

### 3. ポリオーマウイルスの疫学研究と基礎研究

澤 洋文<sup>1)</sup>, 小林 進太郎<sup>1)</sup>, 鈴木 忠樹<sup>2)</sup>, 大場 靖子<sup>1)</sup>

1) 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門

2) 国立感染症研究所 感染病理部

ポリオーマウイルスはポリオーマウイルス科に属する哺乳類動物由来の *Orthopolyomavirus* と *Wukupolyomavirus*, 及び鳥類由来の *Avipolyomavirus* に分類されている。我々は疫学研究を通じて新規のポリオーマウイルスである *Mastomys Polyomavirus* (MasPyV) 及び *Vervet monkey Polyomavirus-1* (VmPyV-1) を単離し, そのゲノムがコードするウイルスタンパク質の機能解析を実施した。更に, ヒトポリオーマウイルスである JC polyomavirus (JCPyV) についての基礎研究を推進し, 最近, 早期タンパク質である Large T 抗原の感染細胞における機能解析, 後期タンパク質である VP1 のシステイン残基の粒子形成への影響, 及び後期タンパク質である Agno のウイルス粒子の細胞外放出機構に対する影響について知見を得たのでその内容を紹介する。

#### 1. はじめに

ポリオーマウイルス (polyomavirus) の発見は 1953 年に Ludwik Gross が, 白血病を発症した AK マウスの肝臓, 脾臓, リンパ組織から濾過した抽出物を新生 C3H マウスへ接種すると白血病だけでなく唾液腺腫瘍が発症するという実験から, 濾過抽出物中にマウス白血病ウイルスとは異なる腫瘍原生物質が存在することを見出したことに始まる<sup>1)</sup>

(後の Murine Polyomavirus (MPyV) の発見である)。その後, Bernic E. Eddy, Sarah E. Stewart らは白血病を自然発症する AKR マウスの肝臓及び脾臓からの抽出物をマウスに接種して, 新生マウスで 3 回, 新生ハムスターで 2~4 回植え継いだ後に発生した様々な種類の腫瘍抽出物をマウス胚細胞に接種したところ細胞変性を観察することに成功し, この腫瘍がウイルスによるものと結論付けた。この実験から, このウイルスは複数種類の腫瘍発生に関わっていると考えられ「many」「tumor」を意味するギリシア語「poly-」「oma」から polyomavirus と名付けられた<sup>2,3)</sup>。

ポリオーマウイルスはエンベロープを持たないカプシドウイルスであり, 約 5000 bp 程度の環状二本鎖 DNA をゲノムとして持つ。そのゲノムには単一の複製開始起点 (replication origin) が存在し, 転写調節領域 (transcriptional control region) もしくは non-coding control region: NCCR) と呼ばれる二方向性のプロモーターの両側に計 5 - 9 個の転写産物をコードしている<sup>4)</sup>。図 1 に示すように, 感染後期の転写産物であるカプシドタンパク質 (VP1, VP2, VP3) が直径 45 - 50 nm の正二十面体構造のウイルス粒子を形成する。ウイルスカプシドは, メジャーカプシドタンパク質である VP1 が 5 つとマイナーカプシドタンパク質である VP2 と VP3 のどちらか 1 つにより成るペンタマーが 72 個集合し形成されている。最近, 一部のポリオーマウイルスが VP3 を発現しない可能性が示唆されているが<sup>5)</sup>, VP1 と VP2 は全てのポリオーマウイルスが持っている。ウイルス粒子の骨格を形成する VP1 のみを大腸菌, 哺乳

#### 連絡先

〒 001-0020

札幌市北区北 20 条西 10 丁目

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

分子病態・診断部門

TEL: 011-706-5185

FAX: 011-706-7370

E-mail: h-sawa@czc.hokudai.ac.jp

shin-kobayashi@czc.hokudai.ac.jp

orbay@czc.hokudai.ac.jp

〒 162-8640

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所 感染病理部

TEL: 03-5285-1111

FAX: 03-5285-1189

E-mail: tksuzuki@nih.go.jp

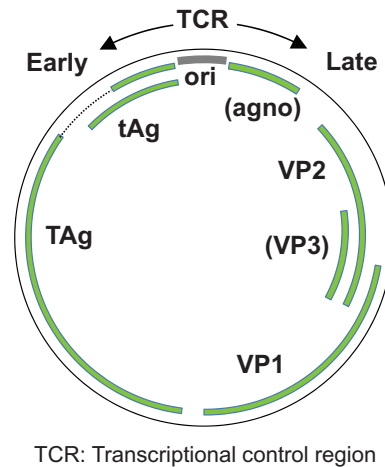


図1 Polyomavirusの基本的なゲノム構造

類細胞，酵母細胞，昆虫細胞等で発現させることにより Virus-Like Particle (VLP) を作製することが出来，血清抗体価測定やウイルス粒子形成機構の解析<sup>6)</sup>，さらにバイオナノマテリアルとしてウイルス学の領域以外の研究においても利用されている<sup>7,8)</sup>。また，後期転写領域にカプシドタンパク質の他に Agnoprotein (Agno) という調節タンパク質を持つポリオーマウイルスも存在する。転写調節領域を挟んで後期転写領域の反対側の早期転写領域に，感染早期に転写される遺伝子がコードされている。早期転写領域はウイルスゲノムの複製に先立って転写され，ウイルスゲノム複製に参与する Large T 抗原と small t 抗原がコードされている。さらにスプライシング産物として T' (T プライム) や middle T 抗原を有するポリオーマウイルスも存在し，また最近 Merkel cell polyomavirus (MCPyV) の早期転写領域に ALTO (Alternate frame of the Large T Open reading frame) がコードされているということが報告されている<sup>9)</sup>。Large T 抗原を含む早期転写産物は形質転換能を有しており，ポリオーマウイルスによる腫瘍発生に関与していると考えられているが，本来の宿主における自然感染において腫瘍発生に関係している確固たる証拠は乏しく，ポリオーマウイルスがその名の通り「腫瘍ウイルス」であるかどうかについては，未だ統一した結論は得られていない。

## 2. ポリオーマウイルスの分類

ポリオーマウイルスは以前，パピローマウイルス，ポリオーマウイルス，バキュオレイティングウイルスとともに パポーバ科 に分類されていたが，2000 年に独立した科（ポリオーマウイルス科）として再分類されている。さらに，

2011 年にはポリオーマウイルス科を哺乳類動物由来の *Orthopolyomavirus* と *Wukipolyomavirus*，および鳥類由来の *Avipolyomavirus* の 3 つの属に分けることが提言されている<sup>10)</sup>。

現在，*Avipolyomavirus* には Avian Polyomavirus, Goose hemorrhagic Polyomavirus, Canary Polyomavirus 等が属している。鳥類ポリオーマウイルスとは異なり後期転写領域の 5' 末端に約 32 kDa 程度の VP4 をコードしている。Avian Polyomavirus では，VP4 (別名 agnoprotein 1a) はウイルス粒子に含まれており<sup>11)</sup>，カプシドタンパク質の一つと考えられている。この鳥類ポリオーマウイルス VP4 に相当するウイルスタンパク質は哺乳類動物ポリオーマウイルスには存在しないが，サルを自然宿主とする SV40 では VP2 のコード領域の中ほどに存在する AUG スタートコドンから翻訳される約 15 kDa の VP4 が発現することが知られている<sup>12)</sup>。しかしながら，この SV40 の VP4 は鳥類ポリオーマウイルスの VP4 とは全く異なるタンパク質であり，宿主の細胞膜に 3 nm 程度の孔を開け細胞膜透過性を充進させることにより，ウイルス粒子の細胞外への放出を促進するウイルスタンパク質ピロポリン (Viroporin) として機能していることが報告されている<sup>13)</sup>。

*Wukipolyomavirus* にはヒトポリオーマウイルスである KI Polyomavirus (KIPyV)<sup>14)</sup>，WU Polyomavirus (WUPyV)<sup>15)</sup>，Human polyomavirus-6 (HPyV6)，及び HPyV7<sup>16)</sup> が属する。これらのウイルスは全ゲノム配列もしくは後期タンパク質の分子系統樹解析により他の哺乳類ポリオーマウイルスと明らかに異なったクラスターに分類される<sup>10)</sup>。

他の哺乳類ポリオーマウイルスは全て *Orthopolyomavirus*

Host species	Viruses	Related diseases	Year
Human	BK virus	Hemorrhagic cystitis	1971
	JC virus	Progressive multifocal leukoencephalopathy	1971
	KI virus	Respiratory disease?	2007
	WU virus	Respiratory disease?	2007
	Merkel cell PyV	Merkel cell carcinoma	2008
	Trichodysplasia spinulosa-associated PyV	Trichodysplasia spinulosa	2010
	Human PyV-6	Not known	2010
	Human PyV-7	Not known	2010
	Human PyV-9	Not known	2011
	MW PyV	Not known	2012
	MX PyV	Acute diarrhea	2012
	Human PyV10	pedunculated condylomas	2012
	STL PyV	Not known	2013
Human PyV-12	Gastrointestinal disease?	2013	
Mouse	Murine Polyomavirus	Salivary gland carcinoma	1953
Rhesus monkey	Simian virus 40	Not known	1960
Chacma baboon	Simian agent 12	Not known	1963
Hamster	Hamster PyV	Skin tumors	1967
Rat	Athymic rat PyV	Sialoadenitis in athymic nude rats	1984
African green monkey	African green monkey PyV	Not known	1985
Cattle	Bovine PyV	Not known	1990
Chimpanzee	Chimpanzee PyV	Not known	2005
Bat	Myotis PyV	Not known	2009
Orangutan	Orangutan PyV	Not known	2010
Gorilla	Gorilla gorilla gorilla PyV	Not known	2011
Equine	Equine PyV	Not known	2012
Elephant	African elephant PyV	Dermal hyperplasia	2013
Dolphin	Dolphin PyV	Respiratory disease?	2013
Raccoon	Raccoon PyV	Brain tumor	2013
Mastomys	Mastomys PyV	Not known	2011
Vervet Monkey	Vervet monkey PyV-1	Not known	2013
Goose	Goose hemorrhagic PyV	Hemorrhagic nephritis and enteritis	2000
Canary	Canary PyV	Hepatitis, Nephropathy	2010

図2 これまでに単離された主な Polyomavirus. 黄色くハイライトした Mastomys PyV と Vervet PyV は我々がザンビアの野生動物から単離した。

に属しており, SV40, JC virus (JCPyV), BK virus (BKPyV) 等を含むポリオーマウイルスの主要なクラスターを形成する (ortho はギリシア語の orthos に由来し, straight という意味を有する<sup>10)</sup>.)

### 3. ポリオーマウイルスの生態と疫学研究

現在までに図2に示すようにヒトを含む種々の動物を自然宿主とするポリオーマウイルスが多数報告されている。ヒトに感染するポリオーマウイルスとしては, 1971年に腎移植後の症例の尿から分離され出血性膀胱炎, 及び移植後のポリオーマウイルス腎症の原因ウイルスであるBKPyVが最初に発見されたウイルスである<sup>17)</sup>。また, 同じく1971年に8年間に渡りホジキン病に罹患し, 抗腫瘍薬であるナイトロジェンマスタード誘導体を2年間投薬され致死性の中樞神経脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) を発症し死亡した38歳の男性から, JCPyVが分離されており<sup>18)</sup>, ヒト疾患に関係のある病原ウイルスとして多くの研究が進められている。以上の2つのウイルスの名前はウイルスが分離された症例のイニシャルに由来している。過去の報告においては, ウイルスが分離された症例のフルネームをウイルスの名前として記載している場合もあるが, 最近では倫

理的な配慮からフルネームの使用は控えられている。

その後, 長らく新規のヒトポリオーマウイルスの発見はなかったが, 最近のシーケンス技術の発達により, 次々と新規のポリオーマウイルスが発見されている。2007年には鼻咽頭の吸引液からKIPyV<sup>14)</sup>, オーストラリアの肺炎と診断された3歳の小児の鼻咽頭の吸引液からWUPyV<sup>15)</sup>がそれぞれ, Karolinska Institutet, 及び Washington University School of Medicine のグループにより報告された (KI および WU はそれぞれの施設の名前に由来している.)。

さらに, 2008年に稀な皮膚悪性腫瘍であるメルケル細胞癌からMerkel cell polyomavirus (MCPyV)が発見された<sup>19)</sup>。ポリオーマウイルスは「多くの腫瘍」という名付けられたウイルスであるにもかかわらず, ヒト腫瘍と明確な関連性のあるウイルスは見つかっていなかったが, メルケル細胞癌の腫瘍細胞では染色体にMCPyVのウイルス遺伝子が挿入され, 形質転換能を有するウイルスタンパク質の発現も見られることから, ウイルスが直接的に癌化に関与している可能性が考えられ, 新たなヒト癌ウイルス候補として大きな注目を集め精力的に研究が進められている<sup>19)</sup>。また, 2010年には稀な皮膚の発疹性疾患 (spiny papules) である trichodysplasia spinulosa から trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV)が発見されており<sup>20)</sup>,

その後も rolling circle amplification (RCA 法) を用いて健康人の額の skin swab から HPyV6, および HPyV7<sup>16)</sup>, generic PCR assay を用いて腎移植後の免疫抑制薬で治療中の症例の血清から human polyomavirus 9 (HPyV9)<sup>21)</sup>, 凍結したヒトの便から精製したウイルス様粒子から shotgun pyrosequencing を用いて MW polyomavirus (MWPyV)<sup>22)</sup>, STL polyomavirus (STLPyV)<sup>23)</sup>, generic polyomavirus PCR を用いて消化器, 脾臓, リンパ節等の組織 DNA から Human Polyomavirus 12 (HPyV12)<sup>24)</sup>, unbiased deep sequencing を用いてメキシコの急性下痢症の小児の便から MX polyomavirus (MXPyV)<sup>25)</sup>, RCA 法を用いて稀な遺伝疾患である Warts hypogammaglobulinemia, Infections, and Myelokathexis (WHIM) 症候群の患者皮膚の pedunculated condyloma から Human polyomavirus 10 (HPyV10)<sup>26)</sup> などが発見されており, 多様な方法により多様な検体から新たなポリオーマウイルスの発見が相次いでいる。しかしながら, これらのポリオーマウイルスの培養は難しく, ほとんど生きたウイルスを分離できていないことや疾患との関連性が不明瞭であることなどが今後の研究遂行上の大きな問題となっている。

ヒトポリオーマウイルスは, 疾患と関連するものも含めて, いずれも幼少期に不顕性に感染し世界中の多くのヒトが既感染であると考えられている。大規模な血清疫学調査により BKPyV, JCPyV, MCPyV, WUPyV, KIPyV などのポリオーマウイルスに対し 40-80% の成人が血清抗体陽性となっていることが報告されている<sup>27)</sup>。これらのポリオーマウイルスは感染しても健康人では何の疾患も引き起こさないが, JCPyV による PML, BKPyV による泌尿器疾患, TSPyV による trichodysplasia spinulosa などは, いずれも宿主が免疫抑制状態に陥ると発症することが知られており, 悪性腫瘍や HIV-AIDS, 臓器移植や自己免疫疾患に対する免疫抑制療法中の患者等で日和見感染症として問題となる。これらのヒトポリオーマウイルス感染症については, 初感染の感染様式, ウイルス潜伏感染の様式, 再活性化の機序, そして病態形成機構など未解明の課題が多く残されている。

ヒトと同様に, ヒト以外の哺乳類動物からもポリオーマウイルスは分離されており, 1953 年に初めて発見されたポリオーマウイルスである MPyV<sup>1)</sup> や 1960 年に分離されたサルを自然宿主とする SV40<sup>28)</sup> はポリオーマウイルス研究だけでなく分子生物学研究のモデル生物として使用されていた「教科書的」なウイルスである。また, チンパンジー<sup>29)</sup>, オランウータン<sup>30)</sup>, ゴリラ<sup>31)</sup>, 等の霊長類やコウモリ<sup>32)</sup> からも様々なポリオーマウイルスが見つかった。最近, コートジボワールのチンパンジーから見つかった新規ポリオーマウイルスに対して, アフリカやヨーロッパの多くのヒトが血清抗体陽性であることが報告された<sup>33)</sup>。現在のところ, これらのウイルスとヒト疾患との関係は不明であ

るが, 一般的にポリオーマウイルスは宿主域が狭く, 種特異性が高いことを考えると, 動物で見つかったポリオーマウイルスがヒトの中に広く蔓延しているという事実は注目に値する。逆に, ヒト疾患の病原ポリオーマウイルスが野生動物にも存在することも考えられ, ポリオーマウイルスが人獣共通感染症病原体である可能性について, さらなる研究が進んでいくことが期待されている。

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターは 2007 年にアフリカのザンビアに BSL-3 施設を有する拠点を設置し, 病原体の自然宿主, 存続機構と伝播経路など生態解明に力を注いでいる。現在, 我々は, このザンビア拠点を利用して野生動物を対象としたウイルス性感染症のサーベイランスを展開している<sup>34-39)</sup>。このサーベイランスの結果, これまでに野生齧歯類のマストミスの脾臓から抽出した DNA より新規の Mastomys Polyomavirus (MasPyV) のゲノム<sup>40)</sup> と, 野生霊長類の Vervet monkey から新規のポリオーマウイルスである Vervet monkey PyV-1 (VmPyV-1) のゲノム<sup>41)</sup> を単離している。さらに単離したウイルスについて詳細に検討を進めたところ, MasPyV の Large T 抗原は pRb には結合できるが p53 には結合できず, ウイルス複製機構が従来知られている JCPyV や SV40 とは異なっている可能性を示した<sup>40)</sup>。また, VmPyV-1 については VP1 のみからなる VLP の合成系の確立<sup>42)</sup> に成功しており, 今後, この系を用いて動物およびヒトの血清疫学調査を実施し, ポリオーマウイルスの自然界での生態を明らかにしていくことを計画している。

#### 4. JCPyV 増殖機構に関する基礎研究

小さな環状二本鎖 DNA をゲノムとして持つポリオーマウイルスは, ゲノムの扱いが簡単であり, また, 古くに発見された MPyV や SV40 はウイルスの扱いも簡単であることから, 分子生物学の黎明期においては, 二本鎖 DNA 複製機構を研究するモデル生物として盛んに研究が実施されていた<sup>43)</sup>。一方, ヒト疾患の病原ウイルスである BKPyV と JCPyV については, 主に疾患との関係性に焦点を当てた研究が進められてきた。

我々は, PML の病原ウイルスである JCPyV について, その病態形成機構を明らかにすることを大きな目標に研究を推進している。PML は JCPyV が中枢神経系のオリゴデンドロサイトに感染し脱髄性病変を形成しており, PML の病態を理解するためには, ウイルス感染によって起こるオリゴデンドロサイトの細胞病理を理解することが重要である。一般的にウイルスの増殖には種々の細胞内因子が関与しており, ウイルスは細胞内環境を自身の増殖に都合が良いように改変している。このような宿主細胞内環境の変化が細胞の機能不全や細胞死を招くと考えられており, 細胞病理の理解のためには, ウイルスと宿主細胞の相互作用を明らかにする必要がある。そこで, 我々は, ウイルスタ

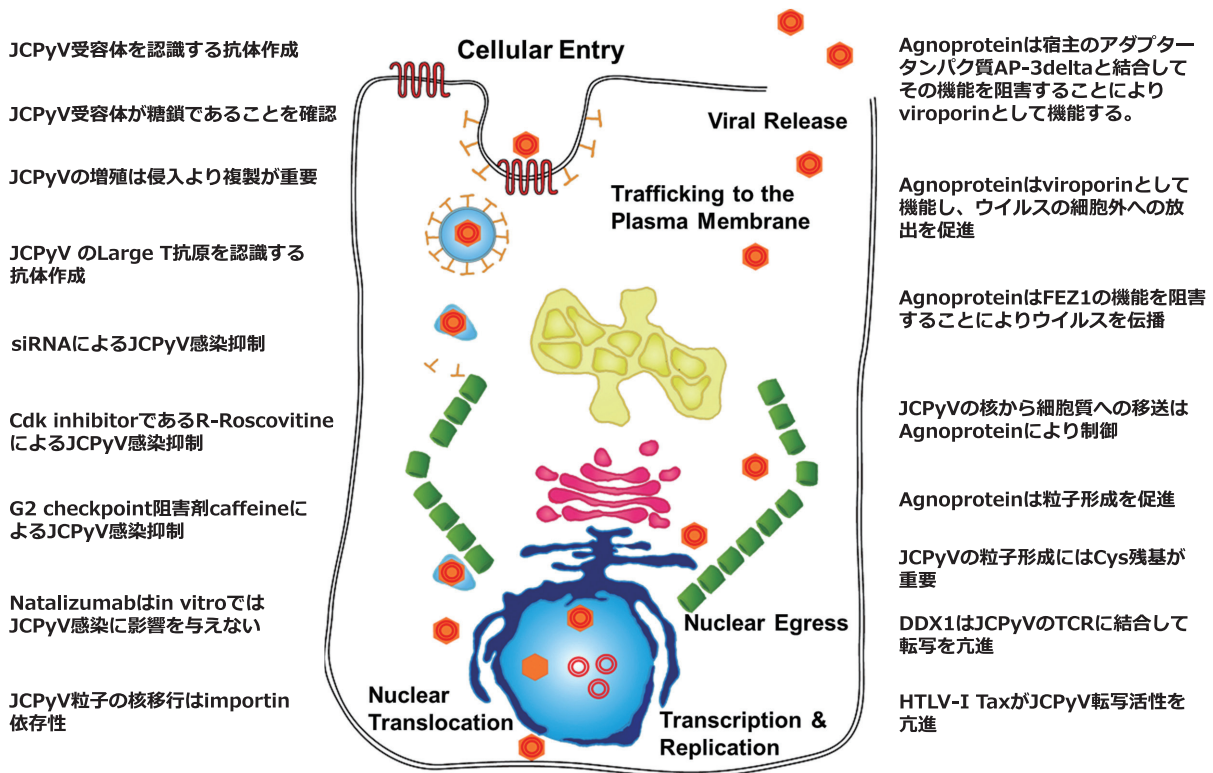


図3 これまでに報告した JCPyV の細胞内の動態等に関する基礎研究。

ンパク質に焦点を当てウイルスの細胞内動態、複製機構を解析することによりウイルスと宿主細胞の相互作用を分子レベルで明らかにしようと研究を進めてきた (図3)。本稿では最近の我々の研究により明らかになった、早期タンパク質 Large T 抗原の感染細胞における細胞周期制御機構、後期タンパク質 VP1 のシステイン残基の粒子形成における役割、及び後期タンパク質 Agno のウイルス粒子の細胞外放出機構における機能について概説する。

#### 4-1. Large T 抗原による細胞周期制御機構

JCPyV のウイルスゲノムは宿主細胞の核内で複製される。この複製には JCPyV の早期タンパク質である Large T 抗原の発現が必須である。Large T 抗原はヘリカーゼ活性を有し、宿主細胞内の複製因子を利用し、JCPyV の DNA を複製する。宿主細胞内の複製因子は、細胞周期により厳密に発現や機能が制御されているものが多いことから、我々は JCPyV ゲノム複製と細胞周期の関係性に着眼し、JCPyV 感染細胞の細胞周期を解析した。その結果、Large T 抗原発現細胞では細胞周期が G2 期に集積することを見出した。この現象は、ウイルス感染時のみならず Large T 抗原を単独で発現させた場合においても観察され、Large T 抗原が細胞周期を制御する機能を有していることが考えられた。また、これらの細胞では Ataxia telangiectasia mutated (ATM) および Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)

を介した経路で G2 チェックポイントが活性化されており、その分子機序として、Large T 抗原が宿主細胞 DNA へ結合し、核マトリクスへ局在することが ATM/ATR を介した DNA 損傷シグナルを誘導し、G2 チェックポイントを活性化していると考えられた (図4)。また、G2 チェックポイント活性化シグナルを阻害するカフェイン (ATM/ATR 阻害剤)、UCN-01 (Serine/threonine-protein kinase である Chk1 の阻害剤)、及び Serine/threonine-protein kinase である Wee1 に対する siRNA で処理した細胞では、Large T 抗原の発現による細胞周期 G2 期停止が解除され、JCPyV ゲノム複製効率が顕著に低下することも見出した。さらに、カフェイン処理した JCPyV 感染細胞ではウイルス感染価は検出限界以下となり、カフェイン処理によりウイルスゲノム複製を低下させるだけでなく感染そのものを抑制できることが示唆された。これらの結果より、JCPyV 感染細胞では Large T 抗原が G2 チェックポイントを活性化することで細胞周期が G2 期に停止し、ウイルス複製にとって都合の良い環境を作り出していると考えられた。また、これらの実験は、*in vitro* の培養細胞系の結果であるが、実際の PML の脳組織においても JCPyV が感染しているオリゴデンドロサイトでは細胞周期 G2 期停止が誘導されている証拠が得られており、G2 期停止を解除し細胞分裂が進行した場合、JCPyV の複製効率が顕著に低下することから、カフェイン等の ATM/ATR 阻害剤が JCPyV 感染抑制に有

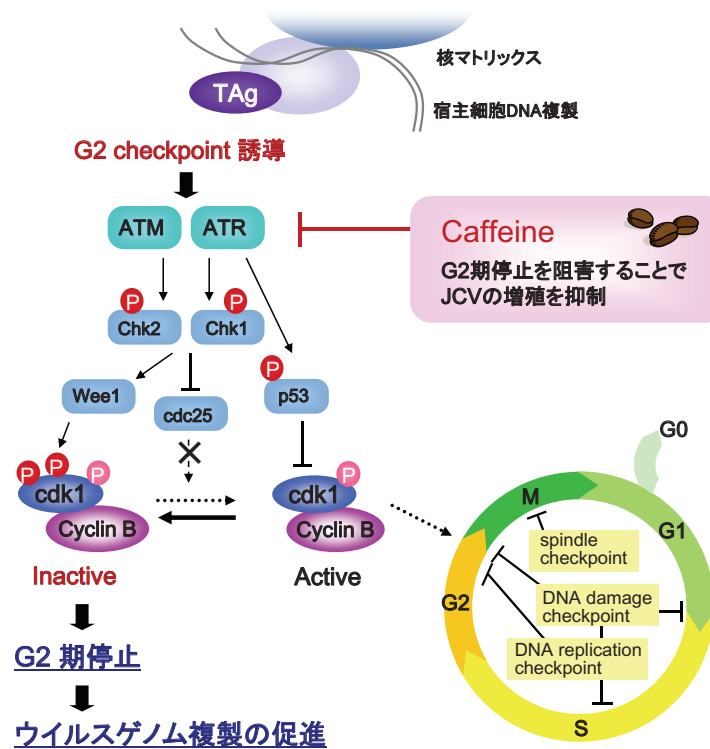


図4 G2期停止の誘導機序. カフェイン等のATM/ATR阻害剤がJCPyV感染抑制に有用である.

効であることが示唆され<sup>44)</sup>, 今後, PML治療薬開発への応用が期待される(図4).

#### 4.2. ウイルス粒子形成機構の解析

JCPyVのウイルス粒子は細胞質内で形成された主要外殻タンパク質VP1の五量体(ペンタマー)が核内移行後, 核内でペンタマー72個が集合して形成されると考えられている<sup>45)</sup>. 同属のウイルスであるSV40ではVP1のシステイン残基がペンタマー形成とペンタマー同士の結合, ウイルス粒子の安定化に重要であることが知られている<sup>46)</sup>.

JCPyVカプシドタンパク質のホモロジーモデリングの結果, JCPyVのVP1はSV40のVP1とは立体構造上の違いが存在することが予想され, JCPyV VP1のシステイン残基はSV40とは異なった役割が存在することが考えられた. そこで, JCPyV VP1に存在する6つのシステイン残基(C42, C80, C97, C200, C247, C260)をそれぞれアラニンに置換したVP1変異体を哺乳類細胞で発現させると, C80とC247に変異を持つVP1はタンパク質の安定性, および粒子形成効率が低下することが明らかとなった. このC80とC247の変異体をタンパク質合成に必要な最小限な因子のみで構成された*in vitro*タンパク質合成システムを用いて合成すると安定性低下は認められず, 安定性の低下には何らかの細胞因子の関与が示唆された. さらに, これらのVP1変異体のペンタマー形成能をショ糖密度勾配遠心法に

より検討した結果, C247変異体はペンタマーを形成していたが, C80変異体はモノマーのままであった. そこで, C80とC247に変異を持つウイルスゲノム導入細胞でVP1の局在を解析すると, C247変異体は野生型と同様に核内に局在するが, C80変異体は細胞質に局在していた. 以上の結果から, C80はVP1の安定性とペンタマー形成に, C247はペンタマーが核内に移行した後の核内における粒子形成に必要であることが示唆され<sup>6)</sup>(図5). SV40とはウイルス粒子形成機構が異なると考えられた.

#### 4.3. ウイルス粒子細胞外放出機構の解析

近年, イオンチャネル様の構造体を形成しウイルス粒子の細胞外放出過程に関わるウイルス膜タンパク質が様々なウイルスにおいて同定され, ピロポリンと総称されている. ピロポリンは100アミノ酸残基程度からなる小さな膜タンパク質で, 多量体化して脂質二重膜に細胞外と細胞内を交通させる孔を作る. この孔がイオンや小分子の膜透過性を充進させ, 細胞内のpH, イオン濃度, および浸透圧等を変化させることにより宿主細胞膜の破綻を誘導し, その結果としてウイルス粒子が細胞外に放出されると考えられている<sup>47)</sup>. しかしながら, 本来, 細胞には細胞内イオン濃度や浸透圧の恒常性を維持するために様々な制御機構が存在しており, ピロポリンがどのようにして, これらの制御機構を破綻させ, 最終的に宿主細胞の破壊を誘導するか

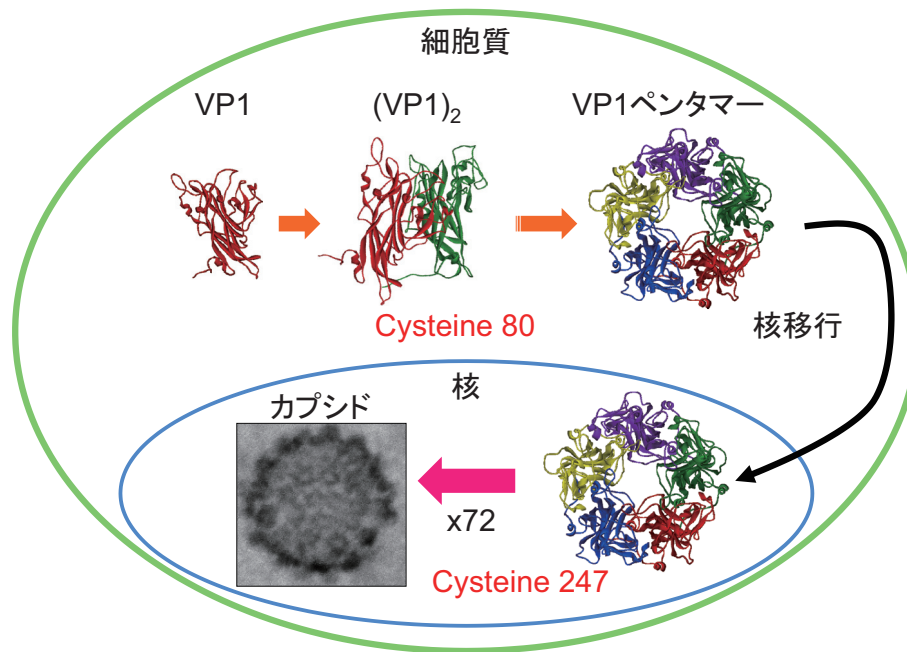


図5 JCVの粒子形成機構の概略図

細胞質で合成されたVP1タンパク質はCysteine 80によりタンパク質として安定化され、ペンタマーを形成する。ペンタマーは核に移行し、Cysteine 247が関与するペンタマー同士の結合によりカプシドを形成する。

については不明であった。我々は、JCPyVの後期タンパク質でその機能が不明であったAgnoについて詳細な機能解析を実施し、AgnoがSV40のVP4と同様に、ピロポリンとして機能していることを明らかにした<sup>48)</sup>。更に、Agnoがピロポリンとして機能する分子機構を明らかにする為に、Agnoに結合する宿主因子を探索した結果、細胞内の物質輸送に関わるアダプタータンパク質である adaptor protein complex 3 (AP3)の $\delta$ サブユニット (AP3D)をAgno結合因子として同定した。同定したAP3DとAgnoの相互作用について分子生物学および生化学的手法を用いて詳細に解析した結果、AgnoはAP3Dと直接結合することによりAP3が関わる細胞内小胞輸送系を阻害し、Agno自身のリソソーム分解系への輸送を抑制していることが明らかになった。その結果としてAgnoはリソソームで分解されず細胞膜上へ移動することが可能となりピロポリンとしての機能を発揮していることが判明した。さらに、得られた結果に基づいて、AP3DのAgno結合部位のみを過剰発現させると、ウイルス粒子の細胞外放出は抑制され、最終的にウイルス感染を抑制することができた<sup>49)</sup>。これらの結果は、ピロポリンの機能発現に宿主因子との相互作用が必要不可欠であることとピロポリン-宿主因子相互作用のインターフェースが新たなウイルス感染治療薬の標的と成り得ることを示しており、今後、ポリオーマウイルスだけでなくインフルエンザウイルス等、ピロポリンを有する他の

ウイルスにおいても同様のコンセプトで、ピロポリンを標的としたウイルス感染治療薬の開発研究が進むことが期待される。

## 5. おわりに

分子生物学黎明期のモデル生物として多くの分子生物学上重要な発見に貢献したポリオーマウイルスの研究は、モデル生物が高等生物になるに従って、基礎ウイルス学からヒト疾患の病原ウイルスとしての医学研究が主流となってきた。しかしながら、2007年以降の相次ぐ新たなポリオーマウイルスの発見により、また研究の様相が大きく変わりつつある。ヒト感染症ウイルスとして医学研究が果たすべき役割の大きさは変わらないが、多くの謎が残されているポリオーマウイルスの自然界における生態を明らかにする疫学研究は、これまでほとんど実施されていなかった非病原性ウイルスの生物学に迫る研究であり、次世代のウイルス学の幕開けを感じさせる。

我々も、現在アフリカをフィールドとして野生動物を対象としたポリオーマウイルスの疫学研究を展開しているが、それと同時にヒトのポリオーマウイルスであるJCPyVを対象とした基礎研究も推進している。JCPyVが唯一の原因であるPMLは、稀有な疾患ではあるものの医療の高度化により抗体医薬の副作用など予想外の局面で問題となっている。難病に指定されているPMLは、原因が明らか

かであるにも関わらず有効な治療法は確立していない。ウイルス増殖の分子機構を一つ一つ明らかにしていく基礎研究を積み重ねることにより、新しい診断方法や治療方法の可能性を提示する等、実際の臨床の現場にフィードバックすることを最終目標とする感染症研究についてもさらなる知見の蓄積が望まれる。

### 謝 辞

本稿の作成にあたり、1981年に日本で初めてJCPyVをPML症例から単離し(Tokyo-1 strain)<sup>50)</sup>、新生仔ハムスターの脳内に単離したJCPyVを接種して小脳のmedulloblastomaを惹起させることを見出し<sup>51)</sup>、その発生機構を解析し<sup>52)</sup>、その後も精力的にJCPyVの研究を推進し、JCPyVの研究を御指導頂いております長嶋和郎 北海道大学名誉教授、及びこれまでに一緒にJCPyVの研究を推進して頂きました多くの方々に心から感謝致します。

### 引用論文

- 1) Gross L.: A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 83: 414-421, 1953.
- 2) Maginnis MS, Atwood WJ.: JC virus: an oncogenic virus in animals and humans?. *Semin Cancer Biol* 19: 261-269, 2009.
- 3) Eddy BE, Stewart SE, Berkeley W.: Cytopathogenicity in tissue culture by a tumor virus from mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 9: 848-851, 1958.
- 4) Knipe DM, Howley PM.: 2013, *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA
- 5) Schowalter RM, Buck CB.: The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein. *PLoS Pathog.* 9: e1003558, 2013.
- 6) Kobayashi S, Suzuki T, Igarashi M, Orba Y, Ohtake N, Nagakawa K, Niikura K, Kimura T, Kasamatsu H, Sawa H.: Cysteine residues in the major capsid protein, Vp1, of the JC Virus are important for protein stability and oligomer formation. *PLoS One* 8: e76668, 2013.
- 7) Niikura K, Nagakawa K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijio K.: Gold nanoparticle arrangement on viral particles through carbohydrate recognition: A non-crosslinking approach to optical virus detection. *Bioconjug Chem* 20: 1848-1852, 2009.
- 8) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Mikuni S, Matsuo Y, Kinjo M, Sawa H, Ijio K.: Low pH-triggered model drug molecule release from virus-like particles. *Chembiochem* 11: 959-962, 2010.
- 9) Carter JJ, Daugherty MD, Qi X, Bheda-Malge A, Wipf GC, Robinson K, Roman A, Malik HS, Galloway DA.: Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 12744-12749, 2013.
- 10) Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC.: Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol* 156: 1627-1634, 2011
- 11) Johne R, Müller H.: Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4. *J Gen Virol* 82(Pt 4): 909-918, 2001
- 12) Daniels R, Sadowicz D, Hebert DN.: A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog* 3: e98, 2007.
- 13) Raghava S, Giorda KM, Romano FB, Heuck AP, Hebert DN.: The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release. *PLoS Pathog* 7: e1002116, 2011.
- 14) Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkne A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B.: Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 81: 4130-4136, 2007.
- 15) Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D.: Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3: e64, 2007.
- 16) Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB.: Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 7: 509-515, 2010.
- 17) Gardner SD.: New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1: 1253-1257, 1971.
- 18) Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH.: Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1: 1257-1260, 1971.
- 19) Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS.: Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319: 1096-1100, 2008.
- 20) van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC.: Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* 6: e1001024, 2010.
- 21) Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B.: A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol* 85: 4586-4590, 2011.
- 22) Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D.: Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J Virol* 86: 10321-10326, 2012.
- 23) Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, Stine OC, Skelton R, Brennan DC, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D.: Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* 436: 295-303, 2013
- 24) Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F,



- Hofmann J, Moens U, Sauer I, Voigt S, Schmuck R, Ehlers B.: Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PLoS One* 8: e58021, 2013
- 25) Yu G, Greninger AL, Isa P, Phan TG, Martinez MA, de la Luz Sanchez M, Contreras JF, Santos-Preciado JI, Parsonnet J, Miller S, DeRisi JL, Delwart E, Arias CF, Chiu CY.: Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. *PLoS One* 7: e49449, 2012.
  - 26) Buck CB, Phan GQ, Raiji MT, Murphy PM, McDermott DH, McBride AA.: Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *J Virol* 86: 10887, 2012.
  - 27) Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL.: Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* 5: e1000363, 2009.
  - 28) Sweet BH, Hilleman MR.: The vacuolating virus, S.V. 40. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med* 105: 420-427, 1960.
  - 29) Johne R, Enderlein D, Nieper H, Müller H.: Novel polyomavirus detected in the feces of a chimpanzee by nested broad-spectrum PCR. *J Virol* 79: 3883-3887, 2005
  - 30) Groenewoud MJ, Fagrouch Z, van Gessel S, Niphuis H, Bulavaite A, Warren KS, Heeney JL, Verschoor EJ., Characterization of novel polyomaviruses from Bornean and Sumatran orang-utans. *J Gen Virol* 91(Pt 3): 653-658, 2010.
  - 31) Leendertz FH, Scuda N, Cameron KN, Kidega T, Zuberbühler K, Leendertz SA, Couacy-Hymann E, Boesch C, Calvignac S, Ehlers B.: African great apes are naturally infected with polyomaviruses closely related to Merkel cell polyomavirus. *J Virol* 85: 916-924, 2011.
  - 32) Misra V, Dumonceaux T, Dubois J, Willis C, Nadin-Davis S, Severini A, Wandeler A, Lindsay R, Artsob H.: Detection of polyoma and corona viruses in bats of Canada. *J Gen Virol* 90(Pt 8): 2015-2022, 2009.
  - 33) Scuda N, Madinda NF, Akoua-Koffi C, Adjogoua EV, Wevers D, Hofmann J, Cameron KN, Leendertz SA, Couacy-Hymann E, Robbins M, Boesch C, Jarvis MA, Moens U, Mugisha L, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH, Ehlers B.: Novel polyomaviruses of nonhuman primates: genetic and serological predictors for the existence of multiple unknown polyomaviruses within the human population. *PLoS Pathog* 9: e1003429, 2013.
  - 34) Simulundu E, Ishii A, Igarashi M, Mweene AS, Suzuki Y, Hang'ombe BM, Namangala B, Moonga L, Manzoor R, Ito K, Nakamura I, Sawa H, Sugimoto C, Kida H, Simukonda C, Chansa W, Chulu J, Takada A.: Characterization of influenza A viruses isolated from wild waterfowl in Zambia. *J Gen Virol* 92 (Pt 6): 1416-1427, 2011.
  - 35) Ishii A, Thomas Y, Moonga L, Nakamura I, Ohnuma A, Hang'ombe B, Takada A, Mweene A, Sawa H.: Novel Arenavirus, Zambia. *Emerg Infect Dis* 17: 1921-1924, 2011.
  - 36) Muleya W, Namangala B, Mweene A, Zulu L, Fandamu P, Banda D, Kimura T, Sawa H, Ishii A.: Molecular epidemiology and a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of infection with rabies virus in Zambia. *Virus Res* 163: 160-168, 2012
  - 37) Sasaki M, Ishii A, Orba Y, Thomas Y, Hang'ombe BM, Moonga L, Mweene AS, Ogawa H, Nakamura I, Kimura T, Sawa H.: Human parainfluenza virus type 3 in wild primates, Zambia. *Emerg Infect Dis* 19: 1500-1503, 2013.
  - 38) Sasaki M, Muleya W, Ishii A, Orba Y, Hangombe BM, Mweene AS, Moonga L, Thomas Y, Kimura T, Sawa H.: Molecular epidemiology of paramyxoviruses in Zambian wild rodents and shrews. *J Gen Virol* 95(Pt 2): 325-330, 2014.
  - 39) Muleya W, Sasaki M, Orba Y, Ishii A, Thomas Y, Nakagawa M, Ogawa H, Hangombe B, Namangala B, Mweene A, Takada A, Kimura T, Sawa H.: Molecular epidemiology of paramyxoviruses in frugivorous Eidolon helvum bats in Zambia. *J Vet Med Sci* (in press)
  - 40) Orba Y, Kobayashi S, Nakamura I, Ishii A, Hang'ombe BM, Mweene AS, Thomas Y, Kimura T, Sawa H.: Detection and characterization of a novel polyomavirus in wild rodents. *J Gen Virol* 92 (Pt 4): 789-795, 2011.
  - 41) Yamaguchi H, Kobayashi S, Ishii A, Ogawa H, Nakamura I, Moonga L, Hang'ombe BM, Mweene AS, Thomas Y, Kimura T, Sawa H, Orba Y.: Identification of a novel polyomavirus from vervet monkeys in Zambia. *J Gen Virol* 94(Pt 6): 1357-1364, 2013.
  - 42) Yamaguchi H, Kobayashi S, Maruyama J, Sasaki M, Takada A, Kimura T, Sawa H, Orba Y.: Role of the C-Terminal Region of Vervet monkey polyomavirus 1 VP1 in virion formation. *J Vet Med Sci* (in press)
  - 43) DeCaprio JA, Garcea RL.: A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol* 11: 264-276, 2013
  - 44) 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* 285: 1544-1554, 2010.
  - 45) Chen XS, Stehle T, Harrison SC.: Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J* 17: 3233-3240, 1998.
  - 46) Li PP, Nakanishi A, Tran MA, Salazar AM, Liddington RC, Kasamatsu H.: Role of simian virus 40 Vp1 cysteines in virion infectivity. *J Virol* 74: 11388-11393, 2000.
  - 47) Nieva JL, Madan V, Carrasco L.: Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol* 10: 563-574, 2012.
  - 48) 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 Pathog* 6(3): e1000801, 2010.
  - 49) Suzuki T, Orba Y, Makino Y, Okada Y, Sunden Y, Hasegawa H, Hall WW, Sawa H.: Viroporin activity of

- the JC polyomavirus is regulated by interactions with the adaptor protein complex 3. Proc Natl Acad Sci USA 110: 18668-18673, 2013.
- 50) Nagashima K, Yamaguchi K, Yasui K, Ogiwara H.: Progressive multifocal leukoencephalopathy. Neuropathology and virus isolation. Acta Pathol Jpn 31:953-961, 1981.
- 51) Nagashima K, Yasui K, Kimura J, Washizu M, Yamaguchi K, Mori W.: Induction of brain tumors by a newly isolated JC virus (Tokyo-1 strain). Am J Pathol 116: 455-463, 1984.
- 52) Matsuda M, Jona M, Yasui K, Nagashima K.: Genetic characterization of JC virus Tokyo-1 strain, a variant oncogenic in rodents. Virus Res 7: 159-168, 1987.

## Epidemiological and basic research activity targeting polyomaviruses

**Hirofumi SAWA<sup>1)</sup>, Shintaro KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Tadaki SUZUKI<sup>2)</sup>, Yasuko ORBA<sup>1)</sup>**

1: Division of Molecular Pathobiology, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control, N20, W10, Kita-ku, Sapporo, 001-0020, Japan

2: Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjyuku-Ku, Toyama 1-23-1, 162-8640, Japan

Recently, the family *Polyomaviridae* was classified as 3 genera, such as *Orthopolyomavirus*, *Wukipolyomavirus* which contain mammalian polyomaviruses and *Avipolyomavirus* which only contain avian polyomaviruses. We have recently isolated novel polyomaviruses, including Mastomys Polyomavirus (MasPyV) and Vervet monkey Polyomavirus-1 (VmPyV-1) by epidemiological activities and examined functions of their encoding proteins. In addition, we have been investigating the mechanisms of replication of human polyomavirus, JC polyomavirus (JCPyV). We recently obtained the results of function of JCPyV-encoding proteins, including early protein (Large T antigen) and late proteins (VP1 and Agno). In this review, we summarized the data of our basic research activities.