

ヒト腸管上皮細胞におけるロタウイルスの認識機構

日大生産工 (院) ○佐藤 岳

日大歯 浅野 岳正 日大歯 小宮山 一雄

日大生産工 (日大院総科) 野呂 知加子

1. 緒言

ロタウイルスは世界中でみられる小児ウイルス性腸炎の原因の一つである。生後 6 ヶ月から 2 歳の乳幼児に多くみられ、主な症状として嘔吐と米のとぎ汁のような白色の下痢が特徴で、発熱を伴う場合が多く重症度が高い。潜伏期間は約 2 日で 3~8 日程度で治ることがほとんどであるが、途上国のアフリカ・東南アジアを中心に毎年 600,000 人の乳幼児が亡くなっている。ロタウイルスは 1973 年に見つかったウイルスでレオウイルス科に属し、2 層のタンパク質の殻に覆われ、内部に 11 本の分節状 2 本鎖 RNA(double-stranded RNA)ゲノムから成るウイルスで、直径は約 70nm である。また、ロタウイルスでは全て経口的に摂取され、小腸に到達すると絨毛突起先端部の上皮細胞で増殖する。

ウイルスは細菌の様に自己で増殖せず、動物細胞をはじめ細菌、真菌等の生細胞に侵入し、感染細胞の代謝機能を借用して自己の複製を行っている。ヒトを含む高等動物は細菌やウイルスに対して自然免疫と獲得免疫の 2 種類の感染防御システムを備え持っており、両免疫系を協調的に働かせることで病原体から身を守っている。自然免疫ではウイルス感染に伴い、一連のシグナル伝達を通して炎症性サイトカインやインターフェロン(IFN)の産生が誘導される。近年、ロタウイルス感染は有意に Type III IFN 産生を誘導することが示された。この事実はヒト腸管上皮細胞である HT-29 を用いた *in vitro* の実験系でも確認さ

れている。しかし、同じヒト腸管上皮細胞である Caco2 を用いて同様の感染実験を行ったところ、Type III IFN 産生が全く誘導されることが分かった。

本研究では、この細胞の種類による Type III IFN の産生誘導のメカニズム解明を目的とした。まずはじめに、HT-29 では発現しているが、Caco2 では発現していない遺伝子を PCR Array を用い調べたところ、PYCARD というタンパク質の発現量が両細胞間で大きく異なることが判明し、HT-29 で多く発現していることがわかった。そこで、PYCARD が Type III IFN の産生誘導において重要な役割を担っていると考え研究を行った。

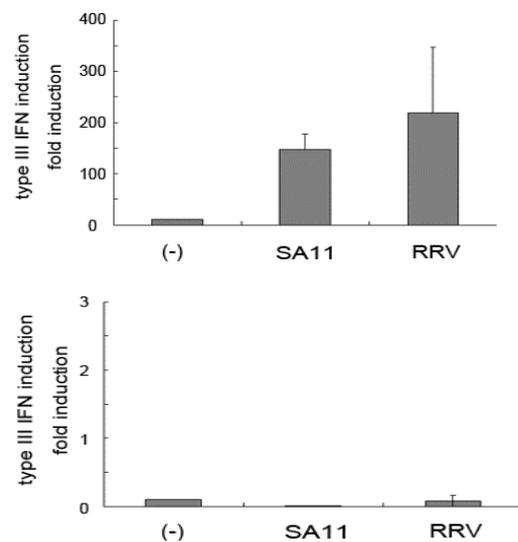


Fig.1 HT 29 と Caco2 での、Type III IFN 発現量の違い(上:HT29/下:Caco2)

2. 実験

2.1 使用した細胞

Recognition mechanism of rotavirus in human intestinal epithelial cells

Gaku SATO, Masatake ASANO, Kazuo KOMIYAMA and Chikako YOSHIDA-NORO

本研究では、口腔由来の上皮細胞株 Ca9-22、ヒト結腸線癌由来の細胞株 HT-29、ヒト結腸癌由来の細胞株 Caco2 を用いた。

2.2 Type III IFNとPYCARD

IFN は、ウイルス感染などで誘導されるタンパク質で抗ウイルス活性がある。Type III IFN(IFN- λ)は IL-28A、IL-28B、IL-29 の3つから成り、Type I IFN と共に抗ウイルス作用を行うと考えられている。PYCARD は N 末端に CARD ドメインを持っており、dsRNA を認識し下流にシグナルを伝達する。また、アポトーシスに関係があると考えられている。

2.3 実験操作

2.3.1 Western Blotting

PYCARD のインサートが入ったベクターからプラスミドを精製し、Ca9-22 の細胞と Caco2 の両細胞にトランスフェクションを行った。それぞれライセートを回収し、遠心後の上澄みをサンプルとし、Western Blotting によりトランスフェクションの確認を行った。

2.3.2 二次元電気泳動/銀染色

SA11(rotavirus)をHT-29の細胞に感染させたものと、させていないもののサンプルを用い、二次元電気泳動を行った後に銀染色によりタンパク質の染色を行い、スポットの違いを比較した。

3.結果と考察

Western BlottingによるPYCARDの発現を確認したところ、トランスフェクションを24h 行ったサンプルにおいて、25kDa付近にバンドを確認出来た。このことからCaco2にPYCARDをトランスフェクション出来ることが分かった。SA11を細胞に感染させたものと、させていないサンプルでの二次元電気泳動後、銀染色により両サンプル間で、同じ場所または違う場所にあるスポットをそれぞれ確認することが出来た。

今後の実験で、実際にType III IFNが発現をみるために、Caco2にPYCARDをトランスフ

ェクションした後にSA11を感染させる予定である。

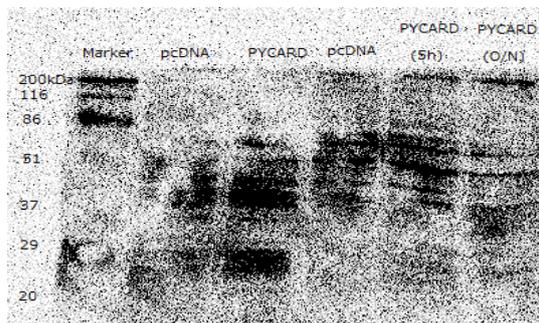


Fig.2 Western BlottingによるPYCARDの発現確認

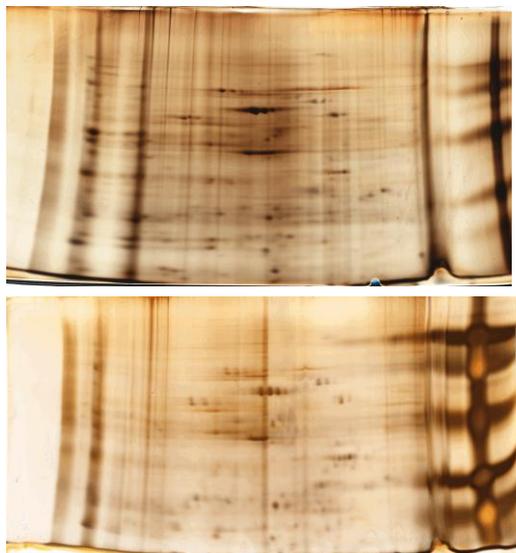


Fig.3 SA11感染の有無による銀染色でのタンパク質スポットの比較(上:陽性/下:陰性)

参考文献

- 1) John Hiscott., “IFN- λ determines the intestinal epithelial antiviral host defense” (2011)
- 2) Mario Barro and John T. Patton “Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3” (2005)
- 3) 呉 成旭, 米山 光俊, 藤田 (2008) 『細胞内ウイルスRNA センサーRIG-I の認識構造と機能』 ウイルス 第58 巻 第2 号, pp.97-104
- 4) 植松 智, 審良 静男 (2006) 『自然免疫におけるウイルス感染認識機構』 ウイルス 第56 巻 第1号, pp.1-8