

例，下痢1例であった。

3. 臨床検査

肝機能異常3例，血液凝固能異常3例，高血糖2例，高アンモニア血症0例，髄液細胞数増加3例，髄液蛋白増加1例，脳CT異常6例であった。血清および髄液TNF- α ，IL-6検査は，1例を除いて殆どの症例で未実施であり，増加例はなかった。

4. ウイルス学的検査

迅速診断は，陽性17例，陰性2例であった。ウイルス分離，HI抗体，RT-PCR法は殆どの症例で未実施であり，陽性者はいなかった。

5. 解熱剤の使用

ジクロフェナクナトリウム単独使用1例，メフェナム酸とイブプロフェン併用1例，アセトアミノフェン単独使用8例であった。

2) 検体の採取と中間代謝産物の定量分析：

インフルエンザ脳炎・脳症17例の乾燥血液濾紙のアシルカルニチンには異常がみられなかった。分析された17例の尿検体では，バルプロ酸代謝産物2例，グリセロール2例，thiodiglycolic acid1例，unknown peak2例がみられたが，先天性代謝異常症及びインフルエンザ脳炎，脳症に特有な代謝異常は見出されなかった。

3) 正常ラット血管の拡張機能に及ぼすTNF- α とIL-6の作用：

内皮を有する正常ラット血管をPheで収縮させた後，IL-6とTNF- α とを添加してこれらサイトカイン自身の血管弛緩能を測定した。その後，さらにAch（内皮依存性弛緩物質）とNTG（内皮非依

存性弛緩物質）とを添加してIL-6とTNF- α の血管弛緩増強効果を検討した。

TNF- α は，単独で血管弛緩作用を示したが，IL-6は，単独では血管弛緩作用を示さなかった（図3，4）。また，TNF- α とIL-6の存在下では，単独で血管弛緩作用を示さないAch濃度 $1 \times 10^{-9}M$ と $1 \times 10^{-8}M$ でも弛緩反応がみられ，TNF- α とIL-6はAchの血管弛緩作用を増強した（図3）。一方，TNF- α もIL-6もNTGの血管弛緩作用は増強しなかった（図4）。

4) ヒト培養細胞のエネルギー代謝に及ぼすTNF- α とIL-6の効果：

正常対照の培養リンパ球〔1-14C〕ピルビン酸脱炭酸能は，TNF- α （1ng/ml）とIL-6（100ng/ml）の添加により殆ど変化しなかった（表1）。有機酸代謝異常を有するメチルマロン酸血症児由来の培養リンパ球でも〔1-14C〕ピルビン酸脱炭酸能は，TNF- α とIL-6の添加によって変化しなかった。

D. 考察

インフルエンザ脳炎・脳症はわが国の小児に多くみられ，厚生省インフルエンザ脳炎・脳症研究班の報告によれば，91例全体の予後については，死亡が27例（30%），重度後遺症7例（8%），軽度後遺症15例（16%）と非常に悪く，後遺症なく治癒した症例は42例（46%）に過ぎなかった。この報告が示すようにインフルエンザ脳炎・脳症の予防・治療法の開発は一刻も早くなされなくてはならない重要な研究課題である。我々は，代謝異常の視点から本症の病態を解析し，

治療・予防法開発への展開を試みた。

有機酸代謝異常症，尿素サイクル異常症等先天代謝異常症は，稀な疾患ではあるが，感冒等の感染症により生体に負荷がかかると重篤なアシドーシスや高アンモニア血症発作が誘発されて脳症をしばしば発症する。そこで，インフルエンザ脳炎・脳症児の基礎疾患としての先天代謝異常症及びインフルエンザ脳炎・脳症に特有な代謝異常を検索するために，尿および血液中の中間代謝産物を定量分析するGC/MS法とMS/MS法とを確立し，検体の提供を全国の大学病院小児科及びその関連病院に依頼した。

各病院の協力により 19 検体が提供された。アシルカルニチン，有機酸等が分析された 19 例の中には先天代謝異常症や本症に特有な代謝異常は見出されなかった。しかし，バルプロ酸代謝産物が 2 例で検出された。バルプロ酸ナトリウムは，抗けいれん薬としてよく使用されており，ライ症候群を発症することが知られている。バルプロ酸ナトリウムが，インフルエンザに罹患の際に脳症の発症を助長することも考えられる。今後，さらに症例数を増やして検索を続ける価値がある。

インフルエンザ脳炎・脳症では脳血管のみならず全身の血管の内皮機能が障害されることが知られている。しかし，その程度や内皮障害と中枢神経障害や多臓器不全との関係に関しては不明な点が多い。我々は，インフルエンザ脳症の本体は，発症後，短時間で脳症を発症する，血管炎がみられる，血中に TNF- α ，IL-6 などのサイトカインが増加する等今まで

に報告された知見から脳血管内皮細胞における何らかの代謝障害に起因する脳浮腫と考えて研究を進めた。

本研究で行った正常ラット頸動脈を用いた張力実験で，インフルエンザ脳症患児で検出される血中レベルの TNF- α や IL-6 が内皮を介して血管の弛緩反応を増強することが明らかになった。したがって，インフルエンザ発症の初期にはサイトカインによる過度の血管拡張により血管透過性の亢進が惹起されるとともに強度の炎症により内皮が傷害されて血管透過性の更なる亢進により脳浮腫をきたし脳症を発症することが十分考えられる。この仮説が正しければ血漿交換により高サイトカイン血症を是正することは治療法として理にかなっている。本研究では，TNF- α と IL-6 とは，正常対照及び有機酸代謝異常をもった培養リンパ球のビルビン酸脱炭酸能を障害しなかった。しかし，今後，培養血管内皮細胞について検討することが必要である。また，血管内皮細胞で産生される NO は強力な血管拡張作用を有することが知られているので本研究で明らかにした TNF- α および IL-6 の血管拡張増強作用を分子レベルで明らかにすれば新たな薬物療法の開発への展開が望めよう。

E. 結論

インフルエンザ脳炎・脳症患児の尿分析により発症前に投与されていたバルプロ酸ナトリウムがインフルエンザ脳炎・脳症の発症を助長する可能性が示唆された。今後，症例を増やして検討する価値がある。インフルエンザ脳炎・脳症で血

中に増加する TNF- α 及び IL-6 は、単独で NO を介する血管拡張作用を有することが明らかになった。NO 阻害薬の投与は本症の治療法として試みる価値がある。

peroxisomal disorders: a simple screening method. J. Chromatogr. B 758: 81-86.

F. 研究発表

1, 論文発表

- 1) Ogaa Y., Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Shinahara K., Kuroda Y. (2002) Three novel SURF-1 mutations in Japanese patients with Leigh syndrome. *Pediatric Neurology* 26: in press.
- 2) Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Ogawa Y., Shinahara K., Kuroda Y. (2001) Gender-specific occurrence of West syndrome in patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Neuropediatrics* 32: 295-298.
- 3) 内藤悦雄小川由紀子 複合体 IV 欠損症—SURF1 遺伝子変異 平成 14 年 4 月発行予定 日本臨床第 60 巻増刊号 4 に掲載予定。
- 4) 内藤悦雄、伊藤道徳、横田一郎、西條隆彦、松田純子、小川由紀子、品原久美、山本聖子、黒田泰弘 West 症候群を発症したピルビン酸脱水素酵素複合体異常症の臨床・生化学所見 平成 12 年 3 月発行 日本小児科学会雑誌第 104 巻第 3 号 341~345 ページ。
- 5) Yamaguchi S., Iga M., Kimura M., Suzuki Y., Shimosawa N., Fukao T., Kondo N., Tazawa Y., Orii T. (2001) Urinary organic acids in

図 1

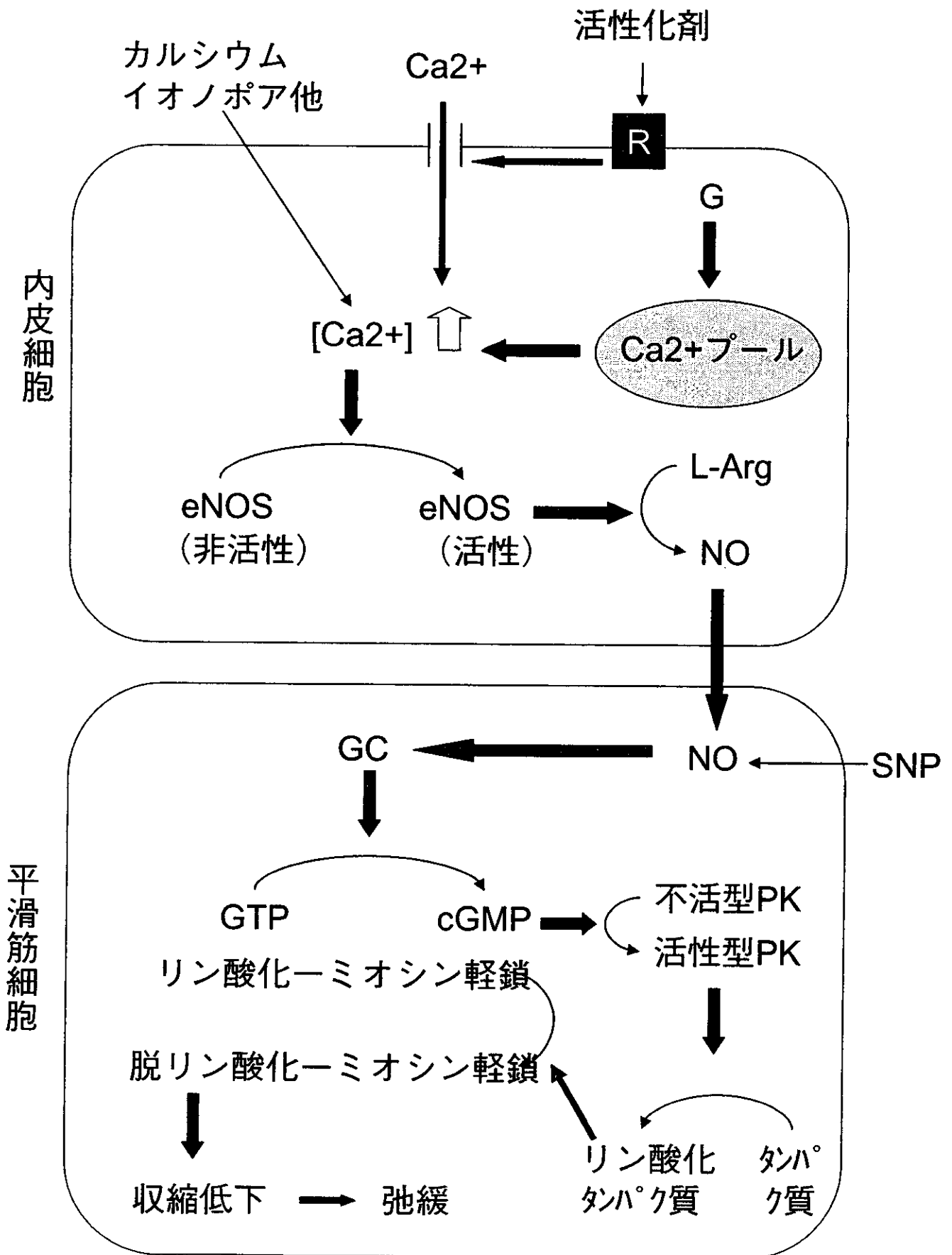


表1 正常対照の培養リンパ球のピルビン酸脱炭酸能に及ぼす
TNF- α とIL-6の相加効果

TNF- α (ng/ml)	0	1
IL-6 (ng/ml)	0	100
正常対照 (1)	120	123
正常対照 (2)	111	110

表2 有機酸代謝異常症の培養リンパ球のピルビン酸脱炭酸能に及ぼす
TNF- α とIL-6の相加効果

TNF- α (ng/ml)	0	1
IL-6 (ng/ml)	0	100
メチルマロン酸血症	142	140

図2

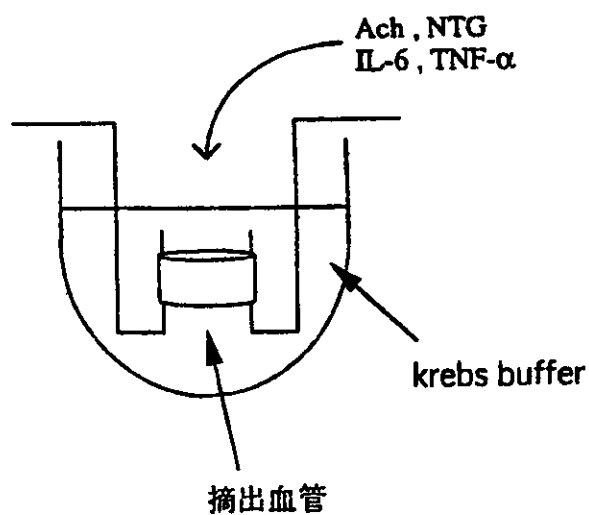


図 3

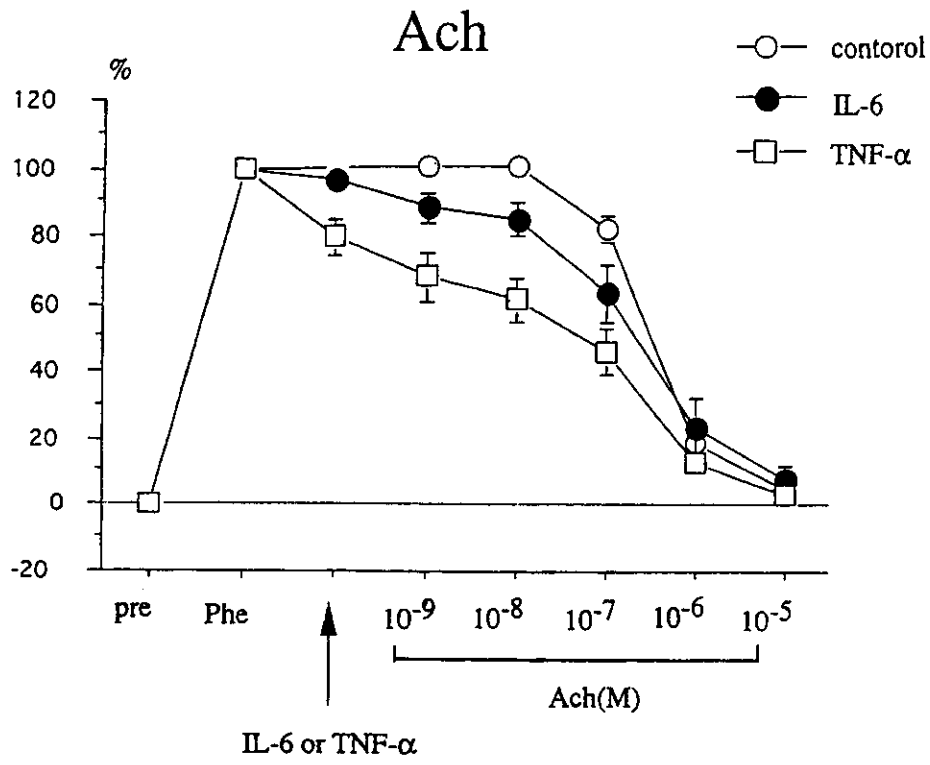
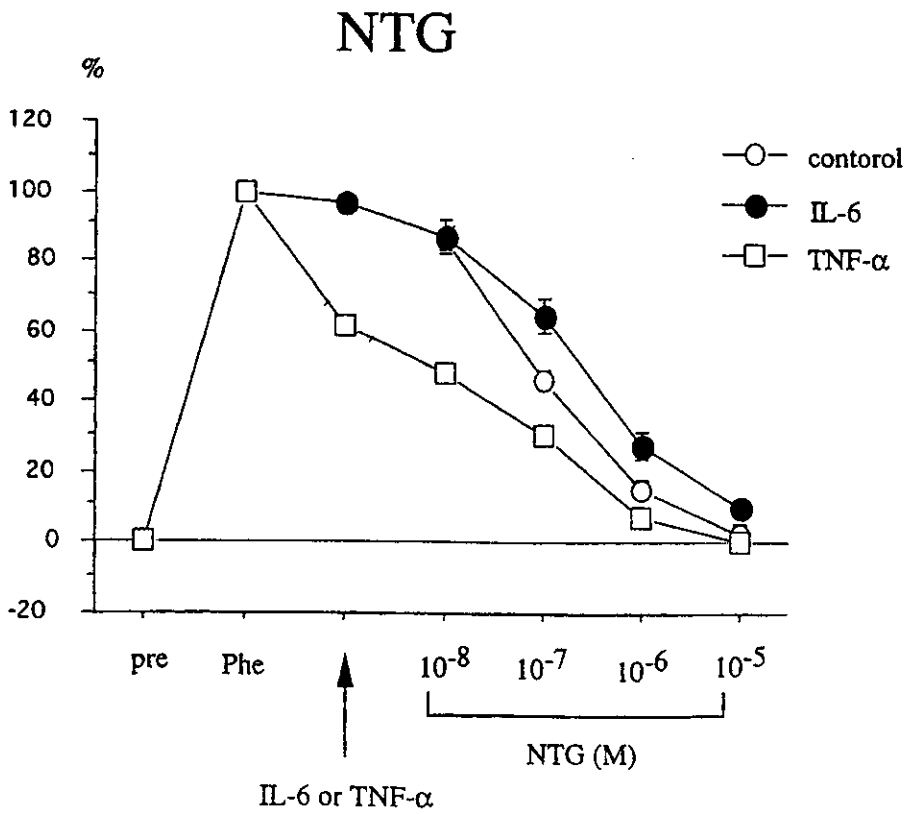


図 4



平成 13 年度厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

（分担）研究報告書

ウイルス性脳症の発症機序に関する研究

分担研究者 長嶋 和郎 北海道大学 分子細胞病理学教授

研究要旨 ヒト JC virus (JCV)は中枢神経系の oligodendrocyte に感染して脱髄性脳症を誘発する。JCV の oligodendrocyte に特異的に感染する機序を解明する目的で、ウイルス産生蛋白の一つであり未知の機能分子である agnoprotein に注目し細胞内発現様式、結合蛋白、リン酸化状態、及び核・細胞質移行等を検討した。その結果 JCV agnoprotein は機能的な NLS, NES を有する核内外を移行する蛋白であり、細胞質では tubulin と結合していることが明らかとなり、核内では DNA に結合し JCV の転写を制御していることが予想された。

A. 研究目的

JCV の agnoprotein (agno) は後期蛋白転写領域の最上流に位置し、調節領域の直後にコードされている、71 アミノ酸、分子量約 8,000 の蛋白である。agno 以外の後期蛋白は、VP1 が主要外殻蛋白、VP2、VP3 は SV40 では VP1 を裏打ちする構造蛋白と考えられているが、これまでに agno が構造蛋白であるとする報告はない。SV40 や BKV の agno はウイルス感染細胞において主に細胞質に局在し、核内で複製・増殖するウイルス粒子とは局在が異なることから、agno が構造蛋白である可能性は低いと考えられる。しかしながら、過去に agno に関する報告は比較的少なく、例えば SV40 では、Agnogene に変異を有するために agno を発現できない agno 欠損ウイルスは、野生型に比較してウイルスの増殖が著明に抑制されるという報告や、agno がウイルスの転写や複製に関与するという報告がなされているが、いずれの見解もコンセンサスが得られていない。

本研究では、我々は agno の局在・機能を調べるために以下の実験を行った。agno に対する抗体を作成してヒト脱髄性脳症(Progressive multifocal leukoencephalopathy: PML)の脳および感染細胞 JCI cell での agno の局在を検索した。さらに二重

免疫染色法により、結合蛋白を検索し、JCV agno の 8-24 番目のアミノ酸にコードされている核移行シグナル (Nuclear Localization Signal: NLS) 様配列と、核外移行シグナル (Nuclear Exporting Signal: NES) 様配列に着目し、これらの機能およびリン酸化との関連について検討した。

B. 研究方法

1) JCV agno の親水性領域に属する peptide を合成して家兎に免疫し、精製を行ない、抗 agno ポリクローナル抗体を作成した。抗体の特異性は avidin-biotin peroxidase 法を用いた Western blotting 法、免疫染色法を用いて確認を行った。PML 症例の剖検時に採集した PML 脳および JCV 感染細胞である JCI 細胞を用いて agno の組織内及び細胞内での局在を検索した。更に agno と細胞骨格蛋白である tubulin と二重染色法を行ない、局在の差異を検討した。

2) plasmid: JCV agno 発現ベクターとして、哺乳細胞発現ベクター pcDNA4HisMax (Invitrogen) に、pBR-Mad1 を鋳型として polymerase chain reaction PCR 法で増幅した Agno 遺伝子全長 (nt. 277-492) をサブクローニングしたもの (pHis-Agno_{WT}) と、pEGFP-N1 (Clontech)

に Agno 遺伝子全長と GST 遺伝子をサブクローニングしたもの (pAgno_{WT}-GSTEGFP) をそれぞれ作成した。pAgno_{WT}-GSTEGFP のカルボキシル末端側にタグを付加するため、PCR によって Agnogene の終始コドン除去し、agno-GST-EGFP が一連の融合蛋白として発現するように設計した。さらにこの発現ベクターを鋳型として、各種変異体を、PCR および ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) を用いた site-directed mutagenesis 法によって作成し、同様に pGST-EGFP にサブクローニングした。NES 変異体は、pcDNA4HisMax ベクターについても作成した (pHis-Agno_{NESmut})。JCV Large-T 抗原発現ベクターとして、pRSV-JCT を用いた。Agnoprotein のリン酸化部位の同定には、各種変異体を PCR および site-directed mutagenesis 法によって作成し、pcDNA4HisMax にサブクローニングしたものをを用いた。

3) GST-EGFP 融合蛋白を用いた agno の細胞内局在の検討: 1) で作成した pAgno_{WT}-GSTEGFP および各種変異体 DNA を、FuGENE6 (Roche) を用いて COS7 細胞に導入した。36 時間後に生細胞のままその局在を共焦点レーザー顕微鏡 Fluoview (Olympus) で観察した。Ieptomycin B (LMB) は東京大学大学院農学生命科学研究科 吉田 稔教授より分与された。JCI 細胞と、FuGENE6 (Roche) を用いて pAgno_{WT}-GSTEGFP を一過性に過剰発現させたヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 (JCRB 9068) の培養液中に LMB を終濃度 50 nM で添加した。前者は 2 時間後、3% パラホルムアルデヒドで固定し、II-2 と同様に抗 agnoprotein 抗体で免疫染色を施行した。後者は 2 時間後に蛍光顕微鏡で GFP の蛍光を観察した。また pAgno_{NESmut}-GSTEGFP を FuGENE6 (Roche) を用いて HEK293 細胞に導入した。24 時間後に細胞を 3% パラホルムアルデヒドで固定し、抗 SC-35 抗体 (Sigma) と反応させた。2 次抗体は Alexa Fluor 594 rabbit anti-mouse IgG (H+L) conjugate (Molecular Probes) を用い、Fluoview で観察した。

4) *In vivo* phosphorylation assay: JCV 持続感染細胞である JCI 細胞と、その起源細胞である

ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 IMR-32 (JCRB 9050) をそれぞれ 5×10^6 個ずつ 100 mm 培養皿に用意した。翌日、10% の透析済 FBS と 400 μ Ci/ml の ³²P-orthophosphate (Phosphorous-32; NEN, MA, USA) を添加したリン酸非含有 DMEM 3 ml を添加し、37 °C、5% CO₂ 条件下で 4 時間培養した。その後、細胞を RIPA バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 50 mM NaF, and 0.1% SDS) で溶解して細胞抽出液を得た。この細胞抽出液に抗 agno 抗体を添加して氷上で 1 時間インキュベーションした後、15 μ l (50% 懸濁液) の protein A-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech) を添加し、4 °C で 1 時間回転させて緩やかに混合した。その後、RIPA バッファーで 3 回洗浄して非結合蛋白を除去し、残存したビーズに SDS サンプルバッファー (0.1M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) を加えて煮沸し、抗体に結合した蛋白を抽出した。ここで得られた蛋白抽出液を 15% SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) で展開してゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィによって ³²P で標識されたバンドを検出した。agno のリン酸化部位の同定には、pHis-Agno_{WT} と各種変異体を lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、60 mm 培養皿に用意した COS7 細胞 (6×10^5 cells/dish) に導入した。導入後 16 時間目に培地を上記の ³²P-DMEM に交換した。スタウロスポリン (Sigma) は ³²P-DMEM 添加時に終濃度 2 μ M になるように添加した。37 °C、5% CO₂ 条件下で 8 時間培養した後、RIPA バッファーで細胞を溶解した。以降はウイルス感染細胞と同様の手順を行った。

C. 研究結果

1) 作成した抗 agno ポリクローナル抗体の特異性を確認するために、JCV 持続感染細胞である JCI 細胞の lysates を用いて Western blot を行った。分子量約 8 kDa の agno の相当する位置に single band の signal を認めた。また JCV 外殻蛋白である

VP1 に対する抗体を用いて既に陽性であることが示されている PML 症例の免疫染色を行ったところ、陽性所見を認めた。これらの免疫反応は抗原吸収試験にて陽性反応が消えることを確認しており、agno に対する抗体の特異性および Western blot また免疫染色法への有用性が確認できた。PML 症例の免疫染色を行った結果、agno は感染細胞の細胞質に樹枝状に発現を認めた (図 1)。また JCV 持続感染細胞では主に核周囲の細胞質および細胞突起に発現しており、わずかに核内にも発現を認めた。また tubulin との二重染色の結果 agno と tubulin は局在が一致していた (図 2)。

2) agno のアミノ酸配列のうち、polyomavirus 間でよく保存されている N 末端領域には、Bipartite Nuclear Localization Signal: NLS 様配列と、Nuclear Exporting Signal: NES 様配列が存在する。そこで GST-EGFP 融合蛋白発現系を用いて、agno の細胞内局在と NLS/NES 様配列との関連性について検討した。その結果、pAgno_{WT}-GSTEGFP はウイルス感染細胞および pHis-Agno_{WT} と同様に、核周囲に強い局在を示した (図 3)。次に NLS より下流のアミノ酸を欠失させた pAgnoN24 は核にびまん性の強い局在を示した (図 3)。さらに、NES 配列の ³⁵FLL を ³⁵AAA に変異させた pAgno_{NESmut} も核に局在したが、pAgnoN24 とは異なり 10-20 個の speckle を形成した (図 3)。また、³⁵FLL→³⁵AAA 変異に加えて、双極性 NLS のアミノ末端側の ⁸RK、あるいはカルボキシル末端側の ²²KKR をそれぞれ ⁸AA と ²²AAG に置換した変異体 pAgno_{NLS1NESmut} および pAgno_{NLS2NESmut} はいずれもその局在が変化し、agno の配列を有さない pGSTEGFP に類似した細胞質にびまん性の局在を呈した (図 3)。以上の結果より、agno に存在する NLS 配列と NES 配列はいずれも機能的であることが示された。

NES 配列を有する核外移行蛋白は、核外輸送蛋白 CRM1/Xpo1 が NES を認識して標的蛋白を核外に運び出す機序が知られている。この CRM1/Xpo1 依存性核外輸送機序は、CRM1/Xpo1 の特異的阻害剤である LMB によって阻害される。そこで agno の核外移行

が CRM1/Xpo1 に依存するか否かを検討するため、LMB 処理を行った。その結果、ウイルス感染 COS7 細胞と pAgno_{WT}-GSTEGFP を過剰発現した HEK293 細胞いずれにおいても、LMB 処理による核外輸送阻害は認められなかった (図 3)。

δ 肝炎ウイルスでは、δ 抗原が形成する核内 speckle はゲノムのスプライシングに関与する因子である SC-35 と局在が一致することか知られている。そこで、pAgno_{NESmut} 発現細胞で見られた核内 speckle が SC-35 と同じ局在を示すかについて、免疫染色によって検討した。その結果、pAgno_{NESmut} が形成する核内 speckle の局在は SC-35 と部分的に一致したが、局在が異なる speckle も数多く認められた (図 3)。

3) BKV agno はウイルス感染細胞内でリン酸化されているという報告がある。agno にはリン酸化を受けると予想されるアミノ酸配列が数箇所あり (図 4)、それらの多くは polyomavirus 間で保存されているアミノ末端側に存在する。そこで、JCV agno がウイルス感染細胞内でリン酸化されているか否かについて、*in vivo* phosphorylation assay によって検討した。その結果、IMR-32 由来 JCV 持続感染細胞 JCI において、IMR-32 には認められない 8 kDa のリン酸化蛋白が抗 agno 抗体によって免疫沈降されたことから、JCV agno も BKV のそれと同様に感染細胞内でリン酸化されていることが示された (図 4)。次に、agno 発現ベクター pHis-Agno_{WT} とその変異体を用いて、リン酸化アミノ酸の同定を試みた。pHis-Agno_{WT} を COS7 細胞に過剰発現させて *in vivo* phosphorylation assay を施行した結果、ウイルス感染細胞と同様にリン酸化バンドが認められ、このバンドはスタウロスポリン (STS) 処理によって消失した (図 4 STS)。そこで、agno のアミノ酸配列中に存在するセリン、スレオニン、チロシン残基とその前後の配列から、リン酸化を受ける可能性が高いと考えられる ⁷S、¹¹S、²¹T、⁴¹T、⁶¹T、⁶²Y に着目し、まずそれぞれのアミノ酸残基を 1 個ずつアラニンに置換した発現ベクターを作成したところ、全ての変異体においてリン酸化バンドが検

出されたことから、agno のリン酸化は複数ヶ所で起きていると考えられた。次に、これら 6 個のアミノ酸残基を全てアラニンに置換した変異体 (図 4 none) を用いたところ、リン酸化バンドが消失したことから、リン酸化アミノ酸はこれら 6 個のアミノ酸残基のいずれかであると考えられた。そこで、これら 6 個のアミノ酸残基のうち 1 個だけをセリン/スレオニン/チロシンのまま残し (⁶¹T と ⁶²Y は両方同時に残した)、他のアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を作成した (図 4 S7、S11、T21、T41、T61Y62)。その結果、いずれの変異体においてもリン酸化バンドが認められたことから、これら 6 個のアミノ酸はいずれもリン酸化されていることが示唆された。しかし、抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットングでは agno に相当するリン酸化バンドが検出されなかったことから (data not shown)、agno のリン酸化部位は ⁷S、¹¹S、²¹T、⁴¹T、⁶¹T の 5 ヶ所であることが示された。

これら 5 ヶ所のアミノ酸のうち、⁷S、¹¹S、²¹T の近傍には双極性 NLS の塩基性アミノ酸クラスターが存在する。APC やサイクリン B1 では、NLS あるいは NES 配列近傍のリン酸化が、その細胞内局在に影響を与えることが知られている。⁷S と ²¹T は PKC、¹¹S は PKA によって認識されるが (図 4)、図 3 で示した pAgno_{NLS1NES^{mut}} (⁸RK→⁸AA) と pAgno_{NLS2NES^{mut}} (²²KKR→²²AAG) は、前者では ⁷S の PKC 認識配列と ¹¹S の PKA 認識配列が、後者では ²¹T の PKC 認識配列がアミノ酸置換によってそれぞれ破壊されていたことから、agno の NLS 機能におけるこれらのアミノ酸残基のリン酸化の関与が推察された。そこで、核局在型変異体 pAgno-N24 の ⁷S、¹¹S、²¹T をそれぞれアラニンに置換して、その局在の変化を検討した。その結果、⁷S→A 変異体でのみ、その局在が核から細胞質に変化したことから、agno の核移行には ⁷S のリン酸化が必須である可能性が示唆された。しかしながら ⁷S を、同じくリン酸化を受けるアミノ酸であるスレオニンに置換してもその局在は細胞質に変化し、さらに pAgno-N24 の核局在はスタウロsporin 処理で影響されなかったことから ⁷S の脱リ

ン酸化が NLS 機能阻害の直接的な原因ではないと考えられた。

D. 考 察

JCV が発現する 6 種類の蛋白のうち、agno 以外の 5 種類についてはその性質や機能がほぼ特定されている。それとは対照的に agno については、その機能についてこれまでにほとんど報告がなされていない。本研究により、agno が NLS と NES を有することを示し、通常は NES が優位となって agno の細胞内局在を規定していると考えられた。NLS が不活性化される機序は未だ不明であり、少なくとも agno のリン酸化の有無は関与しないことが示されたが、agno は細胞質で幾つかの宿主細胞由来の蛋白と結合することから、細胞質ではそれらの蛋白の結合によって NLS がマスクされている可能性が考えられた。一方、NES 変異体は速やかに核内に移行して speckle を形成した。この核内 speckle は pAgno_{WT}-GSTEGFP に SV40 Large-T 抗原由来の NLS を付加して発現させた際にも認められたことから、aa. 25-71 の領域に speckle 形成を規定する配列が存在すると推察された。この speckle は δ 肝炎ウイルスの δ 抗原とは異なり SC-35 と局在が完全には一致せず、また agno が JCV の転写活性化に積極的に関与することを示すデータが得られなかったことから、他の核内 speckle との位置関係を検討することが、agno の核内での機能を推察する上で重要であると考えられた。JCV agno の NES は、HIV の Rev やインフルエンザウイルスの NS2 と共通のロイシンに富む配列であるにも関わらず、その核外輸送は Rev や NS2 と異なり LMB 処理で阻害されなかった。しかしながら最近、NS2 の核外輸送はウイルス感染後期には LMB で阻害されず、またセミインタクト細胞を用いた *in vitro* の核外輸送実験においても、NS2 の核外輸送は LMB 存在下で影響を受けないという報告がなされたことから、agno や NS2 など幾つかの蛋白の核外輸送には CRM1/Xpo1 を介さない輸送機序が存在すると考えられた。また agno 欠損ウイルスでは JCV の他の蛋白の発現が著

明に遅延すること、yeast two hybrid 法による agno 結合蛋白の結果と合わせて考えると agno は核内では DNA に結合し JCV の転写を制御し、細胞質では細胞骨格蛋白と結合することにより感染細胞の細胞質を維持、もしくは他のウイルス蛋白の細胞内輸送に関係していることが予想された。

E. 結論

ウイルス感染細胞における局在や機能が全く未知であった JCV agno について検討した結果、agno の局在は核周囲の細胞質、および細胞突起に強い発現を認め、核にもわずかに発現を認めたこと、細胞質では tubulin と co-localize していたこと。agno は機能性の NLS と NES を有していること、agno は5箇所リン酸化されるが、リン酸化は核移行のスイッチではなかったこと。agno は核内外を移行するウイルス蛋白であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

本研究では、JCV の感染機構の解析を目的とした。本実験で用いられた JCV は P2 で扱うべきウイルスであり、本研究は当研究室の P2 指定実験室にて安全性に留意して行なわれた。また本実験で用いた大腸菌の系については人体に対する安全性は認められており、北海道大学の組換え DNA 申請においても承認を得ている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada, Y., Sawa, H., Endo, S., Orba, Y., Umemura, T., Nishihara, H., Stan, A. C., Tanaka, S., Takahashi, H., and Nagashima, K. Expression of JC virus (JCV) agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) brain. *Acta Neuropathologica*, *in press*.
- 2) Suzuki, S., Sawa, H., Komagome, R., Orba, Y., Yamada, M., Okada, Y., Ishida, Y., Nishihara, H., Tanaka, S., and Nagashima, K. Broad

distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology*, *286*: 100-112., 2001

- 3) Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T., and Nagashima, K. Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol*, *7*: 302-306., 2001.
- 4) Safak, M., Barrucco, R., Darbinyan, A., Okada, Y., Nagashima, K., and Khalili, K. Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J Virol*, *75*: 1476-1486., 2001.
- 5) Hayashi H, Endo S, Suzuki S, Tanaka S, Sawa H, Ozaki Y, Sawamura Y, Nagashima K: JC virus large T protein transforms rodent cells but is not involved in human medulloblastoma. *Neuropathology* *21*: 129-137, 2001
- 6) Okada, Y., Sawa, H., Tanaka, S., Takada, A., Suzuki, S., Hasegawa, H., Umemura, T., Fujisawa, J., Tanaka, Y., Hall, W. W., and Nagashima, K. Transcriptional activation of JC virus by human T-lymphotropic virus type I tax protein in human neuronal cell lines. *J Biol Chem*, *275*: 17016-17023, 2000.
- 7) Shintaku, M., Matsumoto, R., Sawa, H., and Nagashima, K. Infection with JC virus and possible dysplastic ganglion-like transformation of the cerebral cortical neurons in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*, *59*: 921-929., 2000.

2 学会発表

- 1) Glial/neuronal specific activation of the JC virus (JCV) promoter in the presence of HTLV-I Tax. 3rd International Symposium on Neurovirology, 2000, CA, USA

- 2) Okada Y, Endo S, Sawa H, Nagashima K: Distribution and function of JC agnoprotein: The Biology of JC Virus and PML workshop, 2001, IL, USA
- 3) Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Suzuki S, Hasegawa H, Hall WW, Nagashima K: Neural cell specific activation of the JC virus (JCV) promoter in the presence of HTLV-I Tax. 10th International conference on human retrovirology: HTLV and related viruses, 2001, Dublin, Ireland
- 4) 岡田 由紀、澤 洋文、遠藤 秀一、大場 靖子、西原 広史、田中 伸哉、長嶋 和郎: JC virus (JCV) agnoprotien の発現と機能に関する研究。第 90 回 日本病理学会、2001 年、東京
- 5) 林 宏憲、鈴木 聡子、駒込 理佳、西原 広史、大西 晶子、田中 伸哉、澤 洋文、長嶋 和郎: JC virus T 抗原と t 抗原の局在と機能の解析。第 42 回 日本神経病理学会総会 学術研究会、2001 年、東京
- 6) 遠藤 秀一、岡田 由紀、澤 洋文、大場 靖子、田中 伸哉、長嶋 和郎: JC virus (JCV) agnoprotein の細胞内局在および tubulin との結合。第 49 回 日本ウイルス学会、2001 年、大阪
- 7) 澤 洋文、鈴木 聡子、駒込 理佳、岡田 由紀、田中 伸哉、長嶋 和郎: JC virus の細胞への吸着及び侵入に関する検討。第 49 回 日本ウイルス学会、2001 年、大阪
- 8) 岡田 由紀、澤 洋文、遠藤 秀一、大場 靖子、田中 伸哉、長嶋 和郎: JC virus (JCV) agnoprotien の機能に関する検討。第 34 回北海道病理談話会 病理分科会、2001 年、札幌
- 9) 駒込 理佳、西原 広史、田中 伸哉、澤 洋文、長嶋 和郎: JC virus capsid protien VP1 の糖脂質、糖蛋白質への結合。第 24 回 日本分子生物学会、2001 年、横浜
- 10) 逸見 千寿香、岩田 博司、駒込 理佳、佐藤 真実、田中 伸哉、澤 洋文、長嶋 和郎: JC virus (JCV) VP1 による外来遺伝子 packaging 効率の検討。第 24 回 日本分子生物学会、2001 年、横浜
- 11) 遠藤 秀一、岡田 由紀、澤 洋文、大場 靖子、田中 伸哉、長嶋 和郎: JC virus (JCV) agnoprotein は tubulin 結合蛋白質である。第 24 回 日本分子生物学会、2001 年、横浜
- 12) 岡田 由紀、澤 洋文、遠藤 秀一、田中 伸哉、梅村 孝司、長嶋 和郎: JC virus (JCV) agnoprotien の核移行の検討。第 24 回 日本分子生物学会、2001 年、横浜
- 13) 岡田 由紀、澤 洋文、遠藤 秀一、田中 伸哉、梅村 孝司、長嶋 和郎: JC virus (JCV) agnoprotien (agno) の核内外移行シグナルとリン酸化部位の同定。第 37 回 日本ウイルス学会 北海道支部会総会、2001 年、札幌

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

JC ウイルス agno を対象とした PML の治療
(特願 2001-356836 号)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

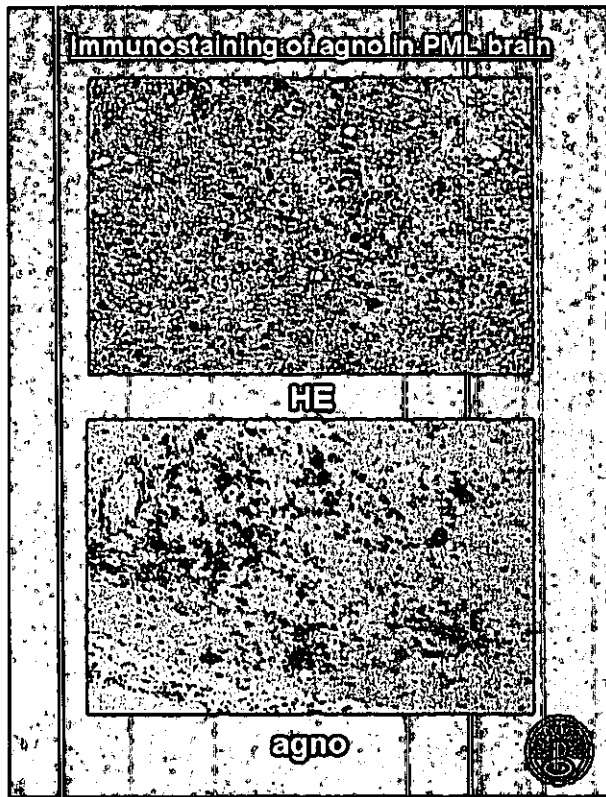


図 1

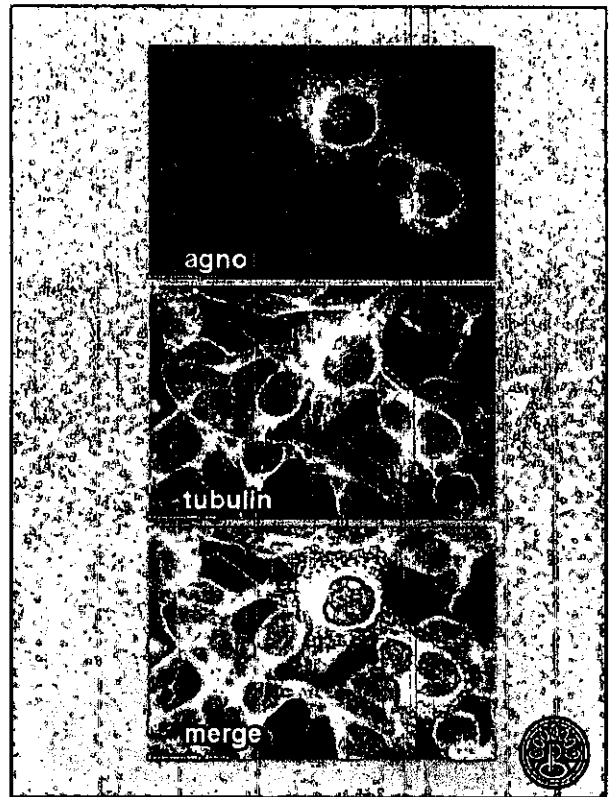


図 2

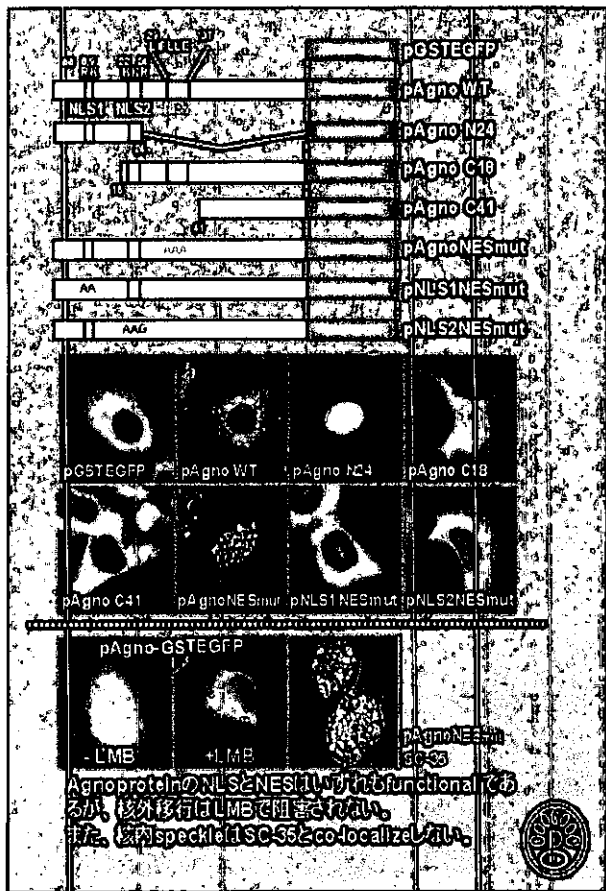


図 3

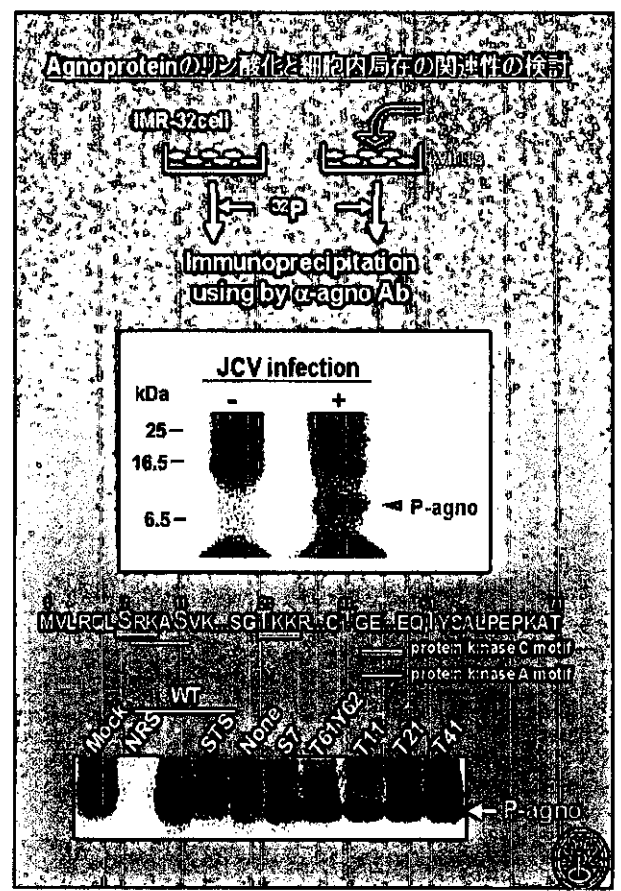


図 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
木戸 博	プロテアーゼとプロテアーゼインヒビターが決定する、インフルエンザウイルスの感染と防御	第15回大学と科学公開シンポジウム組織委員会編、"タンパク質分解の不思議" グバプロ		p. 105-119	2001
内藤悦雄 他	複合体IV欠損症—SURF1遺伝子変異	日本臨床 日本臨床社			2001

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu, Y., Kashiwagi, T., Iwahashi, J., Hamada, N., Mizoue, K., Tsumura, N., Kato, H., and Toyoda, T.	Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser 624 in the active site.	Genes to Cell	6 (2)	87-97	2001
Kim, RD., Sharmin, S., Inoue, M., and Kido, H.	Cloning and expression of novel mosaic serine protease with and without a transmembrane domain from human lung.	Biochemica Biophysica Acta.	1518 (1-2)	204-209	2001
Murakami, M., Towatari, T., Ohuchi, M., Shiota, M., Akao, M., Okumura, Y., Parry, AA., and Kido, H.	Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and sendai virus.	Eur. J. Biochem.	268 (10)	2847-2855	2001
Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu, Y., Toyoda, T.	Protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit.	Int. Congress Series	1219	479-485	2001
Kondo, S., Kagami, S., Kido, H., Strutz, F., Muller, G.A., and Kuroda, Y.	Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis.	J. Am. Soc. Nephrol.	12	1668-1676	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Wakabayashi, H., Yano, M., Tachikawa, N., Oka, S., Maeda, M., and Kido, H.	Increased concentrations of 14-3-3 e, g, and z isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction.	Clinica Chimica Acta	312 (1-2)	97-105	2001
木戸 博	インフルエンザウイルスの感染感受性を決めている体の因子の解析	日本病院薬剤師会雑誌	11	7-13	2001
木戸 博、 鳥居新平	生体防御物質の気道分泌を促進する去痰剤の抗インフルエンザ効果と今後の展望	日経メディカル	30 (11)	93-96	2001
Murakami, M., Towatari, T., Ohuchi, M., Shiota, M., Akao, M., Okumura, Y., Parry, M. A. A., and Kido, H.	Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus.	Eur. J. Biochem.	268	2847-2855	2001
Yamaguchi S. et al.	Urinary organic acids in peroxisomal disorders: a simple screening method.	J.Chromatog r.B	758	81-86	2001
内藤悦雄 他	West症候群を発症したピルビン酸脱水素酵素複合体異常症の臨床・生化学所見	日本小児科学会雑誌	104	341-345	2001
大内正信	インフルエンザウイルスの吸着と遊離	感染症と化学療法	5 (6)	21-24	2001
Hayashi H, Endo S, Suzuki S, Tanaka S, Sawa H, Ozaki Y, Sawamura Y, Nagashima K	JC virus large T protein transforms rodent cells but is not involved in human medulloblastoma.	Neuropathology	21	129-137	2001
Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T., and Nagashima, K	Distribution and function of JCV agnoprotein.	J Neurovirol	7	302-306	2001
Safak, M., Barrucco, R., Darbinyan, A., Okada, Y., Nagashima, K., and Khalili, K	Interaction of JC Virus Agno Protein with T Antigen Modulates Transcription and Replication of the Viral Genome in Glial Cells.	J Virol	75	1476-1486	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Suzuki, S., Sawa, H., Komagome, R., Orba, Y., Yamada, M., Okada, Y., Ishida, Y., Nishihara, H., Tanaka, S., and Nagashima, K.	Broad distribution of the jc virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication	Virology	286	100-112	2001
永武 毅	呼吸器感染症の分子医学4. インフルエンザ感染と予防薬：新しい病態解析と予防法.		60(S)	18-23	2001
S. Sato, T. Nagatake	Dexamethasone impairs pulmonary defence against Pseudomonas aeruginosa through suppressing iNOS gene expression and peroxyhitrite production in mice	Clin. Exp. Immunol.	126	266-273	2001
C. T. Ndour, T. Nagatake	Modulating effects of mucoregulating drugs on the attachment of Haemophilus influenzae.	Microbial Pathogenesis	30	121-127	2001
Yang, B., Yao, D. F., Ohuchi, M., Ide, M., Yano, M., Okumura, Y., and Kido, H.	Ambroxol suppresses influenza-virus proliferation in the mouse airway by increasing antiviral factor levels	Eur. Respir. J.	19 (5)	1-7	2002
Towatari, T., Ide, M., Ohba K., Chiba, Y., Murakami, M., Shiota, M., Kawachi, M., Yamada, H., and Kido, H.	Identification of ectopic anionic trypsin I in rat lungs potentiating pneumotropic virus infectivity and increased enzyme level after virus infection.	Eur. J. Biochem.		in press	2002
木戸 博、 唐渡孝枝、 山田博司	インフルエンザウイルスの感染増悪を制御する生体内プロテアーゼインヒビター	Molecular Medicine	39 (1)	48-5	2002
木戸 博、 Bing Yang, 井手美喜子、 奥村裕司、 山田博司	生体防御物質の気道内分泌を促進する塩酸アンブロキシソールの抗インフルエンザ効果	呼吸器 News & View		印刷中	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Sakai, T., Ohuchi, R., and Ohuchi, M.	Fatty acids on the A/USSR/77 influenza virus hemagglutinin facilitate the transition from hemifusion to fusion pore formation.	J. Virol.	76 (9)	in press	2002
Ogawa Y. et al.	Three novel SURF-1 mutations in Japanese patients with Leigh syndrome.	Pediatric Neurology	26	In press	2002
Naito E. et al.	Gender-specific occurrence of West syndrome in patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency	Neuropediat rics	758	295-298	2002
Okada, Y., Sawa, H., Endo, S., Orba, Y., Umemura, T., Nishihara, H., Stan, A. C., Tanaka, S., Takahashi, H., and Nagashima, K	Expression of JC virus (JCV) agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) brain.	Acta Neuropathol ogica		In press	2002
土橋佳子, 永武 毅	インフルエンザ発症のメカニズム	臨床検査	46(2)	139	2002