

図6 Vero細胞馴化株のPBL及びMo-DCでの増殖

# カニクイザルを用いた麻疹ウイルス脳内接種法の検討

班 員：網 康至（国立感染症研究所・動物管理室）

協力研究者：須崎百合子、小長谷昌功（国立感染症研究所・動物管理室、ウイルス第3部）

小船 富美夫（東京大学医科学研究所・実験動物研究施設）

## 〔研究要旨〕

麻疹ウイルスの脳内侵入経路を明らかにする目的で、麻疹ウイルスを5頭のカニクイザルに経鼻接種後、そのうち3頭については、ウイルス血症の極期である、感染7日後に、末梢血より単核細胞を分離し、同一個体の視床に接種し、脳内における麻疹ウイルスの持続感染について検討を行った。

感染3週後、すなわち感染自己単核細胞脳内接種後2週で、対照群、実験群1頭づつ解剖し、脳からのウイルス分離を試みたが、陰性であった。残りのサルについては引き続き臨床観察を行っている。今回用いた方法でも、脳内の標的細胞に積極的に感染を成立させることが出来ていないかも知れないが、潜伏期である可能性も否定出来ず、ヒトにおけるSSPEの病態を考慮すれば、さらに継続的に観察が必要であると考えられた。

Intracerebral inoculation of autochthonous peripheral blood mononuclear cells of cynomolgous monkeys infected with measles virus

Yasushi AMI<sup>1</sup>, Yuriko SUZAKI<sup>1</sup>, Masayoshi KOHASE<sup>2</sup>, and Fumio KOBUNE<sup>3</sup>

1, Division of Experimental Animal Research, 2, Department of Virology III, National Institute of Infectious Disease, 3, Laboratory Animal Research Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo.

## ABSTRACT

After intranasal inoculation of five cynomolgous monkeys with measles virus(MV), the autochthonous peripheral blood mononuclear cells(PBMC) containing MV infected cells were collected and inoculated to the thalamic region of each hemisphere at 7 days p.i. in three monkeys. Two monkeys were inoculated to the same regions with the same volume of medium. At 2 weeks after intracerebral inoculation, a PBMC-inoculated and a mock inoculated monkey were sacrificed and examined for viral persistent infection. No virus was isolated from both monkeys and no virus antigen was detected in brain tissues. The persistent infection was not established with this method but further studies were needed in the remaining monkeys.

## 〔はじめに〕

SSPE 麻疹ウイルスの脳内における持続感染が SSPE 発症要因のひとつであると考えられている。カニクイザルに麻疹ウイルスを経鼻接種すると接種後1週には脳乳剤からウイルスが分離されたが、病変の形成には至らなかった。一方、麻疹ウイルスを直接脳内に接種しても脳炎は認められない。脳内に持続感染が成立する要因は、種々考えられるが、宿主側の要因とともに、その一つは、脳に到達する形式とウイルス量によるものであると考えられる。病原性を有する麻疹ウイルスは、標的細胞の膜上に存在する SLAM を主としてレセプターとして利用しているが、神経細胞、あるいは希突起膠細胞には発現していない。すなわち、末梢から脳内へのウイルス伝播には、cell to cell の感染が主体であると考えられる。

## 〔目的〕

脳内へのウイルス伝播が感染細胞の脳内移行によるものとすれば、通常ではその機会が少なく、ウイルスの持続感染がまれにしか起らない要因であると考えられる。脳内に感染細胞を接種することにより、脳内標的細胞への感染機会を増加させた場合、持続的な感染が成立するか否かを検討することを目的とする。

## 〔材料と方法〕

カニクイザル5頭に麻疹ウイルス HL-MoBr3 株 10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub> を経鼻接種し、経時的に採血を行い、血液学的検査を行った。また、末梢血単核球を常法にしたがって分離し、B95a 細胞と co-culture を行い、感染細胞数を測定した。感染7日後に末梢血より分離した単核球 10<sup>6</sup> 個を、同一個体の3頭の大脳視床に接種、2頭には対照として培養液を接種し臨床症状の観察を行った(表1)。感染21日後に、両群1頭づつ解剖し、リンパ臓器および大脳からのウイルス分離および病理組織学的検索を行った。ウイルス分離は、

リンパ臓器からは、単核細胞を常法に従って分離し、大脳組織は、0.1% EDTA PBS(-)液中で機械的に分離した細胞と B95a 細胞との co-culture することにより行った。その他の個体については、継続して臨床観察を行った。

本実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

#### 【結果】

ウイルスを接種した 5 頭のカニクイザルは、接種後末梢血中のリンパ球が減少し、明らかに接種ウイルスは病原性を示した (図 1)。接種後 7 日後から 10 日後かけて減少は最大となり以後、増加し、2 頭については接種後 3 週までに接種時の数に回復した。リンパ球数の減少に相関して、末梢血単核球における感染細胞数は増加し、リンパ球数の回復に従って、減少した (図 2)。接種後 7 日後に末梢血単核球を接種した群と、対照群にこれらの変化に差は認められなかった。脳内に接種した感染単核球数を表 1 に示す。接種 2 1 日後において脳内接種群、対照群のそれぞれ 1 頭を解剖し、各臓器からのウイルス分離を行った結果、対照群の末梢血単核球以外からは分離されなかった。接種 2 1 日後の脳からはウイルスが分離されなかった。また、病理組織学的にもウイルス抗原、特異的病変はともに認められなかった。接種 2 1 日後の血清中および脳脊髄液中の中和抗体価を表 2 に示す。

#### 【考察】

ウイルスの脳内侵入機構は、ウイルス単独、あるいは血液細胞を介して、あるいは脳血管内皮細胞への感染からなどが考えられるが、麻疹ウイルスでは今のところ不明である。今回、我々はウイルス血症の主体となっている、感染 1 週後の末梢血単核細胞を脳内に接種する方法で、脳内の標的細胞である神経細胞あるいは希突起膠細胞への効率的に感染が成立する可能性について検討を行った。脳内接種 2 週後の脳からはウイルス分離されず、対照群との有意な差は認められなかった。

脳内接種 2 週後にウイルスが分離されなかったことは、この方法を用いても、神経細胞あるいは希突起膠細胞に効率的に感染を成立させることができなかったか、あるいはこの時期がウイルス増殖の潜伏期であるためであったかのどちらかであると考えられる。Schumacher らは、SSPE ウイルス持続感染継代細胞をアカゲザルの脳内に接種した場合にも、接種 1 3 日以降はウイルスが分離されなかったと報告しており、一致する結果となっている。残りの個体について、引き続き検討する必要があると考えられた。

#### 【結論】

カニクイザルを用いた麻疹ウイルス脳内持続感染作出のために、感染自己末梢血単核球の脳内接種を行ったが、接種後 2 週で脳からウイルス分離できなかった。この方法を用いても効果的に脳への感染を成立させられないかも知れないが、潜伏期である可能性も否定出来ず、ヒトにおける SSPE の病態を考慮すれば、さらに継続的に観察が必要であると考えられた。

#### 【参考文献】

- 1) Schumacher, H.P., Albrecht, P., Clark R.G., Kirschstein R., and Tauraso N.M. Intracerebral inoculation of rhesus monkeys with a strain of measles virus isolated from a case of subacute Sclerosing panencephalitis. *Infect.Immun.*4:419-424.1971

#### 【研究発表】

なし

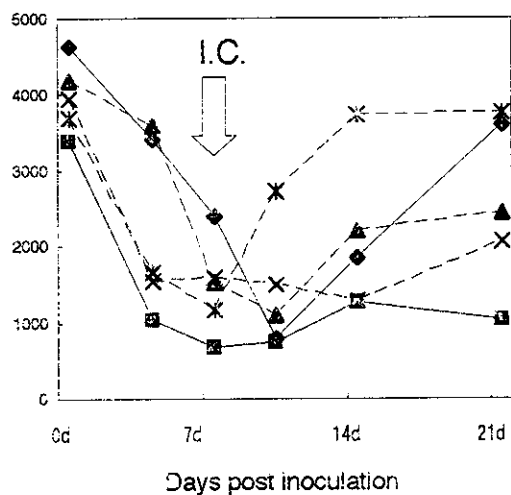


図1 末梢血リンパ球数の変化 (μl)

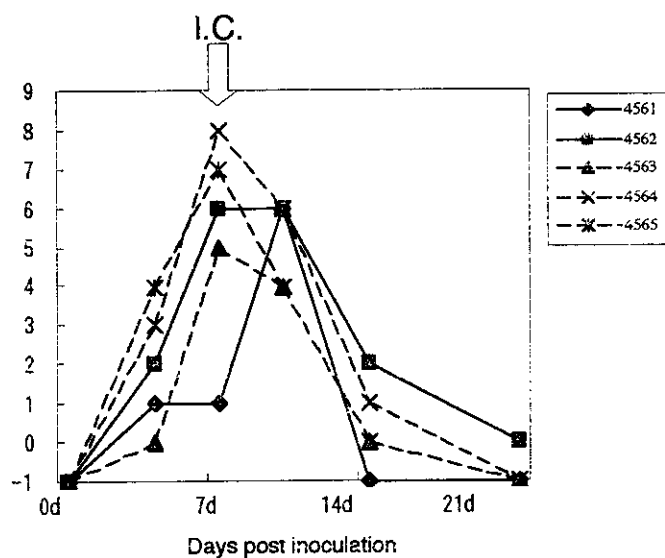


図2 感染細胞数の変化

(Reciprocal titers (log2) in 10<sup>5</sup> PBMCs)

Anim no.	inoculum	virus load
4561	medium	20
4562	medium	640
4563	PBMC	320
4564	PBMC	2450
4565	PBMC	1280

表1 感染7日後脳内接種した細胞(10<sup>6</sup>個)あたりに含まれる感染細胞数

	Virus load				
	4561	4562	4563	4564	4565
PBMC	<1	1	<1	<1	<1
Cer LN		<1	<1		
Thymus		<1	<1		
Spleen		<1	<1		
BM		<1	<1		
Brain		-	-		

	Neutralizing titers				
	4561	4562	4563	4564	4565
Serum	32	128	512	64	128
CSF	<4	<4	<4	<4	<4

表2 感染3週後(脳内接種2週後)におけるウイルス分離成績と中和抗体価

# 進行性多巣性白質脳症 (PML) の核内ウイルス封入体形成メカニズム

## ～Minor カプシド蛋白 VP2、VP3 の機能～

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)

### [研究要旨]

進行性多巣性白質脳症 (PML) では、JC ウイルス (JCV) が感染細胞の核内封入体として認められる。JCV 粒子外殻 (カプシド) は、major カプシド蛋白 VP1 と、minor カプシド蛋白 VP2、VP3 から構成されるが、これらの蛋白がどう機能して核内ウイルス封入体を形成するのか詳細は解っていない。そこで我々は、ウイルス蛋白を COS-7 細胞で強制発現し、その核移行と核内におけるウイルス粒子形成の過程を光学顕微鏡および電子顕微鏡で解析した。その結果、単独では核と細胞質に分布する VP1 蛋白は、VP2 蛋白または VP3 蛋白のいずれか一方があると、協調して効率よく核に移行し、核マトリックスで集積する事がわかった。またカプシド蛋白の核マトリックスでの集積には、major および minor カプシド蛋白の発現比がよく制御されていること、また双方の持つシグナルが協調して機能していることも示唆された。さらに、カプシド蛋白が集積した核マトリックスでは、効率よくウイルス粒子が形成されることも明らかになった。一方、VP1 蛋白を単独発現した場合、VP1 は核と細胞質に分布しウイルス粒子の形成は認めなかった。これらの結果は、minor カプシド蛋白 VP2、VP3 が、積極的にカプシド蛋白の細胞質から核への移行、核マトリックスでの集積、および粒子形成に関与していることを示している。

JC virus capsid proteins, VP1 and VP2/VP3, accumulate to the nuclear matrix for efficient capsid assembly:

How does viral nuclear inclusion develop in progressive multifocal leukoencephalopathy (PML)?

Yukiko SHISHIDO-HARA and Kotaro YASUI

Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience

### ABSTRACT

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a fatal demyelinating disorder due to infection of human polyomavirus JC (JCV). In the nucleus, JCV has been identified as round or filamentous structures. The JCV capsid is likely composed of a major capsid protein VP1, and minor capsid proteins VP2 and VP3, however it is not known how these proteins transport from the cytoplasm to the nucleus and are assembled into capsid structures. To investigate development of viral nuclear inclusion of PML, we expressed the JCV capsid proteins in COS-7 cells, and nuclear transport and capsid assembly were analysed by confocal microscopy and electron microscopy. We found that VP1, which was diffusely distributed both in the cytoplasm and the nucleus by itself, was efficiently transported to the nucleus and accumulated to the nuclear matrix in the presence of either VP2 or VP3. Proportional expression of VP1 and VP2/VP3 is important for their efficient accumulation to the nuclear matrix. Both VP1 and VP2/VP3 likely has a signal, which function cooperatively to target to the nuclear matrix. These results indicate that VP2 and VP3, as well as VP1, has important roles for nuclear transport and intranuclear accumulation of the capsid proteins for subsequent capsid assembly.

## [はじめに]

PML は JC ウイルス感染による脱髄疾患である。感染 oligodendrocyte では、球状または管状の形態をしたウイルスが、核内封入体として認められる。JC ウイルス粒子外殻 (カプシド) は、major カプシド蛋白 VP1 と minor カプシド蛋白 VP2 および VP3 から構成されるが、細胞質で合成されるこれらの蛋白がどう核へ移行して、核内にウイルス粒子を形成するのか、その詳細は明らかでない。そこで我々は、核内ウイルス封入体形成過程における JCV カプシド蛋白の機能を解析した。

## [目 的]

本研究は、PML の核内ウイルス封入体形成機序を解明し、それにつづく脱髄と細胞変性機序の理解へと発展させることを目的とする。

## [材料と方法]

- 1) 発現系: JCV Tokyo-1 株のゲノムフラグメントを pcDL-SRα296 に組み込み、発現ベクター AVP231-SRα と VP1-SRα を作成した。後述のように、AVP231-SRα は複数のウイルス遺伝子を組み込んだ発現ベクターである。また AVP231-SRα を鋳型に、各ウイルス遺伝子の ATG 翻訳開始コドンに TTAG に変異した発現ベクター、MUT-1-MUT-5 を作成した。これらのベクターは lipofectamine plus (Gibco) で COS-7 細胞に導入した。
- 2) 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、蛍光抗体法で共焦点顕微鏡を用いて観察した。
- 3) 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、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 LR white に包埋し、post-embedding 法にて免疫電顕を行った。

## (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]

### (1) Major カプシド蛋白 VP1 の細胞内局在

JCV は培養系での増殖効率が低く、約一ヶ月の培養期間を要するわりに収率もよくない。これは、核内ウイルス封入体を研究する障害となっていた。そこで我々は、JCV ゲノム断片を発現ベクター pcDL-SRα-296 に組み込み、COS-7 細胞を用いた組み換えウイルス粒子発現システムを樹立した (Fig. 1A)。既に報告したように、発現ベクター AVP231-SRα は、複数のウイルス後期遺伝子 (agnoprotein, VP1, VP2, VP3) とイントロンを含むゲノム断片を組み込んでいるのが特徴的である。このベクターを導入した細胞では、ベクター由来の RNA が JCV 本来のスプライス・サイトでスプライスされることが確認され、コードされたカプシド蛋白がウイルス本来の蛋白発現比に類似して発現することが期待された。即ち、蛋白発現比の制御が困難な co-transfection の系とは大きく異なり、より自然に近い条件下で蛋白相互作用を解析できると考えられる。これに対し発現ベクター VP1-SRα には、従来方法通り、イントロンを含まない VP1 蛋白のコード領域のみを組み込んだ。

これら AVP231-SRα と VP1-SRα を各々 COS-7 細胞に導入し、VP1 蛋白の細胞内局在を比較した。VP1 蛋白を AVP231-SRα で発現すると、VP1 は核に局在した。核内での VP1 分布は細胞により異なったが、核膜近傍に強く集積し、核中心部へと核マトリックス様の構造 (後述) に沿って分布を広げる像が特徴的であった (Fig. 1B)。一方 VP1 を VP1-SRα により単独で発現すると、VP1 は核と細胞質に広範囲に散在した (Fig. 1C)。これより、VP1 蛋白は単独では核での集積が困難なことが明らかになった。

## (2) Minor カプシド蛋白 VP2/VP3 の機能

VP1 蛋白の細胞内局在を決定する因子を同定するために、AVP231-SR $\alpha$ を鋳型に5種の変異ベクター (MUT-1~MUT-5) を作成した。これらの変異ベクターでは、agnoprotein、VP2、VP3 のうち、いずれか単数または複数の ATG 翻訳開始コドンが TTG に変異されている (Fig. 2A)。これらの変異ベクターを COS-7 細胞に導入し、抗 VP1 抗体と抗 VP2/VP3 (C 末端) 抗体を用いて 2 重染色した。するとどの変異ベクターを導入した場合も、VP1 蛋白と VP2 または VP3 蛋白が核マトリックスで集積する像が確認された (Fig. 2B)。これより、VP1 蛋白が核マトリックスで集積するためには agnoprotein は必須ではなく、VP2 または VP3 のどちらか一方が発現していることが必要であることが明らかになった。また VP1 蛋白と VP2/VP3 蛋白を各々別の発現ベクターから co-transfection により共発現すると、導入するベクターの比率を厳密に調整した場合にのみ VP1 蛋白は核に局在したが、その再現性は低かった (データ示さず)。これは個々の細胞の外来遺伝子の発現レベルを厳密には制御できないためと推測される。これより、カプシド蛋白の核マトリックスでの集積には VP1 蛋白と、VP2 または VP3 蛋白の発現比が制御されていることが重要で、ウイルスゲノムの遺伝子配列にはその制御機序が隠されていると考えられた。さらに、VP2 または VP3 を単独で発現すると、これらの蛋白は核内でびまん性に分布し核マトリックスでは集積しなかった (データ示さず)。これは、核マトリックスでの集積には VP1 蛋白と VP2/VP3 蛋白の双方の持つシグナルが協調して関与することを示唆している。

## (3) カプシド蛋白の核内集積とウイルス粒子の形成

核内におけるカプシド蛋白の分布とウイルス粒子の形成を解析するために、AVP231-SR $\alpha$ と VP231-SR $\alpha$ を導入した COS-7 細胞を、各々免疫電顕で観察した。AVP231-SR $\alpha$ 導入細胞では、VP1 蛋白の局在を示す金コロイド粒子が核膜近傍の核内領域でクラスターを形成して認められ、共焦点顕微鏡で認めた VP1 局在とよく一致していた (Fig. 3A)。また核膜近傍では、球状および管状のウイルス様粒子の形成を認めた (Fig. 3B, C)。ウイルス様粒子の局在は、金コロイドクラスターの局在とよく一致していたことから、カプシド蛋白は核膜近傍の核マトリックスで集積し、そこでウイルス粒子に効率よく assembly すると考えられる。一方、VP1-SR $\alpha$ 導入細胞では、共焦点顕微鏡の所見と同様に、VP1 蛋白が核と細胞質の双方に分布し、組み換えウイルス粒子の形成は認められなかった (データ示さず)。これらの結果より、VP1 蛋白と VP2/VP3 蛋白は協調して細胞質から核へ移行し、核膜近傍の核マトリックスを足場に、効率よくウイルス粒子を形成することが明らかになった。

## [考 察]

真核細胞の核内には蛋白質と RNA からなる骨格様の構造があり、1970 年代から「核マトリックス」という概念で知られている。この核内構造は、転写や複製など高次核機能が発現するための足場になると考えられてきた。近年では、骨格様の核内構造をとる蛋白質が次々と同定され、そのダイナミズムが生細胞で盛んに観察されている。本研究では、JCV カプシド蛋白の集積する核内領域を具体的に同定したわけではないが、その形態的特徴から従来の概念に従い「核マトリックス」と表現した。

JCV カプシド蛋白が核マトリックスで集積するには、発現比の制御された VP1 蛋白と、VP2 または VP3 蛋白のシグナルが協調して機能すると考えられる。JCV と関連する mouse polyomavirus では、VP1 蛋白が核マトリックス蛋白と結合するという報告があり (6)、VP1 シグナル存在の可能性をよく支持している。また、JCV の VP2 および VP3 蛋白の C 末端領域には lysine や arginine など塩基性アミノ酸に富んだ配列が存在している。DNA シークエンス上約 70% のホモロジーを持つ SV40 では、この領域に核移行シグナル (1)、DNA binding domain (2)、VP1 interaction domain (3) 等が同定された。最近 JCV においても、VP2 および VP3 蛋白の C 末端領域の重要性を示すデータを得たことから、現在これに変異を導入し核マトリックスでの集積に関与する VP2/VP3 蛋白のシグナルを検索している。

## [結 論]

本研究から、minor カプシド蛋白 VP2/VP3 は、カプシド蛋白の細胞質から核への移行、核マトリックスでの集積、および粒子形成に積極的に関与していることが明らかになった。

## [参考文献]

- 1) Clever, J., Kasamatsu, H.: Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology*. 1:78-79, 1991
- 2) Dean, D. A., Li P. P., Lee, L. M., Kasamatsu, H.: Essential role of the Vp2 and Vp3 DNA-binding domain in simian virus 40 morphogenesis. *J Virol*. 69: 1115-1121, 1995
- 3) Gharakhanian, E., Kasamatsu, H.: Two independent signals, a nuclear localization signal and a Vp1- interactive signal, reside within the carboxy-35 amino acids of SV40 Vp3. *Virology*. 178: 62-71, 1990
- 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) Palkova Z, Spanielova H, Gottifredi V, Hollanderova D, Forstova J, Amati P. The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS Lett*. 467:359-64, 2000
- 7) 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
- 8) Shishido-Hara, Y. and Nagashima, K. Synthesis and Assembly of Polyomavirus Virions. In Khalili, K. and Stoner, G. L. eds., *The Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives* John Wiley & Sons Inc. New York 2001
- 9) Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K., and Stoner, G. L.: Analysis of Capsid Formation of Human Polyomavirus JCV (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. Virology* 74: 1840-185, 2000
- 10) Shishido, Y., Nukuzama, S., Mukaigawa, J., Morikawa, S., Yasui, K., and Nagashima, K.: Assembly of JC virus-like particles in COS7 cells *J Medl Virology* 51: 265-272, 1997
- 11) 穴戸由紀子, 遺伝子組み換えによる JC virus 偽ウイルス粒子の作成 *北海道医学雑誌* 71:573-583, 1996

## [研究発表]

1. 論文発表
- 1) Zhou, Z., Wakita, T., Yasui, K.: Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus prM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in Balb/c mice. *J. Virol.* in press
- 2) Ito, T., Yasui, K., Mukaikawa, J., Katume, A., Kohara, M., 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
- 3) Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., Wakita, T.: Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.* 64: 334-339, 2001
- 4) Hanaue, N., Ogata, A., Terado, M., Endo, T., Makiura, T., Hirafuji, M., Yasui, K., Nagashima, K., Tashiro, K., Minami, M.: Selegiline effects on bradykinesia and dopamine levels in a rat model of Parkinson's disease induced by the Japanese encephalitis virus. *Biogenic Amines* 16: 523-530, 2001



- 5) Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K., Stoner, GL.: 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
- 6) Suzuki, T., Ogata, A., Tashiro, K., Nagashima, K., Tamura, M., Yasui, K., Nishihara, J.: Japanese encephalitis virus up-regulates expression of macrophage migration inhibitory factor(MIF) mRNA in the mouse brain. *Biochi. Biophys. Acta.* 1517: 100-106, 2000
- 7) Yasui, K.: DNA vaccines. *Bio Clinica*, 15: 524-528, 2000

## 2. 学会発表

- 1) 穴戸-原 由紀子、保井 孝太郎  
JC ウイルスの major カプシド蛋白 VP1 と minor カプシド蛋白 VP2/VP3 は協調して核移行し、核膜付近で効率よくウイルス粒子を形成する。第 50 回日本ウイルス学会 平成 14 年 (2002 年) 10 月 札幌
- 2) Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., Hara, Y., and Yasui, K.  
Synthesis and assembly of JCV virions: progenies are efficiently generated in discrete regions of the nucleus in the presence of major and minor capsid proteins.  
4<sup>th</sup> International Symposium on NeuroVirology 2002, June 19-20, 2002, Dusseldorf Germany
- 3) 穴戸-原 由紀子、市野瀬 志津子、樋口 佳代子、保井 孝太郎、原 嘉信  
進行性多巣性白質脳症の oligodendrocyte 核内では、JC ウイルスが核膜付近の不連続な領域で複製している。第 43 回第日本神経病理学会 平成 14 年 (2002 年) 5 月 東京

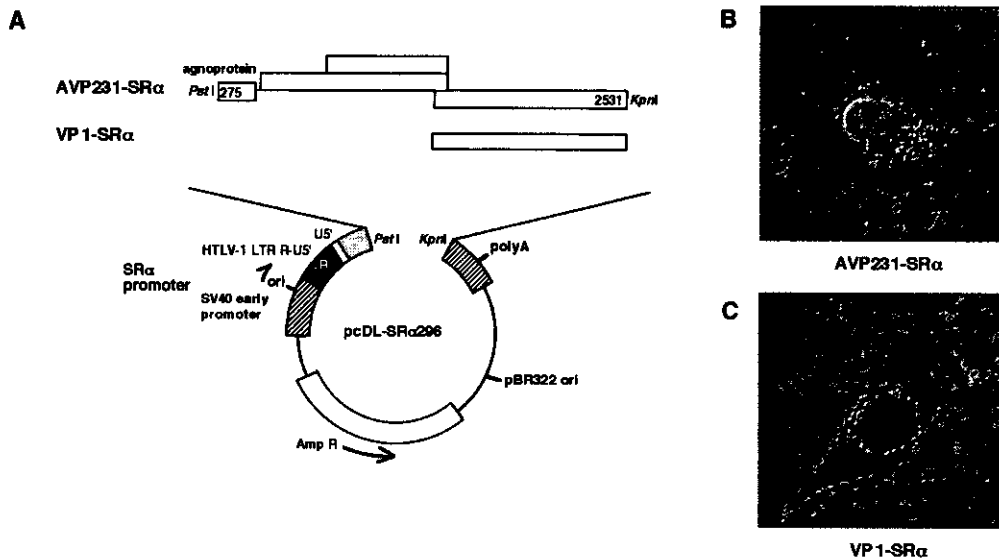


Fig. 1. 発現ベクターAVP231-SR $\alpha$ とVP231-SR $\alpha$ と構造と、ベクター導入COS-7細胞におけるVP1蛋白の局在：A) AVP231-SR $\alpha$ には、複数のウイルス後期遺伝子 (agnoprotein, VP1, VP2, VP3) とイントロンを含むゲノム断片が組み込まれており、カプシド蛋白がウイルス本来の蛋白発現比に類似して発現することが期待された。一方、VP1-SR $\alpha$ にはVP1蛋白のコード領域のみが組み込まれている。B) VP1の局在を解析すると、AVP231-SR $\alpha$ 導入細胞ではVP1は核マトリックスで集積した。一方、VP1-SR $\alpha$ 導入細胞ではVP1は核と脂肪質に広範囲に散在した。

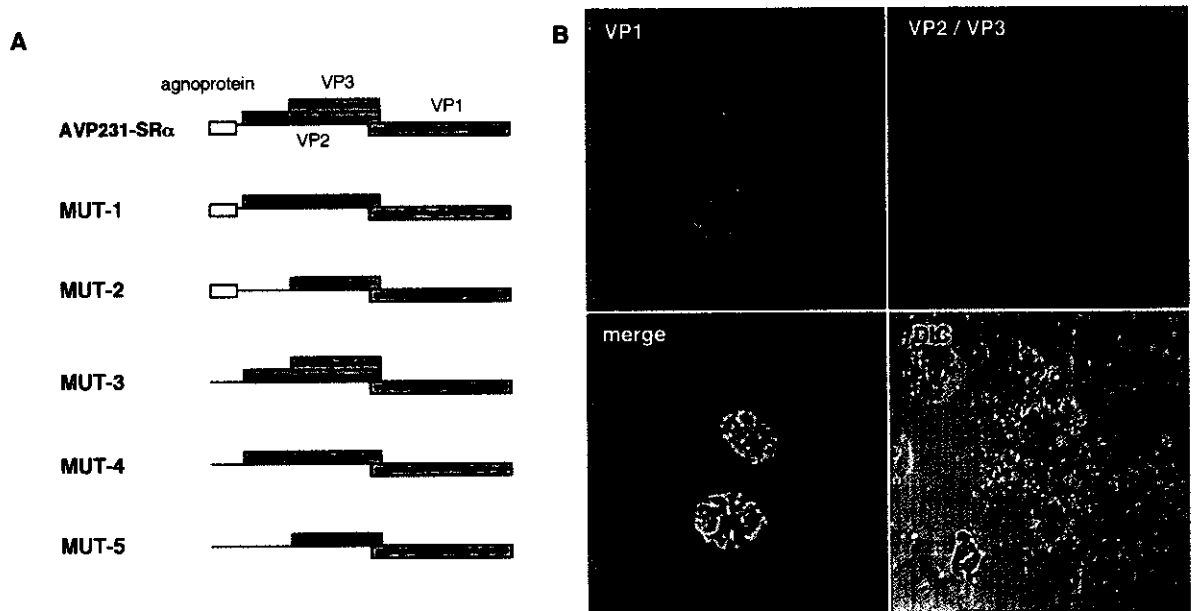


Fig. 2. 変異ベクターの構造と、AVP231-SR $\alpha$ 導入細胞におけるVP1蛋白 (rhodamine ラベル) とVP2/VP3蛋白 (FITC ラベル) の2重染色像：A) AVP231-SR $\alpha$ のagnoprotein, VP2またはVP3のATG翻訳開始コドンをTTGに変異した5種の変異ベクター (MUT-1~MUT-5) を作成した。各変異ベクターがコードする蛋白は図に示すとおり。B) 各変異ベクターをCOS-7細胞に導入し、抗VP1抗体と抗VP2/VP3抗体で二重染色をおこなった。どの場合も、AVP231-SR $\alpha$ 導入細胞と同様に、VP1蛋白がVP2またはVP3蛋白と核マトリックスに共局在する細胞が認められた。



Fig. 3. AVP231-SR $\alpha$ 導入細胞の免疫電顕像：上) AVP231-SR $\alpha$ 導入細胞では、VP1 蛋白の局在を示す金コロイド粒子が核膜近傍の核内領域でクラスターを形成していた。下) 核膜近傍では、金コロイドのクラスターを一致して、球状および管状のウイルス様粒子の形成を認めた。

## JC virus 転写調節領域に結合する神経特異的蛋白質の検索

班 員：長嶋 和郎 (北海道大学・医・分子細胞病理)  
研究協力者：仙葉 慎吾 (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〕

進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスである JC virus はヒト神経系細胞に選択的に感染し、脱髄を生ずる。培養細胞を用いたエントリーアッセイの結果 JC virus は種々の細胞にエントリーし、早期に核に達していることが判明し、この神経親和性を規定する因子は核内に存在することが明らかとなった。核に入ったウイルスが増殖するためには JC virus の遺伝子発現調節配列(transcriptional control region: TCR)に作用する核内転写因子が重要と考えられたので、その同定を試みた。

JC virus の TCR を 9 個のユニットに細分し、これらを probe として electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行い結合している分子を種々のカラムを用いた分画法を用いて精製した。EMSA の結果神経系細胞の核抽出液にのみ反応し、他の細胞核抽出液とは反応しない分子が検出された。次に種々の column chromatography にてこの分子を精製し、cleavage stimulating factor (CstF) であることを明らかにした。CstF は mRNA の cleavage および polyadenylation を制御する heterotrimer であり、我々の結果では p75 が DNA に結合しているという知見が得られた。この事実により JC virus の TCR に結合する複合体の全容を解明していくための手掛かりが得られた。

Investigation of neural-specific protein which binds to JCV regulatory region

Kazuo Nagashima, Shingo Semba, Hirofumi Sawa

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

### ABSTRACT

It has recently been accepted that transcriptional factors are associated with JCV activation and neurotropism. We have examined nuclear factors by using the Mad-4 variant of JCV adapted to the IMR-32 cells. The regulatory region of the variant JCV which consists of 290 bp was divided into 9 fragments, and the fragments were labeled and incubated with nuclear lysates from both IMR-32 and non-permissive cells, and subjected to electrophoretic mobility shift assay (EMSA) assays. The specificity of shifted bands exclusively observed in IMR-32 lysates was confirmed by a competitive assay with a cold probe. By applying several columns and UV cross-linking assays, two molecules of 75 kDa and 45 kDa were identified and verified as forming a heterodimer. By a micro-sequencing analysis, both molecules were identical to those known as 'cleavage stimulation factors (CstF)'. As it is possible that CstF could be a part of a large transcriptional factor complex, CstF may work as clue molecules which might interact with CstF and directly regulate JCV transcription.

## 〔はじめに〕

進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスである 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。JCV はヒト神経系細胞に選択的に感染し、脱髄を生ずる。培養細胞を用いたエントリーアッセイの結果 JCV は種々の細胞にエントリーし、早期に核に達していることが判明し、その本体は糖脂質および糖蛋白質を構成する糖鎖である事が明らかになった<sup>1,2</sup>。

これらの結果から神経親和性を規定する因子は核内に存在することが予想される。核に入ったウイルスが増殖するためには JCV の遺伝子発現調節配列(transcriptional control region: TCR)に作用する核内転写因子が重要であると考えられた。

## 〔目的〕

本研究では JCV の TCR に特異的に結合する蛋白質を単離、同定することを目的として以下の実験を行った。1) TCR 断片をプローブとしたゲルシフトアッセイを行い、DNA 結合蛋白質の有無を検討した。2) 各種カラムクロマトグラフィーで DNA 結合蛋白質を単離することを試みた。

## 〔材料と方法〕

### 1) 細胞株 :

培養細胞株として、核に入った後の JCV 増殖を許容するヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞と JCV 増殖ができない非許容細胞としてヒト子宮頸部類上皮癌由来 HeLa, ヒト肺腺癌由来 A549, ヒト大腸腺癌由来 SW480, ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞を用いた。細胞株は 10% FBS および抗生物質を含んだ DMEM 培地で培養を行った。

### 2) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) :

我々はこれまでに TCR 配列が最小である JCV を JCV 持続感染細胞である JCI 細胞から単離<sup>3</sup>、その配列を決定した(TCRs)。この TCRs (約 290 bp) を互いに重なるように長さ 40 bp の 9 個のユニットに細分し、一本鎖 DNA を合成して、RI 標識した後 annealing を行い二重鎖 DNA probe とした。前述した種々の培養細胞からの核抽出液と JCV DNA との結合を検索するために EMSA を行った。許容細胞である IMR-32 細胞に認められ、非許容細胞 (HeLa, A549, SW480, HepG2 細胞) では認められない分子、即ち IMR-32 細胞の核抽出液に特異的に結合している分子を確認した(図 1)。

最終的に Probe の特異性の確認を以下の方法で行った。IMR-32 細胞の核抽出液を各一本鎖 DNA probe(sense, antisense)と混和し、その際に、RI label を行っていない一本鎖 DNA を competitor として種々の濃度で混和し、反応させて EMSA を行った。得られた Band の強さを LAS image analyzer (Fuji film, Tokyo, Japan)で数値化して比較した。

### 3) UV crosslinking :

EMSA で認められた band の分子量を推定するために、UV crosslinking 法を行った。DNA probe と核抽出物を poly (dI-dC)と混和し、その後 UV lamp (254 nm)のもとで 4°C で 30 分 incubate した。Sample は SDS-PAGE 後、autoradiography で band を確認する。

### 3) 蛋白質の精製 :

種々のカラムを用いた分画法を用いて精製した。

- a) Hitrap Q (volume 5 ml)、溶出条件: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 -1.0 M NaCl, 50 ml linear gradient。
- b) EconoPak CHT-II (hydroxyapatite, volume 1ml)、溶出条件: 50-400 mM Kpi (pH 7.2), 10 ml linear gradient。
- c) Mono S PC 1.6/5、溶出条件: 20 mM MES-NaOH (pH 6.0), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1-0.5M NaCl, 1 ml linear gradient。
- d) Superose 6 PC3.2/30、溶出条件: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1mM DTT, 0.15 M NaCl, 0.04

ml/min, 0.05 ml/fraction で分画。この際に standard protein の分子量と比較して転写結合因子複合体の分子量を推定した。

e) 最終的に精製した蛋白を SDS-PAGE で泳動して、Coomassie Brilliant Blue (CBB)で gel を染色して目的の位置の band を切り出しトリプシンを用いたゲル内消化を行い得られたペプチド断片の配列を protein sequensor によって決定した。

f) 得られたアミノ酸配列をもとに Blast を用いた database 検索を行い精製した蛋白質の同定を行った。

#### (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]

感染許容細胞の核分画から JCV TCR に結合する蛋白質を単離した。

1) 9 個の fragment に分けた JCV TCRs に結合する蛋白を精製・単離した(図 1)。単離した蛋白は分子量 75 kDa の DNA 結合サブユニットと 45 kDa のサブユニットからなるものと考えられた。アミノ酸配列分析の結果、この蛋白は RNA の生成過程で poly (A) signal の 3'側に結合し、RNA loop を形成し、poly (A) site の 3'側で RNA を切断する cleavage stimulating factor (CstF) <sup>4</sup>の 77kDa、50kDa のサブユニットからなる蛋白質であることが判明した(図 2)。

2) CstF は JCV TCRs において塩基配列特異的に、また sense 鎖により強く結合する事が判明した。

#### [考 察]

今回、我々は感染許容細胞の核分画から JCV TCR に結合する蛋白質として CstF を同定した。CstF は m-RNA の poly (A)付加に関与する蛋白質であり、転写活性や転写活性化因子としての機能は持っていない<sup>5</sup>。ゲルろ過で求められた CstF を含む結合蛋白質複合体の未変性条件下での分子量が 670kDa と、p75、p45 のアミノ酸組成から予想される分子量よりもはるかに大きかったことから、結合蛋白質複合体には何らかの蛋白質が結合していることが予想される。これらのことから、我々は以下に示す仮説をたてた。すなわち、p75 に何らかの転写、もしくは DNA 複製活性化因子、Factor X が結合する。p75 が JC ウイルスの転写調節領域の#3 領域に結合することによって、この Factor X がその下流の JC ウイルス遺伝子の転写、複製を活性化する、というものである(図3)。以前から JCV に関する転写調節因子に関しては種々の報告が有るが、神経特異性を決定している因子は未だ明らかになっていない<sup>7 8 9 10 11 12 13</sup>。現在、この可能性を検討するために、yeast two-hybrid 法や pull-down 法を用いて p75 結合蛋白質の検索を行っており、それらの結合蛋白質が JC ウイルス遺伝子の増殖、発現にどのような影響を与えているのかを検討する予定である。

#### [結 論]

感染許容細胞特異的に JCV TCR に結合する蛋白質として CstF を含む蛋白質複合体を同定した。

#### [参考文献]

- 1) Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Atwood WJ and Nagashima K: Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J Virol*, 76: 12992-3000., 2002.
- 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: 100-12., 2001.
- 3) Nukuzuma S, Yogo Y, Guo J, Nukuzuma C, Itoh S, Shinohara T and Nagashima K: Establishment and

- characterization of a carrier cell culture producing high titres of polyoma JC virus. *J Med Virol*, 47: 370-7., 1995.
- 4) Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J: *Molecular Cell Biology*. New York, W.H. Freeman and Company, 1999, pp 404-426.
  - 5) Kleiman FE and Manley JL: Functional interaction of BRCA1-associated BARD1 with polyadenylation factor CstF-50. *Science*, 285: 1576-9., 1999.
  - 6) Wallace AM, Dass B, Ravnik SE, Tonk V, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG and MacDonald CC: Two distinct forms of the 64,000 Mr protein of the cleavage stimulation factor are expressed in mouse male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 6763-8., 1999.
  - 7) Amemiya K, Traub R, Durham L and Major EO: Interaction of a nuclear factor-1-like protein with the regulatory region of the human polyomavirus JC virus. *J Biol Chem*, 264: 7025-32., 1989.
  - 8) Wegner M, Drolet DW and Rosenfeld MG: Regulation of JC virus by the POU-domain transcription factor Tst-1: implications for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 4743-7., 1993.
  - 9) Chen NN, Chang CF, Gallia GL, Kerr DA, Johnson EM, Krachmarov CP, Barr SM, Frisque RJ, Bollag B and Khalili K: Cooperative action of cellular proteins YB-1 and Pur alpha with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their interaction with the viral lytic control element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 1087-91., 1995.
  - 10) Devireddy LR, Kumar KU, Pater MM and Pater A: BAG-1, a novel Bcl-2-interacting protein, activates expression of human JC virus. *J Gen Virol*, 81: 351-7., 2000.
  - 11) Monaco MC, Sabath BF, Durham LC and Major EO: JC virus multiplication in human hematopoietic progenitor cells requires the NF-1 class D transcription factor. *J Virol*, 75: 9687-95., 2001.
  - 12) Chen NN, Kerr D, Chang CF, Honjo T and Khalili K: Evidence for regulation of transcription and replication of the human neurotropic virus JCV genome by the human S(mu)bp-2 protein in glial cells. *Gene*, 185: 55-62., 1997.
  - 13) Shinohara T, Nagashima K and Major EO: Propagation of the human polyomavirus, JCV, in human neuroblastoma cell lines. *Virology*, 228: 269-77., 1997.

#### 〔研究発表〕

##### 1. 論文発表

- 1) Shintaku M, Matsumoto R, Sawa H, 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: 921-9., 2000.
- 2) Okada Y, Sawa H, Tanaka S, Takada A, Suzuki S, Hasegawa H, Umemura T, Fujisawa J, Tanaka Y, Hall WW, 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: 17016-23., 2000
- 3) Okada Y, Endo S, Takahashi H, Sawa H, Umemura T, Nagashima K: Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirology*, 7: 302-6., 2001.
- 4) Suzuki S, Sawa H, Komagome R, Orba Y, Yamada M, Okada Y, Ishida Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K: Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology*, 286: 100-12., 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: 129-37., 2001.
- 6) Safak M, Barrucco R, Darbinyan A, Okada Y, Nagashima K, 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: 1476-86., 2001.
- 7) Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Atwood WJ, Nagashima K: Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J Virol*. 76: 12992-3000., 2002.
  - 8) Okada Y, Sawa H, Endo S, Orba Y, Umemura T, Nishihara H, Stan AC, Tanaka S, Takahashi H and Nagashima K: Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol (Berl)*. 104: 130-6., 2002.
  - 9) Arai Y, Tsutsui Y, Nagashima K, Shinmura Y, Kosugi T, Wakai M, Nishikage H, Yamamoto J: Autopsy case of the cerebellar form of progressive multifocal leukoencephalopathy without immunodeficiency. *Neuropathology*. 22: 48-56., 2002.
  - 10) Orba Y, Sawa H, Nagashima K: [Molecular neuropathology of JC virus]. *No To Shinkei*. 54: 101-9., 2002.
  - 11) 仙葉 眞吾、澤 洋文、長嶋 和郎: JC ウイルスからみたグリアの生物学。神経研究の進歩 46: 557-65, 2002
  - 12) 鈴木 忠樹、澤 洋文、長嶋 和郎: ヒトポリオーマウイルス・JC ウイルスとヒト腫瘍の発生。医学のあゆみ 203: 245-47, 2002
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) Endo S, Okada Y, Semba S, Orba Y, Tanaka S, Sawa H, Nagashima K: Intracellular localization and function of JC virus agnoprotein. 4th International Symposium on Neurovirology, 2002, Düsseldorf, Germany
  - 5) Iwata H, Henmi C, Sato M, Tanaka S, Sawa H, Nagashima K: Application of JC virus (JCV) VP1 as a tool for gene transfer and characterization of neutral antibodies against JCV infection. 4th International Symposium on Neurovirology, 2002, Düsseldorf, Germany
  - 6) 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
  - 7) 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
  - 8) 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
  - 9) 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
  - 10) 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) agnoprotein 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
  - 11) 駒込 理佳、西原 広史、田中 伸哉、澤 洋文、長嶋 和郎: JC virus capsid protein 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



- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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) agnoprotein の核移行の検討。第 24 回 日本分子生物学会、2001 年、横浜
- 15) 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) agnoprotein (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
- 16) 岡田 由紀、澤 洋文、高井 裕之、原田 直樹、門内 由美、渡部 美穂、長嶋 和郎、池田 恭治、本山 昇：Chk2 ノックアウトマウスにおける自然発癌の解析。第 61 回 日本癌学会、2002 年、東京
- 17) 岩田 博司、大場 靖子、澤 洋文、長嶋 和郎：神経系特異的な複製活性を示す JC ウイルス DNA 増幅機構の解明。第 75 回 日本生化学会、2002 年、京都
- 18) 仙葉 眞吾、逸見 千寿香、岡田 由紀、遠藤 秀一、佐藤 真実、澤 洋文、長嶋 和郎：JC ウイルス virion 形成における Agnoprotein の機能の解析。第 75 回 日本生化学会、2002 年、京都
- 19) 仙葉 眞吾、澤 洋文、岡田 由紀、長嶋 和郎：JC ウイルス転写調節領域に結合する神経系細胞特異的蛋白質の同定。第 50 回 日本ウイルス学会、2002 年、札幌
- 20) 岡田 由紀、澤 洋文、大場 靖子、遠藤 秀一、田中 伸哉、長嶋 和郎：JC ウイルス agnoprotein の局在とウイルス粒子の細胞内輸送に関する検討。第 50 回 日本ウイルス学会、2002 年、札幌
- 21) 岡田 由紀、澤 洋文、大場 靖子、遠藤 秀一、田中 伸哉、長嶋 和郎：JC ウイルス agnoprotein の局在とウイルス粒子の細胞内輸送に関する検討。第 6 回 日本神経ウイルス研究会、2002 年、静岡
- 22) 岡田 由紀、澤 洋文、高井 裕之、原田 直樹、門内 有美、渡部 美穂、長嶋 和郎、池田 恭治、本山 昇：Chk2 ノックアウトによるマウスにおける自然発癌の解析。第 61 回 日本癌学会 総会 2002 年、東京
- 23) 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：吸着阻害活性を指標とした JC virus 認識膜タンパクの同定。第 25 回 日本分子生物学会、2002 年、横浜
- 24) 山本 晋、岩田 博司、澤 洋文、長嶋 和郎：定量的 real time RT-PCR 法を用いた JC ウイルス 蛋白 mRNA の発現量の経時的検討。第 38 回 日本ウイルス学会 北海道支部会総会、2002 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

**EMSA with JCV regulatory region**

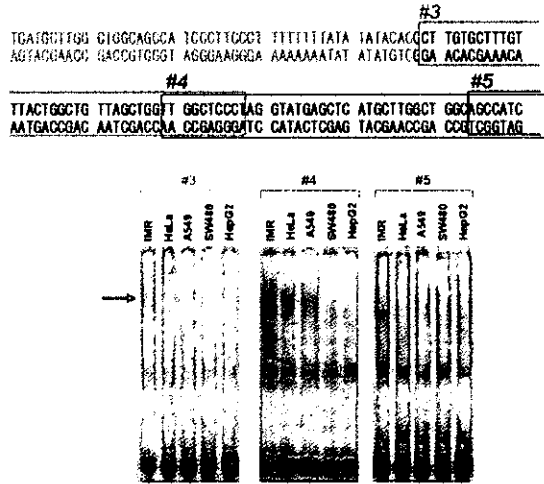


図 1

図 1 : JCV TCR の配列を基にした EMSA の probe の位置と、EMSA の結果。#3 の probe を用いた際に IMR-32 細胞にのみ band が認められている。この band を前述した column を用いて単離した。

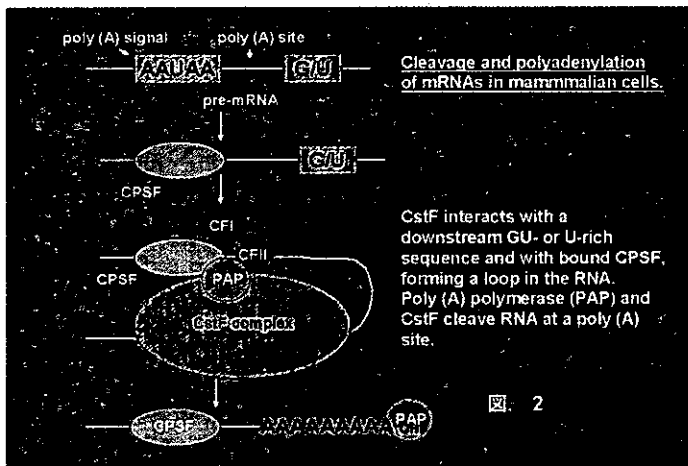


図 2 : CstF の機能を説明した図 (文献 4 から引用、改変)。CstF は RNA の生成過程で poly (A) signal の 3'側に結合し、RNA loop を形成し、poly (A) site の 3'側で RNA を切断する。

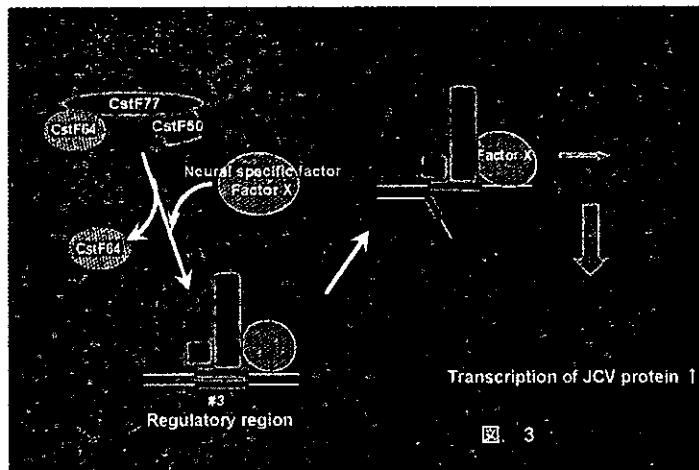


図 3 : p75 が JC ウイルスの転写調節領域の #3 領域に結合することによって、この Factor X がその下流の JC virus 遺伝子の転写、複製を活性

# 研究成果の刊行に関する一覧表

平成 14 年度研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

著 者 名	論 文 題 名	雑 誌 名	巻：頁、 発行西暦年号
Nishida Y, Yamada M, Hara K, Tsunemi T, Yamawaki M, Shimokawa R, Okeda R, Tsutsumi T, Mizusawa H	Creutzfeldt-Jakob disease after Janneta's operation with cadaveric dura mater graft : initial manifestations related to the grafted site	J Neuro	249:480-483, 2002
Shiraishi A, Mizusawa H, Yamada M	Early and persistent sensory-psychiatric symptoms in an inherited prion disease with a PrP P105L mutation	J Neuro	249:1740-1741, 2002
Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, Furukawa H, Takahashi Y, Kataoka Y, Doh-ura K	Returned cognition after quinacrine in patients with Creutzfeldt-Jakob disease	Ann Neurol	52(suppl):S68, 2002
Fujimoto T, Nakamura T, Nishiura Y, Ichinose K, Furuya T, Shirabe S, Eguchi K	Up-regulation of interleukin-12 receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis	J Neurol Sci	196:21-26, 2002
Kambara C, Nakamura T, Furuya T, Nishiura Y, Kawakami A, Ichinose K, Shirabe S, Eguchi K	Increased sialyl Lewisx antigen-positive cells mediated by HTLV-1 infection in peripheral blood CD4+ T lymphocytes in patients with HTLV-1-associated myelopathy	J Neuroimmunol	125:179-184, 2002
Sasaki K, Doh-ura K, Ironside WJ, Iwaki T	Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies	Acta neuropathol	103:199-208, 2002
Koide T, Ohtake H, Nakajima T, Furukawa H, Sakai K, Kamei H, Makifuchi T, Fukuhara N	A patient with dementia with lewy bodies and codon 232 mutation of PRNP	Neurology	59:1619-1621, 2002
Saito Y, Geyer A, Sasaki R, Kuzuhara S, Nanba E, Miyasaka T, Suzuki K & Murayama S	Early onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation	Neurology	58:811-813, 2002
Forno LS, J. Langston W, Herrick MK, Wilson JD, Murayama S	Ubiquitin-positive neuronal and tau 2-positive glial inclusions in frontotemporal dementia of motor neuron type	Acta Neuropath	103:599-606, 2002
Kazama H, Hosoi T, Nakahara K, Murayama S, Saito Y, Kanemaru K, Nagura H, Arai T, Sawabe M, Tobe K, Yamanouchi H, Orimo H	Association between a promoter polymorphism of the paraoxonase PON1 gene and pathologically verified idiopathic Parkinson's disease	Geriatrics and Gerontology International	2:91-96, 2002