

準を作成した。Possible PML は成人発症の数ヶ月で無動性無言状態に至る亜急性進行性脳症、脳 MRI/CT で、白質に脳浮腫を伴わない大小不同、融合性の病変が散在、白質脳症をきたす他疾患を臨床的に除外できるの三項目を満たすものとし、Probable PML は possible PML の項目に更に脳脊髄液から PCR で JC ウイルス DNA が検出されることを必要とし、Definite PML は剖検または生検で脳に特異的病理所見と JC ウイルス感染を証明したものとした。この診断基準をもとに神経内科専門医 3,959 名を対象として、1999 年 1 月から 2003 年 12 月末までに経験したそれぞれの症例数、各症例の基礎疾患、生存期間、治療法などについて郵送によるアンケート調査を行った。

〔倫理面への配慮〕

本報告は個人情報を含まない進行性多巣性白質脳症の疫学調査であり、倫理面での問題はないと判断した。

〔結果〕

神経内科専門医 3,959 名に対し、回答は 1,485 名 (37.5%) から得ることが出来た。まず、① 1999 年から 2003 年における PML 発症状況は、Definite PML 20 例、Probable PML 18 例、Possible PML 14 例の計 52 例であった。基礎疾患としてはヒト免疫不全症ウイルス (HIV) 感染症 21 例 (40%)、先天性免疫不全症 1 例、膠原病/結合織病 7 例、血液系悪性腫瘍 13 例、固形癌 1 例、肝障害 1 例、慢性腎不全 (透析) 2 例、基礎疾患なし/不明 6 例であった (表 2)。② 発症者の男女比は男 : 女 = 1.5 : 1 であり、発症年齢は 25 歳から 80 歳に及び平均年齢は 59 歳で、中高年齢層に多く発病する傾向があった (図 1)。③ 背景基礎疾患を HIV 感染症と非 HIV 感染症に分けて 1999 年から 2003 年度でのそれぞれの発症者数をみると、HIV 感染症患者に合併する PML 患者数が漸増傾向にあった (図 2)。④ 調査患者の内 24 名が死亡しており、その平均生存期間は 5.6 ヶ月 (1 ~ 25 ヶ月) で、HIV 感染者 (8 名) と非 HIV 感染者 (16 名) での平均生存期間はそれぞれ 5.1 ヶ月 (3 ~ 9 ヶ月)、5.8 ヶ月 (1 ~ 25 ヶ月) と、本症の予後は HIV 感染患者、非 HIV 感染患者ともいずれも有意差はなく短期間であった。12 ヶ月以上、更に 24 ヶ月以上と長期生存中の患者は、HIV 感染者では全例高活性抗レトロウイルス療法 (HAART) を受けており、また非 HIV 感染患者では Ara-C、インターフェロン α (INF- α) のほか無治療でも長期生存がみられた (表 3,4)。

〔考察〕

これまでの診断方法は生検ないし剖検での特徴的な病理所見と電顕ないし免疫組織学的な JC ウイルスの証明による組織学的診断に頼っていたために、臨床的疫学的調査報告は皆無であった。しかし本症はこれまで予後不良な疾患といわれ、AIDS の流行蔓延とともに本症をみることは稀ではなくなったために、本症を早期に診断し、対策を講じることは重要である。PML 診断においては、脳 CT 特に脳 MRI などによる造影効果や腫瘍効果のない大脳白質での病巣の検出は本症の可能性を考える上で有益な情報を与え¹⁾ また本症の経過をみる上に有用であり、また髄液で PCR により JC ウイルス DNA が検出された場合本症の診断に 99% と高い特異性^{2,3)} を示すため、臨床所見、画像所見に併せた髄液での JCV DNA の検出はほぼ病理組織学的診断に近いものと判断させる故に、これらを加味して本症診断のための基準をつくることは、疫学的

情報収集だけでなく、早期診断、治療開始に有益である。

今回このこの診断基準のもとで、我が国での臨床的疫学調査を行ったところ、HIV感染を基礎疾患に持つ割合が40%と高いが、AIDSの流行後PML症例の基礎疾患の85%がHIV感染症であるといわれている欧米と異なり、Brooksら⁴⁾が文献的報告のreviewからPMLの基礎疾患としてリンパないし血液系増殖疾患が69%、肉芽腫性疾患7%、腎移植後6%、AIDS4%、免疫抑制の認められない人に約6%が認められたと報告しているAIDS流行早期のごとく非HIV感染免疫不全状態が高い割合を占めていた。しかし我が国もHIV感染者が着実に漸増しており、それを反映して経年的PML基礎疾患の推移をみるとHIV感染者が増加しており(図2)、今後欧米並みにPMLの基礎疾患としてHIV感染症が増加すると考えられる。

今回の調査ではPMLが中高年に多く発病すること、男女での罹患比率は1.5:1とやや男性に多いこと、基礎疾患が全くなく原発性発症と考えられる症例や治療との関連で無治療で長期経過しているnon-progressorと思われる症例の存在、Ara-c、インターフェロン α が有効であった症例、HIV感染患者ではHAART療法が有効な症例が存在すること、しかし多くは発病すると進行性経過をとり約半年で死亡する予後不良の疾患であることなどこれまで報告⁴⁵⁾されたことがあらためて確認された。

〔結論〕

PMLの診断と疫学調査に有用と思われる3段階の診断基準を作成した。この診断基準に基づき過去5年間の疫学的調査を行ったところ、Definite、Probable、Possible併せ計52例が認められた。今後免疫不全症を来す疾患、治療法の増加とともに本症が増加するかも知れず、この診断基準が充分活用されることを期待し、早急に発病メカニズムの解明とJVウイルスを標的とした治療法の開発が必要である。

〔参考文献〕

- 1) Whiteman MHL, Post MJD, Berger JR, et al: Progressive multifocal leukoencephalopathy in 47 HIV-seropositive patients: neuroimaging with clinical and pathologic correlation. *Radiology* 187:233-240, 1993
- 2) Weber T, Frye S, Bodemer M, et al: Clinical implications of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system. *J Neurovirol* 2:175-190, 1996
- 3) Sugimoto C, Ito D, Tanaaka K, et al: Amplification of JC virus regulatory DNA sequences from cerebrospinal fluid: diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 143:249-262, 1998
- 4) Brooks BR, Walker DL: Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol Clin* 2:299-313, 1984
- 5) Manji H, Miller RF: Progressive multifocal leukoencephalopathy: progress in the AIDS era. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69:569-571, 2000

〔研究発表〕

該当なし

疫学調査結果
1999年～2003年におけるPML発症状況

		基礎疾患	
Definite PML	20例	HIV感染症	21例 (40%)
Probable PML	18例	先天性免疫不全症	1
Possible PML	14例	膠原病/結合織病	7
		血液系悪性腫瘍	13
		固形癌	1
		肝障害	1
Total	52例	透析(慢性腎不全)	2
		なし/不明	6

調査回答率: 1,485/3,959=37.5%

表 2.

性別発症数 男 31 女 21
発症平均年齢 59歳 (25～80歳)

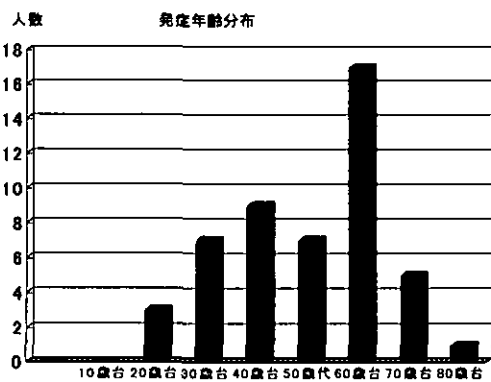


図 1.

年度別発症件数

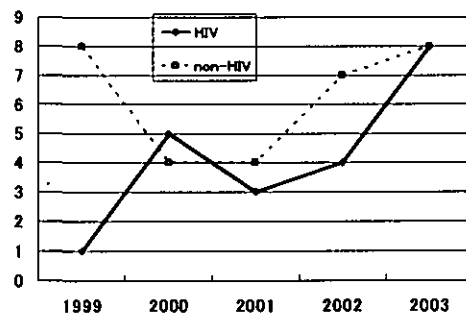


図 2.

疫学調査結果

生存期間	12ヶ月以上生存者の治療状況
死亡 24名 平均5.6ヶ月(1～25ヶ月)	HIV感染者 7名 全例HAART
HIV 8名 5.1ヶ月(3～9ヶ月)	非HIV感染者 9名 Ara-C 1名 INF-α 3名
non-HIV 16名 5.8ヶ月(1～25ヶ月)	なし 5名(基礎疾患なし2名)

表 3.

治療法別予後調査

	症例数	12ヶ月生存者数	24ヶ月経過観察中症例数
HIV HAART(+)	13	7*	4*
(-)	5	0	0
Non-HIV			
無治療	21	5	3
Ara-C	2	1	1
INF-α	3	3	3
IL-2	1	0	0

* cidofovir(+) 1例

表 4.

表 1 進行性多巣性白質脳症の診断基準

Definite PML：下記基準項目の 5 を満たす

Probable PML：下記基準項目の 1, 2, 3 及び 4 を満たす

Possible PML：下記基準項目の 1, 2 及び 3 を満たす

- 1.成人発症の数ヶ月で無動性無言状態に至る亜急性進行性の脳症(1)
- 2.脳 MRI/CT で、白質に脳浮腫を伴わない大小不同、融合性の病変が散在(2)
- 3.白質脳症を来す他疾患を臨床的に除外できる(3)
- 4.脳脊髄液から PCR で JC ウイルス DNA が検出(4)
- 5.剖検または生検で脳に特徴的病理所見(5)と JC ウイルス感染(6)を証明

注

(1)免疫不全（エイズ、抗癌剤・免疫抑制剤投与など）の患者に好発し、エイズでは小児期発症もある。発熱・髄液細胞増加などの炎症反応は欠き、記憶力障害、同名半盲、失語、片麻痺など多彩な神経症候を呈することが特徴である。

(2)病巣の検出には MRI・T2 強調画像がもっとも有用であり、高信号域として描出される。病巣は脳皮質下白質に好発し、皮髄境界まで病変が及ぶと特徴的な帆立貝様の形状を呈する。造影剤増強効果は陰性を原則とするが、病巣辺縁に弱く認めることもある。MRI 拡散強調画像は早期の病変を検出しえるので診断に有用である

(3)白質脳症としては副腎白質ジストロフィーなどの代謝疾患や HIV 脳症、CMV 脳炎などがある。しかし、エイズなど PML がよく見られる病態にはしばしば HIV 脳症や CMV 感染などが合併する。

(4)病初期には陰性のことがある。経過とともに陽性率が高くなるので、PML の疑いが強ければ再検査する。

(5)脱髄巣、ヘマトキシリンに濃染する腫大した核を有する細胞の存在、アストロサイトの反応、マクロファージ・ミクログリアの出現。

(6)JC ウイルス蛋白または m RNA の証明、多量のウイルス核酸の証明、電顕によるウイルス粒子の同定、など。

進行性多巣性白質脳症における JC ウイルス塩基配列の安定性

研究協力者：余郷 嘉明（東京大学・泌尿器科）
：鄭 懷穎（東京大学・泌尿器科）
：北村 唯一（東京大学・泌尿器科）
：保田 由喜治（東海大学・小児科）
：加藤 俊一（東海大学・小児科）

【研究要旨】

健康人や免疫正常な患者の腎、尿、リンパ組織などから検出される JC ウイルス (JCV) DNA は、原型調節領域 (archetypal regulatory region) と命名された一定の調節領域を持つ。一方、進行性多巣性白質脳症 (PML) 患者の脳病変部から検出される JCV DNA は、多様に変化した調節領域 (PML 型調節領域) を持つ。PML 型調節領域は患者の体内で、原型調節領域から塩基配列の再編成 (欠失と重複または欠失のみ) によって作られると考えられている。本研究は、ウイルス蛋白におけるアミノ酸置換が原型から PML 型への変化に関与しているかどうかを調べることを目的とする。そのため、PML の剖検症例において、脳組織 (小脳、後頭葉、脳幹) から多数の全長 JCV DNA クローンを樹立し、得られたクローンの調節領域と蛋白コード領域の塩基配列を解析した。5 個の再編成調節領域が検出されたが、それらは共通する構造上の特徴から 3 グループに分けられた。一方、ウイルス蛋白のコード領域での変化 (塩基置換、再編成) は、調節領域の構造が異なるクローンの間でも、異なる脳領域に由来するクローンの間でも認められなかった。以上から、JCV DNA の蛋白コード領域における塩基置換 (その結果としてのアミノ酸置換) は原型から PML 型への JCV の変化にも、中枢神経系で病巣の拡大にも関与していないと結論された。

Stability of JC virus DNA sequences in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy

Yoshiaki YOGO, Huai-Ying ZHENG, Tadaichi KITAMURA, Yukiharu YASUDA, Shunichi KATO

Department of Urology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo; Department of Pediatrics, Tokai University
School of Medicine

ABSTRACT

JC virus (JCV) DNAs isolated from the urine, kidney and lymphoid organs of healthy and immunocompetent individuals carry the same regulatory region named archetype, while those from the brain of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) carry various regulatory regions named PML-type. It is generally accepted that various PML-type regulatory regions were produced from the archetype, during persistence in the patients, by

sequence rearrangements involving amplification and deletion or deletion alone. The present study was performed to elucidate whether amino acid substitution in the viral proteins was involved in the generation and propagation of JCV variants with rearranged control regions. Many complete JCV DNA clones were established from brain tissues (cerebellum, occipital lobe, and brainstem) autopsied in a PML case where multiple distinct control sequences were detected. Control and coding sequences were determined and compared among the JCV DNA clones. Twenty-eight control-region and twenty coding sequences of JCV were compared. Five rearranged control sequences were detected, but they could be classified into three groups that shared common structural features. Viral coding sequences were identical among clones with different control regions and among clones derived from different brain regions. In the present case, nucleotide substitution in the viral coding regions (and resultant amino acid change in the viral proteins) was involved neither in the genesis of rearranged JCV variants nor in the expansion of demyelinated lesions in the brain.

【はじめに】

進行性多巣性白質脳症（PML）は中枢神経系での脱髄疾患であり、免疫が低下する疾患を有する患者や免疫抑制剤が投与される患者で主に起きる。PML の病因ウイルスである JC ウイルス（JCV）はヒト集団で蔓延している。大部分のヒトは子供の時 JCV に無症候性感染する。感染した JCV は多分ウイルス血症により腎臓へ運ばれ、そこに生涯寄生する。健常人や非 PML 患者の尿や腎から検出される JCV DNA は原型調節領域（archetypal regulatory region）と命名された一定の調節領域を持つ（最近、扁桃から検出される JCV DNA も原型調節領域を持つことが明らかになった）。一方、PML 患者の脳病変部から検出される JCV DNA は多様に変化した調節領域（PML 型調節領域）を持つ。原型調節領域と PML 型調節領域との関係を表すために、余郷と杉本は以下の 5 項目からなる archetype concept を提唱した。(1) 原型調節領域を持つ JCV はヒト集団で循環しているウイルスである。(2) 原型調節領域の構造は一定であるが、PML 型調節領域は極めて多様である。(3) それぞれの PML 型調節領域は原型調節領域から塩基配列の再編成（欠失と重複または欠失のみ）によって作られる。(4) 原型から PML 型への調節領域の変化は患者の体内で起きる。(5) PML 型へ変化した JCV はヒト集団へ戻らない。archetype concept は、ウイルス蛋白におけるアミノ酸置換が原型から PML 型への変化に関与していないことを仮定している。本研究はこの仮定を検証することを目的とする。そのため、剖検脳組織から複数の PML 型調節領域が検出された PML 症例において、多数の全長 JCV DNA クローンに樹立し、得られたクローンの調節領域と蛋白コード領域の塩基配列を解析した。

【材料と方法】

詳しい症例報告は既に発表されているので、ここでは簡単に記す。患者は 14 歳の男児。生後 2 ヶ月で Wiskott-Aldrich 症候群と診断された。平成 10 年 4 月同種骨髄移植を受けた。同年 11 月左半身の麻痺、意識障害など神経症状が出現した。MRI の T2 強調画像により、右後頭葉、小脳、橋に高信号域を認めた。nested PCR により髄液から JCV DNA が検出された。種々の治療が試みられたものの、治療効果は得られず、平成 10 年 12 月末に死亡した。剖検が行われ、脳組織（小脳、大脳後頭葉、脳幹）が採取された。脳の各領域から抽出した DNA から全長 JCV DNA を既報の方法によりクローニングした。得られたクローン多数を蛍光式 DNA シークエンサーを用いてシークエンシングした。調節領域と蛋白コード領域の塩基配列をクローン間で比較した。

（倫理面への配慮）

本研究では、既に報告された症例につき、ウイルス DNA の塩基配列のみを解析したので、倫理的には問題はないと考えられた。

【結果】

1. 調節領域の構造

後頭葉、小脳、脳幹からそれぞれ14、7、8（計29）の全長 JCV DNA クローンを樹立した。最初にこれらのクローンの調節領域の塩基配列を決定した。その結果、I～V と命名された5個の調節領域が検出された。これらの調節領域の模式図を図1に示した。

5個の調節領域の構造的な特徴は以下の通りである。(1) 調節領域 I は欠失のみを有したが、他 (II～V) は欠失と重複を有した。(2) 調節領域 II と III は二つの共通の欠失 (nt 37～60 と nt 201～247) を持っていた。しかし、調節領域 II と III はユニークな重複も有し、また、調節領域 III はユニークな欠失を有していた。これらの構造的な特徴は、調節領域 II と III が同じ中間体から別の経路で作られたことを示唆している。(3) 調節領域 IV と V は同じ欠失 (nt 63～85) と同じ断点 (nt 41 と 110) を持っていた。一方、これらの調節領域はユニークな欠失や重複も持っていた。調節領域 IV と V は共通の中間体から作られたと思われる。以上から、本 PML 症例において、JCV 調節領域の再編成が独立に3回起きたと結論された。

我々は以前、本症例において PCR により検出された様々な JCV 調節領域が脳における独特な分布を示すことを報告した。このことは、多くの全長 JCV DNA に含まれる調節領域を解析した本研究においても確認された (表1)。すなわち、調節領域 I は脳全体から検出された。調節領域 II と III は主に小脳から検出された。調節領域 IV は脳幹でのみ検出された。

2. 蛋白コード領域の塩基配列

全長 JCV DNA クローンを脳の領域と調節領域の構造によりいくつかのグループに分けた (表1)。含まれるクローンの数が少ないグループでは全クローンを、多くのクローンが含まれるグループでは代表クローンをシーケンシングした (表1)。その結果、蛋白コード領域の塩基配列はほとんどすべてのクローンで全く同じであった (この塩基配列を SEQ-1 と名付けた)。しかし、脳幹で得られた3クローン (調節領域 IV を持つ) の配列 (SEQ-2) は SEQ-1 と1塩基のみ異なった。SEQ-1 と SEQ-2 との間の塩基置換はキャプシド蛋白 VP2 遺伝子内にあり、アミノ酸置換 (アラニン/バリン) を伴った。以上の結果から、調節領域が異なっても、蛋白コード領域の塩基配列は同じであること、同じ調節領域を有するクローンが複数の脳の領域にまたがって分布していることが明らかになった。

【考察】

PML 型 JCV は原型 JCV から調節領域における塩基配列の再編成によって作られるという archetype concept は、PML 型 JCV が作られる際にウイルス蛋白におけるアミノ酸置換は関与していないことを仮定している。この仮定を検討するために、ある PML 症例を解析した。この症例では調節領域における再編成が複数回起きたことが既にわかっていた。小脳、後頭葉、脳幹から多数の全長 JCV DNA クローンを樹立し、得られたクローンの間で、調節領域と蛋白コード領域の塩基配列を比較した。ウイルス蛋白のコード領域での変化 (塩基置換、再編成) は、調節領域の構造が異なるクローンの間でも、異なる脳領域に由来するクローンの間でもほとんど認められなかった。以上から、JCV の蛋白コード領域における塩基置換 (その結果としてのアミノ酸置換) は原型から PML 型への JCV の変化にも、中枢神経系で病巣の拡大にも関与していないと結論された。

腎に持続感染し、尿へと排出される原型 JCV はヒト集団で循環しているウイルスである。最近鄭らは、原型 JCV の蛋白コード領域の安定性について検討した。簡単にこの研究を紹介すると、5 家族において親と子（計 11 名）の尿から一人あたり 5～9 個の全長 JCV DNA クローンを樹立し、塩基配列を決定した。その結果、6 名の人で得れたクローンには塩基置換が全く検出されなかったが、5 名で得れたクローンには 1～3 個の塩基置換が認められた。PML 型 JCV の蛋白コード領域での塩基置換率を原型 JCV のそれと正確に比較するためには、今後、本研究で行われた解析と同様な解析を他の PML 症例で行う必要がある。しかし、本症例の解析結果から、PML 型 JCV において、調節領域は華々しく変化するが、蛋白コード領域は頻繁には変異しないと考えられた。

[結論]

本症例の解析結果により、JCV DNA の蛋白コード領域における塩基置換（その結果としてのアミノ酸置換）は原型から PML 型への JCV の変化にも、中枢神経系で病巣の拡大にも関与していないと結論された。

[参考文献]

- 1) Yogo Y, Kitamura T, Sugimoto C, Ueki T, Aso Y, Hara K, Taguchi F: Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol* 64:3139-3143, 1990.
- 2) Ault GS, Stoner GL. Two major types of JC virus defined in progressive multifocal leukoencephalopathy brain by early and late coding region DNA sequences. *J Gen Virol* 73:2669-2678, 1992.
- 3) Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Singer EJ, Stoner GL. JC virus regulatory region rearrangements and genotypes in progressive multifocal leukoencephalopathy: two independent aspects of virus variation. *J Gen Virol* 78:659-664, 1997.
- 4) Yogo Y, Sugimoto C: The archetype concept and regulatory region rearrangement. in: K. Khalili, G.L. Stoner (Eds.) *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*, John Wiley & Sons, New York, pp. 127-148, 2001.
- 5) Yogo Y, Matsushima-Ohno T, Hayashi T, Sugimoto C, Sakurai M, Kanazawa I. JC virus regulatory region rearrangements in the brain of a long surviving patient with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:397-400, 2001.
- 6) 余郷嘉明, 杉本智恵. PML の PCR 診断. 神経感染症の進歩とその周辺. 神経研究の進歩 43:128-137, 1999.
- 7) 余郷嘉明, 杉本智恵. JC ウイルスの遺伝的変化と潜伏感染: 進行性多巣性白質脳症との関連. *Annual Review 神経* 2001, 中外医学社. pp135-144, 2001.

[研究発表]

1. 論文発表

- 1) Yasuda Y, Yabe H, Inoue H, Shimizu T, Yabe M, Yogo Y, Kato S. Comparison of PCR-amplified JC virus control region sequences from multiple brain regions in PML. *Neurol* 61:1617-1619, 2003.
- 2) Zheng HY, Kitamura T, Takasaka T, Chen Q, Yogo Y. Unambiguous identification of JC virus strains transmitted from parents to children. *Arch Virol* 149:261-273, 2004.
- 3) Zheng HY, Yasuda Y, Kato S, Kitamura T, Yogo Y. Stability of JC virus-coding sequences in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy where the viral control region was rearranged markedly. *Arch Pathol Lab Med*, in press.

- 4) Ikegaya H, Iwase H, Yogo Y. Detection of identical JC virus sequences in both human kidneys. Arch Virol, in press.
- 5) Yogo Y, Sugimoto C, Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Kitamura T. JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. Rev Med Virol, in press.
- 6) Kato A, Kitamura T, Takasaka T, Zheng HY, Tominaga T, Yogo Y. Detection of archetypal JC virus DNAs in tonsillar tissue from patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. in preparation.

2. 学会発表

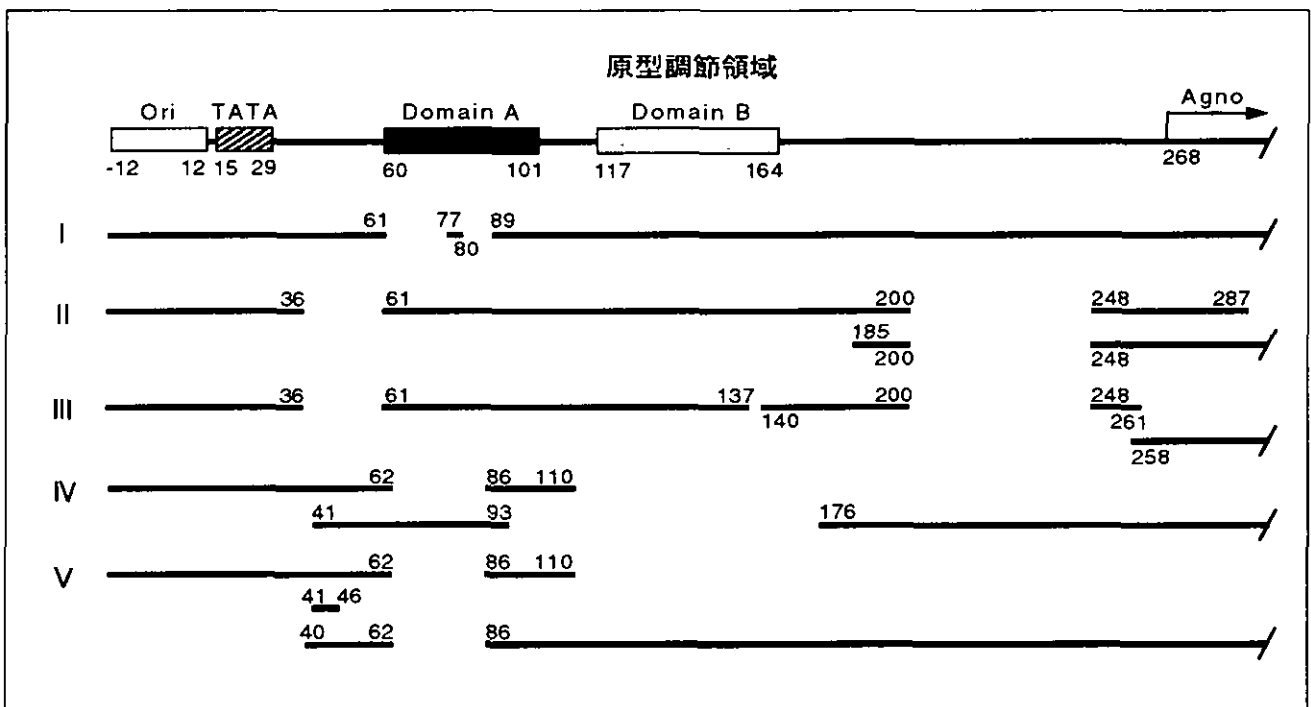
- 1) 高坂友和、北村唯一、鄭懷穎、余郷嘉明. 日本に分布する BK ウイルスの型分類と系統解析. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、2003、京都.
- 2) 鄭懷穎、趙鵬雲、高坂友和、杉本智恵、北村唯一、余郷嘉明. JC ウイルスによる東北アジアヒト集団史の解明. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、2003、京都.
- 3) 余郷嘉明、鄭懷穎、杉本智恵、北村唯一. アイヌから検出された JCV DNA の系統解析：アイヌの起源の解明を目指して. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、2003、京都.
- 4) 池谷博、鄭懷穎、高坂友和、杉本智恵、北村唯一、余郷嘉明. JC ウイルスによるサーミ人とフィンランド人の集団史の比較解析. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、2003、京都.

表 1. 得られた全長 JCV DNA クローンの数*

脳領域	得られたクローン数	各調節領域を持つクローン数				
		I	II	III	IV	V
後頭葉	14 (6)	12 (4)	1 (1)	0	0 (0)	1 (1)
小脳	7 (7)	2 (2)	3 (3)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
脳幹	8 (7)	5 (4)	0 (0)	0 (0)	3 (3)	0 (0)

*脳領域別、調節領域別に示した。蛋白コード領域を解析しクローンの数は括弧内に示した。

図 1. 検出された JCV 調節領域の構造



最上部に原型調節領域を示す。Ori は複製開始点、TATA は TATA 配列、Agno は agnogene を表す。Domain A は多くの PML 型調節領域で重複し、Domain B は欠失している。原型調節領域の下に、脳組織から検出された調節領域を模式的に示す。図の表し方：原型調節領域と同じ配列なら、左から右へ線を引き、重複に遭遇したら、一段下の、重複が開始する位置へ戻り、再び右へ線を引き、欠失に出会ったら、空白にする。番号は原型調節領域のヌクレオチド番号を示す。

JC virus 粒子の核内移行機構の解析

班 員：長嶋 和郎 (北海道大学・医・分子細胞病理)
研究協力者：屈 秋民 (北海道大学・医・分子細胞病理)
：鈴木 忠樹 (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(PML)は、JC virus (JCV) により引き起こされる脱髄疾患である。我々はこれまで JCV の組織特異性は細胞膜から細胞質に至るまでの経路に規定されない事を明らかにしてきた。本研究では JCV の核内移行において感染許容細胞、非感染許容細胞で差が有るかどうかを調べるために JCV 粒子の核内移行の機構を人工ウイルス粒子 (virus like particle: VLP) を用いて検索した。また JCV の主要外殻蛋白である VP1 には、核移行シグナル(NLS)が存在する。この NLS とウイルス粒子の核移行との関係を調べることを目的として本実験を行なった。wtVLP 及び NLS に変異を入れた Δ NLSVLP を蛍光標識し、細胞に接種後、共焦点レーザー顕微鏡にてそれらの局在を観察した。さらに NLS を有する分子の核内移行を担う importin α 、importin β の関係、さらに核膜孔複合体(NPC)との関係について検索するために *in vitro* transport assay を行なった。その結果 wtVLP は細胞膜に吸着した後、1 時間で核内に移行した。一方 Δ NLSVLP は細胞質には侵入したが、3 時間後にも核内に移行する粒子は極僅かであった。またプラスミド DNA を内部に package した VLP を用いた実験でも同様に wtVLP の核移行は確認された。これらの現象は感染許容細胞と非感染許容細胞とで差が無かった。wtVLP は importin α と importin β の共存存在下で核内に移行し、また importin α および importin β の両方と結合した。importin を介した核内移行は、感染許容細胞でも非感染許容細胞でも同様に観察され、また NPC を介する核移行を阻害する WGA、および抗 NPC 抗体により抑制された。 Δ NLSVLP は wt と同じ条件では核内には移行しなかった。また Δ NLS VLP は importin α または importin β との結合は認められなかった。これらの結果より JCV-VLP は細胞に吸着・侵入した後 NLS を介して importin α および importin β と結合し NPC を通過して核内に移行すること、この機構には感染許容細胞、非感染許容細胞間で差は認められないことが判明した。

Analysis of nuclear entry mechanism of the JC virus using virus-like particle (VLP)

Kazuo NAGASHIMA, Quimin QU, Tadaki SUZUKI, Hirofumi SAWA

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

ABSTRACT

JC virus (JCV) is a causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy. JCV's major capsid protein VP1 possesses a nuclear localization signal (NLS) and has the ability to construct a virus-like particle (VLP). We have investigated the mechanism of nuclear entry of JCV using VLP, and clarified the role of NLS. FITC labeled wild-type VLP (wtVLP) and NLS-mutated VLP (Δ NLSVLP) were inoculated into SVG cells and HeLa cells, and were examined with a laser-scanning confocal microscope. *In vitro* transport assay was performed by digitonin treatment. We demonstrated that wtVLP, but not Δ NLSVLP, entered the nuclei of HeLa and SVG cells. The nuclear transport of wtVLP in digitonin-permeabilized cells was dependent on the

addition of importins α and β and was prevented by wheat germ agglutinin or by antibodies to nuclear pore complex (NPC). wt VLP but not Δ NLSVLP directly bound to importins α and β . These results suggested that JCV VLP binds to cellular importins via the NLS of VP1 and is transported into the nucleus through the nuclear pore complex.

〔はじめに〕

進行性多巣性白質脳症(Progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) は致死性中枢神経系脱髄疾患であり、human polyomavirus である JC virus (JCV) はその原因ウイルスである(1)。近年免疫抑制療法の普及や acquired immune deficiency syndrome (AIDS) の流行に伴って PML が益々問題になって来ている(2)。

JCV は polyomavirus family に属する二重鎖環状 DNA ウイルスである。その構造は直径 42 から 45nm の 72 個の五量体のカプソマーから成る。JCV ゲノムは 5,130 塩基から成り、三つの領域に分けられる(3)。調節領域は早期と後期蛋白転写領域の間にあり、複製の開始起点及び転写調節領域を含む。早期蛋白転写領域は 1 種類の mRNA から large T 抗原と small t 抗原等が翻訳されるが、後期蛋白転写領域からは VP1、VP2、VP3 のほかに agnoprotein も翻訳される。VP1 は JCV の主な外殻蛋白であり、ウイルス粒子の表面を覆っている。大腸菌や昆虫細胞でウイルス蛋白を発現させた場合、JCV VP1 は単独で virus-like-particle (VLP)を形成し、JCV と同様の機能も持っていることから JCV 研究によく用いられてきている。

JCV 感染はウイルスが細胞表面の sialic acid を有する receptor との結合することから始まり、clathrin 依存性に細胞内に侵入し(4,5)、microtubules や microfilaments あるいは intermediate filaments 等を利用して細胞核に輸送される(6)。JCV は核内において mRNA の転写や DNA 複製を行いウイルス粒子の増殖を行っており、ウイルス粒子の核内移行は JCV の感染に対して不可欠である。しかし、JCV の核内移行のメカニズムは未だ不明である。また、核膜孔複合体(nuclear pore complexes, NPC)の最大サイズを超えた JCV は粒子状態で核内に移行しうるのか、あるいは細胞質内で粒子構造から VP1 の polymer の形となり、VP1 と JCV の DNA ゲノムが核内に輸送されるのかは未だ判明していない。

今迄の研究で、蛋白質の核内移行は細胞質の importin と NPC によって制御されることが分かっている(7)。核局在シグナル(nuclear localization signal, NLS)を有する蛋白質は細胞質中の importin α が NLS を認識し、更に importin β と結合して protein/ importin α /importin β 三者複合体を形成し、核膜に存在する NPC と複合体との相互作用によって核内に輸送される(8)。

JCV の核内移行が importin と NPC に関係するどうかは未だ報告がない。JCV は増殖が極めて遅い slow virus であり、その調整が難しく、粒子の標識や変異ウイルスの作製等は困難であるが、主な外殻蛋白である VP1 は大腸菌を用いて精製する事により、前述したように粒子構造を有する VLP を作製できる。そして、この VLP は JCV と同様に receptor 結合能や細胞侵入能を持つことが明らかになってきたことから(5, 9)、本研究では JCV-VLP を用いて JCV 粒子の核内移行のメカニズムを解析した。

〔目的〕

我々は JCV の細胞膜から細胞質に至るまでの感染経路において感染許容細胞、非感染許容細胞でその移送に差は無い事を明らかにしてきた。或る腫瘍のウイルスでは核移行に関与する分子によりウイルス親和性が規定されることが報告されている。そこで JCV の核内移行は感染許容細胞、非感染許容細胞で差が有るかどうかを調べるために JCV 粒子の核内移行の機構および VP1 の有する NLS と importin の関係を調べることを目的として本実験を行なった。

〔材料と方法〕

1. 細胞培養

JCV 感染非許容細胞であるヒト子宮頸癌細胞 HeLa (JCRB 9004) はヒューマンサイエンス研究資源バ

ンク(HSRRB, Japan) から購入した。感染許容細胞であるヒト胎児グリア細胞由来 SVG 細胞は Dr. Atwood から寄与された(4)。全ての細胞は 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) と 2 mM L-Glutamine と抗生物質(penicillin, streptomycin, Sigma) を含有する Dulbecco's minimal essential medium (DMEM)にて 5% CO₂ 存在下で 37°C にて培養した。

2. Plasmid の作製

pBR-Mad1 (10)から得た wild type VP1 (wtVP1) 遺伝子は原核発現 vector pET-15b (Novagen, Madison, WI) に subclone した。wtVP1 の N 末端の 12 個のアミノ酸は従来核局在シグナル(NLS) とされている部位である(11)。NLS の mutant VP1 (Δ NLS VP1)を作製するために *in vitro* mutagenesis 法を用いて wtVP1 の N 末端の三つのアミノ酸 KKK を AGA に換えた。 Δ NLS VP1 は wtVLP と同様に pET-15b vector に subcloning した。

3. JC VP1-VLP の作製

wtVLP と Δ NLS VLP は既に報告されている方法で作製した(9)。wtVP1 と Δ NLS VP1 plasmids は各々 competent 細胞 BL21(DE3)/pLys (Stratagene, La Jolla, CA) に transform した。VP1 の発現は 30°C で 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) によって 4 時間誘導した。4,000 \times g、10 分間遠心し沈殿した大腸菌を reassociation buffer (1 \times TBS、20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、1 mM CaCl₂) に懸濁し、終濃度 1 mg/ml の lysozyme を添加し、氷上に 30 分間放置した。終濃度 2 mg/ml になるように sodium deoxycholate を添加し、更に氷上に 10 分間放置した。サンプルは 15 秒 5 回の超音波で処理した後順次に DNase I と PMSF と aprotinin を添加して 20% sucrose 存在下で 100,000 \times g、2 時間超遠心した。沈殿を 4 ml の reassociation buffer に懸濁してから、更に CsCl を用いて 100,000 \times g、15°C で 16 時間超遠心した。上清を上から 500 μ l ずつ回収して赤血球凝集能 (hemagglutination, HA) を測定し、一番高い HA を持つ fraction を集め、reassociation buffer 1,000 ml で 24 時間透析した。VLP に fluorescein isothiocyanate (FITC)を標識するために 2 mg の VLP を 1 M 重炭酸 buffer (pH 9.0) に溶かし、200 μ g の FITC (Sigma) と混ぜて遮光で室温 2 時間 incubate した。100,000 \times g、4 °C で 1 時間超遠心し、未結合の FITC を除去し沈殿を phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁して 12,000 \times g、4°C で一晩遠心した後に pellet を 200 μ l の PBS に再懸濁した。作成した VLP は HA 価を測定後電子顕微鏡にて形態を観察した(図 1)。

4. FITC label した VLP の中への Cy3 の Packaging

VLP が粒子状態で核内に移行することを確認するために、Cy3 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) を VLP の中に packaging した。先ず Cy3 を 50 mM の mono ethanolamine と氷で一晩 incubate して、Cy3 の NHS-group が持っている蛋白質 NH₂ との結合活性を quench した。次いで propidium iodide (PI)を JCV-VLP に packaging する方法(12)を参照して Cy3 を FITC label した VLP に packaging した。FITC label した 0.5 mg VLP を 1 ml の dissociation buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、10 mM EGTA、5 mM DTT)と室温で 1 時間 incubate して部分解離させた。次いで 100 μ g の Cy3 (10 μ l の 50 mM ethanolamine-HCl [pH 8.0])に溶解) と混ぜて、1,000 ml の reassociation buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、1 mM CaCl₂) を用いて遮光で 4°C で一晩透析した。透析した FITC-VLP を 6 mM の MgCl₂ と 10 U の DNase I (Amersham Pharmacia) と 37°C 1 時間 incubate した。濃縮するために Cy3 を packaging した VLP (FITC-Cy3-VLP)を 100,000 \times g、4 °C で 2 時間超遠心して最後に沈殿を 200 μ l の PBS に懸濁し HA を測定した後電子顕微鏡で粒子状態の確認を行った。

5. Laser Scanning 共焦点顕微鏡観察

HeLa および SVG 細胞は 2 \times 10⁴ 個/dish に希釈し、35-mm glass dishes (Iwaki, Chiba, Japan) で 37°C 24 時間培養した。FITC-VLP は 2.56 HA/細胞で、FITC-Cy3-VLP は 0.256 HA/細胞で接種した。細胞は 4°C で 1 時間 incubate してから PBS で 3 回洗い、続いて DMEM で 37°C 培養した。接種後 laser scanning 共焦点顕微鏡(Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。VLP の核内に侵入した割合を調べるために接種後 3 時間の細胞を 3% paraformaldehyde で 10 分間固定し 0.2 μ g/ml の PI で染色し laser scanning 共焦点顕微鏡で観察した。

6. *In vitro* transport assay

In vitro transport assay は既報の方法を参照した(7)。HeLa 細胞と SVG 細胞は 8-well のチャンバースライドに 24 時間培養し rinse buffer (20 mM Hepes [pH 7.3]、110 mM potassium acetate、5 mM sodium acetate、1.0 mM EGTA)で 2 回洗い digitonin 処理を氷上で 5 分間行った。最適の浸透濃度を選ぶために 40, 60, 90, 120 $\mu\text{g/ml}$ 量の digitonin 処理を HeLa 細胞と SVG 細胞に行い、最適である 90 $\mu\text{g/ml}$ の digitonin を用いた。*In vitro* transport assay において、digitonin で処理した細胞を transport buffer (20 mM Hepes [pH 7.3]、110 mM potassium acetate、5 mM sodium acetate、2 mM DTT、1.0 mM EGTA、1 mM PMSF、1 $\mu\text{g/ml}$ each leupeptin、pepstatin、aprotinin)で十分に洗い細胞質を完全に排出させた。続いて ATP 複合体(1 mM ATP、5 mM creatine phosphate、20U of creatine phosphokinase)と細胞質抽出物または理研今本尚子博士から供与された importin α または importin β (13)、もしくは importin α と β が同時に存在した場合のそれぞれに細胞を FITC label した VLP に感染させ 30°C 30 分間 incubate した。PBS で十分に洗ってから、細胞は 3% paraformaldehyde で固定し laser scanning 共焦点顕微鏡で写真を撮った。

細胞質の抽出は既に報告された方法を参照した(7)。HeLa 細胞と SVG 細胞を集め、冷 PBS (pH 7.4) で 2 回洗い更に rinse buffer (10 mM Hepes-NaOH [pH 7.3]、10 mM potassium acetate、2 mM magnesium acetate、2 mM DTT) で洗ってから、5.0 倍量の lysis buffer (5 mM Hepes-NaOH [pH 7.4]、10 mM potassium acetate、2 mM magnesium acetate、2 mM DTT、20 μM cytochalasin B、1 mM PMSF、1 $\mu\text{g/ml}$ each aprotinin、leupeptin、pepstatin) に懸濁した後、氷上で 10 分間放置した。次いで細胞は homogenizer で破碎し、100,000 \times g、40 分間遠心し、上清を transport buffer で透析し蛋白を 10 mg/ml 位に濃縮した。*in vitro* transport assay に使う GST fusion 蛋白、importin α と importin β は以前の報告を参照して *E. coli* に発現し精製した(13, 14)。

7. VLP overlay assay

Recombinant GST fusion 蛋白、GST-importin α 、GST-importin β (6.9 μM , each) は 8% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) に泳動してから、polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane に転写した。Membrane は 0.1% Tween-20 (TBS-T) と 5% skim milk (blocking solution) を含有する Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl) で 1 時間 block し、wtVLP 又は ΔNLS VLP (5 $\mu\text{g/ml}$) と 4°C で 2 時間 incubate した。Membrane は TBS-T で 4 回洗い、TBS-T で 1,000 倍希釈した rabbit 抗-VP1 抗体と反応させた。4°C で 1 時間反応後、抗体液を除去し 4 回冷却 TBS-T で洗浄後 TBS-T で 3,000 倍希釈した HRP-conjugated F(ab')₂ goat 抗-rabbit immunoglobulins (BioSource International, Camarillo, CA) を 4°C で 1 時間反応させた。その後 4 回冷却 TBS-T で洗浄し、免疫陽性シグナルは ECL キットで (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 検出し、LAS-1000 plus system (Fuji Film, Tokyo, Japan) で解析した。

(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. FITC-wtVLP の核移行について

wtVLP と ΔNLS VP1 は両方とも 45 kDa のバンドとして認められた (図 1 A)。次に電子顕微鏡を用いて wt と ΔNLS VLP が直径 40 から 50 nm の粒子構造をとる事を確認した(図 1B、C)。FITC-VLP 及び FITC-Cy3-VLP も同様な粒子構造が認められた(data not shown)。

FITC-VLP を接種後 4°C 1 時間で wtVLP は細胞膜に吸着し、37°C で 1 時間培養すると FITC label wtVLP は許容細胞 SVG と非許容細胞 HeLa の細胞の核内に移行し、2 時間後および 3 時間後ではさらに核内への集積が見られた。接種後 3 時間では 95.6% の HeLa 細胞核内に VLP が認められた (図 2、

上段)。しかし Δ NLS VLP を接種した細胞ではほとんど核移行は認められず、わずか 2.2 %の細胞の核でのみ陽性となった(図 2、下段)。

2. wtVLP の核内移行

VLP が粒子状態で核内に移行することを調べるために、我々は HeLa 細胞(図 3A)と SVG 細胞に FITC-Cy3-VLP を接種した。接種後 37°C、1 時間で FITC と Cy3 のシグナルは同時に HeLa 細胞と SVG 細胞の核内に認められ、2 時間後、3 時間後では核内への集積が増加した。一部の細胞では 3 時間後の細胞質に少量の VLP が認められたが、ここでも FITC と Cy3 は同じ部位に共存していた(図 A、3h)。このことは、VLP が Cy3 を有する粒子状態で核内に移行する事を示唆している。

次に FITC-Cy3-VLP が細胞質で virion から polymer の VP1 に分解し、polymer に結合して核内に移行する可能性を排除するために、FITC-VLP を dissociation buffer と 1 時間 incubate して Cy3 と混ぜ、reassociation buffer で透析しない状態で直接細胞に接種した。その結果感染後 37°C、1 時間、2 時間、3 時間で FITC のシグナルが核内に認められたが、Cy3 のシグナルは殆ど認められなかった(図 3B)。この結果は Cy3 が VP1 の polymer と結合して核内に移行しているのではないという事を示唆した。以上の結果から VLP は粒子状態で核内に移行する事が明らかになった。

3. VLP 核内移行に関する importins と NLS の相互作用

In vitro transport assay において transport buffer と ATP 複合体だけを添加した場合には、wtVLP は digitonin で処理した HeLa 細胞核内に移行しなかった(図 4A)、ATP 複合体と細胞質抽出物を添加すると、wtVLP の核内移行が観察された(図 4B)。この結果から VLP の核内移行には細胞質因子が必要であることが示された。細胞質中の importin が VLP の核内移行における役割を調べるために、細胞質抽出物の代わりに importin α と β をそれぞれ添加して *in vitro* transport assay を行った。Importin α と ATP 複合体(図 4C)、又は importin β と ATP 複合体を添加しても(図 4D)、wtVLP は digitonin で処理した HeLa 細胞の核内には入らなかった。しかし、importin α と β が同時に存在すると、wtVLP の核内移行が観察できた。同様の結果が SVG 細胞でも観察された。これらの結果から wtVLP の核内移行は importin α および importin β の共同作用により制御されることが示唆された。また核移行に関しては JCV 許容細胞 (SVG)と非許容細胞 (HeLa)とで差異がなかった。

4. VLP の核内移行における NLS

JCV-VLP の核内移行における NLS の役割を調べるために Δ NLS VLP の核内移行を調べた。HeLa 細胞と SVG 細胞に FITC label した Δ NLS VLP を接種すると 37°C 1 時間から 2 時間で Δ NLS VLP は細胞質に入ったが、核内には入らなかった。37°C で 3 時間経過してもわずかに 2.2%の HeLa 細胞および 6.1%の SVG 細胞の核内に VLP が認められなかった(図 2、下段)。Cy3 を packaging した FITC- Δ NLS VLP を HeLa 細胞(図 5A)と SVG 細胞に接種すると、37°C で 3 時間が経過しても FITC と Cy3 は細胞質には認められるが核内には侵入しなかった。この際 FITC- Δ NLS VLP と Cy3 は共存しており、 Δ NLS VLP が Cy3 を packaging した粒子構造を取っていることが示された。

In vitro transport assay において細胞質抽出物または importin α と importin β が存在した場合、wtVLP は digitonin で処理した HeLa 細胞の核に入ったが(図 5B)、 Δ NLS VLP は核内に入らなかった(図 5B)。SVG を用いた場合も同じ結果であった。即ち NLS は VLP の核内移行には不可欠であると考えられた。

次に NLS の mutant である Δ NLS VLP が核内に移行しない理由を調べるために、我々は overlay assay を行った。抗 VP1 抗体は wtVLP と Δ NLS VLP とを認識することを確認した上で、この抗体を用いて膜上の importins に結合した VLP を検出した。wtVLP は GST-importin α と GST-importin β とともに結合したが(図 6、上段)。 Δ NLS VLP は GST-importin α と β の両方とも結合しなかった(図 6、下段)。また wtVLP と Δ NLS VLP は両方とも GST に結合しなかった。以上のように wtVLP が特異的に importins と結合することが証明されたことから VLP の核内移行は VP1 の NLS と importin α と β との相互作用によって制御されていることが示唆された。

5. VLP の NPC を介した核内移行

wtVLP の核内移行における NPC の関与を調べるために FITC-wtVLP を接種する前に digitonin で処

理した HeLa 細胞と SVG 細胞を wheat germ agglutinin (WGA) 又は抗 NPC 抗体で予め反応させた(15)。細胞質抽出物または importin α と importin β の両方が存在しても wtVLP の核内移行は WGA と抗 NPC 抗体により完全に抑制された(図 7)。WGA と抗 NPC 抗体は特異的に NPC と結合して蛋白質の核内移行を抑制することから VLP は NPC を経由して核内に移行することが判明した。

〔考 察〕

JCV は神経向性ウイルスとして良く知られているが、その機構は未だ解明されていない。JCV は細胞表面の sialic acid を含有する receptor と結合して clathrin 依存的に細胞内に侵入する。Receptor は種々の細胞膜に存在しており、JCV はこれらの細胞内に侵入できるが、許容細胞である SVG 細胞もしくは IMR-32 細胞でのみ感染増幅が可能である(9)。これらの事実から JCV の神経向性は細胞膜 receptor により規定されていると考えるよりも、細胞質に入った後の因子に依存している可能性が考えられる。本研究では JCV-VLP の核内移行は JCV 許容細胞である SVG 細胞と非許容細胞である HeLa 細胞において差異は認められなかった。最近 ウイルスの細胞親和性が核内外の輸送に関連する分子の量的差で規定されている場合も報告されており(16)、今後 importin α や importin β 、さらに NPC の量的な差異に関して許容細胞と非許容細胞との間で検討する必要があると考えられた。

JCV は粒子状態で核内に移行するかあるいは細胞質で分解されてゲノム DNA が核内に輸送されるかは不明である。本研究では VLP の中に Cy3 を packaging して、外側には FITC を label した粒子を用意し、これを細胞に接種すると FITC と Cy3 のシグナルが同時に細胞核内に認められた。多くの細胞では 3 時間後には VLP は核内に局限したが、一部の細胞では 3 時間後の細胞質にも認められた(図 3A、3h)。これは細胞の状況により細胞質に残留していたと考えられたが、核内から再度核外に移動したという解釈も考えられた。いずれにせよ FITC と Cy3 とは共存しており粒子状態で行動を共にしていることが示された。しかし、Cy3 と FITC-VLP の単純に混ぜ合わせた混合物を細胞に接種しても Cy3 のシグナルが核内に見えなかった。以上の結果から、VLP は Cy3 を内包する粒子であり、核内には VLP が分解されないで粒子状態で移行したものと考えられた。

wtVLP の核内移行が完全に WGA と抗 NPC 抗体によって抑制されることから(15)、VLP は NPC を経由して核内に移行することが判明した。NPC は 50-100 個の蛋白から成る巨大複合体で、細胞質と核との物質交換の channel を形成している(17, 18)。今までの研究で NPC は 50 kDa 以下の分子が自由に通過できるが、それ以上の物質は signal 分子を介して transport される(19)。初期の報告では NPC は最大 29 nm の粒子までしか通過させないとされていたが、最近 Pante and Kann (2002)が直径 36 nm のヒト B 型肝炎ウイルスが壊れないで核内に移行することを証明した(20)。直径 42 から 45 nm の JCV は粒子のまま NPC を通過することは困難であろうと思われた。しかし、直径 50 nm の SV40 ウイルス粒子が細胞質に injection された後 1-2 時間で核内に認められ WGA と抗-nucleoporin 抗体がこの現象を阻害することが報告された(21)。Daneholt (1997)は importin と NPC の結合によって NPC terminal ring の拡大と ribonucleoprotein (RNP)の変形が誘導されて、NPC より大きな粒子が通過出来ると指摘しており(22)、JCV-VLP 粒子はこの場合と同様な機構で NPC を通過すると予想された。

Digitonin 処理は細胞膜を壊すが、核膜は保存されている。結果として digitonin 処理した細胞は核膜輸送機構を保存しているが、細胞質は排出されている。wtVLP は digitonin で処理し、何も添加しない HeLa 細胞と SVG 細胞の核には侵入できないが、細胞質抽出物と ATP 複合体を補充すると核内移行は回復した。一方、importin α と importin β が細胞質抽出物と同様に VLP の核内移行を可能としたことから、JCV-VLP の核内移行は importin α と importin β に制御されると考えられた。

今迄の研究で NLS を含む蛋白質はその NLS を介して importin α および importin β と三者複合体を形成して核内に輸送されることが分かってきた(8)。JCV VP1 N 末端の塩基性アミノ酸系列 MAPTKRKGERK は NLS と推測されているが(11, 23)、JCV 核内移行に於ける役割は未だ不明である。本研究は KRK を AGA に換えて Δ NLS VLP を作製した。この Δ NLS VLP は digitonin 処理した細胞核にも入らないし、非処理の intact な細胞核にも入らないからこの NLS は VLP の核内移行には不可欠

だと考えられた。Overlay assay では wtVLP は importin α と importin β とともに結合したが Δ NLS VLP は両方と結合しなかった。したがって VLP の核内移行は NLS と importin に制御されることが示された。

〔結 論〕

JC virus (JCV)の核内移行機序を明らかにするため Cy3 を packaging した recombinant の virus-like particle (VLP)を作成して解析を行い以下の結果を得た。

- 1.JCV-VLP は感染後 1 時間で細胞の核内に移行し、VLP は Cy3 を packaging したまま粒子状態で核内に移行していることが示された。
- 2.JCV-VLP の核内移行には VP1 の核局在シグナル(NLS)が importin α 及び β と結合し、核膜孔複合体 (NPC)を介して核内に移行することが判明した。

[参考文献]

- 1) Padgett, B., G. Zurhein, D. Walker, R. Echroade, and B. Dessel. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1971; 1: 1257-1260.
- 2) Dworkin MS. A review of progressive multifocal leukoencephalopathy in persons with and without AIDS. *Curr Clin Top Infect Dis.* 2002; 22: 181-195.
- 3) Frisque, R. J., Bream, G. L., and Cannella, M. T. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol.* 1984; 51: 458-469.
- 4) Liu CK, Wei G, Atwood WJ. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha(2-6)-linked sialic acids. *J Virol.* 1998; 72: 4643-4649.
- 5) Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Atwood WJ, Nagashima K. Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J Virol.* 2002; 76: 12992-13000.
- 6) Ashok A, Atwood WJ. Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and simian virus 40. *J Virol.* 2003; 77: 1347-1356.
- 7) Adam SA, Marr RS, Gerace L. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol.* 1990; 111: 807-816.
- 8) Chi NC, Adam EJ, Visser GD, Adam SA. RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. *J Cell Biol.* 1996; 135: 559-569.
- 9) 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.* 2001; 286: 100-112.
- 10) 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 1 Tax protein in human neuronal cell lines. *J Biol Chem.* 2000; 275: 17016-17023.
- 11) Chang D, Haynes JI 2nd, Brady JN, Consigli RA. The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology.* 1992; 189: 821-827.
- 12) Goldmann C, Stolte N, Nisslein T, Hunsmann G, Luke W, Petry H. Packaging of small molecules into VP1-virus-like particles of the human polyomavirus JC virus. *J Virol Methods.* 2000; 90: 85-90.
- 13) Imamoto N, Shimamoto T, Kose S, Takao T, Tachibana T, Matsubae M, Sekimoto T, Shimonishi Y, Yoneda Y. The nuclear pore-targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile. *FEBS Lett.* 1995; 368: 415-419.
- 14) Imamoto N, Shimamoto T, Takao T, Tachibana T, Kose S, Matsubae M, Sekimoto T, Shimonishi Y, Yoneda Y. In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *EMBO J.* 1995; 14: 3617-3626.
- 15) Dabauvalle MC, Schulz B, Scheer U, Peters R. Inhibition of nuclear accumulation of karyophilic proteins in living cells by microinjection of the lectin wheat germ agglutinin. *Exp Cell Res.* 1988; 174: 291-296.
- 16) Hakata Y, Yamada M, Shida H. Rat CRM1 is responsible for the poor activity of human T-cell leukemia virus type 1 Rex protein in rat cells. *J Virol.* 2001; 75: 11515-11525.
- 17) Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E, Goldberg MW. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci.* 2000; 113: 1651-1659.
- 18) Forbes DJ. Structure and function of the nuclear pore complex. *Annu Rev Cell Biol.* 1992; 8: 495-527.
- 19) Talcott B, Moore MS. Getting across the nuclear pore complex. *Trends Cell Biol.* 1999; 9: 312-318.

- 20) Pante N, Kann M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 425-434.
- 21) Clever J, Yamada M, Kasamatsu H. Import of simian virus 40 virions through nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 7333-7337.
- 22) Daneholt B. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell*. 1997; 88: 585-588.
- 23) Ishii N, Minami N, Chen EY, Medina AL, Chico MM, Kasamatsu H. Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1. *J Virol*. 1996; 70: 1317-1322.

〔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 JC virus agnoprotein. *J Neurovirol*. 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 agnoprotein 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) Endo S, Okada Y, Orba Y, Nishihara H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H: JC virus (JCV) agnoprotein colocalizes with tubulin. *J Neurovirol* 9 (Suppl 1): 10-14, 2003
- 11) Ricciardiello L, Baglioni M, Giovannini C, Pariali M, Cenacchi G, Ripalti A, Landini MP, Sawa H, Nagashima K, Frisque RJ, Goel A, Boland CR, Tognon M, Roda E, Bazzoli F: Induction of Chromosomal Instability in Colonic Cells by the Human Polyomavirus JC Virus. *Cancer Res* 63:7256-62, 2003
- 12) Teramoto T, Kaneko H, Futano M, Sawa H, Nagashima K, Hirose Y, Kondo N: Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *Scand J Infect Dis* 35: 910-911, 2003
- 13) 大場 靖子、澤 洋文、長嶋 和郎: JC virus の分子細胞病理学。脳と神経 54: 101-9, 2002.

- 14) 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科学。神経研究の進歩 46: 557-65, 2002
- 15) 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. 3rd 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. 10th 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) VPI as a tool for gene transfer and characterization of neutral antibodies against JCV infection. 4th International Symposium on Neurovirology, 2002, Düsseldorf, Germany
- 6) Sawa H, Qu, Q, Semba S, Suzuki T, Okada Y, Henmi C, Tsuda M, Tanaka S, Atwood WJ, Nagashima K: Translocation of JC virus-like particles (VLP) into the nucleus by interaction with importins and nuclear pore complexes. 5th International symposium of NeuroVirology & HIV Molecular and Clinical Neuroscience Workshop, 2003, MA, USA
- 7) Orba Y, Sawa H, nagashima K: Suppression of JC virus infection by small interfering RNA (siRNA). 5th International symposium of NeuroVirology & HIV Molecular % Clinical Neuroscience Workshop, 2003, MA, US59)
- 8) Sawa H, Nagashima K: Cellular responses to JC virus infection and nuclear factors involved in JC virus replication. 1st International Conference, Polyomaviruses and Human disease: Basic and Clinical Perspectives, 2003, Florence, Italy
- 9) Suzuki T, Sawa H, Okada Y, Orba Y, Semba S, Nagashima K: Investigation of JC virus agnoprotein interacting protein, FEZ1. 1st International Conference, Polyomaviruses and Human disease: Basic and Clinical Perspectives, 2003, Florence, Italy
- 10) Semba S, Sawa H, Okada Y, Nagashima K: Investigation of neural-specific protein that binds to JC virus regulatory region. 1st International Conference, Polyomaviruses and Human disease: Basic and Clinical Perspectives, 2003, Florence, Italy
- 11) 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
- 12) 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
- 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 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
- 14) 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
- 15) 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