

**【13:45~14:00】 11. PrP 特異的パネルモノクローナル抗体の樹立**

演者名 中村 尚登<sup>1</sup>  
共同演者 松田 治男<sup>1</sup> 北本 哲之<sup>2</sup>

- 1) 広島大・生物生産・免疫生物
- 2) 東北大・大学院医・病態神経

**【14:00~14:15】 12. 免疫磁性ビーズを用いた PrP<sup>Sc</sup> 検出系の検討**

演者名 品川 森一<sup>1</sup>  
共同演者 毛利 崇<sup>1</sup> 堀内 基広<sup>1,2</sup> 石黒 直隆<sup>1</sup>

- 1) 帯広畜産大学獣医公衆衛生学教室
- 2) 原虫病研究センター

**【14:15~14:30】 13. 正常型プリオンタンパク質分解活性の検索と、プリオン病の病態解明に向けた基礎研究**

演者名 金子 清俊<sup>1</sup>  
共同演者 桜井 総子<sup>1</sup> 鎌田 礼子<sup>1</sup> 古田 大<sup>1</sup> 八谷 如美<sup>1</sup>

- 1) 国立精神・神経センター神経研究所・疫学研究第七部

**【14:30~14:45】 14. プリオン蛋白 (PrP) 機能領域の解析**

演者名 片峰 茂<sup>1</sup>  
共同演者 坂口 未廣<sup>1</sup> 新 竜一郎<sup>2</sup> 西田 教行<sup>1</sup>

- 1) 長崎大・医学研究科・感染分子病態学
- 2) 長崎大・医学部・細菌学

**【14:45~15:00】 15. 非神経組織の蛋白分解抵抗性プリオン蛋白に関する研究**

演者名 古川 ひさ子<sup>2</sup>  
共同演者 堂浦 克美<sup>1</sup> 高橋 三津雄<sup>2</sup> 岩城 徹<sup>1</sup>

- 1) 九州大学・大学院医・脳研病理
- 2) 福岡大学・薬・薬物治療

**【15:00~15:10】 16. プリオン蛋白 (PrP) 遺伝子導入マウス**

演者名 三好 一郎<sup>1</sup>  
共同演者 岡村 匡史<sup>1</sup> 北本 哲之<sup>2</sup> 村本 環<sup>2</sup> 毛利 資郎<sup>3</sup>

- 1) 東北大・大学院医・動物実験施設
- 2) 東北大・大学院医・病態神経
- 3) 九大・大学院医・実験動物施設

**【15:10~15:30】 17. ヒト・プリオンに対するバイオアッセイ法の開発**

演者名 北本 哲之<sup>1</sup>

- 1) 東北大・大学院医・病態神経

**【15:30~15:50】 18. ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験  
(その 6)**

演者名 毛利 資郎<sup>1</sup>  
共同演者 北本 哲之<sup>2</sup> 三好 一郎<sup>3</sup> 中村 健司<sup>4</sup>

- 1) 九州大・大学院医・実験動物
- 2) 東北大・大学院医・病態神経
- 3) 東北大・大学院医・動物実験
- 4) 東大医科研・ヒト疾患・高次機能

\*\*\*\*\* 15:50 ~ 16:10 総合討論 \*\*\*\*\*

◆閉会挨拶

16:10 ~ 16:25

北本 哲之

# 分 担 研 究 報 告

# JC ウイルスの子孫ウイルス産生機序：JC ウイルスは、発現比が制御された major カプシド蛋白 VP1 と minor カプシド蛋白 VP2/VP3 が協調して、核内に粒子を形成する。

班 員：保井 孝太郎（東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門）  
研究協力者：宍戸—原 由紀子（東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門）  
：原 嘉 信（国立精神神経センター・疾病 5 部研究部）

## 【研究要旨】

JC ウイルス (JCV) 粒子は、360 分子の major カプシド蛋白 VP1 とその約 10 分の 1 量の minor カプシド蛋白 VP2/VP3 から構成されると推測される。JCV 複製サイクル後期には、カプシドの構成分子数比に対応した VP1 と VP2/VP3 が発現し、感染細胞の核内に子ウイルス粒子を形成するが、詳細は明らかでない。そこで我々は、カプシド蛋白発現と核移行、および粒子形成の機序を解明するため、次の実験を行った。まず、RT-PCR と sequencing で後期 RNA の構造を決定し、スプライシングとカプシド蛋白翻訳の制御機序を検討した。またカプシド蛋白の核移行機序を解析するため、COS-7 細胞でカプシド蛋白を強制発現し、細胞内分布を共焦点顕微鏡で観察した。さらに、粒子形成機序を解析するため、これらの COS-7 細胞を電子顕微鏡で観察した。その結果、(1) 後期 RNA の構造：JCV には少なくとも 4 種の後期 RNA (M1-M4) が存在した。VP1 RNA (M2) と VP2/VP3 RNA (M1) の発現比はスプライシングで制御され、蛋白発現比に影響を与えたと考えられた。(2) 翻訳：M1 と M2 は polycistronic RNA である。これは、leaky scanning するリボソームが、翻訳を reinitiation してカプシド蛋白を合成することを示唆していた。(3) 核移行：VP1 は単独では核と細胞質に分布したが、VP2/VP3 と共発現すると核に局在した。これは、VP1 と VP2/VP3 は協調して核移行することを示唆していた。(4) 粒子形成：核内では、VP1 と VP2/VP3 が核膜付近の領域に集積し、組み換えウイルス粒子を形成していた。これらの結果は、JCV 粒子が、発現比が制御された VP1 と VP2/VP3 の相互作用により、核内に形成することを示している。その制御機序は JCV 特異的で、ホモロジーの高い SV40 とは相違する。

Analysis of progeny production of human polyomavirus JC (JCV): major and minor capsid proteins cooperatively generate progeny virions in discrete regions of the nucleus.

Yukiko SHISHIDO-HARA<sup>1)</sup>, Yoshinobu HARA<sup>2)</sup>, and Kotaro YASUI<sup>1)</sup>,

<sup>1)</sup>Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience

<sup>2)</sup>Department of Inherited Metabolic Disease, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry

## ABSTRACT

Human polyomavirus JCV encodes the three capsid proteins, VP1, VP2, and VP3 downstream of the agnoprotein in the late region. JCV virions, round particles and filamentous forms, are identified in the nucleus of infected cells. In this study, we have elucidated unique features of JCV capsid formation by using a eukaryotic expression system. Structures of JCV polycistronic late RNAs (M1-M4) generated by alternative splicing were determined. VP1 would be synthesized from M2 RNA, and VP2 and VP3, from M1 RNA. The presence of the ORF of the agnoprotein or the leader sequence (nt 275-409) can decrease translation efficiency of VP1. VP1 was efficiently transported to the nucleus in the presence of VP2 and VP3, but

distributed both in the cytoplasm and in the nucleus in their absence. Mutation analysis indicated that inefficiency in nuclear transport of VP1 is due to the unique structure in the N-terminal sequence, KRKGERK. Within the nucleus, VP1 was localized discretely and identified as speckles in the presence of VP2 and VP3, but distributed diffusely in their absence. These results suggest that VP1 was efficiently transported to the nucleus and localized to the discrete subnuclear regions, with VP2 and VP3. By electron microscopy, recombinant virus particles were identified in the nucleus, and their intranuclear distribution was consistent with distribution of speckles. These results indicate that the three capsid proteins cooperatively generate progeny virions in the nucleus. We also found that the regulatory mechanisms in this process are unique to JCV, and different from other polyomaviruses.

#### 【はじめに】

JC ウイルス (JCV) は進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy : PML) の原因ウイルスで、多くのヒトに持続感染している。PML 発症には JCV 転写活性の上昇が示唆され、これまで JCV 調節領域と宿主転写因子の研究が盛んに行われてきた。一方、転写にひき続くカプシド蛋白の発現や核内における子ウイルス粒子の形成過程は、ほとんど解析されていない。特に *in vitro* 培養系で JCV 増殖効率が低いことは、JCV 粒子形成研究の障害となってきた。しかし、恐らく一定の分子比率で VP1 蛋白と VP2/VP3 蛋白から構成される JCV 粒子の形成には、未知の制御機序が多く存在すると予想される。そこで我々は、次のことを目的に本研究を行った。

#### 【目的】

本研究は、複製サイクル後期に、JCV が核内にウイルス粒子を形成する機序を解明することを目的とする。すなわち具体的に、(1) 後期 RNA の構造を決定し、ウイルス粒子を構成するカプシド蛋白の発現制御機序を検討する。(2) COS-7 細胞でカプシド蛋白を強制発現し、蛋白の核移行と粒子形成機序を解析する。またこれらの解析結果を、DNA 配列のホモロジーが高い SV40 と比較し、JCV 特異的な制御機序の有無を検討する。

#### 【材料と方法】

- 1) シークエンシング：松田ら (1987) がクローニングした JCV Tokyo-1 株のゲノム配列は、T7 sequanase で DNA 両鎖の配列を読み決定した。
- 2) RT-PCR とその産物のシークエンシング：PML 患者の生検試料または培養細胞から total RNA をとりだし DNase で処理後、各種プライマーで RT-PCR を行った。RT-PCR 産物をシークエンシングし、スプライス・サイトを決定した。
- 3) 発現系：JCV Tokyo-1 株のゲノムフラグメントを pcDL-SR $\alpha$ 296 に組み込み、各種発現ベクターを作製した。組み込んだゲノム領域は以下の通り。AVP231-SR $\alpha$ : nt 275-2531, VP231-SR $\alpha$ : nt 410-2531, VP1-SR $\alpha$ : nt 1467-2531。これらのベクターは lipofectamine plus (Gibco) で COS-7 細胞に導入した。
- 4) 共焦点顕微鏡法：発現ベクターを導入した COS-7 細胞は tissue culture glass slide (Falcon) で培養し、トランスフェクション 72 時間後、2%パラフォルムアルデヒド固定し、蛍光抗体法で VP1 をラベルし、共焦点顕微鏡 (オリンパス FV500) で解析した。
- 5) 電子顕微鏡法：発現ベクターを導入した COS-7 細胞は、トランスフェクション 72 時間後、2.5% グルタルアルデヒド 4%パラフォルムアルデヒドで固定し、エタノール脱水してエボン包埋した。超薄切切片の作製後、電子染色して透過電顕で観察した。

#### 【倫理面への配慮】

JCV に関する実験は、遺伝子組み換え実験に関する倫理委員会の承認のもと、P2 実験室で行った。

## 【結果と考察】

### 1) JCV Tokyo-1 株の DNA ゲノムの構造

JCV Tokyo-1 株の全 DNA 塩基配列 (5128bp) を決定し、後期領域の 4 蛋白のコード配列を予測した (Fig. 1)。後期領域では、3 種のカプシド蛋白 (VP1、VP2、VP3) が、agnoprotein の下流で互いに重なり合ってコードされている。VP3 は、VP2 の 3'側または C 末端側 3 分の 2 の領域と、DNA またはアミノ酸配列が同じである (VP2/VP3 と表記)。JCV Tokyo-1 株の全 DNA 塩基配列を、約 70% のホモロジーをもつ SV40 と BKV と比較すると、相違は主に調節領域にみられ、蛋白コード領域におけるホモロジーは比較的高い。

### 2) 後期 RNA の構造

カプシド蛋白の発現制御機序を解析するため、後期 RNA の構造を決定した。後期領域から、少なくとも 4 種の RNA (M1-M4) が形成される (Fig. 2)。これらの RNA は polycistronic RNA で、リーダー配列に agnoprotein をコードする (本稿では便宜上、カプシド蛋白 open reading frame (ORF) 上流の RNA 配列をリーダー配列と記載する)。また、major カプシド蛋白 VP1 は M2 から、minor カプシド蛋白 VP2/VP3 は M1 からの合成が推測された。これらの RNA の発現比はスプライシングで制御され、カプシド蛋白の発現比にも影響を与える。M3 と M4 には、VP1 の splicing variant である新規 ORF の存在が示唆された。こうした後期 RNA の構造は JCV に特異的で、SV40 とは異なる。JCV と SV40 の DNA 塩基配列を比較すると、splice site 近傍のわずかな相違が、全く異なる RNA 構造を生み出したと考えられた。

### 3) 翻訳の制御

JCV 後期 RNA は polycistronic RNA である。Kozak の leaky scanning mechanism に基づいて考察すると、カプシド蛋白は、leaky scanning するリボゾームが agnoprotein の ORF の下流で、翻訳を reinitiation して合成すると考えられた。リーダー配列の agnoprotein の AUG start codon は、Kozak の提唱する強いコンセンサス配列をもち、下流のカプシド蛋白の翻訳効率を低下させることを示唆していた (Fig. 3C)。

一方、SV40 ではリーダー配列がスプライスされ、agnoprotein の AUG start codon 非存在下でカプシド蛋白を翻訳する RNA が存在する (Fig. 3A)。また、わずか 10 base の 5'-untranslated region (5'-UTR) をもつ RNA では、リボゾームが agnoprotein の AUG start codon を bypass して、下流のカプシド蛋白を翻訳すると報告されている (Fig. 3B)。従って SV40 には、agnoprotein の AUG start codon が強いコンセンサス配列を持つにもかかわらず、効率よく下流のカプシド蛋白を翻訳する機序が存在する。こうした機序は JCV では認めないため、JCV カプシド蛋白の翻訳効率は、SV40 より低いと考えられた。

### 4) カプシド蛋白の核移行

JCV が *in vitro* 培養系で増殖効率が低いことは、複製サイクル後期のカプシド蛋白の機能を研究する障害であった。そこで我々は、JCV ゲノムフラグメントを発現ベクター pcDLSR $\alpha$ -296 に組み込み、COS-7 細胞を用いたカプシド蛋白発現系を樹立した。発現ベクター、AVP231-SR $\alpha$  (agnoprotein、VP1、VP2/VP3 を発現)、VP231-SR $\alpha$  (VP1、VP2/VP3 を発現)、VP1-SR $\alpha$  (VP1 を発現) の構造を Fig. 4 に示す。AVP231-SR $\alpha$  と VP231-SR $\alpha$  は、複数のシストロンを持つエクソンと、イントロンを含むゲノムフラグメントが組み込まれているのが特徴である。これらベクター由来の RNA は、JCV 本来のスプライス・サイトでスプライスされ、M1-M4 様の RNA を産生することが確認された。また、コードした蛋白全ての発現も確認された。これは、効率の低い *in vitro* 培養系の障害を克服し、この実験系でカプシド蛋白の機能を有益に解析できる可能性を示唆している。

まず、VP1 蛋白の核移行機序を解析するため、3 種の各発現ベクターを COS-7 細胞に導入し

て抗 VP1 抗体で免疫染色し、VP1 の細胞内分布を共焦点顕微鏡で観察した。AVP231-SR $\alpha$ と VP231-SR $\alpha$ を導入した細胞では VP1 は核に局在し、細胞によっては核内の核膜付近に集積が認められた (Fig. 5B, C)。一方、VP1-SR $\alpha$ を導入した細胞では、VP1 は核と細胞質に分布した (Fig. 5D)。従って、VP1 は 単独では核への移行効率が低く、VP2/VP3 存在下で効率よく核移行すると考えられた。そこで、AVP231-SR $\alpha$ と VP231-SR $\alpha$ を導入した細胞を抗 VP1 抗体と抗 VP2/VP3 抗体で2重染色して観察すると、核内でこれらの蛋白が共存していた (data not shown)。

一方、SV40 VP1 は単独でも核に効率良く移行し、N 末端領域に核移行シグナルが同定されている。これは、KRK と KK(P)K の塩基性アミノ酸が、8 残基のスペーサー (GSCPGAAP) をはさんでコードした、双極性のシグナルである。JCV VP1 のアミノ酸配列を SV40 VP1 と比較すると、JCV VP1 にはスペーサー部分に6 残基 (CPGAAP) の欠失がある。また、塩基性アミノ酸 KK(P)K の代わりに RK をコードしている。そこで、スペーサー部分に欠失した6 残基 (CPGAAP) を挿入した JCV VP1 の変異体 (Mut-1) と、6 残基を挿入しさらに RK を KK(P)K に置換した変異体 (Mut-2) の発現ベクターを作製した (Fig. 5A)。これらの変異体を COS-7 細胞で発現すると、Mut-1 は依然として核と細胞質に分布した (Fig. 5E)。しかし、Mut-2 は核に局在し、細胞質にはほとんど発現を認めなかった (Fig. 5F)。従って、JCV に特異的な N 末端領域のアミノ酸配列、すなわち6 残基 (CPGAAP) の欠失と RK 残基は、JCV VP1 の核移行効率を、SV40 VP1 と比較して低下させていることが明らかになった。

#### 5) ウイルス粒子の形成

AVP231-SR $\alpha$ と VP231-SR $\alpha$ を導入した COS-7 細胞を電子顕微鏡で解析すると、カプシド蛋白発現細胞の核内に、組み換えウイルス粒子の形成を認めた。これらは、PML 患者の脳組織内で認めたものと同様に、球状または線状の構造を呈していた。一方、VP1-SR $\alpha$ を導入した細胞では、組み換えウイルス粒子の形成は認めなかった。これらの結果は、VP1 蛋白と VP2/VP3 蛋白が協調して、核内にウイルス粒子を形成することを示している。

#### 【結論】

JCV 粒子は VP1 蛋白と VP2/VP3 蛋白の相互作用で核内に形成される。JCV 粒子中の構成蛋白の分子比率は、スプライシング、翻訳、核移行など複数の過程で制御されることが解った。こうした制御機序は JCV に特異的で、ホモロジーの高い SV40 や mouse polyomavirus とは異なることも解った。

#### 【参考文献】

- 1) Ishii N., Minami N., Chen E. Y., Medina A. L., Chico M., Kasamatsu H.: Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1. *J Virol.* 70:1317-1322, 1996.
- 2) Kozak M.: Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome.* 7:563-574, 1996.
- 3) Kozak M.: Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* 44:283-292, 1986.
- 4) 益子仁、中村健、篠崎正彦、荒木和子、藤井良知、保井孝太郎、萩原博：JC ウイルスの血清疫学的研究—1 東京地方における年齢別抗体保有状況ならびに地域抗体保有状況について。帝京医学雑誌. 5: 299, 1982
- 5) Matsuda M., Jon, M., Yasui K., Nagashima K.: Genetic characterization of JC virus Tokyo-1 strain, a variant oncogenic in rodents. *Virus Res.* 7:159-168, 1987.
- 6) Shinohara T., Matsuda M., Yasui K., Yoshiik, K.: Host range bias of the JC virus mutant enhancer with DNA rearrangement. *Virology.* 170: 261-263, 1989

- 7) Shishido Y., Nukuzuma S., Mukaigawa J., Morikawa S., Yasui K., Nagashima K.: Assembly of JC virus-like particles in COS7 cells. *J Med Virol* 51: 265-272, 1997.
- 8) Shishido-Hara Y., Hara Y., Larson T., Yasui K., Nagashima K., Stoner, G.L.: Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *J Virol* 74: 1840-1853, 2000
- 9) Shishido-Hara Y, Nagashima K.: Synthesis and Assembly of Polyomavirus Virions. In Khalili, K. and Stoner, G. L. eds., *The Human Polyomaviruses JC, BK, and SV40: Molecular and Clinical Perspectives* John Wiley & Sons, Inc., New York, 149-177, 2001
- 10) Takebe Y., Seiki M., Fujisawa J., Hoy P., Yokota K., Arai K., Yoshida M., Arai N.: SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol.* 8:466-472, 1988.

[研究発表]

1. 論文発表

- 1) Ito T., Yasui K., Mukaigawa J., Katsume A., Kohara M., and Mitamura K.: Acquisition of susceptibility to hepatitis C virus replication in HepG2 cells by fusion with primary human hepatocytes: establishment of a quantitative assay for hepatitis C virus infectivity in a cell culture system. *Hepatology* 34: 566-572, 2001
- 2) Kato K., Furusaka A, Miyamoto M., Date T., Yasui K., Hiramoto J., Nagayama K., Tanaka T., and Wakita T.: Sequence analysis of Hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* 64: 334-339, 2001
- 3) Shishido-Hara Y., Yasui K., Stoner G. L. and Hara Y., PCR reactions for human polyomavirus JC: optimal amplification of the divergent regulatory sequence and implication of secondary structure at the ATG start codon for agnoprotein coding sequence., submitted.



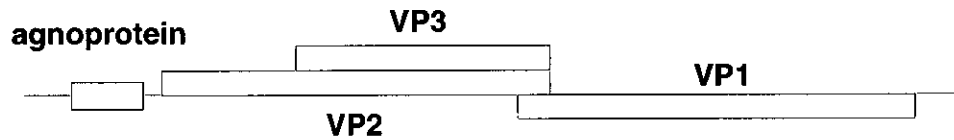


Fig. 1 JCV 後期領域の DNA ゲノム構造 :

JCV Tokyo-1 株の全塩基配列 (5128 bp) を決定し、後期蛋白のコード領域を予測した。agnoprotein の下流に、3 種のカプシド蛋白の VP1、VP2、VP3 が互いに重なり合ってコードされている (agnoprotein : nt 275-490, 71 amino acids; VP1 : nt 1467-2531, 354 amino acids; VP2 : nt 524-1558, 344 amino acids; VP3 : nt 881-1558, 225 amino acids) 。

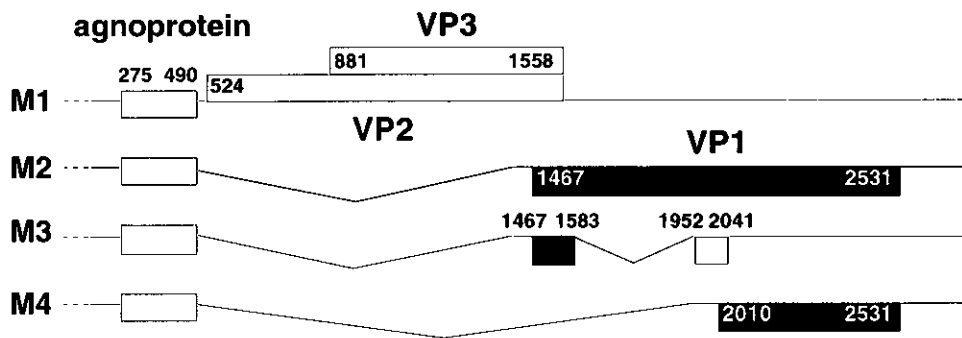


Fig. 2 後期 RNA (M1-M4) の構造 :

JCV 後期 RNA (M1-M4) の構造を決定した。M2-M4 は alternative splicing で形成される。また、major カプシド蛋白 VP1 は M2、minor カプシド蛋白 VP2/VP3 蛋白は M1 からの合成が推測され、これらの RNA の発現比は alternative splicing で制御される。M3 と M4 には、VP1 の splicing variant である新規 ORF の存在が示唆された。M1-M4 は polycistronic で、5' 領域に agnoprotein の ORF がコードされる。

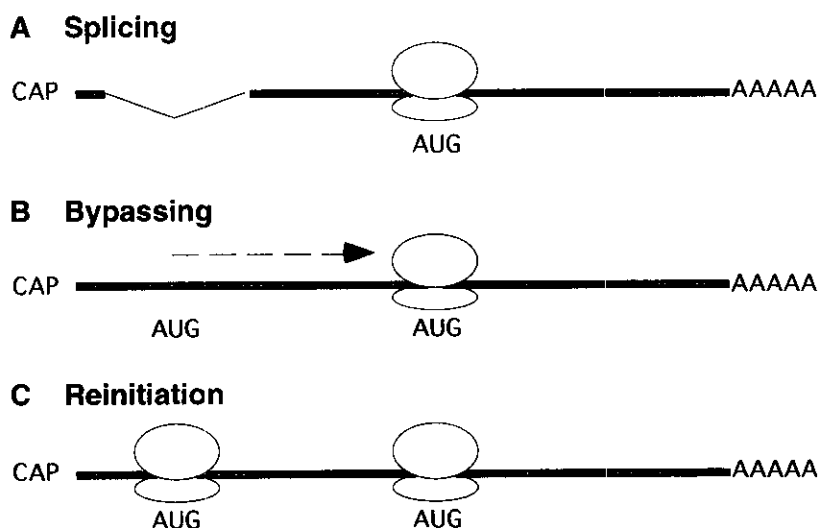


Fig. 3 翻訳の leaky scanning model :

A : SV40 ではリーダー配列がスプライスされ、agnoprotein の AUG start codon 非存在下でカプシド蛋白を翻訳する RNA が存在する。B : また、リボゾームが agnoprotein の AUG start codon を bypass して、下流のカプシド蛋白を翻訳する機序も知られている。C : 一方、JCV では、リボゾームが agnoprotein の ORF の下流で、翻訳を reinitiation して、カプシド蛋白を合成すると考えられ、JCV カプシド蛋白の翻訳効率は SV40 よりも低いと予想された。

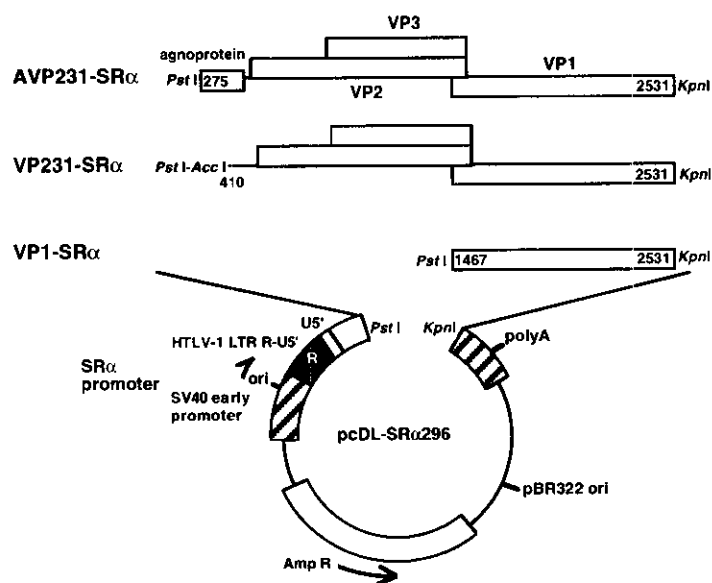


Fig. 4 発現ベクター :

発現ベクター pcDL-SRα-296 に JCV ゲノムフラグメントを組み込み、AVP231-SRα (agnoprotein, VP1, VP2/VP3 を発現)、VP231-SRα (VP1, VP2/VP3 を発現)、VP1-SRα (VP1 を発現) を作製した。AVP231-SRα と VP231-SRα には、複数のシストロンを持つエクソンと、イントロンが組み込まれおり、JCV 本来のスプライス・サイトで splicing がおきる。

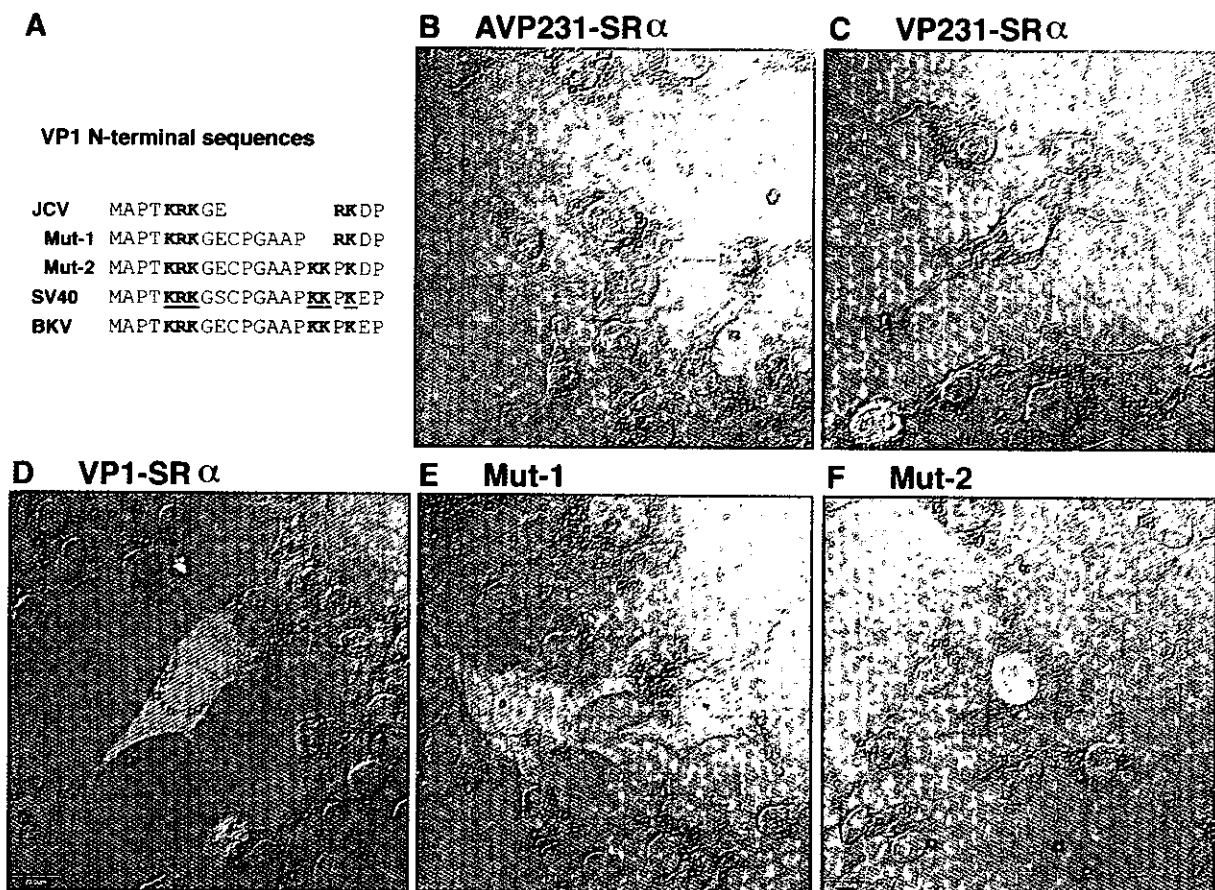


Fig. 5

VP1 蛋白の核移行：

各発現ベクターを COS-7 細胞に導入し、細胞内での VP1 蛋白の分布を共焦点顕微鏡で解析した。A：SV40 VP1 は KRK と KK(P)K の塩基性アミノ酸が、8 残基のスペーサー

(GSCPGAAP) をはさんで配列した、双極性の核移行シグナルをもつ。一方、JCV VP1 には、スペーサー部分に 6 残基 (CPGAAP) の欠失があり、塩基性アミノ酸 KK(P)K の代わりに RK が配列している。そこで、スペーサー部分に欠失した 6 残基 (CPGAAP) を挿入した JCV VP1 の変異体 (Mut-1) と、6 残基を挿入しさらに RK を KK(P)K に置換した変異体 (Mut-2) を作製した。B と C：AVP231-SR $\alpha$  と VP231-SR $\alpha$  を導入した細胞では VP1 は核に局在し、細胞によっては核内の核膜付近の領域に集積が認められた。D：VP1-SR $\alpha$  を導入した細胞では、VP1 は核と細胞質に分布した。E：Mut-1 は核と細胞質に分布した。F：Mut-2 は核に局在し、細胞質にはほとんど発現を認めなかった。



Fig. 6 : 組み換えウイルス粒子の電顕像 :

AVP231-SR $\alpha$ または VP231-SR $\alpha$ 導入 COS-7 細胞の核内には、組み換えウイルス粒子の形成を認めた。これらは、PML 患者の脳内のウイルスと同様に、球状または線状の構造を呈していた。一方、VP1-SR $\alpha$ 導入細胞には、組み換えウイルス粒子形成を認めなかった（写真は VP231-SR $\alpha$ 導入細胞の組み換えウイルス粒子）。

## JC virus agnoprotein の核移行シグナルとその機能の解析

班 員：長嶋 和郎 (北海道大学・医・分子細胞病理)  
研究協力者：岡田 由紀 (北海道大学・医・分子細胞病理、獣医・比較病理)  
：遠藤 秀一 (北海道大学・医・分子細胞病理)  
：澤 洋文 (北海道大学・医・分子細胞病理)

### 〔研究要旨〕

JC virus (JCV)を含む polyomavirus の agnoprotein (agno) は後期蛋白転写領域の最上流に開始コドンを持つ蛋白であるが、その機能に関しては未だ不明である。我々は JCV agno の N 末端領域に存在する nuclear localization signal (NLS)-like motif と nuclear export signal (NES)-like motif の mutant を作製して、wild-type と比較することにより agno の局在の変化を検索し、さらに agno のリン酸化と細胞内局在との関係についても検討を加えた。NLS/NES motif の mutant を用いた実験より、agno の細胞質での局在は NES に依存すること、NLS は核移行の機能を保持していることが示された。次に *In vivo* phosphorylation assay を用いて、agno は 5 カ所のリン酸化部位を有することを明らかにしたしかしながらリン酸化の有無は局在の変化に関与しなかった。以上より JCV agno は核内外を移行する蛋白であることが示され、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輸送に関係していることが予想された。

### Analysis of nuclear transport of JC virus agnoprotein

Kazuo Nagashima, Yuki Okada, Shuichi Endo, Hirofumi Sawa

Laboratory of Molecular & Cellular Pathology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan

### ABSTRACT

JC virus (JCV), a causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), encodes 6 major proteins including an agnoprotein (agno) of unknown function. To explore its function we first studied the expression and localization of agno in cultured cells by immunohistochemical methods using a specific polyclonal antibody against JCV agno. Agno was predominantly found in the cytoplasm and peri-nuclear region and also detected in the nucleus of persistently infected JCI cell. Agno has a nuclear localization signal (NLS)- and nuclear export signal (NES)-like motif at its N-terminus. To investigate the physiological role of these motif, NLS and NES motif mutants were synthesized by *in vitro* mutagenesis. Compared with the localization of wild-type and mutant agno, the cytoplasmic localization of agno was dependent on its NES motif sequence, and the NLS motif had nuclear transport activity. Furthermore, *in vitro* phosphorylation assay revealed that agno had 5 phosphorylation sites which had no effect on nuclear transport. These studies thus define JCV agno as a nucleocytoplasmic shuttling protein.

## 〔はじめに〕

JC ウイルス (JC virus: JCV) は 2 本鎖環状のゲノム構造を有するポリオーマウイルス科の DNA ウイルスであり、調節領域を基点に反時計回り方向に大型 T (Large-T) 抗原と小型 t (small-t) 抗原、時計回り方向に agnoprotein (agno)、VP2、VP3、VP1 の合計 6 種類の蛋白をコードしている(1)。同じポリオーマウイルス科には Simian virus 40 (SV40)と BK virus (BKV)があり、これら 3 種類のウイルスが発現する蛋白のアミノ酸配列は 78-90%という非常に高い相同性を有するが、後期蛋白のひとつである agno のみが、55%前後と際立って低い値を示す (図 1)。しかしながらそのアミノ末端側 1-49 番のアミノ酸配列は、これらのウイルス間で非常に良く保存されていることから、ポリオーマウイルスに共通する機能はこの部分にコードされていると推察される。

JCV の 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(2-4)。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(5-8)、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(9-12)、いずれの見解もコンセンサスが得られていない。一方、JCV の agno について、我々は最近 *in vitro* でウイルス自身が発現する Large-T 抗原と結合するという報告を報告し(13)、また JCV agno が感染細胞の細胞質、特に核周囲に局在し、核内にも少量存在していることを確認した(26)。しかし JCV agno の細胞内での機能については依然として不明な点が多い。

## 〔目的〕

本研究では、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 Localizing 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。

## 〔材料と方法〕

1) plasmid: JCV agnoprotein 発現ベクターとして、哺乳細胞発現ベクター pcDNA4HisMax (Invitrogen, CA, USA) に、pBR-MadI 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<sub>WT</sub>) と、pEGFP-N1 (Clontech, CA, USA) 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<sub>WT</sub>-GSTEGFP) をそれぞれ作成した。pAgno<sub>WT</sub>-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 agnoprotein 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, CA, USA) 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<sub>NESmut</sub>)。JCV Large-T 抗原発現ベクターとして、pRSV-JCT を用いた(14)。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。

2) 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<sub>WT</sub>-GSTEGFP および各種変異体 DNA を、FuGENE6 (Roche, IN, USA)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, Japan) で観察した。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, IN, USA) を用いて pAgno<sub>WT</sub>-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<sub>NESmut</sub>-GSTEGFP を FuGENE6 (Roche, IN, USA) 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, MS, USA) と反応させた。2 次抗体は Alexa Fluor594 rabbit anti-mouse IgG (H+L) conjugate (Molecular Probes, OR) を用い、Fluoview で観察した。

3) *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  $5 \times 10^6$  個ずつ 100 mm 培養皿に用意した。翌日、10% の透析済 FBS と 400  $\mu$ Ci/ml の <sup>32</sup>P-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% CO<sub>2</sub> 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 agnoprotein 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  $\mu$ l (50% 懸濁液) の protein A-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 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ーによって <sup>32</sup>P 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<sub>WT</sub> 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 ( $6 \times 10^5$  cells/dish) に導入した。導入後 16 時間目に培地を上記の <sup>32</sup>P-DMEM に交換した。スタウロスポリン (SIGMA, MS, USA) は <sup>32</sup>P-DMEM 添加時に終濃度 2  $\mu$ M になるように添加した。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 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。

#### (倫理面の配慮)

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。

#### [結 果]

1) 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、2 つの塩基性アミノ酸クラスターが 10 数アミノ酸の間隔をおいて配列する双極性核内移行シグナル (Bipartite Nuclear Localizing Signal: NLS) 様配列と (15)、ロイシンなどの疎水性アミノ酸がある規則性をもって配列する核外移行シグナル (Nuclear Exporting Signal: NES) 様配列が存在する (16) (図 1)。後者は、HIV の Rev 蛋白やインフルエンザウイルスの NS2 蛋白でも認められる配列と非常に類似している (16, 17) (図 1)。そこで GST-EGFP 融合蛋白発現系を用いて、agnoprotein 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<sub>WT</sub>-GSTEGFP はウイルス感染細胞および pHis-Agno<sub>WT</sub> と同様に、核周囲に強い局在を示した (図 2)。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 2)。さらに、NES 配列の <sup>35</sup>FLL を <sup>35</sup>AAA に変異させた pAgno<sub>NESmut</sub> 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 2)。また、<sup>35</sup>FLL → <sup>35</sup>AAA 変異に加えて、双極性 NLS のアミノ末端側の <sup>8</sup>RK、あるいはカルボキシル末端側の <sup>22</sup>KKR をそれぞれ <sup>8</sup>AA と <sup>22</sup>AAG に置換した変異体 pAgno<sub>NLSINESmut</sub> および pAgno<sub>NLS2NESmut</sub> 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 2)。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。

HIV の Rev に代表されるように、疎水性アミノ酸 (特にロイシン) に富む 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(18, 19)。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(20)。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<sub>WT</sub>-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 2)。

$\delta$  肝炎ウイルスでは、 $\delta$  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知られている(21)。そこで、pAgno<sub>NESmut</sub> 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<sub>NESmut</sub> 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 2)。

2) 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(22)。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 3)、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 3)。

次に、agno 発現ベクター pHis-Agno<sub>WT</sub> 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<sub>WT</sub> 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 3 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<sup>7</sup>S、<sup>11</sup>S、<sup>21</sup>T、<sup>41</sup>T、<sup>61</sup>T、<sup>62</sup>Y 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 (data not shown)。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 3 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(<sup>61</sup>T と <sup>62</sup>Y 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 3 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プロットングでは 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<sup>7</sup>S、<sup>11</sup>S、<sup>21</sup>T、<sup>41</sup>T、<sup>61</sup>T 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、<sup>7</sup>S、<sup>11</sup>S、<sup>21</sup>T 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(23, 24)。<sup>7</sup>S と <sup>21</sup>T は蛋白リン酸化酵素 C (Protein Kinase C: PKC)、<sup>11</sup>S は蛋白リン酸化酵素 A (Protein Kinase A: PKA) によって認識されるが(図 3)、図 2 で示した pAgno<sub>NLS1NESmut</sub> (<sup>8</sup>RK→<sup>8</sup>AA) と pAgno<sub>NLS2NESmut</sub> (<sup>22</sup>KKR→<sup>22</sup>AAG) は、前者では<sup>7</sup>S の PKC 認識配列と<sup>11</sup>S の PKA 認識配列が、後者では<sup>21</sup>T 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、agnoprotein 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<sup>7</sup>S、<sup>11</sup>S、<sup>21</sup>T 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、<sup>7</sup>S→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<sup>7</sup>S のリン酸化が必須である可能性が示唆された(図 4)。しかしながら<sup>7</sup>S 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スポリン処理で影響されなかったことから<sup>7</sup>S 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。



## 〔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(25)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（未発表データ）、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<sub>WT</sub>-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（data not shown）、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  $\delta$  肝炎ウイルスの  $\delta$  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 と共通の富ロイシン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。現在のところ、CRM1/Xpo1 以外に富ロイシン配列を標的とする核外輸送蛋白の存在は知られていない。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（河岡、第 24 回日本分子生物学会年会）、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（渡辺ら、第 24 回日本分子生物学会年会）、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 の転写を成書し、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。

## 〔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 は機能性の NLS と NES を有していること、また今回調べた結果では agno 自身のリン酸化は核移行のスイッチではないと考えられた。

## 〔参考文献〕

- 1) Frisque, R. J., Bream, G. L., and Cannella, M. T. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol*, 51: 458-469, 1984.
- 2) Chang, D., Fung, C. Y., Ou, W. C., Chao, P. C., Li, S. Y., Wang, M., Huang, Y. L., Tzeng, T. Y., and Tsai, R. T. Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. *J Gen Virol*, 78: 1435-1439., 1997.
- 3) Goldmann, C., Petry, H., Frye, S., Ast, O., Ebitsch, S., Jentsch, K. D., Kaup, F. J., Weber, F., Trebst, C., Nisslein, T., Hunsmann, G., Weber, T., and Luke, W. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J Virol*, 73: 4465-4469., 1999.
- 4) Kosukegawa, A., Arisaka, F., Takayama, M., Yajima, H., Kaidow, A., and Handa, H. Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid proteins in insect cells. *Biochim Biophys Acta*, 1290: 37-45., 1996.
- 5) Barkan, A. and Mertz, J. E. DNA sequence analysis of simian virus 40 mutants with deletions mapping in

the leader region of the late viral mRNA's: mutants with deletions similar in size and position exhibit varied phenotypes. *J Virol*, 37: 730-737., 1981.

- 6) Mertz, J. E., Murphy, A., and Barkan, A. Mutants deleted in the agnogene of simian virus 40 define a new complementation group. *J Virol*, 45: 36-46., 1983.
- 7) Ng, S. C., Mertz, J. E., Sanden-Will, S., and Bina, M. Simian virus 40 maturation in cells harboring mutants deleted in the agnogene. *J Biol Chem*, 260: 1127-1132., 1985.
- 8) Shenk, T. E., Carbon, J., and Berg, P. Construction and analysis of viable deletion mutants of simian virus 40. *J Virol*, 18: 664-671., 1976.
- 9) Alwine, J. C. Evidence for simian virus 40 late transcriptional control: mixed infections of wild-type simian virus 40 and a late leader deletion mutant exhibit trans effects on late viral RNA synthesis. *J Virol*, 42: 798-803., 1982.
- 10) Hay, N. and Aloni, Y. Attenuation of late simian virus 40 mRNA synthesis is enhanced by the agnoprotein and is temporally regulated in isolated nuclear systems. *Mol Cell Biol*, 5: 1327-1334., 1985.
- 11) Hay, N., Skolnik-David, H., and Aloni, Y. Attenuation in the control of SV40 gene expression. *Cell*, 29: 183-193., 1982.
- 12) Piatak, M., Subramanian, K. N., Roy, P., and Weissman, S. M. Late messenger RNA production by viable simian virus 40 mutants with deletions in the leader region. *J Mol Biol*, 153: 589-618., 1981.
- 13) 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.
- 14) Renner, K., Leger, H., and Wegner, M. The POU domain protein Tst-1 and papovaviral large tumor antigen function synergistically to stimulate glia-specific gene expression of JC virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 6433-6437., 1994.
- 15) Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, 64: 615-623., 1991.
- 16) Meyer, B. E. and Malim, M. H. The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*, 8: 1538-1547., 1994.
- 17) O'Neill, R. E., Talon, J., and Palese, P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J*, 17: 288-296., 1998.
- 18) Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F., and Dargemont, C. Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science*, 278: 141-144., 1997.
- 19) Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., and Weis, K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, 90: 1041-1050., 1997.
- 20) Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res*, 242: 540-547., 1998.
- 21) Bichko, V. V. and Taylor, J. M. Redistribution of the delta antigens in cells replicating the genome of hepatitis delta virus. *J Virol*, 70: 8064-8070., 1996.
- 22) Rinaldo, C. H., Traavik, T., and Hey, A. The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *J Virol*, 72: 6233-6236, 1998.
- 23) Zhang, F., White, R. L., and Neufeld, K. L. Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 12577-12582., 2000.
- 24) Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., and Pines, J. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at

prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol*, 9: 680-689., 1999.

- 25) Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T., and Nagashima, K. Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirool*, 7: 302-306., 2001.
- 26) 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*.

#### 〔研究発表〕

##### 1. 論文発表

- 1) Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T., and Nagashima, K. Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirool*, 7: 302-306., 2001.
- 2) 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*.
- 3) 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 [In Process Citation]. *J Biol Chem*, 275: 17016-17023, 2000.
- 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) 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.
- 6) 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.

##### 2. 学会発表

- 1) Okada Y., Sawa H., Tanaka S., Takada A., Suzuki S., Hasegawa H., Hall W.W., Nagashima K.: Glial/neuronal specific activation of the JC virus (JCV) promoter in the presence of HTLV-I Tax. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Neurovirology, 2000, CA, USA
- 2) Okada Y, Endo S, Sawa H, Nagashima K: Distribution and function of JCV 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. 10<sup>th</sup> 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) agnoprotein 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 宏恵、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<sup>1</sup>、駒込 理佳<sup>1</sup>、岡田 由紀<sup>1</sup>、田中 伸哉<sup>1</sup>、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

#### 〔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