

我々は、Retrovirus を用いた Signal Sequence Trap(SST-REX) 法により、マウス脳より TNFRSF に属する新規の受容体 TROY を単離し、その組織分布について検討した。TROY は、I型膜貫通蛋白で、TNFRSF に特徴的な複数の cysteine に富む領域を細胞外ドメインに持ち、細胞内には TRAF2 結合コンセンサス配列を持つが、Death Domain は持たない。293T 細胞における TROY の過剰発現は NFκB の転写を活性化したが、dominant negative TRAF2, TRAF5, TRAF6 の過剰発現は TROY による NFκB の転写活性化を著明に抑制した。このことは、TROY のシグナル伝達に TRAF family のアダプター分子が関与することを示している。成熟マウスでのノーザンブロットによる TROY mRNA の組織分布では、特に脳に強く発現し、その他心臓、肺、肝臓など多くの臓器に発現していた。胎生期では E11.5 より発現が見られ、成長に伴って増加し、特に皮膚で強発現していた。ISH により検討すると、胎児では皮膚表皮、結膜、肺胞上皮、神経上皮に mRNA 発現細胞が認められたが、新生児の皮膚では毛包に発現していた。脳では SVZ および大脳皮質・海馬などの神経細胞に mRNA シグナルが認められた。これらの分布パターンから、TROY は個体発生において神経系や上皮細胞など、多様な組織の発達に関与する可能性が示唆された。

P245 JCV の entry に関する研究

澤洋文 (北大医)

JCV はヒト以外の動物には感染せず、細胞レベルでもヒト神経系細胞でしか増殖しない。この狭い宿主域が細胞膜で規定されるか否かを調べるために、entry assay (semi-quantitative PCR 法) を確立し、ヒト、マウス、サル由来の細胞を含む 15 種類の細胞株に感染させた後、経時的に JCV genome を JCV entry assay、*in situ* hybridization 法により検索した。また FITC ラベルした JC virus-like particle (JC VLP) を吸着させて、各細胞株での JCV の細胞内での局在を検索し、抗 VP1 抗体、chlorpromazine、および DNase I の効果を調べた。これらの結果、JCV は多くの細胞に ubiquitous に発現している receptor と VP1 を介して細胞に吸着・侵入し、clathrin pathway を介して細胞内に移送され、virion の形で核に達していることが明らかとなった。

P246 シアル酸を含む糖鎖と JCV VP1 の結合

駒込理佳 (北大医)

JCV の細胞への接着はシアル酸が関与することが示唆されている。細胞への吸着の機構を明らかにするため JC virus-like particle (JC VLP) を作製し検索した。TLC および SDS 後の overlay assay により *in vitro* では JC VLP はシアル酸を複数個有する糖脂質とスルファチドに結合すること、また分鎖構造末端にシアル酸を有する糖蛋白質に結合することを明らかにした。また合成脂質による pre-incubation により JC VLP による細胞結合は抑制され、さらにシアリダーゼ処理、糖鎖合成阻害剤により JC VLP の細胞への吸着は抑制された。

P247 VP1 抗体カラムによる VP1 結合蛋白質の単離

山田美里 (北大医)

JC VLP を用いた overlay assay で JCV 許容細胞の膜分画には VP1 結合蛋白質が存在することが明らかとなった。そこで大腸菌で発現させた recombinant VP1 と細胞からの膜蛋白を反応させ、VP1 抗体カラムによるアフィニティ精製により VP1 結合蛋白質を単離した。分子量 100 kDa の band を SDS gel から抽出して、2 種類の

酵素により消化して TOF-MASS 解析を行なった。その結果、結合分子候補の一つとして integrin が単離された。

P248 JCV agnoprotein の機能解析とウイルスの増殖に対する影響の検討

岡田由紀 (北大医)

JCV における agnoprotein の機能は不明である。ウイルス感染細胞では agno は主に細胞質に局在するが、agno のアミノ酸配列中には NLS と NES に相同性のあるモチーフが存在する。agno と EGFP との融合蛋白や mutant を用いた実験から、上記のモチーフ配列はどちらも機能的であり、agno は核 - 細胞質間を移行するシャトル蛋白であることが示唆された。また *in vivo* phosphorylation assay により、agno は細胞内でリン酸化されていることが明らかとなった。agno を欠損した JCV は、野生型に比べてウイルス早期および後期蛋白の発現が遅延する。さらに agno が核に局在した場合 JCV の調節領域に結合して転写を活性化することが判明した。リン酸化による agno の局在の変化が JCV の転写を調節し、ウイルスの増殖に影響を与えることが推察された。

P249 *fosB* 遺伝子による細胞運命の制御と分子メカニズムの解析 (I)

作見邦彦、西岡智子、中別府雄作 (九大・生医研、CREST・JST)

海馬の神経細胞は虚血再還流障害に対し異なる感受性を示す。歯状回や CA3 の神経細胞は虚血後ほとんど脱落しないが、CA1 の神経細胞は遅発性の細胞死に陥る。前初期遺伝子 *fosB* の発現は、虚血再還流直後に歯状回や CA3 で顕著に増加する。一方、CA1 では細胞死の直前にその発現が増加する。我々はこれらの結果から *fosB* が神経細胞の運命の決定に関わると仮定し、培養細胞系で *fosB* 遺伝子産物の機能解析を進めている。休止期の Rat 3Y1 細胞で *fosB* を発現させると、一回の細胞分裂の後両極性に伸長した形態へと変化し、増殖を停止する。現在、この形態変化の過程で発現が変化する蛋白質の解析を進めている。

P250 *fosB* 遺伝子による細胞運命の制御と分子メカニズムの解析 (II)

田原一樹、富永洋平、中別府雄作 (九大・生医研、CREST・JST)

海馬の神経細胞は虚血再還流障害に対し異なる感受性を示す。歯状回や CA3 の神経細胞は虚血後ほとんど脱落しないが、CA1 の神経細胞は遅発性の細胞死に陥る。前初期遺伝子 *fosB* の発現は、虚血再還流直後に歯状回や CA3 で顕著に増加する。一方、CA1 では細胞死の直前にその発現が増加する。我々はこれらの結果から *fosB* が神経細胞の運命の決定に関わると仮定し、培養細胞系で *fosB* 遺伝子産物の機能解析を進めている。休止期の Rat1A 細胞で *fosB* 遺伝子産物の 1 つ、 Δ FosB を発現させると、一回の細胞分裂ののち遅発性の細胞死に陥ることを見出した。現在、その分子メカニズムの解析を進めている。

P251 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素 MTH1 の基質認識機構の解析

酒井康成^{1,2}、古市正人^{1,2}、三島正規³、白川昌宏³、岩井成憲⁴、中別府雄作^{1,2}

(1 九大・生医研、2 CREST・JST、3 奈良先端大、4 生物分子工研)

活性酸素により細胞内で生じる酸化ヌクレオチド (8-oxo-dGTP や 2-OH-dATP) は、DNA 複製や転写、翻