

5. 培養細胞のポリオウイルス感受性

— Enders への回答 —

小 池 智

東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門

ポリオウイルスは急性灰白髄炎のウイルスであり、脊髄前角の運動神経細胞など中枢神経系に感染して重篤な病変を生じさせるが、神経系以外の組織ではよく増えることができない。in vivoでは厳格にこの組織特異性が存在するにも関わらず、in vitroでは霊長類の単層培養細胞ではどの組織に由来したものであれ殆ど例外なくポリオウイルスは非常によく増殖する。細胞がウイルス感受性を獲得するには生体内からシャーレへ環境変化の過程で、なんらかの細胞内環境が変化することが必要であると考えられていた。この疑問は永らく未解決のままであったが、我々は正常の生体内の状態で維持されている素速く、かつ強力なIFNの応答能力が培養細胞においては低下するためウイルス感受性を獲得するようになることを明らかにした。

1. はじめに

ポリオウイルスはHeLa細胞などの培養細胞株で簡単に増殖させることができる。ウイルス学を研究しているラボに入門すればまず最初に培養細胞にウイルスを感染させる方法を習い、それをプラーク法などで定量することを習うであろう。ところが古いウイルス学の論文を読むとウイルスが存在することは動物に接種し発症することにより証明されており、現代と同様の方法でタイターは記載されていない。たとえばはじめてポリオウイルスがトランスミッション可能であることを証明したのもポリオのために死亡したヒト脳のホモジネートをサルに接種し同様の病理学的所見が観察されたことによっている¹⁾。ウイルスの継代もサルの脊髄のホモジネートを別の個体に接種するという方法で行われ、定量性もホモジネートを何倍かに希釈して接種したという具合に記載されているのみである²⁾。Theiler's

murine encephalomyelitis virusが分離された頃の論文をみると、ウイルスが存在することを示すために組織のホモジネートをマウスに脳内接種しマヒの有無を指標にしている³⁾。脳へ直接ウイルスを接種することがもっとも感度の高い方法であったのでこの方法が用いられた訳である。培養細胞を使用する簡便さを知ってしまった我々にとっては、サルなどの動物を用いてこのような実験をすることの大変さは想像を超えるものがある。現在のような方法でポリオウイルスのタイターが測定されたのはEndersらによってヒト胎児の手足、腸などから調製した初代培養細胞でウイルスが増殖することが証明され⁴⁾、さらにDulbecco & Vogtによってサルの腎細胞でポリオウイルスを増殖させることができプラークとしてその定量が可能になってからである⁵⁾。また現行のポリオウイルス生ワクチン株は培養細胞で継代を繰り返して培養細胞に馴化させて弱毒化したものである⁶⁾。1980年代に入り、分子生物学的手法の発達とともにポリオウイルス複製のメカニズムの研究がさかんになされた。ウイルスのmoiや感染開始からの時間など条件を整えることができ、均質な感染系を用いて再現性よく複製機構の研究ができたのは株化細胞を用いた研究ができたからこそである^{7,8)}。このように培養細胞系の恩恵は図りしれないものがある。しかし、ウイルスには多くの場合標的組織がきまっていて、それ以外の組織ではほとんど増殖できないことが多い。神経系でしか増殖できないポリオウイルスを別の方法で増殖することはEndersの時代では画

連絡先

〒183-8526 東京都府中市武蔵台2-6
東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門
TEL : 042-325-3881
FAX : 042-321-8678
E-mail : koike@tmin.ac.jp

期的な革新的技術であったはずである。ではこのような革新的な技術（いまとなっては技術ということさえ奇妙であるが）はどのような経緯で開発され、どのような論理的な裏付けがあるのであろうか？

2. ポリオウイルスの感染特異性

ポリオウイルスの感染は種特異的で組織特異的である。まず通常のポリオウイルス株の宿主域は霊長類に限定されている。これはポリオウイルスレセプター（PVR）とウイルスの結合特異性によって決定されていることがすでに明らかにされた⁹⁾。また感染して病変を生じる組織が限定されている^{10, 11)}。ポリオウイルスの感染はウイルスを経口的に摂取することからはじまる。チンパンジーの経口感染実験の結果などからウイルスは小腸の粘膜で増殖したのち、扁桃、パイエル板、腸間膜リンパ節などのリンパ装置で増殖すると考えられているが、その増殖の程度は低く激しい病変は観察されない。しかし、ウイルスはここから血流に入り全身に広がる。ウイルス血症となると全身の組織はウイルスに曝されると考えられるが、やはり非神経系組織で

はウイルスの顕著な増殖は見られず、爆発的に増殖するのは脊髄の運動神経細胞などの中枢神経系に限られる。マウスは通常ポリオウイルスの宿主とはならないが、PVR遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（PVR-tg）は種特異性の壁を越えてポリオウイルス感受性となる^{12, 13)}。ヒトと異なり経口感染の効率は非常に低いが、実験的にウイルスを静脈内、腹腔内に接種をするとウイルス血症となる。肝臓、腎臓などではポリオウイルスはほとんど増殖しないが、最終的に中枢神経系に達してマヒを発症することは霊長類と同様である。すなわち、霊長類であれマウスモデルであれ、個体のレベルにおいては神経特異性は厳格に守られている。ところがさまざまな組織を培養するとその特異性はなくなり、増殖がほとんどできないはずの非神経系組織でも単層培養細胞にすることによってウイルスは増えることができるようになる（図1）。つまり組織特異性の喪失が起こるのである。ポリオウイルスの感染の組織特異性と特異性の解除はどのようなメカニズムによって起こるのかは長い間明らかにされることがなかった疑問である。

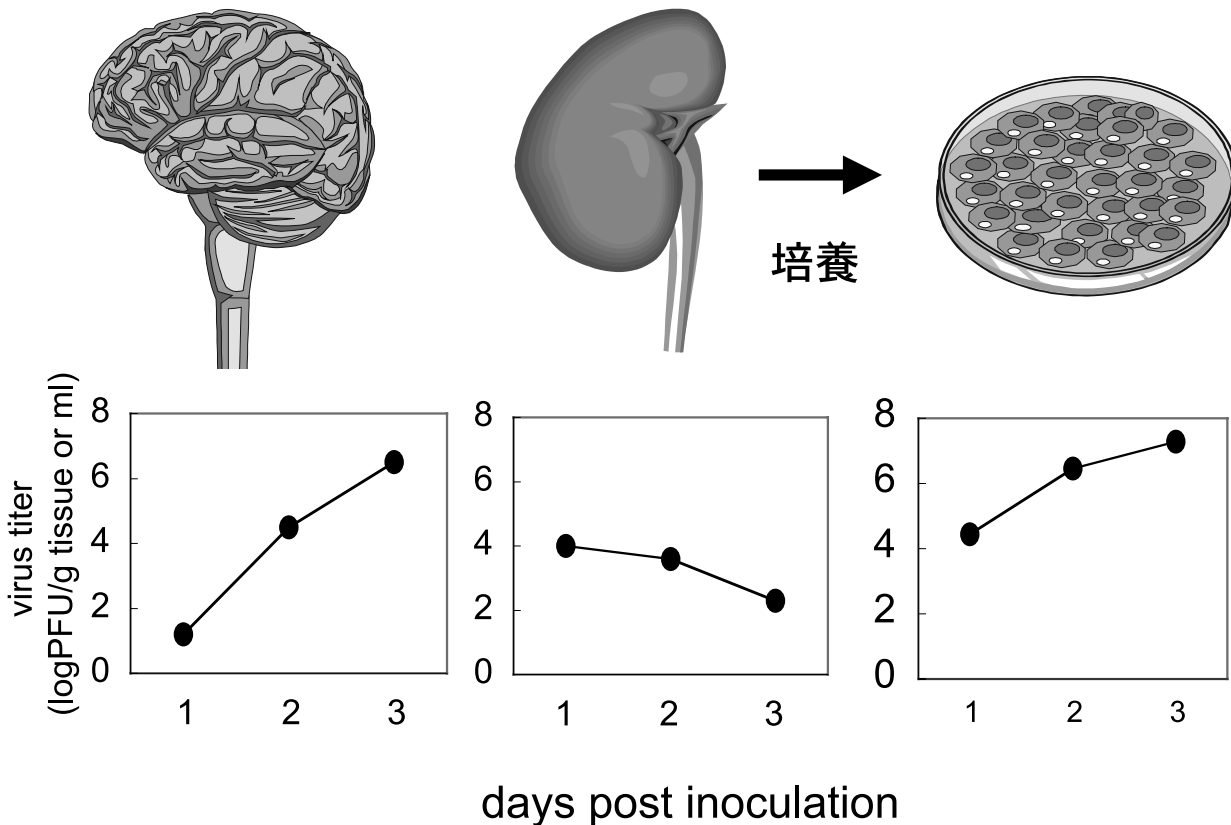


図1 ポリオウイルス感染の組織特異性と特異性の喪失

PVR-tg マウスにポリオウイルスを感染させると脊髄ではウイルスは効率よく増殖し、重篤な病変を生じる（左）。一方腎など非神経系組織ではウイルスの増殖も病変も見られない（中央）。ところが腎細胞を培養するとウイルスは効率よく増殖できるようになる（右）。

3. Enders, Dulbecco らによる培養細胞系の確立

培養細胞系を用いて組織特異性の喪失をはじめに示したのは Enders らである⁴⁾。Enders らはポリオウイルスの生体内の非神経系組織での増殖部位を探ることなどを研究目的の一つとしてヒト胎児の腸、手足などの組織から初代培養細胞を調製しウイルス感受性を調べた。ウイルスが培養細胞の上清に存在するかどうか確認するために、マウスにアダプトした Lansing 株を用いた。Lansing 株は霊長類にも病原性を持つが cotton rat の脳に接種して得られたげっ歯類にも脳炎を起こす性質を持つ株である¹⁴⁾。初代培養細胞に少量のウイルス液を加えて培養し、同様の操作を2もしくは3代繰返し、最後の培養上清をマウスの脳に接種し、マヒが発症することを確認した。継代の際の希釈率を計算すると3代の培養の間にウイルスは 10^{17} 倍に増殖したと考えられた。この論文では培養細胞が cytopathic effects (CPE) を起こしているかどうか記述がないのだが、CPE を始めて観察したのはこのグループの一員の Robbins であり、Enders が CPE という新しい言葉を作ったということである。

さらに Dulbecco & Vogt はサルの腎、睾丸から初代培養細胞を作成し、ウイルスを感染させた後に細胞を寒天培地で覆うことによりプラークが形成され、この方法によって再現性よくウイルスの定量が行えることを示した⁵⁾。培養細胞は鋭敏にウイルスの存在を証明できることから他のウイルスの分離にも使われ、これ以降はなぜこのようなことができるのかという問題はさておき培養細胞系を用いた研究や応用が盛んにされることになる。

4. 厳格な神経特異性がなぜ寛容になるのか？

— Racaniello らの実験 —

ポリオウイルスの感受性の問題は種特異性、組織特異性、組織特異性の喪失の問題が混然としながら議論されてきた。Holland らはマウスの培養細胞はポリオウイルス感受性を持たないが、ウイルスゲノム RNA をトランスフェクションするとウイルスの増殖が起こることから PVR が細胞のウイルス感受性を決定する因子として重要であることを示した^{15, 16)}。これは種特異性に対する回答であるが組織特異性も同様に考えられており、感受性のない生体内の内臓組織には PVR が発現しておらず、培養と同時に PVR が発現しウイルス感受性を獲得すると漠然と考えられていた(図2)。Ren & Racaniello は PVR 遺伝子が単離された後この仮説を検証すべく PVR を発現する tg マウスの腎を用いて実験した¹⁷⁾。まず *in situ* hybridization でマウス生体内の腎を調べると培養する前から PVR mRNA は発現していることがわかった。PVR-tg マウスの腎をトリプシンやコラゲナーゼなどのタンパク質分解酵素を用いて分散させ初代培養細胞を調整することができる。PVR-tg マウスの腎を分散させる処理をした直後は、細胞は生きているもののシャーレには付着せず浮遊している。一部の細胞が付着して増殖をはじめ1週間程培養を続けるときれいな単層培養となるが、この単層培養細胞ではウイルスは増殖することができる。培養開始直後の細胞はタンパク質分解酵素処理によっても PVR が消化されている訳ではなく、ウイルスの結合が起こることにより機能をもつ PVR が発現していることが確認された。しかしウイルスの増殖性はみられなかった。ところ

ポリオウイルス感受性の獲得機構の仮説

in vivo \longrightarrow *in vitro*

ウイルス複製に必要な因子の発現上昇？

PVR

IRES *trans*-activating factors

ウイルス複製を阻害する因子の発現低下？

図2 培養細胞のポリオウイルス感受性メカニズムの仮説

PVR や IRES *trans*-activating factors などウイルス複製に必要な因子が培養とともに発現が上昇することによってウイルス感受性を獲得するとかつては考えられていたが、Racaniello らの実験によってその可能性が否定された。

が24時間以上経過してからは細胞が浮遊状態であってもウイルスの増殖が認められたと報告している。これらのことから彼等は *in vivo* では発現していなかったPVRが培養操作の後に発現することによってウイルスの感受性が獲得されたのではないこと、しかも重要な変化はウイルスが吸着したあとのステップで起こっていることを結論した。そして彼等はポリオ感染の組織による感受性の違いを規定している機構と培養の前後でウイルス感受性の違いを規定している機構は同じものではないかと考えた。

次に培養の際に変化してウイルス感受性に变化を与える候補と考えられたものは internal ribosome entry によるウイルスタンパクの複製開始効率の変化であった(図2)。Pelletier & Sonenberg によってポリオウイルスの5'非翻訳領域にウイルスタンパクの翻訳開始に必須の internal ribosome entry site (IRES) が発見され¹⁸⁾, IRES に結合して IRES を活性化する IRES *trans*-activating factors として polypyrimidine tract-binding protein (PTB), La autoantigen, poly ribo-binding protein-2 (PCBP-2), unr などが同定された¹⁹⁻²³⁾。これらの宿主因子が不足するとウイルスタンパクの翻訳開始効率が低下するためにウイルスは増殖できにくくなる。しかし、これらの候補も Racaniello らの実験によって否定された。Kauder & Racaniello は IRES を含むレポーター遺伝子を発現する組換えアデノウイルスを作成し、マウスに感染させた。このレポーター遺伝子は非神経系以外でも発現し、培養前の生体内でも IRES は機能しうることを示した²⁴⁾。彼らは細胞のウイルス感受性に関与しているステップはウイルスの吸着、侵入、さらにウイルスのタンパク合成開始よりもあとのステップであると結論した。

5. インターフェロン (IFN) 応答と組織特異性

我々は組織特異性を決定する要因として I 型 IFN 応答の組織による違いが重要であることを明らかにした²⁵⁻²⁷⁾。これを明らかにする過程は最近の総説ですでに述べたので結論だけを簡潔に述べる。PVR-tg マウス生体内の非神経系組織でポリオウイルスの増殖が非常に困難なのはウイルス感染すると IFN 応答が速く、強く起こり複製が妨げられるためである。IFN 応答が起こらない I 型 IFN レセプターノックアウトマウス²⁸⁾ と PVR-tg マウスを交配した PVR-tg/Ifnar KO マウスにおいては通常ウイルスの増殖がみられない組織においてもウイルスは増殖することができた。このことは PVR を発現している多くの (すべてかどうかは不確定ではあるが) 組織では潜在的にウイルスは複製可能であることを示している。非神経系組織では速く、強い IFN 応答が起こる理由として、これらの組織では神経系組織と比較して、感染が起こっていない状態においても IFN 応答に必要な遺伝子群がより高いレベルで発現していることが考えられる。すなわちこれらの組織では抗ウイルス状態を実現するために必要な 2'-5' oligoadenylate synthetase

(OAS), protein kinase R (PKR) などがはじめから発現していてウイルスの増殖に抵抗しており、さらに RIG-I, MDA5^{29, 30)} のような二本鎖 RNA の検出装置, IRF-7³¹⁾ のような IFN 遺伝子の転写に関わる転写因子, IFN-stimulated genes (ISG) の転写に関わる IRF-9, STAT-1, STAT-2 がより多く発現しているためウイルス感染開始直後からより速く応答することができる。1970 年代より低濃度の IFN で培養細胞を前処理するとより速く、より強い IFN 応答が起こることが知られておりプライミングと呼ばれている³²⁾。これは IFN 応答に関与する上記遺伝子はそれ自身が IFN によって誘導され、正のフィードバックループを形成しているためである^{33, 34)}。しがたってプライミングされた細胞では準備万端整っているため応答が起こりはじめると一気に強い抗ウイルス状態となるのでますますウイルス側に不利な状況となる^{35, 36)}。一方ウイルスは複製し始めるとプロテアーゼ 2A や 3C の働きにより宿主細胞のタンパク合成を阻害したり、IFN 誘導に関与する転写因子 NF- κ B を切断するなどして IFN 応答を抑制することが知られている³⁷⁻³⁹⁾。通常 HeLa 細胞などにポリオウイルスを感染させても IFN の産生はないことが知られているが、これはそのような IFN 応答抑制が感染後早期に起こるためと考えられる。従って IFN 応答とウイルス増殖のどちらが先手をとるかが大きな問題になり、それによって感染細胞あるいはウイルス増殖の運命が決定される(図3)。ポリオウイルスに対して抵抗を示す非神経系組織中の細胞はすでに IFN 応答の側が先手をとっている格好になっている。このような結果から単層培養を形成する初代培養細胞や株化細胞でポリオウイルスが効率よく増殖できるのは、この IFN 応答によるウイルス複製阻害が起こらなくなっているためではないかと考えた。

6. 培養細胞のポリオウイルス感受性と IFN 応答

もし上記の説が正しいのであれば、培養細胞のウイルス感受性の獲得(組織特異性の喪失)は細胞の IFN 応答が低下するために起こるのではないかと推定することができる。この仮説に基づき PVR-tg マウス腎細胞の培養にともなう IFN 応答の変化を調べた⁴⁰⁾。まず、生体の腎と初代培養細胞での ISG の発現量を調べた。表1に示すように MDA5 STAT-1, STAT-2, IRF-7, IRF-9 などの発現量が半分以下に低下していた。また実際の IFN 応答の素速さを調べるため、PVR-tg マウス個体にはポリオウイルスを静脈内接種し経時的に腎の OAS1a mRNA の発現を調べ、初代培養細胞ではさまざまな moi でポリオウイルスを感染させ、経時的に OAS1a mRNA などの発現を調べた。生体内では応答は6時間以内に起こり OAS1a の上昇が見られた。一方培養細胞ではどのような moi で感染させた場合も OAS1a の上昇は見られなかった(図4)。同様にマウス個体では感染後6時間以内に IFN- β の誘導が見られたが、培養細胞ではごく

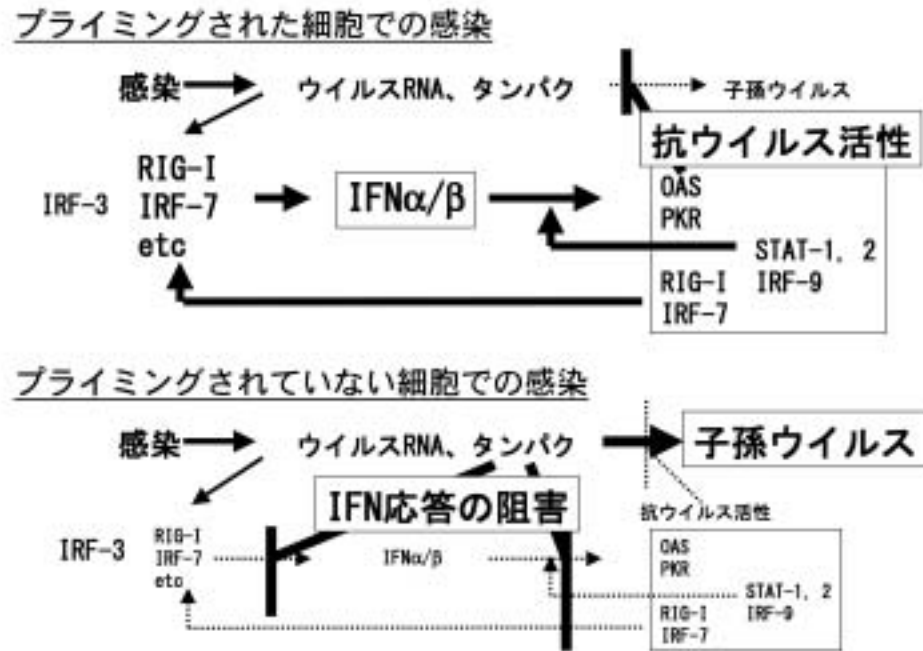


図3 ウイルス増殖に対するIFNによるプライミング効果

細胞を低濃度のIFNで前処理するとRIG-I, MDA5, IRF-7, IRF-9, STAT-1, STAT-2などのISGの発現量が増加する。これによりRIG-I, MDA5によるウイルスRNAの検知, IFN遺伝子の転写, ISGの転写をすぐに行うことができるので, 速く強いIFN応答が可能となり, ウイルスの増殖は抑制される。このとき子孫ウイルスよりも先に多くのIFNが産生され近傍の細胞にも供給されるのでこれらの細胞も含めてウイルス増殖は困難となる。in vivoにおいてはこのような状態にある組織に病変が生じることはない。

一方プライミングされていない細胞ではウイルスタンパクがある程度蓄積すると宿主細胞の翻訳の停止, NF-kBの切断などが起こり, IFN応答を行うことができなくなると考えられる。これによってウイルスは効率よく増殖して感染細胞は死に至る。細胞はIFNをほとんど産生できないので, 近傍の細胞もIFNを受け取ることなく, 増殖した子孫ウイルスの感染を受けてしまうことになる。そのため感染の連鎖が起こりウイルスは効率よく増殖する。

表1 培養による遺伝子の発現量の変化

さまざまな遺伝子のmRNAを定量的RT-PCRで測定し, in vivoの腎の値を100としてin vitroの腎細胞での発現量を示した。MDA5, IRF-7, IRF-9, STAT-1, STAT-2などのISGの発現量が低下している。このために速く強いIFN応答の能力を失ったと考えられた。一方PVR, IRES trans-activating factors, あるいはGAPDHの発現量の低下はみられない。

	in vivo	in vitro
RIG-I	100	85
MDA5	100	42
STAT-1	100	28
STAT-2	100	21
IRF-7	100	16
IRF-9	100	38
PVR	100	137
PTB	100	81
La	100	115
PCBP-2	100	91
unr	100	90
GAPDH	100	98

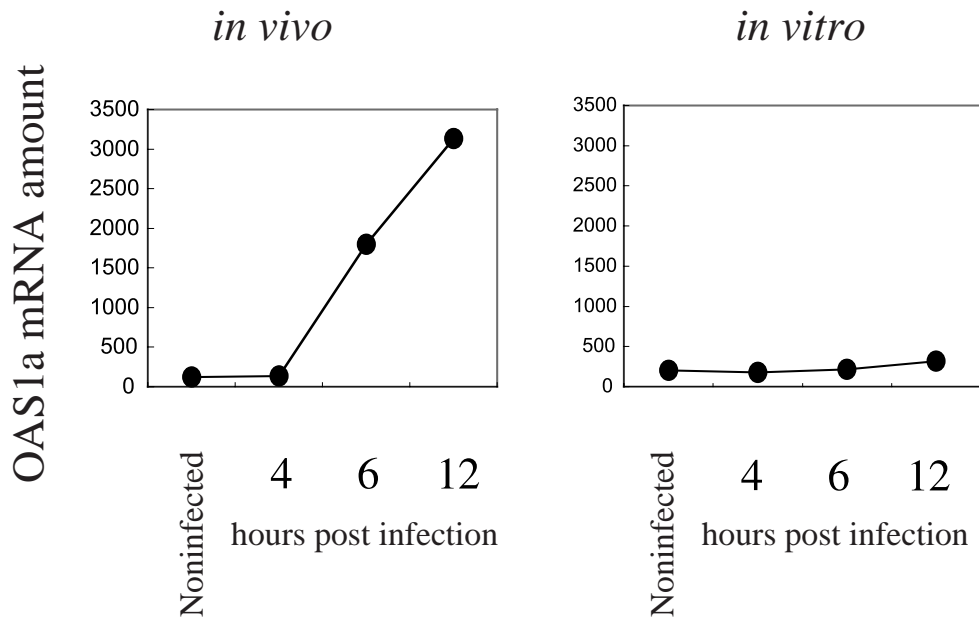


図4 マウス個体中の腎と培養腎細胞の OAS1a の誘導

PVR-tg マウスに 108 PFU のポリオウイルスを静脈内接種し経時的に OAS1a mRNA を定量的 RT-PCR で測定した。また培養腎細胞に moi 10 でウイルスを感染させ、経時的に OAS1a mRNA を定量的 RT-PCR で測定した (左)。マウス個体中では十分な OAS1a の誘導が見られるが、培養細胞ではどのような moi でウイルスを感染させた場合でも誘導はみられない (右)。

わずかな IFN- β mRNA が観察されたのみであった。ポリオウイルスの複製は 6 時間程度要することから IFN や ISG の誘導が 6 時間以内に起こるか否かはウイルスの感染が広がるか、広がりが食い止められるかには決定的に重要であるに違いない。

そこで今度は逆に PVR-tg マウス由来の腎細胞に低濃度の IFN を作用させウイルス感染前からこれらの遺伝子の発現レベルを上昇させたのちウイルス感染を行った。するとこのプライミング効果により 6 時間以内に IFN- β が上昇し、高 moi で感染させた場合を除いて細胞はウイルスに対して抵抗性を示した。すなわち ISG の発現レベルを上げておけば初代培養細胞といえども生体内の腎細胞と同様にウイルス抵抗性を示すことができた。

ポリオウイルスがよく増殖する HeLa 細胞では応答はさらに鈍化していてどのような moi でポリオウイルスを感染させても IFN- β はまったく発現せず、OAS1 遺伝子の上昇も観察されなかった。また HeLa 細胞以外の複数の株化細胞でも少なくとも RIG-I, MDA5, IRF-7, IRF-9 などのいずれかの発現レベルが低くなっており、IFN の誘導も見られなかった。初代培養細胞よりも株化細胞で IFN の誘導が見られない傾向は強いので、細胞を継代していく過程で IFN 応答は鈍化していくか、生育可能な細胞を培養していく操作自体が IFN 応答の鈍い細胞を選択していることになっている可能性がある。いずれにしても生体の中と異なって培養細胞では IFN 応答を維持し続けることが困難なよ

うである。細胞の増殖能力と IFN 応答性の関係は興味深い。がん細胞をさまざまなウイルスを用いて死滅させることが行われているが、特異的に感染させることができるのはこれらの細胞のウイルス抵抗性が生体内においても培養細胞と同様に低いためであるからかも知れない。

一方で Racaniello らの実験によって変動している可能性が否定された PVR や IRES *trans*-activating factors の発現量は彼らの予想通りあまり変化がなかった (表 1)。したがって組織から培養細胞へと環境が変化して細胞がポリオウイルス感受性を獲得する際にもっとも大きな影響を与えるのは IFN 応答であると結論した。

7. 終わりに

一見非常に矛盾している生体内とシャーレの中の細胞のポリオウイルス感受性の違いは IFN 応答という共通のキーワードで非常に簡単に説明できることが判明した。ポリオウイルスが複製できるかできないかはどのような場合でも IFN 応答が強く起こるかどうかという点に制限を受けている。このようなメカニズムを IFN response-restricted tropism と呼ぶことを提唱したい。生体内で組織によって IFN 応答の程度が異なったり、培養を開始したりすると IFN 応答が低下するのはどのようなメカニズムによるのは現在不明である。生体内において感染が起こっていない時の ISG の発現レベルは消化管でもっとも高い。食物の摂取とともに侵入してくるウイルスに対して警戒し防御態勢を

はじめからとっているかのようなのである。さまざまな状況における IFN 応答の違いを生む機構はさらに研究を要する課題である。

文 献

- 1) Landsteiner K, Popper E.: Mikroskopische Präparate von einem Menschlichen und Zwei Affentuckermarken. *Wien Klin Wochenschr.* 21:1830, 1908
- 2) Bodian D.: Histopathologic basis of clinical findings of poliomyelitis. *Am J Med* 6:563-578, 1949
- 3) Theiler M.: Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. *J Exp Med* 65:705-719, 1937
- 4) Enders JF, Weller TH, and Robbins FC.: Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in culture of various human embryonic tissues. *Science* 109:85-87, 1949
- 5) Dulbecco R, Vogt M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99:167-182, 1954
- 6) Sabin AB, Bulger LR. : History of Sabin attenuated polioviruses oral live vaccine strains. *J. Biol. Stand.* 1:115-118,1973
- 7) Racaniello VR.: Picornaviridae: The viruses and their replication, p. 685-722. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields Virology*, 4th ed. Lippencott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001
- 8) Pallansch MA, Roos RP.: Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses, p. 723-775. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields Virology*, 4th ed. Lippencott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001
- 9) Ida-Hosonuma M, Sasaki Y, Toyoda H, Nomoto A, Gotoh O, Yonekawa H, Koike S.: Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution. *Arch Virol* 148:29-44, 2003
- 10) Bodian D.: Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science* 122:105-108, 1955
- 11) Sabin AB.: Pathogenesis of poliomyelitis; reappraisal in the light of new data. *Science* 123:1151-1157, 1956
- 12) Ren R, Constantini F, Gorgacz EJ, J. Lee JJ, Racaniello VR.: Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 63:353-362, 1990
- 13) Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, Nomoto A.: Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:951-955, 1991
- 14) Armstrong C.: Successful transfer of the Lansing strain of poliomyelitis virus from the cotton rat to the white mouse. *Public Health Rep* 54:2302-2305, 1939
- 15) Holland JJ, McLaren LC, Syverton JT.: The mammalian cell-virus relationship. IV. Infection of naturally insusceptible cells with enterovirus ribonucleic acid. *J. Exp. Med.* 110:65-80, 1959
- 16) Holland JJ: Receptor affinities as major determinants of enterovirus tissue tropisms in humans. *Virology* 15:312-326, 1961
- 17) Ren R, Racaniello VR.: Human poliovirus receptor gene expression and poliovirus tissue tropism in transgenic mice. *J. Virol.* 66:296-304, 1992
- 18) Pelletier J, Sonenberg N.: Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-325, 1988
- 19) Hellen CU, Witherell GW, Schmid M, Shin SH, Pestova TV, Gil A, Wimmer E.: A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7642-7646. 1993
- 20) Meerovitch K, Svitkin YV, Lee SH, Lejbkovicz F, Kenan DJ, Chan EK, Agol VI, Keene JD, Sonnenberg N.: La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol* 67:3798-3807, 1993
- 21) Blyn L, Towner JS, Semler BL, Ehrenfeld E.: Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J Virol* 71:6243-6246. 1997
- 22) Boussadia O, Miepman M, Creancier L, Prats AC, Dautry F, Jacquemin-Sablon : Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J Virol* 77:3353-3359
- 23) Kikuchi T, Ichikawa M, Arai J, Tateiwa H, Higuchi K, Yoshikura N.: Molecular cloning and characterization of a new neuron-specific homologue of rat polypyrimidine tract binding protein. *J Biochem* 128: 811-821, 2000
- 24) Kauder SE, Racaniello VR.: Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest* 113:1743-1753, 2004
- 25) Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S.: The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J. Virol.* 79:4460-4469, 2005
- 26) 小池智：ポリオウイルスの標的組織特異性決定機構。 *ウイルス* 54:205-212, 2004
- 27) 小池智：ポリオウイルスのトロピズムに關与するインターフェロン応答。 *実験医学* 23:2602-2608, 2005
- 28) Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M.: Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264:1918-1921, 1994
- 29) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa N, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T.: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-737, 2004.
- 30) Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T.: Shared and unique functions of the DexD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175: 2851-2858, 2005

- 31) Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T.: IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434: 772-777, 2005
- 32) Stewart WE, Gosser JB, Lockart Jr RZ.: Priming: a nonantiviral function of interferon. *J. Virol.* 7:792-801, 1971
- 33) Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N.: Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* 441:106-110, 1998.
- 34) Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T.: Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α / β gene induction. *Immunity* 13:539-548, 2000
- 35) Hata N, Sato M, Takaoka A, Asagiri M, Tanaka N, Taniguchi T.: Constitutive IFN- α / β induction by virus *Biochem Biophys Res Commun* 285:518-525, 2001
- 36) Taniguchi T, Takaoka A.: A weak signal for strong responses: interferon- α / β revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:378-386, 2001
- 37) Etchison D, Milburn SC, Edery I, Sonenberg N, Hershey JW.: Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eukaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem* 257:14806-14810, 1982
- 38) Choe SS, Dodd DA, Kirkegaard K.: Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology* 337:18-29, 2005
- 39) Neznanov N, Chumakov KM, Neznanova L, Almasan A, Banerjee AK, Gudkov AV.: Proteolytic cleavage of the p65-RelA subunit of NF- κ B during poliovirus infection *J Biol Chem* 280:24153-24158
- 40) Yoshikawa T, Iwasaki T, Ida-Hosonuma M, Yoneyama M, Fujita T, Horie H, Miyawaza M, Abe S, Shimizu B, Koike S.: Role of the alpha/beta interferon response in the acquisition of susceptibility to poliovirus by kidney cells in culture. *J Virol* 80:4313-4325, 2006

Poliovirus susceptibility in cultured cells

— an answer to Enders —

Satoshi KOIKE

Department of Microbiology and Immunology
Tokyo Metropolitan Institute for Neurosciences
Tokyo Metropolitan Organization of Medical Sciences
2-6, Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526
e.mail: koike@tmin.ac.jp

Poliovirus is the causative agent of poliomyelitis. It replicates efficiently in the neurons in the central nervous system and produces severe pathological lesions. It cannot replicate well in the non-neural tissues. In spite of this strict neurotropism *in vivo*, however, it can replicate in cells of monolayer cultures derived from almost any tissues of primates as Enders and colleagues initially shown. It was supposed that cellular changes during the process of cultivation were required for acquisition of susceptibility. This question remained unsolved for a long time. We have recently shown that cells in culture acquire poliovirus susceptibility by losing rapid and robust interferon response that has been normally maintained in tissues *in vivo*.