

中山醫學院醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Medicine Chung Shan Medical and  
Dental College

人類多瘤性病毒 JCV 主要及次要殼體蛋白  
於病毒顆粒組裝之研究

**Investigation of the major and minor structural  
proteins, VP1 and VP2, of human JC virus in  
virus particle assembly**



指導教授：李宣佑 教授

張德卿 教授

研究生：黃鈺宏

中華民國九十年六月

# 目 錄

頁次

誌謝	-----1
中文摘要	----- 2
英文摘要	----- 3
人類多瘤性病毒背景介紹	----- 4
本研究相關背景介紹	----- 9
材料與方法	----- 11
結果	----- 22
討論	----- 28
參考文獻	----- 32
圖表	----- 42



## 中文摘要

在人類多瘤性病毒 JCV 的病毒殼體內，包含有結構蛋白 VP1、VP2、VP3 和病毒的 DNA。目前仍不清楚次要結構蛋白 VP2 和 VP3 在病毒殼體扮演什麼角色。在我們的研究中，JC 病毒主要殼體蛋白 VP1 和次要殼體蛋白 VP2 基因已被選殖到酵母菌細胞，且 VP1 和 VP2 蛋白質同時在酵母菌細胞內表達後可自我組裝為類似殼體構造 (capsid-like particle)，可與人類 O 型紅血球細胞產生凝集。利用病毒顆粒特定沉降系數的特性，以 10-50% 蔗糖梯度離心可純化出此病毒顆粒。在電子顯微鏡觀察下，其外形與真實的病毒顆粒 virion 相似。在比較 EGTA 及 DTT 同時處理單獨 VP1 與 VP1VP2 所組成的殼體時，VP1 殼體會快速被瓦解為 capsomere，而 VP1VP2 的殼體則有抵抗被瓦解的能力，推測 VP2 可能參與穩定病毒殼體的功能。另外，以 pseudocapsid 攜帶外生性 DNA 到猴子腎臟細胞，也發現有 VP2 存在時，可提高殼體運送 DNA 的能力。未來我們可藉由此酵母菌的表達系統，進一步探討結構蛋白之間與結構蛋白和病毒 DNA 之間的關係。

## **Abstract**

The human polyomavirus, JC virus, contains three capsid proteins, VP1, VP2, VP3 and a viral minichromosome. Interactions of these three capsid proteins for virus assembly are not well understood. In the current study, the major capsid protein VP1 and minor capsid protein VP2 of JC virus, have been cloned and expressed in yeast cells. Yeast expression system was employed to co-express VP1 and VP2 proteins for facilitating understanding the function of minor structural protein VP2. When VP1 and VP2 gene were co-transformed into yeast cells, both proteins were expressed and detected by their own monospecific antibodies. VP1 and VP2 proteins co-expressed in yeast were able to cause hemagglutination. Self-assembled capsid-like particles were purified by 10-50% sucrose gradient centrifugation and morphology of the particles were observed by electron microscopy. The VP1 capsid could be disrupted into pentameric capsomeres in the presence of both EGTA and DTT but the VP1VP2 capsid was more resistant to the disruption at the same conditions. These findings indicate that VP2 may play a role in stabilizing capsid structure. Furthermore, the efficiency of DNA packaging and delivery into monkey kidney COS-7 cell of VP1VP2 capsid-like particles was increased. The yeast co-expression system will be further employed to investigate protein-protein and DNA-protein interactions during virus maturation.

# 1. JC 病毒簡介

多瘤性病毒( Polyoma virus )是屬於乳多瘤病毒科 ( Papovaviridae ) 的一屬，其大小約 45 nm，不含套膜 ( envelope )，外殼結構是二十面體 ( icosahedron ) 對稱結構，結構殼體( capsid )由七十二個次殼體( capsomere ) 組成，在結構蛋白內包裹了一環形( circular )雙股 DNA 基因組( genome )，約有 5000 對核 酸。多瘤性病毒又依不同宿主可分為 murine polyoma virus、SV40、JCV、BKV 及 BFDV 等(88)，其中 murine polyoma virus 的宿主動物是鼠類，SV40 的天然宿主動物是恆河猴，JCV 和 BKV 的宿主動物是人類，而 BFDV 的天然宿主動物是鳥類。

## 1.1.人類多瘤性病毒的發現

最初 JC 病毒是在 1965 年時，由 Silverman 等人用電子顯微鏡在進行性多病灶腦白質病( progressive multifocal leukoencephalopathy: PML ) 病人的腦部組織所觀察到(83)。到了 1971 年 Padgett 等人運用 JCV 可培養在人類胎兒腦細胞的技術，從進行性多病灶腦白質病病人的腦部組織中分離出 JC 病毒(78)。同年 BK 病毒也從一位 39 歲的腎臟移植病人尿液中分離出來(48)。1977 年 Padgett 等人廣泛篩選不同動物的檢體，均未測得 JC 病毒的抗體(76)，顯示 JC 病毒完全是屬於人類感染的病毒。

1980 年 Hogon 等人在腎臟移植病人的尿液中分離出 JC 及 BK 兩種病毒(59)。此外 Coleman 等人也在懷孕婦女尿液中分離出疑似 JC 的病毒(32)。由此推測 JCV 在原發性感染後，可能潛伏在泌尿道，當病人免疫力受到抑制時就活化起來。而此種因為免疫力與 JCV 活化之相關性，爾後在各種免疫力受壓抑之狀況下，如腎臟移植(1、49、59)、骨髓移植、孕婦(31、32、32、52)，癌症病人(60)及 AIDS 等病人得到証實。1986 年時 Grinnel(57)發現三位進行性多病灶腦白質病病人，其身上的 JC 病毒

除分佈在腦部外，也廣泛的分佈在該病人的脾臟、淋巴結、肺臟、肝臟、腎臟，進而推測 JCV 可透過血流散佈在不同器官，尤其是網狀淋巴系統。到了 1992 年 Tornatore 等人(87)在 89%進行性多病灶腦白質病病人身上，發現 JCV 存在於周邊淋巴球內，此說明 JCV 是廣泛性的分佈，且 Tornatore 等人也在 38% AIDS 而無 PML 之病人的周邊淋巴球內發現 JCV。之後淋巴球更進一步的被証實為 JCV 之特殊標的細胞(70)，且推測扮演著病毒持續性潛伏或其運輸至中樞神經系統之重要角色(38、39、73)。

## 1.2.人類多瘤性病毒 JC 病毒的基因組 ( Genome ) 分析

人類多瘤性病毒 JC 病毒的基因組(45)是一約有 5000 對左右核苷酸的雙股環形 DNA，分子量約為  $3 \times 10^6$  dalton，基因組包含了三個主要功能區：

(一).早期區 ( early region ) :在複製起始點近端，有二種基因產物，大腫瘤抗原 ( large T antigen ) 及小腫瘤抗原 ( small t antigen )，大 T 蛋白質是種非結構性的多功能磷酸化蛋白質，可調控早期基因的轉錄，所以可自我調控 ( autoregulation )。除此之外，T 蛋白質為 DNA 複製起始所需，也控制基因表現從早期轉換到晚期，同時，也能引起細胞的惡性轉形。小 t 蛋白質的功能則尚未清楚。

(二). 晚期區 ( late region ) :在複製起始點遠端，晚期基因順序與早期基因的方向相反，可決定 VP1，VP2，VP3 三種結構蛋白及 agnoprotein(45)。VP1 是最主要結構蛋白，分子量為 42 KDa，約占殼體蛋白質的 75%，VP1 蛋白與細胞接受體 ( cell receptor )，血球凝集反應及抗原反應 ( antigenic reaction ) 有很大的相關。VP2 及 VP3 是次要結構蛋白，約占殼體蛋白質的 10 % (91)。分子量分別為 37 及 26 KDa (17)。VP3 是 VP2 的 C 端的三分之二。

VP2及 VP3 的 C端核酸序列一部份會與 VP1的 N端核酸序列一部份重疊。

(三). 調控區( regulatory region ):是介於早期及晚期基因之間的未轉錄區，其含複製起始點，起動子 ( promoter )，及增強子 ( enhancer )。

### 1.3.多瘤性病毒 JC 病毒所引發的 PML 致病機轉

由血清學的調查知 JCV 和 BKV 的感染很頻繁，且多發生於兒童期，大部份的初次感染並無臨床徵狀或臨床徵狀不明顯。多瘤性病毒 JCV 是一種人類的伺機致病原，會造成少見的髓鞘脫失疾病，即進行性多病灶腦白質病 ( PML ) ( 93、 95 )。進行性多病灶腦白質病的特性是髓質病灶逐漸的變多與擴大，其病人腦部切片中可看到很多脫髓鞘病灶，從 1mm 到幾公分不等。早期損害是在小腦白質(white matter)及皮質(cortex)，晚期損害會擴大到大部份的皮質並侵入灰質(gray matter)，是屬一種中樞神經系統 ( central nervous system ) 退化的疾病 ( 94、 98 )。在大多數進行性多病灶腦白質病的病人其免疫功能受到抑制 ( 12 )，符合進行性多病灶腦白質病是 JCV 所造成的中樞神經系統伺機性感染 ( opportunistic infection ) 的說法。進行性多病灶腦白質病的病人主要有三種症狀:運動衰弱 ( motor weakness )、視障 ( visual disturbance ) 及心智改變 ( altered mental status )。由 Willoughby 等人 ( 98 ) 發現進行性多病灶腦白質病的病人會產生細胞免疫的缺陷及不完全的抗體免疫反應 ( 13 )。大部分病人在病程時，其特异性 IgG 效價沒有提高 ( 9 )，JCV 的原發性感染是在孩童期，但症狀不明，感染後會在尿液中分離到病毒，因病毒到達腎臟後可以潛伏於此，而由尿液中分泌出來 ( 2、 3 )。當 T 細胞功能缺失時，病毒會活化，可由偵測到血清中抗病毒抗體效價提高及尿液中病毒增加來證實。同時病毒活化也見於腎臟移植 ( 8、 63、 67 )、骨髓移植、孕婦 ( 52、 56、 58、 62 )、癌症病人 ( 69 ) 及 AIDS 等病人。進行性多病灶腦白質病在臨床上頗受注意，是因為患進



行性多病灶腦白質病的病人在出現症狀後的十八個月內就會死亡，有 80 % 在九個月內會死亡（98）。若是患 AIDS 又同時患進行性多病灶腦白質病，通常四個月就會死亡（83）。

PML 不管是 JCV 原發性感染或潛伏活化後感染，都可預測病毒是透過血流到達腦部，從腦部多病灶可支持此說法，另外從 PML 病人網狀淋巴系統中發現有病毒存在，更證實此可能性。

#### **1.4 多瘤性病毒 JC 病毒致癌性**

以前研究報告指出將 BKV、JCV 及 SV40 以皮下注射、靜脈注射、腦內及腹腔內等各種不同的方式送入倉鼠體內，經常會引發腫瘤。在細胞培養情況下，倉鼠腦細胞株可因 JCV 感染或因 JCV 的 DNA 轉感染而轉形（transformation）（46），而在這些被轉形的細胞，發現 JCV 基因體嵌入倉鼠基因，表現的 T 蛋白質會跟 p53 及 Rb 蛋白質結合（66）。研究顯示，將 JCV 送入倉鼠腦內，則具有高致癌性。（92、100）。約 83% 的新生倉鼠經過六個月的病毒培養會長出腦瘤，其中 95% 的腦瘤是小腦髓質母細胞瘤（100、101）。以不同方式培養 JCV，則會引發內臟肌瘤、週邊神經母細胞瘤及松果體細胞瘤等（100）。到目前為止 JCV 是唯一被證實在非人類靈長類可誘發腫瘤的多瘤性病毒，若將 JCV 接種到猴子的大腦、皮下、或腹腔內，打入 predisone 使成免疫缺陷狀態，則產生大腦腫瘤或神經膠母細胞瘤。雖然 JCV 可在非人類靈長類誘發腫瘤，在 PML 病人曾發現神經膠瘤（glioma），但尚未有直接證據證實 JCV 跟人類腫瘤有關（37）。

#### **1.5 多瘤性病毒在台灣感染的情形**

這幾年我們實驗室研究人類多瘤性病毒 JCV 在台灣感染的流行率（21、22、23、24、25、26、90、97），分別從免疫完全的健康人，短暫性免疫衰竭的孕婦及長期免疫抑制的自体免疫疾病病人，收集尿液檢體，以

聚合酶連鎖反應(PCR)及南方墨點法(Southern bolt)，偵測由尿液排放的病毒 DNA，並以 DNA 定序分析 DNA 調節區的基因型(genotype)，發現在孕婦及自体免疫疾病病人中存在四種 JCV strain，包括 CY，台灣一號(Taiwan-1)，台灣二號(Taiwan-2)和台灣三號(Taiwan-3)；及兩種 BKV strain，分別是台中一號(Taichung-1)和台中二號(Taichung-2) (21、22、23、24、25、26、97)。在這些不同的 JCV 及 BKV strain 中，發現它們的調節區分別產生了一些突變，而與原始種的 JC 及 BK 有些不同。台灣一號，台灣二號發生了 pentanucleotide- A(GGGAA)及/或 B(AAAGC)的缺失(deletion)；而台中一號有兩個核苷酸改變，台中二號有六個核苷酸改變的突變。我們實驗室的結果中發現有 13.3 % (10/75)的健康人，26 % (20/77)的孕婦及 37.5 % (18/48)的自体免疫疾病病人可偵測到尿液排放的 JCV DNA。而所有健康人都沒有偵測到 BKV DNA，但 3.9 % (3/77)的孕婦及 6.2 % (3/48)自体免疫疾病病人可偵測到 BKV DNA。此外，在所有尿液檢體中，24 % (48/200)是 JCV 陽性，只有 3% (6/200) BKV 陽性 (90)。而且 JCV 陽性的人只感染 TW-1(52%)及 CY(42%)兩種亞型，這些結果顯示：在台灣人類多瘤性病毒從尿液中排放的情形，免疫抑制的人高於健康人；同時，JCV 的流行率高於 BKV，此外，TW-1 及 CY 兩種 strain 是 JCV 在台灣族群中主要流行的亞型。

## 2. 本研究相關背景及結果簡介

在多瘤性病毒當中，對於鼠類及猿猴類的多瘤性病毒探討較為透徹，在病毒殼體的組裝過程中，已知有主要殼體蛋白 VP1 及次要殼體蛋白 VP2 和 VP3(4, 64, 65)參與，其分子量分別約為 42、37 及 26KDa(10, 68)。而主要結構蛋白 VP1，約佔總蛋白的 75%，而次要結構蛋白 VP2、VP3 約佔總蛋白的 10 %另外殼體中還含有一個病毒的 minichromosome ( 89)。這些病毒外殼蛋白是屬 20 面體對稱。早在 1965 年研究發現 murine polyoma virus 外殼蛋白是由 12 個 five-coordinated 及 60 個 six-coordinated capsomere 所組成 (61)，而由的 X-ray 繞射研究顯示，組成 murine polyoma virus 外殼蛋白的 72 個 capsomere 全都是 VP1 pentamer (5)。雖然鼠類及猿類多瘤性病毒殼體的三度空間 X-射線射圖已於 1982(79)及 1991(64)被解析出來，對於病毒組裝可提供更多的資訊，但對於 VP2 與 VP3 存在於病毒顆粒的確切至今位置仍無法被解析出來。Walker (96)與 Etchison (40)發現在以低濃度的 detergent 處理病毒顆粒，就可以移除次要結構蛋白 VP2 及 VP3，因此 VP2/VP3 與 VP1 的結合是屬於非共價性的鍵結。而 VP2 及 VP3 在病毒顆粒內則被認為可能是扮演著連接病毒 DNA 與病毒殼體間橋樑的角色。

目前對次要結構蛋白 VP2 和 VP3 在病毒的感染過程所扮演的角色，以及在病毒顆粒中的存在位置都尚未清晰，依據病毒結構蛋白之胺基酸序列獨特相似區域，可歸納出 VP2 與 VP3 可能含有功能性的 domain，進而對於未來病毒次要結構蛋白 VP2 及 VP3 的功能探討有更為具體化指標。在多瘤性病毒中，其 VP2 與 VP3 基因具有相同之 ORF，在蛋白質層面上 VP3 之胺基酸序列與 VP2 序列之 C 端三分之二完全相同。在 polyomavirus 進行溶解性感染的晚期時，結構蛋白 VP1、VP2 與 VP3 會被運送到細胞核中(41,72,17,18)，接下來這些結構蛋白會與病毒的 DNA 相結合，最後再組裝成一個完整的成熟病毒體(47,68,99)。在過去的研究中發現，只要 VP1

單獨存在的狀況下，VP1 蛋白就能夠自行組裝成 capsid-like particle。而三個結構蛋白 VP1、VP2 及 VP3 都能夠與 DNA 結合(30,35,84)，且在次要結構蛋白方面，VP2 與 VP3 都被證明能與主要結構蛋白 VP1 相結合 (6,14,28,36,44,51)，而在 SV40 次要結構蛋白 VP2 VP3 (34)與 polyomavirus 之 VP2(20)都發現具有 NLS (nuclear localization signal)的功能區。而這三個結構蛋白所形成的複合體可能會再進一步與病毒的 genome 結合。這些都對於病毒次要結構蛋白的特性化及分子層面提供了重要的訊息。

在已知成熟的病毒顆粒是在細胞核內組裝完成的，由於 VP2 NLS 牽涉到病毒結構蛋白是否能夠進入細胞核內。而 DNA binding affinity 牽涉到病毒結構蛋白 VP2 是否有參與包裹 DNA 的功能。對於 NLS 存在於 VP2 而使其能夠進入細胞核內進行病毒結構的組裝及 DNA binding domain 存在於 VP2 而使其能參與 viral DNA 的包裹。這些都是推測 VP2 在病毒顆粒可能扮演的角色，而 VP2 是否確實有以上的功能，目前都是不清楚的。過去並未有太多的實驗針對 JCV 的結構蛋白作功能性的探討，原因是在細胞培養系統中無法找到一個合適的細胞株來作為 JCV 感染對象，用來繁殖 JCV (42)，因而不易獲得大量的研究材料。因此，這方面的研究大多都是在同屬 polyomavirus 家族的 SV40 或是 murine polyomavirus 中進行。但是真正感染人體的多瘤性病毒是 JCV，所以我們實驗室一直都在從事 JCV 的生理研究。為了克服不易獲得大量 JCV 的研究材料。我們發現了人類多瘤性病毒 JCV 的主要蛋白 VP1 在酵母菌中表達時，會自我組裝成 capsid-like particles，因此我們進一步在酵母菌內同時表達 JCV 的主要蛋白 VP1 及次要蛋白 VP2，也發現 VP1 和 VP2 在酵母菌內會共同組裝成 capsid-like particles。所以，我們想用這個帶有 VP2 的病毒殼體，來討論 VP2 分子是否會影響到整個病毒顆粒的特性，這些對於我們在了解病毒子代進行溶解性感染時的組裝及生成上，將會提供相當重要的資訊。進而以此系統我們想進一步研究對於次要結構蛋白 VP2 和 VP3 在病毒的感染過程所扮演的角色以及在病毒顆粒內存在位置和病毒子代的成熟及組裝機制。

### 3. 材料及方法

#### 3.1 JC 病毒主要結構蛋白 VP1 之表達與殼體純化

##### 3.1.1 酵母菌系統的表達載體 pFX7-JCVP1 的構築與表達

台灣三號(Taiwan-3)(17、19) JCV 的 VP1 基因由東歐立陶宛的 Kestas Sasnauskas 教授利用 Spe I 及 XbaI 切位互補的特性將 VP1 選殖 (cloning) 入載體(pFX7), 命名為質體 pFX7-JCVP1, pFX7 載體含有 GAL10-PYK1 融合的啟動子(promoter), 這個新的 VP1 表達載體, 在被3%半乳糖(galactose) 誘發(induction)下, 會在酵母菌細胞表達出 VP1 的全長蛋白。

##### 3.1.2 JCV 類病毒顆粒的純化

將表達 JCV VP1 蛋白的酵母菌細胞於 YPD 培養液中以 3%半乳糖 (galactose)誘發蛋白質表達 24 小時後, 以 1,000 x g, 室溫離心 5 分鐘將菌體沉澱下來。然後用無菌的磷酸鹽緩衝液 ( PBS )清洗菌體, 離心, 移去上清液後, 以 suspension buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 4.5 u/μl lyticase )懸浮菌體, 經過 4 下 30 分鐘的反應後, 接著利用法國壓力 (FRENCH Pressure cells and Press) (Spectronic Unicam)將菌體粉碎, 將已懸浮菌體置入法國壓力粉碎儀中, 接著在 1,000 psi 的壓力下反應 3 分鐘, 之後以每秒 1 滴的流速回收破碎的菌體, 同樣的步驟重複二次。接著在粉碎菌體中加入 DNase I (200 u/ml)及蛋白 抑制劑 (aprotinin, N-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, and phenylmethylsulfonyl fluoride; final concentration of each, 10 ug/ml), 在室溫反應 30 分鐘, 接著將粉碎之後的菌液以 14,000 rpm, 4<sup>0</sup>C, 離心 10 分鐘。所得到的含有可溶性的 VP1 蛋白的上清液, 便可用於進行病毒顆粒的純化

為了要純化 capsid-like particles, 我們利用 10-50 % 蔗糖濃度梯度離心純化, 以得到高純度的病毒結構蛋白質。取兩管 10 ml 的超高速離心管 (Beckman, USA), 由底部而上加入經過 gradient mixer (Hofer, USA) 混合的 50%至 10%的蔗糖溶液各 5 ml, 之後我們將上清液置於最上層, 然後以 Beckman L8-70 M 超高速離心機, SW 41 Ti rotor, 35,000 rpm轉速, 於

4<sup>0</sup>C 下離心 5 小時，之後以蠕動 pump 每 12 滴(200 μ l)為一個 fraction 收集在 1.5 ml 離心管，分別以 SDS-PAGE 及 Western blot 分析蛋白質，並測定血液凝集活性(hemagglutination)。

### 3.1.3 蛋白質電泳及 Western blot 分析

以 10-50 % 蔗糖濃度梯度離心純化出來的 VP1 fraction，利用 12.5 % 的 SDS-PAGE 加以分析，再用 Coomassie blue solution( 50% methanol, 10% acetic acid , 0.1% Coomassie blue R-250 [Sigma #B-0149] ) 染色之後，再以 25% 甲醇/ 7% 冰醋酸脫色後觀察。如果要進一步進行 Western blot 分析的話，將含有蛋白質的 SDS-PAGE gel 以 semi-dry system (Atto. Tokyo, Japan), 將內含的蛋白質轉漬到 nitrocellulose membrane (MSI, Westboro, MA) 之上。接下來將此 membrane 利用含 5 % 脫脂奶粉的 TBS (Tris buffer saline) (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) 加以 blocking, 之後再加入以 1:2000 稀釋的抗 JCV-VP1 的兔子抗血清(19)，室溫下搖動 30 分鐘，再用 TBS-0.01% Tween 20 洗三次，每次 5 分鐘。之後加入 biotinylated anti-rabbit IgG made in goat ( Vectastain ABC kit , USA) ，於室溫反應 30 分鐘，再用 TBS-0.01% Tween-20 洗三次，每次五分鐘；然後加入 ABC reagent ( avidin DH , biotinylated horseradish peroxidase H ) 30 分鐘，再加 TBS-0.01% Tween-20 洗三次，每次五分鐘。最後加 diaminobenzidine solution ( DAB , 0.01% final concentration) ，及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( 0.012 % final concentration ) 呈色偵測 VP1 蛋白。

### 3.1.4 血液凝集試驗 ( Hemagglutination Assay , HA )

先在 96 well 的 microtiter plate，加入 95 μ l PBS 到第一個 well，第二到第十二個 well 則加 50 μ l PBS，再各別取出 5 μ l 由 10-50 % 蔗糖梯度離心所收集的 fractions 樣品置入第一個 well 並作 2 倍的連續稀釋，接著將人類的 O 型血球以磷酸鹽緩衝液 ( PBS ) 洗三次，製成 0.5 % 紅血球懸浮

液，接著在每一 well 中加入 50  $\mu$ l 的 0.5 % 紅血球懸浮液，混合均勻，靜置在室溫 1 小時，再觀察血液凝集的情形。以呈現血液凝集的最後稀釋倍數，定為血液凝集活性。

### 3.1.5 電子顯微鏡觀察 JCV VP1 capsid 外形

病毒顆粒 capsid 陰染的方法是修飾 Garcea(72)的方法。將利用 10-50 % 蔗糖濃度梯度離心而得的 capsid-like particles 固定在已塗佈有 formvar 的銅網上，並利用 2 % 的 uranyl acetate 進行負染。處理好的檢體利用 Joel 2000-CX 電子顯微鏡，於 80 KV 下觀察。

## 3.2 JC 病毒次要結構蛋白 VP2 之表達

### 3.2.1 酵母菌表達載體(pFX7)的取得

本實驗所使用的酵母菌表達載體(pFX7)，是由東歐立陶宛的教授 Kestas Sasnauskas，利用 Spe I 與 Xba I 切位互補的特性，將台灣三號(Taiwan-3) JCV VP1 的 gene 選殖(cloning)入 pFX7 為材料而來。但由於 Spe I 與 Xba I 互補所產生的切位，無法被其它限制酶切割，因此為了順利取酵母菌表達載體 pFX7，本實驗室先前以 pFX7-JCVP1 為模板，並利用在 JCV VP1 的兩端所設計含有 Spe I 切位的 primer (PFX7SSPE 及 PFX7ASSPE)，利用 PCR 反方向增幅，再以限制酶 Spe I digestion 及 self-ligation 並轉殖入 *E.coli*。再由轉殖成功的 *E.coli* 中以 miniprep kit (QIAGEN) 萃取轉殖入 *E.coli* 的載體 DNA (pFX7)，並以 restriction mapping 確認其大小無誤，最後得到酵母菌表達載體 pFX7。同時先前的研究中也完成 pFX7 的核 酸序列分析。pFX7 載體含有 GAL10-PYK1 融合的啟動子(promoter)，可被半乳糖(galactose)誘發(induction)，在酵母菌細胞表達外來蛋白。並且，這個載體內含有細菌的質體 pUC19 全部 DNA 序列，因此質體上含有抗 Ampicillin 的基因，可供在 *E.coli* 複製時，當作選擇性標記。pFX7 還包括有一段 FDH1 基因，是來自

*Candida maltosa*的基因，它是一formaldehyde-resistance的基因，可供在酵母菌細胞複製時，當作選擇性標記。另外，還有PGK1基因，是transcription terminator sequence以及2 m基因為yeast 2-micron DNA的一部分，含有複製起始點(replication origin)。整個載體長約7500 bps。

### 3.2.2 JCV VP2 蛋白基因的構築

利用已知的JCV Taiwan-3 的VP2 DNA 序列，在其N端及C端分別合成含有 Spe I 限制 切位的引子 (primer)，JCV2 sense primer (JCV2ATASspe) : 5'-CACTT GACTA GTATA ATGGG TGCCG CACTT GCACT TTTG -3' 及 JCV2 antisense primer (JCV2ASspe) : 5'-CACTT GACTA GTTTA ACTTC TAGAA CTTCT ACTCCT -3'。以JCV Taiwan-3 genome 當模板，利用PCR的方式放大帶有 Spe I 限制 切位的JCV VP2 DNA 片段。接著以 Spe I限制 ，將切位切開。再將此VP2 DNA 片段接進同樣以 Spe I處理過的酵母菌表達載體 pFX7 中，得到了 pFX7-JCVP2。

### 3.2.3 質體轉殖(transformation)入酵母菌 *S.cerevisiae*-INVSC1

質體 pFX7-JCVP2 轉殖入酵母菌的方法(54)，乃依據 Gietz 等人的質體轉殖法。酵母菌(INVSC1)在以 lithium acetate (LiAc) 處理後，藉由100沸水處理的單股鯡魚精子 DNA (herring sperm DNA)，可攜帶質體直接轉殖進入酵母菌菌體內(82)。詳細方法如下：

a.Competent cells 的製備：

取 50  $\mu$ l 已飽和之酵母菌(INVSC1)培養液接種入 50ml YPD 液體培養基(1% yeast extract, 2% peptone 及 2% glucose)，於 30<sup>o</sup>C，200 r.p.m轉速振盪培養至隔夜。接著取 30 ml 菌液種到 300ml YPD(1:10)，繼續培養直到 OD<sub>600</sub> 達 0.4-0.6，約 2-3 小時，此時酵母菌生長速率正好達 mid-log phase。



之後，於室溫以 1000 ×g 離心 5 分鐘，倒去上清液，以 20 ml TE/LiAc [新鮮配製: 8ml ddH<sub>2</sub>O + 1 ml 10×LiAc(1M LiAc) + 1 ml 10×TE buffer(0.1M Tris-HCl, 10 mM EDTA pH7.5)]清洗菌體，再以 1000 ×g 離心 5 分鐘，除去上清液後，以 3 ml TE/LiAc 懸浮菌體，室溫搖晃 30 分鐘後，即為 yeast competent cell

#### b.質體 DNA 的轉殖(transformation):

在 1.5 ml 離心管內放入 200 μl yeast competent cell，同加入 50 μl (5 μg)的質體 DNA(pFX7JCVP2)及 10 μl (5 μg)單股鯡魚精子 DNA (已經過 100 °C 煮沸處理 20 分鐘，隨即冰浴)，然後加入 600 μl 的 PEG/LiAc [新鮮配製: 8ml 50% PEG4,000 + 1 ml 10×LiAc (1M LiAc) + 1 ml 10×TE buffer (0.1M Tris-HCl, 10 mM EDTA pH7.5)]。混合均勻後，置於 30 °C，200 r.p.m 振盪培養 30 分鐘，接著以 42 °C 水浴熱休克 15 分鐘，隨即再冰浴 5 分鐘後，以 14,000 r.p.m 離心 15 秒鐘，除去上清液，以 1 ml YPD 清洗菌體，再以 1 ml YPD 懸浮菌體，於 30 °C 振盪培養 10-15 小時，使菌體先活躍起來，再塗 200 ul 於含有 formaldehyde (30 μl/100 ml) 的 YPD 平板培養基上，置於 30 °C 培養箱直到菌落生長。

#### 3.2.4 JCV 次結構蛋白 VP2 在酵母菌細胞的表達

將轉殖成功的含質體 DNA 的酵母菌( pFX7-JCVP2/ INVSC1 )，挑選單一菌落，接種到含有 formaldehyde (30 ul/100 ml) 的 YPD 液體培養基中，於 30 °C 振盪培養 (200 rpm) 24 小時，再取 1 ml 接種到 100 ml 含有 30 μl formaldehyde/100 ml YPD 選擇性液體培養基中，於 30 °C，200 r.p.m 振盪培養 12 小時，然後加入 20% galactose(最終濃度 3%)去誘發菌體表達 JCV VP2 蛋白質，持續培養於 30 °C，24 小時後。將誘發培養 24 小時的菌液，取 1.5 ml 菌液，以 12,000 rpm 離心沈澱菌體，倒去上清液後，溶於 200 μl TBS，再以超音波震盪粉碎菌體，接著取 15 μl 破碎的菌體以 12.5%

SDS-PAGE 分析。再將含有蛋白質的 SDS-PAGE gel 以 semi-dry system (Atto, Tokyo, Japan), 將內含的蛋白質轉漬到 nitrocellulose membrane (MSI, Westboro, MA) 之上。以 1:1000 稀釋的抗 GST-JCV VP2 的兔子抗血清 (以 *E.coli* 表達的 GST 與 JCV VP2 融合蛋白所誘發的抗體), 來偵測 VP2 蛋白。Western blot 的方法同 2.1.3

### **3.3 JCV 結構蛋白 VP1 與 VP2 同時在酵母菌表達**

#### **3.3.1 pFX7JCV2 轉殖(transformation)入已帶有 pFX7JCV1 基因的酵母菌 *S.cerevisiae*-INVSC1**

將已帶有 pFX7JCV1 基因的酵母菌(INVSC1), 以 lithium acetate (LiAc) 處理後, 製成 Competent cells。再藉由 100 沸水處理的單股鯡魚精子 DNA (herring sperm DNA), 攜帶質體 pFX7JCV2 直接轉殖進入酵母菌菌體內。酵母菌質體轉殖法同 3.2.3。

#### **3.3.2 利用 PCR 偵測酵母菌 (*S.cerevisiae*-INVSC1) 內是否同時存在 pFX7JCV1 與 pFX7JCV2 兩種質體**

##### **a. 酵母菌中抽取質體 DNA**

抽取轉殖至酵母菌後的質體 DNA, 是使用 glass beads and phenol-chloroform extraction 的方法。挑選單一菌落的轉殖酵母菌, 接種到含有 formaldehyde (30 ul/100  $\mu$ l) 的 YPD 液體培養基中, 於 30<sup>0</sup>C 振盪培養 (200 rpm) 24 小時。然後取 1.5 ml 菌液置入微量離心管中, 離心 (12,000 rpm) 1 分鐘, 倒掉上清液後, 加入 30 ul 懸浮緩衝液 (suspension buffer) (0.1 M Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 4.5 unit/ $\mu$ l lyticase (過濾使之無菌)),

懸浮菌體後，置於 37 °C 振盪培養 30 分鐘，加入 170  $\mu$ l lysis buffer (0.1 M Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100, 過濾使之無菌)，再加入 0.3 g 玻璃珠 (glass beads)(Sigma, USA)，然後加入 200  $\mu$ l phenol / chloroform / iso-amyl alcohol (25:24:1)，劇烈混合 5 分鐘後，以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上層液到新的 1.5 ml 離心管，加入 8  $\mu$ l 3M sodium acetate 及 500  $\mu$ l 冰溫的絕對酒精，置於 -70 °C，1 小時，使質體沉澱，再離心 (14,000 rpm) 10 分鐘，倒掉上清液，用 speed-Vac 使沉澱物乾燥，最後以 20  $\mu$ l 已滅菌的二次水回溶。

#### b. 聚合酶連鎖反應 (PCR) 偵測由酵母菌(INVSC1)中抽取的質體 DNA

取 1  $\mu$ l 由酵母菌抽取的質體 DNA 當模板(template)，加入 5  $\mu$ l 10 倍濃度的 pro-Taq 緩衝液，4  $\mu$ l 的 dNTP，以及分別為偵測 VP1 基因的引子 (JCV1S1G, JCV1AS1G) 和偵測 VP2 基因的引子 (JCV2ATASspe, JCV2ASspe) 各 1  $\mu$ l，0.5  $\mu$ l Taq 聚合酶(2U/ $\mu$ l) (pro-Taq polymerase) (Promega, USA) 及 35.5  $\mu$ l 滅過菌的二次水，混合均勻後，進行基因的放大，於 95 °C, 2 分鐘之後，95 °C, 45 秒, denature ; 55 °C, 1 分鐘, annealing ; 72 °C, 1 分鐘, extension。共 30 個循環，然後以 1% 的瓊脂膠(agarose gel) 進行電泳分析。

#### 3.3.3 以西方墨點法 (Western blot) 來確認 JCV VP1 和 JCV VP2 蛋白質在酵母菌細胞表達

將轉殖成功同時帶有 pFX7-JCVP1 和 pFX7-JCVP2 質體 DNA 的酵母菌，以 3% galactose 誘發菌體表達 JCV 結構蛋白。利用 12.5% SDS-PAGE 分析。並以 semi-dry system (Atto. Tokyo, Japan)，將內含的蛋白質轉漬到 nitrocellulose membrane (MSI, Westboro, MA) 之上。接下來將此 membrane 利用含 5% 脫脂奶粉的 Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) 加以 blocking，之後再加入以 1:2,000 稀釋的抗 JCV-VP1 的兔子抗血清(19)

和以 1:1000 稀釋的抗 GST-JCV-VP2 的兔子抗血清，於室溫反應 30 分鐘，再用 TBS-0.01% Tween-20 洗三次，每次五分鐘，之後再加入用 1:5000 稀釋的 Anti-rabbit horseradish peroxidase (Amersham)，於室溫反應 1 小時，再以 TBS-0.01% Tween-20 十五分鐘洗二次。再配合 ECL kit (Amersham) 將 solution I 和 solution II 各 250  $\mu$ l 混合均勻後與以 TBS-0.01% Tween-20 清洗過的 nitrocellulose membrane 反應 5 分鐘。再以壓片的方式來偵測 JCV VP1 與 JCV VP2 蛋白表達情況。

### 3.3.4 血液凝集試驗 ( Hemagglutination Assay , HA )

收集已表達 JCV VP1 和 JCV VP2 蛋白質的菌液，去除上清液後，加入 1 ml suspension buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 4.5 u/ $\mu$ l lyticase (無菌過濾)懸浮菌體，於室溫均勻上下混合 30 分鐘，再加入 0.3 g 的玻璃珠，劇烈振盪 1 分鐘。然後加入 3 ul (1 U /1  $\mu$ l) DNase I (Promega, USA) , 2.5  $\mu$ l 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ l 1 mM PMSF, 於室溫反應 30 分鐘，接著以超音波振盪打斷 DNA，離心 14,000 rpm 10 分鐘，將上清液換到乾淨離心管，即可用於血液凝集試驗。血液凝集試驗的方法同 2.1.3

### 3.3.5 JC 病毒殼體蛋白純化

將帶有 pFX7-JCVP 和 pFX7-JCVP2 二個質體 DNA 的酵母菌同樣以 3% galactose 於 30 °C, 24 小時誘發 JCV 結構蛋白質(VP1 和 VP2)在酵母菌表現。同樣以利用法國壓力(French pressure)來破細胞。最後離心 ( 14,000 rpm), 將上清液收集於乾淨試管，進行 10-50 % 蔗糖濃度梯度離心，以得到高純度的病毒結構蛋白質 (方法同 2.1.2)。接著同樣收集 fraction，分別以 SDS-PAGE 分析蛋白質及 Western blot(利用抗 JCV-VP1 的兔子抗血清 (19)和 1:2000 稀釋的抗 GST-JCV-VP2 的兔子抗血清配合 ECL kit 壓片的方式來確認)，並測定每個 fraction 的血液凝集(hemagglutination)活性。並以電子顯微鏡觀察利用 10-50 % 蔗糖濃度梯度離心所純化得到的病毒結

構蛋白外形

### 3.4 鑑定 JCV VP2 是否存於病毒殼體之中

由單獨表達 VP1 或由同時表達 VP1 和 VP2 的酵母菌所純化出的病毒殼體，各取 15  $\mu$ l (30  $\mu$ g) 加 5  $\mu$ l 4x sample buffer (250  $\mu$ l 20% SDS, 250  $\mu$ l glycerol/0.2% BPB, 125  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanol)，沸水煮沸 5 分鐘，以 12.5% SDS-PAGE 分析，並以 Coomassie blue 染色後觀察。或者以 semi-dry system (Atto. Tokyo, Japan)，將 SDS-PAGE 上的蛋白質轉漬到 nitrocellulose membrane (MSI, Westboro, MA) 之上，之後分別以 1:2000 稀釋的抗 JCV-VP1 的兔子抗血清(19)偵測 VP1 或以 1:1000 稀釋的抗 GST-JCV-VP2 的兔子抗血清偵測 VP2 或同時以抗 JCV-VP1 和抗 GST-JCV-VP2 的兔子抗血清，配合 ECL kit (Amersham) 以壓片的方式來偵測 JCV VP1 或 JCV VP2 蛋白。方法同 3.3.3

### 3.5 病毒殼體的比較

#### **3.5.1 金屬螯合劑(EGTA)及還原劑(DTT)對 capsid 穩定度的影響**

20  $\mu$ g (50  $\mu$ l) 由 10-50% 蔗糖濃度梯度離心純化出的 VP1 capsid 與 V1V2 capsid，同時加入 10 mM EGTA(ethyleneglycol-bis-N, N'-tetraacetic acid)(Promega, USA) 及 3 mM DTT (dithiothreitol) (Promega, USA) 混合均勻，置於室溫，分別於室溫 1 小時，2 小時，3 小時，4 小時，5 小時之後測定血液凝集活性(HA)。

#### **3.5.2 將 ODN 利用 pseudocapsid particles 送入細胞株**

#### a. Antisense oligodeoxynucleotide(ODN)合成與螢光標定

由生工合成 5'-FITC- T<sup>^</sup>C<sup>^</sup>T<sup>^</sup> GTT<sup>^</sup> TAA<sup>^</sup> AAC<sup>^</sup>TTT<sup>^</sup> <sup>^</sup>ATC <sup>^</sup>C<sup>^</sup><sup>^</sup>A<sup>^</sup>T<sup>^</sup>-3'，共 21 個 mer 的部分硫化取代（<sup>^</sup>為硫化取代位置）ODN。

#### b. 利用滲透壓震盪法在 in vitro 環境中包裝 ODN

將外源性 DNA 包裝進 pseudocapsid particles 的方法，已由 Forstova 等人(43)提出 (1995) 簡述如下，分別將 60 ug 的 VP1 所組成 pseudocapsid particles 和 VP1、VP2 組成的 pseudocapsid particles 各與 4 ug 的 ODN (oligodeoxynucleotides) 混合於 100 ul 的 Tris buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.01 mM CaCl<sub>2</sub>) 環境下，將此混合物置於 37 °C 反應 30 分鐘。接下來加入 350 ul 的蒸餾水，並在 37 °C 下反應 30 分鐘，以進行滲透壓震盪反應。之後再加入 10 倍的 Tris buffer 置於室溫 20 分鐘，讓反應環境回到等張，即包裝完成。

#### c. 將含有 ODN 之 pseudocapsid particles 感染猴子腎臟細胞(COS-7)

將猴子腎臟細胞(COS-7)培養於置有一蓋玻片的 35-mm 培養皿中，以 Dulbecco's modified Eagle's 培養液(DMEM)加上 10% 胎牛血清，進行培養。實驗進行時，先以 PBS wash 細胞，之後以含有 ODN 的 pseudocapsid particles 混合物加在細胞的表面，並將培養皿置於 4 °C，每 10 分鐘搖動一次進行感染 30 分鐘。接著將細胞表面之含有 ODN 的 pseudocapsid particles 混合物以 PBS 洗掉，並將培養皿轉至於含 5 % CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培養箱中，繼續進行感染 1 小時，感染完成後，加入(DMEM)細胞培養液，繼續在含有 5 % CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培養箱中進行培養。實驗中以培養皿轉至於 37 °C 培養箱為感染之起始點，4 小時後利用螢光顯微鏡觀察細胞被感染情況。

### 3.5.3 利用偽病毒殼體(pseudocapsid particles)將外源性 DNA 送入 COS-7

同樣利用 Forstova 等人(43)提出的方法，將外源性 DNA 包裝進 pseudocapsid particles。將 60 ug 的 pseudocapsid 與 3 ug 的 pEGFP-C1 質體 DNA (Clontech, Palo Alto, CA)混合於 100 ul 的 TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.01 mM CaCl<sub>2</sub>) 環境下，將此混合物置於 37 °C 反應 10 分鐘。接下來以加入 350 ul 蒸餾水，並在 37 °C 下反應 30 分鐘，以進行滲透

壓震盪反應。之後再加入 3 單位的 DNase I (Promega, Madison, WI), 於 37 反應 20 分鐘, 除去未被包裝的 DNA 分子。然後, 準備以此混合物去感染猴子腎臟細胞(COS-7)。為了要進行利用 pseudocapsid 將外源性 DNA 送入猴子腎臟細胞(COS-7)的實驗, 我們先將細胞培養於置有一蓋玻片的 35-mm 培養皿中, 以 Dulbecco's modified Eagle's 培養液(DMEM)加上 10% 胎牛血清, 進行培養。實驗進行時, 先以 PBS 對細胞進行 wash, 之後以包裝有 pEGFP-C1 質體的 pseudocapsids 置於細胞的表面, 每 15 分鐘搖動一次進行感染 1 小時。感染完成後, 加入 DMEM 培養液, 繼續在含 5 % CO<sub>2</sub> 的 37 培養箱中進行培養。48 小時後, 利用 UV 螢光顯微鏡觀察細胞是否有綠色螢光出現。

## 4. 實驗結果

### 4.1 JC 病毒主要結構蛋白 VP1 之表達與殼體純化

#### 4.1.1 JCV VP1 蛋白質的純化

之前我們實驗室已證實 pFX7-JCV VP1 可在酵母菌細胞內表達病毒結構蛋白 VP1，而且表達 JCV VP1 的酵母菌細胞液 (lysate) 具血液凝集特性 hemagglutination activity (HA)，初步證明 JCV VP1 在酵母菌細胞內可自組為殼體。在自然界完整病毒顆粒 (virion) 密度為  $1.34 \text{ g/cm}^3$ ，空殼顆粒 (empty capsid) 密度為  $1.29 \text{ g/cm}^3$  (44)，而一般蛋白質的密度為  $1.25 \text{ g/cm}^3$ ，因此利用此特性以 CsCl 超高速離心純化 JCV VP1 蛋白質。並且在電子顯微鏡下可觀察到類病毒顆粒。雖然由 CsCl 密度梯度離心可純化出高純度的病毒殼體，但由於 CsCl 超高速離心純化須長時間離心且每次所能分離出的 JCV VP1 蛋白質也不多，為了能更有效率的純化更多量的病毒殼體，因此本實驗室發展出利用病毒顆粒的沉降係數為 240S 的特性，以 10-50% 蔗糖濃度梯度離心 (sucrose gradient) 的方法來純化 JCV 的病毒殼體。蔗糖梯度離心之後，以約  $200 \mu\text{l}$  為一 fraction，以 SDS-PAGE Western blot 分析蛋白質含量並測定每個 fraction 的血液凝集特性。從 SDS-PAGE 可看到分別在 fraction 7 到 fraction 14 有高純度的 VP1 蛋白質分佈 (圖 1a) 從 Western blot 上也可發現 fraction 7 到 fraction 14 確實含有 VP1 蛋白 (圖 1b) 從血液凝集特性可見 fraction 8 及 9 有 HA 活性高峰 (圖 2)。以這些結果證明，10-50% 蔗糖梯度離心可純化出的 VP1 蛋白。

#### 4.1.2 JCV VP1 蛋白質組成殼體的穿透式電子顯微鏡圖

為了更進一步證實 10%-50% 蔗糖梯度離心，確實能夠純化病毒顆粒。接著我們收集 fraction 7 到 fraction 14 這部分高純度的蛋白質，在 TBS 的緩衝液中，作隔夜的透析。接著我們利用 uranyl acetate 陰染 (negative stain) 在穿透式電子顯微下觀察純化的 VP1 殼體形態。結果可見病毒顆粒 (virion-like particle)，大小約為  $45 \text{ nm}$  (圖 3)



## 4.2 JC 病毒次要結構蛋白 VP2 之表達

### 4.2.1 以西方墨點法 ( Western blotting ) 偵測 JCV VP2 蛋白質在酵母菌內表達情形

質體pFX7是在酵母菌內的蛋白質表達系統,利用完整的TW-3 genomic DNA為模板,利用PCR將VP2基因放大出來,並將其選殖到一個真核酵母菌系統的表達載體pFX7,用來在酵母菌中表達一全長且為非融合蛋白的JCV VP2蛋白。圖4顯示,以Western blot 測定JCV VP2蛋白質表達的結果。在經由3% galactose 誘導表達24小時後,收集含有JCV VP2蛋白的酵母菌(INVSC-1)細胞,並將其利用超音波震盪儀加以粉碎,以12.5% SDS-PAGE分析,再轉印到nitrocellulose paper上,再用anti-GST-JCV VP2的抗體偵測。在與單獨酵母菌體蛋白(圖4, lane 1)和 pQE30JCV2 (可在大腸桿菌內表達Histidine融合的JCV2蛋白)(圖4, lane 2)比較後,發現在含有 VP2 / pFX7 基因的酵母菌(INVSC1)在35 kd左右有明顯的JCV2蛋白質出現。因此可以判斷此蛋白乃由 pFX7-JCV2 所表現的JCV VP2 蛋白。

## 4.3 JC 結構蛋白 VP1 與 VP2 同時在酵母菌表達

### 4.3.1 以西方墨點法 ( Western blotting ) 偵測 JCV VP1 與 JCV VP2 蛋白質同時在酵母菌細胞表達情形

利用(JCV1SG, JCV1ASG)與 (JCV2SG, JCV2ASG)這二組引子(primer)分別偵測及篩選出經由共轉殖(co-transformation)後,同時帶有 pFX7JCV1與 pFX7JCV2 基因的酵母菌。接著將這株酵母菌同樣經由 3% galactose 誘導 24 小時後。收集菌體,並利用超音波震盪儀加以粉碎細胞,接著以 12.5% SDS-PAGE 分析,再轉印到 nitrocellulose paper 上,並以 anti-JCV

VP1 與 anti-GST-JCV VP2 的抗體確認。跟已知在酵母菌單獨表達的 VP1 (圖 5, lane 1) 與 VP2 (圖 5, lane 2) 蛋白質做比較, 發現對照組酵母菌細胞(不表達任何 JCV 結構蛋白質)(圖 5, lane 4), 而同時帶有 pFX7JCVVP1 與 pFX7JCVVP2 基因的酵母菌細胞, 即可表達 JCV VP1 與 JCV VP2 蛋白質 (圖 5, lane 3)。由此可知 JCV VP1 與 JCV VP2 能同時在酵母菌細胞內表達。

#### 4.3.2 JCV VP1 與 JCV VP2 蛋白質在酵母菌表達後之血液凝集活性

鼠類 polyomavirus VP1 在昆蟲細胞表達可形成殼體 (72)。人類 JCV VP1 在昆蟲細胞(16)及 *E.coli* (75)表達也會自己組合成殼體並可導致血液凝集現象, 另外單獨的 JCV VP1 結構蛋白在酵母菌表達後也可以形成殼體 (圖 3) 因此我們推測人類 JCV VP1 與 JCV VP2 在酵母菌細胞內表達後, 也可能會組合成殼體。因此我們以血液凝集試驗來初步證實 JCV VP1 在伴隨 JCV VP2 在酵母菌內共同表達後能組裝成殼體。在經由 3% galactose 誘導 24 小時後, 收集細胞, 溶於溶解緩衝液破細胞, 以連續稀釋法測定蛋白質血液凝集活性。發現同時表達 JCV VP1 與 JCV VP2 的酵母菌細胞液 (lysate) 有  $10 \times 2^{11}$  hemagglutination activity (HA), 而單獨表達 JCV VP1 的酵母菌細胞液 (lysate) 有  $10 \times 2^{13}$  hemagglutination activity (HA), 未表達任何 JCV 結構蛋白的酵母菌細胞液則不具血液凝集特性 (表 1)。此實驗初步證明 JCV VP1 伴隨 JCV VP2 在酵母菌細胞內仍可自組為殼體。

#### 4.3.3 JCV VP1 與 JCV VP2 蛋白質的純化

由 HA 證實 JCV VP1 和 JCV VP2 同時在酵母菌細胞內可自組為殼體 (表 1) 由於完整病毒顆粒的沉降係數為 240S。在酵母菌內單獨 JCV VP1 可透過 10%-50%蔗糖梯度離心的方式, 可得到高純度的病毒顆粒, 因此我們同樣利用 10%-50%蔗糖梯度離心的方法來純化在酵母菌細胞內同時表達 JCV VP1 和 JCV VP2 的病毒顆粒。蔗糖梯度離心之後, 以約 200  $\mu$ l

為一 fraction，以 SDS-PAGE Western blot 分析及測定每管血液凝集特性。在 SDS-PAGE 可看到分別在 fraction 7 到 fraction 14 可看有高純度的 VP1 蛋白質分佈（圖 6a）。從 Western blot 上也可發現 fraction 7 到 fraction 14 確實含有 VP1 和 VP2 蛋白（圖 6b）從血液凝集特性可見到 fraction 8 及 9 有 HA 活性高峰（圖 7）。以這些結果推測，10%-50% 蔗糖梯度離心也可純化出含有 VP2 的病毒殼體。

#### 4.3.4 JCV VP1 與 JCV VP2 蛋白質組成殼體的穿透式電子顯微鏡圖

收集 fraction 7 到 fraction 14 這部分高純度的蛋白質，在 TBS 緩衝液中，作隔夜的透析。以陰染（negative stain）在穿透式電子顯微下觀察所純化的病毒蛋白形態。結果可見同時表達 VP1 和 VP2 所純化出病毒顆粒（圖 8b）與單獨表達 VP1 所純化出的病毒顆粒比較（圖 8a）。其形態相同，大小約為 45 nm。

#### 4.4 鑑定 JCV VP2 是否存於病毒殼體

為了進一步確認，VP1 和 VP2 同時在酵母菌表達後，其純化出的病毒殼體是由 VP1 和 VP2 蛋白所組成。（圖 9）以 SDS-PAGE 來分析經由 10-50% 蔗糖濃度梯度離心的步驟所純化出的病毒殼體。發現不管是由單獨表達 VP1 或同時表達 VP1 和 VP2 的酵母菌藉由 10-50% 蔗糖梯度離心，皆可得到高純度的病毒殼體蛋白。而以 Western blot 鑑定，發現（圖 10a）由抗 JCV-VP1 的兔子抗血清(19)偵測，得知此方法純化出的蛋白質確實為 JCV VP1 蛋白質。而由 GST-JCV-VP2 的兔子抗血清偵測，發現只在酵母菌同時表達 VP1 和 VP2 所純化出的病毒殼體上可偵測出 VP2 蛋白（圖 10b，lane4）。同時以 JCV-VP1(19) 和 GST-JCV-VP2 的兔子抗血清偵測單獨表達 VP1 所純化出的病毒殼體只有 VP1 蛋白的存在（圖 10c，lane3），而同

時表達 VP1 和 VP2 所純化出的病毒殼體上同時存在 VP1 和 VP2 蛋白 (圖 10c, lane4)。因此 VP1 和 VP2 在酵母菌同時表達後, 可組裝類病毒殼體的結構。

## 4.5 病毒殼體的比較

### 4.5.1 EGTA 及 DTT 對 VP1 殼體穩定性的影響

由鼠類 polyomavirus、SV40 及 JCV 研究得知, 雙硫鍵及鈣離子對病毒顆粒的完整性扮演重要角色(11、10、16、29、96)。為了瞭解 VP2 是否會影響到病毒殼體的穩定性, 我們以螯合劑(EGTA, 移除  $\text{Ca}^{2+}$ )及還原劑(DTT), 使雙硫鍵~S~S~變為硫氫基~SH)同時處理 capsid, 在室溫下在不同的時間點測量血液凝集活性。結果由對照組(圖 11a)中(不加任何藥劑)發現, 不管是只含 VP1 的病毒殼體或是同時帶有 VP1 和 VP2 的病毒殼體, 在 5 小時後都可維持 HA 活性。而實驗組(圖 11b) (同時加入 EGTA 和 DTT) 中, 只含 VP1 的病毒殼體在 1 小時後即因殼體解離而失去 HA 活性。然而, 含有 VP2 的病毒殼體, 其 HA 活性可持續維持到 5 小時。

### 4.5.2 病毒殼體攜帶 ODN 進入猴子腎臟細胞(COS-7)

本實驗結果證實在 *in vitro* 環境下, 單獨 VP1 形成的 pseudocapsid particles 利用滲透壓震盪法 (osmotic shock) 包裝 ODN, 能感染細胞並運送螢光 ODN 到細胞中。因此, 以我們想探討含 VP2 的病毒顆粒, 是否因 VP2 的存在可增加病毒感染細胞的效率。由單獨 VP1 組成的病毒殼體與 VP1VP2 的病毒殼體各 30  $\mu\text{g}$ , 同樣利用滲透壓震盪法 (osmotic shock) 包裝 4  $\mu\text{g}$  之 ODN-FITC, 感染猴子腎臟細胞 COS-7。在感染後 4 小時利用螢光顯微鏡觀察, 細胞被感染的情形, 結果發現在 4 小時後, 不管是被 VP1 病毒殼體或是被 VP1VP2 的病毒殼體所感染的 COS-7 細胞中, 都可在細胞質觀察到綠色螢光 (圖 12), 而被感染細胞數 (positive cell), 皆約佔總細胞數的 90%。另外, 也利用單純只含有 4  $\mu\text{g}$  ODN-FITC 而不加 pseudocapsid particles 的對照組進行相同的包裝及感染步驟感染細胞, 結果

發現在 4 小時，在 COS-7 細胞中都沒有觀察到綠色螢光(data not shown)。因此殼體中 VP2 的存在，並無法增加病毒顆粒感染細胞的效率。

#### 4.5.3 利用偽病毒殼體(pseudocapsid particle)攜帶外生性 DNA 到猴子腎臟細胞

先前我們實驗室已發現，單獨 VP1 所形成的病毒殼體，無法有效率的用來當作運送 DNA 的載體。在我們的表達系統中，能夠得到含有 VP2 的病毒殼體，使我們聯想到是否可利用這類的病毒殼體，來加強運送 DNA 的能力，因而將其應用在基因治療上。為了測試這個可能性，我們將所純化的 pseudocapsid particles 利用滲透壓震盪 (osmotic shock) 的方法，把一個能在真核細胞中表達出綠色螢光的質體 (pEGFP-C1) 包裝進 particles 中。包裝完成後，先利用 DNase I 處理掉可能粘附於 particles 外側的 DNA，接著將包裝完成的 particles 感染猴子腎臟細胞(COS-7)。單獨 VP1 的病毒殼體感染細胞 72 小時後，以螢光顯微鏡可觀察到 1%發出綠色螢光的細胞，而 VP1VP2 的病毒殼體感染細胞後可觀察到 13%發出綠色螢光的細胞。利用未以 capsid particles 加以包裝的 pEGFP-C1 質體單獨感染細胞當作對照組，則無法見到任何帶綠色螢光的細胞中出現 (data not shown)。由 positivity 的比率來看，似乎有 VP2 的存在的，有助於病毒殼體攜帶 DNA 的能力。

## 5. 討論

JCV 有三個結構蛋白，分別是主要結構蛋白 VP1 及次要結構蛋白 VP2 及 VP3，在病毒成熟及繁殖子代的過程中，這三個結構蛋白都是必要的成份 (89)。雖然目前已經知道，自然界中具有感染力的病毒顆粒中，包含有三個結構蛋白與病毒的 DNA 及由宿主細胞所提供的 Histone 蛋白。但目前對於病毒顆粒是如何組裝的，以及次結構蛋白在病毒顆粒內到底參與什麼角色，仍然不清楚。由於 JC 病毒不容易在組織培養中得到，而且在原核細胞(*E. coli*)所表現的 JC 病毒次結構蛋白無法以溶解態存在，而酵母菌除了和動物細胞一樣有細胞核外，亦是一操作簡便的系統。因此我們選用酵母菌表達系統進行 JC 病毒結構蛋白的功能研究。由於先前我們實驗室已証實人類 JCV VP1 蛋白質可在昆蟲細胞(16)及 *E. coli*(75)中表達並自我組裝成殼體。我們想先瞭解人類多瘤性病毒 JCV VP1 單獨在酵母菌系統是否也能自我組裝(self-assemble)成 capsid-like particle。於是，我們將源自於類風濕性關節炎病人尿液的 Taiwna-3 JCV VP1 結構蛋白基因(18、19、22、24、74)，選殖到一酵母菌系統的表達載體，並送到酵母菌細胞表達。利用 JC virus 具有凝集人類 O 型血球的特性(77)，証實在酵母菌細胞表達的 VP1 蛋白質確實具有 HA，並利用多瘤性病毒顆粒的沉降系數為 240S 的特性，透過 10-50% 蔗糖濃度梯度離心發現在酵母菌細胞內可表達 VP1 形成 capsid-like particle(圖 1)。並在電顯下呈現類似完整病毒顆粒(virion-like particle)的構造(圖 3)。因此我們利用酵母菌細胞表達系統，將 Taiwna-3 JCV 次結構蛋白基因 VP2 也送入酵母菌細胞，同時與 VP1 基因一起表達，經由血液凝集的活性與透過蔗糖濃度梯度離心，發現 VP1 和 VP2 也可在酵母菌細胞內共同形成病毒殼體(圖 6)，在電顯下呈現出與單獨由 VP1 組成的殼體相類似的病毒顆粒(virion-like particle) (圖 8)。再經由 Western blot 的鑑定，此殼體中確實含有 VP1 和 VP2 蛋白(圖 10)。

由酵母菌的表達系統中，可獲得含有次結構蛋白 VP2 的病毒顆粒。因

此，我們接著進一步的想要了解 VP2 在病毒結構中到底扮演什麼角色。從 polyomavirus(5)及 SV40(29)的殼體穩定性試驗，証實還原劑是殼體解離所需。因此推測需要雙硫鍵幫助穩定病毒顆粒，而使這些鍵還原，則是病毒脫殼(uncoating)過程很重要的步驟之一。此外，Ghafakhanian (50)等人研究 SV40 VP1 蛋白質，証實雙硫鍵可穩固自我組裝的 postpentameric 12S 複合物，且雙硫鍵參與在病毒組裝過程的 postpentameric 階段。Sapp 等人(81)，在昆蟲細胞中研究人類 papillomavirus 也發現其主要殼體蛋白質 L1 中的兩個 cysteine 形成 capsomere 之間雙硫鍵，約二分之一的 L1 蛋白質形成 trimer。而此 trimerization 使 capsomere 連結，對保持 papillomavirus 殼體的穩定相當重要。因此我們初步由 EGTA 和 DTT 對於殼體穩定性的實驗中，發現含有 VP2 的病毒殼體有抵抗 EGTA 和 DTT 瓦解殼體的能力(圖 11)。因此，我們懷疑 VP2 是否會影響病毒殼體內雙硫鍵的形成。在先前本實驗室就已發現，利用 non-reducing SDS-PAGE 分析人類多瘤性病毒 JCV VP1 殼體(capsid)的雙硫鍵鍵結，在自然狀態下的 VP1 分子之間，當環境中有 SDS 的存在時，會出現 3 種 VP1 monomer isoforms 及 dimer 和少許 trimer，它們分別占全部 VP1 分子的 45%，40%及 15%，可見雙硫鍵確實存在 VP1 在殼體中(27)。因此是否我們也可利用 non-reducing SDS-PAGE 分析含 VP1 和 VP2 殼體(capsid)的雙硫鍵鍵結，以釐清含 VP2 的病毒殼體為何可抵抗被 EGTA 和 DTT 瓦解的功能，是否是因 VP2 的存在而造成殼體(capsid)雙硫鍵鍵結的改變。

目前對於 JC 病毒確切的感染路徑並不清楚，sialic acid 是普遍存在於各種細胞表面的物質，根據先前的研究指出多瘤性病毒可能是藉由主要結構蛋白 VP1，在病毒感染時以呈現在殼體表面三個 loop (BC、DE、HI)來辨認細胞表面的 sialic acid 並與之結合(85,86,7)，進而感染細胞，但亦有研究指出，sialic acid 對於 JC 病毒感染細胞而言是必要而非主要的因子。而多瘤性病毒的次結構蛋白在這之中是否有參與此感染起始的步驟，至目前為止也仍不清楚，所以我們嘗試利用 pseudocapsid particles 包裝以螢光標定的 ODN 感染細胞。發現無論單獨 VP1 組成的 pseudocapsid particles 或

由 VP1 和 VP2 所共同組成的 pseudocapsid particles 在包裝螢光標定的 ODN，並感染細胞後，其感染效率並無明顯的差異(約 90%)(圖 12)。這是否意味著 VP2 存在於病毒殼體內，而沒有外露以形成特定的結構與細胞結合，進而參與感染起始的步驟。

另外在 virion 成熟的過程中，病毒殼體蛋白的 DNA 結合能力可能也扮演著重要的角色。在先前的研究中證明 murine polyomavirus 的三個結構蛋白中，只有 VP1 具有 DNA 結合的能力(15,71)，但是 SV40 的 VP1 (84)及 VP2/3 (30)則都有與 DNA 結合的能力。另外，在昆蟲細胞中表達的 murine polyomavirus VP1 除了可自我組裝成 particles 外，還能夠包裝入約 5 kb 的 DNA 分子(55)。因此是否可利用結構蛋白可與 DNA 結合的特性，把病毒殼體作為基因運送載體。目前 polyomavirus 的 pseudocapsids 來作為基因運送載體，以當作一個基因治療的工具，正開始被積極的研究中。在昆蟲細胞中表達的 murine polyomavirus VP1 蛋白會自我組裝成 capsid-like particle (44,55,72)，Forstova 等人(43)也證明這種由 baculovirus 系統中製造出來的 murine polyomavirus pseudocapsid 可以將外源性的 DNA 運送到哺乳類細胞中，之後在相同表達系統製造出來的 SV40 pseudocapsid，也被證明有相同的能力(80)。在我們實驗室最近的研究中，在 *E. coli* 自我組裝為 capsid-like particle 的人類 JCV VP1，也被證實可包裝 DNA 及攜帶外生性 DNA 到人類細胞(75)，然而這單獨 VP1 所形成的病毒殼體，卻無法有效率的用來當作運送 DNA 的載體。在我們的表達系統中，能夠得到含有 VP2 的病毒殼體，使我們聯想到是否可利用這類的病毒殼體，來加強運送 DNA 的能力。為了測試這個可能性，以含有 VP2 的 pseudocapsid 在 *in vitro* 下利用滲透壓震盪 (osmotic shock) 的方法，將 pEGFP 此一 plasmid 包裝進 particles 中，攜帶螢光蛋白質的質體 DNA(pEGFP-C1)到猴子腎臟細胞表達。當病毒殼體存在 VP2 時，有提高了運送的外生性 DNA 的能力(圖 13)。因此 VP2 與 DNA 結合的能力是否可提高殼體運送 DNA 的能力。這也值得我們進一步的探討，以期開發出有效的基因治療載體。

此外。在酵母菌細胞表達的蛋白質的修飾作用(modification)類似於哺乳類細胞的修飾作用，如磷酸化(phosphorylation)，乙醯化(acetylation)，醣化(glycosylation)等。1993年 Forstova 等人(44)，在昆蟲細胞同時表達 murine polyomavirus 結構蛋白 VP1 和 VP2，發現因 VP2 的存在，會改變 VP1 的修飾作用(modification)。VP1 蛋白質的修飾作用可能跟病毒顆粒的組裝有



關。而在本系統中，VP2 是否也會影響到 VP1 的修飾作用，未來我們可利用 2D-PAGE 分析，來回答這個問題。同一 polypeptide 不同的修飾，是否造成不同的生物功能，目前尚不明瞭，也需更進一步分析。

我們建立了一個在酵母菌內共同表達 JCV 結構蛋白的系統，未來可用來探討三個結構蛋白的生物與生化特性，特別是次要結構蛋白 VP2 和 VP3 在整個病毒生活史中所扮演的角色。

## 參考文獻

1. Andrews C.A., Shah K.V., Daniel R.W., Hirsch M.S., and Rubin R.H.(1988). A serological investigation and BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J. Infect. Dis.* 158,176-181.
2. Arthur R.R., Dagnostin S., and Shah K.V. (1989). Detection of BKV and JCV in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27,1174-1179.
3. Arthur R.R., and Shan K.V. (1989). Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine, *Prog. Med. Virol.* 36,42-61.
4. Baker T.S., Drak J., and Bina M. (1988). Reconstruction of the three dimensional structure of simian virus 40 and visualization of the chromatin core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 442-426.
5. Baker T.S., Dark J., and Bina M. (1989). The capsid of small papova viruses contains 72 pentameric capsomeres: direct evidence from cryoelectron microscopy of SV40. *Biophys. J.* 55:243-253.
6. Barouch D.H., Harrison S.C. (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology.* 68:3982-3989.
7. Bauer P.H., Cui C., Stehle T., Harrison S.C., DeCaprio J.A., and Benjamin T.L. (1999). Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates Polyomavirus spread in the mouse. *J. Virol.* 73, 5826-5832.
8. Beggs A.H., Miner H.H., and Scangos G.A. (1990). Cell type-specific expression of JC virus T antigen in primary and established cell lines from transgenic mice. *J. Gen. Virol.* 71, 151-164.
9. Boerman R.H., Arnoldus E.P.J., Rapp A.K., Peters A.C.B., Ter Schegget J., and Van den Ploeg M. (1989). Diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by hybridization techniques. *J. Clin. Pathol.* 42:153-161.
10. Brady J.N., Winston V.D., and Consigli R.A. (1978). Characterization of a DNA-Protein complex and capsomere subunits depived from polyoma virus by treatment with ethyleneglycol-bis-*N,N'* -tetraacetic acid and dithiothreitol. *J. Virol.* 27:193-204.
11. Brady J.N., Winston V.D., and Consigli R.A. (1977). Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.*

23:717-724.

12. Brooks B.R., and Walker D.L. (1984). Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol. Clin.* 2:299-313.
13. Brown P., Tsai T., Gajdusek Am D.C. (1975). Seroepidemiology of human papovaviruses: discovery of virgin population and some unusual patterns of the world. *Am. J. Epidemiol.* 102:331-340.
14. Cai X., Chang D.C., Rottinghaus S., Consigli R.A. (1994). Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *Journal of Virology.* 68:7609-7613.
15. Chang D.C., Cai X., Consigli R.A. (1993). Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid proteins. *Journal of Virology.* 67:6327-6331.
16. Chang D.C., Fung C.Y., Ou W.C., Chao P.C., Li S.Y., Wang M.L., Huang Y.L., Tzeng T.Y., and Tsai R.T. (1997). Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* 78:1435-1439.
17. Chang D.C., Haynes J.I., Brady J.N., and Consigli R.A. (1992). Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology.* 191:978-983.
18. Chang D.C., Haynes J.I., Brady J.N., Consigli R.A. (1992). The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* 189:821-827.
19. Chang D.C., Liou Z.M., Ou W.C., Wang K.Z., Wang M.L., Fung C.Y., Tsai R.T. (1996). Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. *J. Virol. Meth.* 59:177-187.
20. Chang D.C., Haynes J.I., Brady J.H., and Consigli R.A. (1992). The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology.* 189, 821-827.
21. Chang D.C., Sugimoto C., Wang M.L., Tasi R.T. and Yogo Y. (1999). JC virus genotypes in the Taiwan aboriginal tribe (Bunun):implication for its population history *Arch. Virol.* In press.
22. Chang D.C., Tsai R.T., Wang M.L., and Ou W.C. (1996). Different genotypes of human polyomaviruses found in patients with autoimmune diseases in Taiwan. *J. Med. Virol.* 48:204-209.
23. Chang D.C., Wang M.L., Ou W.C., Lee M.S., Ho H.N., and Tsai R.T. (1996).

- Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant individuals in Taiwan. *J. Med. Virol.* 48:95-101.
24. Chang D.C., Wang M.L., Ou W.C., Tsai R.T., Fung C.Y., and Hwang Y.J. (1996). A simple method for detecting human polyomavirus DNA in urine by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 58:131-136.
  25. Chang D.C., Wang M.L., and Tsai R.T. (1999). Treatment with cytotoxic immunosuppression agents increases JC viruria in autoimmune disease patients. *J. Med. Virol.* Submitted.
  26. Chen C.H., Wen M.C., Shu K.H., Chang D.C., Wu M.J., Cheng C.H., and Lian J.D. (1999). BK virus induces interstitial nephritis in a kidney allograft. *J. Med. Virol.* Submitted.
  27. Chen P.L., Wang M., Ou W.C., Lii C.K., Chen L.S., and Chang D.C. (2001). Disulfide bonds stabilize JC virus capsid-like structure by protecting calcium ions from chelation. *FEBS letters.* in press.
  28. Chen X.S., Stehle T., Harrison S.C. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO.* 17:3233-3240.
  29. Christiansen G., Landers T., Griffin J., and Berg P. (1977). Characterization of components released by alkali disruption of simian virus 40. *J. Virol.* 21:1079-1284.
  30. Clever J., Dean D.A., Kasamatsu H. (1993). Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid protein VP2 and VP3. *Journal of Biological Chemistry.* 268:20877-20883.
  31. Coleman D.V., Gardner S.D., Mulholland C., Fridiksdottir V., Porter A.A., Liford R., and Valimarsson H. (1983). Human polyomavirus in pregnancy. A model for the study of defence mechanisms to virus reactivation. *Clin. Exp. Immunol.* 53,289-296.
  32. Coleman D.V., Wolfendale M.R., Daniel R.A., Dhanial N.K., Gardner S.D., Gibson P.E., and Field A.M. (1980). A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J. Infect. Dis.* 142, 1-8.
  33. Daniel R., Shah K., Madden D., and Stagno S. (1981). Serological investigation of the possibility of congenital transmission of papovavirus JCV. *Inf. Imm.* 33,319-321.
  34. David A.D., and Kasamatsu H. (1994). Signal- and Energy-dependent Nuclear Transport of SV40 Vp3 by Isolated Nuclei. *J. Biol.Chem.* 269: 4910-4916.
  35. Dean D.A., Li P.P., Lee L.M., Kasamatsu H. (1995). Essential role of the VP2 and VP3 DNA-binding domain in simian virus 40 morphogenesis. *Journal of Virology.*

69:1115-1121.

36. Delos S.E., Cripe T.P., Leavitt A.D., Greisman H., Garcea R.L. (1995). Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in *Escherichia coli*: in vitro interactions with recombinant VP1 capsomeres. *Journal of Virology*. 69:7734-7742.
37. Dorries K., Loeber G., and Meixensbarger J. (1987). Association of polyomavirus JC, SV40, and BK with human brain tumors. *Virology*. 160:268-270.
38. Dubois V., Dutronc H., and Lafon M.E. (1997). Latency and Reactivation of JC virus in Peripheral Blood of Human Immunodeficiency Virus Type I- Infected Patients *J. Clin. Microbiol.* 35. 2288-2292.
39. Dubois V., Lafon M.E., Ragnaud J.M., Pellegrin J.L., F-Damasio C., Michaud B.V., and Fleury H.J.A. (1996). Detection of JC virus DNA in the peripheral blood leukocytes of HIV-infected patients. *AIDS* 10:353-358.
40. Etchison D., and Walter G. (1977). Subunit interactions in polyoma virus structure. *Virology* 77:783-796.
41. Fattaey A., Consigli R.A. (1989). Synthesis, posttranslational modifications, and nuclear transport of polyomavirus major capsid protein VP1. *Journal of Virology*. 63:3168-3175.
42. Feigenbaum L., Khalili K., Major E.O., Khoury G. (1987). Regulation of the host range of human papovavirus JCV. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 84:3695-3698.
43. Forstova J., Krauzewicz N., Sandig V., Elliott J., Palkova Z., Strauss M., Griffin B.E. (1995). Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Human Gene Therapy*. 6:297-306.
44. Forstova J., Krauzewicz N., Wallace S., Street A.J., Dilworth S.M., Beard S., Griffin B.E. (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology*. 67:1405-1413.
45. Frisque R.J., Bream G.L., and Cannella M.T. (1984). Human polyomaviruse JC virus genome. *J. Virol.* 51, 458-469.
46. Frisque R.J., Rifkin D.B., and Walker D.L. (1980). Transformation of primary hamster brain cells with JC virus and its DNA. *J. Virol.* 35:265-269.
47. Garcea R.L., Benjamin T.L. (1983). Isolation and characterization of polyoma nucleoprotein complexes. *Virology*. 130:65-75.
48. Gardner S.D., Field A.M., and Coleman D.V. (1971). New human papova-virus (BK)

isolated from urine after renal transplantation, *Lancet*. 1, 1253-1257.

49. Gardner S.D., MacKenzie E.F., Smith C., and Porter A.A. (1984). Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J. Clin. Pathol.* 37, 578-586.
50. Ghafakhanian E., Andrew K.S., and Weidman M.K. (1995). SV40 VP1 assembles into disulfide-linked postpentameric complexes in cell-free lysates. *Virology*. 207:251-254.
51. Gharakhanian E., Takahashi J., Clever J., Kasamatsu H. (1988). In vitro assay for protein-protein interaction: Carboxyl-terminal 40 residues of simian virus 40 structural protein VP3 contain a determinant for interaction with VP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 85:6607-6611.
52. GiaRusso M.H., Koeppen A.H. (1978). Atypical progressive multifocal leukoencephalopathy and primary cerebral malignant lymphoma. *J. Neurol. Sci.* 35, 391-398.
53. Gibson P.E., Field A.M., Gardner S.D., and Coleman D.V. (1981). Occurrence of IgM antibodies against BK and JC polyomaviruses during pregnancy. *J. Clin. Pathol.* 34, 674-679.
54. Gietz S.D., Jean A., Woods R.A., and Schiestl R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acid Res.* 20:1425.
55. Gillock E.T., Rottinghaus S., Chang D.C., Cai X., Smiley S.A., Consigli R.A. (1997). Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *Journal of Virology*. 71:2857-2865.
56. Gordon J.W., and Ruddle F.H. (1982). Germline transmission in transgenic mice. *Prog. Clin. Biol. Res.* 85, 111-124.
57. Grinnell B.W., Padgett B.L., and Walker D.L. (1983). Distribution of non-integrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 147, 669-675.
58. Gullotta F., Masini T., Scarlato G., Kuchelmeister K. (1992). Progressive multifocal leukoencephalopathy and gliomas in a HIV-negative patient. *Pathol. Res. Pract.* 188, 964-972
59. Horgan T.F., Borden E.C., McBain H.A., Padgett B.L., and Walker D.L. (1980). Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. *Ann. Intern. Med.* 92,373-378.
60. Horgan T.F., Padgett B.L., Walker D.L., Borden E.C., and Frias Z.J.L. (1983). Survey of human polyomavirus (JCV, BKV) infections in 139 patients with lung cancer,

breast cancer, melanoma, or lymphoma, in polyomaviruses and Human Neurological Disease, Sever, D. L. Madden, Alan R. Liss, New York, pp 311-324.

61. Klug A.J., and Finch J.T. (1965). The structure of viruses of the papilloma-polyoma type 3. Structure of rabbit papilloma virus, with an appendix on the topography of contrast in negative-staining for electron-microscopy. *J. Mol. Biol.* 11:424-431.
62. Krynska B., Gordon J., Otte J., Franks R., Knobler R., Giordano A., DeLuca A., and Khalili K. (1997). Role of cell cycle regulators in tumour formation in transgenic mice expressing the human neurotropic virus, JCV, early protein. *J. Cell. Biochem.* 67, 223-230.
63. Krynska B. Otte J., Franks R., Khalili K. and Croul S. (1999). Human ubiquitous JCV (CY) T-antigen gene induces brain tumors in experimental animals. *Oncogene.* 18, 39-46.
64. Liddington R.C., Yang Y., Moulai J., Sahli R., Benjamin T.L., and Harrison S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8Å resolution. *Nature.* 354, 278-284.
65. Lin W., Hata T., and Kasamatsu H. (1984). Subcellular distribution of viral structural proteins during simian virus 40 infection. *J. Virol.* 50: 363-371.
66. Mandl C.W., and Frisque R.J. (1986). Characterization of cells transformed by the human polyomavirus JC virus. *J. Virol.* 67:1733-1739.
67. McDeever P.E., Chronwall B.M., and Houff S.A. (1983). Glial and divergent cells in primate central system tumors induced by JC virus isolated from human progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), in Sever JL, Madden DL (eds): *Polyomaviruses and Human Neurological Disease.* New York, Alan R Liss. 105, 239-251.
68. McMillen J., and Consigli R.A. (1974). Characterization of polyoma DNA protein complex I. Electrophoretic identification of the proteins in a nucleoprotein complex isolated from polyoma- infected cells. *J. Virol.* 14:1326-1336.
69. Miller N.R., London E., and Padgett B.L. (1983). The detection of JC viral genome in owl monkey tumors, in Sever JL, Madden DL (eds): *Polyomaviruses and Human Neurological Disease.* New York, Alan R Liss. 271-288.
70. Monaco M.C.G., Atwood W.J., Gravell M., Tornatore C.S., and Major E.O. (1996). JC virus infection of hematopoietic progenitor cells. Primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implication for viral latency. *J. Virol.* 70:7004-7012.
71. Moreland R.B., Montross L., Garcea R.L. (1991). Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *Journal of*

- Virology. 65:1168-1176.
72. Montross L., Watkins S., Moreland R.B., Donald H., Capar L.D., and Garcea R.L. (1991). Nuclear assembly of polyomaviruscapsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol.* 65:4991-4998.
  73. Newman J.T., Frisque R.J. (1997). Dection of Archetype and Rearranged Variants of JC virus in Multiple Tissues From a Pediatric PML Patient *J. Med, Virol.* 52.243-252.
  74. Ou W.C., Tasi R.T., Wang M.L., Fung C.Y., Hseu T.H., and Chang D.C. (1997). Genomic cloning and sequence analysis of Taiwan-3 human polyomavirus JC virus. *J. Form. Med. Asso.* 96:511-516.
  75. Ou W.C., Wang M.L., Fung C.Y., Tsai R.T., Chao P.C., Tzeng T.Y., and Chang D.C. (1999). The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *E. coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J. Gen. Virol.* 80:39-46.
  76. Padgett B.L., Rogers C.M., and Walker D.L. (1977). JC virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy: additional biological characteristics and antigenic relationships. *Infect. Immun.* 15, 656-366.
  77. Padgett B.L., and Walker D.L. (1973). Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 127:467-470.
  78. Padgett B.L., Walker D.L., Zu Phein G.M., Echroade R.J., and Dessel B.H. (1971). Cultivation of a papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet.* 1, 1257-1260.
  79. Rayment I., Baker T.S., Caspar D.L.D., and Murakami W.T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 A resolution. *Nature.* 295, 110-115.
  80. Sandalon Z., Dalyot-herman N., Oppenheim A.B., Oppenheim A. (1997). In vitro assembly of SV40 virions and pseudovirions: Vector development for gene therapy. *Human Gene Therapy.* 8:843-849.
  81. Sapp M., Fligge C., Petzak I., Harris J.R., Streeck R.E. (1998). Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfide between two highly conserved cysteines. *J. Virol.* 72:6186-6189.
  82. Schiesti R.H., and Gietz R.D. (1989). High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acid as a carrier. *Curr. Genet.*16: 339-346.



83. Silverman L., and Rubinstein L.L. (1965). Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta. Neuropathol.* 5, 215-224.
84. Soussi T. (1986). DNA-binding properties of the major structural protein of simian virus 40. *Journal of Virology.* 59:740-744.
85. Stehle T., and Harrison S.C. (1997). High-resolution structure of a Polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: Implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.* 16, 5139-5148.
86. Stehle T., Yan Y., Benjamin T.L., and Harrison S.C. (1994). Structure of murine Polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369, 160-163.
87. Tornatore C.S., Berger H.R., and Houff S.A. (1992). Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann. Neurol.* 31, 454-562.
88. Tooze J. (1981). DNA tumor viruses, 2<sup>nd</sup> edn, pp:61-370. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
89. Tooze J. (1981). Molecular biology of tumor virus, part 2. DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p 61-370.
90. Tsai R.T., Wang M.L., Ou W.C., Lee Y.L., Li S.Y., Fung C.Y., Huang Y.L., Tzeng T.Y., Chang D.C. (1997). Viruria incidence of JC virus is higher than that of BK virus in Taiwan. *J. Med. Virol.* 52:253-257.
91. Walker D.L., and Frisque R.J. (1986). The biology and molecular biology of JC virus. In the papovaviride, pp:327-377. Edited by N.P. Salzman. New York : Plenum Press.
92. Walker D.L., Padgett B.L., and Zu-Rhein G.M. (1973). Human papovavirus (JC): induction of brain tumors in hamsters. *Science.* 181:674-676.
93. Walker D.L. (1978). Progressive multifocal leukoencephalopathy : An opportunistic viral infection of the central nervous system. in Vinken PJ, Bruyn GW (eds) : *Handbook of Clinical Neurology.* Amsterdam, North-Holland Publishing Co. 18:307-329.
94. Walker D.L. (1983). Progressive multifocal leukoencephalopathy, in *Comprehensive Virology*, Plenum, B. L. Padgett, H. Frankel-Conrat, R. R. Wanger New York. 18: 161-193.
95. Walker D.L. (1985). Progressive multifocal leukoencephalopathy, in *Handbook of Clinical Neurology*, P.J. Vinken, G.W. Bruyn, and H.L. Elsevier Science. Amsterdam. 3:503-524.

96. Walter G., and Deppert W. (1974). Intermolecular disulphide bonds: an important structural feature of the polyoma virus capsid. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39:255-257.
97. Wang M.L, Tzeng T.Y., Fung C.Y., Ou W.C., Tsai R.T., Chen C.H., and Chang D.C. (1999). Human anti-JC virus serum reacts with native but not denatured JC major capsid protein VP1. *J. Virol. Meth.* 78:171-176.
98. Willoughby E., Price R.W., Padgett B.L., Walker D.L., and Dupont B. (1980). Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML); in vitro cell-mediated immune responses to mitogens and JC virus. *Neurology.* 30:1 256-262.
99. Yuen L.K.C, Consigli R.A. (1985). Identification and protein analysis of polyomavirus assembly intermediates from infected primary mouse embryo cells. *Virology.* 144:127-138.
100. Zu Rhein G.M. (1983). Studies of JC virus-induced nervous system tumors in the Syrian hamster: A review. *Polyomaviruses and Human Neurological Disease.* Sever, J. L. and D.L. Madden, eds., Alan R. Liss, New York. 205-221.
101. Zu Rhein G.M., and Varakis J.N. (1979). Perinatal induction of medulloblastomas in Syrian golden hamsters by a human polyoma virus (JC). *Natl. Cancer. Inst. Monoer.* 51: 205-208.

