



Title	Archetypeの調節領域を持つJCウイルスの細胞親和性とその解析
Author(s)	長谷川, 靖
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第4035号
Issue Date	1997-03-25
DOI	10.11501/3122193
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51404
Type	theses (doctoral)
Note	Running title: Propagation of archetypal JCV in COS-7 cells
File Information	000000307384.pdf



[Instructions for use](#)

Archetypeの調節領域をもつ
JCウイルスの細胞親和性とその解析

北海道大学

長谷川 靖

Archetypeの調節領域を持つJCウイルスの細胞親和性とその解析

Analysis of the cellular tropism of JC virus with archetypal regulatory region

長谷川 靖

Yasushi Hasegawa

北海道大学医学部病理学第二講座

The Second Department of Pathology, Hokkaido University School of Medicine

Running title: Propagation of archetypal JC virus in COS-7 cells

Archetypeの調節領域を持つJCウイルスの細胞親和性とその解析

要約

原型調節領域をもつJCV (Archetype) は、健常人の尿中からクローニングされた。PML患者の脳組織から分離されたJCV (PML type) の調節領域は、この原型調節領域から欠失と重複という変化を経て構築されていることが推測されている。しかし、archetypal JCVのウイルス粒子、in vitroでの感染性、調節領域の違いによる細胞親和性への影響などに関してはいまだ明らかにされていない。そこで我々は、archetypal JCV株であるJCV CY、PML type JCV株であるJCV Mad-1および調節領域のみCYに置換したMad-1のキメラ株であるJCV Mad-1/CR-CY (JCV Chimera) のそれぞれのDNAをCOS-7細胞 (サル腎細胞由来) およびIMR-32細胞 (ヒト神経細胞由来) にトランスフェクション法を用いて導入し長期間にわたり継代した。その結果、JCV CY、JCV Mad-1およびJCV ChimeraはCOS-7細胞にて増殖したが、IMR-32細胞においてはJCV Mad-1のみの増殖が認められた。それぞれの感染細胞から抽出したJCV DNAは、サザンブロットハイブリダイゼーションにより確認し、JCV DNAの調節領域はPCR法により増幅し、シーケンスを行ってそれぞれのプラスミドの調節領域と同じ塩基配列であることを確認した。これらのことから、神経系の細胞であるIMR-32細胞においては、JCVが増殖するために調節領域がPML typeであることが必要であり、調節領域の違いによる細胞親和性への影響が示唆された。一方、サルの腎細胞であるCOS-7細胞において3型とも増殖した点は、この細胞がJCVの増殖に有用なSV40 T抗原を持っているためと思われる。また、本実験で我々はCOS-7細胞において、初めてJCV CYの増殖に成功し、将来的にarchetypal JCVの腎での持続感染機構の解明に有用であると考えられた。

Running title: Propagation of archetypal JCV in COS-7 cells

Abstract

Analysis of the cellular tropism of JC virus with archetypal regulatory region

JC virus (JCV) with an archetypal regulatory region (archetype) has been cloned from urines of a healthy individual. It has been suggested that the regulatory region of prototype JC virus (PML type) isolated from brain of PML patient was derived from that of the archetype by deletion and duplication. Biological characteristics of archetypal JCV, however, have not been fully studied. In the present study we examined the infectivity of archetypal JCV (CY), PML-type JCV (Mad-1) and Chimera JCV (Mad-1/CR-CY), in which the regulatory region is composed of CY and the other region Mad-1.

DNAs from the three JCV types were transfected into COS-7 (monkey kidney cells transformed with SV40 T) and IMR-32 (human neuroblastoma cell). COS-7 was permissive for all three types, but IMR-32 was only infected with Mad-1. Infected DNAs were confirmed by Southern blotting, and the constancy of the regulatory regions before and after transmission was verified by DNA sequencing. The results showed that the viral regulatory region was related to viral cell tropism and that PML type regulatory region would be necessary for IMR-32 to propagate. The fact that COS-7 was susceptible for all three types may be explained by the function of SV40 T protein. In addition, we first succeeded in the propagation of CY in COS-7, which would provide a useful system to analyze the mechanism of persistent infection of archetypal JCV.

Key Words:JC virus, PML type, Archetype, Control region, COS-7 and IMR-32

緒言

JCウイルス（以下JCVと略す）は、パポーバウイルス科*Papovaviridae*、ポリオーマウイルス属*Polyomavirus*に属し、ウイルスDNAは、二重鎖の環状DNAで約5,130塩基対からなっている。¹⁾ JCVは、ヒト中枢神経の脱髄性疾患である進行性多巣性白質脳症（PML）の原因ウイルスであり、Padgettら（1971）によりPML患者の脳組織から分離された。²⁾ 従来、JCVが増殖可能な細胞がヒト胎児脳細胞の初代培養（Primary human fetal glial cells: PHFG細胞）にほぼ限られ³⁾、しかも十分なウイルスを得るのに長期間を必要とし、JCVのウイルス学的研究において大きな妨げとなっていた。

しかし最近では、赤谷らがJCV Mad-1株をIMR-32細胞に感染させ、ウイルスが増殖したことを報告している⁴⁾。また、奴久妻らはこのJCVをIMR-32細胞に感染させ比較的短時間で大量のJCVを産生するJCV持続感染細胞（JCI細胞）を樹立した⁵⁾。

JCVは幅広く一般の人に無症候性に腎に感染しており、しばしば尿に排泄され⁶⁾、免疫不全の患者では脳に病変を生ずることが知られているが、その詳細は不明である。

最近余郷ら（1990）が健常人の尿中からクローニングされたJCVの調節領域の塩基配列を調べた結果、この配列は脳組織から分離されたJCVの調節領域の構造とは異なることを示し、この尿型の調節領域を持つJCV株を原型JCV株（Archetype）、従来の調節領域を持つJCV株をPML型JCV株（PML type）と呼ぶことを提称した。さらに詳細な解析からPML型調節領域は、原型調節領域から欠失と重複という変化を経て構築されていることが明らかにされた⁷⁾。

しかし、原型調節領域を持つJCVの*in vitro*での感染性、調節領域の違いによる細胞親和性への影響などに関しては未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、原型JCV株であるCY DNA、PML型JCV株であるMad-1 DNAおよび調節領域のみCYに置換したMad-1のChimera DNAを用いて、トランスフェクション法によりCOS-7細胞およびIMR-32細胞との親和性を解析、比較検討した。さらにCOS7細胞において原型調節領域を持つJCVの増殖に成功したので報告する。

材料および方法

1 ウイルスと細胞

DNAは、原始型 (Archetype) の調節領域を有するJCV DNAであるCY (東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部余郷博士より分与)、PML型 (PML type) の調節領域を有するJCV DNAであるMad-1 (余郷博士より分与) およびCYの調節領域とMad-1のキメラであるJCV Mad-1/CR-CY DNA (余郷博士より分与) を用いた。細胞は、COS-7細胞 (SV-40 transformed African green monkey kidney cell)、293細胞 (embryonal kidney cell, human)、CV-1細胞 (African green monkey kidney cell)、SMKT-R-3細胞 (renal cell carcinoma, human)、T24細胞 (bladder carcinoma, human)、EJ-1細胞 (bladder carcinoma, human)、IMR-32細胞 (neuroblastoma, human)、A-172細胞 (glioblastoma, human)、U251細胞 (glioma, astrocytoma) を用いた。COS-7細胞 (ATCC, Rockville, MDより入手) および、CV-1細胞、SMKT-R-3細胞、T24細胞、EJ-1細胞 (JCRB細胞バンクより分与) は、Eagle's minimum essential medium (MEM) に2 mMのグルタミンと10% ウシ胎児血清 (FBS) および抗生物質 (ペニシリン100U/ml, ストレプトマイシン100 μ g/ml) を添加し、IMR-32細胞、U251細胞 (JCRB細胞バンクより分与) は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に2 mMのグルタミンと10% FBS および抗生物質を添加して培養した。293細胞 (JCRB細胞バンクより分与) は、MEMに2 mMのグルタミンと10% ウマ血清 (HS) および抗生物質を添加し、A-172細胞 (ATCCより入手) は、DMEMに2 mMのグルタミンと10% FBS、抗生物質および4.5g/lのグルコースを添加して培養した。37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

2 トランスフェクション

トランスフェクション3日前に35mmシャーレにて単層培養を行い、細胞がシャーレの底を50~70%覆ったことを確認後 Lipofectamine法によるトランスフェクションを行った。pUC-19のEcoRI siteでクローニングされたJCV CY DNA、JCV Mad-1/CR-CY DNAおよびJCV Mad-1 DNAをEcoRIで消化し、フェノール抽出後、エタノール沈殿を行った。沈殿は蒸留水に溶解し、導入用DNAとして用いた1.0 μ gをOpti-MEM (GibcoBRL, Grand Island, NY) 100 μ lに溶解し、Lipofectamine (GibcoBRL) 1.0 μ lをOpti-MEM 100 μ lに溶解したものと穏やかに混合して室温にて45分静置することによりDNA-lipofectamine複合体を形成させ、Opti-MEMで洗浄したシャーレ上の細胞に添加した。用いたJCV CY DNA、JCV Mad-1/CR-CY DNAおよびJCV Mad-1 DNAは、EcoRIでプラスミドDNAから切り出して使用した。6時間後、10% FBS含有MEMまたは10% FBS含有DMEMにて培養液を交換し、3日後に25cm²培養フラスコにまきなおした。以後、1:3~1:4の継代比率にて継代し、64日間継代した細胞を回収した。

3 赤血球凝集反応 (Hemagglutination:HA) ⁸⁾

トランスフェクションしてから64日間継代した感染細胞を回収し0.2%BSAを含む1mM Tris-HCl (pH 7.5) 0.5mlに懸濁し、3回凍結融解を行うことにより細胞を破壊した。0.05mg/mlノイラミニダーゼ (Type V, Sigma, St Louis, MO) を添加し、37°Cにて一昼夜インキュベートした後、56°Cで30分の熱処理により酵素反応を停止させた。そのウイルス液を1,500rpmで10分間4°Cで遠心し、上清を回収しウイルス液とした。V字型96穴マイクロプレート (Costar, Cambridge, MA) に0.2%BSA加PBS (pH 7.15) を50 μ lずつ分注し、マイクロプレートの第1穴目に感染細胞より回収したウイルス液を50 μ l加え2倍段階希釈した。よく混和した後、37°Cで1時間インキュベートし、PBS (pH7.15) で洗浄した0.5%ヒトO型赤血球を50 μ lずつ全穴に分注し、4°Cで反応させ3時間後に判定した。HA価は、赤血球を完全に凝集させた最大希釈の逆数とした。なお、PBSを陰性コントロールとし、JCI細胞由来のウイルス液⁵⁾を陽性コントロールとした。

4 JCV DNAの抽出

64日間継代した感染細胞からのJCV DNAの抽出はHirt法⁹⁾に従った。即ち、25cm²の培養フラスコに培養した感染細胞をスクレーパーではがし、10mM Tris-HCl (pH 7.5) 1mlに懸濁させた。その液に10mM Tris-HCl (pH 7.5), 20mM EDTA, 1.2% SDS混合液を1ml加え、30分間室温に静置した。20 μ g/mlのproteinase K液 (Takara Shuzo, Kyoto) を20 μ l加えて、37°Cで1時間処理後、5M NaClを0.5ml添加し4°Cで一昼夜静置した。翌日、4°C、14,500rpmで30分間遠心することにより高分子のDNAを沈殿させた。上清を回収した後、フェノール抽出-クロロフォルム抽出により除タンパクを行った。エタノール沈殿にてウイルスDNAを回収し、蒸留水200 μ lに溶解した。

5 サザンブロット

抽出したウイルス DNA 10 μ gはEcoRI単独、またEcoRIとBamHIの両方で消化した。このDNAと陽性コントロールとして、JCV CY DNA 1ngを1.0%アガロースゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを1.0M NaCl-0.4N NaOH液で30分間ゆっくり振盪してアルカリ変性を行った。その後、ナイロン膜 (Biodyne plus membrane, Pall Biosupport Division, East Hills, NY) にキャピラリー法により、一昼夜トランスファーし、ナイロン膜を80°Cで30分乾熱処理しDNAを膜に固定した。このナイロン膜をハイブリダイゼーション液 (5 \times SSC, 2% blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine sodium salt, 50%formamide, 0.02% SDS) を用いて37°C1時間のprehybridizationを行った。プローブは、トランスフェクションに用いたJCV CY DNAをジゴキシゲニンDNA標識および検出

キット (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用い、ランダムプライム法により37°C1時間のインキュベーションにてジゴキシゲニン標識した。プローブは、100°Cで10分間熱処理後、氷中に5分間急冷し、ハイブリダイゼーション液に25 ng加え、ナイロン膜とともに37°Cで1晩インキュベーションした。翌日、ナイロン膜を2×SSC-0.05%SDS液で室温5分間2回洗浄、0.1×SSC-0.05%SDS液で55°C15分間2回洗浄した。洗浄したナイロン膜をブロッキング溶液に20分間浸した後、5000倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体と30分間反応させた。その後、バッファー (100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH7.5) で10分間3回洗浄後、3 mlのHNPP-EU (アイシン・コスモス, 刈谷)¹⁰⁾ と2時間反応させ、Epi-Light UV撮像セットEU-1100 (アイシン・コスモス, 刈谷) を用いてシグナルを検出した。

6 免疫染色

感染細胞内のJCVは、JCVのVP1に特異的に反応する抗JCVウサギVP1抗体を用いた免疫染色を行い、ウイルスが増殖していることを確認した。トランスフェクション後64日目の感染細胞はポリ-L-リジンをコートしたカバーガラスに培養した。培養4日後に培養液を除き、PBSにて2回洗い、冷アセトンにて10分間固定した。内因性ペルオキシダーゼをブロックするために、H₂O₂-メタノールで前処理を行い、1%BSA加PBSにて100倍に希釈した抗JCVウサギVP1抗体¹¹⁾ (東京都立衛生研究所青木博士より分与) で4°C、一昼夜反応させた。次に、二次抗体として、ビオチン化抗ウサギ抗体 (Histofine SAB-PO Multi Kit, Nichirei Corporation) で37°C、1時間反応させ、3,3-diamino-benzidine tetrahydrochloride dihydrate (DAB) で発色させた。ヘマトキシリンで核染後、封入し鏡検した。

7 JCV調節領域の塩基配列の解析

JCV調節領域のPCR増幅は、Ault&Stonerの方法に従った。感染細胞から抽出したDNA100 ngにプライマーは25 pmolのJRR-5 (*Bam*HI siteを含む) 5'-CCATGCAGACCTATCAAGGCC-3' (4942 to 4962) とJRR-6 (*Pst*I siteを含む)^{12,13)} 5'-TTAGTTCCACTCCAGGTTTTAC-3' (341 to 320)、80 μmol dNTP、10×PCR buffer 10 μlおよび2.5 units Taq DNA polymeraseを添加し、さらに蒸留水を加えて計100 μlとした。増幅反応は、94°C 30秒、55°C 1分、72°C 1分を1サイクルとして、35サイクルをGene Amp System 2400 (Perkin Elmer) を用いて行った。陽性コントロールとして、トランスフェクションに使用したJCV CY DNAを用いた。PCR産物は2.0%アガロースゲルにて、電気泳動しバンドを確認した。PCR産物はMicro Spin S-400 HR Column (Pharmacia Biotech, Molecular Biology Reagents Division, USA) を用いて精製した。精製したPCR産物とpBluescript SK+ vector (Stratagene, USA) を*Bam*HIと*Pst*Iで1時間消化した後、DNA Ligation Kit (Takara Shuzo, Otsu) を用いて16°Cで一昼夜連結させた。翌日、この連結反応液を用いて、heat-shockにて*Escherichia*

coli JM109 competent cells (Takara Shuzo) を形質転換させた。この形質転換させた大腸菌をSOC培地にて1時間培養後、X-gal/IPTG/アンピシリンプレートに塗り広げ、37°Cで1晩培養した。白いコロニーを培養し、Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification system (Promega, Madison, USA) キットを用いプラスミドDNAを抽出後*Bam*HIと*Pst*Iで1時間消化してinsertの入っているクローンを選択した。おのおの6クローンのプラスミドDNA 1 μ gを鋳型としサイクルシーケンシングキットの添付のプロトコールに従い、日立蛍光式パーソナル DNAシーケンサーSQ-5500 (HITACHI) にて塩基配列を決定した。

2. 免疫染色によるICVの検出

感染細胞に対して抗ICV capsid VP1抗体を用いた免疫染色を行ったところ、COS-7細胞においては、ICV CY株、ICV Mad-1/CR-CY株、ICV Mad-1株のすべてで細胞内にVP1抗原を捕捉した。CY-COS-7細胞の免疫染色をFig. 1に示す。

3. 感染細胞から精製されたICV DNAの解析

64日間継代した細胞からHirt法を用いて精製されたICV DNAを*Eco*RI単独で消化、また*Eco*RIと*Bam*HIの両方で消化した。このDNAを用いて、ICV CY DNA全長をprobeとして、サザンブロットハイブリゼーション法によるICV DNAの解析を行った結果、*Eco*RI単独で消化した場合は1ヶ所で切断され約5.1 kbpの位置に陽性シグナルを認めた。さらに*Eco*RIと*Bam*HIで消化した場合は制限酵素マップで示されている通り、帯分の約2.5 kbpの位置に陽性シグナルを認めた (Fig. 2)。

4. シーケンシング

感染細胞から検出されたICV DNAの調節領域の塩基配列を解析した結果、CY-COS-7およびChimera-COS-7由来のICV DNAの調節領域はトランスフェクションに用いたICV CY DNAのものとは完全に一致した (Fig. 3a)。また、Mad-1-COS-7から抽出されたICV DNAの調節領域の解析を行った結果、複製開始点 (O_{ori}) から109塩基のところ、すなわち一対目のTATA boxと二対目のTATA boxの間にGCATCという4塩基の挿入を認めた。

結果

1 JCVトランスフェクション後のHA価の測定

トランスフェクション後、COS-7細胞およびIMR-32細胞におけるJCV産生をHAにより測定した結果をTable 1に示す。COS-7細胞においては、JCV CY株のHA価は128 HA units、JCV Mad-1/CR-CY株のHA価は128 HA units、JCV Mad-1株のHA価は64 HA unitsであった。また、IMR-32細胞においては、JCV CY株およびJCV Mad-1/CR-CY株のHA価は検出限界以下 (<4 HA units) であった。JCV Mad-1株のHA価は、256 HA unitsであった¹⁴⁾。なお、293細胞、CV-1細胞、SMKT-R-3細胞、T24細胞、EJ-1細胞、A-172細胞、U251細胞のHA価はすべて検出限界以下 (<4 HA units) であった。

2 免疫染色によるJCVの検出

感染細胞に対して抗JCVウサギVP 1抗体を用いた免疫染色を行ったところ、COS-7細胞においては、JCV CY株、JCV Mad-1/CR-CY株、JCV Mad-1株のすべてで核内にVP 1抗原を確認した。CY-COS-7細胞の免疫染色をFig. 1に示す。

3 感染細胞から精製されたJCV DNAの解析

64日間継代した細胞からHirt法を用いて精製されたJCV DNAを*EcoRI*単独で消化、また*EcoRI*と*BamHI*の両方で消化した。このDNAを用いて、JCV CY DNA全長をprobeとして、サザンブロットハイブリダイゼーション法によるJCV DNAの解析を行った結果、*EcoRI*単独で消化した場合は一ヶ所で切断され約5.1 kbpの位置に陽性シグナルを認めた。さらに*EcoRI*と*BamHI*で消化した場合は制限酵素マップで示されている通り半分の約2.5kbpの位置に陽性シグナルを認めた (Fig. 2)。

4 シーケンス

感染細胞から検出されたJCV DNAの調節領域の塩基配列を解析した結果、CY-COS-7およびChimera-COS-7由来のJCV DNAの調節領域はトランスフェクションに用いたJCV CY DNAのものと完全に一致した (Fig. 3a)。また、Mad-1-COS-7から抽出されたJCV DNAの調節領域の解析を行った結果、複製開始点 (Ori) から109塩基のところ、すなわち、一番目のTATA boxと二番目TATA boxのちょうど間にGGTCという4塩基の挿入を認めた。

考察

ヒト中枢神経の脱髄性疾患である進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) の原因ウイルスであるJC virus (JCV) は広く世界中に分布しており^{15,16)}、しばしば尿中に排泄されていることが明らかとなっている⁶⁾。JCVは初感染後に腎に持続感染していることが明らかにされており¹⁷⁾、また尿中からクローニングされたJCVの大部分は原型調節領域をもつarchetypeのJCVであることが確認されている¹⁸⁾。さらにこの原型調節領域から欠失と重複という塩基配列の再編成を経てPML型の調節領域が構築されていることが明らかにされている⁷⁾。

しかし、現在までのところarchetypeのJCVのin vitroでの感染性や調節領域の違いによる細胞親和性への影響などの詳細については不明である。そこで本研究において、archetypeのJCV CY、PML typeのJCV Mad-1 および調節領域のみCYに置換したMad-1のキメラJCVの3型のウイルスDNAをCOS-7細胞およびIMR-32細胞にトランスフェクション法により導入し64日間にわたって継代してその解析を行った。

トランスフェクション後、64日目にウイルスの産生量をHAにより測定したところ、CY-COS-7およびChimera-COS-7では128 HAunits、Mad-1-COS-7では64 HA unitsであった。このことから、サル腎細胞にSV40 T抗原を発現させたCOS-7細胞において、3型のすべてがウイルスの増殖を示したことが明らかとなった。しかし、調節領域の違いによる細胞親和性への影響については、HA価においてarchetypeの調節領域を持つJCV CYおよびJCV ChimeraとPMLtypeの調節領域を持つJCV Mad-1との間には2倍の差があることは、感染細胞の継代数により多少の変動もみられるが、PML typeはarchetypeに比して腎細胞への親和性が少ないためと推測される。

神経芽細胞腫由来のIMR-32細胞においては、CY-IMR-32およびChimera-IMR-32では検出限界以下 (<4 HA units) でありウイルスの増殖は起こらなかったと考えられ、Mad-1-IMR32においては256 HA unitsでウイルスの増殖を認めた¹⁴⁾。

さらに、抗JCVウサギVP 1抗体を用いて免疫染色を行ったところ、CY-COS-7、Chimera-COS-7およびMad-1-COS-7において、感染細胞の腫大した核内にVP 1抗原を認めた。このことから、Lipofectamine法によりトランスフェクションされた後、JCVはCOS-7細胞の核内にて増殖していることが明らかとなった。また、JCVが細胞核内に存在したままCOS-7細胞の増殖が起きJCVも増えているのか、あるいは核内で増えたJCVがその細胞から放出された後に、他の細胞に吸着、侵入しその感染された細胞の核内で増えているのかは不明だが、このJCVの感染機構についてはさらなる解析が必要と考えられる。さらに今後は、電子顕微鏡を用いたJCVのウイルス粒子の確認が重要と考えられ、より多量のJCVウイルス粒子を得るためにはトランスフェクション後の細胞の継代数による影響、細胞培養液中の血清濃度による影響⁴⁾などに関する解析も必要と思われた。COS-7細胞から抽出されたDNAをEcoRI単独、EcoRI

と *Bam*HI の両方で消化した後、トランスフェクションに用いた JCV CY DNA をプローブとしてサザンブロットハイブリダイゼーション法によりその解析を行ったところ、*Eco*RI 単独で消化した場合は一ヶ所のみで切断され 5.1 kbp の位置に陽性シグナルが見られ、*Eco*RI と *Bam*HI で消した場合は 2.5 kbp の位置に陽性シグナルを認めた^{1,19)}。このことから、この DNA が JCV のものであり COS-7 細胞内に JCV DNA が存在していることが明らかとなった。また、このウイルス DNA は構造上の大きな変化のない JCV DNA であると考えられた。

さらに COS-7 細胞で増殖した JCV の調節領域の塩基配列を解析した結果、CY-COS-7、Chimera-COS-7 および Mad-1-COS-7 由来の JCV の調節領域はトランスフェクションに用いた JCV DNA のそれと完全に一致した。JCV の調節領域は *in vitro* においても非常に変異を起こしやすい領域であることが知られているが²⁰⁾、本実験においては、欠失や重複などの塩基配列の再編成は認められず、長期間にわたる持続感染により変化のないウイルスを得ることが可能であると考えられた。

一方、IMR-32 細胞に関しては HA 価の上昇を示した Mad-1-IMR-32 由来の JCV の調節領域には欠失が起こっていることが明らかとなっている¹⁴⁾。また、今回の実験で CY-IMR-32、Chimera-IMR-32 の HA 価の上昇は見られずウイルスの増殖が起きなかったことなどから、JCV が IMR-32 細胞において増殖するためには、少なくとも PML type の調節領域を持っている必要があると考えられ、調節領域の違いによる細胞親和性への影響が示唆された。

しかし、COS-7 細胞において JCV CY、JCV Chimera、JCV Mad-1 の 3 型とも増殖した点からは、SV40 の T 抗原が primate cells において JCV Mad-1 の DNA 複製、転写を促すという報告もあり²¹⁾、調節領域の違いよりも SV40 T 抗原の影響が大きいのではないかと思われた。このことから、SV40 T 抗原のないサル腎細胞由来株 CV-1 では全く感染性を示さなかった点からも裏付けられよう。また、SV40 の promoter を用いて作成されたプロモーター *SR* α 下に JCV 後期蛋白領域を COS-7 にて発現させることによりウイルス粒子が形成されることも報告されており²²⁾、SV40 T 抗原の多機能性が重要であることを示唆している。

最近、Sock ら (1996) は archetype および PML type の JCV における機能的比較を行った²³⁾。すなわち、サル腎細胞である CV-1 細胞とヒトグリア細胞である U138 細胞における両者の JCV DNA の複製を比較したところ、JCV の T 抗原発現下において顕著な差は見られなかったという。これらの知見は本研究において、JCV の T 抗原よりも強力な活性を有する SV40 の T 抗原を発現している COS-7 細胞において archetype、PML type ともに HA 価の上昇を認めたことと矛盾しないと考えられる。さらに彼らは JCV の遺伝子発現を解析し、PML type の初期、後期プロモーターともにグリア細胞でより高い活性が見られたとしている。しかしながらこれらの結果は、ウイルス産生には到らない感染初期の比較であり、さらに JCV の T 抗原を発現させているため必ずしも細胞親和性を直接反映したものではない可能性がある。

またMonacoら (1996) は、PML type のJCVを用いてリンパ系の細胞であるヒトのhematopoietic progenitor cells (CD34⁺)、primary B lymphocytes、tonsillar stromal cellsおよび神経系の細胞であるhuman fetal glia cellsにおける感染性の比較を行った^{2,4)}。その結果、神経系の細胞におけるほど高率ではなかったもののリンパ系の細胞を含むすべての細胞においてDNA複製およびT、V抗原の出現を認めた。これらのことは本研究において、PML typeのJCVであるMad-1がIMR-32細胞において良く増殖し、脳親和性を示したことと相関すると考えられた。

JCVはその限られた宿主特異性により、通常用いられる細胞株においてウイルス遺伝子の複製、転写が顕著でないためSV40のT抗原を発現しているCOS-7細胞を用いたり、強制的にSV40あるいはJCVのT抗原を発現させた細胞で細胞親和性を比較するしかないのが現状である。近年、IMR-32細胞において調節領域に欠失があるもののJCV Mad-1が増殖可能になっていることから^{4,5,14)}、今後、腎由来の細胞株についてもさらなる解析をすすめ、COS-7細胞に変わるT抗原非発現下における細胞親和性の検討を行う必要があると思われる。

また、本実験では我々はCOS-7細胞において、archetypeのJCVとしては初めてJCV CYの増殖に成功し、将来的にarchetypal JCVの腎での持続感染機構やPML発症に至るまでの機序の解明を発展させるものと考えられた。

結語

JC virusの組織親和性に関して、archetype（腎親和性）とPML type（脳親和性）のウイルス株の調節領域の差によるウイルス増殖性を、主にCOS-7細胞（腎由来細胞）とIMR-32細胞（脳由来細胞）とを用いて解析し、次の結果が得られた。

- 1 IMR-32細胞においてJCV Mad-1のみが増殖したことから、この細胞では調節領域がPML typeであることが重要であると示された。COS-7細胞においてJCV CY、JCV Chimera、JCV Mad-1の3型とも増殖したことから、この細胞では調節領域の違いよりもSV40 T抗原の影響が大きいものと思われた。
- 2 HA価の上昇を示したCY-COS-7、Chimera-COS-7およびMad-1-COS-7細胞のすべてで、感染細胞の腫大した核内にVP 1抗原を確認し、JCVが細胞核内に増殖していることが明らかにされた。
- 3 COS-7細胞から抽出されたDNAをそれぞれサザンブロットハイブリダイゼーション法により解析を行ったところ、*EcoRI*単独消化では5.1kbp、*EcoRI*と*BamHI*の両方で消化した場合は2.5kbpの陽性シグナルを認め、構造上大きな変化のないJCV DNAであると考えられた。
- 4) COS-7細胞から抽出された3型あるJCV DNAの調節領域の塩基配列を解析したところ、CY-COS-7およびChimera-COS-7ではトランスフェクションに用いたJCV DNAのものと完全に一致し、欠失や重複などは認められなかった。Mad-1-COS-7では複製開始点（Ori）から109塩基のところにGGTCという4塩基の挿入を認めた。
- 5) Archetype のJCVとしては初めてCOS-7細胞においてウイルスの産生に成功した。

謝辞

本研究に当たり、御指導、御校閲を賜りました北海道大学医学部病理学教室第2講座 長嶋 和郎教授に深謝致します。御指導、御協力を頂いたカルフォルニア工科大学生物部 奴久妻 聡一博士ならびに同講座 平賀 博明先生に深謝致します。また、JCV CY DNAの分与をして頂いた東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部 余郷博士に深謝致します。さらに、種々の御協力を頂いた同講座 小林 希、佐藤 真実、高橋 文誉技師に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT (1984): Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 51: 458-469.
- 2) Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH (1971): Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1: 1257-1260.
- 3) Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR (1992): Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. [Review]. *Clin Microbiol Rev* 5: 49-73.
- 4) Akatani K, Imai M, Kimura M, Nagashima K, Ikegami N (1994): Propagation of JC virus in human neuroblastoma cell line IMR-32. *J Med Virol* 43: 13-19.
- 5) Nukuzuma S, Yogo Y, Guo J, Itoh S, Shinohara T, Nagashima K (1995): Establishment and characterization of a carrier cell culture producing high titers of the polyoma JC virus. *J Med Virol* 47: 370-377.
- 6) Kitamura T, Aso Y, Kuniyoshi N, Hara K, Yogo Y (1990): High incidence of urinary JCV virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. *J Infect Dis* 161: 1128-1133.
- 7) Yogo Y, Kitamura T, Sugimoto C, Ueki T, Aso Y, Hara K, Taguchi F (1990): Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol* 64: 3139-3143.
- 8) Padgett BL, Walker DL (1973): Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 127: 467-470.
- 9) Hirt B (1967): Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 26: 365-369.
- 10) Kagiya N, Fujita S, Momiyama M, Saito H, Shirahama H, Hori SH (1992): A fluorescent detection method for DNA hybridization using 2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylamide phosphate as a substrate for alkaline phosphatase. *Acta Histochem Cytochem* 25: 467-471.

- 1 1) Aoki N, Mori M, Kato K, Sakamoto Y, Noda K, Tajima M, Shimada H (1996) : Antibody against synthetic multiple antigen peptides (MAP) of JC virus capsid protein (VP1) without cross reaction to BK virus : a diagnostic tool for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurosci Let* 205: 111-114.
- 1 2) Ault GS, Stoner GL (1993): Human polyomavirus JC promoter/enhancer rearrangement patterns from progressive multifocal leukoencephalopathy brain are unique derivatives of a single archetypal structure. *J Gen Virol* 74:1499-1507.
- 1 3) Ault GS, Stoner GL (1994): Brain and kidney of progressive multifocal leukoencephalopathy patients contain identical rearrangements of the JC Virus promoter/enhancer. *J Med Virol* 44: 298-304.
- 1 4) Yogo Y, Hara K, Guo J, Taguchi F, Nagashima K, Akatani K, Ikegami N (1993): DNA-sequence rearrangement required for the adaptation of JC polyomavirus to growth in a human neuroblastoma cell line (IMR-32). *Virology* 197: 793-795.
- 1 5) Flaegstad T, Sundsfjord A, Arthur RR, Pedersen M, Traavik T, Subramani S (1991): Amplification and sequencing of the control region of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction. *Virology* 180: 553-560.
- 1 6) Markowits R-B, Eaton BA, Kubik MF, Latorra D, McGregor JA, Dynan WS (1991): BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J Virol* 65: 4515-4519.
- 1 7) Chesters PM, Heritage J, McCance DJ (1983): Persistence of DNA sequence of BK virus and JC virus in normal human tissues and diseased tissues. *J Infect Dis* 147: 676-684.
- 1 8) Tominaga T, Yogo Y, Kitamura T, Aso Y (1992): Persistence of archetypal JC virus DNA in normal renal tissue derived from tumor-bearing patients. *Virology* 186: 736-741.
- 1 9) Howley PM, Rentier-Delrue F, Heilman CA, Law M-F, Chowdhury K, Israel MA, Takemoto KK (1980): Cloned human polyomavirus JC DNA can transform human amnion cells. *J Virol* 36: 878-882.
- 2 0) Martin JD, Padgett BL, Walker DL (1983): Characterization of tissue culture-induced heterogenicity in DNAs of independent isolates of JC virus. *J Gen Virol* 64: 2271-2280.

- 2 1) Feigenbaum L, Khalili K, Major E, Khoury G (1987): Regulation of the host range of human papovavirus JCV. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 3695-3698.
- 2 2) Shishido Y, Nukuzuma S, Mukaigawa J, Morikawa S, Yasui K, Nagashima K (1997): Assembly of JC virus-like particles in COS7 cells. J Med Virol: in press.
- 2 3) Sock E, Renner K, Feist D, Leger H, Wegner M (1996): Functional comparison of PML-type and archetype strains of JC virus. J Virol 70: 1512-1520.
- 2 4) Monaco MCG, Atwood WJ, Gravell M, Tornatore CS, Major EO (1996): JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency: J Virol 70: 7004-7012.

Figure Legends

Fig.1 Immunostain with rabbit anti-JCV VP1 antibody. JCV VP1 antigen was detected in the nuclei of infected cells at 4 days after subcultivation. a: JCV CY DNA transfected COS-7 cells (x50), b: COS-7 cells (not transfected).

Fig.2 Viral DNAs were extracted from infected cells at 64 days after transfection and were detected by Southern blot hybridization.

2a: The viral DNAs were digested with *EcoRI* (Lanes a,c,e,g), *EcoRI*+*BamHI* (Lanes b,d,f,h). Lane a,b: viral DNA extracted from CY-COS-7 cells. Lane c,d: viral DNA extracted from Chimera-COS-7 cells. Lane e,f: viral DNA extracted from Mad-1-COS-7 cells. Lane g,h: Positive control (JCV CY DNA). 2b: Restriction enzyme cleavage map of JCV DNA.

Fig.3 Sequence of the regulatory region of archetypal JCV DNA extracted from CY-COS-7 cells and Chimera-COS-7 cells.

Table 1. HA units^a of the JCV in COS-7 cells and IMR-32 cells

	JCV-CY	JCV-Chimera	JCV-Mad-1
COS-7	128	128	64
IMR-32	<4	<4	256

^aTotal yield: COS-7 cells and IMR-32 cells in 25 cm² tissue culture flasks at 64 days after transfection.

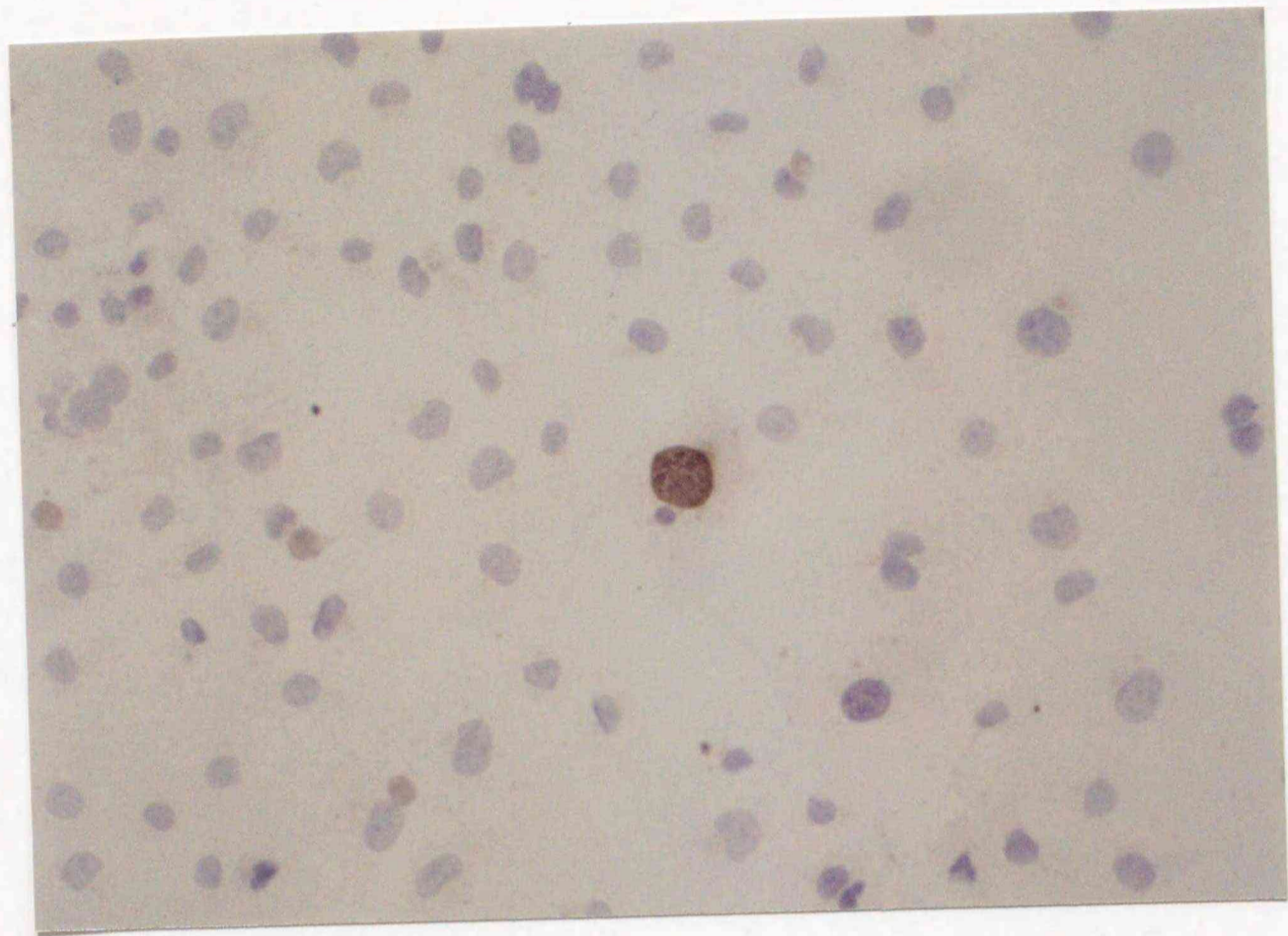


Fig. 1a

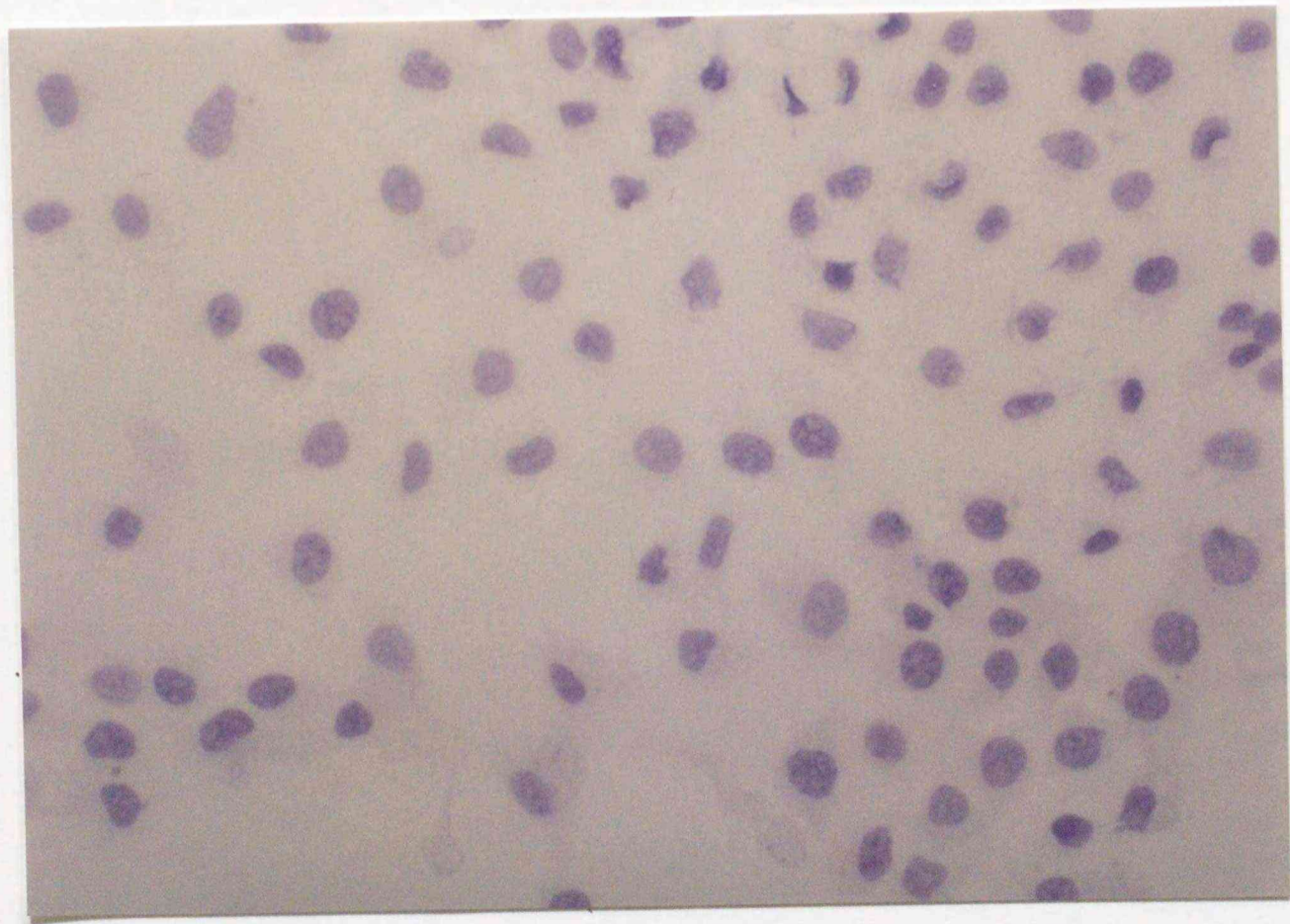


Fig. 1b

2病
長谷川靖

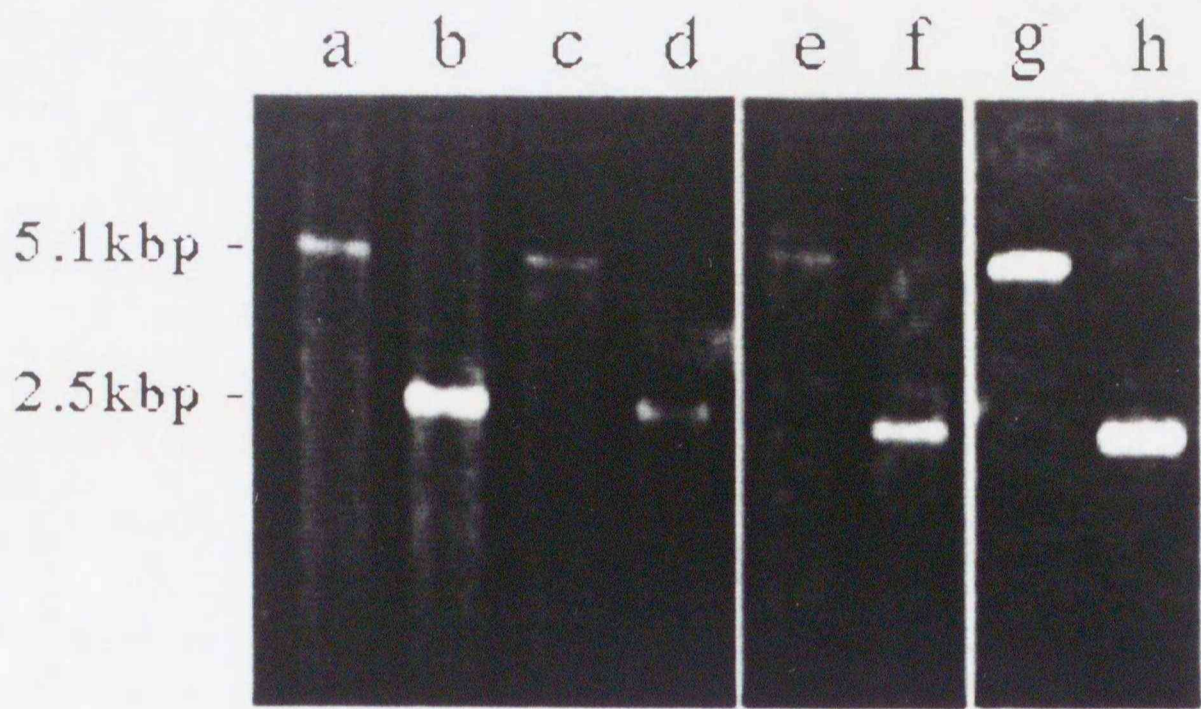


Fig. 2a

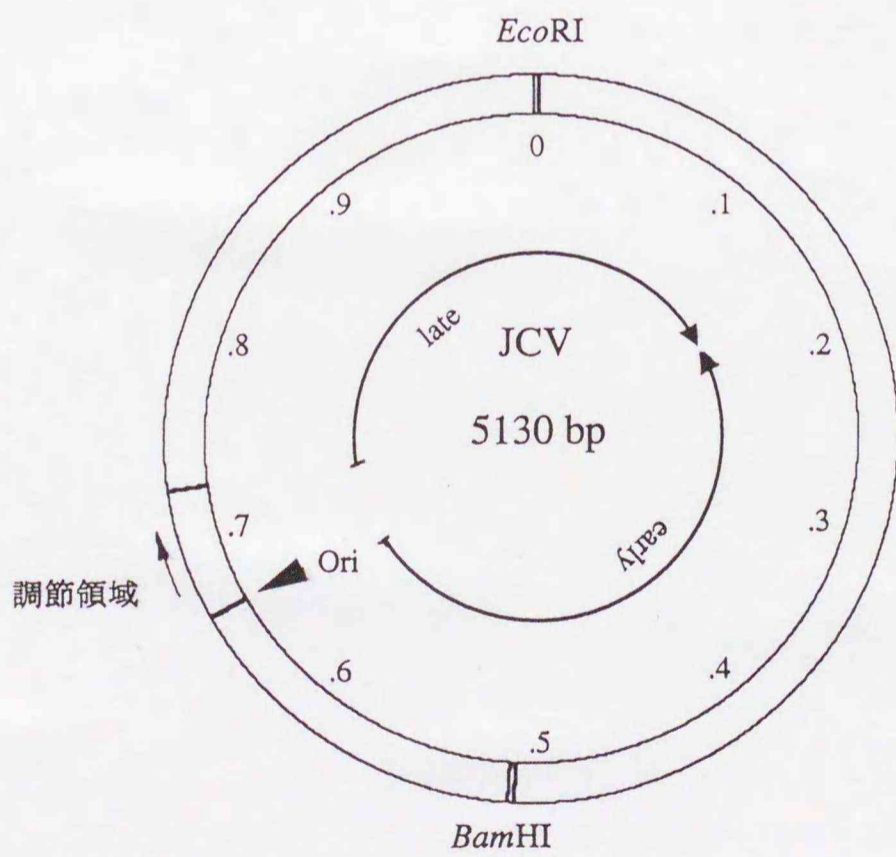


Fig. 2b

2病
長谷川 靖

Ort TATA
GCCTCGGCCT CCTGTATATA TAAAAAAAAG GGAAGGTAGG GAGGAGCTGG CTAAACTGG 80

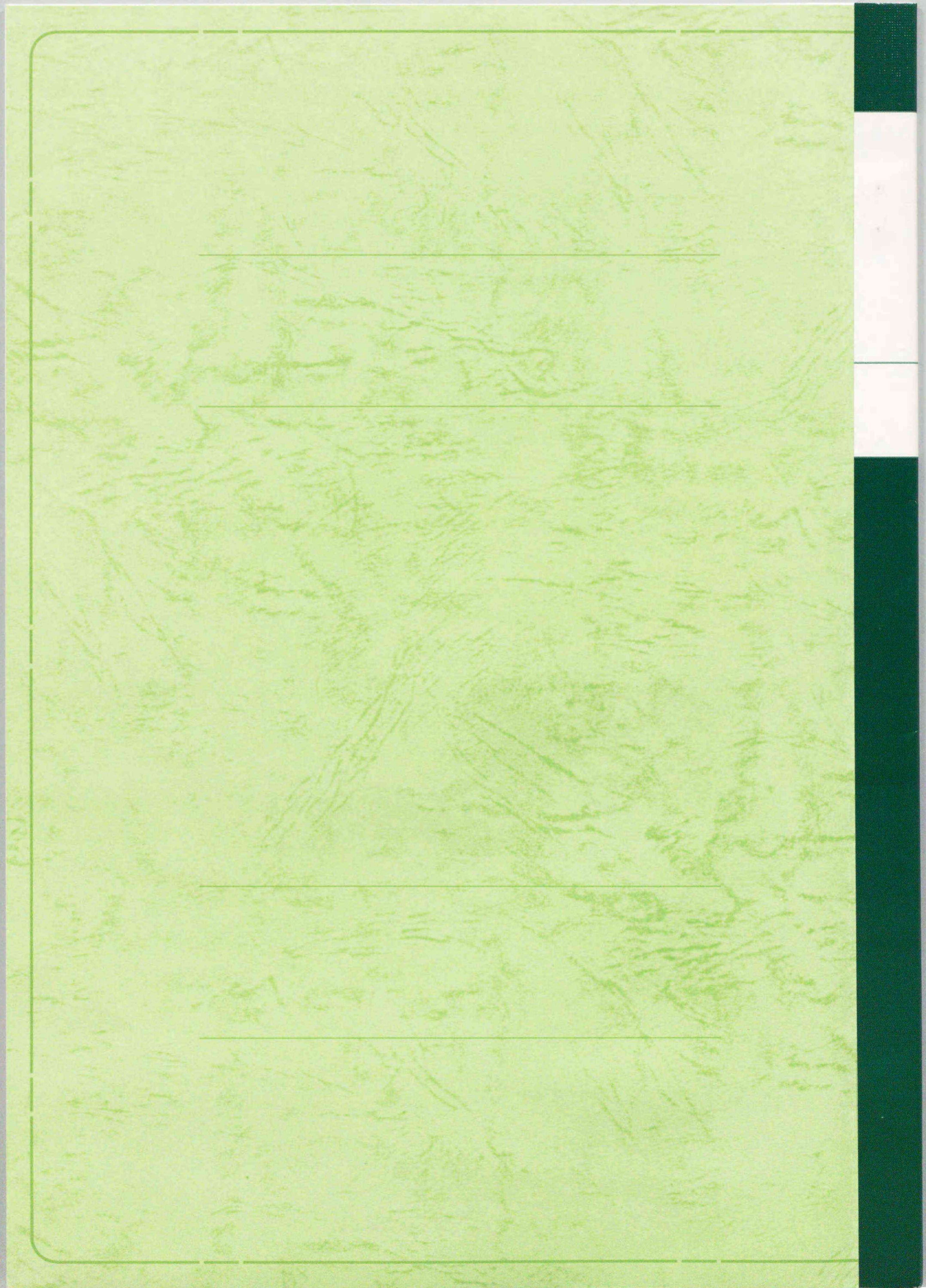
TAGGCTGCCA GCCAAGCATG AGCTCATACC TAGGGAGCCA ACCAGCTGAC AGCCAGAGGG 120
Domain A

AGCCCTGGCT GCATGCCACT GGCAGTTATA GTGAAACCCC TCCCATAGTC CTTAATCACA 180
Domain B

AGTAAACAAA GCACAAGGGG AAGTGGAAAG CAGCCAGGGG AACATGTTTT GCGAGCCAGA 240

GCTGTTTTGG CTTGTCACCA GCTGGCCATG 270
LP-1

Fig. 3

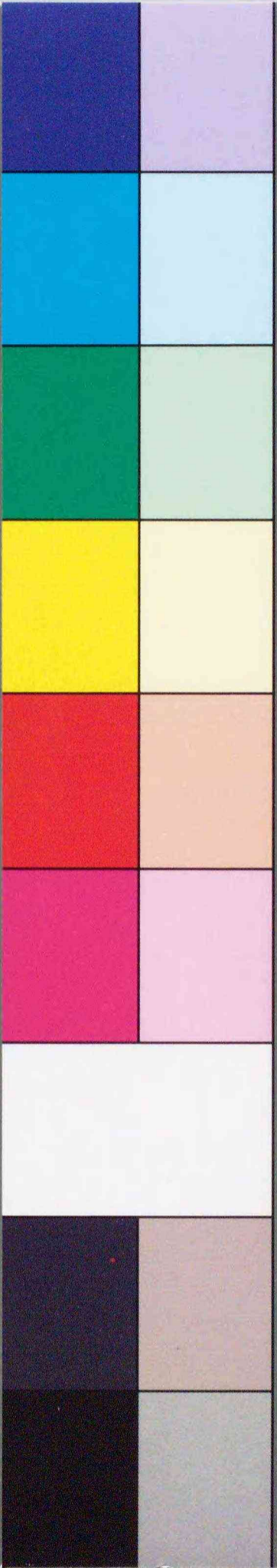


inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

