

2. JC ウイルスのチャネルタンパク質ピロポリンに関する研究

鈴木 忠樹

国立感染症研究所 感染病理部

ウイルス粒子の細胞外放出過程に関わるウイルスタンパク質の中にピロポリンと呼ばれるイオンチャネル様の多量体を形成する膜タンパク質が存在する。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内外を交通させる「孔」を作る。この「孔」がイオンや小分子の生体膜透過性を亢進させる。詳細な分子機構は未だブラックボックスであるが、膜透過性亢進の結果として宿主細胞膜の破綻を誘導し、最終的にはウイルス粒子の細胞外に放出に寄与すると考えられている。我々は、進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスであるJCウイルスのコードするAgnoが、子孫ウイルス粒子放出を担うピロポリンであることを見出した。さらに、Agnoのピロポリン活性は、宿主因子との特異的な相互作用により制御されている事を明らかにした。このことは、ピロポリンが機能するためには生体膜に「孔」を形成するだけでなく、特定の宿主因子との相互作用が必要不可欠であることを示唆しており、ピロポリンはウイルス-宿主細胞相互作用における重要なインターフェースを形成していると考えられた。

1. はじめに

進行性多巣性白質脳症 (Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: PML) は、おもに免疫抑制状態においてヒト大脳白質に脱髄を起こす致死的中枢神経疾患であり、未だ有効な予防、治療法は確立していない。JCウイルス (JCV) はPML患者の脳から分離されたウイルスであり、PML脱髄病変では細胞変性を伴うオリゴデンドロサイト核内にJCVウイルス粒子が大量に存在している。JCVはヒトを自然宿主とするポリオーマウイルスで幼少期に初感染し成人の7割以上に不顕性持続感染をしているが、正常のオリゴデンドロサイトにはJCVは存在しない。このことから、PMLはJCVが免疫不全を契機に中枢神経系のオリゴデンドロサイトに感染し、同細胞を障害することにより脱髄病変が形成され発病すると考えられている。よって、JCV感

染によって引き起こされるオリゴデンドロサイトの細胞病理を理解することは、PML発病機構を解明し、有効な予防・治療法を開発するために重要である。一方、ウイルスは宿主細胞内環境を自身の増殖に都合が良いように改変しており、この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いる。我々は、ウイルス感染による細胞病理の理解を目指し、ウイルスタンパク質に焦点を当てたウイルス-宿主細胞相互作用とウイルス増殖機構の解析という分子生物学的方法論で研究を進めてきた。この研究の中で、筆者が解析対象としたAgnoという小さなウイルスタンパク質は、他のポリオーマウイルスにおいても研究が進んでおらず、筆者が研究を始めた当初 (2002年) は、Agnoの名前の由来である古代ギリシャ語 *ágnōtos* = unknownの示す通り、ほとんど機能が分かっていなかった。本稿では、この小さなウイルスタンパク質の宿主細胞内の振る舞いとウイルス増殖における機能を明らかにするために我々が行ってきた研究について詳述する。

連絡先

〒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

2. JCVの特徴

JCVはポリオーマウイルス科オルソポリオーマウイルス属に分類されるDNAウイルスである⁸⁾。最近のシーケンス技術の発展により新たなポリオーマウイルスが次々と発見されており⁴⁾、それに伴いポリオーマウイルスの分類が細分化され、JCVは正式にはJCポリオーマウイルス

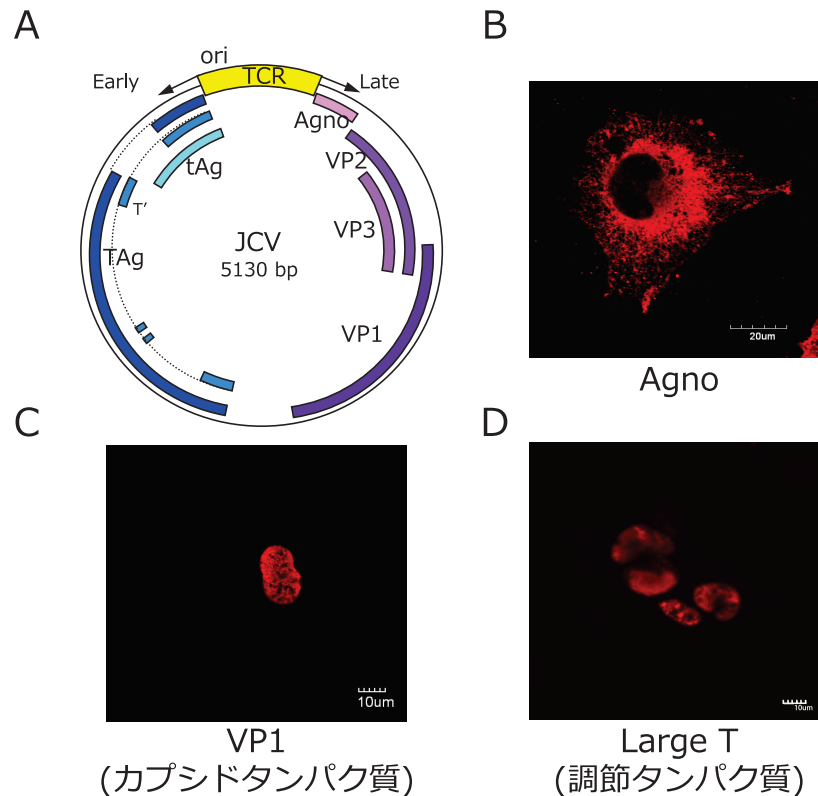


図1 JCVのコードするウイルスタンパク質の細胞内局在。(A)JCVのゲノム構造。(B-D)感染細胞におけるAgno(B), VP1(C), Large T(D)の細胞内局在。Agnoのみが核外に局在する

(JCPyV)と記載することとなっているが、本稿では筆者が研究を始めた当初からの呼称であり馴染み深いJCVと記載させていただく。JCVにより引き起こされるPMLは1950年代に初めて記述された稀な神経疾患である²⁾。1965年にSilvermanらが電子顕微鏡解析によりPML病変部のオリゴデンドロサイト核内にウイルス粒子を発見したことから、PMLがウイルス性疾患である可能性が指摘されていた²⁰⁾。その後、1971年にPadgettらによってPML患者の脳組織からウイルスが分離され¹⁸⁾、その時の患者の名前にちなんでJCVと名付けられた。さらに、同ウイルスがPML病変部のオリゴデンドロサイト内で増殖していることが明らかにされ、PMLがJCV感染により惹起される疾患であるという概念が提唱された。JCVのゲノムは、約5100塩基対の環状二本鎖DNAから成り、調節領域と呼ばれる二方向性のプロモーターの両側に初期転写領域と後期転写領域が存在する⁵⁾。調節領域は、複製開始起点および転写調節領域を含んだ領域である。初期転写領域はウイルスゲノムの転写複製に関与しているLarge T, small tをコードしており、後期転写領域はAgnoと構造タンパク質であるVP1, VP2, VP3をコードしている(図1)。JCVのウイルス粒子は、エンベロープを持たない直径約40~45nmの正二十面体構造をしており、major capsid protein

であるVP1が5つとminor capsid protein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個集合し形成される。カプシドタンパク質がコードされる後期転写領域に存在するAgnoはウイルス粒子には取り込まれないことから、初期転写領域にコードされるウイルスタンパク質などと同様にウイルス増殖を制御する調節タンパク質の1つと考えられていた。

3. Agno欠損ウイルスを用いたJCV Agnoのウイルス増殖における機能解析

JCVのコードする遺伝子の中で、初期転写産物はウイルスゲノムの複製と転写を司る調節タンパク質であること、後期転写産物のVP1, VP2, VP3はカプシドを構成する構造タンパク質であることは古くから知られていた。一方、Agno以外のウイルスタンパク質はウイルス複製の場である感染細胞核内に局在するのにも関わらずAgnoのみが核外に局在するということもあり¹⁵⁾、Agnoの機能は長らく不明であった(図1)。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、古くに発見されたサルを自然宿主とするポリオーマウイルスである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されていた⁴⁾。しかしながら、SV40 Agno に関しては、1980年代の研究により「細胞間のウイルス感染拡大に寄与するがウイルス増殖サイクルには必須ではない」という結論が得られたことから³⁾、その後の研究がほとんど進展しなかった。SV40 よりも後に発見された JCV のウイルス学研究は先行する SV40 の研究をお手本として進められてきていたが、SV40 Agno の研究結果から、Agno はウイルス感染にとって重要ではない分子と認識されており、JCV Agno に関する研究は全く進んでいなかった。

このような分子に我々が注目したきっかけは、PML の脳病理組織での抗 Agno 抗体を用いた免疫組織化学解析により、大変興味深い結果が得られたことであった¹⁵⁾。PML 患者の脳組織においても Agno 以外のウイルスタンパク質は感染オリゴデンドロサイト核内に局在するが、Agno はオリゴデンドロサイトの細胞質全体に局在していた。さらに、脱髄巣辺縁部の形態的には特に変化が見られないオリゴデンドロサイトにおいても長い突起の末端部にまで及ぶ Agno の発現が見られた。PML では JCV がオリゴデンドロサイトに感染し、それにより細胞変性が誘導され脱髄が起こることは知られていたが、腎臓尿路上皮に不顕性感染できる JCV が、なぜオリゴデンドロサイトに細胞変性を誘導するのかという疑問は全く解決されていなかった。この時、筆者の指導教官であり病理医である長嶋和郎教授（北海道大学大学院医学研究科）が Agno の免疫組織化学解析の結果を見て、「Agno はオリゴデンドロサイトの機能不全、細胞変性のイニシエーターなのではないか」という疑問を持ったことから、Agno に関する我々の研究が始まった。

我々が JCV Agno の研究に着手するに当たり、まず初めに Agno を欠損した JCV を作製し、SV40 Agno で見られている現象を追試することにした。SV40 という優れたお手本があった JCV であるが、JCV 研究の大きなハードルとなったのが JCV の増殖性の低さである。JCV は、初感染で PML を惹起することではなく、長い潜伏期を経た後に宿主の免疫不全を契機に発症するため「遅発性ウイルス」と呼ばれているが、何故か *In vitro* での増殖も遅いという実験がやりにくいウイルスである（恥ずかしながら、筆者は研究を開始した当初、増殖が遅いウイルスを「遅発性ウイルス」と分類すると勘違いしていた）。さらに、JCV の近縁の SV40 や BK ウイルス (BKV) は、Vero 細胞などウイルス学研究で汎用されている培養細胞でよく増殖するが、JCV はこれらの細胞には全く感受性がなく、ヒト初代培養胎児グリア細胞、もしくは神経芽細胞腫由来の IMR-32 細胞を使用する必要がある¹³⁾。日本ではヒト初代培養胎児グリア細胞の入手は困難であることから、我々は IMR-32 細胞を用いていたが、IMR-32 細胞は接着性が悪く取り扱いが面倒であり、さらに JCV は感染し増殖す

るもののウイルス感染による明瞭な細胞変性効果は見られずウイルス増殖も緩徐であり、1回の実験に1~2週間かかるという気の長い実験を行う必要があった。また、Agno によるウイルス増殖の変化を検討するためには Agno を欠損した変異ウイルスを作製する必要があるが、変異導入したゲノム DNA を IMR-32 細胞にトランスフェクションしようにも神経系細胞株である IMR-32 細胞のトランスフェクション効率は著しく低く、ウイルス自体の増殖性も低いことから、シンプル実験であるにも関わらず多大な労力を必要とした（この実験を実施したのは筆者ではなく、筆者に実験を指導して下さった岡田由紀先生（現所属：東京大学分子細胞生物学研究所）である¹⁴⁾。この実験の結果、Agno 欠損 JCV では、ウイルス増殖性が著しく低下していることが明らかとなった。さらに、ウイルス感染細胞に Agno に対する siRNA を導入すると効率良くウイルス感染を抑制することができることから（この実験も実施したのは筆者ではなく、今も一緒に JCV 研究を続けて下さっている大場靖子先生（現所属：北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター）である¹⁷⁾、JCV Agno は SV40 とは異なりウイルス増殖において重要な役割を担っていると考えられた。さらに、野生型の JCV の調節領域の一部を SV40 の配列と置き換えたキメラウイルスとヒト胎児グリア細胞である SVG-A 細胞を用いることにより *In vitro* のウイルス増殖を改善した系を用い⁹⁾、同様の実験を行ったところ、Agno 欠損ウイルスではウイルス感染後期において子孫ウイルス粒子の放出が障害されていることが明らかとなった（この実験以降は、筆者も主体的に実験している²³⁾。しかしながら、この系を用いても十分な感染性ウイルスを得ることは困難であり、オーソドックスなウイルス学的手法では、なかなか研究が進展しなかった。そこで、我々は、Agno のタンパク質としての性質を生化学的、細胞生物学的に解析するとともに、宿主細胞内で Agno が相互作用する宿主タンパク質を同定し、その相互作用とウイルス増殖との関係性を解析することにより Agno の機能を解明していくことを考えた。

4. Agno タンパク質の性状解析

Agno は、71 アミノ酸から成る小さなタンパク質であり、他の生物やウイルスの持つタンパク質にホモロジーのある配列はなく、既知の機能ドメインも存在しない。同じポリオーマウイルス同士でも他のウイルスタンパク質に比べ相同性が低く、アミノ酸の配列情報のみから、その細胞内機能を推定することは困難であったが、25番目のアラニンから18残基ほど疎水性アミノ酸が連続するという特徴を持っていた。そこで、Agno は1回膜貫通型の膜タンパク質ではないかと考え、生化学的に検証を行った。まず、Agno のみ発現するように遺伝子導入した細胞の細胞破砕液を細胞質分画とミクロソーム分画に分けると Agno は、

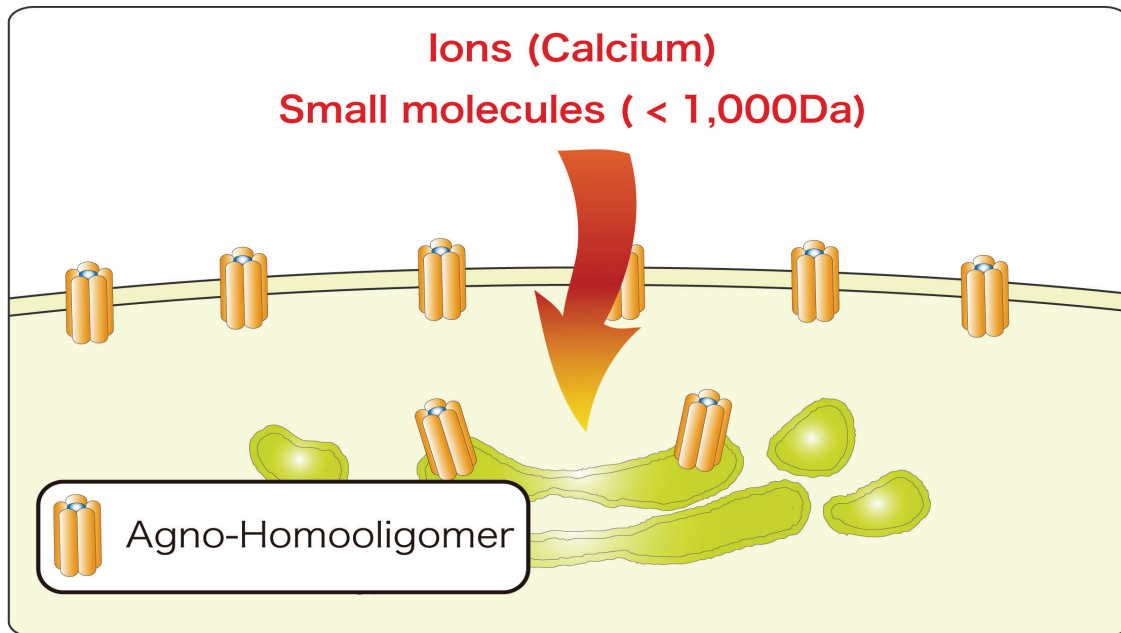


図2 JCV Agno は細胞内小器官および細胞膜にて多量体を形成し、小分子やイオンに対する細胞膜透過性を亢進させるピロポリンとして機能する。

主にミクロソーム分画に分画された。このミクロソーム分画を Triton X-114 により水層と界面活性剤層との層分離処理を行ったところ、Agno は膜タンパク質である Calnexin と同様に界面活性剤層に検出され、Agno が膜タンパク質であると考えられた。次に、膜タンパク質である Agno が細胞内でどのような生体膜に局在するかを検討するために、Agno の細胞内局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡にて解析した。その結果、Agno は核周囲から細胞質に局在しており、細胞質の末梢部においては、小胞体に局在する Calreticulin と共局在し、核周囲では、ゴルジ体に局在する GM130 と共局在した。以上より、Agno は小胞体からゴルジ体に局在する膜タンパク質であると考えられた。さらに Agno の細胞内局在に焦点を当て詳細に解析すると、興味深いことにウイルス感染後、時間経過に従い Agno の細胞内局在が変化していく事が分かった。感染初期には、小胞体およびゴルジ体の局在が見られるが、感染後期になってくると小胞体への局在が不明瞭になり、細胞質全体にびまん性に局在が見られた。この結果と Agno が膜タンパク質であることを合わせ考えると、感染後期に Agno は細胞表面まで移動している事が予想された。そこで、Agno が細胞表面に存在するかどうかを、Agno の C 末端を抗原として作製した抗体を用いて膜透過処理を行わず染色し、フローサイトメトリー解析及び共焦点レーザー走査型顕微鏡解析により検討したところ、細胞表面上に Agno の C 末端が存在することが明らかになった。以上の結果より Agno は、感染当初は小胞体やゴルジ体の脂質二

重膜に局在し、感染後期になると C 末端を細胞外へ露出した状態で細胞膜に局在するようになると考えられた²³⁾。

5. Agno のピロポリン活性の証明

これまでの解析により、Agno は感染細胞の細胞内小器官および細胞膜の脂質二重膜に挿入されている小さな膜タンパク質であることが明らかになった。多くのウイルスでエンベロープタンパク質とは異なる小さな膜タンパク質が存在していることが報告されているが、その中の多くはピロポリンと呼ばれる機能分子であることが知られている^{6,12)}。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を貫通する「孔」を作るウイルスがコードするチャンネルタンパク質である。この「孔」がイオンや小分子の膜透過性を亢進させることにより、何らかの宿主内環境を変化させ、結果として宿主細胞膜の破綻を誘導し、最終的にはウイルス粒子の細胞外に放出に寄与すると考えられている。このピロポリンの概念が提唱され出した当初は、ポリオーマウイルスを含む DNA ウイルスではピロポリンは発見されていなかったが、ノンエンベロープウイルスであるピコルナウイルスにピロポリンの機能を有するウイルスタンパク質が存在することが知られており^{1,11)}、Agno は子孫ウイルス粒子の細胞外放出に関与する膜タンパク質であることから、我々は、Agno は JCV のピロポリンではないかと考えた。これまでにインフルエンザウイルスの M2¹⁹⁾、コクサッキーウイルスの 2B^{1,11)}、HCV の p7⁷⁾などがピロポリンとして報告さ

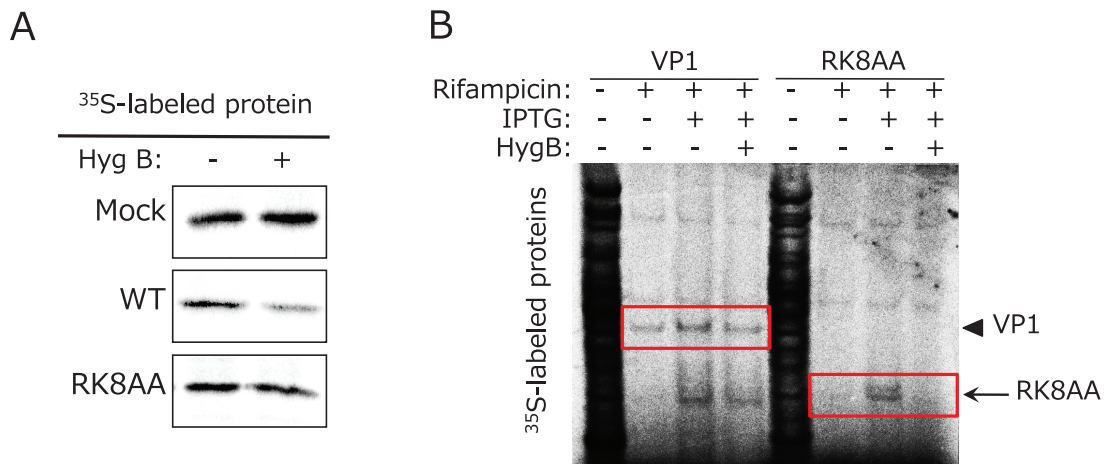


図 3 ビロポリン活性欠損 Agno 変異体 RK8AA の発見. (A) 哺乳類細胞における野生型 Agno および RK8AA 変異 Agno のピロポリン活性の解析. タンパク合成阻害剤であるハイグロマイシン B 存在下でのタンパク質合成を ^{35}S 標識されたタンパク質 (サロゲートマーカータンパク質として外来性発現させた GFP を検出) を検出することにより評価した. 野生型 Agno 発現細胞ではタンパク質合成が阻害されており, ハイグロマイシン B の細胞膜透過性が亢進していることを示唆している. 一方, RK8AA 変異 Agno 発現では, ハイグロマイシン B の細胞膜透過性に変化は見られなかった. (B) 大腸菌における RK8AA 変異 Agno のピロポリン活性の解析. 大腸菌に VP1 もしくは RK8AA 変異 Agno を導入し Rifampicin で宿主内因性タンパク質合成を抑制した状態で IPTG により導入遺伝子の発現を誘導した. この時にハイグロマイシン B を加えておくと VP1 発現大腸菌では, VP1 の発現は変化がないが, RK8AA 変異 Agno 発現大腸菌では, RK8AA 変異 Agno の発現が抑制されており, ハイグロマイシン B の細胞膜透過性が亢進していることが示唆された.

れているが, それぞれのピロポリンで配列は多様であり, 共通配列が存在するわけではないことなどから, あるウイルスタンパク質がピロポリンであるかどうかを証明するには, その分子がピロポリンとして備えるべき特徴を有しているかを実験的に確認する必要がある. ビロポリンの最も大きな特徴は多量体化しチャネル構造を形成することである. そこで, Agno が多量体を形成しているかどうかについてケミカルクロスリンカーを使った実験で検討したところ, Agno は感染細胞内において 5 量体程度の多量体を形成している事が明らかになった. さらに, 蛍光タンパク質を融合した Agno を用いて分子間 FRET を利用した Agno の分子動態解析を実施したところ, Agno は生細胞の細胞内小器官, 細胞膜において多量体を形成していると考えられた. 次に多量体化する Agno がピロポリンの活性である膜透過性亢進能を有しているかどうかについて検討した. ビロポリンにより細胞膜透過性が亢進すると細胞外領域からイオンや小分子が細胞内に流入してくるが, この時, 細胞外から流入してくるカルシウムイオンが宿主細胞の生理機能に与える影響が最も大きいと考えられている. そこで, Agno による細胞膜カルシウムイオン透過性への影響についてカルシウムイオンに対する FRET バイオセンサー¹⁰⁾ を用いて解析したところ, Agno 存在下では, 細胞膜のカルシウムイオンに体する透過性が亢進している事が明らかになった (図 2). 以上の結果より, Agno は細胞膜上で多

量体を形成し細胞膜の透過性を亢進させるピロポリンとして機能しており, このピロポリン活性により細胞外へのウイルス粒子の放出を促していると考えられた²³⁾.

6. ビロポリン活性欠損 Agno 変異体の発見

タンパク質の機能解析を進める上で, 機能欠損変異体を用いた解析が非常に有用であることは言うまでもない. Agno のタンパク質性状解析の過程で Agno の C 末端が細胞外に存在することが明らかとなったことから, Agno は細胞内に N 末端が存在する 2 型膜タンパク質であると考えられた. また, JCV Agno と近縁ウイルスの BKV Agno を比較すると両者の間で N 末端は比較的保存されていることから, 細胞質内に存在する N 末端側に何らかの機能モチーフが存在することが推測された. そのような観点でアミノ酸 1 次配列をよく見ると塩基性残基のクラスターが見られたことから, この塩基性残基が Agno の性状, 機能に重要ではないかという仮説を立て, これらを順番にアラニンに置換した変異体を作製した. Agno の細胞内局在が感染後経時的に変化していくことを観察していたので, これらの変異が Agno の細胞内局在に与える影響を検討したところ, 8 番目と 9 番目の塩基性残基「RK」をアラニンに置換した RK8AA 変異 Agno 以外は, 細胞内小器官の局在が消失した. このことから, Agno の N 末端の塩基性残基は細胞内小器官の膜局在に重要であると考えられた. さ

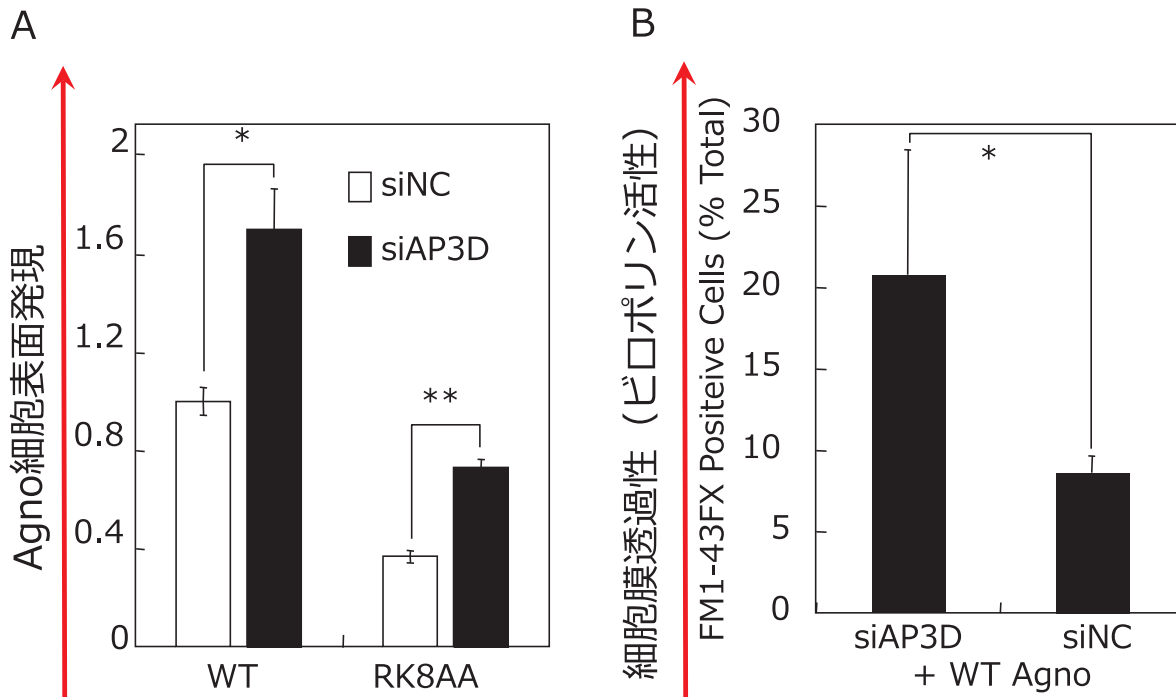


図4 AP3抑制によるAgnoの細胞表面発現量とピロポリン活性の変化。(A)野生型およびRK8AA変異Agno発現細胞においてAP3D発現量を抑制すると、野生型およびRK8AA変異Agnoのいずれも細胞表面での発現量が増加した。(B)野生型Agno発現細胞においてAP3D発現量を抑制するとAgnoのピロポリン活性が上昇した。

らに、野生型と同様に細胞内小器官に局在したRK8AA変異Agnoの細胞内局在を経時的に解析すると、野生型とは異なり細胞膜上には局在できないことが明らかになった。Agnoがピロポリンとして機能するためには、細胞膜の透過性を亢進させる必要があり、細胞膜への局在が重要であると考えられたので、RK8AA変異Agnoがピロポリン活性を有しているかどうかを検討すると、予想通りRK8AA変異Agnoは細胞膜透過性を亢進させることが出来ず、ピロポリン活性を欠損していた(図3A)。さらに、RK8AA変異Agnoを持つ変異ウイルスを作製したところ、子孫ウイルス粒子の放出がAgno欠損ウイルスと同様に阻害されていた。これは、Agnoの細胞膜透過性亢進能、すなわちピロポリン活性が子孫ウイルス粒子の放出の要となっていることを示唆しており、Agnoのピロポリン活性のウイルス増殖における意義を明らかにする重要な知見であった。

このRK8AA変異Agnoの発見は、Agnoのピロポリンとしてのウイルス感染における役割を明確にただけでなく、次の研究に繋がる重要なヒントを与えてくれるものであった。RK8AA変異Agnoがピロポリン活性を欠損している理由は、細胞膜に局在できないことであると考えられたが、その原因を特定していくために、ピロポリンとしての特徴である多量体化能について検討したところ、RK8AA変異Agnoは野生型と同様に多量体を形成してい

た。多量体を形成することができれば、チャネル構造を形成することが予想されたために、本来の宿主ではない大腸菌にRK8AA変異Agnoを強制発現させたところ、野生型と同様に大腸菌の細胞膜透過性を亢進させることができチャネル構造を形成していることが明らかとなった(図3B)。このことは、RK8AA変異Agnoは、JCVの感染宿主である哺乳類細胞ではピロポリン活性を失うものの、タンパク質としては多量体化能もチャネル構造形成能も有していることを示しており、Agnoのピロポリン活性には宿主因子依存性があることが予想された²³⁾。

7. Agno 相互作用宿主因子の同定とピロポリン活性

我々は、Agnoのピロポリンとしての機能が明らかになる前に、Agnoの宿主細胞内での機能を推定するためにYeast Two-Hybrid法を用いたAgno相互作用宿主因子の同定を試みていた。最初の実験によりAgnoが感染後期のウイルス粒子放出に寄与していることは分かっていたので、得られた相互作用候補宿主因子のいくつかについてウイルス増殖に与える影響を解析し、少なからずウイルス増殖に関与しているという結果を得ていた^{16, 21)}。しかしながら、いずれの宿主因子との相互作用もウイルス増殖に決定的に影響を与えているわけではなく、その他の宿主因子がAgnoのピロポリン活性に重要であることが考えられた。

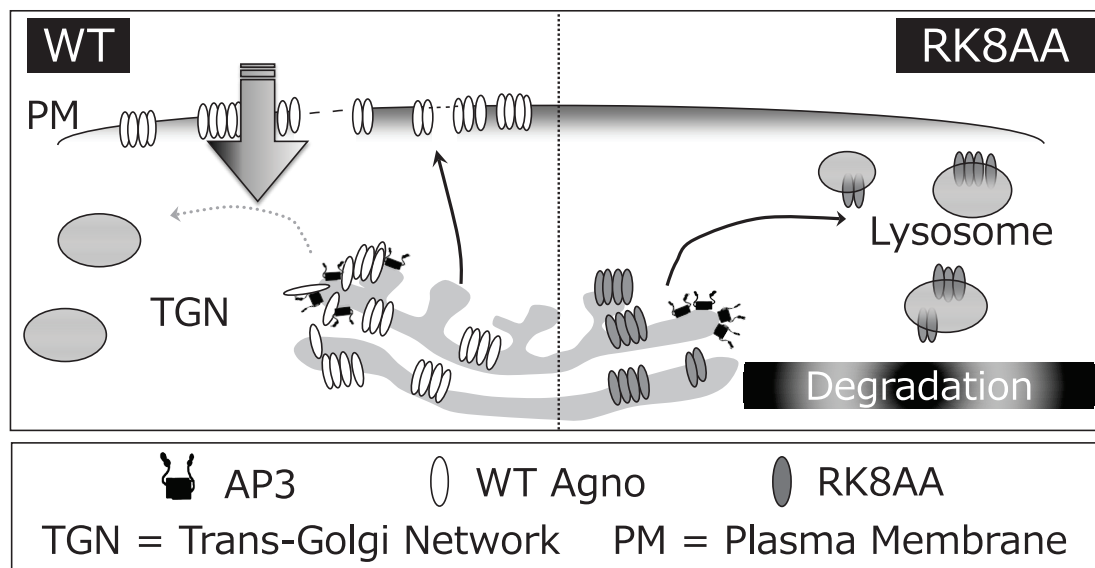


図5 Agno と AP3 の相互作用によるピロポリン活性制御機構のモデル。AP3D に結合できない RK8AA 変異 Agno は、AP3 依存的な小胞輸送によりリソソームに輸送され分解されるが (右側)、野生型 Agno は AP3D に結合することにより AP3 依存的な小胞輸送を抑制し、Agno 自身がリソソームで分解されることを防いでおり、結果として細胞膜上へ移動でき細胞膜透過性を亢進させることができる (左側)。

また、この Yeast Two-Hybrid 法による Agno 相互作用宿主因子スクリーニングにおいて、Agno の細胞内局在に重要と考えられた N 末端の 24 アミノ酸を bait として用いた時に、細胞内小胞輸送を担う分子の一つである Adaptor protein complex 3 (AP3) の δ サブユニット (AP3D) が同定されていたが、その相互作用の意義についての解析は全く進んでいなかった。そこで、ピロポリン活性を欠損した RK8AA 変異 Agno と AP3D との相互作用を検討したところ、RK8AA 変異 Agno は AP3D と結合できなくなっていたことが明らかとなった。AP3 は、細胞内小胞輸送のうちリソソームへの輸送を担うアダプター分子であり、この分子の機能抑制により本来リソソームに局在すべき膜タンパク質が細胞膜上へ局在するようになる現象が知られていた。そこで、Agno の細胞膜上への局在に、この AP3 を介した系が関与している可能性を考え、Agno の AP3 依存性小胞輸送への影響を解析したところ、Agno は AP3D に結合することにより AP3 依存性のリソソームへの小胞輸送を抑制していた。また、AP3D と結合できない RK8AA 変異 Agno は AP3 依存的小胞輸送によりリソソームへ輸送され分解されており、野生型の Agno も一部が AP3 依存的にリソソームで分解されていた。さらに、AP3 の機能を抑制すると Agno の半減期は延長し、細胞膜上への局在が増加しピロポリン活性は増強した (図 4)。以上より、Agno は、AP3D と相互作用することにより AP3 依存的な細胞内小胞輸送系を阻害し、Agno 自身がリソソームに輸送され分解されることを抑制し、その結果として Agno は

ピロポリンとして働く場所である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明らかになった (図 5)。さらに、これらの結果を元にして Agno と AP3D の相互作用を阻害するタンパク質を設計し感染細胞内に発現させるとウイルス粒子の細胞外放出が抑制され、ウイルス感染が抑制されることが明らかとなった²²⁾。これらの結果は、JCV のピロポリンである Agno が機能を発揮する分子機構を明らかにしただけでなく、ピロポリンの活性発現にピロポリンと宿主因子との直接的な相互作用が必要不可欠であること、さらにピロポリン-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唆していた。

8. JCV チャネルタンパク質ピロポリンと細胞病理

ピロポリンは脂質二重膜に挿入され多量体化することにより自律的に、すなわち宿主因子非依存的に孔を形成し脂質二重膜の透過性を亢進させることができる。実際、Agno を大腸菌に単独で発現させると細胞膜の透過性を亢進させ、大腸菌の増殖を抑制することができる。一方、Agno を本来の宿主である哺乳類細胞に単独で発現させた場合は細胞膜の透過性は亢進するにもかかわらず、細胞増殖性に変化は見られない。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外因性ストレスに対抗する様々な機構が存在しており、ピロポリンの活性発現には、これらの宿主機構との相互作用が関与していることが考えられる。我々は、これまでの研究で明らかになった

「AP3はAgnoの分解に関与しており一種の内因性感染制御因子として機能している」という事実に注目し、細胞内には多くのウイルスに存在するピロポリンに対する普遍的な感染制御因子が備えられているのではないかと予想している。Agno単独発現系では細胞膜の透過性を亢進させることはできるがウイルス感染時のような細胞破壊を引き起こすことが出来ないという事実から、宿主細胞内にはAgno単独発現の系では回避できない何らかのピロポリン活性抑制機構が存在し、それによりAgnoのピロポリン活性が制限されていることが推測される。今後、JCV感染による細胞病理の発生機序解明を目指し、このピロポリン活性抑制機構を解析していくことが重要であると考えられる。

9. まとめ

我々は、PMLという致死性難病の発病機構を解明したという動機から、JCVによって起こる細胞病理の発生機序をウイルスタンパク質の細胞内での振る舞いと宿主因子との相互作用という観点で解析してきた。その研究の中で、Agnoという小さなタンパク質がウイルスの持つチャネルタンパク質「ピロポリン」であることを発見し、その機能発現が宿主因子との直接結合により制御されていることを明らかにした。ピロポリンの細胞膜透過性亢進能という特徴は、ウイルス感染による細胞病理の要となっている可能性が考えられ、今後、ブラックボックスとなっているピロポリンによる宿主細胞膜破綻誘導の分子機構が明らかにされることにより、細胞病理の発生機序に対する理解が深まると考えられる。また、JCV Agnoに関する研究だけでなく、ピロポリンを持つ他のウイルスにおいても同様の研究が進展することにより、ウイルス感染におけるピロポリンの役割とその分子機構の詳細が解明され、ウイルス-宿主細胞相互作用の新たな局面が見えてくるのではないかと期待している。

謝辞

本稿で紹介した内容は、私が2002年から北海道大学大学院医学研究科分子細胞病理学分野にて長嶋和郎教授の指導のもとで行ってきた研究を基礎として、2006年から2009年に博士研究員として在籍した北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門にて澤洋文教授のもとで発展させ、2009年に着任した国立感染症研究所感染病理部にて長谷川秀樹部長のご支援を受けてまとめることが出来た研究です。1つのテーマを3つの研究室に渡って継続して行くことが出来たのは、3人の理解ある指導者に恵まれたという幸運だけでなく、最初に素晴らしい研究テーマを与えてくださった長嶋先生と学生時代から長きに渡り御指導くださった澤先生、研究者としてのイロハを教えてくださいました岡田由紀先生、一緒にJCV研究を続け多くの実験に直接的に御協力くださった大場靖子先生を

はじめ3つの研究室の多くの方の御指導、御協力、御支援のおかげであり、心より御礼を申し上げます。また、私を杉浦奨励賞にご推挙くださいました澤洋文教授、長嶋和郎名誉教授、長谷川秀樹部長に深謝致します。

引用文献

- 1) Agirre, A., A. Barco, L. Carrasco, and J. L. Nieva. Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J Biol Chem* 277:40434-40441 2002.
- 2) Astrom, K. E., E. L. Mancall, and E. P. Richardson, Jr. Progressive multifocal leuko-encephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain: a journal of neurology* 81:93-111 1958.
- 3) Carswell, S., J. Resnick, and J. C. Alwine. Construction and characterization of CV-1P cell lines which constitutively express the simian virus 40 agnoprotein: alteration of plaquing phenotype of viral agnogene mutants. *J Virol* 60:415-422 1986.
- 4) DeCaprio, J. A., and R. L. Garcea. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nature reviews. Microbiology* 11:264-276 2013.
- 5) Frisque, R. J., G. L. Bream, and M. T. Cannella. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 51:458-469 1984.
- 6) Gonzalez, M. E., and L. Carrasco. Viroporins. *FEBS Lett* 552:28-34 2003.
- 7) Griffin, S., C. Stgelais, A. M. Owsianka, A. H. Patel, D. Rowlands, and M. Harris. Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology* 48:1779-1790 2008.
- 8) Johne, R., C. B. Buck, T. Allander, W. J. Atwood, R. L. Garcea, M. J. Imperiale, E. O. Major, T. Ramqvist, and L. C. Norkin. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Archives of virology* 156:1627-1634 2011.
- 9) Major, E. O., A. E. Miller, P. Mourrain, R. G. Traub, E. de Widt, and J. Sever. Establishment of a line of human fetal glial cells that supports JC virus multiplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:1257-1261 1985.
- 10) Nagai, T., S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa, and A. Miyawaki. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10554-10559 2004.
- 11) Nieva, J. L., A. Agirre, S. Nir, and L. Carrasco. Mechanisms of membrane permeabilization by picornavirus 2B viroporin. *FEBS Lett* 552:68-73 2003.
- 12) Nieva, J. L., V. Madan, and L. Carrasco. Viroporins: structure and biological functions. *Nature reviews. Microbiology* 2012.
- 13) Nukuzuma, S., Y. Yogo, J. Guo, C. Nukuzuma, S. Itoh, T. Shinohara, and K. Nagashima. Establishment and characterization of a carrier cell culture producing

- high titres of polyoma JC virus. *Journal of medical virology* 47:370-377 1995.
- 14) Okada, Y., S. Endo, H. Takahashi, H. Sawa, T. Umemura, and K. Nagashima. Distribution and function of JCV agnoprotein. *Journal of neurovirology* 7:302-306 2001.
 - 15) Okada, Y., H. Sawa, S. Endo, Y. Orba, T. Umemura, H. Nishihara, A. C. Stan, S. Tanaka, H. Takahashi, and K. Nagashima. Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta neuropathologica* 104:130-136 2002.
 - 16) Okada, Y., T. Suzuki, Y. Sunden, Y. Orba, S. Kose, N. Imamoto, H. Takahashi, S. Tanaka, W. W. Hall, K. Nagashima, and H. Sawa. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep* 6:452-457 2005.
 - 17) Orba, Y., H. Sawa, H. Iwata, S. Tanaka, and K. Nagashima. Inhibition of virus production in JC virus-infected cells by postinfection RNA interference. *J Virol* 78:7270-7273 2004.
 - 18) Padgett, B. L., D. L. Walker, G. M. ZuRhein, R. J. Eckroade, and B. H. Dessel. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1:1257-1260 1971.
 - 19) Pinto, L. H., L. J. Holsinger, and R. A. Lamb. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69:517-528 1992.
 - 20) Silverman, L., and L. J. Rubinstein. Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta neuropathologica* 5:215-224 1965.
 - 21) Suzuki, T., Y. Okada, S. Semba, Y. Orba, S. Yamanouchi, S. Endo, S. Tanaka, T. Fujita, S. Kuroda, K. Nagashima, and H. Sawa. Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JC virus agnoprotein and microtubules: role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1 from microtubules in viral propagation. *J Biol Chem* 280:24948-24956 2005.
 - 22) Suzuki, T., Y. Orba, Y. Makino, Y. Okada, Y. Sunden, H. Hasegawa, W. W. Hall, and H. Sawa. Viroporin activity of the JC polyomavirus is regulated by interactions with the adaptor protein complex 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:18668-18673 2013.
 - 23) Suzuki, T., Y. Orba, Y. Okada, Y. Sunden, T. Kimura, S. Tanaka, K. Nagashima, W. W. Hall, and H. Sawa. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS pathogens* 6:e1000801 2010.

Investigation of Molecular Mechanism of JC virus Viroporin Activity

Tadaki SUZUKI

Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases

1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Phone: +81-3-5285-1111 / Fax: +81-3-5285-1189

E-mail: tksuzuki@niid.go.jp

Viroporins are small and hydrophobic viral proteins that form pores on host cell membranes, and their expression can increase the permeability of cellular membranes and the production of progeny virus particles. JC virus (JCV) is the causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). We demonstrate that JCV Agno, which is the small and hydrophobic protein, and increases the plasma membrane permeability and virion release, acts as a viroporin. We also demonstrate that an interaction of Agno with a host cellular protein regulates the viroporin activity of Agno. These findings indicate a new paradigm in virus-host interactions regulating viroporin activity and viral replication.