博士（医　学）　宍　戸　由紀子

学 位 論 文 題 名

遺伝子組み替えによるJC virus偽ウイルス粒子の作成

学位論文内容の要旨

I 研究目的

JC virus (以下JCV)はヒト脱髄性疾患である進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスであるが、宿主域が狭く、JCVを増殖させる適当な細胞系が無いためJCVの研究にとって大きな障害であった。そこで遺伝子工学の手法を用いて人工的に偽JCVを作成することを試みた。ベクターとしてpcDL-SRα296を用い、COS7細胞にトランスフェクションする実験系を組み、JCVの種々の組み替えコンストラクトを作成して発現させた結果、極めて効率の良い人工的偽ウイルス粒子形成を確立したので報告する。

II 研究方法

1．細胞とウイルス：ウイルスはJCV Tokyo-1株を用い、細胞としてはサル腎細胞を、複製開始点を欠失したSV40DNAで形質転換させて恒常的にSV40 large T抗原を発現するようになったCOS7細胞を用いた。

2．組み替えプラスミドの作成：COS7細胞での発現を考慮して、発現ベクターとしてSV40の初期プロモーターとHTLV-Iのlong terminal repeat (LTR)とで構成されるキメラプロモーターであるpcDL-SRα296を用いた。

VP1-SRα：VP1のopen reading frameをN端側のprimerには *Bam*HI 認識部位を付加した領域、C端側のprimerには*Kpn*I認識部位を付加した領域をpolymerase chain reaction (PCR)にて増幅した。PCR増幅産物をpUC19 *Hinc*II部位にサブクローニングし、これをpcDL-SRα296 の*Pst*I と*Kpn*I 部位にサブクローニングした。同様の方法でVP23を発現するベクターVP23-SRα (VP23)、agnogeneのATGコドンからVP23を連続して発現させるAgnoVP23-SRα (AgnoVP23)、VP1の全後期蛋白（late proteins: LP)を翻訳する領域に当たるプラスミドLP-SRα (LP)、及びVP231を発現するVP231-SRα (VP231)を作成した。VP231-SRα は N端がtruncateされたagnogeneと VP2/VP3およびVP1を組み込んだベクターである。

3．トランスフェクション：プラスミドはLipofectamine法を用いてCOS7 細胞にトランスフェクトした。

4．抗体：VP1の発現を検出する方法として JCVを初代ヒト胎児グリア細胞の培養にて増殖させ、ウサギに免疫して得た抗JCV抗体　を用いた。抗体はVP1エピトープを認識するがagnoprotein、VP2 や VP3とは反応しない。

5．間接蛍光抗体法：トランスフェクション後72時間目のCOS7細胞を抗JCV抗体と37°C1時間反応させ、FITC-標識抗ウサギ抗体にて37°C1時間反応させ、蛍光顕微鏡

にて観察した。
6． 共焦点レーザー顕微鏡観察：細胞核を描出するため抗核抗体としてSLE患者血清を使用し、二次抗体に rhodamine- 標識抗ヒト IgG を用い、さらに上記抗JCV抗体との二重染色標本を Confocal Laser Scan Microscope にて観察した。
7．Radioimmunoprecipitation (RIP)：トランスフェクション 後60時間目の細胞を ^{35}S Protein Labeling Mixにてラベルし、 抗JCV抗体との抗原抗体複合物をprotein A-Sepharose beads で吸着して、 fluorography 用に処理したゲルを Kodak X-OMATAR filmに -80℃で露光し、標識した蛋白を検出した。
8． 電子顕微鏡観察：VP231-SRαをCOS7細胞にトランスフェクション後72時間目の細胞を固定し、 epoxy resinに包埋し、 H-800 電子顕微鏡にて観察した。

III 結 果
1．ＶＰ1の核移行：VP1-SRαをトランスフェクトしたCOS7細胞ではVP1の発現はほとんど細胞質に留まっており、稀にしか核内には見られなかった。これに反し ＬＰ-SRαをトランスフェクトした細胞では48時間後にはVP1は核にのみ認められた。抗JCV抗体をFITCラベル抗体でgreenに、抗核抗体をrhodamineラベルでorangeに発色させ共焦点レーザー顕微鏡にて観察すると、VP1-SRαをトランスフェクトした細胞ではVP1はほとんどが細胞質内に存在しgreenの蛍光を発していたが、LP-SRαをトランスフェクトした細胞では核内に存在しており、このため核のorange色と重なりyellowの蛍光を発していた。VP231-SRαをトランスフェクトした細胞ではVP1は核内に局在し、かつ多数の細胞が陽性となっていた。
2．VP231-SRαによるVP1の発現量 ：RIPにてVP1の発現を調べると約 43 kDaの分子として認められた。 VP231-SRαで強い陽性バンドが検出され、種々の組み合わせの内でVP231-SRαの場合に最もVP1の発現量が高い事が判明した。
3.JCウイルス粒子の超微形態学的検索：VP1の発現量が最も著明となるVP231-SRα-をトランスフェクトしたCOS7細胞を対象に電顕的検索を行うと、細胞の核内に太さ約 30 nmのフィラメント状の形態を示すものと直径約40 nm大の円形粒子とが認められ、この超微形態像はTokyo-1株を初代ヒト胎児グリア細胞にて感染させた時の所見と全く同一の形態であった。

IV 考 察：蛋白が核に移行するには特別のアミノ酸配列が必要で、この配列は核移行シグナル(nuclear localization signal : NLS) と呼ばれている。JCVのVP1は SV40 VP1-のNLS とほとんど同じであるが、ただ8番目のアミノ酸一個がSerからGluに代わった配列である。それにもかかわらずJCVのVP1の核への移行率は極めて低く、VP2/VP3-と一緒に発現させてはじめて効率良く核に移行していた。

発現量を比較するとLP-SRα ではVP1の発現が極めて低いのにVP231-SRαではかなりの量のVP1発現が得られるという現象が生じた。LP-SRαとVP231-SRαとの構築の差は前者には完全なagnogeneが存在し、後者にはtruncateされたagnogeneが存在するという違いだけであり、agnogeneとその産物であるagnoproteinの機能と関係しているのではないかと推測される。

JCVの粒子形成機構は未だ十分に解明されていないが、今回の実験からVP231-SRαをCOS7細胞に発現させることにより電子顕微鏡で見ても従来報告されたきたウイルス粒子と同じ粒子ができることが示された。しかし、実際に形成された粒子に

はcoreのnucleocapsidsが存在するのか、外郭のみからなるempty particleなのか、それとも形成された粒子がSV40とJCVとのキメラウイルスであるか等の問題は今後の重要な研究課題と思われた。

V　結　　語：今回の実験でVP231-SRαで発現させたVP1蛋白は容易に核内に移行し、十分量の蛋白として翻訳され、そして超微形態学的にも同一の粒子が観察されたことより、SRαとCOS7細胞の系でJCVの人工（偽）ウイルス粒子形成法を確立できた。

学位論文審査の要旨

主 査　教 授　柿 沼 光 明

副 査　教 授　吉 木　　敬

副 査　教 授　高 田 賢 藏

学 位 論 文 題 名

遺伝子組み替えによるJC virus偽ウイルス粒子の作成

JC virusは進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスであり、強い神経向性を示す。約5.1kbpの二本鎖環状DNAを持ち、制御領域(regulatory region)を境界に早期蛋白としてLarge T抗原とsmall t抗原が、後期蛋白としてagnoprotein、VP1、VP2及びVP3がコードされている。また、SV40とは約70%のhomologyを有している。本ウイルスの宿主域は狭く、それを増殖させる適当な細胞系が無いことは、JC virusの研究にとって大きな障害であった。

一般にpolyomaウイルス属は、感染細胞に吸着、侵入した後、細胞核にて脱核しウイルス遺伝子を放出する。まず、早期蛋白であるLarge T抗原とsmall t抗原が発現され、これらの蛋白は細胞核に移行してウイルス遺伝子の複製を促進する。その後、後期蛋白であるagnoprotein、VP1、VP2及びVP3が発現され、細胞核に移行しウイルス粒子を形成すると言われているが、その詳細は明らかにされていない。

そこで、遺伝子工学的に強力な発現系を用いて、人工的に偽ウイルス粒子を作成することを試みた。そのためには、ウイルスの主要外郭蛋白であるVP1が充分量発現され、効率よく細胞核に移行し、ウイルス粒子を形成する系を確立することが必要となる。本研究では、そうした偽ウイルス粒子を短期間で効率よく産生するシステムを確立することに成功した。

材料と方法として、ウイルスはJC virus Tokyo-1株 (Nagashima et. al., Acta Path Jpn 1981, Matsuda et.al., Virus Res 1987) を使用した。発現系は、COS7細胞 (Gluzman, Cell 1981)とpcDL-SRα296 (Takebe et.al., Mol Cel Biol 1988)を使用した。pcDL-SRα296はHTLV-1のLTRとSV40のearly promoterのキメラからなる転写要素を持ち、SV40のT抗原をstableに発現するCOS7では効率の良い発現が期待される。抗体はJC virusをウサギに免疫し作成した、抗JC virus抗体を使用した。この抗体はVP1エピトープは認識するが、agnoprotein、VP2、VP3のエピトープは認識しない。発現したウイルス蛋白は、間接蛍光抗体法、共焦点レーザー顕微鏡観察、放射性標識免疫沈降法、電子顕微鏡観察にて検索した。

結果、JC virusの主要外郭蛋白であるVP1は、単独で細胞核へ移行はするものの、その移行の効率は非常に悪かった。他の構造蛋白が存在してはじめてVP1は効率よく核へ移行した。また、VP1の核移行にはVP2のC末端、又はVP3が共同して働くことが強く考えられた。agnoproteinは関与しないことが明らかとなった。

また、agnoproteinの開始コドンを含む5'末端137bpを欠失することにより、VP1の発現は劇的に増加したことから、VP1の発現には制御領域(regulatory region)以外にも、その発現

を制御する配列のあることが、強く示唆された。即ち、agnoproteinがその下流の蛋白の発現を制御している可能性がある。

VP231-SRαは、agnoproteinの一部とVP2/VP3、及びVP1のopen reading frame(ORF)をSRα下流に組み込んだコンストラクトである。VP2/VP3をコードしているため、VP1は効率よく細胞核に移行する。また、agnoproteinの開始コドンを含む5'末端137bpを欠失しているため、充分量のVP1を発現する。VP231-SRaをトランスフェクトしたCOS7細胞の細胞核を電子顕微鏡にて観察すると、無数の偽ウイルス粒子が認められた。

考察として、JC virusの粒子形成機構の研究において、SV40をかなり参考にしたが、SV40 VP1とほぼ同様の核移行シグナルを有しているにもかかわらず、この実験系ではJC virus VP1の核移行は効率が悪かった。その点、単独でも効率よく核に移行するSV40 VP1とは異なる。

後期蛋白の転写、翻訳についても、SV40の報告を参考にすれば、JC virusでも19s mRNAと16s mRNAが合成され、前者からはagnoproteinとVP2、VP3が、後者からはagnoproteinとVP1が発現されると考えられる。本研究では16s mRNAにおいてagnoproteinがリーダー配列としてVP1の発現を制御することが強く示唆された。

本研究はJC virus粒子を人工的に形成する事をはじめて確立したもので、博士（医学）の学位に値するものと判定した。