

学 位 論 文 題 名

JC virus 感染における Replication Protein A(RPA) の リン酸化に関する検討

学位論文内容の要旨

緒 言

Polyomavirus である JC virus (JCV)は進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML)の原因ウイルスである。成人では70%以上が血清のJCV抗体が陽性であり、不顕性感染をしていると考えられている。PMLは免疫抑制状態が発症の契機となり、近年ではacquired immunodeficiency syndrome (AIDS)や移植後の免疫抑制療法等の増加によりその発症率は増加している。JCVは二重鎖閉環状DNAウイルスであり、JCV genomeは機能的にはregulatory region、初期、後期蛋白転写領域の3つの部分に分けられる。JCVの初期蛋白はLarge T antigen (TAg), small t antigenにより構成されている。

JCVと同属のPolyomavirusであるsimian virus 40 (SV40)のSV40 TAgはJCVのTAgと70%以上の相同性を有している。TAgを介したPolyomavirusの複製の機構はこれまでにSV40において検討されてきた。SV40 TAgは宿主側の蛋白であるreplication protein A (RPA), topoisomerase I, DNA polymerase α -primaseとinitiation complexを形成し、DNA合成を開始する。またDNA複製過程においてはhelicaseとして作用してDNAのunwindingを惹起し、RPAとともにsingle-stranded DNA (ssDNA)と複合体を形成し、ssDNAを安定化させる。

RPAは分子量が70-, 32-, 12-kDaからなる3量体 (RPA70, RPA32, RPA12)であり、DNA複製、修復、組み替え時に作用する。SV40 TAgとは3量体のうちRPA70とRPA32が直接結合することが報告されている。RPA32のN末はリン酸化することにより種々の機能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている。SV40 TAgとRPAに関してはDNA複製における機序が解明されつつあるが、JCV TAgの複製に関してはその機構は未だ不明な点が多い。

本研究ではJCV感染過程において、JCV早期蛋白であるTAgと宿主蛋白であるRPA32のリン酸化との関係を詳細に検討し、JCVの複製機構を解明する事を目的として検討を行った。

材料と方法

ヒト神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞と、IMR-32細胞由来のJCV持続感染細胞であるJCI細胞を用いた。また、RPA32のリン酸化を検討するため、リン酸化RPA32 (pRPA) 特異抗体を作成した。診断目的で検体の採取されたヒトPML brainを免疫染色、immunoblottingに用いた。

結 果

IMR-32細胞とJCI細胞を抗RPA抗体でimmunoblottingを施行すると、両細胞において32 kDaの位置にRPA32のバンドが認められた。またJCI細胞ではそれより高分子量の34 kDaの位置にリン酸化したRPA32と予想されるバンドが認められた。IMR-32細胞にAdriamycin (ADM) 処理によるRPAのリン酸化を惹起した後に、alkaline phosphatase処理を行なったところ、34 kDaのバンドのみが消失した。この結果から、34 kDaのバンドはリン酸化RPAのバンドであることが示唆された。未感染のIMR-32細胞ではpRPAの発現は認められなかったが、JCI細胞では34 kDaの位置にpRPAを認め、このシグナルはalkaline phosphatase処理で消失した。さらに作成した抗pRPA抗体ではalkaline phosphatase処理前のJCI細胞にのみシグナルが認められた。

次に、IMR-32細胞にJCVを感染させた群と非感染細胞の粗抽出液を接種した陰性対象群として、immunoblotting

で RPA のリン酸化を検討したところ、未処理 IMR-32 細胞、IMR 抽出物で処理した IMR-32 細胞では RPA のリン酸化は認められなかった。しかし JCV を感染させた IMR-32 細胞および JCI 細胞では RPA32 のリン酸化が確認された。以上の結果から、IMR-32 に JCV を感染させた細胞でも JCI 細胞と同様に、RPA32 のリン酸化が起こっていることが確認された。

JCV TA_g と RPA、pRPA の結合を免疫沈降にて検討した結果、RPA、pRPA のいずれも JCV TA_g と結合していることが確認された。

IMR 細胞、JCI 細胞を用いた免疫染色の結果、JCI 細胞では TA_g 陽性の細胞の核では RPA は斑状の発現を示した。抗 pRPA 抗体を用いて免疫染色を施行した結果、斑状の RPA の発現は pRPA の発現と完全に共局在していた。JCV が感染しているヒト PML 大脳を用いた immunoblotting によりヒト脳での RPA のリン酸化を確認した。また、ウイルス感染により核が腫大し、TA_g 陽性を示すグリア細胞で RPA の斑状の陽性像を認め、pRPA と共局在した。このことから PML 大脳でも pRPA が核内で斑状に発現していることが明らかになった。

考 察

今回の検討からは 1) RPA32 のリン酸化抗体を作成し、2) JCV 早期蛋白質である TA_g 陽性の細胞では RPA32 がリン酸化していること、およびリン酸化 RPA32 は核内で斑状に集積することが判明した。以上の結果から、JCV の感染により、宿主細胞の RPA のリン酸化が惹起されることが示された。

しかしながら、本研究では JCV が自身の複製のために TA_g を介し RPA のリン酸化を惹起させるのか、もしくは JCV が細胞内に入ってきたことを DNA 傷害として細胞が認識し、その結果として宿主細胞の DNA 修復のために RPA32 のリン酸化を細胞が行なっているのかを確定するには至らなかった。今後 siRNA、dominant negative 等の方法を用いて、RPA32 の機能を抑制し、JCV の複製における影響を検索することが必要と考えられた。

結 語

1) JCV 感染と宿主の複製過程制御因子である replication protein A (RPA32) のリン酸化について、抗リン酸化抗体を作成し検討した。JCV 感染により RPA32 がリン酸化することを確認した。JCV 複製において helicase として機能する JCV 早期蛋白質である T 抗原 (TA_g) は RPA32 と結合する事が示された。

2) JCV 感染細胞、ヒト進行性多巣性白質脳症の JCV 感染細胞において、TA_g 陽性細胞では RPA32 の局在は核内に斑状に認められ、また斑状の RPA32 はリン酸化していることが明らかになった。以上の結果からリン酸化した RPA は JCV の複製過程において重要な役割を果たしていることが推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 長 嶋 和 郎

副 査 笠 原 正 典

副 査 畠 山 昌 則

学 位 論 文 題 名

JC virus 感染における Replication Protein A(RPA) の リン酸化に関する検討

Polyomavirus である JC virus (JCV)は進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy: PML)の原因ウイルスで、二重鎖閉環状 DNA ウイルスである。ウイルスは自己複製の際にウイルス蛋白である Large T antigen (TAg)とともに宿主細胞蛋白を利用していると考えられる。そこでウイルス非感染細胞である IMR-32 細胞と持続感染細胞である JCI 細胞で様々な DNA replication protein に関して検討を行い、replication protein A (RPA)の発現の差を見出した。

RPA は DNA 複製, 修復, 組み替え時に作用する。3 量体である RPA のうち 32kDa の RPA32 の N 末はリン酸化することにより種々の機能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている。SV40 TAg と RPA に関しては DNA 複製における機序が解明されつつあるが、JCV TAg の複製に関してはその機構は未だ不明な点が多い。

本研究では JCV 感染過程において、JCV 早期蛋白である TAg と宿主蛋白である RPA32 のリン酸化との関係を詳細に検討し、JCV の複製機構を解明する事を目的として検討を行った。

IMR-32 細胞、JCI 細胞における RPA のウエスタンブロッティングにて 32kDa のバンドのほか JCI 細胞では 34kDa にもバンドが認められた。作成したリン酸化 RPA を認識する抗体 (pRPA)、phosphatase 処理による検討からこの 34kDa のバンドは RPA32 のリン酸化バンドであることが示された。次に IMR-32 細胞に JCV を感染させても同様に RPA32 のリン酸化が出現した、以上の結果から、JCV 感染にて RPA32 のリン酸化が起こっていることが確認された。

次に JCV TAg と RPA, pRPA の結合を免疫沈降にて検討した結果、RPA, pRPA のいずれも JCV TAg と結合していることが確認された。

IMR-32 細胞、JCI 細胞を用いた免疫染色の結果、JCI 細胞では TAg 陽性の細胞の核では RPA は斑状の発現を示した。次に斑状に発現している RPA はリン酸化していると推測し、抗 pRPA 抗体を用いて免疫染色を施行した結果、斑状の RPA の発現は pRPA の発現と完全に共局在していた。さらに培養細胞と同様に、JCV が感染しているヒト PML 大脳での RPA のリン酸化を immunoblotting により確認した。また、免疫染色、蛍光免疫染色でも核が腫大した TAg 陽性の oligodendrocytes で RPA の斑状の陽性像を認め、pRPA と共局在していることからヒト PML 大脳で

も pRPA が核内で斑状に発現していることが明らかになった。

今回の検討からは培養細胞、ヒト PML 脳検体において、JCV 早期蛋白質である TAg 陽性の細胞では RPA32 がリン酸化していること、およびリン酸化 RPA32 は核内で斑状に集積することが判明した。以上の結果から、JCV の感染により、宿主細胞の RPA のリン酸化が惹起されることが示され、ウイルス複製において RPA のリン酸化が重要な役割を担っていることが推察された。

口頭発表にあたり、副査の畠山（昌）教授より IMR-32 細胞における adriamycin 処理とウイルス感染の RPA リン酸化バンドの差；ウイルス感染の RPA のリン酸化が修復に関与している可能性、副査の笠原教授よりウイルス全般での RPA のリン酸化、pRPA の斑状の意義、主査の長嶋教授よりリン酸化抗体作成部位、ヒト PML 脳で培養細胞と同様の結果が出た意義等に関する質問があった。これらの質問に関して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は pRPA がウイルスの複製機構に関与する重要な分子であることを証明し、またヒト PML brain でも pRPA の核内局在が斑状であることも明らかにした。

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と判定した。