

学 位 論 文 題 名

Identification of FEZ1 as a protein that interacts
with JC virus agnoprotein and microtubules:
role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1
from microtubules in viral propagation.

(JC ウイルス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)

学位論文内容の要旨

緒言

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。

材料と方法

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。

結果

Human adult brain cDNA library から Yeast two-hybrid 法を用いて、神経軸索伸長因子である Fasciculation and elongation protein zeta-1(FEZ1)を agnoprotein 結合タンパク質として同定した。FEZ1 は、*Caenorhabditis elegans* UNC-76 のホモログとしてクローニングされた分子で、PKC zeta の下流で神経突起の伸長に関与していることが報告されている。FEZ1 の mRNA の発現をノーザンブロット法、および RT-PCR 法により検討すると、FEZ1 の発現は中枢神経、特に神経細胞で高いが、JCV 感受性細胞であるグリア細胞では FEZ1 の発現は低い傾向が認められた。

次に agnoprotein と FEZ1 の結合を、培養細胞の抽出液を用いた免疫沈降法により

確認した。さらに共焦点顕微鏡を用い両者の細胞内局在を観察を行い、agnoprotein と FEZ1 は核周囲領域において共局在することを見出した。

次に Agnoprotein は核周囲領域で微小管と結合することが報告されていることから (J Neurovirol 9: 10, 2003)、agnoprotein と FEZ1、微小管の 3 者の関係性について検討を加えた。昆虫細胞を用いた発現系により組み換え agnoprotein を作成、精製し、大腸菌を用いた発現系により組み換え FEZ1 を作成、精製した。これらの精製タンパク質を用いて agnoprotein および FEZ1 と微小管との結合性を微小管共沈法により検討したところ、両者はいずれも直接微小管に結合していることが示された。また、agnoprotein は FEZ1 と微小管との結合に対して競合的に作用し、FEZ1 を微小管から解離させた。FEZ1 deletion mutant の組み換えタンパク質を精製し、FEZ1 に対する agnoprotein と微小管の結合領域を検索したところ、agnoprotein は、FEZ1 のコイルドコイル領域に結合したが、微小管はカルボキシル末端付近に結合した。さらにカルボキシル末端部のみからなる FEZ1 の組み換えタンパク質は、微小管には結合するが agnoprotein により微小管から解離することはなかった。このことより、agnoprotein が FEZ1 のコイルドコイル領域に結合することにより FEZ1 のカルボキシル末端部の高次構造が変化し、微小管への結合性が失われている可能性が考えられた。

さらに、FEZ1 の生理的機能である神経突起伸長作用に対して agnoprotein が、どのように作用するかを、PC12 細胞を用いた実験系により検討したところ、agnoprotein は、FEZ1 の神経突起伸長作用を阻害することが判明した。

最後に FEZ1 と JCV 感染の関係性について検討するために外来性に FEZ1 を過剰発現する細胞株を樹立し、感染実験を行った。FEZ1 過剰発現細胞ではウイルス粒子の形成、ウイルスのプロモーターの転写活性には影響を与えなかったが、ウイルス粒子の局在が核に局限しており、感染後期において JC ウイルスの伝播が阻害されていた。

考察

ウイルスタンパク質 agnoprotein と Yeast two-hybrid 法により同定された神経軸索伸長因子 FEZ1 の相互作用は、FEZ1 と微小管との結合の解離により FEZ1 の機能を阻害した。また、FEZ1 は、ウイルス粒子の細胞内輸送を阻害することによりウイルス感染を阻害した。JC ウイルス感受性細胞において FEZ1 の発現が低いことも考慮すると、FEZ1 は、神経軸索伸長という現象のみならず、ウイルス粒子の細胞内輸送の抑制によるウイルス感染の阻害という現象に対しても重要な役割を担う分子であることが示唆された。JCV の 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予想された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 瀬 谷 司

副 査 教 授 志 田 壽 利

学 位 論 文 題 名

Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JC virus agnoprotein and microtubules: role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1 from microtubules in viral propagation.

(JC ウイルス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)

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。

Human adult brain cDNA library から Yeast two-hybrid 法を用いて、神経軸索伸長因子である Fasciculation and elongation protein zeta-1(FEZ1)を agnoprotein 結合タンパク質として同定した。次に agnoprotein と FEZ1 の結合を、培養細胞の抽出液を用いた免疫沈降法により確認した。さらに共焦点顕微鏡を用い両者の細胞内局在の観察を行い、agnoprotein と FEZ1 は核周囲領域において共局在することを見出した。次に agnoprotein および FEZ1 と微小管との結合性を微小管共沈法により検討したところ、両者はいずれも直接微小管に結合していることが示された。また、agnoprotein は FEZ1 と微小管との結合に対して競合的に作用し、FEZ1 を微小管から解離させた。最後に FEZ1 と JCV 感染

の関係性について検討するために外来性に FEZ1 を過剰発現する細胞株を樹立し、感染実験を行った。FEZ1 過剰発現細胞では感染後期において JC ウイルスの伝播が阻害されていた。JC ウイルス感受性細胞において FEZ1 の発現が低いことも考慮すると、FEZ1 は、ウイルス粒子の細胞内輸送の抑制によるウイルス感染の阻害という現象に対して重要な役割を担う分子であることが示唆された。JCV の 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予想された。以上の学位論文の発表内容に対し、志田壽利教授から agnoprotein 欠損ウイルスを用いた遺伝子導入実験の結果と FEZ1 による感染阻害との関係性について、FEZ1 の *in vivo* での発現と JCV 感染細胞との関係性について、Yeast two hybrid 法で得られた他の候補遺伝子と agnoprotein との関係性についての質問があった。次いで瀬谷司教授から LT や VP1、agnoprotein の細胞内局在の細胞特異性について、他のウイルスでの核から細胞質へのウイルス粒子移行の報告の有無についての質問があった。最後に、笠原正典教授から FEZ1 の過剰発現によるウイルスタンパク質低下の機序について、agnoprotein と相互作用する分子の agnoprotein 上の結合部位について、FEZ1 と他のウイルスとの関係性について、PML の治療法を含めた今後の展望について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去の実験データや参考文献を引用し、志田教授の質問に対しては、agnoprotein 欠損ウイルスの実験においてはウイルスの増殖が遅く mRNA を検出する実験系のみでしか評価することができず実際にウイルス感染がどの段階で抑制されているのかを検討していないが、SV40 の agnoprotein 欠損ウイルスにおいてみられる現象を考慮すると今回報告した FEZ1 を過剰発現した細胞で見られた現象と同様の現象が起きていたと考えられるということ、*in vivo* での FEZ1 の発現細胞については FEZ1 の発現は主に神経細胞で見られ、JCV が感染するグリア細胞においては、ほとんど発現がみられず、*in vivo* においても FEZ1 の発現と感染細胞との関係は *in vitro* で見られた関係性と同様であること、他の agnoprotein の相互作用因子と agnoprotein の関係性については、agnoprotein の局在によって、相互作用因子が異なる可能性があるかと解答した。また、瀬谷教授の質問に対しては、それぞれのウイルス蛋白の局在は、どんな細胞においても同様であること、他のウイルスについては、ヘルペスウイルスや SV40 など核から細胞質へのウイルス粒子の輸送についての報告があることを解答とした。笠原教授の質問に対しては、タンパク質の発現低下は、感染率の減少と非常に良く相関していることから、感染の拡大の抑制が機序として考えられること、agnoprotein の相互作用因子の agnoprotein 上の結合部位の同定は、現在試行中であること、FEZ1 と他のウイルスとの関係性については、HIV で報告があること、今後 FEZ1 を標的としたウイルス感染症の治療法の開発が期待されることを解答とした。

この論文は、JCV の機能未知タンパク質であった agnoprotein の機能を分子細胞生物学的に明らかにした点で高く評価され、ウイルス感染機構の更なる解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。