

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390111

研究課題名（和文）ウイルス因子と宿主因子の細胞レベルの相互作用の解明による PML 治療法の開発

研究課題名（英文）Cellular biological examination of relationship between viral and host factors and development of therapeutic strategy of PML

研究代表者

澤 洋文（SAWA HIROFUMI）

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：30292006

研究成果の概要（和文）：JC ウイルスのウイルス因子 agnoprotein が細胞因子 AP-3 と結合し、細胞内輸送機構を抑制することにより、ウイルス因子自身の分解を回避し、細胞形質膜へ輸送され、viroporin としてウイルス粒子の細胞外への放出を促進させること、ウイルス因子 VP1 のシステイン残基が粒子形成に重要な機能を有することを明らかにした。これらの知見は JC ウイルスにより惹起される進行性多巣性白質脳症の治療法の開発の基礎的知見となると共に、他のウイルス感染症の発症機序や治療法の開発にも応用される可能性が有る。

研究成果の概要（英文）：The human polyomavirus JC virus (JCV) is the causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). The JCV encoded agnoprotein has been shown to act as a viroporin, promoting the release of progeny virions. We demonstrate that the JCV agnoprotein specifically interacts with AP-3. This interaction interrupts AP-3-mediated vesicular trafficking with suppression of the targeting of the protein to the lysosomal degradation pathway, and instead permitting the transport of agnoprotein to the cell surface. The findings demonstrate a unique viral-host factors interaction, and suggest that the viroporins of other viruses may also be highly regulated by specific interactions with host factors. In addition, JCV capsid consists of 72 pentameric capsomeres of a major structural protein VP1. We examined the role of cysteine residues in the VP1 expression by individually mutating the six cysteines. The C80A and C247A VP1 mutants showed greatly decreased Vp1 expression. Our results suggest that regions of VP1 including Cys80 and Cys247 is essential for JCV virion assembly. These results may be applicable for development of therapeutic strategy for PML and other viral diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) JC ウイルス (JCV) はポリオーマウイル

スに属する DNA ウイルスであり、約 70-80% の健常人は JCV に不顕性感染している。JCV

は免疫不全状態を契機として、中枢神経系のオリゴデンドロサイトで特異的に増殖し、脱髄を惹起する。Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML)罹患者は JCV の増殖に伴い、種々の中枢神経症状が進行し、最終的に呼吸不全等で死に至る。近年、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)の感染による AIDS の流行[2007 年度内に新たに日本で判明した HIV 感染者および HIV による後天性免疫不全症候群(AIDS)症例数は 1500 人、世界全体の HIV 感染者数は 3220 万人]や、移植治療後の免疫抑制療法の実施により、PML 罹患者数は急激に増大している (AIDS 症例の 2-4%に PML が認められるという報告が有る)。また最近では、多発性硬化症やクローン病の治療薬であるナタリズマブの服用者において PML の発症が報告されており、疾患の重要性が高まっている。しかしながら、他の多くのウイルス感染症と同様に PML に対する治療法は確立されておらず、対症療法のみが行なわれている。また前述したように、JCV は不顕性感染率が高く殆どの人が抗体を有しているため PML に対するワクチンの効果は無いと考えられる。

現在、JCV 感染と宿主因子に関する報告は有るが、その結果に基づいた治療法は未だ無く、JCV のウイルス因子と宿主因子の細胞レベルにおける相互作用を明らかにし、その結果に基づく治療法を確立することは急務である。

(2) 研究代表者は、これまでに、JCV の構成タンパク質および転写・複製調節領域と宿主因子の相互作用について研究を行い、多くの新しい知見を見出し、EMBO Rep、J Biol Chem、J Virol、Cancer Res、Virology 等の英文雑誌に報告しており、2005 年には Nat Rev Microbiol に Research highlight として JCV の核外輸送機構を解明した論文が紹介され、世界から注目を集め、世界における JCV の研究の中心の一人である。

2. 研究の目的

本申請では研究代表者がこれまでに実施してきた研究を発展させ、JCV のウイルス因子と宿主因子の細胞レベルにおける相互作用を明らかにし、PML の治療法の基礎的知見を得ることを最終目的とし、JCV のウイルス因子である agnoprotein (agno)および VP1 を主とするウイルス因子が関与する宿主因子を同定する。さらにウイルス因子と宿主因子の細胞レベルにおける相互作用を明らかにして、JCV の粒子形成および細胞外への放出等における詳細な機序を解明する。

3. 研究の方法

① 分子生物学的方法

PCR 法を用いた in vitro mutagenesis による

変異タンパク質作成、大腸菌による組み換えタンパク質作成、酵母を用いた yeast 2 hybrid 法、siRNA を用いた遺伝子の knock down、レトロウイルスを用いた遺伝子導入法およびタンパク質発現誘導細胞株の作成、遺伝子シーケンシング法等

② 細胞生物学的方法

細胞染色法、GST-pull down 法、FRET を用いた細胞内タンパク質の会合および細胞機能の検索、蛍光タンパク質を用いた細胞内因子の局在および動態の確認、³⁵S pulse chase 法等

③ 免疫学的方法

免疫組織学的染色法、免疫沈降法、flowcytometer を用いた細胞表面のタンパク質発現の確認、イムノブロットィング法等

4. 研究成果

(1) JCV ウイルス因子である agnoprotein (agno)を対象とした研究成果

① 我々はこれまでに JCV のウイルス因子である agno が核膜において、宿主因子である heterochromatin protein 1 alpha と相互作用することにより、核膜の状態を変化させる現象、および fasciculation and elongation protein zeta 1 と結合することにより、その機能を抑制して、ウイルス粒子の核から細胞質内へ輸送を制御することを報告した。

ウイルス粒子が細胞外に放出されるには、核膜に加えて形質膜を超えることが必要である。野生型および agno を欠損させたウイルスゲノムを作成し細胞内に導入すると、野生型はカプシドタンパク質である VP1 が、細胞内および細胞上清中に発現が確認され、ウイルス粒子が上清中に放出されていることが示唆された。一方、agno 欠損ウイルス(Δ agno)は、細胞内に VP1 は発現しているが、上清中に VP1 の発現は認められなかった(図 1)。この結果から、agno が JCV 粒子の細胞外への放出に関与していることが明らかになった。

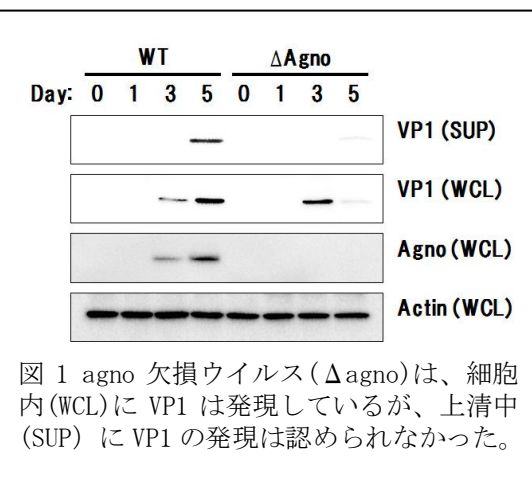
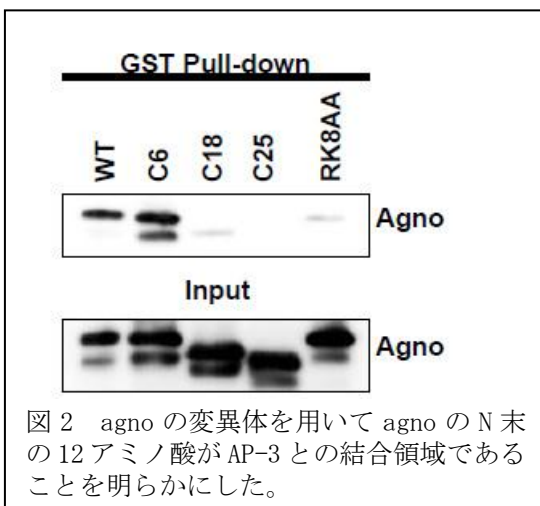


図 1 agno 欠損ウイルス(Δ agno)は、細胞内(WCL)に VP1 は発現しているが、上清中(SUP)に VP1 の発現は認められなかった。

② 生化学的および細胞生物学的実験を実施し、71 アミノ酸残基からなり、疎水性領域を持つ agno が、脂質二重膜に挿入されていること、ホモオリゴマーを形成することを明らかにした。また、agno はカルシウムイオン、ハイグロマイシン等の低分子の細胞内への流入を促進させた。これらの結果から、agno は細胞形質膜にホモオリゴマーを形成して形質膜の透過性を亢進させ、細胞からウイルス粒子の放出を促進する viroporin として機能することを証明した。得られた結果は 2010 年に PLoS Pathogens (被引用数 17) に報告した。

③ 次にウイルス因子である agno と宿主因子の相互作用を明らかにするために、yeast 2 hybrid assay 法を実施し、agno 結合宿主因子として、細胞内輸送に関与するアダプタータンパク質 adapter-related protein complex 3 (AP-3) を単離した。Agno と AP-3 の結合は、yeast 2 hybrid 法、免疫沈降法および GST-pull down 法で確認した。さらに agno の N 末の 12 アミノ酸が AP-3 との結合領域であることを明らかにした(図 2)。



④ agno が AP-3 と結合してウイルスの産生にどのような影響を与えるかを調べるために、agno 変異体、AP-3 の agno との結合領域である AP-3-Y27C タンパク質、siAP-3 を用いて、機能阻害実験を試みると共に、agno-inducible cell を用いて agno 発現による細胞機能を詳細に検討した。その結果、agno は AP-3 に結合することにより、AP-3 依存的細胞内輸送機構を抑制し、agno 自らのリソソームでの分解を回避し、細胞膜への輸送を促進させることを証明した。

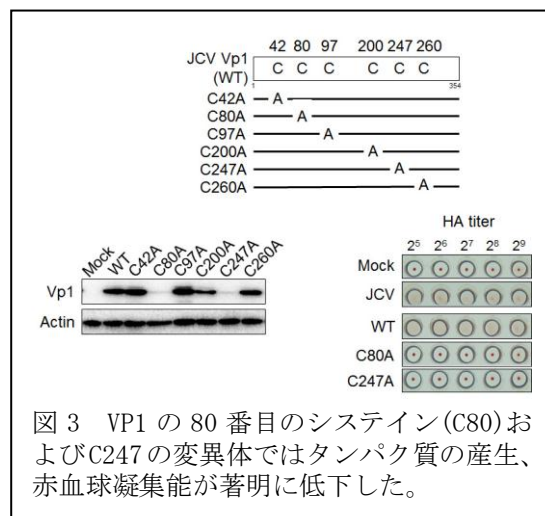
⑤ これまでに得られた結果をまとめると、ウイルス因子である agno は細胞因子である heterochromatin protein 1 alpha および fasciculation and elongation protein zeta 1 と結合することにより、その機能を抑制して、ウイルス粒子の核から細胞質内へ輸送を

促進する。さらに、agno は細胞質では細胞因子 AP-3 と結合し、AP-3 依存的細胞内輸送機構を抑制することにより、自らの分解を回避し、細胞形質膜へ輸送されることにより、細胞膜上でホモオリゴマーを形成し、細胞膜の透過性を亢進させ、最終的にウイルス粒子の細胞外への放出を促進させることを明らかにした。本研究によりこれまで、細胞外への放出機構が不明であった DNA ウイルスであるポリオーマウイルスの産生経路に新たな概念を提唱するものであり、ウイルス学における重要な知見である。得られた結果は、既に英文雑誌に投稿準備中である。

(2) JCV ウイルス因子である VP1 を対象とした研究成果

① JCV 粒子は他のポリオーマウイルスと同様に外郭タンパク質である VP1 の 5 量体であるペンタマーが 72 個集合して形成される。しかし、粒子構造の形成機序については不明である。同族のポリオーマウイルスである SV40 は粒子形成にシステイン残基が重要であることが報告されている。また JCV の VP1 と SV40 の VP1 は相同性が高く、システイン残基の位置も類似している。本研究では JCV 粒子形成における VP1 のシステイン残基に着眼して、その機構を明らかにすることを試みた。

② JCV の VP1 のゲノムに存在する 6 個のシステイン(42、80、97、200、247、260)をアラニンに置換した変異体を作成して、ウイルス産生への影響を調べた。システイン変異を有する JCV ゲノムを細胞に導入し、タンパク質の発現および粒子形成の指標である赤血球凝集価を測定した結果、VP1 の 80 番目のシステイン(C80)および C247 の変異体を有する変異ウイルスはタンパク質の産生、赤血球凝集能が著明に低下することが示された(図 3)。



③ 次に C80 および C247 の変異体 C80A、C247A の発現が低下する原因を検索するために、C80A、C247A を細胞に発現させ、³⁵S で標識した後に Pulse chase assay を実施し、細胞内での分解の程度を野生型と比較した。その結果、C80A、C247A の変異体 VP1 は野生型に比較し、標識後、12 および 24 時間で著明に分解が進行することが明らかとなった(図 4)。

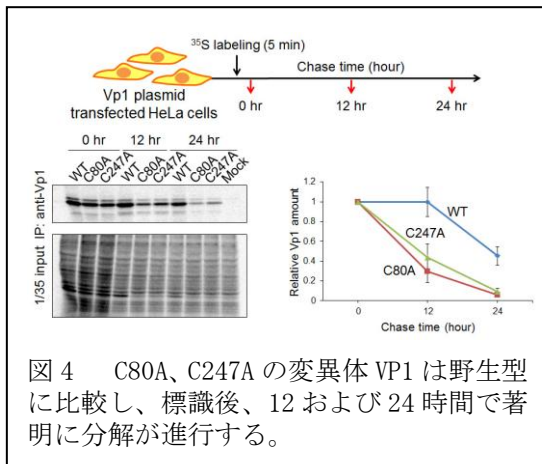


図 4 C80A、C247A の変異体 VP1 は野生型に比較し、標識後、12 および 24 時間で著明に分解が進行する。

④ この分解が細胞因子によるものかを明らかにするために、試験管内で ribosome、転写因子およびタンパク合成に必要な因子のみが存在する中で各々のシステイン変異体を合成した。その結果、細胞内では発現が著明に低下した C80A、C247A の変異体 VP1 も他の変異体と同程度に、発現することが明らかになった(図 5)。

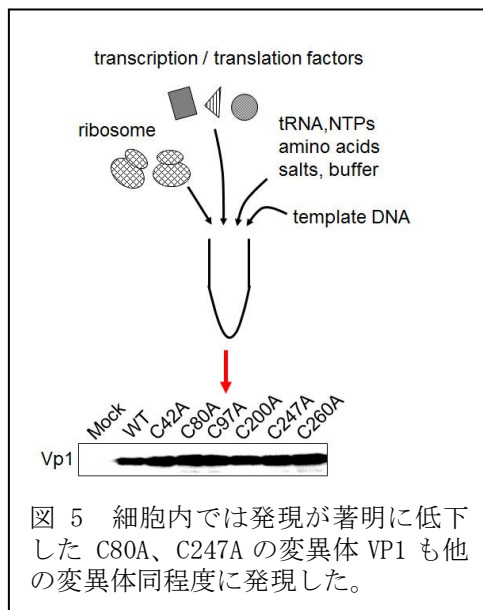


図 5 細胞内では発現が著明に低下した C80A、C247A の変異体 VP1 も他の変異体同程度に発現した。

⑤ これらの結果から、JCV VP1 のシステイン残基 C80 および C247 は JCV 粒子形成において重要な機能を有し、さらに試験管内での

タンパク質発現系 (in vitro protein synthesis) においては発現低下は認められないこと、³⁵S pulse chase 法で C80 および C247 変異 VP1 が野生型に比べて分解が著明に進行することから、VP1 の細胞内での産生において細胞因子が関与し、C80 および C247 変異 VP1 では構造上の特性から、細胞因子により分解されていることが明らかになった。現在、本研究によって得られた結果は、既に英文雑誌に投稿準備中である。

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究課題で下記の成果が得られた。JCV ウイルス因子である agnoprotein (agno) は adapter-related protein complex 3 (AP-3) と結合し、AP-3 依存的細胞内輸送機構を抑制することにより、自らの分解を回避し、細胞形質膜へ輸送されることにより、細胞膜上でホモオリゴマーを形成し、細胞膜の透過性を亢進させ、最終的にウイルス粒子の細胞外への放出を促進させることによりウイルスの産生を促進させている。また以前報告した様に agno は細胞因子である heterochromatin protein 1 alpha および fasciculation and elongation protein zeta 1 と結合することにより、その機能を抑制して、ウイルス粒子の核から細胞質内へ輸送を促進することと合わせて考察すると、agno は JCV 感染細胞において、多段階でウイルスの産生を促進する作用を有していることが判明した。

さらに、ウイルス因子である VP1 はそのシステイン残基である C80 および C247 が粒子形成に重要な役割を果たし、これらの残基をアラニンに置換すると、細胞因子的作用により分解される。

以上、本研究課題では、JCV のウイルス因子と細胞因子に着目し、細胞レベルにおける相互作用を明らかにして、JCV の粒子形成および細胞外への放出等における詳細な機序を明らかにした。これらの成果は国内外においても他に類を見ないものである。既に成果の一部は国内および国際学会にて発表を行い、また 2010 年に国際的に有名な Online Journal である PLoS Pathogens に投稿し、未だ公開されてから日は浅いが、既に被引用数は 17 であり、成果のインパクトは高いことが推定される。また、他の成果は現在、英文雑誌に投稿準備中である。本研究課題によって得られた基礎的知見は JCV の agno もしくは VP1 を対象とした PML の治療法の開発の基礎的知見となると共に、同じポリオウイルスに属し、腎移植の障害となる BK ウイルス感染症また、他の DNA ウイルス感染症の発症機序の解明や治療法の開発に応用される可能性が有ると考えられる。また本研究課題を推進する過程で作成したウイルス様粒子

が drug delivery system に応用できる事実も見出した。

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 8 件)

- ① Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S: High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology* 査読有 31(1) 38-41, 2011
doi:10.1111/j.1440-1789.2010.01122.x.
- ② Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H: The Human Polyoma JC Virus Agnoprotein Acts as a Viroporin. *PLoS Pathogens* 査読有 6 (3):e1000801, 2010
doi: 10.1371/journal.ppat.1000801
- ③ Suzuki T, Yamanouchi S, Sunden Y, Orba Y, Kimura T, Sawa H: Natalizumab has no direct biological effect on JC virus infectivity in permissive human neural cell lines. *J Med Virol* 査読有 82 (7):1229-1235, 2010
DOI: 10.1002/jmv.21805
- ④ Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Mikuni S, Matsuo Y, Kinjo M, Sawa H, Ijiro K: Low pH-triggered model drug molecule release from virus-like particles. *Chembiochem* 査読有 11(7):959-962, 2010 DOI: 10.1002/cbic.201000094
- ⑤ Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H: Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J Biol Chem* 査読有 285 (2):1544-1554, 2010
doi: 10.1074/jbc.M109.064311
- ⑥ Niikura K, Nagakawa K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijiro K: Gold nanoparticle arrangement on viral particles through carbohydrate recognition: A non-crosslinking approach to optical virus detection. *Bioconjug Chem* 査読有 20 (10):1848-1852, 2009
DOI: 10.1021/bc900255x

[学会発表] (計 27 件)

- ① 高橋健太、木村太一、王磊、高阪真路、工藤伸一、奴久妻聡一、谷野美智枝、西原広史、澤洋文、長嶋和郎、田中伸哉: メチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 の JC ウイルス関連蛋白による転写制御の解析、第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会、2012 年 6 月 28-30 日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター、新潟
- ② 鈴木忠樹、片野晴隆、佐藤由子、澤洋文、佐田徹太郎、長谷川秀樹: 進行性多巣性白質脳症における JC ウイルス後期蛋白質発現動態の面積組織学的検討。第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 26-28 日、京王プラザホテル、東京
- ③ 澤洋文: 進行性多巣性白質脳症 (PML) の原因ウイルスである JC ウイルスの細胞内動態。第 3 回 NeuroCPC 2011 年 3 月 8 日、松本、信州大学医学部附属病院
- ④ Suzuki T, Orba Y, Makino Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Sawa H: Disruption of intracellular vesicular trafficking by agnoprotein is essential for viroporin activity and JC virus replication. 10th International Symposium on NeuroVirology, Oct. 12-16, 2010, Milan Italy
- ⑤ Orba Y, Suzuki T, Kimura T, Sawa H: Large T antigen promotes JC virus replication in G2 arrest by inducing G2 checkpoint signaling. 10th International Symposium on NeuroVirology, Oct. 12-16, 2010, Milan, Italy
- ⑥ Kobayashi S, Suzuki T, Igarashi M, Ohtake N, Nakagawa K, Niikura K, Kimura T, Kasamatsu H, Sawa H: Cys80 of JC virus capsid protein, VP1 is essential for intrapentamer disulfide bond and pentamer formation. 10th International Symposium on NeuroVirology, Oct. 12-16, 2010, Milan, Italy
- ⑦ Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Mikuni S, Matsuo Y, Nagakawa K, Kinjo M, Sawa H, Ijiro K: Preparation of functionalized virus-like particles enabling pH-mediated release of target molecules. International Symposium on Joint Research Network for Advanced Material and Devices, March 25-26, 2010, Tomakomai, Japan

- ⑧ Nagakawa K, Niikura K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijio K: Gold nanoparticle array based on the surface structure of virus. International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics, Oct. 1-2, 2009, Tokyo, Japan
- ⑨ Orba Y, Suzuki T, Kimura T, Sawa H: 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, Aug. 19-21, 2009, Niseko, Japan (poster)
- ⑩ Suzuki T, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H : Viroporin activity of JCV agnoprotein. The 1st International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2009, Aug. 19-21, 2009, Niseko, Japan
- ⑪ Suzuki T, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H : Viroporin activity of JCV agnoprotein. The 9th International Symposium in NeuroVirology, June 2-6, 2009, Florida, USA (oral)

[図書] (計1件)

- ① Kasamatsu H, Nakanishi A, Liddington RC, Sawa H: Structural and Functional Studies of Polyomavirus Late Gene Products. In Yoshida K (ed) Molecular Biology of Tumor Virus Gene Products. Research Signpost, Kerala, India 2009, 109-168

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計2件)

名称: JC ウイルスの VP-1 に対する siRNA 及びそれを含有してなる医薬組成物

発明者: 長嶋和郎、澤洋文、大場靖子

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特許第 4672654 号

取得年月日: 平成 23 年 1 月 28 日

国内外の別: 国内

名称: JC ウイルス agno を対象とした PML の治療

発明者: 長嶋和郎、澤洋文、岡田由紀

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特許第 4840792 号

取得年月日: 平成 23 年 9 月 2 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.czc.hokudai.ac.jp/pathobiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 洋文 (SAWA HIROFUMI)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン

ター・教授

研究者番号: 30292006

(2) 研究分担者

田中 伸哉 (TANAKA SHINYA)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号: 70261287