

電子顕微鏡的酵素抗体法による単純ヘルペスウイルス 感染細胞中の glycoprotein D の局在

—時間的経過—

益 田 徹

広島大学医学部眼科学教室

要 約

単純ヘルペスウイルス感染細胞中の glycoprotein D の局在とその時間的経過を調べる目的で、家兎角膜培養細胞に単純ヘルペスウイルス1型を感染させ、glycoprotein D に対するモノクローナル抗体を用いて電子顕微鏡的酵素抗体法を行い観察した。ウイルス吸着直後には、ウイルスのエンベロープが染色され、ウイルスが接触する細胞膜にも染色が認められた。吸着後5時間から細胞質内の膜構造の一部と核膜に新たな反応産物が認められるようになり、この時点で glycoprotein D の産生が始まったものと考えられた。ヌクレオカプシドの出現し始める吸着後6時間になると、細胞膜の全周も染色されるようになった。吸着後12時間では、ウイルスはエンベロープを獲得して、細胞外へ放出されていた。エンベロープの獲得は反応産物が存在する細胞質内の二重膜構造または核膜を利用して行われた。(日眼会誌 95:817-828, 1991)

キーワード：単純ヘルペスウイルス, glycoprotein D, 免疫電顕, モノクローナル抗体, 培養細胞

Immunoelectron Microscopic Localization of Herpes Simplex Virus Glycoprotein D in Infected Culture Cells Using the Indirect Peroxidase-labeled Antibody Method

Toru Masuda

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

Abstract

Ultrastructural localization of herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D was studied using HSV infected monolayers of rabbit corneal cells. The pre-embedding indirect peroxidase-labeled antibody method was employed. Immediately after viral adsorption, deposits of reaction products were seen on the viral envelope. The cytoplasmic membrane showed focal positive staining at the sites of virus attachment. At 1 hour after infection, reaction products were found on the envelope of the virus in the phagocytic vacuoles and on the walls of these vacuoles. The localization of the staining did not alter until 4 hours after infection. At 5 hours after infection the nuclear envelope and parts of the membranous structures in the cytoplasm were stained. At 6 hours after infection, when capsid assembly began, the cell surfaces were stained throughout. At 12 hours after infection, when

別刷請求先：734 広島市南区霞1-2-3 広島大学医学部眼科学教室 益田 徹
(平成2年8月17日受付, 平成2年12月8日改訂受理)

Reprint requests to: Toru Masuda, M.D. Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine.

1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(Received August 17, 1990 and accepted in revised form December 8, 1990)

enveloped particles were released into the extracellular space, viral particles were enveloped by the nuclear membrane or membranous structures in the cytoplasm. These membranes were stained positively. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 817-828, 1991)

Key words: Herpes simplex virus, Glycoprotein D, Immunoelectron microscopy, Monoclonal antibody, Cultured cells

I 緒言

単純ヘルペスウイルス(HSV)のエンベロープには、7種類の glycoprotein が存在するが、その役割や感染細胞内での分布は不明である¹⁾²⁾。角膜ヘルペスでは、細胞性免疫の関与する実質型角膜炎において、glycoprotein が感染細胞の表面抗原として病態の成立に関与していると考えられている³⁾が、その詳細は明らかではない。glycoprotein の一つで、中和抗体の主要標的と考えられている glycoprotein D (gD) を取り上げてみると、HSV 感染細胞における gD の局在については、これまでに蛍光抗体法を用いて観察され、細胞膜に局在することが確かめられている^{4)~6)}が、細胞内の局在を超微形態学的に検討したものはない。また、従来から広く行われている免疫沈降法を用いた生化学的手法では、感染2~3時間以降に新たに gD が産生され始めることが明らかになっている^{7)~9)}が、感染細胞の膜に存在する新生 gD と新生ウイルスのエンベロープ中に存在する gD とを区別することができず、詳細な検討の妨げとなっていた²⁾。今回、抗 gD ヒトモノクローナル抗体を用いて電子顕微鏡(電顕)的酵素抗体法を行い、感染細胞内の gD の局在を経時的に初めて観察することができたので報告する。

II 実験方法

1. 培養細胞とウイルス

培養細胞には、継代培養した Sweden institute rabbit corneal cell (STRC 細胞) を使用した。増殖には、Eagle's minimal essential medium に10%の calf serum (KC Biological, Inc.) および penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml) を加えたものを使用した。維持には、calf serum を2%とした。ウイルスは、角膜ヘルペス患者の角膜擦過材料から分離した HSV 1型の Moto 株を使用した。その感染価は、microtiter 法にて $10^{6.8}$ TCID₅₀/ml であった。

2. HSV の接種

Cover slip 上に SIRC 細胞の monolayer (3~4 \times 10⁶

cells/cover slip) を作製した後、multiplicity of infection が10前後になるように、HSV を含む medium 0.5 ml を角チューブ中に入れ、37 $^{\circ}$ C で1時間吸着させた。その後、cover slip を phosphate buffer solution (PBS) で3回洗い、新しい培養液を含む角チューブに移し、37 $^{\circ}$ C で培養した。吸着後0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12時間の8時点に cover slip を取り出し、以下の検索に当たった。

3. 観察方法

1) 通常の電子顕微鏡的観察

取り出した cover slip 上の HSV 感染細胞を PBS で洗浄後、2%グルタルアルデヒドで4時間固定、2%オスミウム酸で再固定し、脱水後エポンに包埋、重合した。ガラス面を軽く加熱し、エポンブロックから cover slip を取り除いてトリミング後、超薄切片を作製し、酢酸ウラニール・鉛二重染色を行い、電子顕微鏡で観察した。超薄切片の作製には LKB 2128 Ultratome を用い、電子顕微鏡は日本電子100CX を80 kV の加速電圧で使用した。

2) 電顕的酵素抗体法

電顕的酵素抗体法には、McLean & Nakane の PLP 液 (periodate-lysine-paraformaldehyde) で、5 $^{\circ}$ C 4時間の固定を行った。染色は以下の手順で、5 $^{\circ}$ C に氷冷して行った。まず cover slip を取り出し、PBS (pH 7.2, 0.01M) で1分間の洗浄を3回行った後、10%蔗糖および 4×10^{-5} M digitonin 加 phosphate buffer (PB, pH 7.2, 0.05M), 15%蔗糖加 PB, 20%蔗糖加 PB にそれぞれ3時間浸漬し、20%蔗糖加 PB+10%グリセリンに1時間浸漬し、固定液の洗浄を行った。クライオスタット中で急速に氷結、自然融解した後、10%蔗糖加 PBS で洗浄し、10%未感作正常山羊イムノグロブリンで30分間前処理を行った。その後10%蔗糖加 PBS で10分間の洗浄を3回行い、湿室中で抗 gD ヒトモノクローナル抗体 (20倍希釈) と1晩反応させた。10%蔗糖加 PBS で10分間3回洗浄後、ペルオキシンダーゼ標識抗 IgG F(ab')₂ 抗体 (40倍希釈) と3時間反応させた。10%蔗糖加 PBS で30分間の洗浄を4回繰

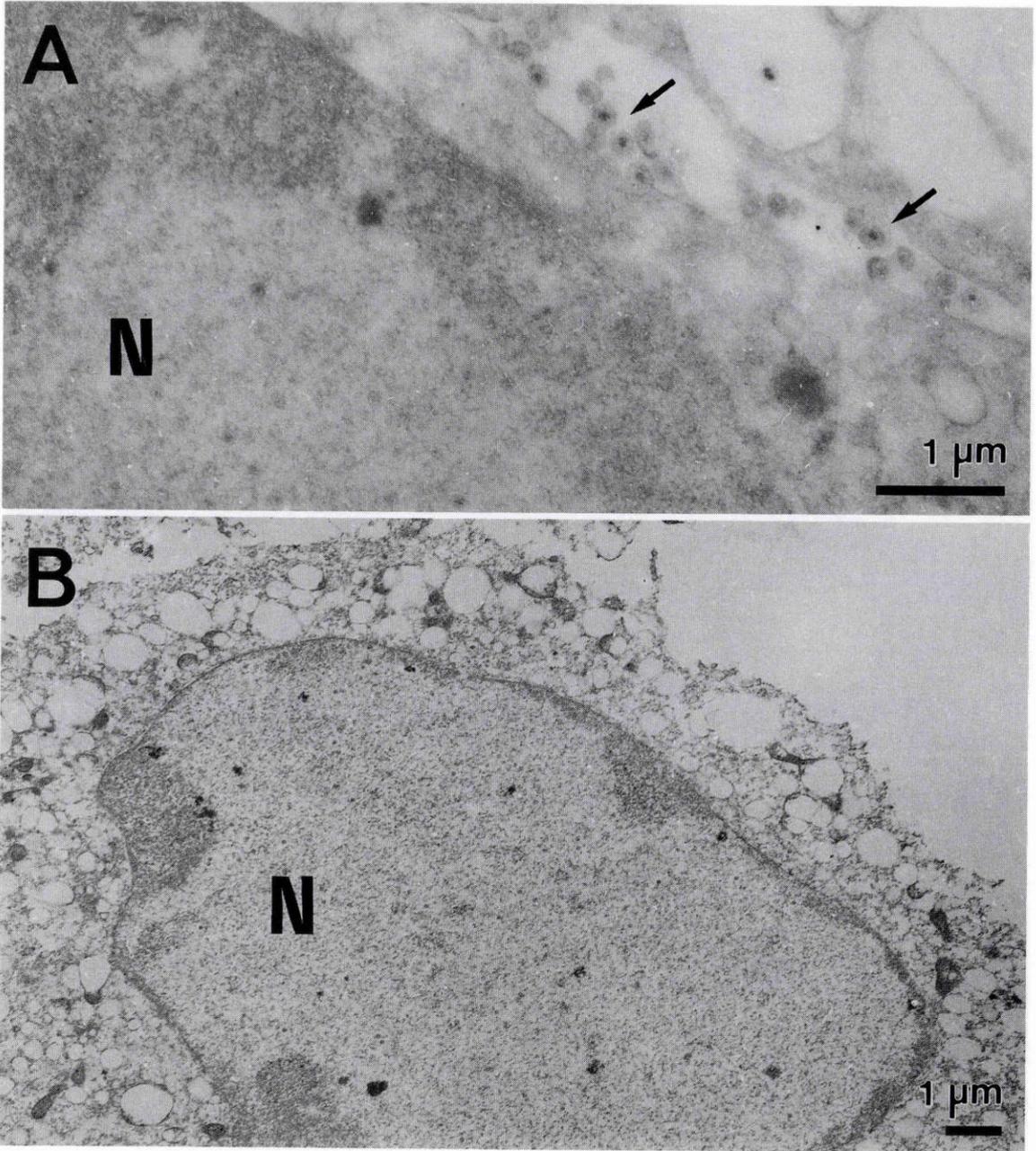


Fig. 1 Electron micrographs of HSV-infected cells of negative-control staining at 12 hours after infection. (A & B: immunoelectron microscopy)

A. Many viral particles (arrows) are seen in extracellular space. Viral envelopes are not stained at all. $\times 19,000$ B. Nuclear envelope and cell surface are not stained at all. $\times 8,100$

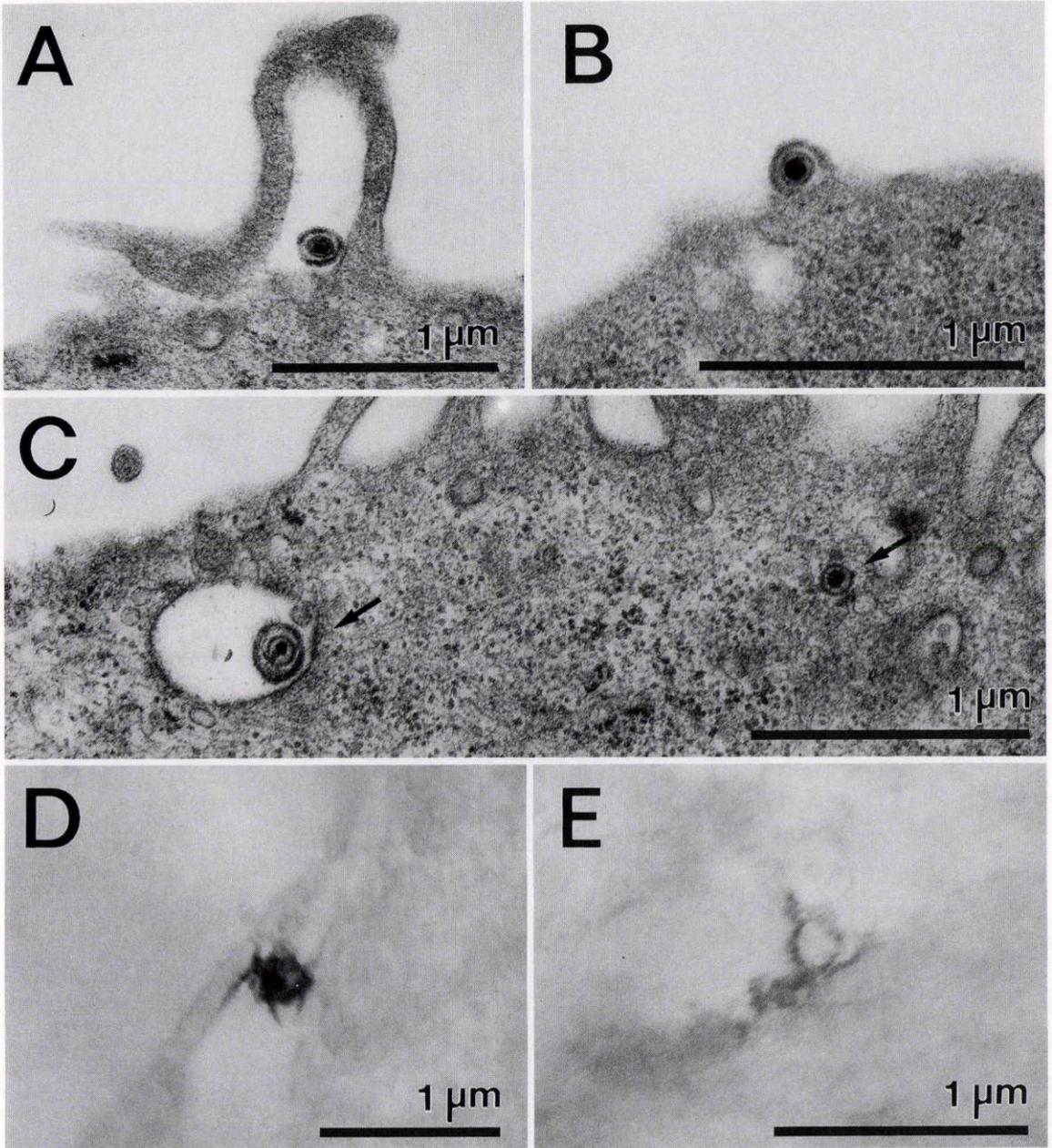


Fig. 2 Electron micrographs of HSV-infected cells immediately after viral adsorption (0 hour after infection). (A, B & C: standard, D & E: immunoelectron microscopy)

A. Viral particle is adherent to microvillus. $\times 32,000$ B. Envelope of viral particle is fused to cell surface. $\times 46,000$ C. Left arrow shows enveloped particle in phagocytic vacuole. Right arrow shows naked particle. $\times 39,000$ D. Viral envelope and surface of microvillus are stained. $\times 26,000$ E. Viral envelope and cell surface fused with envelope are stained. $\times 36,000$

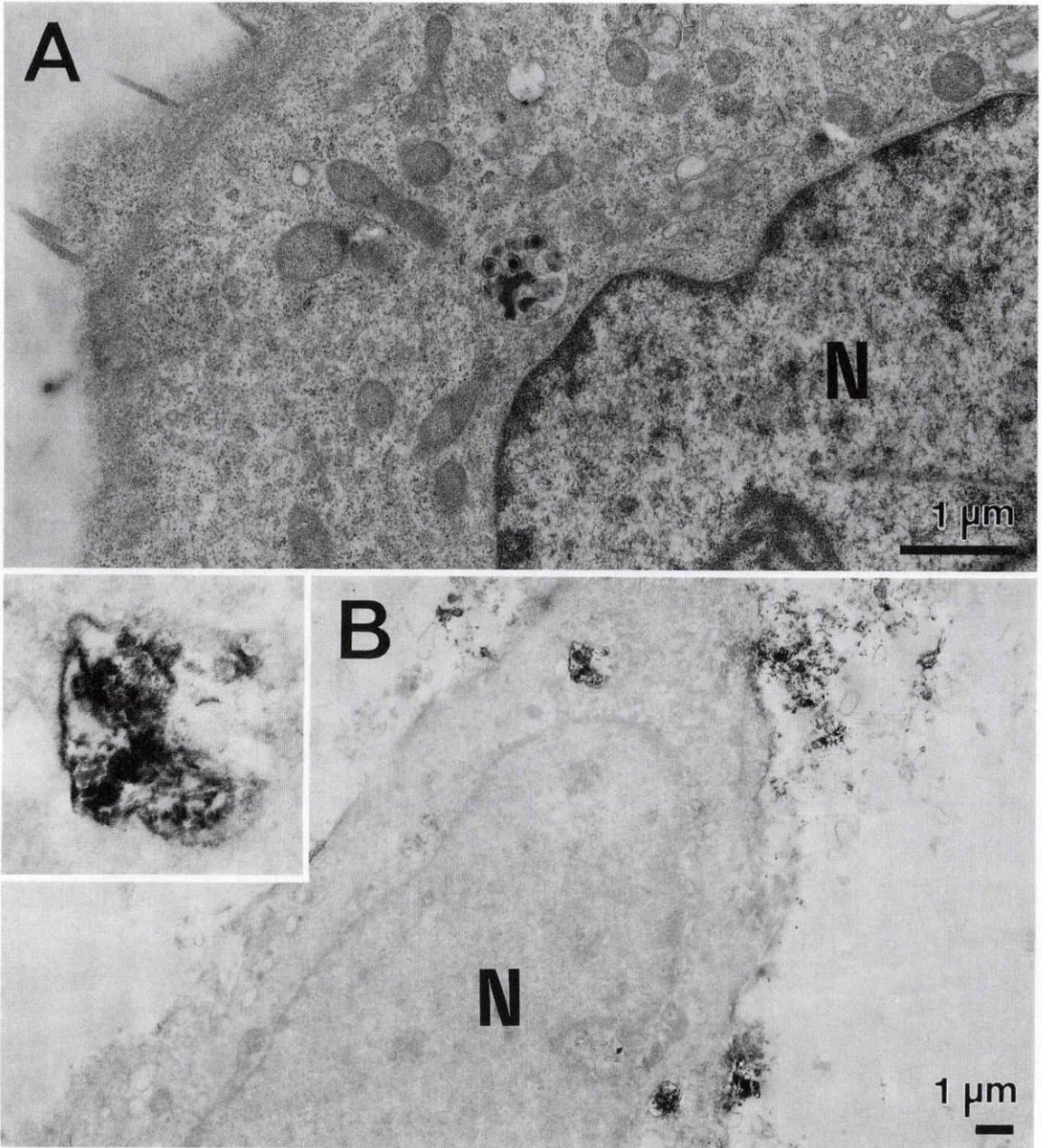


Fig. 3 Electron micrographs of HSV-infected cells at 1 hour after infection. (A : standard, B : immunoelectron microscopy)
A, Phagocytic vacuole containing enveloped virions and naked particles are seen near by nucleus. $\times 16,000$ B, Envelope of virus in phagocytic vacuoles and walls of these vacuoles are stained. $\times 5,700$

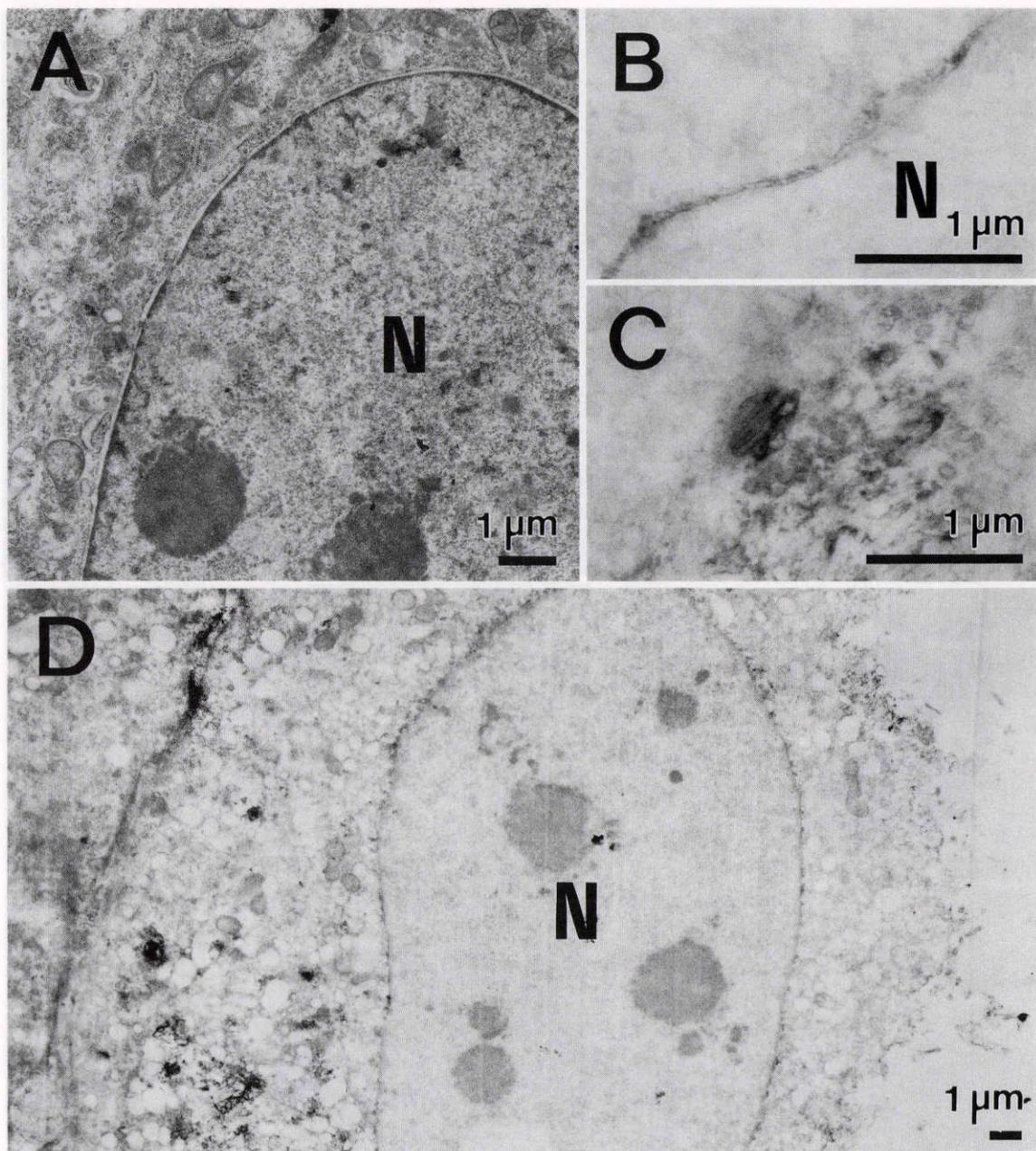


Fig. 4 Electron micrographs of HSV-infected cells at 5 hours after infection. (A: standard, B, C & D: immunoelectron microscopy)
 A. Chromatin has become sparse but viral particles are not seen. $\times 8,400$ B, C & D. Nuclear envelope and parts of membranous structures in cytoplasm are stained. B: $\times 25,000$, C: $\times 23,000$, D: $\times 4,400$

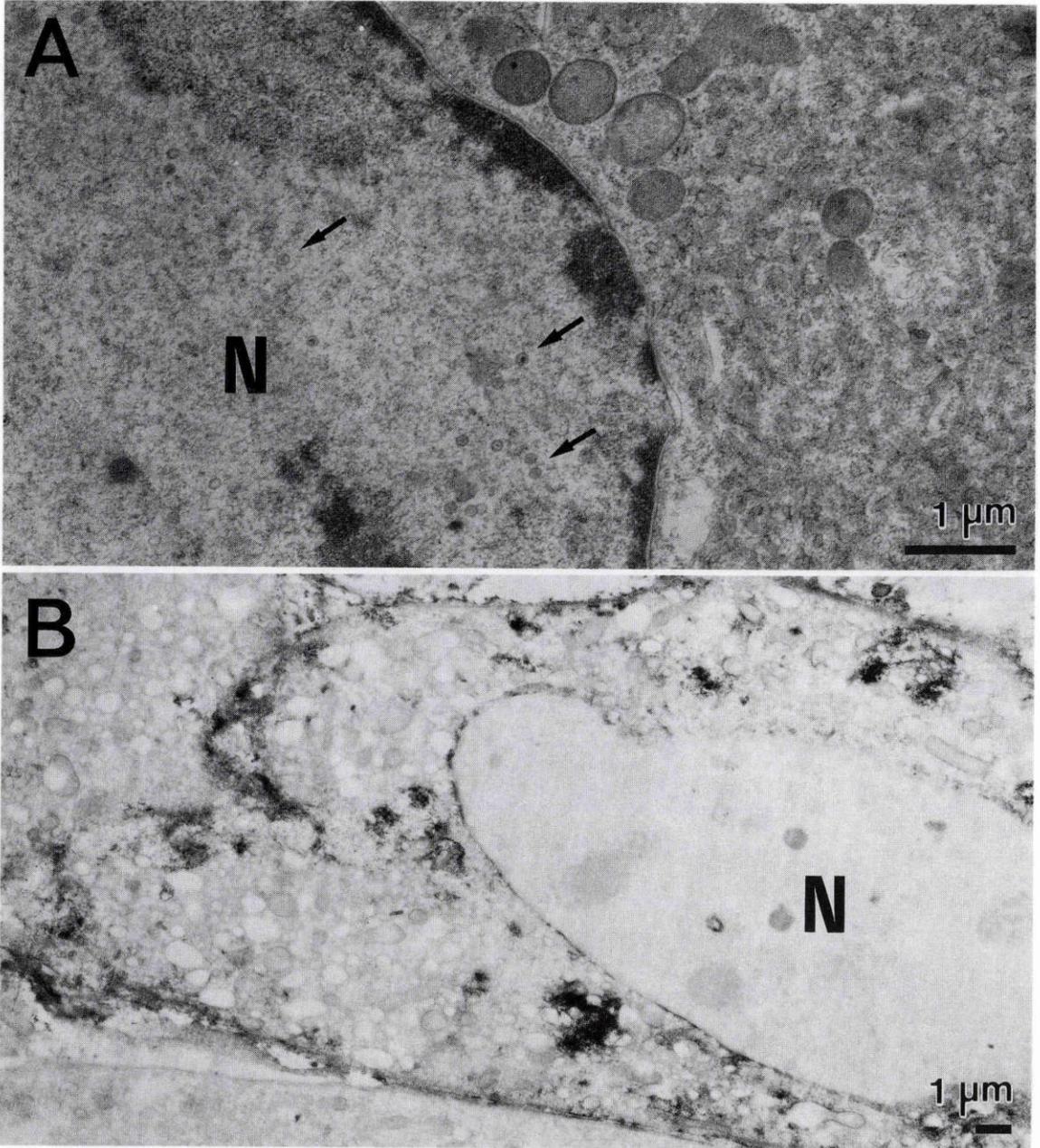


Fig. 5 Electron micrographs of HSV-infected cells at 6 hours after infection. (A : standard, B : immunoelectron microscopy)
A. Capsid assembly has begun, and viral particles (arrows) are seen in nucleus. $\times 16,000$
B. Nuclear envelope and parts of membranous structures in cytoplasm are stained more intensely, and cell surface is stained throughout. $\times 5,000$

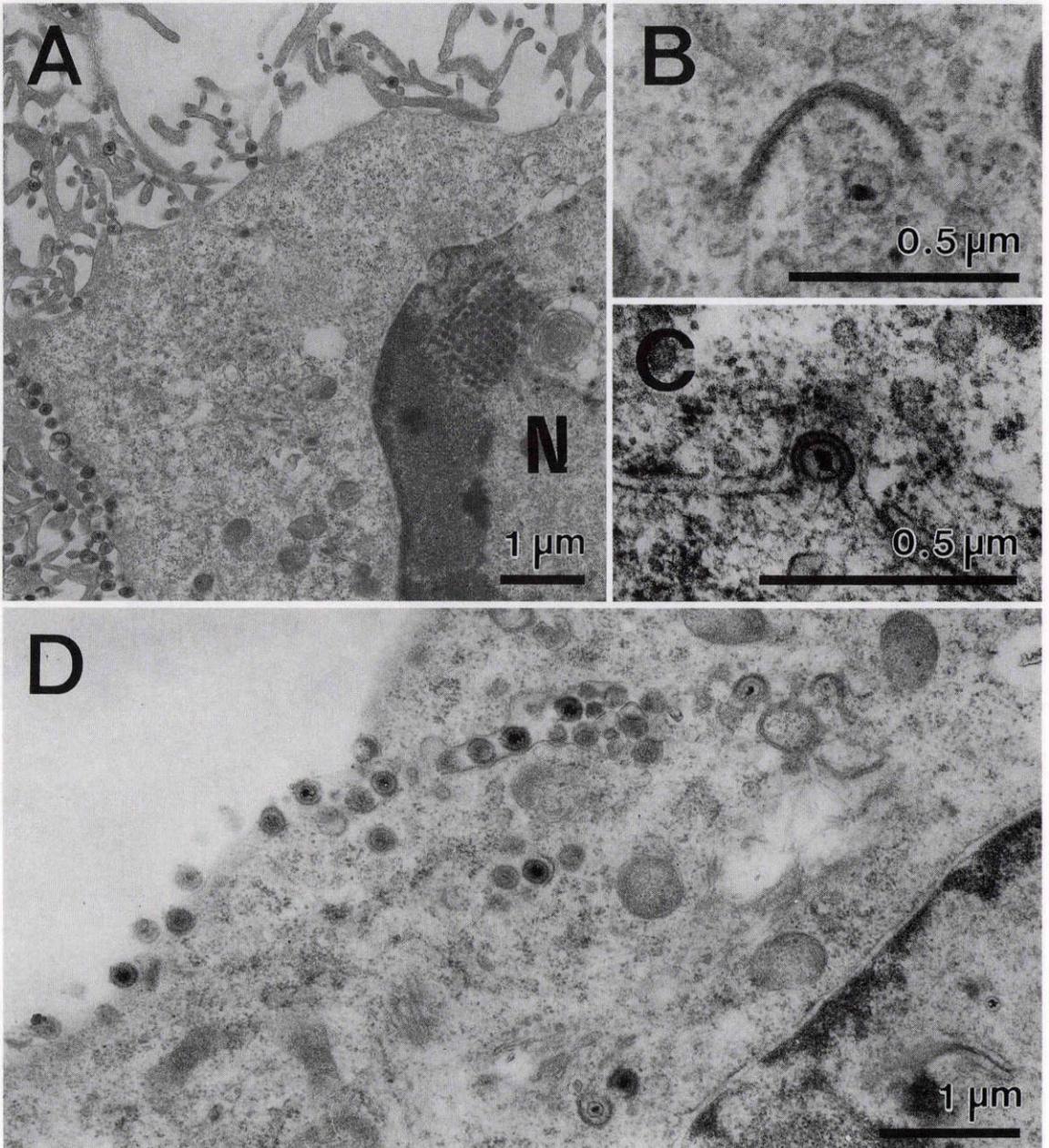


Fig. 6 Electron micrographs of HSV-infected cells at 12 hours after infection. (standard microscopy)

A. Many viral particles are seen in nucleus and in extracellular space. $\times 12,000$
 B. Nucleocapsid in cytoplasm is enveloped by double membrane. $\times 34,000$ C. Nucleocapsid in nucleus is enveloped by inner nuclear membrane. $\times 37,000$ D. Enveloped viral particles are released into extracellular space through cytoplasmic vacuoles. $\times 20,000$

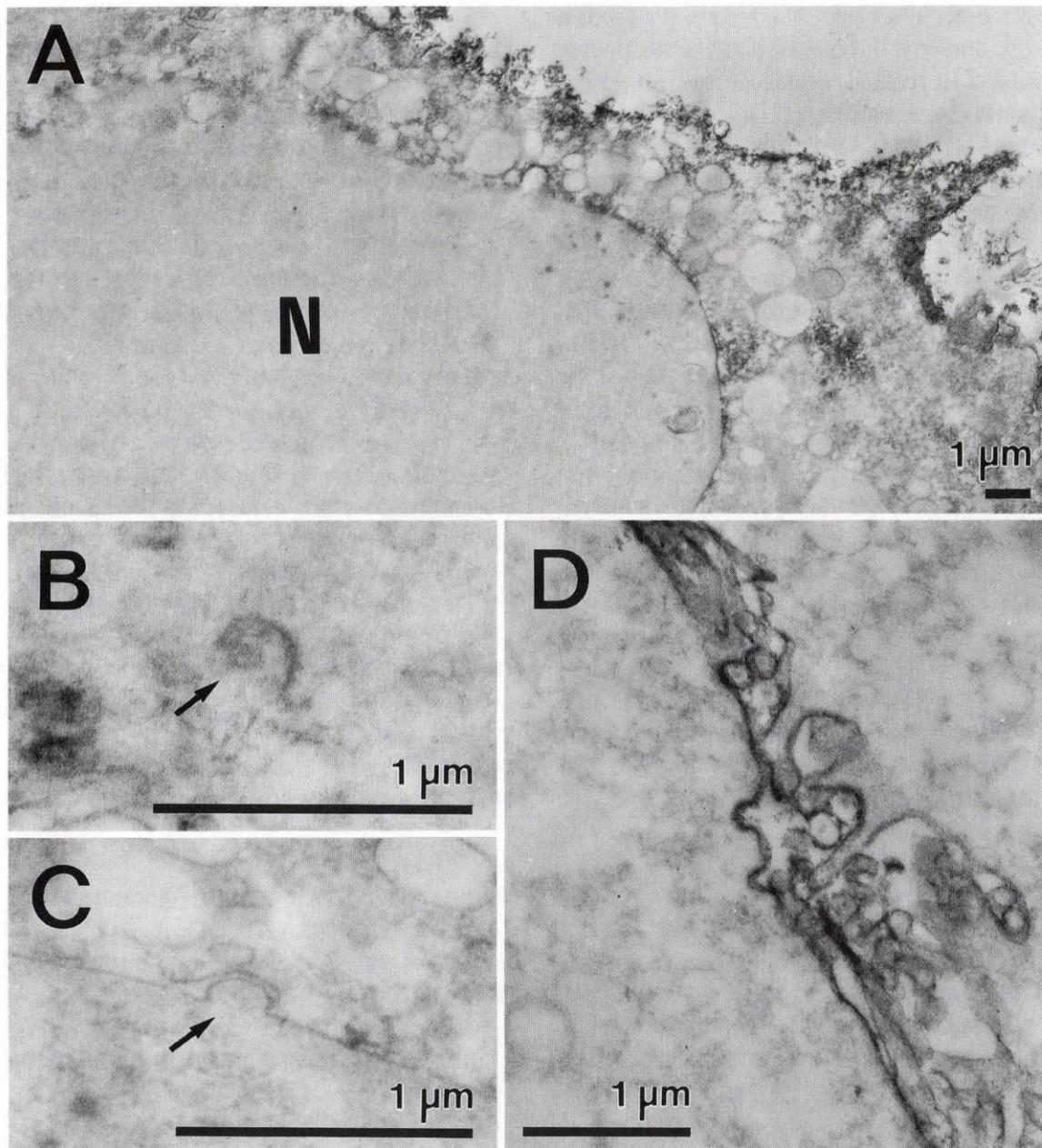


Fig. 7 Electron micrographs of HSV-infected cells at 12 hours after infection. (immunoelectron microscopy)

A. Nuclear envelope, cell surface, and parts of membranous structures in cytoplasm are stained with the same intensity as 6 hours after infection. $\times 6,400$ B. Nucleocapsid (arrow) in cytoplasm is enveloped by double membrane which is stained positively. $\times 46,000$ C. Nucleocapsid in nucleus is enveloped by nuclear membrane which is stained positively. $\times 42,000$ D. Viral particles are released into extracellular space. Viral envelope and cell surface are stained. $\times 25,000$

り返した後、1%グルタル・アルデヒドで5分間処理した。PBSで5分間の洗浄を5回行った後、DAB液(30mg, 4-HCl diaminobenzidine+100ml pH 7.7トリス塩酸緩衝液)に2時間浸漬し、0.004% H_2O_2 加DAB液中で5~10分発色させた。PBSで5分間の洗浄を3回行った後、2%オスミウム酸で2時間再固定した。50%・70%・80%・90%・95%・99.5%・無水アルコール系列で各2~5分脱水した後、エポンに包埋、重合した。エポンブロックからcover slipを取り除き、トリミング後薄切し、無染色で電子顕微鏡観察・撮影を行った。

抗体は、1次抗体としてコスモ・バイオ社の抗gDヒトモノクローナル抗体を用いた。これは、人リンパ球由来のIgGで、gDとその前段階である未熟なpgDとに反応する¹⁰⁾。2次抗体としてはタゴ社のペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG F(ab')₂抗体(山羊)を用いた。酵素抗体法のコントロール染色としては、1) 1次抗体の省略、2) HSV非感染培養細胞、3) 1次抗体を他のヒトモノクローナル抗体IgGで代用して、全く染色性が見られないことを確認した(Fig. 1)。Fig. 1は他のヒトモノクローナル抗体IgGで代用したコントロール染色で他の2種類のコントロール染色は省略した。他のヒトモノクローナル抗体IgGとしては、日本薬品開発株式会社の肺癌、腎癌に対する抗体であるHuMoIg® SLNF10を用いた。

III 結 果

吸着直後の通常電顕では、接種したウイルスが培養細胞の細胞膜に接して認められた。ウイルスの侵入の仕方には、ウイルスが細胞質の小突起により捕捉されて(Fig. 2A)、細胞質内の空腔に取り込まれて侵入する場合(Fig. 2C)と、エンベロープが細胞膜に融合して(Fig. 2B)、ヌクレオカプシドが細胞質内に侵入する場合(Fig. 2C)があった。免疫電顕では、接種したウイルスのエンベロープ上に反応陽性物質が認められ(Fig. 2D, E)、小突起の細胞膜(Fig. 2D)とウイルスが融合した部の細胞膜(Fig. 2E)も陽染されていた。

吸着後1時間の通常電顕では、ウイルスを貪食した空腔が核に近付くのが観察された(Fig. 3A)。免疫電顕では、貪食空腔内のエンベロープと空腔の壁に反応陽性物質が認められた(Fig. 3B)。

吸着後2, 3, 4時間の通常電顕では、核内クロマチンの粗鬆化が徐々に進行したが、免疫電顕では、吸着後1時間における観察所見とほとんど同じであっ

た。

吸着後5時間には、通常電顕ではクロマチンの粗鬆化が進んでいたが、この時点ではまだ新生ウイルス粒子は認められなかった(Fig. 4A)。免疫電顕では、核膜が部分的に染色され(Fig. 4B, D)、細胞質内の膜構造の一部(Fig. 4C, D)に反応陽性物質が認められた。

吸着後6時間になると、通常電顕では核内に新生ウイルス粒子がヌクレオカプシドとして出現した(Fig. 5A)。免疫電顕では、核膜のほぼ全周が染色され、細胞質内の膜構造の一部の染色性が増強し、新たに細胞膜も全周で染色されるようになった(Fig. 5B)。

吸着後12時間の通常電顕では、ウイルスがエンベロープを獲得して、細胞外に放出されていた(Fig. 6A)。エンベロープの獲得は、内側核膜で行われる場合(Fig. 6C)と、ヌクレオカプシドが細胞質内の括弧状の二重膜構造を利用して行われる場合(Fig. 6B)があったが、後者の場合が多く認められた。その後ウイルスは、空腔を通して細胞外へ放出された(Fig. 6D)。免疫電顕では、核膜、細胞膜、細胞質内の膜構造の一部に反応産物が認められた(Fig. 7A)が、吸着後6時間と比べて染色の範囲、強さは変わらなかった。エンベロープ獲得は、陽染された括弧状の二重膜構造(Fig. 7B)と、核膜(Fig. 7C)を利用して行われた。また、細胞外に放出されたウイルスのエンベロープ上にも染色が認められた(Fig. 7D)。

IV 考 按

HSVが細胞に侵入する際には、通常電顕では二通りの侵入の仕方が観察された。1つは、ウイルスが小突起により捕捉されてphagocytosisにより侵入する場合であり、他の1つは、エンベロープが細胞膜に融合(fusion)してヌクレオカプシドのみが細胞質内に侵入する場合であった。免疫電顕で観察すると、反応陽性産物は接種したウイルスのエンベロープ上と、ウイルスに接した小突起の細胞膜や貪食空腔の壁、あるいはウイルスが融合した部の細胞膜に認められた。予備実験で非感染細胞にはgDが存在しないことを確かめており、染色されたこれらの膜の反応産物は接種したウイルス由来のものと考えられた。Glycoprotein E(gE)の局在を電顕を用いて観察したParaら¹¹⁾は、ウイルスの侵入直後にはウイルスのgEが感染細胞の細胞膜へ移行すると述べており、gDもgEと同様、ウイルスのエンベロープから細胞膜へ移行したと考えられた。しかし、Paraらの方法は未固定標本にperoxidase

anti-peroxidase complex を作用させて観察したものであり、細胞表面しか観察できず、細胞内局在については全く検討していない。

その後吸着後1から4時間の間には、通常電顕で核内クロマチンの粗鬆化が進行するのが観察されたが、免疫電顕では貪食空胞の内容物と空胞の壁に反応産物が認められるのみで、反応産物の存在部位に大きな変化はなかった。

吸着後5時間になって細胞質内の膜構造の一部と核膜に新たな反応産物が認められるようになり、この時点でHSV感染細胞内でのgDの産生が始まったと考えられた。HSV glycoproteinの産生に関する生化学的研究によると、まず、粗面小胞体のリボゾームでアミノ酸鎖が作られ³⁾、粗面小胞体でNグリコシド結合オリゴ糖を獲得し、ついで、ゴルジ装置に運ばれてそこで脂肪酸とOグリコシド結合オリゴ糖を獲得し成熟したglycoproteinになる¹²⁾と考えられている。今回免疫電顕で染色された細胞質内の膜構造は、粗面小胞体あるいはゴルジ装置であると考えられ、核膜上の反応産物は、粗面小胞体と核膜には連絡性があるために抗原が膜伝いに移動したものであろう。

吸着後6時間になると細胞膜の全周にも反応産物が認められ、これは吸着後5時間から作られ始めたgDが細胞の内側から表面に運ばれたものと考えられる。Johnsonら¹³⁾は、ゴルジ装置の機能を止める働きをもつmonensinをHSV感染培養細胞に作用させると、glycoproteinは成熟しなくなり、また細胞表面にglycoproteinが現われなくなることから、glycoproteinはゴルジ装置内で成熟し、ここから細胞表面に運ばれると述べている。ゴルジ装置から細胞表面に運ばれる方法として、Spear³⁾は二つの過程を考えている。一つは、エンベロープを獲得したウイルスが細胞表面に運ばれる際にエンベロープ上のglycoproteinが細胞表面に運ばれる場合と、もう一つは、細胞内小器官の膜を通して運ばれる場合とである。吸着後6時間の通常電顕による観察では、核内にヌクレオカプドの出現はあるもののエンベロープの獲得はまだ行われていないので、吸着後6時間でのgDの細胞表面への移送はエンベロープを獲得したウイルス粒子の移動によるとは考えられず、細胞内小器官の膜構造によるものであろう。

吸着後12時間になると、ウイルスはエンベロープを獲得して細胞外に放出されていた。エンベロープの獲得には、大きく分けて内側核膜を利用する場合と細胞

質内の膜構造を利用する場合がある¹⁴⁾。今回用いた実験系では内側核膜でbuddingする場合も認められたが、naked particleが細胞質内の括弧状の二重膜構造に近づいてエンベロープを獲得することの方が多かった。免疫電顕では核膜も括弧状の膜構造も今回使用した抗体とは反応した。使用した抗体はgDともpgDとも反応するため、染色された膜構造のglycoproteinの成熟度については区別できないが、gDあるいはpgDの存在する膜を利用してエンベロープを獲得することが明らかとなった。エンベロープ上のglycoproteinの成熟については、内側核膜を利用してエンベロープを獲得する場合について詳細に検討されている。つまり、内側核膜のglycoproteinは未熟で¹⁵⁾、これを利用したウイルス粒子のエンベロープ上のglycoproteinは核膜腔内ではまだ未熟であり、ウイルス粒子がゴルジ装置に運ばれてそこで成熟する¹³⁾とされている。一方、細胞質内の膜構造を利用してエンベロープを獲得する場合のglycoproteinの成熟について検討した報告は今までにはなされていない。今回の通常電顕による観察では、括弧状の二重膜構造でエンベロープを獲得したウイルス粒子はゴルジ装置を経由しないで、そのままreverse phagocytosisによって細胞外へ放出されているので、二重膜上のglycoproteinはすでに成熟しているものと推定される。新居は¹⁴⁾、細胞質内の二重膜構造の起源についてゴルジ空胞を想定しているが、成熟したglycoproteinをもつ二重膜構造の起源としては、やはりゴルジ装置由来の膜が最も考えやすいのではないだろうか。

擲筆にあたり、ご校閲頂きました調枝寛治教授に深謝いたします。終始ご指導頂きました教室の坂田広志講師、広島鉄道病院病理岩本俊之先生、広島記念病院吉田秀人先生に厚く感謝いたします。本研究は、文部省科学研究費補助金(課題番号01771414)の補助を受けた。

文 献

- 1) 柳 壺夫：ヘルペスウイルス科ウイルスゲノムの構造と機能的解析。単純ヘルペスウイルス1型、単純ヘルペスウイルス2型(HSV-1, HSV-2)、日本臨床 47: 290-301, 1989.
- 2) Spear PG: Glycoproteins specified by herpes simplex viruses, in Roizman B (ed): The herpesviruses 3, New York, Plenum, 315-356, 1985.
- 3) Carter CV, Schaffer PH, Tevethia SS: The involvement of herpes simplex type 1 glycoproteins in cell-mediated immunity. J Immunol 126: 1655-1665, 1981.

- 4) **Eberle R, Courtney RJ**: Preparation and characterization of specific antisera to individual glycoprotein antigens comprising the major glycoprotein region of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 35: 902-917, 1980.
- 5) **Roizman B, Norrild B, Chan C**: Identification and preliminary mapping with monoclonal antibodies of a herpes simplex virus 2 glycoprotein lacking a known type 1 counterpart. *Virology* 133: 242-247, 1984.
- 6) **Johnson DC, Smiley JR**: Intracellular transport of herpes simplex virus gD occurs more rapidly in uninfected cells than in infected cells. *J Virol* 54: 682-689, 1985.
- 7) **Cohen GH, Long D, Eisenberg RJ**: Synthesis and processing of glycoprotein gD and gC of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 36: 429-439, 1980.
- 8) **Balachandran N, Harnish D, Rawls WE, et al**: Glycoproteins of herpes simplex virus type 2 as defined by monoclonal antibodies. *J Virol* 44: 344-355, 1982.
- 9) **Johnson DC, Spear PG**: Evidence for translational regulation of herpes simplex virus type 1 gD expression. *J Virol* 51: 389-394, 1984.
- 10) **Seigneurin JM, Desgranges C, Seigneurin D, et al**: Herpes simplex virus glycoprotein D: Human monoclonal antibody produced by bone marrow cell line. *Science* 221: 173-175, 1983.
- 11) **Para MF, Baucke RB, Spear PG**: Immunoglobulin G(Fc)-binding receptors on virions of herpes simplex virus type 1 and transfer of these receptors to the cell surface by infection. *J Virol* 34: 512-520, 1980.
- 12) **Johnson DC, Spear PG**: O-linked oligosaccharides are acquired by herpes simplex virus glycoproteins in the Golgi apparatus. *Cell* 32: 987-997, 1983.
- 13) **Johnson DC, Spear PG**: Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol* 43: 1102-1112, 1982.
- 14) **新居志郎**: ヘルペスウイルス群のエンベロープ獲得様式. *最新医学* 28: 1232-1238, 1973.
- 15) **Compton T, Courtney RJ**: Virus-specific glycoproteins associated with the nuclear fraction of herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Virol* 49: 594-597, 1984.
- 16) **新居志郎**: ヘルペスウイルス科, 保坂康弘, 松本明編, 電子顕微鏡, 図説ウイルス学, 東京, 朝倉書店, 50-67, 1979.