

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790429

研究課題名(和文)ポリオーマウイルスの新たな遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of JC virus late gene expression

研究代表者

大場 靖子 (ORBA, Yasuko)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教

研究者番号：60507169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトポリオーマウイルスであるJCウイルス(JCV)の後期遺伝子からは、pre-mRNAとして機能する長鎖のRNAが転写されており、新たに判明したスプライシング様式により転写後調節されて後期タンパク質を発現する成熟mRNAが産生されることが明らかとなった。後期遺伝子pre-mRNAの特殊なスプライシングは、後期タンパク質の発現やウイルス増殖に必要であることも判明した。本研究で判明した後期遺伝子の転写後調節機構は、JCVの細胞内増殖機構の解明につながる新たな知見となった。

研究成果の概要(英文)：JC virus(JCV) late transcripts, which produce agnoprotein, VP1, VP2, and VP3, are polycistronic mRNAs and processed by alternative splicing. We found that JCV late transcripts are processed into mature mRNAs using a unique splicing mechanism. Analysis of virus infection using JCV genomes with splice site mutations indicated that the identified splicing mechanism is necessary for efficient production of late proteins and viral infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：JCウイルス RNA 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

JC ウイルス (JCV) はヒト大脳に脱髄病変を惹起する進行性多巣性白質脳症 (PML) の原因ウイルスである。PML は免疫不全状態の患者において発症する致死性の疾患であり、基礎疾患は Human immunodeficiency virus (HIV) 感染症である後天性免疫不全症候群 (AIDS) が多くを占める。近年では生物学的製剤の副作用としての PML が発生しており、モノクローナル抗体製剤使用患者における PML 発症が報告されている。PML の有効な治療法は未だ確立されておらず、AIDS に伴う PML の場合、highly active antiretroviral therapy (HAART) による免疫賦活療法により症状の改善が見られる場合があるものの、無効例や症状の憎悪例も存在する。このため免疫賦活療法に加えた新たな抗 JCV 薬の開発が早急に望まれる。

JCV はポリオマウイルス属に属する 2 本鎖環状 DNA ウイルスで、種特異性、細胞特異性が強く、ヒト脳内のオリゴデンドロサイトで選択的に増殖する。培養細胞系においては、IMR-32 細胞、primary human fetal glial (PHFG) 細胞等の一部の神経系細胞でのみ増殖する。これらの細胞特異性を決める要因は未だ明らかではなく、ウイルスの増殖規定因子を解明することが JCV 感染細胞を標的とした治療法の開発のために重要と考えられる。これまでの研究で、JCV の受容体 (-2,6-シアル酸、セロトニン受容体) や、JCV の遺伝子転写活性を亢進する細胞内因子についての報告はあるが、JCV 感染の細胞特異性を決定付ける因子は未だ明らかとなっていない。感染規定因子は単一ではなく、ウイルスが細胞内に侵入後、早期および後期遺伝子の転写、翻訳、ウイルスゲノム複製過程に関与する細胞内因子が増殖を規定していると考えられている。本研究では、ウイルス後期遺伝子の転写後調節機構に着目し、JCV の細胞内増殖機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究は、JCV 遺伝子の新たな転写後調節機構を明らかにし、宿主細胞内におけるウイルス増殖の制御機構を解明することを目的とする。

(1) JCV 後期遺伝子の転写産物である長鎖 RNA の機能を明らかにし、それらが宿主細胞内にてウイルス遺伝子発現を制御するメカニズムを解明する。明らかとなった増殖制御機構に関わる細胞内因子を標的にして、ウイルス増殖抑制効果を検討し、PML の治療法を開発するための基盤を確立することを目的とする。

(2) ウイルス遺伝子の発現に関わる宿主細

胞内因子を網羅的に探索するため、ウイルス増殖を容易に検出可能な GFP レポーターウイルスゲノムを作製し、siRNA ライブラリーを用いた網羅的解析により JCV 増殖規定因子の探索を行う。結果を基に増殖規定因子を標的としたウイルス増殖抑制法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ウイルスゲノム由来長鎖 RNA の解析

約 5 kb の 2 本鎖環状 DNA からなるポリオマウイルスゲノムは、両方向性のプロモーターである転写調節領域 (TCR) をはさんで早期方向に large T antigen (TAg), small t antigen (tAg) などの早期タンパク質をコードし、後期方向には Agnoprotein、カプシドタンパク質である VP1、VP2、VP3 をコードしている。早期、後期遺伝子のコーディング領域は逆鎖上になっていることになり、それぞれの 3' 端には polyA シグナルがみられる。これまでの研究から、ウイルス感染細胞内ではこれらの polyA シグナルで終結する mRNA 以外に、後期遺伝子方向にゲノムを一周以上にわたり転写される 5 kb 以上の長さを持つ RNA が存在することを RT-PCR 法にて確認している。

この長鎖 RNA の発現を確認するため、早期遺伝子および後期遺伝子の転写産物に対するアンチセンスおよびセンス RNA プロンプを作成し、JCV を感染させた IMR-32 細胞より抽出した RNA を用いてノーザンブロット法により長鎖 RNA を含むウイルス由来 RNA の検出を試みた。

また、長鎖 RNA の配列構造を明らかにするため、感染細胞由来の RNA を用いて、RT-PCR により遺伝子増幅後シーケンス解析を行った。また、5'-または 3'-RACE 法により長鎖 RNA の末端配列を増幅しシーケンスにより解析を試みた。

JCV 感染細胞由来の RNA を用いて、後期 mRNA のスプライシングパターンをシーケンスにより詳細に解析し、長鎖 RNA が後期遺伝子の pre-mRNA として機能する可能性を検討した。

新たに判明したスプライシングパターンがウイルス後期 mRNA の産生、後期タンパク質の発現、ウイルス増殖に与える影響を検討するため、JCV Mad1 株の 2 か所のアクセプター配列に PCR により変異を導入したウイルスゲノムを作製した。野生株および変異体 JCV ゲノムを IMR-32 細胞に導入し、経時的に RNA、タンパク質を回収し、定量 PCR にてウイルス mRNA 発現量の解析、イムノブロット法によりタンパク質発現量を解析した。

(2) GFP レポーターウイルスゲノムの作製

ウイルス遺伝子の発現に関わる細胞内因子を探索するため、siRNA ライブラリーを用いた網羅的解析を行う予定である。JCV の細胞内増殖を容易に検出するため、後期遺伝子の VP1、VP2 領域をそれぞれ GFP 遺伝子に置換したウイルスゲノム、もしくは後期遺伝子領域に GFP 遺伝子を挿入したウイルスゲノムを作成した。これらのレポーターウイルスゲノムを細胞に導入し、各ウイルスゲノム導入細胞における GFP 発現量、ウイルスゲノム複製量、ウイルスタンパク質発現量を解析した。

本研究に用いた遺伝子組換え実験は、「組換え JC virus の作製」という名称にて第二種使用等拡散防止措置承認を北海道大学遺伝子組換え実験等安全委員会から得て行った。

4. 研究成果

(1) JCV 後期遺伝子の新たな転写後調節機構

JCV ゲノムの早期方向および後期方向の転写産物を検出するため、それぞれの鎖に対する RNA プローブを作成し、ウイルス由来 RNA に対するノーザンプロット法を行った。その結果、スプライシングされた早期および後期遺伝子 mRNA 以外に、10 kb 前後の長さの後期方向の RNA を数本検出した。このことから、JCV ゲノムからは、後期方向にゲノムを一周以上にわたって長鎖の RNA が転写されていることが判明した。

この長鎖 RNA をクローニングするために、5'-または 3'-RACE 法により長鎖 RNA の末端配列を増幅しシークエンスにより解析を試みた。その結果、3'端は後期遺伝子 mRNA と同様の polyA site であると考えられた。5'端に関しては、転写調節領域内の数か所の遺伝子部位が検出されたものの同定は困難であった。

後期遺伝子方向の長鎖 RNA が、スプライシング機構により後期遺伝子 mRNA となる前の pre-mRNA である可能性を検討するため、後期転写産物の RNA のスプライシングパターンを詳細にシークエンス解析した。その結果、これまでに知られている後期タンパク質 Agnoprotein、VP1、VP2/3 を産生する mRNA のスプライシングパターン以外に、5'側のエクソン内で約 120bp の繰り返し配列が様々な数で生じている mRNA が産生されていることが判明した。このことから、後期方向の長鎖 RNA は pre-mRNA であり、ほぼウイルスゲノム全長にわたる RNA がスプライシングにより除かれ、その結果一部の領域が繰り返し配列として残ると考えられた。このスプライシングにより出来た mRNA は最終的に 3'側に VP1 もしくは VP2/3 のコーディング領域および polyA 配列を持ち、mRNA として機能していることが示唆された。

新たに判明した後期遺伝子 pre-mRNA の特殊なスプライシングが、ウイルス後期タンパク質の発現、ウイルス増殖に与える影響を検討するため、JCV Mad1 株の 2 か所のアクセプター配列に変異を導入したウイルスゲノムを作製した。

また、IMR-32 細胞で継代された JCV 株では、Mad1 株に比べてより多くの繰り返し配列を持つ mRNA が産生されていることから、ウイルスゲノムの配列を解析した結果、スプライシング領域に 15 塩基の欠失があり、2 か所の内一方のアクセプター配列が機能しないことが予想された。このため、Mad1 株に 15 塩基の欠失変異を導入したウイルスゲノムも作成した。

これらの変異体ウイルスゲノムを IMR-32 細胞に導入し、ウイルス mRNA、タンパク質発現量を継時的に解析した。その結果、2 か所のアクセプター配列の内どちらか一方のみ機能する変異ウイルス (Am1、Am2、Amdel) では野生型 Mad1 株に比べて繰り返し配列の数が増加し、スプライシング効率が上昇した (図 1)。同時に後期タンパク質発現量も増加し (図 2)、感染後 16 日目の細胞での各ウイルスタンパク質発現も野生型に比べ増加した。また、2 か所のアクセプター配列両方が機能しない変異ウイルス (Am1/2、Amdel/1) では、後期ウイルスタンパク質発現が顕著に減少することから、今回判明したスプライシングは後期タンパク質の発現に必要であることが明らかとなった。これらの結果から、本研究で判明した後期遺伝子の特殊なスプライシングは、後期タンパク質の発現に必要であり、ウイルス増殖を亢進させることが明らかとなった。

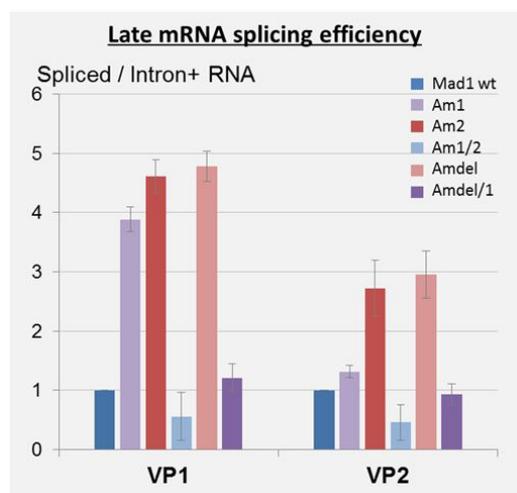


図 1 後期 mRNA のスプライシング効率 アクセプター配列変異ウイルスにおけるスプライシングされた後期遺伝子 VP1 および VP2 の mRNA 量とイントロンを含む pre-mRNA 量の比をグラフに示した。

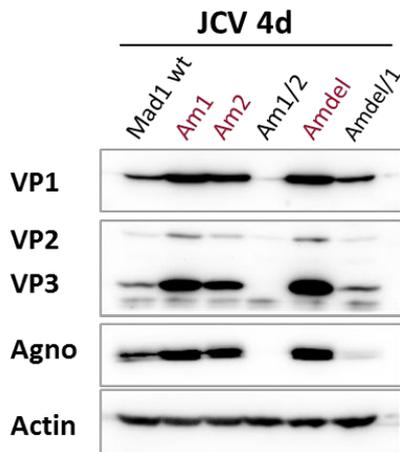


図 2 後期タンパク質発現のイムノプロット解析結果
アクセプター配列変異ウイルス感染後 4 日目の細胞の各後期タンパク質発現。ローディングコントロールとして Actin の発現量を示した。

本研究で得られた後期遺伝子のスプライシングによる転写後調節機構は、JCV の細胞内増殖を規定する新たな因子であることが明らかとなった。

今後、JCV の特殊なスプライシング機構に関わる細胞内因子の探索を行うことで、増殖規定因子を標的とした JCV 増殖抑制法の開発を試みる。

(2) GFP レポーターウイルスゲノムの作製

ウイルス遺伝子の発現に関わる細胞内因子を、siRNA ライブラリー等を用いた網羅的解析により探索するために、GFP レポーターウイルスゲノムを作製した。

後期遺伝子の VP1、VP2 領域をそれぞれ GFP 遺伝子に置換したウイルスゲノム (VP1-AcGFP、VP2-AcGFP) を作成し、IMR-32 細胞に導入した。その結果、これら 2 種類のレポーターウイルスはいずれも GFP を発現していることを蛍光顕微鏡下で確認した (図 3、上段)。また、これらのレポーターゲノムにおいて、早期タンパク質 TAg が発現しないように遺伝子領域を一部欠損させたものでは (Sph I TAg⁻) GFP 発現が顕著に低下した (図 3、下段)。さらに、2 種類のレポーターウイルスゲノムが細胞内で複製することを確認するため、複製した DNA 量を定量した結果、いずれのレポーターウイルスゲノムにおいても JCV Mad1 ゲノムと同等の複製効率であることを確認した。

これらの結果から、本研究で作製したレポーターウイルスは、早期タンパク質発現、ゲノム複製、後期遺伝子転写活性を反映するものと考えられた。

今後、作成した GFP レポーターウイルスを用いて、JCV 増殖に必要な細胞内因子を siRNA ライブラリーにより網羅的に解析する。解析結果を基に、同定した細胞内因子を標的とする JCV 増殖抑制法の開発を試みる。また、作成した GFP レポーターウイルスは、化合物ライブラリーを用いたスクリーニング等のハイスルー・プット解析にも応用可能であり、抗ウイルス薬開発研究への応用が期待できる。

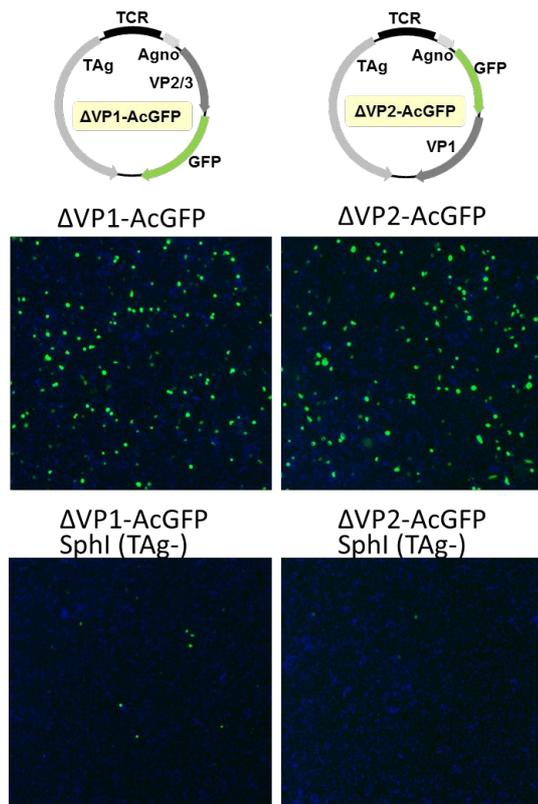


図 3 GFP レポーターウイルスゲノムの作成
VP1、VP2 領域をそれぞれ GFP 遺伝子に置換したレポーターゲノム (VP1-AcGFP、VP2-AcGFP) および TAg を発現しない各レポーターゲノム (下段、TAg⁻) を導入後 4 日目の細胞の GFP 発現 (緑色)。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Suzuki T, Orba Y, Makino Y, Okada Y, Sunden Y, Hasegawa H, Hall WW, Sawa H. Viroporin activity of the JC polyomavirus is regulated by interactions with the adaptor protein complex 3. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 12;110(46):18668-73.

DOI: 10.1073/pnas.1311457110. 査読有

Takahashi K, Orba Y, Kimura T, Wang L, Kohsaka S, Tsuda M, Tanino M, Nishihara H, Nagashima K, Sawa H, Tanaka S. Relationship between methyl CpG binding protein 2 and JC viral proteins. Jpn J Infect Dis. 2013 ;66(2):126-32.

DOI: 10.7883/yoken.66.126. 査読有

Yamaguchi H, Kobayashi S, Ishii A, Ogawa H, Nakamura I, Moonga L, Hang'ombe BM, Mweene AS, Thomas Y, Kimura T, Sawa H, Orba Y. Identification of a novel polyomavirus from vervet monkeys in Zambia. J Gen Virol. 2013 Jun;94(Pt6):1357-64.

DOI: 10.1099/vir.0.050740-0. 査読有

Suzuki T, Semba S, Sunden Y, Orba Y, Kobayashi S, Nagashima K, Kimura T, Hasegawa H, Sawa H. Role of JC virus agnoprotein in virion formation. Microbiol Immunol. 2012 Sep; 56(9): 639-46.

DOI: 10.1111/j.1348-0421. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

大場靖子「JC ウイルス T 抗原 C 末端領域の機能解析」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸国際会議場、神戸市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.czc.hokudai.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大場 靖子 (ORBA, Yasuko)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教

研究者番号：60507169