
原 著

ワクシニアウイルスの膜蛋白による
感染細胞のアポトーシスの誘導

新潟大学脳研究所神経内科学分野 (主任: 辻 省次教授)

林 靖 子

Apoptosis Induction by Penetration Protein of Vaccinia Virus

Yasuko HAYASHI

*Department of Neurology,
Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Shoji TSUJI)*

Treatment with SDS-soluble fraction (vSF) of vaccinia virus induced apoptosis of U937 cells. Neutralizing 2D5mAb did not block the vSF-induced apoptosis, though removal of 2D5mAb-reactive VP23-29K deleted the apoptosis inducing capacity of the vSF, and affinity purified VP23-29K induced the apoptosis. The apoptosis inducer was the VP23-29K (L1R encoded penetration protein). The N-terminal amino acid sequence of the VP23-29K resembled to active site of hTNF- α . An anti-TNF receptor antibody, which inhibits TNF-induced apoptosis, did not inhibit the vSF-induced apoptosis. The vSF, hTNF- α and anti-TNF receptor mAb did not affect on adsorption, penetration and plaque formation of the virus. Moreover, the TNF-like sequence was suggested to orient inward on the virus by analogy to 3D structure of TNF/TNF-receptor. These results indicated that the TNF- α receptor was not the virus receptor. The VP23-29K induces the apoptosis by a unique process, or the interaction between the VP23-29K and its unidentified receptor for penetration exposes the TNF-like sequence of VP23-29K to interact with host TNF-receptor.

Key words: Vaccinia virus, Apoptosis, TNF- α

ワクシニアウイルス, アポトーシス, 腫瘍壊死因子- α

Reprint requests to: Yasuko HAYASHI,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University,
Niigata City, 951-8510, JAPAN.

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経内科学分野 林 靖子

はじめに

アポトーシスはプログラムされた細胞死の遂行として種々の分野で注目されているが、ウイルスはその蛋白合成などを宿主細胞に大きく依存するため、ウイルス感染という観点からみると細胞のアポトーシスは感染防御のひとつのかたちと考えられている。実際ウイルスのいくつかはアポトーシスを抑制するための遺伝子を持っている¹⁾。

ボックスウイルスは serine protease inhibitor superfamily (serpin: SPI;) を遺伝子中に有している²⁾。ラビットボックスウイルスは 40 kDa の SPI-1 をコードし、その蛋白はウイルスが誘導するアポトーシスを制御することがわかっている³⁾⁴⁾。また、カウボックスウイルスは interleukin-1 β converting enzyme (ICE) の働きを抑制して炎症反応を抑えることがわかっている⁵⁾。ICE はアポトーシスの経路で活性化する⁶⁾ことから、この蛋白 (cytokine response modifier A; crmA) がアポトーシスの抑制に働くことが予想され、実際に、ウイルス感染⁴⁾、ICE⁷⁾、成長因子の欠乏⁸⁾、サイトカイン⁹⁾などで誘導されるアポトーシスを crmA が抑制することが報告された。

ボックスウイルスがこのようなアポトーシス抑制因子を有することは、その感染や複製において宿主細胞のアポトーシスが引き起こされるのを阻止するためと考えられる。さらに、それらの抑制因子はボックスウイルスの初期蛋白中にあることからウイルス感染の初期 (吸着、侵入) 過程にアポトーシスを起こすシグナルが出されることが考えられる。我々は、このような仮定のもとにボックスウイルス科に属するワクシニアウイルスを検討した。その結果、ワクシニアウイルスが細胞に感染する際に重要な働きをする膜蛋白 (VP23-29K) に腫瘍壊死因子 (TNF) の活性部位と同一のアミノ酸配列が存在し、細胞のアポトーシスを誘導し得ることを見出した。このような結果はウイルスと宿主細胞の関係において興味深い知見と思われたので報告する。

材料, 方法

細胞とウイルス

Vero 細胞, U937 細胞を10%ウシ胎児血清 (FCS) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 内で培養した。ワクシニアウイルスの IHD-J 株を Vero 細胞で増やした。細胞内成熟ウイルス (intracellular mature virus; IMV) を蔗糖密度勾配遠心法¹⁰⁾¹¹⁾ で分離、精製

した。IMV はトリプシン (TPCK-treated trypsin, 20 mg/ml, Sigma) 処理 (37°C, 10分間) をして HA 抗原を溶解して感染性を高めた¹²⁾ (活性化ウイルス)。ウイルスの感染能は Vero 細胞を用いて、プラーク形成数で定量した。活性化ウイルスの一部は2分間紫外線を照射し、初期蛋白以外を合成できない状態にしてアポトーシス誘導能の定量実験に使用した (UV-IMV)。[35S] methionine と [35S] cysteine (5 μ Ci/ml, Amersham) を含む培養液中で Vero 細胞を培養しウイルスを感染させて、ウイルスにアイソトープ標識した。標識したウイルスはウイルスの吸着実験に用いた。

抗体とイムノプロットティング

煮沸水中の非還元性緩衝液 (2% SDS, 10% glycerin, 0.1 M Tris buffer pH 6.4) と、還元性緩衝液 (2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerin, 0.1 M Tris buffer pH 6.4) に精製した IMV (10 mg) をそれぞれ加えて破碎し、11%ポリアクリルアミドゲル上に電気泳動 (20 mA, 3時間) した。その後、ニトロセルロース膜にウイルス蛋白をプロットティングした¹³⁾。

免疫染色には抗ワクシニアマウス血清、抗-VP23-29K モノクローナル抗体 (2D5mAb, 8C2mAb, 11A2mAb) を既報¹⁴⁾¹⁵⁾ のごとく作製して使用した。

ワクシニアウイルスの SDS-可溶蛋白 (vSF)

と VP23-29K 蛋白の精製

IMV 10 mg を界面活性剤 (0.1% SDS in 1 mM Tris-HCl buffer, pH 8.9, 2 ml) に加え、12,000回転、20分遠心した。遠心上清を界面活性剤吸着カラム (AffinityPak Extracti-Gel D, Pierce) に通して SDS を取り除いた。その抽出物を通常使用する2倍の濃度の DMEM と同量混合し、生理的塩濃度に調整した。調整後の抽出物 (SDS-soluble fractions; vSF) の蛋白濃度は 530 μ g/ml であった。vSF 2 ml を100倍に希釈した 2D5mAb (ウイルスの細胞内侵入に必須の蛋白の VP23-29K と結合する中和抗体) 1 ml と混合して37°C, 30分反応させ、Protein-A アガロースビーズ (50 μ l, Oncogene Science) を加えた。抗原-抗体反応で結合した VP23-29K-2D5mAb 複合体を吸着しているビーズを低速遠心で分離し、ビーズに結合した VP23-29K を低 pH (acetate buffer, pH 3.0) にして遊離させた後、pH と塩濃度を調節した。このようにして回収した VP23-29K 蛋白濃度は 30 μ g/ml であった。

アポトーシスの検定

アポトーシスの検定は断片化した細胞 DNA を定量する方法 (Cellular DNA Fragmentation ELISA,

Boehringer Mannheim) を用いた。U937 細胞を 96 well のプレートに 10^5 個/ml の細胞を $10 \mu\text{M}$ の BrdU を含む培地で16時間培養した。その培地中に濃度の異なるヒト腫瘍壊死因子- α (hTNF- α , Pepro Tech INC.), vSF, UV 照射した IMV をそれぞれ $50 \mu\text{l/well}$ 加えた。その後16時間培養した。上清中にはアポトーシスの際に放出された、断片化 DNA (BrdU でラベルされている) が含まれる。この上清を抗 BrdU モノクローナル抗体を吸着させた ELISA プレートに移して発色させ、O.D.370. で測定した。

ウイルスの感染能の定量

Vero 細胞を hTNF- α (10^{-3} , $100 \mu\text{l/well}$), vSF (10^{-3}), DMEM 中で 37°C 45分培養後、 4°C に冷却した。[S35] 標識された活性化ウイルスをそれぞれに加え45分間 4°C に放置し、 37°C の CO_2 インキュベーターに移した。2D5mAb (10^{-3} $100 \mu\text{l/well}$) を時間を追って添加して各段階で侵入を完了していないウイルスを中和した¹⁶⁾。冷却した DMEM で細胞表面を洗い流し、アガーを重層した。3日後にプラークを数え定量した。

結 果

ワクシニアウイルスの SDS-可溶成分によるアポトーシス

ワクシニアウイルスの IHD-J 株の SDS-可溶成分

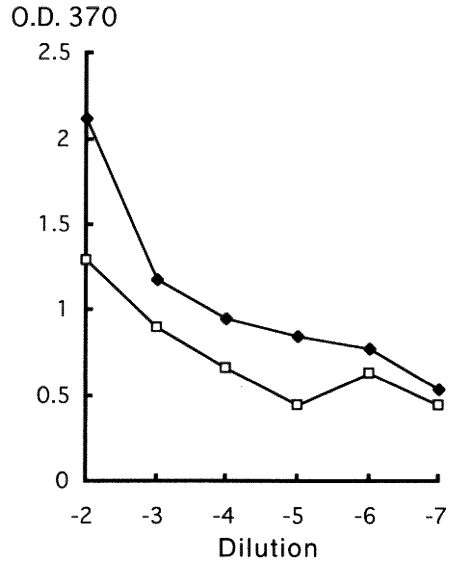


図 1 hTNF- α と vSF によるアポトーシスの誘導

◆: hTNF- α (基準値として $100 \mu\text{g/ml}$, 2×10^6 unit/ml を使用). □: vSF. 各ポイントは 4 回の平均値を示す. コントロールは $\text{OD}_{370} = 0.17 \pm 0.02$. アポトーシス誘導能が dose-dependent に低下する。

	Apoptosis OD_{370}	Apoptosis in the CHX OD_{370}
hTNF- α	0.57 ± 0.03	0.67 ± 0.09
vSF	0.48 ± 0.06	0.54 ± 0.21
UV-IMV	0.30 ± 0.01	0.48 ± 0.02
UV-IMV + hTNF- α	0.28 ± 0.04	0.64 ± 0.16
UV-IMV + vSF	0.25 ± 0.02	0.56 ± 0.11
Control	0.23 ± 0.04	0.37 ± 0.04

図 2 ワクシニアウイルス感染細胞のアポトーシス

CHX: cyclophosphamide ($10 \mu\text{g/ml}$), hTNF- α : ヒト腫瘍壊死因子 (10^4 units/well), vSF: ワクシニアウイルス膜蛋白 SDS 可溶成分 (10^{-3} 希釈), UV-IMV: 紫外線照射ウイルス (IMV 100 PFU/cell に相当). OD_{370} はいずれも 4 回の平均値で示す。

SPI などの初期蛋白のみ合成可能な UV-IMV は hTNF- α で誘導されるアポトーシスを抑制する傾向が認められる。初期蛋白も合成できない CHX 添加培地中ではその傾向がみられない。

(vSF)を加えて培養した U937 細胞はアポトーシスを起こすことが示された (図 1)。

UV 照射されたウイルスは SPI などの初期蛋白のみの合成が可能であり、感染に必要な機能蛋白の合成ができない。UV-IMV (IMV 100 PFU/cell にあたるウイルス量), vSF (10^{-3} 希釈), hTNF- α (10^4 unit/well) 各々と、それぞれの組み合わせでアポトーシス誘導がどうなるかを調べた (図 2)。UV-IMV を加えた well では、加えないものに比べてアポトーシスが抑制される傾向があった。初期蛋白も合成できないように cycloheximide (CHX) を添加した培地中では UV 照射 IMV を加えてもアポトーシスは抑制されなかった。このことからワクシニアウイルスに感染した細胞はその初期蛋白が合成される状況ではアポトーシスが抑制されることがわかった。

ワクシニアウイルスのアポトーシス誘導因子

vSF はウイルス粒子の表面に存在するいくつかの蛋白を含有している。我々は vSF 中のアポトーシス誘導因子を同定するためウイルスの中和抗体がアポトーシスを抑制するかを調べた。中和抗体は 2D5mAb, 8C2mAb, 11A2mAb, ポリクローナル抗ワクシニアマウス血清を用いた。しかし、これらの抗体が vSF のアポトーシス誘導を抑制するという明らかな結果は得られなかった。

vSF と 2D5mAb を反応させ、Protein-A アガロースビーズを用いて 2D5mAb に反応する蛋白を回収した。2D5mAb はウイルス蛋白の VP23-29K と特異的に反応することがわかっており、こうして精製された VP23-29K は免疫プロットの結果、ウイルスの他の蛋白を含んでいないことが確認された (図 3)。また、VP23-29K はもとの vSF の約18倍のアポトーシス誘導能を

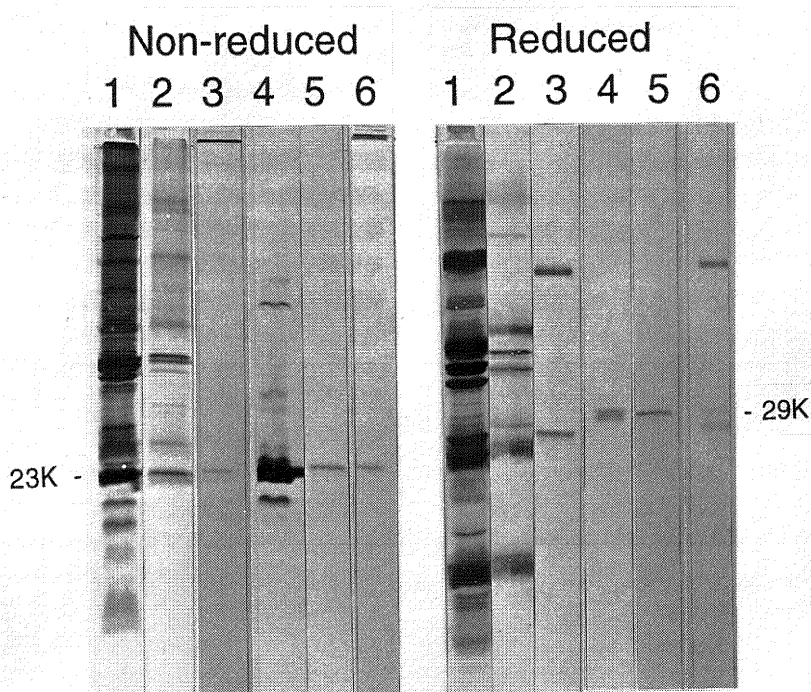


図 3 ワクシニアウイルスとその SDS 可溶成分の免疫プロット

レーン 1, 4: 精製 IMV. 2, 5: vSF. 3, 6: 精製 VP23-29K (vSF より分離精製したウイルス感染関連蛋白 [penetration protein]). 左のパネルは非還元性緩衝液でウイルスを破碎したものを、右は還元性緩衝液で破碎したものを展開。蛋白プロット後のニトロセルロース膜はポリクローナル抗ワクシニアマウス血清 (レーン 1~3), 2D5mAb (レーン 4~6) と反応させた。VP23-29K は非還元の状態では 23kDa, 還元をうける状態では 29 kDa にプロットされる。精製 VP23-29K では 2D5mAb が約 60 kDa にも反応し、ダイマーを形成していることが考えられる。精製 VP23-29K には精製 IMV や vSF 中のほかの蛋白が含まれていないことがわかる。

Apoptosis of U937	OD ₃₇₀
Control	0.34 ± 0.07
vSF 10 ⁻³ dilution	0.52 ± 0.01
VP23-29K 10 ⁻³ dilution	0.60 ± 0.09
vSF deleted of VP23-29K	0.36 ± 0.05

$p < 0.05$
 $p < 0.01$

Each value represents the mean of 4 assays.

図 4 精製 VP23-29K により誘導されるアポトーシス
vSF に比べて VP23-29K はアポトーシス誘導能が高く、VP23-29K を取り
除いた vSF は誘導能を失うことがわかる。OD₃₇₀ はいずれも 4 回の平均値で示す。

有することが示された (図 4)。

VP23-29K の TNF- α 様のアミノ酸配列

ワクシニアウイルスのアミノ酸配列を既知のアポトーシス誘導蛋白 (hTNF- α , hTNF- β , lymphotoxin- β , rat-Fas protein) とコンピュータプログラム (BLAST¹⁷) を用いて比較した。ウイルスの蛋白全体ではこれらのアポトーシス誘導蛋白との相同性はみられなかった。そこで、ウイルス蛋白のエピトープ単位での部分的な相同性をさがすため、あたらしいプログラムを作製した。各ウイルス蛋白のアミノ酸を10個ずつ区切り、既知のアポトーシス誘導蛋白の最初から、1アミノ酸ずつずらしながら比較し、その10個のアミノ酸のうち5個以上にマッチする部分を取り出した。その結果 hTNF- α '84-AVSQYTKVNLLSAIKS-99' と VP23-29K の N 末の配列 '4-AASIQTTVNTLSERIS-19' に高い相同性がみつかった (図 5)。この部分では16のアミノ酸のうち、9アミノ酸が同じであり、そのうち alanine-84, serine-86, valine-91 は hTNF- α のアポトーシス誘導に必須のアミノ酸であることが報告¹⁸⁾ されている。VP23-29K の高次構造は明らかにされていないが、この蛋白はウイルスが細胞に感染する際の重要なエフェクターであることから、感染の初期に TNF レセプターに何らかの影響を与えることが考えられた。

TNF- α と vSF はウイルスの吸着を抑制しない

VP23-29K はウイルスの吸着、侵入に必須の蛋白であることから、ワクシニアウイルスは TNF レセプター

を介して感染する可能性を考え、hTNF- α や、vSF がウイルスと競合し、感染を抑制するかを調べた。その結果 vSF, hTNF- α とともにウイルスのプラーク形成に影響を与えないことがわかった (図 6)。

考 察

ワクシニアウイルスはポックスウイルス科に属する大型 DNA ウイルスである。ワクシニアウイルスは細胞とウイルス表面の膜融合で感染し、感染を受けた細胞は多核細胞をつくるようになる。我々が用いた VP23-29K はウイルス遺伝子の LIR にコードされる蛋白であり、そのモノクローナル抗体である 2D5mAb は強力にウイルス感染を中和することが知られている¹⁴⁾¹⁶⁾。このことから VP23-29K はウイルス感染の成立に必須の蛋白と考えられている。ワクシニアウイルスは2本鎖 DNA の遺伝子を持ち、その遺伝子の中には感染初期につくられて、ウイルスの構造形成には関係のない初期蛋白をコードする部分がある。近年、この領域の解析がすすみ、サイトカイン受容体¹⁹⁾²⁰⁾、アポトーシスを抑制する SPI²⁾ などがコードされていることがわかってきた。これらが感染初期に合成されるのは、宿主の感染防御反応としてのアポトーシス¹⁾ や免疫反応を抑えて、後に続くウイルスの複製を効率よく行うためと考えられる。

一方我々は、これらの蛋白が初期に合成されることから、ワクシニアウイルスが感染の初期 (吸着、侵入) の段階で細胞のアポトーシスを誘導するのではないかと予

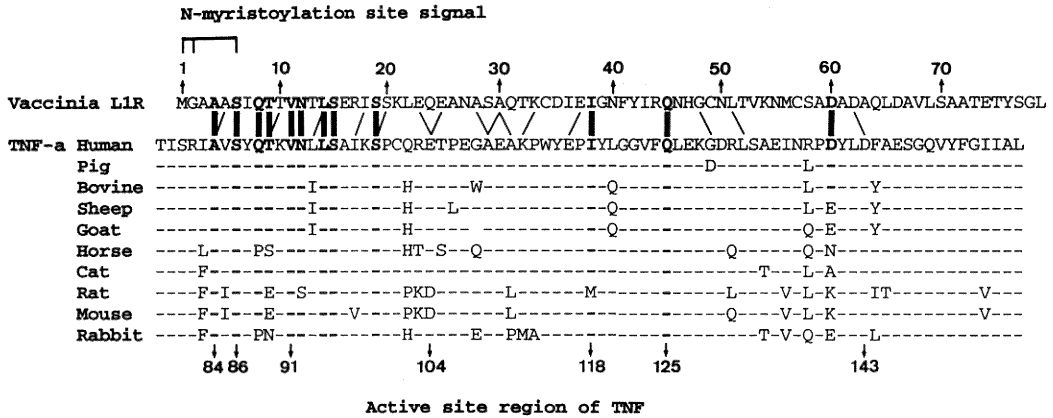


図5 VP23-29K と各生物種 TNF 活性部位のアミノ酸配列の比較

相同の残基は太線で、1残基違いは細線で示す。アミノ酸配列のデータは GenBank で収集した。

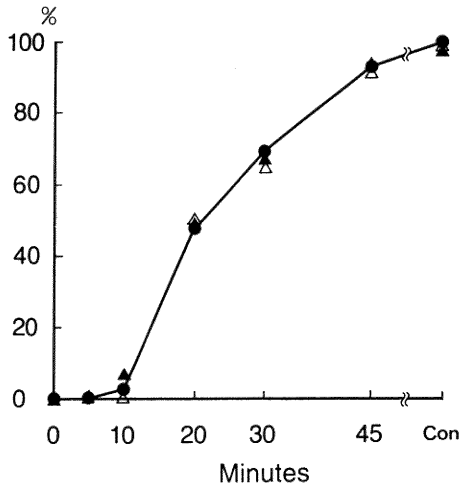


図6 プラークの相対数

●: DMEM, ▲: vSF, △: hTNF-α の存在下でのプラーク数をコントロールの数 (162±13.3 well) を100%としたときの相対値で示す。vSF, hTNF-αともにプラーク形成には影響を与えないことがわかる。

想した。このことを検証するため、感染の際に重要なエフェクターである VP23-29K に注目して実験を行った。その結果、VP23-29K は細胞にアポトーシスを誘導し、そのN末に hTNF-α の活性部位類似のモチーフを持つことが示された。感染初期に VP23-29K が宿主細胞の TNF レセプターに接触してアポトーシスを誘導するため、ウイルスの初期蛋白の SPI がアポトーシスの抑制に働くことが考えられた。しかし一方で、hTNF-α がウイルスと競合して感染を抑制するという結果が得られず、ウイルスが TNF レセプターを自らのレセプターとして結合し、感染が成立するというあきらかな証拠は得られなかった。Vanderplasschen ら²¹⁾ は最近、細胞の表面抗原に対するモノクローナル抗体のひとつがワクシニアウイルスの感染を部分的に抑制することを示し、IMV のレセプターとなるものが2つ以上存在することを示唆している。今後 VP23-29K、細胞膜上のウイルスレセプターなどの分子構造や、感染の際のそれらの動的な構造変化の解析がすすみ、アポトーシス誘導のメカニズムが明らかになる可能性がある。

稿を終えるにあたり、本研究の御指導を戴きましたウイルス学教室市橋康夫先生、コンピュータープログラム作製の御助言をいただきましたウイルス学教室大家正康先生に深く感謝致します。また、本研究の機会をいただき、多大の御助言をいただきました神経内科学分野教授辻 省次先生、ウイルス学教室前教授浜田忠弥先生に深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) **Vaux, D.L., Kaecker, G. and Strasser, A.:** An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, **76**: 777~779, 1994.
- 2) **Smith, G.L., Howard, S.T. and Chan, Y.S.:** Vaccinia virus encodes a family of genes with homology to serine protease inhibitors. *J. Gen. Virol.*, **70**: 2333~2343, 1989.
- 3) **Ali, A.N., Turner, P.C., Brooks, M.A. and Moyer, R.W.:** The SPI-1 gene of rabbit pox virus determines host range and is required for hemorrhagic pox formation. *Virology*, **202**: 305~314, 1994.
- 4) **Brooks, M.A., Ali, A.N., Turner, P.C. and Moyer, R.W.:** A rabbit pox virus serpin gene controls host range by inhibiting apoptosis in restrictive cells. *J. Virol.*, **69**: 7688~7698, 1995.
- 5) **Pickup, D.J., Ink, B.S., Hu, W.M., Ray, C.A. and Joklik, W.K.:** Hemorrhage in lesions caused by cowpox virus is induced by a viral protein that is related to plasma protein inhibitors of serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7698~7702, 1986.
- 6) **Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S., and Pickup, D.J.:** Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin 1β converting enzyme. *Cell*, **69**: 597~604, 1992.
- 7) **Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweig, E.A. and Yuan, J.:** Induction of apoptosis in fibroblasts by interleukin- 1β converting enzyme, a mammalian homolog of *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, **75**: 653~660, 1993.
- 8) **Gagliardini, V., Fernandez, P.A., Lee, R.K., Drexler, H.C., Rotello, R.J., Fishman, M.C. and Yuan, J.:** Prevention of vertebrate neuronal death by the *crmA* gene. *Science*, **263**: 826~828, 1994.
- 9) **Tewari, M. and Dixit, V.M.:** Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus *crmA* gene product. *J. Biol. Chem.*, **270**: 3255~3260, 1995.
- 10) **Joklik, W.K.:** The purification of four strains of poxviruses. *Virology*, **18**: 9~18, 1962.
- 11) **Oie, M. and Ichihashi, Y.:** Characterization of vaccinia polypeptides. *Virology*, **113**: 263~276, 1981.
- 12) **Ichihashi, Y. and Oie, M.:** Proteolytic activation of vaccinia virus for the penetration phase of infection. *Virology*, **116**: 297~305, 1982.
- 13) **Ichihashi, Y. and Oie, M.:** Epitope mosaic on the surface of orthopoxviruses. *Virology*, **163**: 133~144, 1988.
- 14) **Ichihashi, Y., Takahashi, T. and Oie, M.:** Identification of vaccinia virus penetration protein. *Virology*, **202**: 834~843, 1994.
- 15) **Takahashi, T., Oie, M. and Ichihashi, Y.:** N-terminal amino acid sequences of vaccinia virus structural proteins. *Virology*, **202**: 844~852, 1994.
- 16) **Ichihashi, Y.:** Extracellular Enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology*, **217**: 478~485, 1996.
- 17) **Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J.:** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403~410, 1990.
- 18) **Van-Ostade, X., Tavernier, J., Prange, T. and Fiers, W.:** Localization of the active site of human tumor necrosis factor (hTNF) by mutational analysis. *The EMBO J.*, **10**: 827~836, 1991.
- 19) **Alcami, A. and Smith, G.L.:** A soluble receptor for interleukin- 1β encoded by vaccinia virus: A novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell*, **71**: 153~167, 1992.
- 20) **Symons, J.A., Alcami, A. and Smith, G.L.:** Vaccinia virus encodes a soluble type 1 interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell*, **81**: 551~560, 1995.
- 21) **Vanderplasschen, A. and Smith, G.L.:** A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. *J. Virol.*, in press.

(平成10年1月23日受付)