

学位論文題名

JC ウイルス粒子の核内移行機構の解析

学位論文内容の要旨

緒言

進行性多巣性白質脳症は致死性中枢神経系脱髄疾患であり, human polyomavirus JC virus (JCV) はその原因ウイルスである. JCVは核内において mRNA の転写や DNA 複製を行いウイルス粒子の増殖を行っており, ウイルス粒子の核内移行は JCV の感染に対して不可欠である. しかし, JCV の核内移行のメカニズムは未だ不明である. JCV の標識や変異ウイルスの作製等は困難であるが, 主な外郭蛋白である VP1 は大腸菌を用いて精製する事により, 粒子構造を有する virus-like particle (VLP)を簡単に作製できる. 我々はこの VLP が JCV と同様に receptor 結合能や細胞侵入能を持つことを明らかにしてきたので, この JCV-VLP を用いて JCV 粒子の核内移行のメカニズムを解析した.

材料と方法

Wild type VLP (wtVLP) の作製には, JCV の pBR-Mad1 から得た wild type VP1 (wtVP1) 遺伝子を原核発現 vector pET-15b に subcloning した後に大腸菌で発現させて, sucrose と CsCl を用いた超遠心で, wtVLP を精製した. VP1 N 末にある塩基性アミノ酸系列は核局在シグナル(NLS)と考えられているので, wtVP1 の N 末端の三つのアミノ酸 K R K を A G A に換えて, NLS の mutant である Δ NLS VP1 を作製した. Δ NLS VP1 は wtVLP と同様に pET-15b vector に subcloning した. 精製した wtVLP と Δ NLS VLP は両方とも 45kDa のバンドとして認められた. 電子顕微鏡でも wtVLP と Δ NLS VLP は 40~50 nm の粒子構造をとる事が確認された.

JCV の許容細胞である SVG 細胞と非許容細胞である HeLa 細胞は 35 mm dish に 37 °C 24 時間培養した後に FITC label した VLP を感染させて, 4 °C 1 時間 incubate してから, 37 °C で培養し, laser scanning 共焦点顕微鏡で観察した. *In vitro* transport assay では, 8 well のチャンバースライドに培養した HeLa と SVG を 90 μ g/ml の digitonin で 5 分間浸透した. Transport buffer で十分に洗い, 細胞質を完全に排出させ, 細胞に ATP 複合体と cytosol 抽出物または importin α または importin β , もしくは importin α と β を同時に添加して, FITC label した VLP を接種後 30 °C 30 分間 incubate して, 3% paraformaldehyde で固定し, laser scanning 共焦点顕微鏡で写真撮影をした.

結果と考案

接種後 37 °C 1 時間培養すると, FITC label した wtVLP はすでに HeLa と SVG の細胞核内に入り, 2 時間後および 3 時間後ではさらに核内への集積が見られた. 接種後 3 時間では 95.6% の HeLa 細胞と 95.4% の SVG 核内に VLP が見られた. VLP が粒子状態で核内に移行するのかを調べるため

に、HeLa と SVG に Cy3 を packaging した FITC-VLP を接種した。感染後 37°C 1 時間で FITC と Cy3 のシグナルが同時に HeLa と SVG の核内に認められ、2 時間後、3 時間後では核内集積が増加してきた。Cy3 を packaging した FITC-VLP が細胞質に入ってから virion から polymer の VP1 となりその polymer に結合して核内に移行する可能性を排除するために、FITC label した VLP を dissociation buffer と 1 時間 incubate して Cy3 と混ぜ、reassociation buffer で透析しない状態で直接細胞を感染させた。その結果、感染後 37°C 1 時間、2 時間、3 時間で FITC のシグナルは核内に認められたが、Cy3 のシグナルは殆ど見られなかった。つまり、Cy3 が VP1 の polymer と結合して核内に移行しているのではないという事が示された。以上の結果から、VLP が粒子状態で核内に移行する事が示唆された。

In vitro transport assay では、transport buffer と ATP 複合体だけを添加した場合には、wtVLP は digitonin で処理した HeLa と SVG の核内に移行しなかったが、ATP 複合体と細胞質抽出物を添加すると、wtVLP の核内移行が観察された。従って VLP の核内移行には細胞質因子が必要であることが示された。細胞質中の importins の VLP の核内移行における役割を調べるために、細胞質抽出物の代わりに importin α と β をそれぞれ添加した。Importin α と ATP 複合体、又は importin β と ATP 複合体を添加しても、wtVLP は digitonin で処理した HeLa と SVG の核内には入らなかった。しかし、importin α と β が同時に存在すると、wtVLP の核内移行が観察された。つまり、wtVLP の核内移行は importin α および importin β の共同作用により制御されることが示唆された。

JCV-VLP 核内移行における NLS の役割を調べるために、 Δ NLS VLP の核内移行を調べた。HeLa と SVG に FITC label した Δ NLS VLP を接種すると、37°C 1 時間から 2 時間で Δ NLS VLP は細胞質に入ったが、核内には入れなかった。3 時間経過してもわずかに 2.2% の HeLa と 6.1% の SVG の核にのみ VLP が認められた。Cy3 を packaging した FITC- Δ NLS VLP を HeLa と SVG に接種すると、FITC と Cy3 は細胞質に見られるが、核内には認められなかった。*In vitro* transport assay において、細胞質抽出物または importin α と importin β が存在した場合、wtVLP は digitonin 浸透した HeLa と SVG 細胞核に入ったが、 Δ NLS VLP は核内に入らなかった。即ち、NLS は VLP の核内移行には不可欠だと考えられた。Overlay assay では、wtVLP は GST-importin α とともに GST-importin β とともに結合したが、 Δ NLS VLP は GST-importin α と β の両方とも結合しなかった。以上の結果から VLP の核内移行は VP1 の NLS と importin α と β との相互作用によって制御されることが示唆された。

wtVLP の核内移行に核膜孔複合体(nuclear pore complexes, NPC)が関与するのかを調べるために、FITC-wtVLP を接種する前に、digitonin 浸透した HeLa と SVG 細胞を wheat germ agglutinin (WGA) 又は抗 NPC 抗体で予め反応させた。細胞質抽出物または importin α と importin β の両方が存在しても、wtVLP の核内移行が WGA と抗 NPC 抗体により完全に抑制された。WGA と抗 NPC 抗体は特異的に NPC と結合して蛋白質の核内移行を抑制することから、VLP が NPC を経由して核内に移行することが判明した。

結 語

JC virus (JCV) の核内移行機序を明らかにするため Cy3 を packaging した recombinant の virus-like particle (VLP) を作成して解析し、次の結果が得られた。

1. JCV-VLP は感染後 1 時間で細胞の核内に移行し, VLP は Cy3 を packaging したまま粒子状態で核内に移行していることが示された.
2. JCV-VLP の核内移行には VP1 の核局在シグナル(NLS)が importin α 及び β と結合し, 核膜孔複合体(NPC)を介して核内に移行することが判明した.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 志 田 壽 利

学 位 論 文 題 名

JC ウイルス粒子の核内移行機構の解析

進行性多巣性白質脳症は致死性中枢神経系の脱髄疾患であり、JC virus (JCV)はその原因ウイルスである。今までの研究で、JCVは核内において mRNA の転写や DNA 複製を行いウイルス粒子の増殖を行っている事が判明しているが、JCV 粒子の核内移行の機序は不明である。JCV は変異ウイルスの作製が困難なウイルスである。主な外殻蛋白である VP1 は大腸菌を用いて発現、精製する事により、粒子構造を有する virus-like particle (VLP) を簡単に作製できる。この VLP では変異ウイルス作製が可能で、かつ JCV と同様に receptor 結合能や細胞侵入能を持つことから、本研究では JCV-VLP を用いて JCV 粒子の核内移行のメカニズムを解析した。wtVLP は、JCV の Mad1 株の VP1 遺伝子を大腸菌発現 vector pET-15b に subcloning した後に大腸菌で発現させ、sucrose と CsCl を用いた超遠心で精製した。VP1 N-末の KRKGERK 配列の KRK を AGA に変換して、mutant VP1 (Δ NLS VP1) を作製した。 Δ NLS VLP も wtVLP と同様の方法で精製し、wtVLP と一緒に SDS-PAGE で展開、CBB 染色を行ったところ、wtVLP と Δ NLS VLP は両方とも 45kDa のバンドとして認められ、電子顕微鏡でも wtVLP と Δ NLS VLP は同様な粒子構造をとる事が確認された。

この mutant VP1 と wtVP1 遺伝子を SVG 細胞に transfection して、抗 flag 抗体で VP1 の発現を検索すると、wtVP1 は主に核内に発現したが、 Δ NLS VP1 は主に細胞質に発現した。VP1 N 末のこの配列は核局在シグナル(NLS)として機能していることが示唆された。

細胞に FITC label した VLP を接種すると、1 時間後に wtVLP はすでに細胞核内に入り、接種後 3 時間では 95.6% の HeLa 細胞と 95.4% の SVG 細胞核内に VLP が見られた。しかし、 Δ NLS VLP を接種した細胞では VLP がほとんど核内に移行しなく、接種後 3 時間では 2.2 % の HeLa 細胞と 6.1% の SVG 細胞核内にのみ VLP が見られた。VLP の核内移行には NLS が寄与していることが示唆された。

FITC-VLP の中に Cy3 を packaging して、HeLa と SVG 細胞に接種すると、Cy3 を packaging した FITC-wtVLP は感染後 1 時間、2 時間、3 時間で FITC と Cy3 のシグナルが同時に核内に認められた。一方、Cy3 を packaging した FITC- Δ NLS VLP を接種すると、1 時間、2 時間、3 時間後では FITC と Cy3 のシグナルが同時に細胞質に見られたが、

核内には認められなかった。 FITC label した wtVP1 と packaging していない単独の Cy3 との混合物を細胞に接種すると、1 時間、2 時間、3 時間後に FITC のシグナルが核内に認められたが、Cy3 のシグナルは消失していた。Cy3 が VP1 に単純に結合して核内に移行するわけではない事が示された。Cy3 を packaging した VLP を SDS-PAGE で展開し、Cy3 の蛍光を検出してから、同じ gel を CBB で染色した場合、VP1 と Cy3 が異なる場所に存在し、Cy3 と VP1 が結合していない事が確認できた。以上の結果から、JCV VLP が粒子状態で核内に移行する事が証明された。

plasmid DNA を packaging した VLP を細胞に接種した場合、wtVLP に packaging された DNA は HeLa と SVG 細胞の total cell lysate と核抽出液内に検出されたが、 Δ NLS VLP に packaging された DNA は total cell lysate にだけ検出され、核抽出液には検出されなかった。VLP は DNA を内部に packaging した状態でも、核内に移行することができ、本来の JCV 粒子と同様の生物学特性を有していると示唆された。

In vitro transport assay では ATP 複合体と cytosol、または importin α と β を同時に添加した場合でのみ、VLP の核内移行が観察されたことから、VLP の核内移行は importin α と β の共同作用によって媒介されることが示唆された。VLP の核内移行は WGA と抗 NPC 抗体により抑制されたことから、VLP は核膜孔複合体(NPC)を経由して核内に移行することが明らかとなった。Importin α と β が存在しても、 Δ NLS VLP の核内移行が認められなかったことから、VLP の核内移行における NLS の必要性が示された。Overlay assay では wtVLP は importin α と β に結合したが、 Δ NLS VLP は importin α と β とともに結合しなかった。この結果から VLP の核内移行には VP1 の NLS と importin α と β との相互作用によって制御されていることが示唆された。

以上の結果から、JCV-VLP は感染後粒子状態で核内に移行し、JCV-VLP の核内移行には VP1 の NLS が importin α 及び β と結合し、NPC を介して核内に移行することが判明した。

口頭発表に当たり、副査の吉木教授より、VLP のサイズは JCV と同じか、JCV 許容細胞と非許容細胞の核移行機序について、同じく副査の志田教授より VLP の核内移行における Ran の役割、大きな JCV が小さな NPC を通過する機序等に関する質問があった。また主査の長嶋教授より HeLa と SVG 細胞の核内移行における量的差、overlay assay の長所、直接 JCV を使わない理由等に関する質問があった。これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は JC ウイルス粒子の核内移行機構を明らかにした点で優れていると判断され、今後の進行性多巣性白質脳症発症機構の解釈と治療に貴重な示唆を与えたものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。