

狂犬病ウイルス粒子に取り込まれる CD99 関連タンパク (VAP21) の機能について

(研究課題番号 : 1 2 6 7 0 2 8 1)

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 1 4 年 4 月



研究代表者 : 梶 倉 匡 文
(京都大学薬学研究科 助手)

狂犬病ウイルス粒子に取り込まれる CD99 関連タンパク (VAP21) の機能について

(研究課題番号 : 1 2 6 7 0 2 8 1)

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 1 4 年 4 月

研究代表者 : 梶 倉 匡 文
(京都大学薬学研究科 助手)

は し が き

本冊子は、平成12年度から13年度にかけて頭書の研究課題について行った研究の成果をまとめたものである。本研究は以下に示す研究組織および研究経費により行われた。

研究組織

研究代表者：栃倉匡文（京都大学薬学研究科）

研究分担者：河合明彦（京都大学薬学研究科）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	1,800	0	1,800
平成13年度	500	0	500
総計	2,300	0	2,300

研究発表

(1) 学会誌等

Xiao,S., Tochikura,T.S., Sagara,J., and Kawai,A. The rabies virion-associated 100-kDa polypeptide (VAP100) is a host-derived minor component of the viral envelope. *Microbiol.Immunol.*44:657-668 (2000).

(2) 口頭発表

栃倉匡文、蕭 颯、河合明彦：エンベロープを持ったウイルス粒子に取り込まれる宿主由来成分 CD99 関連タンパク VAP21 の機能解析. 日本ウイルス学会第 49 回学術集会・総会（2001 年 11 月、大阪）

南波伸治、栃倉匡文、河合明彦：狂犬病ウイルスエンベロープタンパク質と細胞骨格系との相互作用の解析（1）. 日本ウイルス学会第 49 回学術集会・総会（2001 年 11 月、大阪）

Md.Bahanur Rahman,Tadafumi S.Tochikura, and Akihiko Kawai. Anti-viral innate immunity factors in animal serum. 日本ウイルス学会第 49 回学術集会・総会（2001 年 11 月、大阪）

栃倉匡文、蕭 颯、河合明彦：エンベロープを持ったウイルス粒子に取り込まれる宿主由来成分 VAP21 のウイルス複製における役割. 日本ウイルス学会第 48 回学術集会・総会（2000 年 10 月、三重）

栃倉匡文、東 尚世、川野久美、河合明彦：エンベロープを持ったウイルス粒子に取り込まれる宿主由来成分 VAP21 の機能解析. 日本薬学会第 120 年会（2000 年 3 月、岐阜）

目次

1. 研究目的
2. 実験計画・方法
3. 実験結果と考察

1. 研究目的

現行の狂犬病ワクチンは組織培養に馴化した狂犬病ウイルスを培養系で増殖させて部分精製後、不活化したものである。そのため曝露後発病予防の目的でこのような宿主由来の不純物を含むワクチンを頻回に接種することにより自己抗体の産生を惹起する可能性が生じることが危惧される。一方で成熟ウイルス粒子には精製操作を繰り返しても排除できない宿主由来成分が存在することが報告されている。我々もこれまでにシリアンハムスター由来の培養細胞 (BHK-21) で増殖させた狂犬病ウイルス粒子中にはウイルス由来の 5 種類の構造タンパク質以外に 8 種類の宿主由来タンパク質 (130kDa、100kDa、85kDa、82kDa、75kDa、42kDa、73kDa、21kDa) が取り込まれていること、また培地由来のファイブロネクチン [260kDa] がインテグリン (130kDa、宿主細胞由来) を介してウイルス粒子に結合することを見出した (第 43 回日本ウイルス学会で発表)。これらの宿主由来タンパク質のうち、42kDa はアクチンであることが既に報告されていたが、我々の研究から 85kDa (エズリン)、82kDa (ラディキシン)、75kDa (モエシン) はアクチン結合タンパク (ERM) であり (Sagara, J. *et al.*, *Virology*, 1995)、73kDa のものは熱ショックタンパク (Hsc70) で細胞内でもヌクレオカプシドと結合していることが明らかとなった (Sagara, J. *et al.*, *Virology*, 1992)。これら特定の宿主成分が成熟したウイルス粒子に選択的に取り込まれるのは細胞内でのウイルス複製過程との密接な関わり合いを持つ可能性があることを示唆するものである。このような宿主成分は通常は粒子形成過程で排除されるが、一部は完全に排除されずに粒子中に取り込まれると思われる。従って成熟粒子内の宿主由来成分を同定することはウイルス粒子形成に関わりを持つ宿主成分の機能を明らかにするきっかけとなるとともに、培養細胞では効率よく増殖でき、接種回数が少なくても狂犬病ウイルスに特異的な抗体産生を誘導できる理想的な狂犬病ワクチンを今後開発する上での貴重な基礎データになると期待される。

そこで、我々はウイルス粒子中に最近新たに検出された 2 つの宿主成分 (100kDa、21kDa) のうち 21kDa のもの (以下 VAP21) に着目し、その性状解析を行ったところ、これまでに以下のような知見を得た。【1】精製ウイルス粒子をプロテアーゼ処理すると VAP21 はウイルス粒子から外れたが、アルカリ処理では影響を受けなかったことから、VAP21 はエンベロープタンパクと associate し、VAP21 がウイルス粒子表面に露出していることが示唆された (免疫沈降法)。【2】蛍光抗体法を用いた研究から VAP21 抗原は狂犬病ウイルス非感染細胞においては微絨毛上に瀰漫性に発現するが、ウイルス感染によりエンベロープタンパクである G タンパク、M タンパクの発現分布と VAP21 のそれとはパッチ状 (G) あるいはスポット状 (M) の同じパターンを示すようになった。【1】【2】で得られた知見は VAP21 がウイルス粒子形成に何らかの役割を演じている可能性があることを示唆するものである。 (Sagara, J. *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, 1999)。【3】BHK-21 細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法により cDNA を合成した。抗 VAP21 モノクローナル抗体を

用いて VAP21 の cDNA スクリーニングを行い、塩基配列を決定したところ、そこから推定されるアミノ酸配列から、VAP21 は I 型糖タンパクに属し、膜貫通部分を 1 ヶ所持ち、ヒトのリンパ球に見い出されている CD99 分子と膜貫通部分において相同性領域（約 40%）を持つが、現在までのところ未同定の細胞膜成分であることが明らかとなった (Sagara, J. *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, 1998)。【4】 VAP21 が狂犬病ウイルス以外のウイルス粒子にも取り込まれているか否かについて検討したところ、以下のような結果を得た。(1) 精製ウイルス粒子を用いた実験から VAP21 は狂犬病ウイルス以外のマイナス鎖 RNA ウイルス（水疱性口内炎ウイルス、以下 VSV）、プラス鎖 RNA ウイルス（シンドビスウイルス、以下 SV）及び 2 本鎖 DNA ウイルス（単純ヘルペスウイルス I 型、以下 HSV-1）の粒子中にも検出された（ウエスタンブロット法）。(2) ウイルス感染 BHK-21 細胞ライセートを抗 VAP21 抗体で免疫沈降したところ、VSV ではエンベロープタンパク（M）及び N タンパクが、SV ではカプシドタンパクが、又 HSV-1 ではカプシドタンパク及びエンベロープタンパクが検出された。以上の結果は VAP21 が種々のエンベロープを持ったウイルス粒子中に取り込まれることを示すものであり、VAP21 が単独で、或いは他の宿主細胞成分を介してウイルスタンパクと complex を形成する可能性があることを示唆するものである (Yamamoto, K. *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, 1998)。【5】 VSV の G 及び M タンパク共発現細胞ライセートを抗 VAP21 抗体を用いて免疫沈降すると G 及び M タンパクが検出されたが、G タンパク単独発現細胞ライセートでは G タンパクは共沈されず、M タンパク単独発現細胞ライセートでは M タンパクの共沈が検出された（未発表データ）。これらの結果は VSV では VAP21 は M タンパクと強く associate していることを示唆するものであり、このことはウイルス感染系(上記【4】)及び間接蛍光抗体法(上記【2】)で得られた結果と一致しており、VAP21 がウイルス粒子形成において何らかの役割を演じている可能性があることをうかがわせるものである。

そこで、本研究ではこれまでに得られた成果をもとに VAP21 の機能解析を目指すと同時にウイルス粒子形成における VAP21 の役割を明らかにすることを目的として、その基礎的検討を行った。

2. 実験計画・方法

【1】 VAP21 の同定作業

BHK-21 細胞以外の種々の培養細胞、個体レベルでは種々の臓器・組織における VAP21 遺伝子の存在の有無、発現状況等をサザンブロット法、ノーザンブロット法、ウエスタンブロット法を用いて解析し、VAP21 の機能を明らかにするための基礎データを集める。

【2】 VAP100 の同定作業

VAP21 に比べて同定作業が進んでいない VAP100 については、現在モノクローナル抗体が準備できており、これを用いた生化学的解析を行う。

【3】 VAP21 の機能解析

(1) VAP21 を発現していない種々の動物細胞 (CHO-K1、HeLa、MDCK、COS-7) に pZIP-NeoSV(X)1 ベクター或いは tetracycline-regulated gene expression system を用いて VAP21 遺伝子の導入及び発現を試みる。次に VAP21 発現誘導細胞 (テトラサイクリン非存在下) にエンベロープを持つ種々のウイルスを感染させ、ウイルス産生量 (プラーク法)、ウイルスタンパクの細胞内分布 (間接蛍光抗体法) を VAP21 発現非誘導細胞 (テトラサイクリン存在下) との間で比較することにより、VAP21 のウイルス複製に及ぼす影響を調べる。

(2) VAP21 遺伝子の逆転写 cDNA を挿入したアンチセンス mRNA 発現マウスレトロウイルスベクターを構築する。BHK-21 細胞に発現ベクターを導入後、抗 VAP21 抗体で細胞を処理し、次にモルモット補体を添加することにより VAP21 発現細胞を溶解除去する。得られた VAP21 発現抑制細胞にエンベロープを持つ種々のウイルスを感染させ、上記 (1) の方法により VAP21 のウイルス複製に及ぼす影響を調べる。

【4】 CD99 の cDNA クローニングと発現

ヒト T 細胞由来 Jurkat 細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法によって CD99 の cDNA をクローニングする。cDNA を大腸菌で発現させ、得られたポリペプチドを抗原としてウサギを免疫して抗 CD99 抗体を作製する。

3. 実験結果と考察

【1】 VAP21 の同定、抗原分布

シリアンハムスターの種々の臓器・組織・培養細胞、シリアンハムスター以外の動物（チャイニーズハムスター、マウス、サル、イヌ、ヒト）由来培養細胞における VAP21 抗原の発現状況について検討した。まず最初にサザンブロット法を用いて VAP21 遺伝子の存在を検討したところ、調べた全ての細胞において遺伝子が存在することが示されたが、ノーザンブロット法による解析ではシリアンハムスター由来の細胞（BHK-21、HmLu-1）においてのみ VAP21 遺伝子の発現が見られ、チャイニーズハムスター由来の CHO-K1 細胞では発現は見られなかった。cDNA を大腸菌で発現させて得られたポリペプチドを抗原としてウサギを免疫して作製した抗体を用いて行ったウエスタンブロット法においても同様の結果が得られ、シリアンハムスター由来の細胞においてのみ 21~22kDa のバンドが検出された。次にシリアンハムスターの肝臓、腎臓、腸管等の種々の臓器についてウエスタンブロットを行ったところ、調べた全ての臓器において VAP21 抗原が検出されたが、臓器間で電気泳動における移動度が異なっていた。以上の結果から VAP21 はシリアンハムスターに特異的に発現しているが、個体レベルでは臓器間で異なるプロセッシングを受ける可能性があることが示唆された（投稿中）。

【2】 VAP100 の同定

狂犬病ウイルス感染 BHK-21 細胞について抗 VAP100 モノクローナル抗体を用いて間接蛍光抗体染色を行ったところ、狂犬病ウイルスのエンベロープタンパクの発現分布と VAP100 のそれとは同じパターンを示した。又、免疫沈降法、蔗糖密度勾配遠心後の精製ウイルス粒子について行ったウエスタンブロット法の結果から VAP100 はウイルス粒子表面に露出し、エンベロープタンパクと associate していると推察された。これらの結果は VAP100 が VAP21 と同様にウイルス粒子形成に何らかの役割を演じている可能性があることを示唆するものである。

【3】 VAP21 の機能解析

まず初めにシリアンハムスター由来 BHK-21 細胞にアンチセンス mRNA 発現ベクターを導入後、抗 VAP21 抗体で細胞を処理し更にモルモット補体を添加することにより VAP21 発現抑制細胞の樹立を試みた。VAP21 の発現をウエスタンブロット法により確認したところ、VAP21 発現量が 1/2~1/4 に減少した細胞が得られた。この細胞に VSV を感染させたところ、ウイルス産生量は約 50% に減少していた。次に tetracycline-regulated gene expression system を用いテトラサイクリンにより誘導可能な VAP21 発現細胞の樹立を試みた。VAP21 の発現は培地からテトラサイクリンを除去後、間接蛍光抗体法、ウエスタンブロット法により確認した。VAP21 非発現細胞（HeLa [ヒト]、MDCK [イヌ]、COS-7 [サル]、CHO-K1 [チャイニーズハムスター]）に 3 種類の DNA（pTet-tTAk、pTet-VAP21、pIRES-Neo）をトランスフェクション後 4 日目に蛍光抗体染色を行ったところ、VAP21 抗原陽性率は

3.5% (HeLa/VAP21)、9.5% (MDCK/VAP21)、10.5% (COS-7/VAP21)、1.3% (CHO-K1/VAP21)であった。これらの細胞についてさらに培養を続けると MDCK/VAP21 を除いて抗原陽性細胞数は徐々に減少し、G418 耐性細胞が樹立される頃には全て消失した。MDCK/VAP21 については限界希釈によりクローニングを行ったところ、抗原陽性率の高い 3 つのクローン（陽性率：14～50%）を得ることができたが、さらに培養を続けたところ抗原陽性細胞は全て消失した。以上の結果から、本来 VAP21 が備わっていない細胞に VAP21 を発現させると細胞死が誘導される可能性が考えられたため、次に VAP21 を恒常的に発現しているシリアンハムスター由来の 2 種類の細胞 (BHK-21, HmLu-1) に VAP21 遺伝子を導入し、VAP21 過剰発現細胞の樹立を試みるとともに VAP21 のこれらの細胞に与える影響について検討した。G418 耐性となったコロニーについてウェスタンブロット法で VAP21 発現量を定量したところ、BHK-21/VAP21 では 64 倍、HmLu-1/VAP21 では 128 倍、親株 (BHK21, HmLu-1) に比べて増加していた。次に MDCK/VAP21 (抗原陽性率：40%)、COS-7/VAP21 (一過性発現、抗原陽性率：20%)、BHK-21/VAP21 について VSV を感染させ、VAP21 のウイルス増殖に及ぼす影響について調べたところ、MDCK/VAP21 では 2 倍、COS-7/VAP21 及び BHK-21/VAP21 では 4 倍、ウイルス産生量が親株より増加していた。以上の結果から VAP21 はウイルス増殖にポジティブに働く可能性が示唆された。(投稿中)。なお、VAP21 非発現細胞では緩徐に引き起こされる細胞死のために VAP21 発現誘導可能な細胞が樹立できなかったことから、VAP21 の発現と最近報告されている CD99 によるアポトーシス誘導との関連性について現在検討しているところである。ところで、VAP21 過剰発現細胞においては細胞表面に球形の無数の vesicle 形成が見られるようになった。これまでに VSV の M タンパク単独発現において細胞表面から培養液中に vesicle が放出されることが報告されていることから、今回、VAP21 過剰発現細胞において観察された vesicle 形成がウイルス粒子形成に何らかの役割を演じている可能性があることも十分に考えられる。VAP21 のウイルス粒子形成における役割については今後さらに検討していく予定である。

[4] CD99 の cDNA クローニングと発現

ヒト T 細胞由来 Jurkat 細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法によって CD99 の cDNA をクローニングした。この cDNA を大腸菌で発現させて得られたポリペプチドを抗原としてウサギを感作し、抗 CD99 抗体を作製した。今後、これを用いて生化学的解析を行う予定である。