

以下の事項につき第二次疫学調査を、郵送による質問形式で調査した。①調査期間：1999年～2004年に発症した症例、②転機、③基礎疾患、④経過、発症様式、初発症状、経過中に出現した症状、画像検査所見、髄液検査所見、脳生検所見、HIV感染の場合、発症時のCD4(+)リンパ球数、抗ウイルス療法の有無、⑤本症に対する治療とその効果、⑥診断の確実性。以上の結果を踏まえ、それぞれを解析した。

(倫理面への配慮)

今回の調査では臨床症状、基礎疾患、治療歴などを検討したもので、症例の個人を特定できるものではないため、倫理的な問題は生じない。

### C. 研究結果

神経内科専門医 3,920 名に調査用紙を送付した結果、1999 年～2004 年での患者数は前回調査より少ない 32 名の症例であった。その内訳は、definite 13 例、probable 15 例、possible 4 例であった。この 32 例を上記方法により解析した。

① 基礎疾患は、非 HIV が 21 名 (66%) で、血液疾患 8 例 (自己免疫性溶血性貧血 1 例、慢性骨髄性白血病 1 例、赤血球貪食症候群 1 例、悪性リンパ腫 4 例、多発性骨髄腫 1 例)、先

天性免疫不全症 2 例 (X 連鎖無ガンマグロブリン血症 1 例、高 IgM 症候群 1 例)、膠原病 4 例 (全身性エリテマトーデス 3 例、結節性多発動脈炎 1 例)、悪性胸腺腫 1 例、慢性腎不全 (透析) 3 例、基礎疾患無し 3 例であり、HIV 感染は 11 例 (34%) で、抗ウイルス剤未治療例 7 例、治療中発症 4 例であった (図 1)。背景基礎疾患を HIV 感染症と非 HIV 感染症に分けて発症者数を年度別にみると (図 2)、HIV 関連 PML の漸増がうかがわれた。

② 年齢構成は、25 歳～77 歳 (平均 53.3 歳) で、男女比は 18 : 14 であり、非 HIV 感染者と HIV 感染者を比べると、前者では 30 歳～77 歳 (平均 57.3 歳、男女比 10 : 11)、後者では 25 歳～67 歳 (平均 45.7 歳、男女比 8 : 3) と HIV 関連 PML では発症年齢が若年にみられる傾向があり、男性が多くみられた (図 3)。

③ 2005 年 7 月までの調査期間での転帰をみると (図 4)、非 HIV 感染者での発病からの生存期間は中間値 7 ヶ月 (1～75 ヶ月)、HIV 感染者では 14.5 ヶ月 (2～51 ヶ月) であった。死亡者は非 HIV 患者は 18 名、HIV 患者は 4 名あり、前者の平均生存期間は 10 ヶ月、後者は 6.3 ヶ月であり、ほとんどの患者で 1 年以内に死亡してた。

Definite PML 14例	HIV感染症 11例(34%)
Probable PML 15例	抗ウイルス剤未治療 7
Possible PML 3例	抗ウイルス剤治療中 4
計 32例	血液疾患 8例
	赤血球貪食症候群 1
	自己免疫性溶血性貧血 1
	慢性骨髄性白血病 1
	悪性リンパ腫 4
	多発性骨髄腫 1
	先天性免疫不全症 2例
	Btk欠損症 1
	高IgM症候群 1
	膠原病 4例
	SLE 3
	PN 1
	悪性胸腺腫 1例
	慢性腎不全(透析) 3例
	無 3例

図 1 第二次疫学調査結果 (1999～2004)

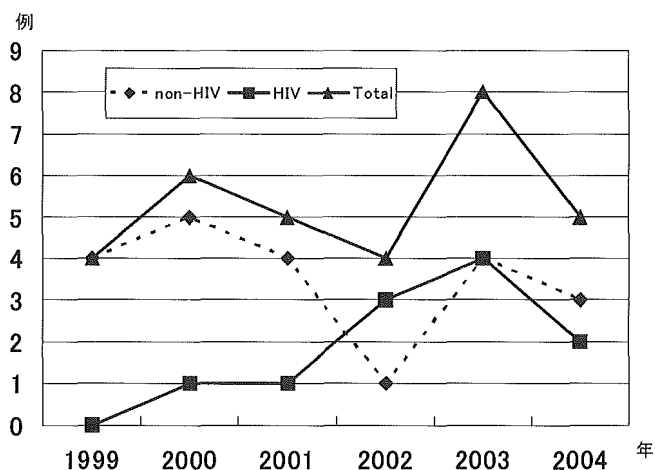


図2 年度別発生件数

年齢 25歳～77歳(平均53.3歳)                      性別 男 18 :女 14  
 non-HIV                      HIV                      non-HIV                      HIV  
 30～77歳                      25～67歳                      10:11                      8:3

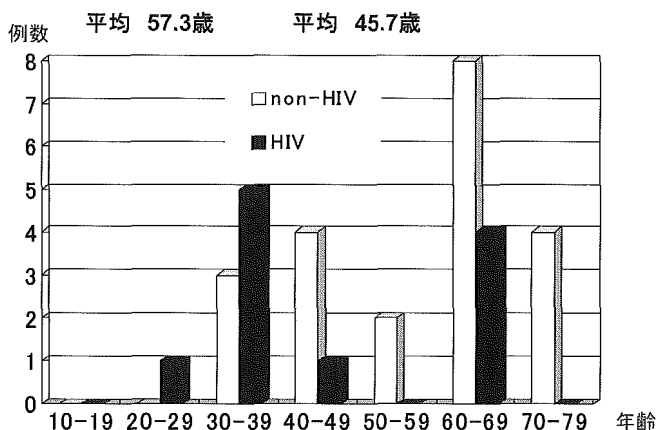


図3

- ④ 死因はPMLが36%、その他が41%であった。
- ⑤ 経過では 81%の患者で進行性経過をとり、16%で進行停止ないし改善をみ、亜急性経過をとるものがほとんどであった(図5)。
- ⑥ 初発病巣は 84%で大脳半球にあり、16%が小脳初発であった(図5)。
- ⑦ 初発症状は多彩であるが、運動麻痺、認知機能障害、失語症、視力障害が代表的であり、経過中に言語・嚥下障害、脳神経麻痺、無動・無言状態が多く症例で加わってきた(図6,7)
- ⑧ 画像検査では、MRI が全例行われており、definite および probable 例に限ると、初診時に単一病巣が 20 例、多発例は 8 例みられた。小脳発症は 5 例のみでその他は大脳に初発していた。造影剤増強効果は 2 例にみたのみで、ほとんどの症例では造影剤増強効果はみられなかった。
- ⑨ 髄液検査では細胞数は平均6.3(0~75)/ $\mu$ lであるが、ほとんどの症例で増加は無く、蛋白は平均 44mg/ml(24mg~108mg)であり、軽度上昇するものが 1/3 例にみられた(図8)。
- ⑩ HIV 症例での発症時の CD4(+)リンパ球数は平均 66.3/ $\mu$ l と低値であり、抗ウイルス剤

転帰(2005年7月調査時)		non-HIV	HIV
生存期間	中間値	7ヶ月(1~75M)	14.5ヶ月(2~51M)
死亡		18名	4名(不明1)
期間		1ヶ月~59ヶ月 (平均10ヶ月)	2ヶ月~17ヶ月 (平均6.3ヶ月)
生存		3名	6名
期間		(7ヶ月~75ヶ月)	(12ヶ月~51ヶ月)
死因			
PML		7	1
その他		7	2
不明		4	1
12ヶ月以上生存		5	7

図 4

	non-HIV	HIV	計(%)
経過 進行性	18例	8例	26例(81%)
停止性	3	0	3 (19%)
改善	0	3	
発症 急性	3	2	5 (16%)
亜急性	18	9	11 (84%)
初発病巣			
大脳半球	16	11	27例(84%)
小脳	5	0	5 (16%)

図 5

初発症状	Non-HIV (n=18)	HIV (n=11)	計(%)
認知機能障害	5	7	12(41)
失語症	3	4	7(24)
脳神経麻痺	3	2	5(17)
視力障害	3	4	7(24)
片麻痺/四肢麻痺	10	7	17(59)
小脳症状	5	0	5(17)
感覚障害	3	0	3(10)
頭痛	1	2	3(10)
痙攣	0	1	1(3)
不随意運動	1	2	3(10)

図 6

経過中症状	Non-HIV(n=18)	HIV(n=11)	計(%)
認知機能障害	15	7	22(76%)
失語症	11	7	18(62%)
無動・無言	14	3	17(59%)
脳神経麻痺	12	3	15(52%)
視力障害	5	6	11(38%)
構音障害	13	7	20(69%)
嚥下障害	14	7	21(72%)
片麻痺/四肢麻痺	16	9	25(86%)
深部反射亢進	12	7	19(66%)
錐体路症状	15	8	23(79%)
小脳症状	8	2	10(34%)
感覚障害	7	4	11(38%)
パーキンソニズム	2	1	3(10%)
不随意運動	3	3	6(21%)
頭痛	2	1	3(10%)
痙攣	1	3	4(14%)
膀胱直腸障害	9	5	14(48%)

図 7

未治療では 3~282/ $\mu$ l(平均 52.4)、抗レトロウイルス剤投与中の発症では 23~146/ $\mu$ l といずれも CD4(+)リンパ球数でみた場合、免疫不全状態で発症していた(図 9)。

- ⑪ 治療面では、HIV 関連 PML で HAART を行った 11 例中 7 例(78%)が有効でああったが、Ara-C で有効例が 1 例存在したのみで、その他には効果は認められなかった。
- ⑫ 1年以上の長期生存例は非 HIV 患者では 5 例、HIV 患者では 7 例みられた。非 HIV 患者で

は全身エリテマトーデスで基礎疾患のコントロールをすることで延命を、HIV 患者では HAART 療法が有効で、無治療では全例死亡していた(図 10)。

#### D. 考察

診断基準に基づいた PML 症例の実態調査と臨床状態を解析したが、前回調査時<sup>1)</sup>より調査項目が多いためか、回答症例が少なかった。本症の基礎疾患、年度別発生頻度は前回調査と同

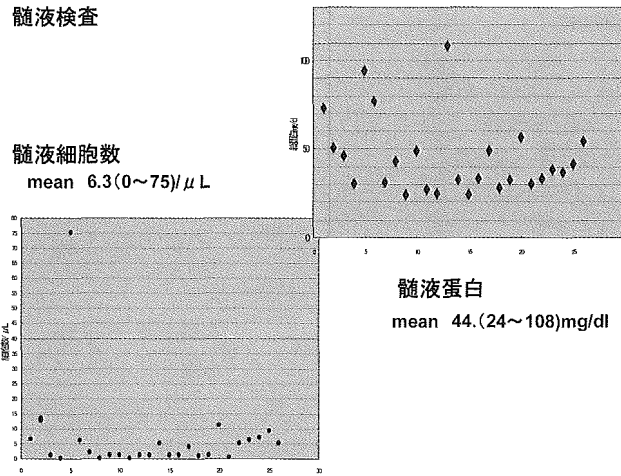


図 8

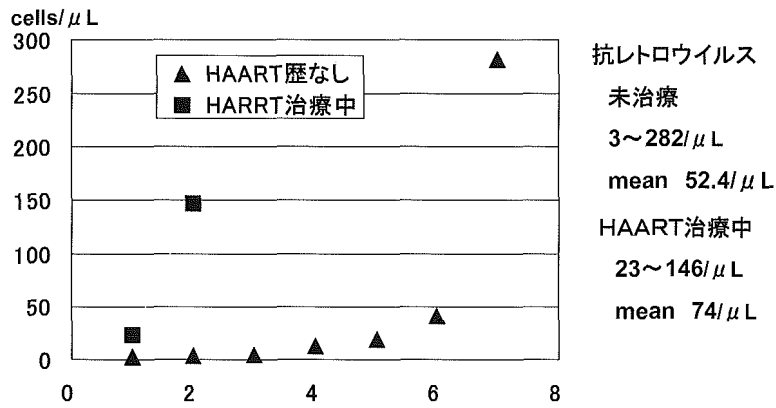


図 9 HIV-PML の CD4 細胞数

<p>1. Non-HIV 無治療 11例 全例死亡 インターフェロン<math>\alpha</math> 3例 効果無2、不明1 Ara-C 1例 効果有り その他 6例 副腎皮質ホルモン 3例 但しSLEコントロールで59M、72M生存例あり</p> <p>同パルス療法 1例 効果無 免疫グロブリン 2例 効果無</p>	<p>2. HIV 無治療 2例 死亡 2例 HAART 9例 効果あり 7例 なし 2例</p>
--	---

図 10 PML に対する治療と結果

様、わが国では HIV/AIDS 患者が漸増していることを受けて、HIV 関連 PML が増加傾向にあるものの、依然として非 HIV 関連 PML が優位であった。この現象は PML の基礎疾患のほとんどが HIV 感染であるとの欧米の成績<sup>2)</sup>と異なる

結果であり、わが国の HIV 感染者数が諸外国ほどではないことを示している。

発症時の年齢や性は基礎疾患の影響を大きく受けており、中高年に多く、男性にやや多いが、とくに HIV 感染者では青壮年期とやや若

く、男性に多くみられた。

臨床症状は、運動麻痺、認知機能障害、視力障害、失語症など大脳病変で発症するものが多く、経過中に運動麻痺、認知機能障害の比率が高くなり、構音障害、嚥下障害、脳神経麻痺、無動・無言状態が高率に出現し、錐体路徴候なども高率にみられるが、高次機能、運動系に比べると感覚障害は少なく、頭痛、痙攣なども少ない。自律神経系では膀胱直腸障害がみられる。これらの所見は以前高橋<sup>3)</sup>が文献例を集積解析したものとほぼ同様の傾向であり、今回非 HIV と HIV 関連 PML の間に詳細な解析は行っていないが臨床症状の間に差はみられていない。

検査所見では、MRI での検査では初診時に 72% の症例で単一病巣を認め、大脳の各脳葉からほぼ同程度に発症していたが、小脳原発が 5 例のほかは、脳幹、脊髄からの発症は今回の調査ではみられなかった。また造影剤増強効果も 7% の症例で認めるのみで、ほとんど造影効果はみられなかった。Post ら<sup>4)</sup>の HIV 関連 PML の解析では、テント上での発症が約 94% であり、造影剤増強効果が 2% にしか認められておらず、テント上に発症することが多いこと、さらに脳血液関門の破壊の少ない病変であることを示している。髄液検査は軽度な蛋白増加を認めるものの、細胞数はほとんどの例で、正常であることなど、これまでの記載とおりでである。

HIV 関連 PML では抗レトロウイルス剤未治療、治療開始後の発症者とも CD4(+)リンパ球数でみるとそれぞれ低値であり、多数例の HIV 関連 PML でみた発症時の平均 CD4(+)リンパ球数 88 細胞/mm<sup>3</sup>(中央値)と同様<sup>5)</sup>、高度の免疫不全状態、あるいは免疫の回復の無い時期に発症している。

治療とその効果を検討してみると、非 HIV 患者での長期生存は全身性エリテマトーデスで基礎疾患をコントロールすることで、59 ヶ月、72 ヶ月生存例があるほかには、インターフェロン $\alpha$ 、Ara-C、ほかの効果は認められておらず

平均 10 ヶ月で死亡、HIV 関連 PML において無治療者が平均 6 ヶ月で死亡しているに比べ、強力な抗レトロウイルス療法を受けた 9 例中 7 名が 1 年以上の延命を認めており、HIV 関連 PML に対してエビデンスのある治療法である<sup>6)</sup>。

## E. 結論

わが国での PML の第二次疫学調査を行い、臨床解析を行った。HIV 関連 PML は HAART が有効であり、非 HIV 関連 PML は基礎疾患のコントロールによる免疫回復が延命に効果的である。しかし延命はすなわち機能回復ではなく、また多くの症例で致死的ないし不可逆性神経障害をとっている。今後早期診断と有効な治療法の早期開発・早期開始が必要であり、当面の間ケアシステムの確率が必要な疾病である。

## 文献

- 1) 岸田修二, 黒田康夫, 余郷嘉明、ほか: 進行性多巣性白質脳症の診断基準に基づいた全国疫学調査結果. 厚生労働科学研究費補助金, 難治性疾患克服研究事業. プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究, 平成 15 年度研究報告書. 2004. p.227-232
- 2) Berger JR, Pall L, Lanska D, et al : Progressive multifocal leuko-Encephalopathy in patients with HIV Infection. J Neurovirol 4 : 59-68, 1998. Am J Neuroradiol 1999 : 20 : 1896-1906.
- 3) 高橋 昭: パポバウイルス(JC ウイルス): 領域別症候群シリーズ no26. 神経症候群 I. 日本臨床別冊, 1999 年, 東京, p.411-417
- 4) Post MJD, Yiannoutsos C, Simpson D, et al : Progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS: are there any MR findings useful to patient management and predictive of patient survival? Am J Neuroradiol 20 : 1896-1906, 1999

- 5) Antinori A, Cingolani A, Lorenzini P, et al : Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy : Data from the Italian Registry Investigative Neuro AIDS (IRINA). *J Neurovirol*, **9**(suppl.1) : 47-53, 2003.
- 6) Roberts MTM : AIDS-associated Progressive multifocal leuco-encephalopathy. *CNS Drugs* **19** : 671-682, 2005

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岸田修二 : PML の疫学と臨床. 日本神経感染症学会総会. 2005.10

H. 知的財産権出現・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班  
分担研究報告書

進行性多巣性白質脳症(PML)の治療ガイドラインの作成(試案)

研究協力者：黒田 康夫	佐賀大学内科
研究協力者：岸田 修二	都立駒込病院神経内科
分担研究者：長嶋 和郎	北海道大学・大学院医・分子細胞病理
研究協力者：余郷 嘉明	東京大学・大学院医・泌尿器科
研究協力者：宍戸一原由紀子	東京都神経科学総合研究所微生物部門
分担研究者：水澤 英洋	東京医科歯科大学・大学院医・神経内科

研究要旨

一昨年度、当 PML 分科会は PML の診断基準を作成し、それを用いてわが国の PML の一次実態調査を行った。その結果、わが国にも症状の著明な改善が認められた患者が少数ではあるが存在することが確認された。わが国では HIV 感染者が増加傾向にあり、今後 PML 患者は増加していくと予測される。しかしながら、一部の施設を除けば PML 患者を診療することは非常に稀であるため、患者が入院した場合どのような診療計画を立てたらよいか、最善の治療は何なのか直ちに見当がつかないのが現状と思われる。実際、PML の治療に関しては、エイズに合併した PML では Standard Treatment が提唱されているが、エイズ以外の疾患に合併した PML では明確な治療ガイドラインは提唱されていない。

かかる理由から、平成 17 年度中に本研究班で治療ガイドラインを作成する必要があると判断し、試案を作成した。

A. 研究目的

一昨年度、当 PML 分科会は PML の診断基準を作成し、それを用いてわが国の PML の一次実態調査を行った。その結果、わが国にも症状の著明な改善が認められた患者が少数ではあるが存在することが確認された。わが国では HIV 感染者が増加傾向にあり、今後 PML 患者は増加していくと予測される。しかしながら、現時点では一部の施設を除けば PML は非常に稀な疾患であるため、患者が入院した場合どのような診療計画を立てたらよいか、最善の治療は何なのか直ちに見当がつかないのが現状と思われる。実際、PML の治療に関しては、

エイズに合併した PML では Standard Treatment が提唱されているが、エイズ以外の疾患に合併した PML では明確な治療ガイドラインは提唱されていない。

かかる理由から、最新の PML の診断法および治療法を網羅した診療ガイドラインを本研究班が作成する必要があると判断した。

B. 研究方法

PML は極めて稀な神経疾患であるので、実用的な診療ガイドラインを作成することを目的にする。内容は、2005 年度までに学術雑誌に掲載された Up-date の PML の診断および治

療を記述した論文を検索し、グレードを付して診断法・治療法を推奨する。

A : 行うよう強く勧められる

B : 行うよう勧められる

C1 : 行うことを考慮してもよいが、十分な科学的根拠がない

C2 : 科学的根拠がないので、勧められない

D : 行わないよう勧められる

非エイズ患者の PML は極めてまれであるので、多施設治験結果だけでなく、1 施設における少数例の治験結果に関しても有効性が認められた論文はできるだけガイドラインの記載対象にする。さらに、昨年度施行された PML 全国実態調査を解析し、症状の停止および改善が認められた症例について解析し、文献と併せて予後関連因子の解明に努める。また、PML には非定型な神経症状、画像所見および脳脊髄液所見を呈する症例が少なからずあり、このような非定型例における診断法についてもガイドラインの対象にする。2005 年度末までの完成を目標にする。

#### C. 研究結果

当 PML 分科会が作成した PML 治療ガイドラインを別に示す。

#### D. 考察

エイズ関連 PML では highly active antiretroviral therapy (HAART) が多施設で比

較的多くの患者に試行されて有効性が確認されており、HAART はグレード B 以上で行うように推奨できる治療法である。一方、非エイズ PML では大規模の RCT を行うことは実際上不可能であり、治療は少数例に基づきしかも Open Trial である。従って、その推奨グレードは「C」の行うことを考慮しても良いが、十分な科学的根拠はない。PML では進行して半年以内に死に至る経過が典型的であるが、稀に進行の停止あるいは症状の自然軽快も認められる。したがって、有効と判定された治療が、真に治療によるものかどうか慎重に判定することが重要であり、過度の評価は慎むべきと考えられる。また、治療効果を認めた治療法だけが論文として医学雑誌に採択されるバイアスも考慮に入れるべきである。さらに、文献検索を通して言えることは、治療効果判定の基準が一樣でないために有効性を比較することが困難であることである。今後は治療効果の判定基準を作成することが強く望まれる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権出現・登録状況

なし



Establishment of Japanese Guidelines for the Management of Progressive Multifocal  
Leukoencephalopathy

Yasuo KURODA<sup>1</sup>, Shuji KISHIDA<sup>2</sup>, Kazuo NAGASHIMA<sup>3</sup>, Yoshiaki YOGO<sup>4</sup>, Yukiko  
SHISHIDO-HARA<sup>5</sup> and Hidehiro MIZUSAWA<sup>6</sup>

1, Department of Medicine, Saga University ; 2, Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital ; 3, Laboratory of Molecular and Cellular Pathology, Hokkaido University Graduate School of Medicine ; 4, Department of Urology, Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, University of Tokyo ; 5, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience ; 6, Department of Neurology, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medical and Dental Sciences.

The subcommittee of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) have already made the diagnostic criteria of PML and conducted the first nationwide survey of the disease. This nationwide survey has revealed that, although a few cases, there were PML patients who had showed marked improvement. It is generally believed that patients with PML will progressively increase in Japan, mainly due to the increase of AIDS patients. Until now there were few reports describing available treatment for PML except with the highly active antiretroviral therapy in AIDS-related PML. Therefore, clinicians who are to take care of PML patients may be puzzled how to manage their patients and what treatment to choose. Based on these reasons, the PML subcommittee has decided to make guidelines for the management of PML during the year of 2005.

## PML の PCR 診断サービスと PML に関わる JCV の遺伝学的な変化

研究協力者：余郷 嘉明 東京大学医学部泌尿器科

### 研究要旨

JC ウイルス (JCV) DNA の調節領域を標的とした nested PCR は PML の診断に有用である。この PCR を用いた PML の診断サービスを全国の病院に対して実施した。平成 17 年 2 月から平成 18 年 2 月までに 57 名の患者の髄液と 1 名の脳生検を検査した。これらのうち 7 名の患者の髄液と 1 名の脳生検から JCV 調節領域が検出された。検出された調節領域はいずれもユニークな再編成型であったことから、8 名の患者は PML と診断された。

最近我々は、PML 患者の脳組織から分離された JCV DNA (PML 型 JCV DNA) の主要キャプシド蛋白 (VP1) 遺伝子のループ領域に変異が多発していることを見いだした(この変異を VP1 ループ変異と命名)。VP1 ループ変異は 3 つのループ (BC、DE、HI) に存在する 8 つの部位で見いだされた。本研究は、26 名の PML 患者の脳組織または髄液から分離された JCV DNA に存在する VP1 ループ変異を解析した。さらに、PML の病態進行と VP1 ループ変異との関係も解析した。その結果、(1) 8 ヶ所での変異は全てが生物学的に重要な意義を有すること。(2) VP1 ループ変異は PML の病態進行に関係があること、(3) VP1 ループ変異は抗原性を変化させることが示唆された。(本年度に行った VP1 ループ変異の解析は、東京大学医学部泌尿器科・鄭懐穎、東京大学医学部神経内科・大野孝江、同桜井正樹、同金沢一郎、東京都立駒込病院神経内科・岸田修二らとの共同研究である。)

### A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症 (PML) はヒトポリオマウイルス (JCV) によって惹起される中枢神経系での脱髄疾患である。本研究の第一の目的は、Sugimoto ら (1998) が開発した nested PCR (nPCR) を用いて、PML の診断サービスを全国の病院に対して行うことである。Sugimoto らの方法は調節領域を増幅の標的とするため、コンタミによる偽陽性の可能性を排除できる。以下その理由を簡単に述べる。

JCV のゲノムは環状二本鎖 DNA で、DNA 複製開始点 (Ori) を境に初期領域 (左半分) と後期

領域 (右半分) に分けられる (図 1 参照)。初期領域からは調節蛋白 (large T、small t) が作られ、後期領域からはキャプシド蛋白 (VP1、VP2、VP3) とアグノ蛋白が作られる。Ori と後期領域の間に転写調節領域 (以下単に調節領域と呼ぶ) がある。健常人の尿、腎、扁桃から検出される JCV DNA は一定の調節領域 (原型調節領域) を持つ。一方、PML 患者の脳病変部から検出される JCV DNA は多様に变化した調節領域 (PML 型調節領域) を持つ。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) によって患者の体内で作られる。こ

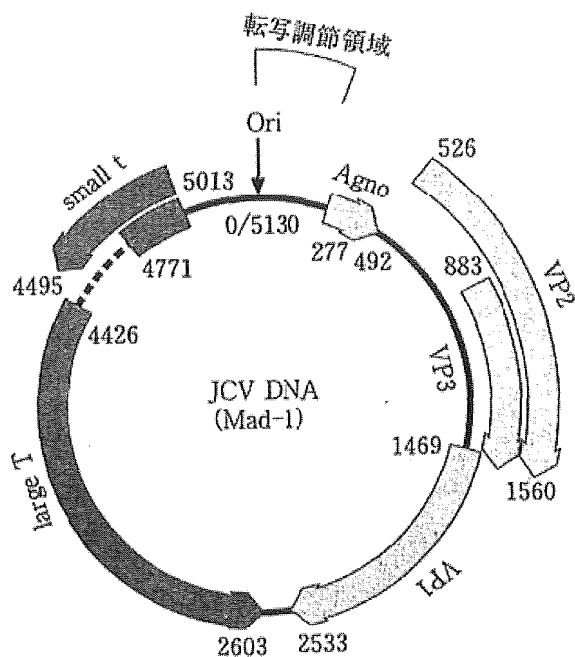


図1 JCVのゲノム構造(本文参照)

の再編成は不規則的に起きるため、PML型調節領域は患者ごとに異なる(Yogo & Sugimoto, 2001)。したがって、PMLのPCR診断において調節領域を標的にすれば、検出されたJCV DNAがPML型かどうか判断できるだけでなく、偽陽性の可能性を排除することもできる。

PMLの発症には、患者の免疫学的な状態に加えて、JCVの遺伝学的な変化が関与していると考えられる。最近我々は、PML患者の脳組織から分離されたJCV DNA(PML型JCV DNA)の主要キャプシド蛋白(VP1)遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が多発していることを見いだした。この変異はVP1蛋白の表面ループ(Liddington et al., 1991)に存在することから、VP1ループ変異と命名された。この変異は非PML患者の尿から分離されたJCV DNAからは検出されない。VP1ループには、細胞レセプターへの結合部位や抗体が認識するエピトープが存在すると考えられていることから、VP1ループ変異はPMLの発症やPMLの進行と関連があると考えられた。VP1ループ変異は3つのループ(BC、DE、HI)に存在する8つの部位で見いだされた。これらの変異が全て生物学的な意義を有するかどうかを明らかにするために、新たに

26名のPML患者の脳組織または髄液からVP1ループ変異の検出を行い、検出されたVP1ループ変異の部位特異性とアミノ酸特異性を解析した。また、PMLの病態進行とVP1ループ変異との関係も解析した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

**PCR診断:** 髄液からのDNA抽出はスマイテスト EX-R&D(ゲノムサイエンス研究所)を用いて行った。髄液を100 $\mu$ lずつ6本のマイクロチューブに分注し、以下キットの指示にしたがって処理した。脳組織からのDNA抽出は組織を鋏で細断し、SDSの存在下、56 $^{\circ}$ C、1時間プロテイナーゼKで消化した。その後、フェノール抽出、クロロホルム抽出を行い、最後にエタノール沈殿によりDNAを回収した。

**VP1ループ変異の解析:** PML患者の髄液と生検または剖検脳組織から抽出され、凍結保存されていたDNAを用いた。長期生存した2症例(患者1と2)においては、剖検で得たいろいろな脳領域から抽出されたDNAを用いた。患者1の基礎疾患はWiskott-Aldrich syndromeであった。PMLと診断されてから4年後に死

亡したが、その間、脱髄病巣は脳全体に拡大した。患者2はHIV陽性であり、PMLと診断されてから2年後に死亡した。その間、HAART療法が奏功し、病巣の拡大は停止した。

## 2. PCR 診断法

nested PCR (nPCR)は既に報告された方法(Kato et al., 2004)により行った。ただし、各検体に対して6回ずつnPCRを行った。増幅断片を直接またはクローニングを経てシーケンシングした。クローニングは既報の方法(Sugimoto et al., 1998; Kato et al., 2004)により行った。シーケンシングにはキャピラリー式自動シーケンサー Applied Biosystems 3130)を用いて行った。

## 3. VP1 ループ変異の解析

脳組織DNAからのVP1領域の増幅には標準PCRを、髄液DNAからの増幅にはsemi-nested PCRを用いた。増幅断片をクローニングし、得られたクローンをシーケンシングした。得られた塩基配列をアミノ酸に翻訳し、原型JCV(健常人の尿から検出されたJCV)のVP1アミノ酸配列と比較した。なお、PCRのエラーによる変異を除外するために、検体当たり2回のPCRを行い、各PCR産物当たり2個のクローン(検体当たり4クローン)をシーケンシングした。4クローンに共通して認められた変異をVP1ループ変異とみなした。

(倫理面への配慮)

本研究ではウイルス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。

## C. 研究結果

### 1. PCR 診断

平成17年2月から平成18年1月までに57名の患者の髄液と1名の患者の脳生検からJCV調節領域の検出を試みた。その結果、7名(J48~J53、J55)の髄液と1名(J54)の脳生検からJCV調節領域が検出された(表1)。JCV調節領域が検出された8名の患者の基礎疾患はエイズ(4名)、腎不全(1名)、SLE(1名)、サルコイドーシス(1名)、悪性リンパ腫疑い(1名)であった。

髄液または脳生検より検出されJCV調節領域(図2)は全て原型調節領域から欠失と重複により作られた再編成型であった。いずれもユニークな構造を有しており、過去に検出された調節領域とは一致しなかった。J48とJ52以外の患者の髄液からは1種類の調節領域が検出された。J48からは2種類、J52からは3種類の、互いに関連した調節領域が検出された。J49とJ55から検出された調節領域は欠失のみを有した。

### 2. VP1 ループ変異

今回VP1ループ変異が検出された例数と以前検出された例数(Zheng et al., 2005)とを合計した(以下同様)。脳組織における検出率は19/24(79%)、髄液における検出率は17/21(81%)であった。VP1ループ変異の検出率は脳組織と髄液の間で有意な差はなかった。

VP1の各部位で検出されたVP1ループ変異を表2にまとめた。VP1ループ変異が起きる部位は、BCループ内の4ヶ所(L55、K60、S61、D66)、DEループ内の1ヶ所(S123)、HIルー

表1 JCV DNAが検出された患者の基礎疾患

基礎疾患	患者数	患者コード
エイズ	4	J48、J50、J51、J52
腎不全	1	J49
サルコイドーシス	1	J53
SLE	1	J54*
悪性リンパ腫疑い	1	J55
合計	8	

\*脳生検から検出された(他は髄液から検出された)。

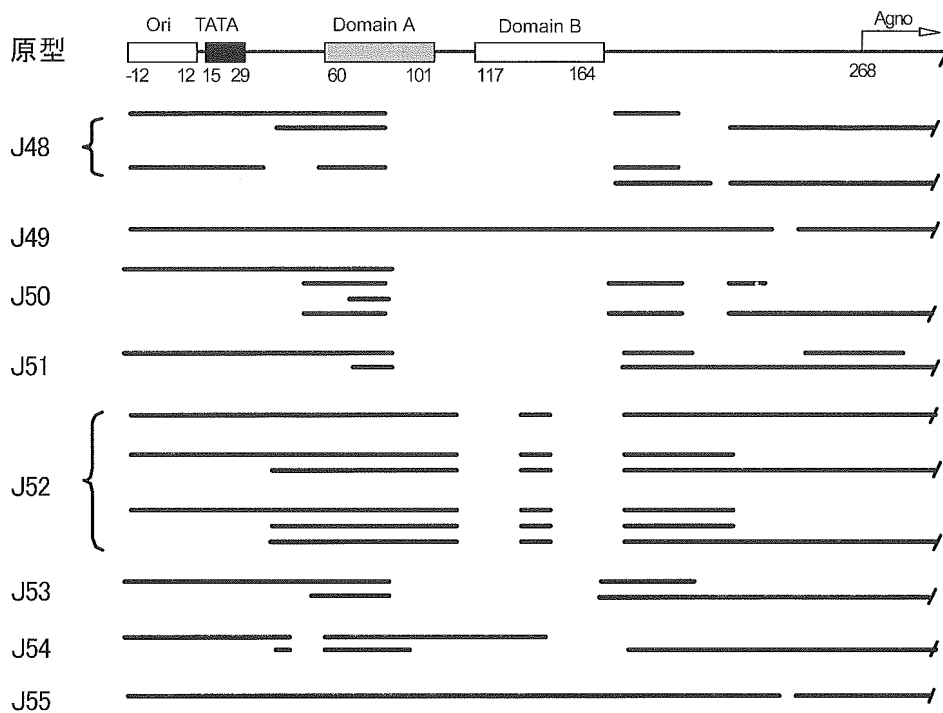


図2 髄液から検出された JCV DNA 調節領域の構造。

最上部に原型調節領域を示す。Ori は DNA 複製の開始点、TATA は TATA 配列を表す。また、アグノ蛋白 (Agno) の翻訳開始部位を示す。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。数字はヌクレオチド番号を示す。

表2 各部位で検出された VP1 ループ変異の数

アミノ酸残基 (ループ)	L55 (BC)	K60 (BC)	S61 (BC)	D66 (BC)	S123 (DE)	N265 (HI)	S267 (HI)	S269 (HI)	計
検出数	7	4	2	4	3	4	6	10	40

今回検出された件数と以前検出された件数 (Zheng et al., 2005) とを合計した (以下同様)。

プ内の 3 ヶ所 (N265、S267、S269) であった。変異は各部位で複数回 (2 回～10 回) 起きた。最も変異が起きやすい部位は S269 であった (10 回)。L55 (7 回)、S267 (6 回) がそれに続いた。なお D66 での変異 (D66H) は、唯一の抗原性変異株として知られる PML 型 JCV (Mad-11) で認められた変異である。

一般に、コドンの 1 つの塩基が別の塩基に置換されると、対応するアミノ酸も別のアミノ酸に置換されることがある。特に 1 番目と 2 番目の塩基が置換されると、別のアミノ酸に置換されることが多い。ループ変異が認められたコドンにおいて、任意の塩基置換が起きると、4～8 通

りのアミノ酸置換が起きる。しかし、実際には 1～3 種類のアミノ酸置換しか検出されなかった (表 3)。部位を無視して、置換されたアミノ酸を集計したところ、フェニルアラニンへの変化が最も多かった (表 4)。このように、VP1 ループ変異にはアミノ酸特異性があることがわかった。

長期生存したが、病巣が脳全域に拡大した患者 (患者 1) では、全ての脳領域において 1～3 種類のループ変異が検出された。一方、PML が安定化し、病巣の拡大も停止した長期生存患者 (患者 2) では、多くの脳領域で変異は検出されず、一部の脳領域でのみ 1 種類の変異が検出された (表 5)。

表3 塩基置換によって起きうるアミノ酸置換と実際に起きたアミノ酸置換

アミノ酸残基 (VP1 ループ)	コドン (アミノ酸)	1塩基置換により 起きるアミノ酸置換の数	実際に検出された コドン(アミノ酸)	各アミノ酸置換が 検出された株の数
L55(BC)	CUU (L)	6	UUU (F)	7
K60(BC)	AAG (K)	7	AUG (M)	2
			AAC (N)	1
			GAG (E)	1
			UUA (L)	2
S61(BC)	UCA (S)	4	UUA (L)	2
D66(BC)	GAU (D)	8	CAU (H)*	3
			AAU (N)	1
			UGU (C)	3
S123(DE)	UCU (S)	7	UGU (C)	3
N265(HI)	AAC (N)	8	GAC (D)	3
			ACC (T)	1
			UUU (F)	4
S267(BC)	UCU (S)	8	GCU (A)	1
			UUA (L) †	1
			UUC (F)	7
S269(BC)	UCC (S)	6	UAC (Y)	2
			UGC (C)	1

\*抗原性変異株(Mad-11) (Padgett and Walker, 1983)からも検出された。†2ヶ所の塩基置換により生じた。

表4 各アミノ酸置換の発生頻度

置換されたアミノ酸	発生頻度
F	18
C	4
H	3
D	3
M	2
N	2
L	3
Y	2
E	1
A	1
T	1
計	40

各部位で起きたアミノ酸置換(表3)をまとめた。

表5 病態進行とVP1ループ変異との関連

患者	基礎疾患	生存期間*	病態	病巣	各領域で検出されたVP1ループ変異					
					前頭葉	頭頂葉	側頭葉	後頭葉	橋	小脳
1	WAS	4年	進行	拡大	D66H	D66N	D66H	D66H	D66H + K60E	D66H
2	エイズ	2年	安定化	停止	Proto	Proto	Proto + S267F	Proto	Proto	Proto + S267F

\*PML発症後の生存期間。WAS, Wiskott-Aldrich syndrome ; Proto、変異を持たないVP1ループ。

## D. 考察

### 1. PCR 診断

今年度は8症例からJCV調節領域が検出された。それらはいずれも原型から再編成により作られたPML型調節領域であった(図2)。検出された調節領域と同じPML型調節領域は過去に検出されていない(即ち、コンタミネーションの可能性は否定された)。以上により、8症例はいずれもPMLと確定診断された。

今年度、髄液を検査した患者(n=57)のうち、JCV DNA が検出された患者(n=7)の割合は12.3%と低かった。我々は、PMLの可能性が低いと考えられた患者の検体を排除せず、検査依頼のあった全ての検体を検査した。このことが陽性率を著しく低下させた理由の一つと考えられた。しかし、髄液からJCV DNA が検出されるのはPML症例のうち70~80%に過ぎないと報告されている(Gibson et al., 1993; Fong et al., 1995; Cinque et al., 1997)。本年度における我々の診断においても、これと同じ率で偽陰性があったと仮定すれば、髄液からJCV DNA が検出されなかったPML患者が2、3名程度はいたと推定される。実際、脳生検からJCV DNA が検出されたJ54は、最初髄液を検査して陰性だった患者である。基礎疾患、臨床経過、MRI所見などによりPMLが強く示唆されたが、髄液中のJCV DNA が陰性であった症例に対しては脳生検を検討すべきである。

脳生検が侵襲的であるため、施行が困難な場合にどう対応するかという問題が残る。髄液のPCR検査に代わる方法として、髄液からのintrathecalな抗JCV抗体を検出する方法が提案されている(Knowles et al., 1995; Sindic et al., 1997; Weber et al., 1997)。この抗体は中枢神経系において形質細胞に作られる抗体である。PCRでJCV DNAが検出されないPML患者の髄液からintrathecalな抗JCV抗体が検出可能かどうか将来検討する必要がある。

### 2. VP1 ループ変異

VP1 ループ変異の特徴は、変異がVP1 ループ内の複数の部位で起き、また、置換されるアミノ酸も多様であることである。今回、(1)変異が起きる部位は8ヶ所存在すること、(2)これらのいずれの部位でも変異が繰り返し起きていること、(3)各部位において特定のアミノ酸に置換される傾向があることが明らかになった。以上から、8ヶ所での変異は全てが生物学的に重要な意義を有すると考えられた。

本研究において同変異の生物学的な意義を示唆する断片的な知見が得られた。(1)脳と髄液におけるVP1 ループ変異の発生率は約80%と高率ではあったが、100%ではなかった。(2)長期生存した2名のPML患者の解析した結果から、PMLの進行に伴って、VP1 ループ変異を有するJCVが増え、VP1 ループ変異の種類も増えることが示された。以上から、VP1 ループ変異はPMLの発生とは関係ないが、PMLの病態進行に関係することが示唆された。

JCVは単一の血清型からなるが、例外的に抗原性変異を有するPML型株(Mad-11)が古くから知られていた(Padgett and Walker)。この株のVP1にはD66Hというループ変異が存在するが、これと同じ変異が別の2株のPML型JCVからも検出された。以上から、VP1 ループ変異は抗原性を変化させる変異であり、抗JCV抗体の存在下でJCVの持続的な増殖を可能にするという可能性が考えられた。

## E. 結論

平成17年2月から平成18年2月までに47名の患者の髄液と1名の脳生検を検査した。これらのうち7名の患者の髄液と1名の脳生検からJCV調節領域が検出された。検出された調節領域はいずれもユニークな再編成型であったことから、8名の患者はPMLと診断された。

8ヶ所での変異は全てが生物学的に重要な意義を有すると考えられた。VP1 ループ変異は

PML の発生とは関係ないが、PML の病態進行に関係があることが示唆された。VP1 ループ変異は抗原性を変化させる変異でると考えられた。

#### F. 参考文献

- 1) Cinque P, Scarpellini P, Vago L, et al. : Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients : cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. *AIDS* **11** : 1-17, 1997
- 2) Fong IW, Britton CB, Luinstra KE, et al. : Diagnostic value of detecting JC virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol* **33** : 484-486, 1995
- 3) Gibson PE, Knowles WA, Hand JF et al. : Detection of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Med Virol* **39** : 278-281, 1993
- 4) Liddington RC, Yan Y, Moulai J, et al. : Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* **354** : 278-284, 1991
- 5) Kato A, Kitamura T, Takasaka T, et al. : Detection of the archetypal regulatory region of JC virus from the tonsil tissue of patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *J Neurovirol* **10** : 244-249, 2004
- 6) Knowles WA, Luxton RW, Hand JF, et al. : The JC virus antibody response in serum and cerebrospinal fluid in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Diagn Virol* **4** : 183-194, 1995
- 7) Padgett BL, Walker L. : Virologic and serologic studies of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Prog Clin Biol Res* **105** : 107-117, 1983
- 8) Sindic CJM, Trebst C, Van Antwerpen MP, et al. : Detection of CSF-specific oligoclonal antibodies to recombinant JC virus VP1 in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuroimmunol* **76** : 100-104, 1997
- 9) Sugimoto C, Itoh D, Tanaka 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
- 10) Weber T, Trebst C, Frye S, et al. : Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* **176** : 250-254, 1997
- 11) Yogo Y, Sugimoto C. : The archetype concept and regulatory region rearrangement. In *Human polyomaviruses : molecular and clinical perspectives*. Edited by Khalili K, Stoner GL (John Wiley & Sons, New York). pp 127-148, 2001
- 12) Zheng HY, Takasaka T, Noda K, et al. : New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Gen Virol* **86**, 2035-2045, 2005

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ikegaya H, Iwase H, Zheng HY, Nakajima M, Sakurada K, Takatori T, Fukayama M, Kitamura T, Yogo Y : JC virus genotyping using formalin-fixed, paraffin-embedded renal tissues. *J Virol*



- Methods **126** : 37-43, 2005
- 2) Zheng HY, Takasaka T, Noda K, Kanazawa A, Mori H, Kabuki T, Joh K, Oh-ishi T, Ikegaya H, Nagashima K, Hall WW, Kitamura T, Yogo Y : New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Gen Virol **86** : 2035-2045, 2005
- 3) Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Matsushima-Ohno T, Sakurai M, Kanazawa I, Kishida S, Nagashima K, Kitamura T, Yogo Y : Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. Biochem Biophys Res Commun **333** : 996-1002, 2005
- 4) Takasaka T, Goya N, Ishida H, Tanabe K, Toma H, Fujioka T, Omori S, Zheng HY, Chen Q, Nukuzuma S, Kitamura T, Yogo Y : Stability of the BK polyomavirus genome in renal-transplant patients without nephropathy. J Gen Virol **87** : 303-306, 2006
2. 学会発表
- 1) 余郷嘉明 : PMLにおけるJCウイルスゲノムの変異. シンポジウムI : 進行性多巣性白質脳症の新しい展開-PMLが治る時代へ向けて-. 第10回日本神経感染症学会、2005、東京
- 2) 鄭 懷穎, 池谷 博, 高坂友和, 長嶋和郎, 北村唯一, 余郷嘉明. PML型JCウイルスに頻発するVP1ループ変異の解析. 第53回日本ウイルス学会、2005
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## JC virus 感染におけるウイルスタンパク質 agnoprotein と FEZ1 の 相互作用の機能解析に関する研究

分担研究者：長嶋 和郎 北海道大学・人獣リ・分子病態・診断  
研究協力者：鈴木 忠樹 北海道大学・医・分子細胞病理  
研究協力者：澤 洋文 北海道大学・人獣リ・分子病態・診断

### 研究要旨

JC virus (JCV) は、Polyomavirus 科に属する二本鎖環状 DNA ウイルスである。成人では 70%以上が血清の JCV 抗体が陽性であり、多くの人が幼少児期に不顕性感染をしていると考えられている。JCV は悪性腫瘍、Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) 等に罹患し免疫不全状態になると中枢神経系に脱髄病変を生じる進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy : PML) を惹起する。現在、PML に対する有効な治療法は未だ確立されていない。

JCV のゲノムは約 5 kb の二本鎖環状 DNA で、6 つの遺伝子をコードしている。このうち後期転写領域に存在する agnoprotein はウイルス感染にとって必要不可欠な分子であると報告されているが、agnoprotein がどのようにウイルス感染を制御しているのかは不明である。本研究では、JCV agnoprotein のウイルス感染における機能とその分子機構を明らかにするために、Yeast two-hybrid 法を行ない、agnoprotein 結合タンパク質を検索し、ウイルス感染過程における agnoprotein と宿主側のタンパク質の相互作用について分子生物学的、生化学的手法を用いて解析を行った。その結果 JCV agnoprotein はウイルス感染の阻害因子である FEZ1 の機能を FEZ1 と微小管の結合を阻害することにより抑制し、その結果、効率良くウイルスを伝播させることにより、ウイルス感染を制御していることが明らかになった。

### A. 背景および研究目的

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。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。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、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、VP2、VP3、VP1 の合計 6 種類の蛋白をコード

している。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。Polyomavirus family 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。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、Polyomavirus 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 agnoprotein 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。agnoprotein 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 agnoprotein が構造蛋白であるとする報告はない。SV40 や BKV の agnoprotein 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、agnoprotein 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 agnoprotein 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 agnoprotein を発現できない agnoprotein 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、agnoprotein がウイルスの転写や複製に関与するという報告がなされているが、いずれの見解もコンセンサスが得られていない。一方、JCV の agnoprotein 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ことを報告し、また JCV agnoprotein 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。しかし JCV agnoprotein 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。本

研究では JCV agnoprotein のウイルス感染における機能とその分子機構を明らかにするために Yeast two-hybrid 法を行ない、agnoprotein 結合タンパク質を検索しウイルス感染過程における agnoprotein と宿主側のタンパク質の相互作用について分子生物学的、生化学的手法を用いて解析を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 細胞株 :

培養細胞株としてヒト胎児腎臓上皮細胞由来の細胞株 HEK293、HEK293 細胞由来で JCV agnoprotein を Tet promoter の制御下で発現させる 293AG 細胞、ヒト胎児グリア細胞に SV40 を形質転換させた SVG-A、ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞由来の JCV 産生細胞株である JCI、ヒト神経芽細胞腫由来の PC12 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) Yeast two-hybrid assay :

Yeast two-hybrid assay は human brain cDNA library および Matchmaker System 3 を用いて行った。酵母 AH109 細胞に human brain cDNA library および shuttle vector である pGBKT7 に JCV agnoprotein の cDNA を subcloning したものを導入し、陽性クローンを大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換し、sequence を行い、得られた配列は NCBI database の BLAST program を用いて検索を行った。

### 3) 組み換え蛋白の作成 :

agnoprotein は Gateway system を用いて His-tag との融合蛋白として発現 vector である pDEST10 に組み込み、昆虫細胞である Sf9 に導入した。500ml の培養液で育てた Sf9 細胞を遠心後、5 volume の lysis buffer [600mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% (v/v) Triton X-100, 1mM PMSF, and 0.05mg/ml DNase] で溶解し、4°C で 30 分 rotate した。その後 24,000xg、20 分間遠心し、上清を

nickel-chelated Cellulofine column に通して、lysis buffer および buffer(600mM NaCl, 20mM imidazole-HCl, pH 7.5) で洗浄後、elution buffer(600mM NaCl and 200mM imidazole-HCl, pH 7.5) で溶出した。さらに The 抗 agnoprotein 抗体を conjugat した sepharose resin と混和し、4°Cで一晩 rotate した。その後 resin を TBS-T buffer[50mM Tris-HCl(pH 7.5), 140mM NaCl, 0.05% Tween-20]で洗浄し、buffer(0.1M Glycine-HCl, pH 2.8)出溶出した後、0.1 volume の 1M Tris-base で中和し、TBS にて透析を行った。

#### 4) 一次抗体 :

抗 SV40 large T antigen (Ab-2)、抗  $\gamma$ -tubulin、抗 pan-actin (MAB1501R)、抗 MAP2 (clone AP-20)、抗 Flag (M2) and horseradish peroxidase-conjugated monoclonal 抗体、抗 GST polyclonal 抗体は購入した。抗 JCV agnoprotein、抗 JCV VP1 抗体は当研究室で作成したものを用いた(16)。

#### 5) 細胞への plasmid の導入と immunoblotting

細胞への遺伝子導入は lipofectamine 2000 を用いて行った。遺伝子導入後 24-48 時間後に細胞を回収して Immunoblotting に用いた。細胞は RIPA buffer[10mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM NaF, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]と Complete protease inhibitor cocktail を混和した buffer で溶解し、15,000xg、4°C15 分間遠心後、上清を回収して細胞抽出液とした。細胞抽出液は Protein assay にてタンパク質濃度を測定し、20  $\mu$ g のタンパクを含有する細胞抽出液を SDS-PAGE にて泳動後、blotting buffer (12.5mM Tris-HCl, 96mM glycine, 20% methanol)を用いて Immobilon-P Transfer Membrane[polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane]に転写した。その後 PVDF 膜は、5% non-fat dry milk 添加 TBS-T buffer にて

30 分間ブロッキングした後に一次抗体を反応させた。その後 TBS-T buffer で洗浄し、二次抗体である Goat anti-Mouse Immunoglobulin または Goat anti-Rabbit Immunoglobulin を室温で 1 時間反応させた。反応後、再度 TBS-T buffer で洗浄し、ECL Western blotting detection reagents を用いて発色させ Luminoimage analyzer で検出した。

#### 6) 免疫蛍光染色

細胞は 3% paraformaldehyde/PBS で固定した後 0.1% Triton X-100 in PBS で permeabilize し、5% skim milk/PBS 存在下で室温にて incubate した。その後 PBS で一度 PHEM buffer (60mM PIPES[piperazine-N, N9-bis(2-ethanesulfonic acid)], 25mM HEPES, pH 6.9; 10mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>)で二度洗浄し、氷上で 0.2% Saponin in PHEM buffer で 3 分間処理した。Detergent に不溶であった cell components を PHEM buffer で洗浄した後 methanol で -20°C、4 分固定した。処理した細胞はその後一次抗体と incubate した後、二次抗体 (Alexa 488- or Alexa 594-labeled goat antibodies to rabbit immunoglobulin G もしくは Alexa 594-labeled goat antibodies to mouse immunoglobulin G) と反応させ、propidium iodide (0.2  $\mu$ g/ml) で核染を行い、confocal laser-scanning microscope で観察した。

#### 7) GST precipitation assay

FEZ1 と GST の融合蛋白およびその deletion mutants は大腸菌 AD494 DE3 株で発現させ、glutathione-Sepharose 4B beads を用いて単離した。*in vitro* GST precipitation assay では GST もしくは GST 融合蛋白 (50pmol) を 10  $\mu$ l の histidine-tagged agnoprotein と混和し、binding buffer[10mM Tris-HCl(pH 7.4), 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.5mM PMSF]と Complete protease inhibitor cocktail を混和した溶液中で 4°C で 1 時間 incubate した。さらに 10  $\mu$ l の 50% (v/v)