

ウイルスの感染はウイルスが細胞表面に結合することから始まるといわれている。ウイルスの細胞内への侵入は L2 蛋白質の関与なしでも L1 蛋白質が細胞表面のレセプターに結合することでおこることが知られている。一方で L1 蛋白質のみで構成された偽ウイルスより L1/2 蛋白質で構成された偽ウイルスの方が感染価が高いことから、L2 蛋白質はウイルスが細胞表面に結合した後に何らかの役割を果たすのではないかと推測される。しかし未だ L2 蛋白質がどのようにしてウイルス感染に関与しているかは不明であり、L2 蛋白質と細胞表面の相互作用が重要である可能性を示唆する報告も散見される。そこで L2 蛋白質と細胞表面との相互作用を調べるため、GFP 融合 L2 蛋白質を作製し、子宮頸癌由来細胞表面への結合、侵入を調べ、L2 蛋白質の 108-120aa が HPV 感染において果たす役割を解明することを本研究の目的とした。

【方法】

(HPV16L2 蛋白質の 108-126aa 領域と GFP(Green Fluorescent Protein)との融合蛋白質の作製)

HPV16L2 蛋白質の 108-126aa 領域をコードする DNA 断片はを 3 回の PCR にて増幅し、バキュロウイルス発現系を用いて、GFP の N 末端に融合させた GFP-L2(108-126)を精製した。108-126aa 領域にアミノ酸変異を導入した 3 種類の GFP 融合蛋白質も同様に作製した。

(GFP-L2(108-126)の細胞表面への結合及び侵入)

細胞は子宮頸癌由来細胞である HeLa 細胞を用いた。GFP-L2 融合蛋白質を浮遊系及びスライドガラス上で培養した HeLa 細胞と 4℃で 1 時間反応させ、十分に洗浄したのち、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞内への侵入は、引き続き 37℃での培養後に観察した。細胞核の染色には propidium iodide を使い、GFP 融合蛋白質の局在をより明確にした。GFP 融合蛋白質と HeLa 細胞表面との結合は FACS(fluorescence-activated cell sorting) にて定量的に測定した。

(種類の細胞における GFP-L2(108-126)の結合能の比較)

子宮頸癌由来の細胞(SiHa, CaSki)、ヒト由来の上皮系細胞(293, Alexander, Hep G2)、サル由来上皮系細胞(COS-1)、げっ歯類由来上皮系細胞(C127,NIH/3T3,3Y1)、ヒト由来間質細胞(PAI)、昆虫由来細胞(Sf9)の各々について、GFP-L2(108-126)との結合を同様に FACS を用いて定量的に測定した。

(HPV 偽ウイルスの作製と感染価の評価)

L2 蛋白質 108-126aa と細胞表面との結合とウイルスの感染との関連を調べるた

め、細胞との結合能を失ったアミノ酸変異をもつ HPV 偽ウイルスを作成し、感染実験を行った。L2 蛋白質の 108-111aa を LVEE から GGDD に変異させた L2 蛋白質と L1 蛋白質をバキュロウイルスを用いて発現させ VLP を精製した。2-メルカプトエタノールで粒子構造を壊した状態でレポーター遺伝子である β -galactosidase 発現プラスミドを加え、ゆっくりと透析を行うことで、蛋白質が再構成され粒子内にプラスミド DNA を組み込んだ偽ウイルスができた。偽ウイルスは塩化セシウム平衡密度勾配遠心法およびショ糖沈降速度法によって精製した。野生型の L1/2 偽ウイルスと同量の変異型 L1/2 偽ウイルスを用いて COS-1 細胞への感染実験を行い、その感染価を比較した。

(HPV16L2 ペプチドによる競合)

L2 蛋白質の 108-120aa を含むペプチド、もしくは 108-120aa を含む融合蛋白質を競合剤として、あらかじめ COS-1 細胞に添加した後、野生型偽ウイルスの感染実験を行い、感染が競合されるか否かを調べた。

【結果】

(GFP-L2(108-126)の細胞表面への結合及び侵入)

共焦点レーザー顕微鏡での観察の結果、GFP-L2(108-126)は細胞表面に結合していた。さらに 37°C で 2 時間反応させた後に観察すると、GFP-L2(108-126)は細胞内に侵入していることが確認された。FACS による定量的な測定では、GFP-L2(108-126)はコントロールである GFP に比して明らかに強い蛍光強度を示した。また、GFP-L2(108-126)は、あらかじめトリプシン処理をした HeLa 細胞には結合せず、このことから、結合には細胞表面の蛋白質が関与していることが示唆された。3 種類の変異型 GFP-L2 のうち、108-111aa を LVEE から GGDD に変異させた GFP-L2(GGDD)は細胞表面との結合能を失った。

(種類の細胞における GFP-L2 蛋白質の結合能の比較)

子宮頸癌由来の他の細胞(SiHa, CaSki)はヒトの肝癌由来細胞(Alexander, Hep G2)より強く、またヒト由来細胞(SiHa, CaSki, 293)はげっ歯類由来上皮系細胞(C127,NIH/3T3,3Y1)より強く結合がみられた。ヒト由来間質細胞(PAI)、昆虫由来細胞(Sf9)には結合がみられなかった。このことからヒトの上皮系細胞に標的蛋白質が多く存在していることが予想された。

(HPV 偽ウイルスの感染価の評価)

電子顕微鏡での観察では変異型偽ウイルスは野生型偽ウイルスと同様の粒子構造をとっていた。ショ糖沈降速度法によって分画し、L1 および L2 蛋白質の質量

比が野生型と同様であることを確認した。ウイルス内のプラスミド DNA は DNase I 耐性 DNA を PCR 法で検出することで確認した。変異型ウイルスの感染価は野生型の 1/3 から 1/4 程度まで低下した。

(HPV16L2 ペプチドによる競合)

L2 蛋白質の 108-120aa ペプチド、もしくは 108-120aa を含む融合蛋白質にて、HPV16 偽ウイルスの感染は競合された。感染価は競合剤の量依存性に下がることを確認した。十分な競合剤により低下した感染価は L1 のみで構成される偽ウイルスの感染価とほぼ同等であった。このことは L2 蛋白質の 108-120aa がウイルスの感染を効率的に行うために必要であることを示している。

【考察および結語】本研究においては、GFP と融合させた L2(108-126)ペプチドが低温では細胞表面に結合し 37°C で細胞質内に侵入することが共焦点レーザー顕微鏡で観察され、L2(108-120)ペプチドが偽ウイルスの感染を競合阻害することが明らかとなった。競合実験においては L2(108-120)が結合できる細胞側のレセプターの存在が示唆された。GFP 融合 L2(108-126)ペプチドの細胞表面への結合や侵入はそのまま粒子の中の L2 蛋白質の動態を反映していると思われる。なぜなら、細胞との結合能を失ったアミノ酸の置換と同じアミノ酸置換をもつ偽ウイルスの感染価は低下しているからである。従って、L2(108-126)は、ウイルスが細胞と結合する感染の初期過程において、細胞側のレセプターと結合することによって感染効率をあげていると推測される。また L1 に対するレセプターの候補に挙げられている蛋白質は様々な組織由来の細胞に広く分布している蛋白質であるのに対し、結果から推測されるように L2 に結合する細胞蛋白質は子宮頸癌由来上皮細胞により多く分布していることから、この蛋白質は粘膜型 HPV の細胞特異性の一部を決定している可能性が考えられる。

本研究から HPV の L2 蛋白質の 108-120 アミノ酸領域が細胞表面の蛋白質と作用することによりウイルスの感染に重要な役割を担っていることが示唆された。L2 蛋白質の 108-120aa に対する抗体をワクチンによって誘導することができれば予防ワクチンとして臨床応用できる可能性がある。しかもこの L2 領域が粘膜型 HPV によく保存されていることから、この領域を標的にしたワクチンはどの粘膜型 HPV にも有効な broad-spectrum な予防ワクチンになりうる。また、この L2 領域と相互作用のある細胞表面に存在する蛋白質を同定することは HPV の感染のメカニズムを解明することにつながると考えられる。