

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890005
 研究課題名（和文）JC ウイルスの細胞特異性に関わるウイルス後期遺伝子の転写後調節機構
 研究課題名（英文）Cell-specific regulation of the JC virus late gene
 研究代表者
 大場 靖子（YASUKO ORBA）
 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員
 研究者番号：60507169

研究成果の概要（和文）：

① JC ウイルスの早期タンパク質である T 抗原は、ウイルス後期遺伝子のみならず様々なプロモーターの転写活性を亢進するが、こうした転写亢進は感染許容細胞である IMR-32 細胞において特に顕著であり JC ウイルス感染の細胞特異性を規定する一つの要因となっていると考えられた。

② 多くの食品に含まれ医薬品としても用いられているカフェインは、JC ウイルスの早期タンパク質発現ならびにウイルスゲノム複製を抑制し、ウイルス増殖を顕著に抑制することが判明した。

研究成果の概要（英文）：

① Large T antigen of JC virus activates various promoters including JC virus late promoter. The enhancement of promoter activity by large T antigen is prominent in JC virus permissive cells. The cell-specific transcriptional regulation by T antigen is one of potential mechanisms of cell specificity for JC virus infection.

② We found that caffeine had a pronounced antiviral effect in cells infected with JC virus. Caffeine suppressed expression of viral early proteins and viral DNA replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：医歯薬学・実験病理学

キーワード：JC ウイルス、T 抗原

1. 研究開始当初の背景
 ヒトポリオーマウイルスである JC ウイルス

(JCV)はヒト大脳に脱髄病変を生じ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、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の増加や移植後の免疫抑制療法に伴い日本国内においても発症数が増加しているが、有効な治療法は未だ確立されていない。ウイルスの増殖に必要な宿主細胞内因子を抗ウイルス薬の標的とするのは、特に JCV のような小さなウイルスでは有用であると考えられるが、正常細胞に対する副作用が問題となるため感染細胞に特異的な因子や機構を標的とするのが望ましい。JCV は種特異性、細胞特異性が強く、これらの細胞特異性を決める要因は未だ明らかではない。我々のこれまでの研究では、JCV は多くの種類の細胞に侵入出来ることを示しており、侵入後の細胞内でのウイルスゲノム複製、ウイルスタンパク質の産生などの増殖過程が特異性を決定していると考えられる。

2. 研究の目的

JCV の細胞特異的な増殖機構を解明し、ウイルス増殖に必要な宿主細胞因子ならびにウイルス側の要因を明らかにすることで、JCV 増殖抑制の標的となる因子を同定し、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。本研究では、JCV の細胞特異性を決める要因の一つに JCV 遺伝子発現の転写後調節が関わっていると仮定し、感染許容細胞におけるウイルス遺伝子発現亢進の機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 感染許容細胞と非許容細胞における JCV の後期タンパク質発現効率の検討。

① 後期遺伝子転写活性を検討するため、JCV の転写調節領域の下流にレポーター蛍光タンパク質遺伝子を導入したプラスミド (TCRL-ZsGreen) を作成し、感染許容細胞である IMR-32 細胞、非許容細胞である HEK293 細胞、HeLa 細胞、Vero 細胞にそれぞれ導入し ZsGreen の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。JCV の早期タンパク質である T 抗原は、後期遺伝子の転写活性を亢進させることが知られていることから、T 抗原発現プラスミドと上記レポータープラスミドを同時に各細胞に導入したものについても検討を行った。

② 後期遺伝子のプロモーター活性に依存しない転写後調節の有無を確認するため、他のプロモーター (CMV、CAGGS、EF1a) の下流に後期遺伝子またはコントロールとして GFP 遺伝子を導入したプラスミドを作成し、①で用いた各細胞にそれぞれ導入し後期タンパク質 Agnoprotein および GFP の発現を検討した。同時に TAG 存在下や nonsense-mediated mRNA decay (NMD) の阻害剤でもあるカフェイン存在下でのこれらの発現変化についても検討した。

(2) カフェインによるウイルス増殖抑制効果の検討。

上記(1)②の研究において、ウイルス感染細胞においては、カフェインは早期タンパク質の発現を減少させることが判明したことから、カフェインのウイルス増殖に与える影響と作用機序について詳細に検討した。

- ① JCV 感染細胞の培養液にカフェインを加え 3 から 9 日間培養し、ウイルス感染価 (HA 価)、ウイルスタンパク質発現量を解析した。
- ② カフェインの JCV ゲノム複製効率への影響を DpnI replication assay を行い検討した。
- ③ カフェインは DNA 損傷チェックポイントのメディエーターである ATM/ATR の阻害剤でもあることから、感染細胞におけるチェックポイント誘導、細胞周期の変化を検討し、ウイルス増殖との関連性を調べた。

4. 研究成果

(1)

① 後期遺伝子の転写活性を TCR-ZsGreen を導入した 4 種類の細胞 (IMR-32 細胞: 感染許容細胞、HEK293、HeLa 細胞、Vero 細胞: 非感染許容細胞) で比較した結果、IMR-32 細胞に比べ、HEK293 細胞や HeLa 細胞ではレポータータンパク質である ZsGreen の発現が低かったが、Vero 細胞では強い発現が見られた。また T 抗原による転写亢進は IMR-32 細胞においてもっとも顕著であり、HEK293 細胞では発現亢進が見られなかった (図 1)。これらの結果は、後期遺伝子プロモーターの転写活性化だけが JCV 感染の細胞特異性を規定するものではないことを示しているが、IMR-32 細胞においてはより効率的な T 抗原による後期遺伝子転写亢進メカニズムがあることが示唆された。

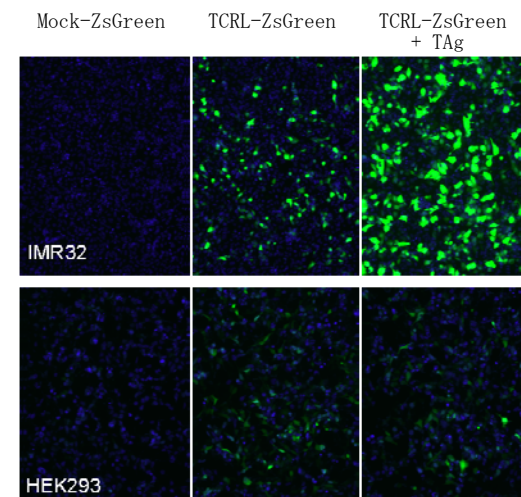


図 1 IMR-32 細胞および HEK293 細胞での JCV 後期転写活性。後期プロモーター下で緑色蛍光タンパク質を発現するレポーター遺伝子 (TCRL-ZsGreen) を細胞に導入し、蛍光顕微鏡にて細胞を観察した。IMR-32 細胞では T 抗原 (TAG) 存在下でプロモーター活性が亢進する。

② T 抗原による後期遺伝子発現の亢進が、転写活性のみならず、翻訳過程などの転写後調節である可能性を検討するため、後期遺伝子領域を様々な発現ベクターに挿入し、T 抗原発現存在下での後期タンパク質発現を検討した結果、IMR-32 細胞および Vero 細胞では①の結果と同様に T 抗原による後期タンパク質発現の増加が見られた。しかしながら、コントロールとして用いた GFP 発現ベクターにおいても T 抗原による発現増加が同様に見られたことから、これらの T 抗原による発現亢進は後期遺伝子特異的なものではなく、プロモーター非特異的に転写活性を亢進していることが示唆された。これらの結果から、T 抗原は様々なプロモーターにおいて転写活性を亢進するが、こうした非特異的な転写亢進は、感染許容細胞である IMR-32 細胞において特に顕著であり、JCV 感染の細胞特異性を規定する一つの要因となっていると考えられた。

また、ウイルスタンパク質発現に NMD 経路が関与している可能性を検討するため、NMD 経路の阻害剤であるカフェイン存在下で CMV や CAGGS プロモーター下の後期タンパク質発現を検討した結果、IMR-32 細胞のみで発現の増加が見られた。そこで、JCV 転写調節領域を含む後期遺伝子を挿入したプラスミドでカフェインの影響を調べたところ、後期遺伝子の mRNA 量の増加は見られず、また JCV 感染細胞においてもカフェインを 12 時間処理した細胞で後期タンパク質発現量に変化は見られなかった。このことから、後期遺伝子発現に NMD が関与している可能性は低いと考えられた。

(2) 上記の JCV 感染細胞においてカフェインの影響を検討した際に、後期タンパク質への影響は見られなかったが、早期タンパク質の発現がカフェイン処理 12 時間で顕著に減少することが判明した。カフェインが早期遺伝子プロモーター活性や T 抗原のタンパク質分解に及ぼす影響を検討した結果、影響は見られなかった。このことから、カフェインが早期遺伝子 mRNA の翻訳に至る過程に何らかの影響を与えている可能性が考えられるため、今後も検討を行う。

また、カフェインは JCV の早期タンパク質発現を低下させることが判明したことから、JCV の増殖抑制に有用であると考え、カフェインによるウイルス増殖抑制効果を詳細に検討した。

① JCV 感染後 7 日目の IMR-32 細胞に 1 または 2mM カフェインを 3-9 日間加えた結果、カフェインを加えた感染細胞ではウイルスタンパク質量が顕著に減少し、ウイルス感染価は検出限界以下に低下した。

② 2mM カフェイン存在下でのウイルスゲノム複製効率を検討した結果、未処理の細胞に

比べてウイルスゲノム複製量が顕著に減少した(図 2)。

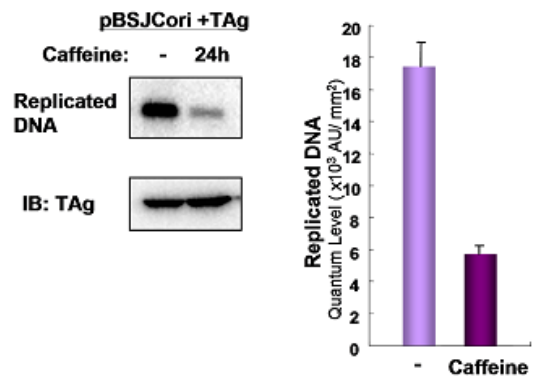


図 2 カフェインによる JCV ゲノム複製効率の低下。IMR-32 細胞に JCV 複製開始点を持つ pBSJCori および T 抗原発現ベクターを導入し、複製した pBSJCori をサザンブロットにて解析した。定量化したグラフを右に示す。カフェイン (Caffeine) 処理細胞では複製効率の低下が見られる

③ カフェインによるウイルスゲノム複製抑制機序を明らかにするため、JCV 感染細胞の細胞周期を解析した結果、ウイルスゲノム複製が行われている細胞では細胞周期が G2 期に停止しており、その原因として DNA 損傷シグナルの一つである G2 チェックポイントシグナルが活性化していることが判明した。カフェインを感染細胞に作用させると、ATM/ATR 活性が阻害されチェックポイントシグナルの活性化が抑制されるため、G2 期停止が解除され分裂期に進行することが判明した。このことから、JCV のゲノム複製は G2 期に停止した細胞内で効率的に行われており、カフェインは感染細胞の G2 停止を阻害することでウイルスゲノム複製を抑制することが明らかとなった。

以上の結果から、カフェインは JCV の早期タンパク質発現ならびにウイルスゲノム複製を抑制することから、JCV 感染抑制薬として有用である可能性が示唆された。

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 1 件)

- ① Yasuko Orba, Tadaki Suzuki, Yoshinori Makino, Kanako Kubota, Shinya Tanaka, Takashi Kimura, Hirofumi Sawa, Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. J. Biol. Chem. 2010, 285, 1544-1554. 査

読有

[学会発表] (計3件)

- ①大場 靖子、Large T antigen of JC virus promotes viral replication by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. The 1st international young researcher seminar in zoonosis control、2009年8月20日、ニセコいこいの村
- ②大場 靖子、JC ウイルス large T antigen による G2/M checkpoint 活性化機構の解析。BMB2008、2008年12月11日、神戸ポートアイランド
- ③大場 靖子、ヒトポリオーマウイルス JCV の Large T Antigen による細胞周期 G2 期停止機構。第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日、岡山コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 靖子 (YASUKO ORBA)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員

研究者番号：60507169