



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13723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ク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 blot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 blot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 およびウェスタンプ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 PGKhph を wild-type の ES細胞と 2つのモエシン欠失 ES 細胞クローニング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。耐性クローニングの中から CD46の発現量が同レベルのクローニング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マーの 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) ウィルスの複製：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ク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ストラテジーは、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。