発現の有無による違いはなかった。

5) 細胞表面でのモエシンの発現

ES細胞他いくつかの細胞株について、モエシンが細胞表面に発現しているかどうかを二種類の抗体を用いてフローサイトメトリーで調べた。いずれの場合もモエシンは細胞表面には認識されなかった。

6) CD46とモエシンの局在

ヒトCD46発現ES細胞およびCHO細胞におけるモエシンとCD46の局在を蛍光抗体法を用いた二重染色で調べた。細胞のlateral側にはCD46とモエシンが共に局在しているが、微絨毛にはモエシンのみしか発現していなかった。

【総括】

本研究では、ジーンターゲティング法により作成したモエシン欠失ES細胞とwild-typeのES細胞、およびこれらにヒトCD46を発現させたES細胞を用いて麻疹ウイルス感染実験を行い、モエシン発現の有無にかかわらず麻疹感染効率に違いがないという結果を得た。また、フローサイトメトリーでモエシンが細胞表面に発現していないことを確認した。以上のことから、モエシンが麻疹ウイルスのレセプターではないこと、さらにモエシンがCD46のレセプター機能に影響しないことを明らかにした。また、本研究ではモエシン欠失により合胞体の形態異常を認めた。モエシンは、現在、ラディキシン、エズリンとともに細胞膜とアクチンフィラメントのクロスリンカーとして機能していると考えられているが、本研究結果からモエシンが細胞の形態変化に関わる重要な因子であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

CD46が麻疹ウイルスのレセプターであることは現在確立されているが、モエシンがCD46以外の麻疹ウイルスレセプターであるかどうかについては論争中であった。そこで、本申請者は、本研究において、この論議に対して最終的な結論を見出すことを目的として、ジーンターゲティング法により単離したモエシン欠失ES細胞と wild-type のES細胞、およびこれらにヒトCD46を導入した細胞を用いて麻疹ウイルス感染実験を行った。その結果、モエシンの発現の有無にかかわらず麻疹ウイルスの感染効率に違いがないことから、モエシンが麻疹ウイルスのレセプターではないこと、さらにモエシンがCD46のレセプター機能に影響しないことを明らかにした。また、本研究ではモエシン欠失により合胞体の形態異常がおこることを発見し、モエシンが合胞体の形態変化に関わる重要な因子であることを示唆した。

本研究でのモエシン欠失ES細胞を用いるという戦略は、モエシンが麻疹ウイルスのレセプターであるかどうかという議論に結論をだすために現時点で可能な最も直接的な手段であり高く評価できる。また、本研究で得られた実験結果は、ウイルス学の分野のみならず、細胞生物学の分野においても極めて貢献度の高いものである。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。