

論文内容の要旨

Functional analysis of trichodysplasia spinulosa-associated
polyomavirus-encoded large T antigen

トリコディスプレジア・スピヌローザ関連ポリオーマウイルス T 抗原の機能解析

日本医科大学大学院医学研究科 皮膚粘膜病態学分野

大学院生 奈古 利恵

Japanese Journal of Infectious Diseases 掲載予定

【背景】 Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV または、ヒトポリオーマウイルス 8 型) は 2010 年に Trichodysplasia spinulosa (TS) より発見されたポリオーマウイルスである。TS は棘状毛孔性丘疹を特徴とするまれな皮膚疾患で、免疫不全者の顔面に好発し、組織では表皮肥厚と毛包漏斗部の拡張、毛包漏斗部内部で毛幹の消失、異常角化細胞や角質の充満が見られる。日本では健常者の 62% が既感染 (抗体陽性) であるが、TS の症例はいまだ報告されておらず、TSPyV の病原性については不明な点が多い。TSPyV は 5.2kbp の環状の二本鎖 DNA ウイルスであり、他のポリオーマウイルスと同様に早期タンパクである large T (LT)、middle T、small T 抗原と、ウイルス粒子の構造に関わる VP1、VP2、VP3 をコードしている。LT は SV40 などの他のポリオーマウイルスにおいては、ウイルスによる腫瘍化の責任分子であり、ウイルス複製にも関連する重要な分子である。本研究では TSPyV がコードする T 抗原の機能と病原性、ウイルス産生における役割を解明することを目的とした。

【方法】 TSPyV LT の DNA を発現ベクターにクローニングし、293 細胞に遺伝子導入することにより LT の cDNA 配列を得た。LT の cDNA を HeLa 細胞に GFP 融合タンパクとして遺伝子導入し、LT の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。また、昆虫細胞を用いて組換え LT タンパクを合成、精製し、キチナーゼ活性、ATPase 活性を市販キットで測定した。タンパク間の相互作用は免疫沈降法で、足場非依存的増殖能の評価は軟寒天培地の二層培養法で検討した。

【結果】 TSPyV の LT をコードする DNA から既報告の全長 (80kDa) cDNA と 2 つの splicing variant の cDNA を同定した。全長 LT cDNA を遺伝子導入した細胞では LT は核内に発現し、欠失変異体の解析により、DNA junction と origin binding domain の間に核移行シグナルを同定した。組換え LT タンパクは ATPase 活性を示し、ウイルス複製への関与が示唆された。さらに、LT はキチナーゼ様ドメインを持つが、組換え LT タンパクはキチナーゼ活性を示さなかった。免疫沈降法では、TSPyV LT は Rb1 と結合するが、P53 とはほとんど結合しなかった。NIH3T3 細胞に TSPyV LT を遺伝子導入すると軟寒天培地内でコロニーの形成が見られた。

【考察】 TSPyV LT の核内発現、核移行シグナルの保持、ATPase 活性、癌抑制因子である Rb1 との結合などは他のポリオーマウイルスの LT にも見られる特徴である。コロニー形成実験からは、哺乳類細胞における TSPyV LT の形質転換能が示され、これは TSPyV LT が TS における内毛根鞘の過形成と関連する可能性を示唆する。一方で TSPyV LT は P53 と結合しないことから、TSPyV LT における形質転換能には Rb1 が主に関与していると考えられる。メルケル細胞ポリオーマウイルスはヒトポリオーマウイルスの中で TSPyV と遺伝的に最も近いウイルスであるが、その LT も P53 と結合せず、Rb1 との結合が形質転換に重要と考えられている。TSPyV LT のキチナーゼ様ドメインは、分子系統樹では哺乳類のキチナーゼよりも細菌のキチナーゼに近い関係にあり、他の微生物から遺伝的に組み込まれた可能性がある。キチナーゼ活性を有さないものの TS の病態や TSPyV 感染に関連する

可能性があり、さらなる研究が望まれる。本研究では LT の機能の一部を明らかにしたが、TSPyV 感染と TS における過角化や角化細胞異形成との関連、TSPyV の生体内における病原性を解明するためには、感染実験や TSPyV 感染動物実験系が必要である。