

3. ヒトポリオーマウイルス JC の核内封入体形成機序 —カプシド蛋白は PML 核体でウイルス粒子を形成する。—

宍戸-原 由紀子

杏林大学医学部病理学教室

ヒトポリオーマウイルス JC (JCV) は、重篤な脱髄脳症である進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスで、感染した希突起膠細胞 (oligodendroglia) に核内ウイルス封入体を形成する。JCV の粒子外殻は、360 分子のメジャーカプシド蛋白 VP1 と、マイナーカプシド蛋白 VP2, VP3 が一定の割合で会合して形成すると推定される。しかし、カプシド蛋白の発現制御機序や、核移行、ウイルス封入体形成の過程には不明な点が多かった。近年我々は、JCV 粒子形成機序について、次のことを明らかにした。即ち、(i) メジャーカプシド蛋白とマイナーカプシド蛋白は、選択的スプライシングにより発現比が制御された mRNA から合成される、(ii) メジャーカプシド蛋白とマイナーカプシド蛋白の mRNA は polycistronic で、両カプシド蛋白の翻訳は制御蛋白 agnoprotein の下流で行われる、(iii) メジャーカプシド蛋白とマイナーカプシド蛋白は共同して核に移行し、PML 核体と呼ばれるドット状の核内構造に集積する、(iv) PML 核体では JCV ゲノム複製と粒子形成が連動し、効率の良いウイルス複製が行われると考えられる。PML 核体は、宿主細胞の重要な核機能の発現の場である。JCV 感染の標的が PML 核体であることは、核内ウイルス封入体形成後の細胞変性機序の解明にも寄与するところが大きい。

1. はじめに

進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy) は、ヒトポリオーマウイルス JC (JCV) による脱髄疾患である。人口の大半が JCV に感染しているがその殆どは無症候感染で、AIDS や末期癌、高齢者など免疫能の低下した宿主に重篤な脱髄脳症をきたす。剖検で得られた脳組織を病理組織学的に解析すると、脳白質の脱髄巣辺縁に核の腫大した oligodendroglia が多数見られ、その核内にヘマトキシリンとエオジンに両染性を示すウイルス封入体が認められる。電子顕微鏡的にウイルスは、約 40 nm の球状または管状の構造物として確認される^{27, 32)}。1971 年、JCV はヒト胎児グリア初代培養細胞

(primary human fetal glia: PHFG) を用いて分離・同定された²¹⁾。本邦では、1981 年に長嶋らが JCV Tokyo-1 株を分離し¹⁹⁾、1987 年に松田らとそのゲノム DNA をクローニングした¹⁷⁾。

JCV の DNA 配列は、DNA 腫瘍ウイルスとして有名な simian virus 40 (SV40) や、ヒトに尿路感染症をきたす BK virus (BKV) と約 70% のホモロジーを有している。SV40 の結晶構造解析^{4, 16, 28)} から、JCV の粒子外殻 (カプシド) は 72 個のペンタマーを形成する合計 360 分子のメジャーカプシド蛋白 VP1 と、その約 10 分の 1 量のマイナーカプシド蛋白 VP2/VP3 から構成されると推測される。SV40 と同様、VP1 ペンタマーは互いに C 末端のアミノ酸配列で結合してカプシド外側を形成し、VP2 および VP3 はカプシド内側で VP1 ペンタマーと結合して内部のウイルスゲノムとヒストンからなる minichromosome をアンカリングする可能性がある。VP1 蛋白と VP2/VP3 蛋白が一定の割合で会合して幾何学的に均整のとれたウイルス粒子を形成するには、多くの制御機序が存在すると推測されるがその詳細は明らかではない。

JCV は in vitro 培養系における増殖効率が低く、後期 mRNA やカプシド蛋白の発現には 2 週間～3 週間の培養期

連絡先

〒181-8611 東京都三鷹市新川 6-20-2
杏林大学医学部病理学教室
TEL: 0422-47-5511 (内線 3420)
FAX: 0422-40-7093
E-mail: yhara@kyorin-u.ac.jp

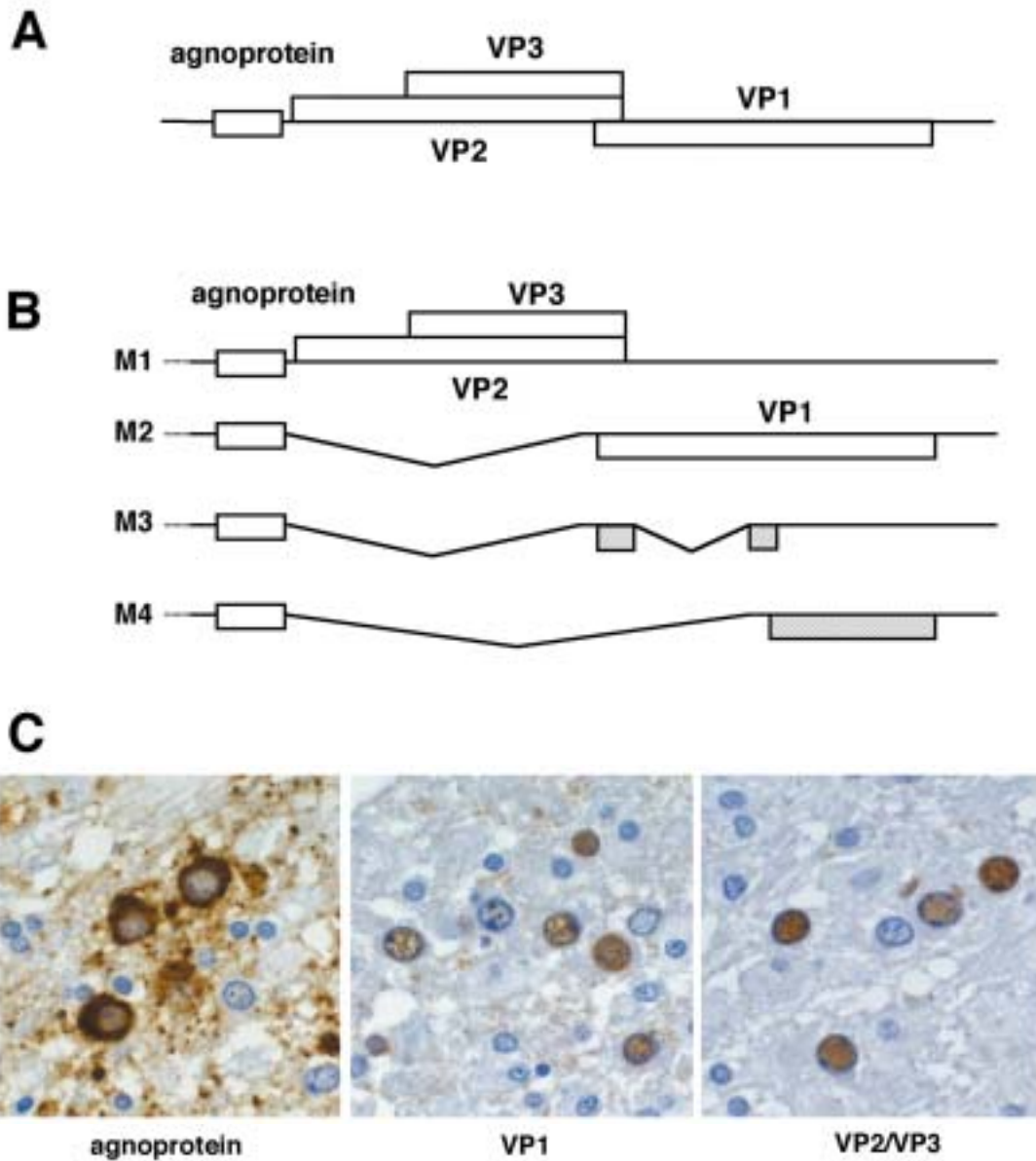


図1 A) JCV DNA 後期領域のゲノム構造: メジャーカプシド蛋白 VP1 とマイナーカプシド蛋白 VP2/VP3 は、制御蛋白 agnoprotein の下流で互いに重なり合ってコードされている。B) JCV 後期 mRNA の構造: JCV では、少なくとも4種 (M1-M4) の polycistronic な後期 mRNA が産生されており、これらの発現比は選択的スプライシングにより制御される。VP1 は M2、VP2/VP3 は M1 にコードされ、各々 agnoprotein の下流で翻訳される。M3 と M4 には新規 ORF の存在が示唆された。C) 進行性多巣性白質脳症における JCV 後期蛋白の発現: JCV 後期蛋白に対するペプチド抗体を作製し、各蛋白の細胞内局在を解析した。agnoprotein は感染細胞の核膜周囲に、VP1 と VP2/VP3 は核内に発現が認められた。

間を要したため、ウイルス粒子形成機序の解析は困難とされていた。そこで我々は、VP1 および VP2/VP3 蛋白のコード領域を含む polycistronic なウイルスゲノム断片を強力な SR α プロモータ³⁰⁾の下流に組み込み、COS-7 細胞に導入後3日で組み換え JCV 粒子を作製する系を樹立した^{22,24)}。COS-7 細胞内で発現されたベクター由来の RNA はウイルス本来のスプライシング部位でスプライスされ、メジャーおよびマイナーカプシド蛋白の proportional な発現が可能

となった。また COS-7 細胞を使用することにより他の培養細胞と比較して高い JCV カプシド蛋白の発現効率を得ることができた。この系を用いて、JCV 粒子形成が promyelocytic leukemia (PML) 核体と呼ばれるドット状の核内構造を足場に起きることを明らかにし、さらに JCV 感染ヒト脳組織の検討でもこれを支持するデータを得た²⁵⁾。

PML 核体は、DNA 複製、転写、アポトーシスなど真核細胞の重要な核機能を担う核内構造である。癌抑制因子で

ある PML 蛋白が主要構成成分で、その他 p53, CREB-binding protein (CBP), pRB, ユビキチンなど多数の蛋白が PML 核体に恒常的にまたは一過性に局在する^{3, 11, 18)}。また PML 核体は急性前骨髄性白血病や癌, ポリグルタミン病などの神経変性疾患の発症に関連しており、この核体構造の崩壊や機能破綻は細胞の癌化や変性と関係があると考えられている。近年、ウイルス感染においても PML 核体の関与が注目されてきた。Type-1 herpes simplex virus (HSV-1) や human cytomegalovirus (HCMV), Epstein-Barr virus (EBV) では、ウイルス初期蛋白が PML 核体を崩壊してウイルス増殖に有利な細胞環境を誘導する^{1, 2, 8)}。一方、パピローウイルスではカプシド蛋白が PML 核体に集積して、これを足場にウイルス粒子形成が行われると考えられている^{9, 10)}。

SV40 やマウスポリオーマウイルスでは、転写後のスプライシングや翻訳などの遺伝子発現、カプシド蛋白の核移行、さらにウイルス粒子の結晶構造が、各分野の専門家により積極的に解析されてきた。これらの事象は互いに密に関与しあい効率のよいウイルス複製に寄与すると考えられる。本稿では、JCV カプシド蛋白の発現、核移行、PML 核体での粒子形成まで一連の過程における巧みな制御機序について、明らかになった知見を SV40 と比較しつつ紹介する。

2. JCV カプシド蛋白発現の制御機序

JCV は、約 5130 bp の環状 DNA をゲノムとしてもつ (JCV Tokyo-1 株: GenBank accession number AF030085)²⁴⁾。ゲノムには初期・後期の蛋白コード領域があり、初期領域には腫瘍抗原 (T antigens) が、後期領域には制御蛋白 agnoprotein と 3 種のカプシド蛋白 (VP1, VP2, VP3) がコードされている。メジャーカプシド蛋白 VP1 とマイナーカプシド蛋白 VP2, VP3 の open reading frame (ORF) は互いに重なり合う。即ち、VP3 は VP2 C 末端側 3 分の 2 とアミノ酸配列が同じで (VP2/VP3 と表記)、VP1 N 末端は VP2/VP3 C 末端とフレームをシフトさせて、部分的に重なり合っている (図 1A)。

後期領域からは、少なくとも 4 種の mRNA (M1-M4) が選択的スプライシングにより産生される (図 1B)。JCV と SV40 には、5' および 3' スプライス・サイトの DNA 塩基配列や、ポリピリミジン鎖の長さに相違があり、mRNA は互いに異なった構造をとる。特に、JCV ではリーダー配列でのスプライシングが認められず、どの後期 mRNA も agnoprotein をコードすることが特徴的である (本稿では便宜上、カプシド蛋白 ORF 上流の RNA 配列をリーダー配列と記載する)。M1 RNA はスプライスを受けない pre-mRNA で、マイナーカプシド蛋白 VP2/VP3 をコードする。M2 RNA は主要な後期 mRNA で、メジャーカプシド蛋白 VP1 をコードする。メジャーおよびマイナーカプシド蛋白の RNA 発現比は選択的スプライシングにより制御されて

おり、M2 のスプライス・サイトは最もコンセンサス配列に近く、スプライシング効率も高い。M3 と M4 には、VP1 の splicing variant である新規 ORF の存在が示唆された^{24, 26)}。

JCV カプシド蛋白は agnoprotein の下流で翻訳を受ける (図 1B)。Kozak が提唱するモデルでは、リボゾームが 5' 側から mRNA 配列をスキャンしてコンセンサス配列をもつ AUG コドンから効率よく蛋白合成を開始する^{14, 15)}。最も翻訳効率の高いコンセンサス配列は GCC ACC AUG G であり、特に AUG コドンの A を +1 position とすると、-3 position のプリン、できれば A ($R^3=A^3$ or G^3) と、+4 position の G (G^{+4}) は、翻訳開始に極めて重要である¹³⁾。JCV 後期 mRNA の配列をみると、agnoprotein の AUG 翻訳開始コドンとその近傍の配列 CUG GCC AUG G は、 G^3 と G^{+4} を含む強いコンセンサス配列を有しており、高い翻訳効率が予測される。一方、カプシド蛋白 VP1 と VP2/VP3 の翻訳は、agnoprotein の合成を終えたりリボゾームが蛋白合成を reinitiation して行われる可能性が高い。即ち、VP1 翻訳開始コドンを含む候補配列 AAG AUG G は A^3 と G^{+4} を有しているにもかかわらず、reinitiation による蛋白合成効率の低下が予測される。これに対して SV40 では、agnoprotein の AUG 翻訳開始コドンを超プライス・アウトしたり、またリボゾームが agnoprotein の AUG 翻訳開始コドン bypass する機序が存在し、下流のカプシド蛋白の翻訳効率が比較的高い。従って JCV では、リーダー配列における agnoprotein ORF の存在が、メジャーおよびマイナーカプシド蛋白の全体的な発現量を、翻訳レベルでは抑制していると考えられた^{24, 26)}。

JCV カプシド蛋白のアミノ酸配列を DNA 配列から予測し、agnoprotein, VP1, VP2/VP3 のペプチド抗体を作製して免疫組織化学的に検討した。進行性多巣性白質脳症の脳組織において、agnoprotein は感染細胞の主に核膜周囲に、VP1 および VP2/VP3 は核内に発現していた (図 1C)。こうした局在は、VP1, VP2/VP3 がウイルス粒子構成成分であること、agnoprotein はウイルス粒子内には組み込まれない制御蛋白であることをよく反映していた。

3. カプシド蛋白の核移行

～ VP1 と VP2/VP3 は共同して核移行する。～

細胞質で合成されたカプシド蛋白は、速やかに核移行して粒子形成する。SV40 では、VP1 N 末端と VP2/VP3 C 末端が互いにフレームをシフトして重なった領域に、核移行シグナルや DNA binding domain などの重要なシグナルが同定されている^{5, 7, 12)}。JCV の VP1 N 末端と VP2/VP3 C 末端の重複領域はそれぞれ、SV40 や BKV と比較して、8 アミノ酸残基が欠失する特異的な配列を有している (図 2A)。

JCV VP1 を COS-7 細胞に単独で導入発現すると、核と細胞質の双方に分布した (図 2B 左)。一方、SV40 VP1 は単独でも核に効率良く移行し、限局して核に分布する。

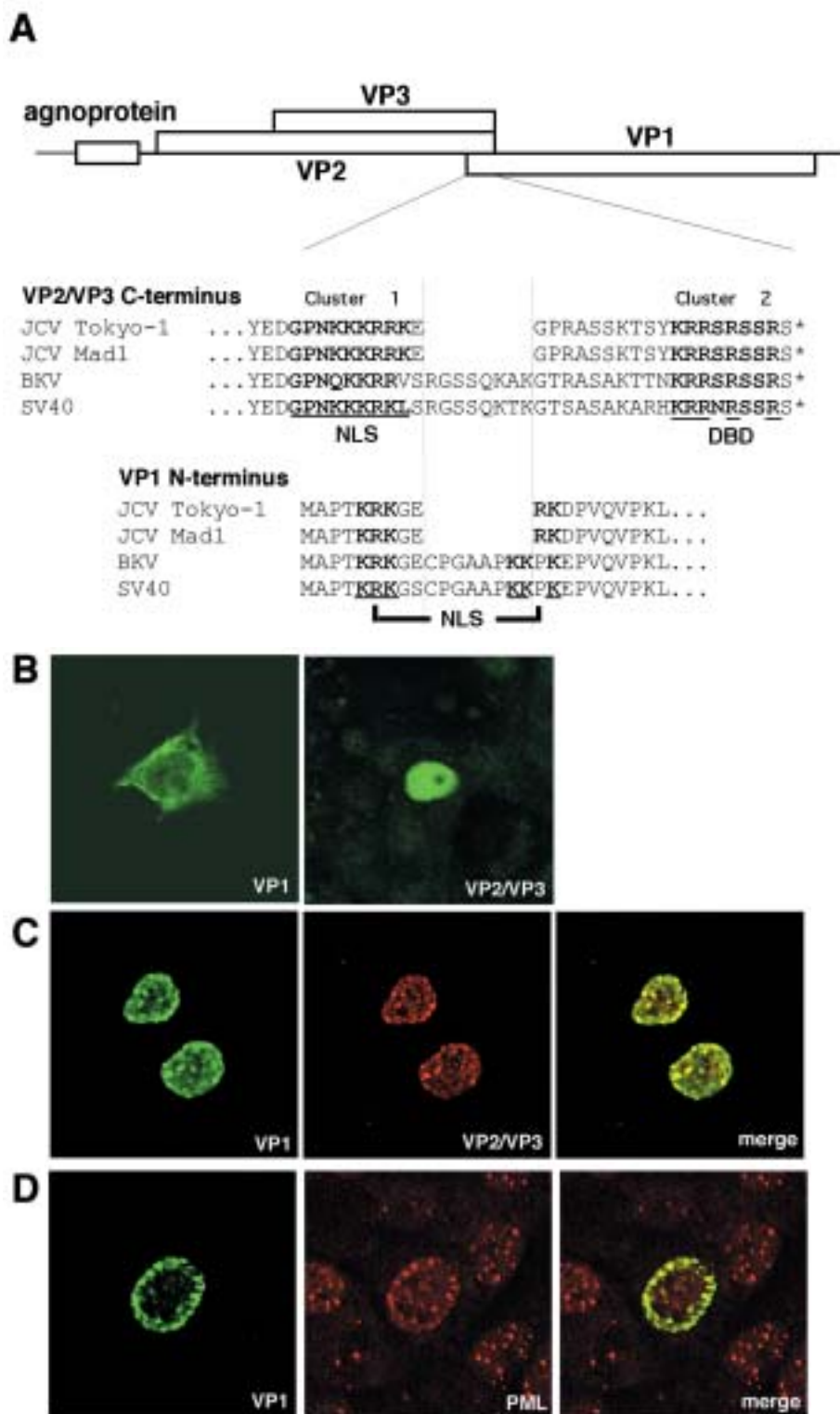


図 2 A) VP1 N 末端と、VP2/VP3 C 末端のアミノ酸配列：JCV には、VP1 N 末端と VP2/VP3 C 末端が重なった領域に、BKV や SV40 と比較して、8 残基の欠失が認められる。SV40 ではこの領域に、VP1 と VP2/VP3 の核移行シグナル (NLS) や DNA binding domain (DBD) が同定されている。JCV にも類似のアミノ酸配列があるが、介在配列に 8 残基の欠失がある。B) VP1 と VP2/VP3 の単独発現：VP1 と VP2/VP3 を COS-7 細胞で単独発現すると、VP1 は核と細胞質に分布し、VP2/VP3 は核にびまん性に分布する。C) VP1 と VP2/VP3 の共発現：3 種カプシド蛋白を共発現すると、VP1 と VP2/VP3 は核に局限して発現し、ドット状の集積を示す。D) VP1 の PML 核体への集積：カプシド蛋白は核膜内側に沿って、PML 核体に集積する。(NLS: 核移行シグナル, DBD: DNA binding domain)

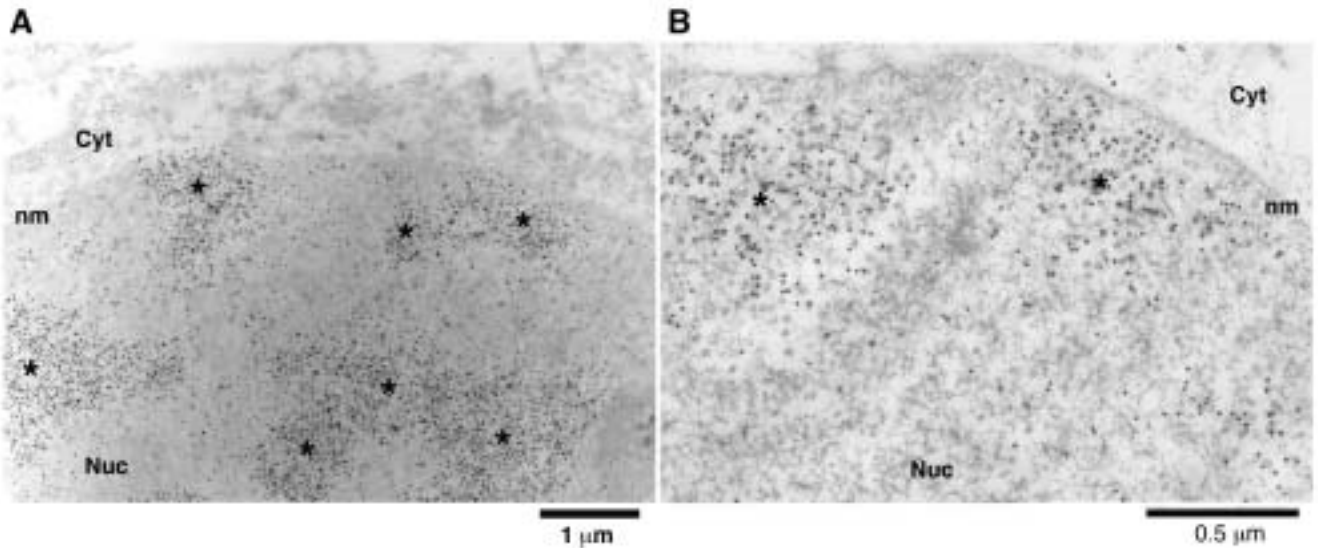


図3 JCV様粒子の電子顕微鏡像：A) COS-7細胞で agnoprotein, VP1, VP2/VP3を発現して、免疫電顕で解析した。金コロイドはVP1の発現を示す。COS-7細胞の核膜内側に沿って金コロイドのクラスター（*印）が認められた。B) 強拡大で、金コロイドのクラスター（*印）に一致して、ウイルス様粒子の形成を認めた。VP1蛋白の核内分布は共焦点顕微鏡のデータともよく一致しており、PML核体にカプシド蛋白が集積し、ここで効率よくウイルス粒子形成が行われていると考えられる。（Nuc:核, Cyt:細胞質, nm:核膜）

SV40 VP1のN末端領域に同定された双極性の核移行シグナル（nuclear localization signal: NLS）では、KRKとKK(P)Kの塩基性アミノ酸が8残基のスペーサー（GSCPGAAP）を挟んで配列している¹²⁾。核移行シグナルを認識するimportin α が2カ所の結合部位を持つことから⁶⁾、SV40 VP1は双極性核移行シグナルにより効率よく核に移行することが予想される（図2A）。しかしながら、JCV VP1では、スペーサー部分に6残基（CPGAAP）の欠失があるため、核移行シグナルが双極性の構造をとらない。また、塩基性アミノ酸KK(P)Kの代わりにRK配列をコードする。そこで、JCV VP1のN末端アミノ酸配列をSV40と同一の配列に変異させたところ、変異体は速やかに核に移行した。これより、JCVに特異的なN末端領域のアミノ酸配列が、JCV VP1の核移行効率を低下させていると考えられた^{24,26)}。

JCV VP2/VP3をCOS-7細胞で発現すると、核内にびまん性に分布した（図2B右）。JCV VP2/VP3のC末端領域には、塩基性アミノ酸に富んだ2種の配列、GPNKKRRK（cluster 1）とKRRSRSSRS（cluster 2）が存在する。cluster 1はSV40核移行シグナルと、cluster 2はSV40 DNA binding domainと類似または同一の配列を含む（図2A）。JCV VP2/VP3は、cluster 1およびcluster 2の何れか一方があれば効率よく核移行する²⁵⁾。一方、SV40 VP2/VP3の核移行シグナルは、JCV VP2/VP3のcluster 1とほぼ同一の配列であるにも関わらず、僅か1残基の変異でも核移行機能の喪失をきたすことが報告されている²⁰⁾。前述の様に、

JCVのVP2/VP3 C末端では、2種の塩基性アミノ酸のクラスター間に8残基のアミノ酸がSV40と比較して欠失しているため、この8残基のアミノ酸の有無が両ウイルスの塩基性アミノ酸の構造と機能を異なるものにする可能性が考えられる。

JCV VP1は、JCV VP2/VP3と共発現すると速やかに核移行し、ほぼ全ての陽性細胞で核に局限した発現が認められた（図2C）。変異体による解析から、VP1蛋白の効率よい核移行には、VP2またはVP3のどちらか一方のC末端配列が必要であることが明らかになった²⁵⁾。さらにVP1とVP2/VP3は、核内では核膜近傍のドット状の構造に集積を示し、この核内構造がPML核体であることも同定された（図2D）。カプシド蛋白の効率の良い核移行とPML核体における集積には、VP1とVP2/VP3が概ねある一定の比率で発現していることが重要である。VP1とVP2/VP3を各々別の発現ベクターに組み込みco-transfectionにて共発現しても、核に局限した発現や、PML核体での明瞭な集積像はなかなか得ることができない（未発表データ）。しかし、スプライス・サイトを含むpolycistronicなJCVゲノム断片を発現ベクターに組み込みCOS-7細胞に導入すると、発現ベクター由来のmRNAがスプライシングを受け、JCV M1およびM2 RNAに類似したmRNAが産生された²⁴⁾。これにより発現されたVP1、VP2/VP3は核に局限し、PML核体に明瞭な集積を示した。これより、カプシド蛋白の効率のよい核移行とPML核体での集積には、VP1とVP2/VP3が同一細胞内で選択的スプライシングにより発現

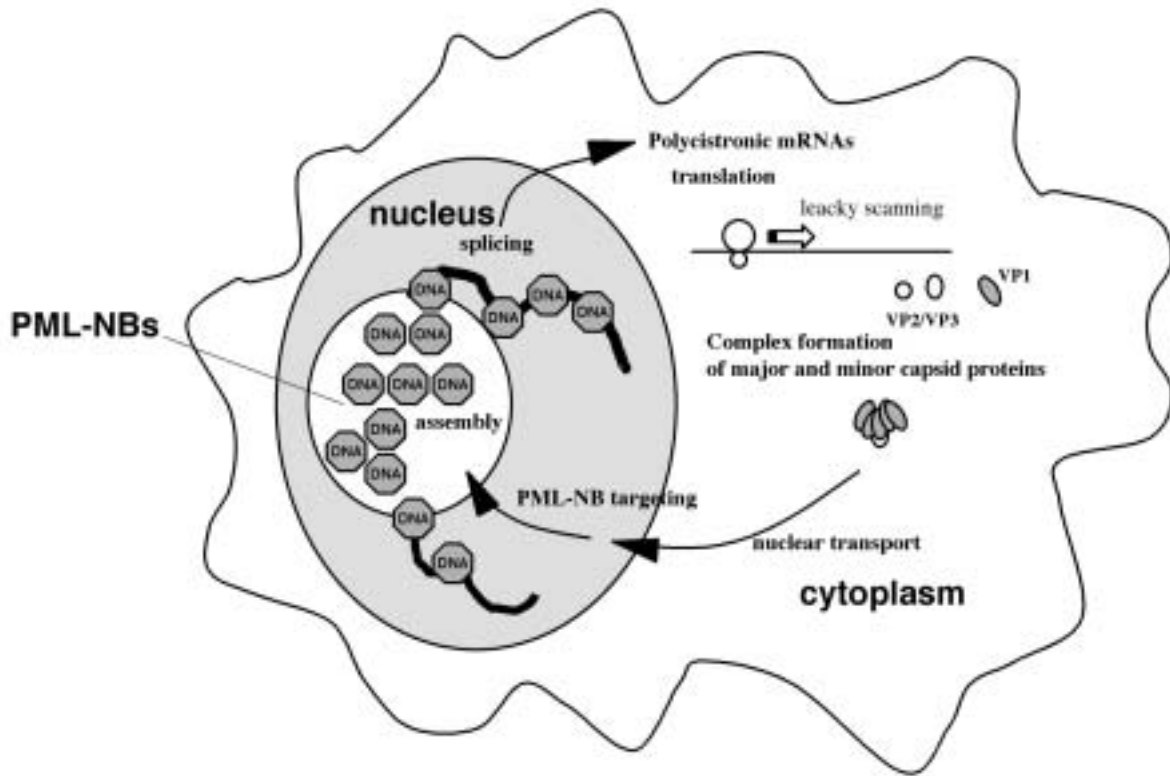


図4 JCVの粒子形成メカニズム (一部仮説)
(PML-NBs; promyelocytic leukemia nuclear bodies)

制御されることが重要と考えられる。また, agnoproteinはカプシド蛋白の核移行には必須ではないが, agnoproteinを共発現させると, カプシド蛋白の核移行やPML核体での集積効率が上がる²⁵⁾。これは, カプシド蛋白の核移行やPML核体での集積が単に核移行シグナルだけでなく, その発現比率に加えて, agnoproteinによっても制御されることを示している。

4. PML核体における粒子形成

～ウイルスDNA複製と粒子形成は連動しているか?～

JCVカプシド蛋白はPML核体に集積し, これを足場にウイルス粒子に会合する²⁵⁾。SV40やパピローマウイルスではPML核体でウイルスゲノムDNAが複製すると報告されていることから^{29, 31)}, JCVのウイルス粒子形成はゲノムDNA複製と連動して行われている可能性が高い。

JCVカプシド蛋白のPML核体への集積には, VP2/VP3 C末端のcluster 2配列が必須である。cluster 2を欠失したJCV VP2/VP3と共発現させると, JCV VP1と変異VP2/VP3は核全体にびまん性に分布し, PML核体での集積は見られなかった。また, cluster 1とcluster 2を含むC末端領域34残基を欠失したJCV VP2/VP3と共発現させると, JCV VP1は単独で発現した時と同様に, 核と細胞

質に分布した²⁵⁾。これより, カプシド蛋白の細胞質から核への移行と, 核内移行後のPML核体への集積は互いに独立したプロセスで, 前者には核移行シグナルが, 後者にはcluster 2配列がその機能を担っているとも考えられる。JCV VP2/VP3のcluster 2配列(KRRSRSSRS)は, SV40 DNA binding domain⁷⁾と同一の配列を含むことから, PML核体には複製したJCVゲノムDNAが存在し, それを標的としてカプシド蛋白が集積してくる可能性も推測される。しかし, VP2/VP3 cluster2配列は, JCVカプシド蛋白のPML核体への集積に必須であるが, 必ずしも充分ではない。JCV VP2/VP3を単独で発現させると, cluster2配列を有しているにも関わらず, 核内にびまん性に分布し, PML核体への集積を認めなかった(図2B右)。JCV VP1とVP2/VP3は共発現させた場合にのみPML核体への明瞭な集積を示すことから, VP2/VP3 cluster2のみならず, VP1にも何らかの機能シグナルが存在すると予測される。

PML核体に集積したカプシド蛋白は, これを足場に効率よくウイルス粒子に会合する²⁵⁾。JCV agnoprotein, VP1, VP2/VP3をCOS-7細胞で共発現させると, VP1の局在を示す金コロイド粒子が核膜内側に沿って集積し, これに一致して球状および管状のウイルス様粒子の形成が認められた(図3)。また, PML核体に集積したウイルス様粒子は,

核マトリックスに沿って核内に広がると考えられた。さらに、進行性多巣性白質脳症の脳組織を用いた2重染色法により、VP1とPML蛋白がoligodendrogliaの核膜内側に共局在するドット状のシグナルとして認められ、VP1がPML核体へ集積していることが示された。電子顕微鏡観察においても、oligodendroglia核膜内側に、ウイルスが集積を形成して分布することが確認された。一方、VP1蛋白をCOS-7細胞に単独発現させた場合、VP1は核と細胞質に分布しウイルス様粒子の形成は認められない。また、VP1とVP2/VP3をagnoprotein非存在下で発現させてもウイルス様粒子は形成されるが²²⁾、カプシド蛋白の過剰発現によりPML核体への限局した集積が困難になるばかりか、広範な核内領域に不整形形態のウイルス様粒子を認めるようになる(未発表データ)。メジャーカプシド蛋白VP1とマイナーカプシド蛋白VP2/VP3は、一定の蛋白分子密度の閾値を超えるとPML核体でなくとも会合すると考えられる。しかし、感染性のある子ウイルスの産生には、ウイルスゲノムDNA分子とカプシド蛋白分子の均衡が保たれていることが重要で、agnoproteinはこれを積極的に制御し、効率のよいウイルス増殖に寄与しているのかもしれない。

5. 最後に

メジャーカプシド蛋白とマイナーカプシド蛋白をコードするウイルス遺伝子は、転写後に核内で選択的スプライシングにより制御合成されたmRNAから、細胞質で翻訳される。その後、カプシド蛋白は核へ移行してPML核体でウイルス粒子へと会合する。カプシド蛋白の細胞質から核への移行と、PML核体への集積は、互いに独立したプロセスで、前者には核移行シグナルが、後者にはDNA binding domainがその役割を担うとも考えられる。PML核体への集積にDNA binding domainが機能するならば、ウイルスゲノム複製と粒子形成は連動して起こる可能性が高い(図4)。

JCV感染が誘導するoligodendrogliaの変性機序は未だ殆ど解明されていない。PML核体はDNA複製、転写、アポトーシスなど、重要な機能を担う核内構造であり、PML核体の構造破綻や機能喪失は、細胞変性や癌化を誘導することが知られている^{3, 11, 18)}。JCVはヒトoligodendrogliaの細胞変性と脳白質の脱髄を導くだけでなく、動物モデルでは脳腫瘍を誘発することも報告されており、ヒトでも腫瘍原性が有るか否か議論が続いている²³⁾。今後、JCV感染がもたらす細胞変性や癌化のメカニズムが、PML核体の機能から分子レベルで解明されることを期待したい。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病および遅発性ウイルス感染に関する調査研究」として行われました。

参考文献

- 1) Adamson AL. and Kenney S. : Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol.* 75, 2388-99, 2001.
- 2) Ahn JH. and Hayward GS. : The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol.* 71, 4599-613, 1997.
- 3) Borden KL. : Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol.* 22, 5259-69, 2002.
- 4) Chen XS, Stehle T. and 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, 3233-40, 1998.
- 5) Clever J. and Kasamatsu H. : Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology.* 181, 78-90, 1991.
- 6) Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G. and Kuriyan J. : Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell.* 94, 193-204, 1998.
- 7) Dean DA, Li PP, Lee LM. and Kasamatsu H. : Essential role of the Vp2 and Vp3 DNA-binding domain in simian virus 40 morphogenesis. *J Virol.* 69, 1115-21, 1995.
- 8) Everett RD. and Maul GG. : HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *Embo J.* 13, 5062-9, 1994.
- 9) Florin L, Sapp C, Streeck RE. and Sapp M. : Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol.* 76, 10009-14, 2002.
- 10) Florin L, Schafer F, Sotlar K, Streeck RE. and Sapp M. : Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein l2. *Virology.* 295, 97-107, 2002.
- 11) Hodges M, Tissot C, Howe K, Grimwade D. and Freemont PS. : Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet.* 63, 297-304, 1998.
- 12) Ishii N, Minami N, Chen EY, Medina AxL, Chico MM. and Kasamatsu H. : Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1. *J Virol.* 70, 1317-22, 1996.
- 13) Kozak M. : Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* 44, 283-92, 1986.
- 14) Kozak M. : Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res.* 29, 5226-32, 2001.
- 15) Kozak M. : Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* 299, 1-34, 2002.
- 16) Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL. and Harrison SC. : Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature.* 354, 278-84, 1991.
- 17) Matsuda M, Jona M, Yasui K. and Nagashima K. : Genetic characterization of JC virus Tokyo-1 strain, a

- variant oncogenic in rodents. *Virus Res.* 7, 159-68, 1987.
- 18) Maul GG, Negorev D, Bell P. and Ishov AM. : Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol.* 129, 278-87, 2000.
 - 19) Nagashima K, Yamaguchi K, Yasui K. and Ogiwara H. : Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neuropathology and virus isolation. Acta Pathol Jpn.* 31, 953-61, 1981.
 - 20) Nakanishi A, Shum D., Morioka H, Otsuka E. and Kasamatsu H. : Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *J Virol.* 76, 9368-77, 2002.
 - 21) Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ. and Dessel BH. : Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet.* 1, 1257-60, 1971.
 - 22) Shishido Y, Nukuzuma S, Mukaigawa J, Morikawa S, Yasui K. and Nagashima K. : Assembly of JC virus-like particles in COS7 cells. *J Med Virol.* 51, 265-72, 1997.
 - 23) 穴戸-原 由紀子 JC ウイルスはヒトに腫瘍を誘導するか? *医学のあゆみ* 214, 223, 2005.
 - 24) Shishido-Hara Y, Hara Y, Larsonx T, Yasui K, Nagashima K. and Stoner GL. : Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *J Virol.* 74, 1840-53, 2000.
 - 25) Shishido-Hara Y, Ichinose S, Higuchi K, Hara Y. and Yasui K. : Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. *J Virol.* 78, 9890-903, 2004.
 - 26) Shishido-Hara Y. and Nagashima K. : *Synthesis and Assembly of Polyomavirus Virions.* John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001.
 - 27) Silverman L. and Rubinstein LJ. : Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol (Berl).* 5, 215-24, 1965.
 - 28) Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y. and Harrison SC. : The structure of simian virus 40 refined at 3.1 A resolution. *Structure.* 4, 165-82, 1996.
 - 29) Swindle CS, Zou N, Van Tine BA, Shaw GM, Engler JA. and Chow LT. : Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol.* 73, 1001-9, 1999.
 - 30) Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, Arai K, Yoshida M. and Arai N. : SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol.* 8, 466-72, 1988.
 - 31) Tang Q, Bell P, Tegtmeyer P. and Maul GG. : Replication but not transcription of simian virus 40 DNA is dependent on nuclear domain 10. *J Virol.* 74, 9694-700, 2000.
 - 32) Zu Rhein GM. and Chou S-M. : Particles resembling Papova viruses in human cerebral demyelinating disease. *Science.* 11, 1477-9, 1965.

Development of intranuclear inclusions of human polyomavirus JC. - Capsid proteins are assembled into virions at the PML nuclear bodies -

Yukiko SHISHIDO-HARA

Department of Pathology, Kyorin University School of Medicine
6-20-2, Shinkawa, Mitaka, Tokyo, 181-8611, Japan
E-mail: yhara@kyorin-u.ac.jp

Human polyomavirus JC (JCV) is a causative agent for progressive multifocal leukoencephalopathy, a fatal demyelinating disorder. The viruses form intranuclear viral inclusions in infected oligodendrocytes. The outer capsid of JCV is thought to be composed of 360 molecules of major capsid protein VP1, and minor capsid proteins VP2 and VP3 in an appropriate ratio. However, the regulatory mechanisms of gene expression for the capsid proteins, their nuclear transport, and formation of viral inclusions are not well understood. We have recently clarified the following regarding the mechanism underlying JCV virion assembly; (i) major and minor capsid proteins are synthesized from messenger RNAs, the expression ratio of which is determined by alternative splicing, (ii) messenger RNAs for the major and minor capsid proteins are polycistronic, and their translation occurs downstream of the regulatory protein, agnoprotein, (iii) major and minor capsid proteins are translocated to the nucleus in a cooperative manner and accumulate at the dot-shaped intranuclear structures called promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs), (iv) efficient viral replication can occur at the PML-NBs, where capsid assembly is likely to be associated with viral DNA replication. PML-NBs are the sites for expression of important nuclear functions for the host cells. The finding that the target of JCV infection is the PML-NB may contribute greatly to our understanding of the mechanism underlying cellular degeneration, which occurs after the formation of intranuclear viral inclusions.

