

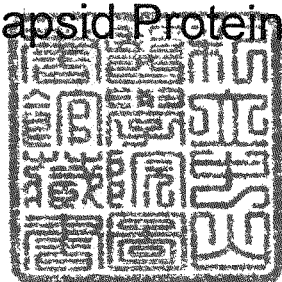
R  
008.8  
4402

中山醫學院生物化學研究所

碩 士 論 文

人類多瘤性病毒 JCV 次要結構蛋白 VP2 之基因  
選殖,表達及功能特性化

Molecular Cloning, Expression and Functional  
Characterization of Human Polyomavirus JCV Minor  
Capsid Protein VP2



指導教授: 張德卿 教授

研究生: 黃亦樂

中華民國八十六年六月

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C046150

# 授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人度在中山醫學院生物化學研究所  
組86學年第2學期所撰碩士學位論文。

論文名稱：人類多瘤性病毒JCV次要結構蛋白VP2之基因選殖，表達及功能特性化

同意  
本人業以  
具學以  
不有校各  
同著圖書  
意著作方  
財產重製  
權為製  
之學術  
論不限  
文研不  
全究時  
文之間  
資目與  
料的地  
以域，  
授各，  
予種惟  
教每  
育法以  
部重一  
指份  
定或為  
送或為  
繳為限  
之上。  
圖述  
書目的  
館的再  
及再授  
本授人  
權

同意  
本人業以  
具學以  
不有校各  
同著圖書  
意著作方  
財產重製  
權為製  
之學術  
論不限  
文研不  
全究時  
文之間  
資目與  
料的地  
以域，  
授各，  
予種惟  
教每  
育法以  
部重一  
指份  
定或為  
送或為  
繳為限  
之上。  
圖述  
書目的  
館的再  
及再授  
本授人  
權

同意  
本人業以  
具學以  
不有校各  
同著圖書  
意著作方  
財產重製  
權為製  
之學術  
論不限  
文研不  
全究時  
文之間  
資目與  
料的地  
以域，  
授各，  
予種惟  
教每  
育法以  
部重一  
指份  
定或為  
送或為  
繳為限  
之上。  
圖述  
書目的  
館的再  
及再授  
本授人  
權

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研究均為無償。

指導教授姓名：張德卿

研究生簽名：黃亦樂 學號：R84211  
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 7 月 23 日

備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。  
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。  
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

# 簽署人須知

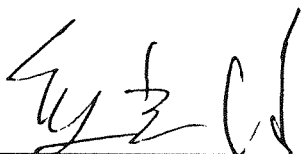
1. 依均著權法規，定何人單以網路、光碟與微縮等方式的整合國內學術資料，受
2. 均須先將權專利。著作財產權人授，請分別在三種利用方式的同欄內銜選並填，授
3. 各項資得。利。是重授指被授權人，所取得之權，並非獨占性的使用權，授權人尚
4. 所將權非專利。屬授權是重授指被授權人，所取得之權，並非獨占性的使用權，授權人尚
5. 權授在，金支代義權全在已，裝面去本地

-----  
研究生姓名：黃永樂 聯絡電話：(02) 968-4375  
地址：台北縣板橋市民權路213巷1-1號2F  
-----

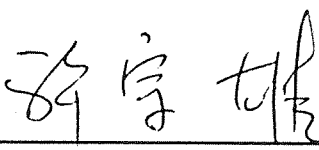
本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之  
必備條件之一，經中山醫學院生物化學研  
究所碩士論文考試委員會審查合格及口試  
通過

口試委員

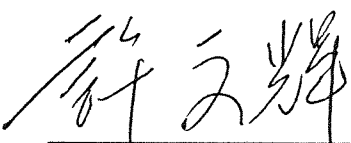
工研院化工所

  
熊光濱 教授

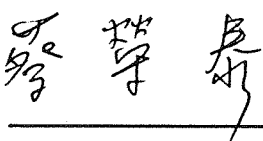
清華大學生命科學研究所

  
許宗雄 教授

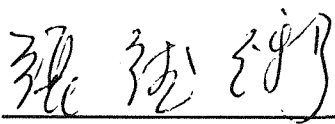
中興大學分子生物研究所

  
許文輝 教授兼所長

中山醫學院醫學研究所

  
蔡榮泰 副教授

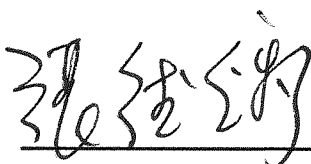
中山醫學院醫學系微生物科  
(論文指導教授)

  
張德卿 教授兼主任

中華民國八十六年六月

學生 黃亦樂 論文題目為“人類多瘤性病毒 JCV 次要結構蛋白 VP2 之基因選殖,表達及功能特性化”，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：張德卿

簽名：

中華民國八十六年七月二十三日

## 目錄

	頁次
誌謝.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
第一節 前言.....	4
第二節 本研究相關資料結果簡介.....	10
第三節 材料與方法.....	11
第四節 結果.....	22
第五節 討論.....	26
第六節 圖表.....	28
第七節 參考文獻.....	49

## 誌謝

在這兩年短暫且精實的研究生活，其過程不僅對知識與人格有了更進一步的啟發，在人生過程中更是重要的轉捩點，所有點滴與充實感匯集於一點，正如同吾師 張德卿教授所教誨的一句話：『人生當中所追求的在於自我實現。』承蒙恩師在指導期間不時地給予研究上的解惑及精神感召，讓學生有如稚魚悠游於大海之中，享受著無限的滋潤。於論文撰寫期間，恩師更是孜孜不倦，悉心的撥冗指正，感於師恩浩瀚，學生永銘於心，於此謹誌卷首，獻上至深謝忱。

文稿初成，復蒙工研院熊光濱博士、清華大學生命科學系許宗雄教授、中興大學分生所許文輝所長、中山醫學院醫學系蔡榮泰教授對於本論文之細心審閱、詳加斧正，深表誠摯的謝意。並感謝王朝所長、醫研所李宣佑教授及毒理所李輝所長於實驗及學業給予協助。

在研究期間，更要由衷感謝歐威志學長與王梅林學姐在實驗上的教導以及生活上的照料，曾才郁同學的相互照應，玉珍阿姨、方瓊瑤學姐、賴瑞芬與曾玉伶學妹所給予的幫助及共度時光都點滴在亦樂心頭。

最後要感謝的是我最最親愛的父母和姊姊，僅以此篇論文獻給你們，由於你們的包容體諒與支持，讓我更有毅力繼續前進。並且感謝愛我的人及朋友所給予的鼓勵並且致上我最深的謝意。

黃亦樂 謹誌於  
中山醫學院生物化學研究  
7.22.97

## 摘要

台灣三號人類多瘤性病毒 JCV 之次要結構蛋白 VP2 基因選殖至 pGEX4T-1 質體並在大腸桿菌內表達。全長 1035 對核酸也定序出來，利用電腦分析程式得知其氨基酸轉譯序列以及所有的限制酶反應位置。與 Mad-1 及 GS/B JCV 的 VP2 氨基酸序列比較得知 8 個氨基酸的差異。VP2 蛋白在 *E.coli* 內大量表達後也被純化出來。利用純化的重組 VP2 蛋白免疫兔子而得到該蛋白之抗體，以利 VP2 之鑑定及偵測。

JC 病毒次要結構蛋白 VP2 在細胞質生合成後，會被送入細胞核內組合 (assembly) 成完整的病毒顆粒，因此推測 VP2 應含有轉核訊號 (nuclear localization signal)。因此，我們將全長 VP2 及 C-端切除的 VP2 分別與螢光蛋白融合並轉染至 COS-7 細胞內，觀察此融合螢光蛋白細胞內的移動位置。結果發現全長 VP2 可以完全地將融合螢光蛋白帶入核內。C-端最後 13 個氨基酸切除的 VP2 並未喪失轉核功能，因此亦能完全地將螢光融合蛋白帶入核內。然而 C-端最後 29 個氨基酸切除的 VP2 卻無法將螢光融合蛋白帶入核內，只停留在細胞質內。在此證實 JCV VP2 含有自己的轉核訊號，而其轉核訊號及位於 C-端最後 29 個氨基酸內。

VP2 在細胞質生合成被送入核後，便進入病毒顆粒之組合，VP2 被推測存在於 JC 病毒顆粒內部，可能會與 viral genome 結合，使該病毒趨向成熟組合。因此，我們利用 Southwestern blotting 的方法探討 VP2 與 DNA 結合之能力，結果發現全長的 VP2 確實能與 DNA 結合，而且其 DNA 結合區 (domain) 位於 C-端最後 13 個氨基酸。此外，利用點突變的方法將 C-端最後 13 個氨基酸分別改變再測其 DNA 鍵結能力。結果發現 Lys-332 及 Lys-336 被改變後對 DNA 的結合力大量地下降。

本論文研究結果證實 VP2 有自己的轉核訊號及 DNA 結合能力，且都位在 C-端但不同區域。這些結果對 JC 病毒顆粒組合機轉及感染途徑提供一些重要訊息。



## Abstract

The gene of the minor capsid protein VP2 of human polyomaivurs JCV was cloned into a prokaryotic expression vector, PGEX4T-1, and expressed in *E. coli*. The 1035 base-pair DNA of VP2 was sequenced. The amino acid sequence of VP2 was translated and the restriction sites were also analyzed by a computer program. It was found that there are 8 amino acids differences among Mad-1, GS/B and Taiwan-3 JCV VP2. VP2 protein was expressed in *E. coli* and purified by elentroelution. VP2 antiserum was generated in a rabbit by using the purified recombinant VP2 protein.

After synthesized in the cytoplasm, VP2 is transported into the nucleus for virion assembly. In order to identify the nuclear localization signal (NLS) of VP2, full-length VP2 and C-terminal truncated VP2 were cloned into a eukaryotic expression vector, pEGFP-C1, to express a fluorescent VP2 fusion protein in Cos-7 cells. After transfection of Cos-7 cells, intracellular localization of the fusion protein was visualized under UV microscope. The results showed that wild-type VP2 was able to translocate the fusion protein into the nucleus. The last 13 amino acids truncated VP2 did not loss its function for nuclear transport. However, the last 29 amino acids truncated VP2 was unable to transport the fusion protein into the nucleus and retained in the cytoplasm. Therefore, the NLS of VP2 was demonstrated to located at the C-terminal last 29 amino acids of VP2.

After transported into the nucleus, VP2 should interact with viral genome for virion assembly. Therefore, DNA binding activity of VP2 was further investigated. Southwestern blot was employed for DNA binding assay in this study. Our results showed that VP2 was able to bind to DNA but the last 13 amino acids truncated VP2 was not. Furthermore, the last 13 amino acids were mutated by site-directed mutagenesis to determine the crucial amino acid(s) for DNA binding. The results showed that Lys-332 and Lys-336 mutated VP2 reduced DNA binding activity drastically.

The results in this study demonstrated that the NLS and the DNA binding domain of VP2 were located at C-terminus but at different regions. These findings may provide some important information in the mechanisms of virion assembly and infection pathway of JC virus.

## 人類多瘤性病毒 JCV 背景介紹

### 人類多瘤性病毒 (Human polyomavirus) 簡介

簡單的說，多瘤性病毒就是會引發多種類形腫瘤的病毒。而人類多瘤性病毒屬於乳多瘤病毒科 (Papovaviridae) 的一屬，具有二十面體 (icosahedron) 之蛋白質外殼 (capsid)，由 72 個次殼體 (capsomere) 組成，不具有套膜 (envelope)，約 45 nm 的大小。病毒基因是一雙股環狀 DNA，被包裹在殼體內。病毒外殼 (capsid) 是由 VP1 polypeptide 構成的 72 次殼體所組成，內含有圓形，超螺旋 (circular supercoiled) 的雙股 DNA，分子量約有  $3 \times 10^6$  道爾頓 (dalton)。而人類多瘤性病毒有 JC virus (JCV) 及 BK virus (BKV)。除此之外，SV40 為猿猴類多瘤性病毒，以及鼠類多瘤性病毒 (mouse polyomavirus)，鳥類的有 (Buderigar Fledgling Disease Virus) (92)。

### JCV 的基因組成

在 JCV (Mad-1) strain 的基因組中 (5130bp) (53) 與 BKV (Dun) strain (103) (5153bp) 有 75% 的相似性，而與 SV40 776 strand (5243bp) (99) 則有 69% 的相似性。在基因組 (genome) 中包含了兩個調節蛋白 (regulatory protein)，large T 及 small T，及三個結構蛋白 (VP1、VP2、VP3) 和 agnoprotein，和 SELP (SV40 early leader protein)，在 JCV 中有 JELP，於 BKV 中有 BELP。

#### (1) 調節序列 (Regulatory sequence)

JCV (Mad-1) 的調節區位於第 5014 至第 276 個核苷酸，共 393 個核苷酸，具有 promoter，enhancer，及複製起始序列。複製起始位置之主要序列 (core sequence) 含有了 64 個核苷酸，其中又可分為三個功能性的區域，一個為 27 個核苷酸的 palindrom sequence，其中含有 4 個  $5' \text{-GAGGC-3'}$  序列的重複 (36, 43, 109, 121, 125)，第二個是 inverted repeat，位於 palindrom sequence 的前端，第三個則是 AT-rich 的區域，位於 palindrom sequence 的後端 (8, 37, 38, 41, 55, 64, 110)。這三區域皆可被 Large T 調節蛋白結合，並促使 DNA 複製。另外還有兩個輔助序列 (auxillary sequence)，為可被 SP1 轉錄因子 (transcription factor) 結合的 GC-rich sequence，及二個

72 base pair 的 tandem repeat 序列，這些序列共同存在於 BKV, JCV, SV40 的複製起始位 (replication ori site)，且相似性很高 (106)，而且也都可被 Large T 調節蛋白結合，促使 DNA 複製。

Mad-1 JCV 具有兩個 TATA BOX promoter，位於 tandem repeat 內，另外，JCV 也有一 GC-rich BOX (5´-PyPyCCXCCC-3´) 序列可被 SP1 轉錄因子結合 (44)，而調控 early gene 及 late gene 的轉錄，及 DNA 的複製 (8, 14, 75, 76)。其複製起始位置上有兩個 large T 調節蛋白結合位置，稱為 site1, site2，位於 promoter / enhancer 上游的 5´-GAGGC-3´ 序列。

Feigenbaum 等人 (51) 提出 JCV 感染宿主有嚴格限制可能有兩個原因，第一是 early gene 產物的表現，第二是 DNA 的複製率。JCV early gene 的表現須透過宿主細胞內組織特異性因子 (tissue specific factor) 辨認 JCV 的 promoter 及 enhancer 序列，而 DNA 的複製則只有靈長類宿主細胞內有 species specific factor 可幫助 DNA 複製。

## (2) 結構蛋白 (Capsid protein) 基因

在人類多瘤性病毒 (polyomaviruses) late region 中，包含 3 種結構蛋白基因 VP1, VP2 及 VP3。其各自有完整的解讀序列 (open reading frame)，轉錄方向與 early gene 轉錄方向相反。其中最大的是 VP1 結構蛋白，VP3 是 VP2 一部分，VP3 可由 VP2 C-端轉譯出來，VP2 及 VP3 的 C-端核酸序列一部分會與 VP1 的 N-端核酸序列一部分重疊。此外，agnoprotein 可能與結構蛋白組成有關 (5, 17, 100)。JCV, BKV, SV40 三種病毒的 agnoprotein N-端的 2/3 有很高的相似性，而近 C-端的部分則有很大的差異，

## (3) Early leader peptide 基因

在 SV40 發現 Early leader peptide (71)，其 early mRNA 轉譯起始位置會往前移 69 個核苷酸，形成一新的起始點，而多出一段 23 個氨基酸的 peptide 就稱 SELP (SV40 early leader peptide)。同樣的情形也可能出現在 JCV 及 BKV。因為多了一個 AUG 的起始點，可能會干擾下一個 AUG 起始點 (72, 73)，所以 JELP 的產生對 large T 蛋白及 small t 蛋白的複製可能是有影響的。

## 人類多瘤性病毒之分離與宿主偏好性

在 1965 年時 JC 病毒由 Silverman, 等人用電子顯微鏡在進行性多病灶腦白質病 (progressive multifocal leukoencephalopathy; PML) 病人的腦部組織觀察到 (108)。在 1971 年從一位進行性多病灶腦白質病病人的腦部組織分離出 JC 病毒 (195)。同年也從一位 39 歲的腎臟移植病人的尿液中分離出來 BKV(54)。JC 病毒完全是屬於人類感染的病毒, 在 1977 年時 Padgett 等人廣泛篩檢不同動物的檢體都沒有偵測到 JC 病毒的抗體 (110)。1980 年 Hogon 等人在腎臟移植病人尿液中分離出 JC 及 BK 兩種病毒 (67)。Coleman 等人也在懷孕婦女尿液中分離出疑似 JC 的病毒 (31)。在 1983 年時 Grinnel 等人 (61) 發現 3 名進行性多病灶腦白質病病人其身上的 JC 病毒除了分佈於腦部外, 也廣泛的分佈於病人的脾臟, 淋巴結, 肺, 肝臟, 腎臟。由此推測 JC 病毒可透過血流散佈在不同器官, 尤其網狀淋巴系。說明 JCV 是有系統的分佈, 同樣的 Tornatore 也在 38% AIDS 病人的週邊淋巴球發現 JCV。

人類的胚胎膠細胞 (primary human fetal glial cell) 是少數可用於體外組織培養的細胞株之一 (95)。若將 JCV 由原來的人類的胚胎膠細胞培養中移到非洲綠猴細胞或老鼠胚胎細胞或人類胚胎腎臟、小腸、肺及肝等細胞都無法培養成功。同樣將 JCV 培養於人類的轉形上皮細胞 (6, 7), 腦細胞 (122), JCV 也無法持續繁殖, JCV 在 primary cell culture 很困難, 當培養於人類的胚胎膠細胞時很難觀察到細胞病變 (CPE), 若是培養於神經膠母細胞 (spongioblast) 約 2-3 個星期則可觀察到神經膠母細胞變大及變形的細胞病變, 再接著數週細胞便會溶解掉。因為人類的胚胎膠細胞不易培養且能獲得的來源有限, 常造成研究的不便, 所以企圖獲得 transformed cell line, 其中 SVG 及 cPOS 細胞株是經過 SV40 defective mutant transform 的人類的胚胎膠細胞 (81, 82)。另外 POJ 細胞株是經過 JCV transform 的細胞株, 可供無缺陷的 JCV 感染, 也可供 JCV T antigen mutant 或只包含 JCV 複製起始點 (Ori site) 之載體的 DNA 複製 (80, 81, 84)。

## JCV 與進行性多病灶腦白質病 (Progressive multifocal leukoencephalopathy)

JCV 會破壞寡突膠細胞, 寡突膠細胞負責產生中樞神經系統的髓質, 進行性多病灶腦白質病是一種中樞神經系統 (central nervous system) 退化的疾病 (119, 120)。其特性是髓質病灶逐漸的變多與擴大。在大多數進行性多病灶腦白質病的病人, 免疫功能受抑制 (12, 118), 由於免疫功能的缺失, 可能導致 JCV 伺機性感染 (opportunistic pathogen)。最近的調查發現, AIDS 病人也有 2-7% 會同時患有進行性多病灶腦白質病。

白質與灰質內形成髓質的寡突膠細胞會受破壞。這樣一個疾病的過程稱 leucoencephalopathy。從進行性多病灶腦白質病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分的皮質並侵入灰質 (gray matter)。而 JCV 感染寡突膠細胞會使其溶解 (lysis)，而造成脫髓鞘現象。在無脫髓質的寡突膠細胞也包含了病毒的 DNA 及蛋白，可用免疫組織化學法 (immunocytochemistry) 及 *in situ* hybridization 偵測 (83)。同時於腦血管細胞裏也可見到被 JCV 感染的細胞，也說明了 JCV 可能透過血流散佈到中樞神經系統 (1, 2)。然而病毒 late 蛋白較少在星形膠細胞中表現 (2)，而導致 JCV 流產感染 (abortive infection)。除了寡突膠細胞，星形膠細胞外，巨噬細胞也會出現在病灶區，有可能是宿主產生的免疫反應。同時患有 AIDS 與進行性多病灶腦白質病的病人，這種巨噬細胞浸潤特別明顯，在體外實驗發現 HIV 的基因產物 tat 可活化 JCV promoter，在理論上可解釋 JCV 及 HIV 導致的協同感染 (synergistic infection)。

一般如淋巴增生、抗癌藥物治療、器官移植後免疫抑制、AIDS 等病人都可能患進行性多病灶腦白質病。由 Willoughby 等人 (87) 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) 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)。視覺缺失是最早的症狀，在診斷上，除了症狀外，可配合 X 光斷層攝影 (tomography)，可見到後大腦半球白質脫髓鞘多病灶徵狀 (10, 16, 32, 74)。此外也可以利用核磁共振 (MRI) 的技術。而最可信的診斷應是活體切片 (biopsy)，當病理切片不明確時可輔助免疫組織化學法或 *in situ* hybridization (99) 來鑑定。

在孩童時期 JCV 是原發性感染的，但症狀不明 (subclinical)，感染後會在尿中分離到病毒可能是病毒到達腎臟後可以潛伏於此，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中病毒增加來證實。同時病毒活化也見於腎臟移植 (3, 54, 67)，骨髓移植及孕婦 (30, 31, 35, 58)，癌症病人 (66) 及 AIDS (88) 等病人。

### JCV 之致病發生 (Pathogenesis)

PML 乃因 JCV 破壞製造髓質的寡突膠細胞，而使腦部功能缺損，且 JCV 通常是伺機性感染。JCV 原發性感染是在腦部或是腎臟仍是未知，且如何抵達腦部仍有待了解。但大多數的研究顯示 JCV 的原發性感染是在腎臟，當免疫功能降低後才使 JCV 出現基因異變，變成更有效率地複製其 DNA，也就是活化，而造成 PML。由於基因調節的改變，使 JCV 在不同組織中可生長。PML

不管是 JCV 原發性感染或潛伏著活化後感染，都可預測病毒是透過血流到達腦部。另外從 PML 病人網狀淋巴系統中發現有病毒存在，在 1988 年 Houff 等人 (68) 用 DNA-DNA hybridization 及免疫組織化學法，測試兩位 PML 病人骨髓、脾臟及腦的單核細胞，結果測到有 JCV 存在，這些作者推論 JCV 可能感染骨髓的單核細胞後便潛伏，接著感染 B 細胞，隨著循環進入腦部而感染寡突膠細胞。

### JCV的癌生物學 (Oncogenecity and cell transformation)

JCV 在結構及基因上均類似於 SV40 及鼠類多瘤性病毒，所以 JCV 被分離出來之後，即測其致癌性，並且 PML 病人常有系統腫瘤 (systemic tumor) (淋巴性而非中樞神經性)。而由於倉鼠 (hamster) 對於 SV40 具感受性 (44)，所以選擇倉鼠做為實驗動物。若將 JCV 注射到倉鼠大腦內或皮下，80% 倉鼠均產生神經膠母細胞瘤 (glioblastomas)，神經管胚細胞瘤 (medulloblastomas) (69, 72)。在這些腫瘤細胞可發現 T 蛋白質，若將其跟人類膠細胞一起培養，則倉鼠的腫瘤細胞會釋出具感染性病毒。若接種到倉鼠眼內，則誘發腹部神經母細胞瘤，且轉移到肝、骨髓、及淋巴結 (68)。

Nagashima 等人從 PML 病人分離一株 JCV (Tokyo strain)，接種於新生倉鼠的腦內後，也同樣造成 95% 的倉鼠產生神經管胚細胞瘤。在倉鼠若產生神經管胚細胞瘤，最常見是由 JCV 所造成。JCV 所感染的標的細胞是 extragranular cell (85)。JCV 是人類病毒中唯一會導致靈長類產生腫瘤的，在成猴 (owl monkey) 腦內接種 JCV，16-25 個月後會導致 1/2 的成猴產生腫瘤 (79)，其中一隻是得星形膠細胞瘤 (astrocytoma)，另一隻則是神經瘤及膠細胞瘤。除了 owl monkey 外，JCV 接種於 squirrel monkey 也會造成星形膠細胞瘤。

JCV 可使人類胚胎膠細胞及人類血管內皮細胞轉形，最早被 JCV 轉形的 non permissive cell 是 primary hamster brain cell (79)，另外還有兩種被轉形的細胞株，分別是 BHK-21 (baby hamster kidney cell)，及 Rat2 (rat fibroblast) (9)。JCV、BKV、SV40 都會使上述的細胞變形從這些結果發現，JCV 的調節基因及 T 抗原基因造成 JCV 轉形能力降低。在齧齒類動物 (rodent) 細胞內，JCV 可啟動 SV40 及 BKV T 抗原表達而導致齧齒類動物細胞轉形。若只有 JCV 則無法達成轉形。T 抗原造成細胞轉形的位置已被鑑定出來。在 JCV、BKV 分別是：T 抗原靠 C-端的第 437/438 個氨基酸，在 JCV，SV40 分別是：T 抗原的第 81/82 (63) 及 411/412 個氨基酸。藉由免疫沉澱

(immunoprecipitation) 的實驗，推測 JCV large T 抗原比 BKV large T 抗原不穩定，而 BKV large T 抗原又不如 SV40 T 抗原穩定 (28)，T 抗原造成細胞轉形可能需與細胞內蛋白有交互作用才可啟動，並有兩種抑癌基因 (tumor suppressor gene) 產物 P53 (65) 及 Rb (40) 兩種蛋白可與多種病毒 T 抗原作用，JCV large T 抗原在體外實驗發現只可與 Rb 蛋白有很微弱的結合 (45)。但於 POJ 細胞中，JCV large T 抗原可與另一抗癌蛋白約 107 Kd 很有效的結合 (46)。且結合區域與 JCV large T 抗原與 Rb 蛋白結合區域重疊。JCV large T 抗原也會與 transform rat 2 cell, hamster tumor cell 中的 P53 形成穩定的複合物 (107)。在 JCV 轉形的細胞中，常可發現 JCV 基因組有多重複製，且基因順序排列不一。利用南方墨點法發現 JCV DNA 插入宿主細胞的染色體時是隨意的 (91)。而被 BKV, SV40 轉形的細胞，BKV, SV40 的 DNA 通常不會插入宿主的染色體 DNA (15, 27, 97, 112, 113)。JCV 會插入宿主細胞染色體最少有 4-5 個位置，因為須要很多位置所以可能是造成 JCV 轉形細胞效率差的原因 (84)。JCV 或其基因無法使血管內皮細胞轉形 (50) 但可使倉鼠膠細胞轉形 (52)。BKV 或其基因可使倉鼠、小白鼠、兔子、猴子、人細胞轉形。SV40 或其基因可使人類胚胎或新生兒腎臟細胞 (104) 及胚胎星形膠細胞 (107) 及成人骨骼肌細胞轉形 (89)。

#### 人類多瘤性病毒在台灣地區感染情形之研究

在過去幾年我們利用簡易又敏銳的PCR 方法 (21) 檢測在台灣地區之孕婦 (23)、自體免疫疾病病人 (22)、及健康人 (116) 之尿液。在這些檢體中發現存在有 CY、Taiwan-1、Taiwan-2 及 Taiwan-3 JC 病毒以及 Taichung-1和 Taichung-2 BK 病毒。在健康人、孕婦及自體免疫疾病病人的尿液中分別有 13.3%、26% 及 37% 的檢體含有JC 病毒，而只有 3-6% 的檢體含有 BK病毒(116)。然而血清學測定結果發現健康人、孕婦及自體免疫疾病病人，這三個族群皆約有75%為JC病毒陽性反應(117)。此外，Taiwan-3 JC 病毒的genome 含有5111 base-pair 也被選殖出來(93) 以利其生理及病理之研究。Taiwan-3 JC 病毒之主要結構蛋白 VP1 也分別被選殖及於 *E.coli* 及昆蟲細胞 (18) 內表達。我們發現於 *E.coli* (94) 及昆蟲細胞內 (18) 表達之 VP1 蛋白可自我組合 (self-assembly) 形成殼體。此殼體可用於疫苗之檢驗試劑之備製，亦可能成為攜帶基因之載體，可應用於基因治療。

## 本研究相關背景及結果簡介

在多瘤性病毒當中，以鼠類及猿類多瘤性病毒的探討較為透徹，對於病毒殼體的組裝已知有主要殼體蛋白 VP1 及次要結構病毒蛋白 VP2 和 VP3(4, 77, 78)，其分子量分別約為 40、37 及 26kDa (11, 86)。由於鼠類及猿類多瘤性病毒殼體的三度空間 X-射線射圖已於是 1982(98)及 1991(77)被解析出來，對於病毒組裝的模型提供更多的參考價值。

然而對於次要結構蛋白 VP2 和 VP3 的主要角色與在病毒顆粒中心的存在位置也尚未清晰，依據病毒結構蛋白之氨基酸序列獨特相似區域，以歸納出可能具有功能性的 domain，進而對病毒次要結構蛋白 VP2 及 VP3 的功能更為具體化。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 之氨基酸次序與 VP2 之 C'端三分之二完全相同。在 SV40 次要結構蛋白 VP2、VP3 具有 DNA 結合區域(34)與 NLS (nuclear localization signal)(49)，在 polyomavirus 之 VP2(25)也具有 NLS，並且其功能區域皆發生在 Lys、Arg 集中的 domain(25)，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。

在我們實驗室中，從一自體免疫病患尿液發現 Taiwan-3 JCV，以 PCR 的方法放大其 VP2 基因。將其殖入表達螢光蛋白載體 pEGFP-C1，將 JCV VP2 基因及 C-端 deleted 之 VP2 基因殖入，且轉染至細胞 (COS-7) 進行表達，並以螢光顯微鏡觀察 VP2 螢光融合蛋白存在於細胞的位置，根據其螢光是否聚集於核內或細胞漿質，以決定 NLS 在 VP2 中的區域。發現 VP2 C-端 13 個氨基酸缺失依然能夠入核，而 C-端 29 個氨基酸缺失之 VP2 則聚集於核外，顯示 NLS 是在 JCV VP2 C-端第 13 個氨基酸至 C-端 29 個氨基酸之間的區域。此外，VP2 基因亦被殖入另一表達載體 pGEX-4T 進行蛋白質表達，且其氨基酸次序與 SV40 VP2 有很高的相似性(102)，針對於 VP2 蛋白 C-端之 basic amino acid 集中區域，以 Southwestern 的方法進行 DNA binding affinity assay，同時以 PCR 的方法設計出 C-端 truncated 之 VP2 及點突變之 mutants，發現 JCV VP2 之 Lys-332 及 Lys-336 為重要影響與 DNA 結合能力之氨基酸。

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。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。本研究顯示 JCV VP2 兼具了這兩種特性，而這兩個功能區域皆存在 C-端不同位置上，這些結果對於病毒組裝之感染路徑提供了重要的訊息。





## 材料與方法

### 尿液檢體

尿液檢體是從中山醫學院附設醫院免疫風濕科一位患有類風濕性關節炎的病人取得，該位病人已發病四個月，曾經服用了hydroxychloroquine，methotrexate，prednisolone 等藥物四個月取得尿液後，本實驗室以 PCR，Southern hybridization 及 DNA sequencing 等方法鑑定出此病人尿液中含有 JCV 病毒(22)，並將此病毒命名為 JCV Taiwan-3 strain(93)。而尿液取得後放在  $-20^{\circ}\text{C}$  儲存。

### 載體 pGEX4T

本實驗所用的 DNA 載體是 pGEX4T 購自 Pharmacia 公司，其上含有一 Glutathione-S-transferase (GST) 的基因。此載體提供了一個可供表達及純化偵測的系統，此載體上包含了一個 tac 啟動子 (promoter)，可被化學物 Isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG) 誘發，且有高度的表現程度同時提供了 Ampicillin 及 lac I<sup>q</sup> 兩個可供篩選的標記。Multiple cloning site 緊接在 GST 基因之後，因此當蛋白質表現出來後，是以一融合蛋白的形式，即 GST 後接著所要的蛋白質。pGEX4T 的基因圖如圖2。

### 利用 PCR Amplify Taiwan-3 JCV VP2 基因

JCV Mad-1 strain 主要結構蛋白VP2基因序列由第 526 至第 1560 個核苷酸，共有 1035 個核苷酸，利用已知的 JCV Mad-1 strain 的VP2 DNA 序列合成的兩段引子 (primer)，JCV sense primer (S1) : 5'-CAC TTG GGA TCC ATG GCC CCA ACA AAA-3' 及 JCV antisense primer (AS1) : 5'-ACA TGT GGA TCC TTA CAG CAT TTT TGT CTG CAA-3'且為了基因選殖的方便，我們在兩段引子的兩端各加一個 Bam H1 的 linker。在 PCR 進行前要先前處理尿液檢體，先將尿液超高速離心14,000 xg，1.5 個小時，取出含 JC 病毒的沉澱物 (pellet)，加入 200  $\mu\text{l}$  的水，再取出 5  $\mu\text{l}$  再加入 3  $\mu\text{l}$  的水及 2  $\mu\text{l}$  的 lysis buffer (final concentration 10 mM Tris pH 8.0，1mM EDTA，50 mg/ml proteinase K)  $50^{\circ}\text{C}$ ，15 分鐘然後於  $100^{\circ}\text{C}$  沸水中加熱 10 分鐘，再離心12,000，3 分鐘，取出上清液 9  $\mu\text{l}$ ，再加入 JCV VP2 S1 (sense) primer 1  $\mu\text{l}$  (20 pmole)，及 JCV VP2AS1 (antisense) primer 1 $\mu\text{l}$  (20 pmole) 及 8  $\mu\text{l}$  2mM dNTP (dATP，dTTP，dCTP，dGTP)，8  $\mu\text{l}$  final concentration 2.5mM

MgCl<sub>2</sub>, 10 μl 10X Taq Buffer, Tag enzyme 1μl 及 ddH<sub>2</sub>O 62 μl 共 100 μl 的反應物，最後再加入 40 μl 的礦物油。放入 thermocycler 中反應。反應條件如下：95 °C, 45 秒、55 °C, 2分鐘、72 °C, 2 分鐘，共 35 個循環。反應後可取出 2 μl 在 1% agarose gel 上觀察。

#### 純化 PCR 產物及選殖前處理

PCR 產物的純化是利用廠商 (QIAGEN) 開發的一組 QIAE II gel extraction kit。首先將 PCR 產物 50 μl 去跑 1% agarose gel 電泳，切出含 JCV VP2 基因的 band，加入 500μl buffer QX I 放於 55 °C，再加入一種可結 DNA 的 glass beads (QIAEX II) 10μl，混合均勻，於 55 °C 靜置 15 分鐘，每三分鐘 vortex 一次，離心 12,000 rpm, 20 秒後，移去上清液，再以 500μl buffer QX I 清洗，離心 20 秒後，移去上清液，再以 500 μl buffer PE 清洗三遍，經過乾燥後，最後加入預熱 60-70 °C 的滅菌水 50 μl 等 3 分鐘再離心 12,000 rpm, 20 秒，則 JCV VP2 DNA 之 PCR 產物便回收在水溶液中。

回收的 JCV VP2 DNA 產物為方便接入載體 (pGEX4T) 中，所以須將兩端 blunt end VP2 DNA 利用 BamH1 切成 stagger end。先將 JCV VP2 回收產物取出 40 μl，加入 3μl /30 units 的 Bam H1 enzyme (Promega)，再加入 5 μl 10X Buffer, 2μl ddH<sub>2</sub>O 於 37 °C 反應 4 小時。再用 kit (Wizard<sup>TM</sup> Minipreps DNA purification system, Promega) 回收產物，將被 Bam H1 處理過的 PCR 產物加入可結合 200 base pairs 至 20 kilo base pairs DNA 的 resin 1 ml，混合均勻，通入接在針筒前端的 column 將 DNA 留在 column 的 resin 上，再以 2ml 80% isopropanol 清洗，離心 12,000 rpm, 20 秒將殘餘的 isopropanol 去除，最後加入預熱 60-70 °C 的滅菌水 50 μl 至 column 中等一分鐘再離心 12,000 rpm, 20 秒，則可獲得產物。

#### 選殖前載體的處理

同樣的載體 pGEX4T 在選殖前也要先處理，首先要從 *E.coli* JM109 strain 中抽出載體。將含有載體的 *E.coli* 37 °C 隔夜培養於含 ampicillin (100 μg / 1 ml L broth) 的 5 ml L broth (final concentration 1% tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract) 中，次晨再分裝成 1.5 ml 菌液為一管，離心 12,000 rpm, 3 分鐘，取出沉澱物，再用由從廠商購得的 Wizard<sup>TM</sup> Minipreps DNA purification system (Promega) 抽出載體。所用的方法是加入 200 μl resuspension solution (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA) 將沉澱的菌體打散，再加入 200 μl lysis solution (0.2 M NaOH, 1% SDS) 混合均勻可溶解細菌的細胞壁及細胞膜，之後再加入 200 μl neutralization solution (2.55 M

potassium acetate, pH 4.8) 混合均勻後，離心12,000 rpm，5分鐘，取出上清液加入可結合 200 base pairs 至 20 kilo base pairs DNA 的 resin 1 ml，混合均勻，通入接在針筒前端的 column 將 DNA 留在 column 的 resin 上，再以 Wash solution (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA 1:1 Dilute with 95% ethanol) 2 ml 清洗，離心12,000，20秒將殘餘的 Wash solution 去除，最後加入預熱 60-70 °C 的滅菌水 50 $\mu$ l，至 column 中等一分鐘再離心12,000 rpm，20秒，以回收 plasmid DNA。

抽出的 pGEX4T 載體須先用限制酶 Bam H1 在 multiple cloning site 將載體切出可與 JCV VP2 (insert) 互補的切點，首先將抽出的載體 pGEX4T 取出 40  $\mu$ l (約 5  $\mu$ g) 加入 3  $\mu$ l (15U) 的 Bam H1, 5  $\mu$ l 10X buffer, 及 2  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 於 37 °C 反應 4 個小時。之後放入 72 °C 水浴中 15 分鐘破壞 Bam H1 活性，之後再加入 calf intestine phosphatase (CIP) 3  $\mu$ l, 6 $\mu$ l 10X buffer, 1  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 於 37 °C 反應 1個小時以去除 5-端的磷酸，再用 Wizard<sup>TM</sup> Minipreps DNA purification system (Promega) 回收 DNA 將被 Bam H1, CIP 處理過的載體加入可結合 DNA 的 resin 1 ml, 混合均勻，通入接在針筒前端的 column 將 DNA 留在 column 的 resin 上，再以 2ml 80% isopropanol 清洗鹽類，離心 12,000 rpm, 20 秒將殘餘的 isopropanol 去除，最後加入預熱 60-70 °C 的滅菌水 50  $\mu$ l 至 column 中等一分鐘再離心 12,000 rpm, 20 秒，則可回收產物。

### 基因選殖

將 BamH1 及 CIP 處理過的 pGEX4T 載體 (圖1, lane4) 2 $\mu$ l 分別加入已處理過的 JCV VP2 insert (圖1, lane3) 2  $\mu$ l 再分別加入 1  $\mu$ l T4 DNA ligase (3U), 1  $\mu$ l 10x T4 DNA ligase buffer 最後分別加入 ddH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ l 共 10  $\mu$ l 於 16 °C 作隔夜 ligation 反應。

### E.coli 轉形

Competent cell 的製備，將 *E.coli* JM109 strain 菌種於前一夜接種於 5 ml 滅過菌的 L. broth 不含任何抗生素，37 °C 隔夜培養，次晨再取出 0.5 ml 接種於 50 ml (1:100 稀釋) 滅過菌的 L. broth，培養約 2 個小時直到 O.D. 600 值達 0.4-0.6，此數值是 *E.coli* 已到達 mid-log phase，再離心 2,500 rpm, 5 分鐘將菌體離下來之後倒掉上清液再加入 25 ml 冰浴過的 0.1 M CaCl<sub>2</sub>，輕輕的使沉澱物懸浮，再放入冰浴中 4 °C。30 分鐘，再離心 2,500 rpm 5 分鐘將菌體離

下來之後倒掉上清液再加入 1 ml 冰浴過的 0.1 M CaCl<sub>2</sub>，輕輕的使沉澱物懸浮再放入冰浴中 4 °C，60 分鐘。

Competent cell 製備好了以後，取出 100 μl 的 competent cell 加入 ligation lygase 10 μl 混合均勻後，置於冰中 30 分鐘接著以 42 °C 水浴 heat shock 3 分鐘，再放入冰浴 5 分鐘，再將混合物均勻塗在含 ampicillin (100 μg/ml) 的選擇性培養基 (agar plate) 於 37 °C 隔夜培養。

#### 篩選含有正接 JCV VP2 基因的 *E.coli* 菌落

從含有 ampicillin 的培養基中挑出單一菌落種入含有 ampicillin(100μg/ml) 的 5 ml L broth 中，37 °C 隔夜培養 16-20 個小時，以 alkaline lysis method 方法萃取載體。將接種於 5 ml L broth 的菌液各取出 1.5 ml 菌液離心 12,000 rpm，5 分鐘，然後加入 100μl solution I (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA) 打散沉澱的菌體，再置於冰上 10 分鐘，之後加入 200 μl solution II (0.2N NaOH, 2% SDS)，混合均勻後置於冰上 10 分鐘，再加入 150 μl solution III (3 M sodium acetate pH 4.0)，混合均勻後置於冰上 10 分鐘，離心 12,000 rpm，15 分鐘，取上層液，加入 5μl (5ng / μl) RNase 於 37 °C 反應 1 小時後加入 500 μl phenol 混合均勻後置於室溫 10 分鐘，離心 12,000 rpm，5 分鐘，取上層液加入 250 μl chloroform 及 250 μl saturated phenol 混合均勻後置於室溫 10 分鐘，離心 12,000 rpm，5 分鐘，取上層液加入 300 μl chloroform 混合均勻後置於室溫 10 分鐘，離心 12,000 rpm，5 分鐘，取上層液加入 100% ethanol 放入 -70 °C 冷凍庫中，30 分鐘。離心 16,000 rpm，15 分鐘，小心倒掉酒精，加入 75% ethanol 200 μl 清洗鹽類，離心 16,000 rpm，5 分鐘，小心倒掉酒精再冷凍離心乾燥 (speed-vac)。最後加入 50 μl 無菌水。

#### Restriction mapping

將抽出的載體以內切酶 PstI/BglII 及 Bam HI 作 restriction mapping，用 Bam HI enzyme 可將接入的基因從接入的接點切出來，形成一 4969 個核苷酸的載體 DNA 及一 1035 個核苷酸的 VP2 DNA。利用 PstI / BglII enzyme 則可區分接入的基因是不是正確的方向，若是正接可切出兩段的基因，分別是 1158 與 4846 個 base pairs 若是反接則會切出兩段基因分別是 1851 與 4153 個核苷酸。作法是將抽出的載體 4 μl，加入 1μl (10unit) Bam HI enzyme 及 1μl buffer，及 4μl 無菌水於 37 °C 反應 1.5 小時，再於 1% agarose gel 電泳上觀察結果。同樣將抽出的載體 4 μl 加入 0.5μl (20unit) PstI / BglII enzyme 及 1 μl buffer，及 4μl 無菌水於 37 °C 反應 1 小時，再於 1% agarose gel 電泳上觀察結果。

## GST-VP2 融合蛋白在 *E.coli* 內之表現

由於所用的載體是 pGEX4T 其為 expression vector，前有 tac promoter 所以當載體中有接入 JCV VP2 基因時，可被 (IPTG) 誘導出高表達的 GST 及 JCV VP2 的融合蛋白。作法是將有正接 JCV VP2 基因於載體的 *E.coli* 於含有 ampicillin (100  $\mu$ g / 1ml) 的 5 ml L broth 37 ° C 隔夜培養，次日取出 0.5 ml 菌液加入 50 ml L broth，於 37 ° C 培養約 2-3 個小時至 O.D. 600 值到達 0.4-0.6 然後加入 10  $\mu$ l 0.5M IPTG (final concentration 1mM) 於 37 ° C incubator 培養 3 個小時後取出 1.5 ml 菌液，離心 12,000rpm，5 分鐘，將菌體加入 100  $\mu$ l 1:4 稀釋的 SDS-PAGE sample buffer (1% SDS，8% glycerol，5% mercaptoethanol，0.01% bromophenol blue)，在 100 ° C 沸水中煮沸 5 分鐘再以超音波打斷 DNA，最後取出 20  $\mu$ l 以 12.5% 的 SDS-PAGE 電泳分析，並以 Coomassie blue 染色觀察表現情形。

## JCV VP2 (Taiwan-3) DNA 序列的分析

分析 Taiwan-3 JCV VP2 sequence 是採用從廠商處購得的 fmole<sup>TM</sup> DNA Sequencing System (Promega) Kit，首先將篩選到含有正接的 JCV VP2 基因於載體中的菌種 37 ° C 隔夜培養於含 ampicillin (100  $\mu$ g / 1ml) 5 ml 的 L broth 中，次日則利用由廠商購得的 Wizard<sup>TM</sup> Minipreps DNA purification system (Promega) 抽出載體提供分析所用的引子 (primer) 是根據 JCV Mad-1 strain 的 VP2 序列所設計的，其序列如(圖3)所示。

fmole<sup>TM</sup> DNA sequencing system (Promega) 是利用改良的 sequencing grade Taq DNA polymerase 進行 thermocycling reaction，原理是依據雙氧去核糖核酸鏈終止法。即 enzyme method 利用 polymerase 去延伸一個 primer，與模板雜交，直到終止核苷酸 (ddNTP) 被嵌入，以下便利用 Kit protocol 所建議的用量去進行實驗：

Extension / Termination Reactions : Template DNA 500 fmole (約 1 $\mu$ g)，primer 3 pmole，[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP 1.4 $\mu$ l (10 Ci /  $\mu$ l)，fmole<sup>TM</sup> DNA sequencing 5X Buffer 5 $\mu$ l (250 mM Tris - HCl pH 9.0，10mM Mg Cl<sub>2</sub>)，加水至 16  $\mu$ l 再加入 1 $\mu$ l sequencing Grade DNA polymerase (5U /  $\mu$ l) 到 primer / template 混合物中，再各取 4  $\mu$ l 的 enzyme/primer/template 分別加到 2  $\mu$ l d/dd NTP (d / dd TTP，d / dd CTP，d / dd GTP，d / dd ATP)，最後加入 20  $\mu$ l mineral oil，放入 thermocycler 中反應條件如下：95 ° C，30秒 (denaturation)、42 ° C，30秒 (annealing)、70 ° C，1 分鐘 (extension) 共 30

個 cycle，之後加入 3 $\mu$ l stop solution ( 10mM NaOH, 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanole)，反應完成後於 7M urea 的 8% acrylamide gel，1700V 下進行電泳，乾膠後以柯達 X 光底片壓片並置於 -70 $^{\circ}$ C 進行放射顯影，約3-4 天。

### Sequencing gel 的製作

本部份的實驗所使用的系統是 Bio-Rad Sequi-Gen Sequencing Cell (38 cm  $\times$  50 cm  $\times$  0.4 mm)。Gel solution 是 5 倍的 TBE 24 ml 加 40% acrylamide 24 ml 加 2% bis-acrylamide 24 ml 加 51g 的 urea，然後加水至 120 ml，待其溶解，以 0.45  $\mu$ m 的 filter membrane 過濾。Sequencing gel 的封底是用 gel solution 20 ml 加 10% APS (ammonium persulfate) 500  $\mu$ l 加 TEMED 50  $\mu$ l，而 running gel 是 gel solution 100 ml 加 10% APS 475  $\mu$ l 加 TEMED 90  $\mu$ l。gel 做好後，至少要等上一個小時，讓它可以完全 polymerization。

### JCV VP2 在 *E.coli* 之表現

將篩選到含有 JCV VP2 基因於 pGEX4T 載體中的 *E.coli* strain 接種於滅過菌的 5 ml L broth (含 ampicillin 100 $\mu$ g/1 ml) 中 37 $^{\circ}$ C 隔夜培養。次晨取出 50 $\mu$ l 菌液加入 50 ml (1:100 稀釋) 滅過菌的 L broth (含 ampicillin 100  $\mu$ g/1 ml) 於 37 $^{\circ}$ C 作次培養，約 2-3 個小時，O.D. 600 值達 0.4-0.6 再加入 1mM IPTG (final concentration)，誘導融合蛋白的表現，分別收集表現前及表現後 1、2、3、4、5、6 小時的菌液各 1.5 ml 離心 12,000 rpm，5 分鐘加入 SDS-PAGE sample buffer 100 $\mu$ l 於 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮沸 5 分鐘，各取出 5 $\mu$ l 於 12.5% 的 SDS-PAGE 電泳分析並以 Coomassie blue 染色觀察表現情形。

### 利用 Electroelution 純化 JCVP2-GST

將篩選到含有 JCV VP2 基因於 pGEX4T 載體中的 *E.coli* strain 接種於滅過菌的 5 ml L broth (含 ampicillin 100 $\mu$ g/1 ml) 中 37 $^{\circ}$ C 隔夜培養，次晨取出 5 ml 菌液加入 1,000 ml (1:100 稀釋) 滅過菌的 L broth (含 ampicillin 100 $\mu$ g/1 ml) 於 37 $^{\circ}$ C 作次培養，約 2-3 個小時，O.D. 600 值達 0.4-0.6 再加入 1mM IPTG (final concentration)，誘導融合蛋白的表現，四小時後，離心 5,000 rpm，15 分鐘收集 50ml 菌液菌體，再用 TBS 均勻打散菌體以清洗，離心 5000 rpm，15 分鐘收集沉澱物再用 TBS 均勻打散菌體再清洗一遍，同樣離心 5000 rpm，15 分鐘。最後將菌體用 10 ml TBS 打散，取 0.5 ml 出來，

加入 SDS-PAGE sample buffer 200 $\mu$ l 於 100 °C 沸水中煮沸 5 分鐘，於 12.5% 的 SDS-PAGE 上以 200 V，4.5 小時條件下分離蛋白，之後以 Coomassie blue (50% methanol，10% acetic acid，0.1% Coomassie blue) 染色 10 分鐘，再用脫色溶液脫色 (50% methanol，10% acetic acid) 然後用刀片切下正確位置約 62 Kd 處含有融合蛋白的膠，此蛋白並未在沒有 IPTG 誘導的 *E.coli* 出現以此判定為 GST-VP2 蛋白。用刀片將該膠體切成細片，放入含有 10mM Tris-acetate pH 8.6，0.05% SDS 溶液的 cup 中，cup 外所加入的是 40mM Tris-acetate pH 8.6，0.05% SDS 的溶液，將 GST-VP2 融合蛋白於 3 watts，5 小時的電力，將 GST-VP2 融合蛋白從膠中萃取出來。

#### 利用純化的 GST-JCV VP2 融合蛋白免疫兔子

於免疫兔子前先取兔子血，再將純化出的 GST-JCV VP2 融合蛋白 2 ml 與 2 ml complete Freund's Adjuvant 以超音波 (sonication) 方式混合後，全部注入兔子皮下，10 天後追加注射 (booster) 第一次，所追加的量是 1 ml (final 40 ml 菌液) 融合蛋白與 1 ml incomplete Freund's Adjuvant 同樣以超音波方式混合，然後注入皮下，再隔 12 天後追加注射第二次，追加的量與第一次追加的量相同再隔 7 天後，第一次取血 (bleeding) 約 30 ml。再相隔 5 天後追加注射第三次，所注射的量與第一、二次的量相同，再相隔 10 天後追加注射第四次注射量與前三次相同，相隔 10 天後將兔子犧牲取血。

#### 利用西方墨點法 (Western blotting) 偵測兔子抗 GST-JCV VP2 抗體

取出誘導前及誘導後四小時的 pGEX-JCV VP1/JM109 菌體及只表現 GST 的菌體分別加入 SDS-PAGE 的 sample buffer 100 $\mu$ l，打散菌體後於沸水中煮沸 5 分鐘，sonication 後各取出 5 $\mu$ l 於 12.5% SDS-PAGE 以 200V，4 小時條件下分離蛋白，再將膠上的蛋白利用 HORIBLOT (ATTO) 在 anode buffer I : 0.3 M Tris，pH 10.4，20% methanol。anode buffer II : 25 mM Tris pH 10.4，20% methanol。cathode buffer III : 25 mM Tris pH 9.4，20% methanol，300 mA，40 分鐘條件下轉印至 nitrocellulose paper 上，然後加入 20 ml 的 5% non-fatty milk，於室溫中均勻搖動反應 30 分鐘，blocking 沒有蛋白結合的區域然後直接加入免疫後兔子血清 (第二次取血) (final concentration 1:3000) 於室溫反應 30 分鐘，再加入 TBS-Tween 0.01% buffer 清洗3次，一次五分鐘，之後加入 biotin labeled goat anti-rabbit antiserum 30 ml (Vectastain ABC kit) 於室溫反應 30 分鐘，再加入 TBS-Tween-20 0.01% buffer 清洗3次，一次五分鐘，然後加入 ABC reagent (Avidin DH Biotinylated Horseradish Peroxidase H) 30 ml，於室溫反應 30 分鐘，再加入 TBS-Tween-20 0.01% Buffer 清洗3次，一次五分鐘，最後加入

Diaminobenzidine solution (final concentration 0.01%) 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final concentration 0.012%) 呈色分析。

#### 螢光載體：pEGFP-C1 plasmid

pEGFP-C1 是 CLONTECH 廠商的產品，其將水母綠螢光蛋白 (Green fluorescen protein) 基因接入於表達系統中，其所表現的螢光蛋白可作為一偵測源，這 plasmid 有 kanamycin resistant marker 及 MCS ( multiple cloning site )，pUC Ori 及 CMV promoter 可提供在一些 *E.coli* 及 eukaryotic cell 中進行複製表達，並且有 SV40 promoter，可在 large T transformed cell 中進行蛋白質表達。Multiple cloning site 緊接在 GFP 基因之後，因此當蛋白質表現出來後，是以一融合蛋白的形式表現出來。

#### pEGFP-C1 / VP2、VP2 $\Delta$ C13、VP2 $\Delta$ C29 基因選殖

為了能夠順利的將 JCV VP2、VP2 $\Delta$ C13，VP2 $\Delta$ C29 insert 載入於 pEGFP-C1 中，合成 GFP-JCV VP2 融合蛋白。選擇以 Bam HI 切割位置作為 JCV VP2 插入的地方。將 BamH1 及 CIP 處理過的 pEGFP-C1 載體 1 $\mu$ l 分別加入已處理過的 JCV VP1 insert 1 $\mu$ l 再分別加入 1  $\mu$ l T4 DNA ligase (3U)，1 $\mu$ l 10x T4 DNA ligase buffer 最後分別加入 ddH<sub>2</sub>O 7 $\mu$ l 共 10  $\mu$ l 於 16 ° C 作隔夜 ligation 反應。

#### Restriction map

接入完成之 pEGFP-C1 / JCVVP2 vector，於 competent cell (JM109)，於 kankmycin plate 上挑出生長菌落，種於 L broth，待隔日抽取 DNA 載體。根據 VP2 及 pEGFP-C1 之 DNA 序列，以 Bam HI 及 Bgl II 處理，若有接入者，以 Bam HI 可切出一 4731bp 及 1035 bp，若以 Bgl II 切出 912 bp 及 4850 bp，則為正向接入，若為 223 bp 及 5543 bp，則為反向接入。以 pEGFP-C1 為載體接入 JCV VP2  $\Delta$  C13，VP2  $\Delta$  C29 DNA，同樣是以 Bam HI 來確定 JCV VP2 有接入，再以 Bgl II 確認其為正向接入。

#### 細胞培養

COS-7 培養方法參照 Hink 的方法 ( 29 )。簡單的說，COS-7 細胞培養於含 10 % 胎牛血清 ( Gibco ) 的 DMEM 培養液中。DMEM 的泡法是將 13.4g 的粉狀培養液溶於 0.85 公升的去離子水中，加入 3.7 g 的 sodium bicarbonate，



室溫下攪拌使其完全溶解後，再用 1N NaOH 調 pH 至 7.2，加水到 1 公升，再於無菌操作檯內以 0.22 $\mu$ m 的濾膜過濾。此時 pH 約為 7.4，保存於 4 $^{\circ}$ C。胎牛血清初次使用前需先 56 $^{\circ}$ C，30 分鐘處理，將補體去活化。

細胞株 COS-7(來自於食品工業發展研究所菌種保存及開發中)其細胞組織來源為非洲綠猴之 SV40 癌化之腎臟細胞(SV40 transformed kidney, African Green Monkey)，為 Fibroblast-like cell，培養基為 90%，Dubecco's modified Eagle's medium +10%FBS 於 37 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub> 條件下培養，經 2~3 小時細胞即黏著於培養盤底部，約一星期更新 medium 2~3 次，待細胞數已滿再以 1:4 稀釋比例繼代培養，先移去 medium 後以 PBS 洗去殘餘 medium，再加入 trypsin-EDTA 作用 3~5 分鐘再移去 trypsin-EDTA，輕拍培養瓶使細胞脫落，加入新鮮的 medium 均勻混合後再將部分轉移至新的培養瓶中。

### DNA Transfection

在進行 DNA 進行轉染 (transfection) 的前一天將試量的細胞 (COS-7) 從 T-75 flask 分種至 35mm dish 中 ( $4 \times 10^5$  cells/per-dish)，在種細胞於 dish 之前先放置一  $24 \times 24\text{mm}^2$  之無菌蓋玻片，以便日後細胞的顯示微鏡觀察。待細胞經隔夜培養後已附著於蓋玻片上。在進行轉染前 3-4 小時，先將 dish 中之 10%FCS-DMEM 換成 20%FCS-DMEM 於培養箱培養。

從各管欲轉染之 DNA 取出 1  $\mu$ l 到 Hoefer TKO 100 Fluorometer 測定 DNA 濃度。所用的緩衝液為 10 ml 1x TNE ( 10 mM Tris，1 mM EDTA，200 mM NaCl，pH7.4 ) 加入 1  $\mu$ l 的染料 ( Hoechst 33258，1 mg/ ml in H<sub>2</sub>O )，所讀出的值即為 DNA 濃度 (ng /  $\mu$ l)。

將欲轉染之 DNA 以 minipreps 從菌體中純化出來，以測得濃度後，將 4 $\mu$ g 於 57.6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O 中加 30 $\mu$ l Calphose Maximixer (CLONTECH) 再加 12.4 $\mu$ g CaCl<sub>2</sub>，為 100 $\mu$ l 的混合 solution 緩緩滴入 100 $\mu$ l 的 2 倍 HBS 罩於 vortexer 以低轉速，混合後靜置 20min，再將總體積 200 $\mu$ l 之 DNA-Calphose-HBS 混後液滴入 35min dish 中，培養 6 小時後以 1xPBS 清洗 2 次，加入 2ml 10%FCS-DMEM 繼續培養至觀察時間。

將感染後 36 小時之 dish 中的蓋玻片初以 PBS 清洗 2 次後，將細胞附著面向下，蓋於戴玻片上直接至螢光顯微鏡下觀察。若細胞有表達出 GFP，在 UV 360-400nm 則可看到螢光現象。

## PCR amplify VP2 $\Delta$ C13、 $\Delta$ C29 及 13 個點突變 mutants

利用已知的 JCV Taiwan-3 strain 的 VP2 DNA 序列所合成的引子 (primer), 如表 4, 且為了基因選殖的方便, 我們在兩段引子的兩端各加一個 Bam H1 的 linker。將 JCV VP2 S1(sense) primer 1  $\mu$ l (20 pmole), 及 JCV VP2 (antisense) primer 1  $\mu$ l (20 pmole) 及 JCV Taiwan-3 template 1  $\mu$ g 及 4  $\mu$ l 2mM dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 5  $\mu$ l final concentration 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ l 10X Taq Buffer, Taq enzyme 0.5  $\mu$ l 及 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ l 的反應物, 最後再加入 30  $\mu$ l 的礦物油。放入 thermocycler 中反應。反應條件如下: 95 °C, 45 秒、55 °C, 2 分鐘、72 °C, 2 分鐘, 共 40 個循環。

## 基因選殖 JCV VP2 $\Delta$ C13、JCV VP2 $\Delta$ C29 及 13 個 mutants

將 BamH1 及 CIP 處理過的 pGEX4T 載體 1  $\mu$ l 分別加入已處理過的 JCV VP2 insert 1  $\mu$ l 再分別加入 1  $\mu$ l T4 DNA ligase (3U), 1  $\mu$ l 10x T4 DNA ligase buffer 最後分別加入 ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l 共 10  $\mu$ l 於 16 °C 作隔夜 ligation 反應。

## 13 個 VP2 mutants 的 DNA 序列分析

將篩選到之正確的 VP2 mutants, VP2P1 至 VP2P13 / pGEX4T / *E.coli*, 將其 1.5ml 的菌液以 minipreps 純化其 plasmid DNA 將 5  $\mu$ g 之 DNA 溶於 13  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 加 NaOH-Tris 5  $\mu$ l 靜置 5 分鐘後加入 amino acetate 5  $\mu$ l 後再加入 75  $\mu$ l ice-cold 之酒精, 置於 -70 °C 1min, 以 16,000rpm 10 分鐘高速離心後, 倒除上清液並將其真空乾燥之後溶於 7  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O 再加入 1  $\mu$ l 之 5pmol Sequencing primer (pGEX4T-C' or-N') 加入 1  $\mu$ l 之 Sequencing reaction buffer 後置於 65 °C, 2min, 於 30 分鐘內冷卻至 35 °C 置於冰上。依序加入 DTT 1  $\mu$ l, labeling Mix 2  $\mu$ l,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 0.5  $\mu$ l diluted sequence 2  $\mu$ l 於室溫反應 5min 後, 再取 3.5  $\mu$ l 之反應液至分別含有 2  $\mu$ l ddGTP / dNTP, ddATP / dNTP, ddTTP / dNTP, ddCTP / dNTP tubes 中於 37 °C 反應 5min 後加入 4  $\mu$ l stop solution 後, 於跑 sequencing gel 前以 75 °C 加熱 2 分鐘即可 loading。

## JCV VP2 蛋白質與 JCV genomic DNA 結合能力分析

### A. DNA 探針的製備

DNA 探針 (probe) 的製備是依 nicked translation 的方法 (Promega, U1001)。未標識的 DNA 藉 DNase I 的作用產生自由 3' -OH 端 (nicks),

DNA polymerase I 則催化將核苷酸加到 3'-OH 端的反應。同時，此酵素的 5'→3' 外切酶活性移去 nick 的 5'磷酸端。因此，移去原核苷酸的位置即為加入新核苷酸的位置，所以將具放射性的核苷酸加到 DNA。步驟如下：

先混合如下成份

Nucleotide mix	10 $\mu$ l
nick translation 10x buffer	5 $\mu$ l
TW-3 JCV DNA genome in H <sub>2</sub> O	2 $\mu$ g
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dATP	7 $\mu$ l
DNA polymerase/ DNaseI mix	5 $\mu$ l
Sterile H <sub>2</sub> O to final volume	50 $\mu$ l

在 15 °C 下作用 60 分鐘，再加入 5  $\mu$ l stop solution。經由 Sephadex G-50 固定離心條件（1,000 rpm，3 分鐘）移去未結合的 dATP。取 1  $\mu$ l 以閃爍計數儀測其放射強度。

## B. Southwestern

誘導 JM109 / VP2-GST 及各 mutants 蛋白質表達，以 12.5 % SDS-PAGE 分離，轉印到 nitrocellulose paper 後，置於 buffer B（10 mM Tris-Cl，pH 6.7，50 mM NaCl，1 mM EDTA，0.02 % BSA，0.02 % Ficoll，0.02 % polyvinylpyrrolidone），30 分鐘。加入 DNA 探針，使其放射強度達 10<sup>5</sup> cpm / ml，室溫下作用 1 小時。再用 buffer B 清洗，之後乾燥，放射顯影。

## 結果

### 一. 從自體免疫病患尿液分離出 Taiwan-3 JCV VP2 基因

為了探討 JCV 之次要結構蛋白 VP2 之生理功能，我們利用 PCR 的方法從尿液放大出 Taiwan-3 JCV VP2 基因。為了能夠得到大量的 VP2 蛋白提供研究，故將其接入表現載體於 *E.coli* 中表現，並製作抗血清予以鑑定。

#### 1. Taiwan-3 JCV VP2 基因選殖

Taiwan-3 JCV 為首次在台灣發現之 strain (93)，為了便於 VP2 基因定序及表達，我們自尿液檢體順利放大出 Taiwan-3 JCV VP2 (圖 1, lane 2)，由於在引子 (表 1) 上已設計了 BamHI 的切割序列，之後以 BamHI 處理過的 VP2 基因 (圖 1, Lane 3) 接入已用 BamHI 處理過之表現載體 pGEX4T (圖 1, lane 4)，經由酵素連接後，予以轉送入 *E.coli* 中，並篩選菌落之 plasmid，以 BamHI 切割確定有接入 VP2 基因，並且得到 1035bp 及 4969bp 的片段 (圖 1, lane 5) 再以 Bgl II 及 Pst I 來確定為正向接入，作用後所得到的片段為 1158bp 及 4846bp (圖 1, lane 6)。所以我們得到 Taiwan-3 JCV VP2 / pGEX4T 之質體命名為 pGEX-JCVP2 (圖 2)。此質體將用以進行 DNA 定序，並以其表達系統表達及純化 VP2 蛋白。

#### 2. JCV VP2 核甘酸序列的分析

為了瞭解 Taiwan-3 JCV VP2 基因的差異性，故予以進行 DNA 定序，我們以雙去氧核糖核酸鏈終止法 (dideoxy nucleotide chain termination method)，配合所設計的幾段引子 (表 1)，分析出了 Taiwan-3 strain VP2 完整的核甘酸序列，並依密碼推算出氨基酸的序列。Taiwan-3 strain VP2 共有 1035 對核甘酸，其序列如圖 1，其 334 個氨基酸序列如圖 4。同時使用電腦程式 (Strider) 分析出此段 JCV VP2 被 restriction enzyme 所切的切點，結果如圖 5。Taiwan-3 與 Mad-1 的核酸及氨基酸序列比較，則發現其間有 16 對核酸變異，分別為核酸號碼 180 (T → A) (Mad-1 → Taiwan-3)，213 (A → T)，159 (A → C)，289 (T → A)，369 (A → G)，465 (G → T)，523 (G → T)，525 (C → T)，531 (C → A)，546 (G → A)，626 (C → T)，698 (T → G)，726 (T → C)，733 (C → T)，834 (A → G)，836 (G → A)。而在這些核甘酸的變異中有 4 個核甘酸的變異會導致內切酶作用不同，分別是第 531，626，698 及 726 個的核甘酸位置，結果列於表 2。有 8 個核酸變異影響氨基酸的轉譯，分別是氨基酸 87、97、175、209、219、233、245、279 (表 3)。在不同 strain 的 VP2 蛋白質的氨基酸差異雖然變化不大，但是否影響這些

strains 的結構蛋白之功能特性，以及是否會影響病毒組裝能力，仍需更進一步研究。

### 3. 誘導 GST-JCV VP2 蛋白表現

質體pGEX4T為一蛋白質表達系統，由此結果(如圖6)顯示在經過 IPTG 誘導後，含有 VP2 / pGEX4T 基因的 *E.coli* 可以表現一 GST-VP2 蛋白，分子量約 62 Kd。經由 SDS-PAGE 的分析發現此蛋白分子量與我們預測 GST-VP2 的分子量相同(圖6, lane 2-7)。GST 分子量約為 27 Kd 而VP2 分子量約為 35 Kd。因此很明顯地可以判斷此蛋白乃由 pGEX4T-JCV2 所表現的 GST-VP2 融合蛋白。

為了瞭解此蛋白表達最多量的時間，我們將 time course 誘導的VP2-GST 表現量以 densitometer 測定其在不同時間表現的相對量。結果顯示，在圖6, lane 5, 6。得知在 IPTG 誘導後第4及5小時 VP2 的表現量最高，我們將它定為 100%。相對地在誘導後第 4 小時VP2 的表現量以達 95%，因此在以後我們表現 VP2 的時間定為 IPTG 誘導後 4 小時。

### 4. 西方墨點法 (Western blotting) 偵測兔子抗 JCV VP2 抗體

為了備製兔子JCV VP2抗血清，且所表達之GST-VP2為非水溶性蛋白，所以我們以electroelution的方法純化GST-VP2蛋白(圖6, Lane 8)，並以這純化的 GST-VP2蛋白為抗原來免疫兔子，預期之後其血清可對GST-JCV VP2抗原進行辨認，發現所 induced 出的抗體可辨認 IPTG 所誘導的GST-JCV VP2如圖7, lane 2;也可辨認electroelution 所純化的GST-JCV VP2 如圖7, lane 3，未誘導的JM109 / GST-JCV VP2沒有辨識反應 (圖7, lane 1)。此結果表示以 GST-JCV VP2 注射兔子後有 induced 出特異性抗 GST-JCV VP2 的抗體，並可由此抗血清來建立 JCV VP2 的 Western blotting 鑑定系統。

## 二. JCV VP2 之轉核訊號( NLS )的探討

NLS 是蛋白質上的一段區域，具有進入細胞核的功能，存在於蛋白質的一端，在多瘤性病毒當中，結構蛋白在細胞質生合後會被送到核內進行病毒顆粒組裝，因此通常會具有 NLS，如 SV40 之 VP1、VP2、VP3(90)，polyoma 之 VP1、VP2、VP3 也具有 NLS(26)。就 VP2 的氨基酸序列比對而言，JCV VP2 之 NLS 可能存在 C-端第 13 個與 C-端第 29 個氨基酸之間，由於與 SV40 VP2 相似。因此我們以全長 VP2、VP2  $\Delta$  C13、VP2  $\Delta$  C29 進行 NLS 的分析。

為了能夠直接觀察 VP2 是否能夠進入細胞核的現象，我們以一螢光蛋白作為偵測源且融合 JCV VP2 的方法來觀察其螢光存在於細胞內的位置。我們所用的系統是質體 pEGFP-C1 表達系統，將基因 VP2、VP2  $\Delta$  C13、VP2  $\Delta$  C29 接入質體 pEGFP-C1，以轉染的方法送入 COS-7 細胞內進行蛋白質表達及追蹤。

### 觀察螢光融合 JCV VP2 蛋白在細胞中表達後所存在的位置

JCV VP2 C-端 29 個氨基酸區域中富含 Lys 與 Arg，推測與 nuclear localization signal (NLS) 有關。以 pEGFP-C1 / JCV VP2、JCV VP2  $\Delta$  C13、JCV VP2  $\Delta$  C29 plasmid 轉染細胞，在轉染後 48 小時，並觀察所表達之 VP2 及 VP2  $\Delta$  C13、JCV VP2  $\Delta$  C29 融合螢光蛋白所送往的位置。單純由 pEGFP-C1 plasmid 所表達的螢光蛋白約 27kDa 可自由通透遍佈於整個細胞中，包括細胞核及細胞漿質(圖 8, A)。pEGFP-C1 / VP2 及 VP2  $\Delta$  C13 plasmid 所轉染的細胞，其所表達出 VP2 及 VP2  $\Delta$  C13 融合螢光蛋白，只存在於細胞核中(圖 8, B, C)。而 pEGFP-C1 / VP2  $\Delta$  C29 所轉染的細胞發現螢光只存細胞漿質中(圖 8, D)。在 JCV VP2 C-端 13 個胺基酸缺失的情況下，其依然能夠進入核內；而其 C-端 29 個胺基酸缺失後，其融合蛋白便無法進入核內，顯示 JCV VP2 之 NLS 是位於 C-端第 13 個胺基酸至第 29 個胺基酸之間的區域。

### 三. JCV VP2 蛋白之 DNA 結合區域探討

由於 VP2 之 C-端的 Lys、Arg 密集區域之氨基酸極有可能構成所謂的，DNA binding domain。然而在已知的文獻也提出 NLS 富含 Lys、Arg。為了區別所預測的區域可能具有不同的功能性，我們用 C-端不同的引子，備製出兩個 C-端不同長度的 VP2 基因，並予以在 *E.coli* 中表達蛋白質，VP2  $\Delta$  C13 及 VP2  $\Delta$  C29 (表 4)，分別為 C-端缺失 13 個胺基酸及 C-端缺失 29 個胺基酸之 VP2 蛋白，以進行 DNA binding domain 之分析。

#### 1. JCV VP2 之 DNA 結合能力分析

已知鼠類 Polyomavirus 主要結構蛋白 VP1 與 DNA 有結合能力(24)，因此用來當 positive control (圖 9, B, C lane 1)。JCV genomic DNA 與 pGem-7 plasmic DNA 當 probe 兩種 probe 都可與 JCV VP2 結合(圖 9, B, C lane 2)，由此結果得知 JCV VP2 對於 DNA 的結合能力是 non-sequence specific，所以 JCV VP2 對於 DNA 的結合並不需要特定的 DNA 序列。

#### 2. JCV VP2 之 DNA 結合能力區域分析

利用PCR的技術設計了兩個VP2之C-端truncated (表4) (JCV VP2 $\Delta$ C13, JCV VP2 $\Delta$ C29) 經蛋白質表達後，與全長VP2蛋白比較其DNA結合能力的差異。經由 Southwestern DNA binding assay 後，發現全長VP2 (圖9, B, Lane 2) 能有效率的結合DNA，而JCV VP2 $\Delta$ C13及JCV VP2 $\Delta$ C29卻喪失了與DNA結合能力(圖10, B, Lane 3, lane 4)，就JCV VP2 $\Delta$ C13喪失了與DNA結合能力而言可以推測DNA結合區域是保留在C-端13個氨基酸中。並且推測是一些 positive charge的氨基酸所組成，如Lys、Arg。並且由JCV VP2 $\Delta$ C13(圖10, B, Lane 3) 沒有結合DNA的能力也說明了NLS區域不影響DNA binding。

### 3. 以PCR的方法設計JCV VP2蛋白C-端13個氨基酸點突變mutants

為了進一步了解JCV VP2蛋白C-端最後13個氨基酸中那些氨基酸與DNA結合能力最有相關性。我們設計一些點突變之mutants在DNA層面上，我們在設計 primer的時候以改變一個核苷酸為原則來改變其codon (表4)，使其轉譯的氨基酸改變分別命名為JCV VP2 P1到P13 (圖11)，並且在基因選殖之後進行 DNA 序列分析(圖12)，確認是正確之突變位置的 mutants。

### 4. 13個點突變之JCV VP2 mutants的DNA結合能力分析

將選殖到的 13 個 mutants 經蛋白質表達且定量後之 *E. coli* total lysate，以 Southwestern 法進行 DNA 結合能力分析(圖 13)。發現 JCV VP2P9 及 JCV VP2P13(圖 13, A, lane 9, lane 13)對於 DNA 的結合能力明顯的降低，同時以 densitometry 定量以便於 13 個 mutants 對於 DNA 結合能力能以相對質量來比較出結合能力的高低。其改變的氨基酸位置分別為 Lys 336  $\rightarrow$  Met 與 Lys 332  $\rightarrow$  Ile。並且以 Western blotting(圖 13, B)再確認 VP2 及 mutants 蛋白質的存在及含量。在預測的 VP2 C-端 13 個氨基酸中(圖 11)，預測其中兩個 Lys 及四個 Arg 與 DNA 結合能力最有關係，結果發現只有 P9 Lys 332 及 P13 Lys 336 對於 DNA 的結合能力最具影響。另外 P2 Arg 343、P5 Arg 340、P7 Arg 338、P8 Arg 337 之 mutants 之 DNA 結合能力與 JCV VP2 並無顯著差異。

## 討論

在 polyomavirus 其結構蛋白有 VP1、VP2 及 VP3(11, 57, 86), 而 VP1 早已證實為病毒殼體的主要部份(98), 並且與 VP2 / VP3 之間有 interaction(48, 83)。似乎 VP2 與 VP3 參與病毒殼體的包裝並且成為病毒殼體的一部份(29), 由於在純化病毒顆粒中 VP2 與 VP3 所占有的量不多, 歸為次要結構蛋白, 而單獨 vp1 可形成病毒殼體(94), 並且其 monomer VP1 之 N-端之特定序列含有 NLS (41)與 DNA binding domain(34)在近兩三年來被發現, 其功能的角色上在病毒的組裝有其重大之義意。對於病毒蛋白在 pre-assemble 為何能夠入核進行組裝可提出何理的解釋(41), 而在特定序列上發現其為 Lys、Arg rich 的區域(29, 41, 56, 77, 101, 123)。對於功能性與病毒殼體蛋白組裝上仍然未知其角色的次要結構蛋白 VP2 與 VP3 而言, 功能性探討為研究 VP2 與 VP3 在病毒顆粒中組裝的前提。然而在 VP2 亦發現有類似於 VP1 N-端之特定的 Lys、Arg-rich domain(41, 56, 77, 101, 123)。推測是否同樣俱有 DNA binding domain 以及 NLS 之功能。在氨基酸 sequence(SV40) 相似性的比較下(70, 102), 預測 C-端第 29 至 C-端第 13 個氨基酸為 NLS, C-端 13 個氨基酸為 DNA binding domain。而在這些區域中, 前人對於部份 Lys、Arg rich domain 進行點突變(4), 結果會使得 NLS 與 DNA binding domain 的功能性喪失或減弱, 更確定其功能與特定的 Lys、Arg 有關。

對於人類多瘤性病毒殼體組裝的機轉及生理路徑至今仍未有一清晰的圖, 而已知人類多瘤性病毒 JC virus 之結構蛋白有 VP1, VP2 及 VP3(11, 57, 86)。主要結構蛋白 VP1 能夠形成病毒殼體 (capsid) (94), 其內包裹著 viral genome 與 histones(114)所形成的 mini-chromosome, 而次要結構蛋白 VP2 及 VP3 仍未知其確實存在位置, 但其確實存在於病毒結構內, 而其扮演角色亦未清, 故目前對於 VP2 及 VP3 的功能特性化為一重要的課題。

VP2 與 VP3 在病毒基因上具有相同的 ORF (open reading frame) (102), 只是 VP3 少了 VP2 之 N-端約 1/3 的片段, 其他氨基酸次序相同, 而與同屬多瘤性病毒之 SV40 之氨基酸次序比對下, 推測其 C-端可能具有已知的 NLS (nuclear localization signal) domain 及 DNA 結合區域 (DNA binding domain)。已知成熟的病毒顆粒是在細胞核內組裝完成的, 由於 NLS 牽涉到病毒結構蛋白是否能夠進入細胞核內, DNA binding affinity 牽涉到病毒結構蛋白是否有參與包裹 DNA 的功能, 而引起了我們對於 NLS 是否存在於 VP2 / VP3 而使其能夠進入細胞核內進行病毒結構的組裝? 及 DNA binding domain 是否存在於 VP2 / VP3 而使其能參與 viral DNA 的包裹? 亦是今後仍需進一步確定的課題。

NLS 推測是在 VP2 之 C-端之第 13 至第 29 個氨基酸之間, 故以 PCR 的方法設計了 VP2, VP2  $\Delta$  C13, 及 VP2  $\Delta$  C29 的 truncates, 在 DNA level 上 clone 到 pEGFP-C1 (可在真核細胞中表達之一螢光基因 vector), 將所得之 plasmid 以 DNA-calcium-phosphate 沉澱法使 plasmid 轉染入細胞 (COS-7) 進



行表達，並以螢光顯微鏡直接觀察螢光融合蛋白在細胞中的位置。結果發現 VP2 及 VP2  $\Delta$  C13 所轉染的細胞發出螢光的位置聚集在細胞核內，顯示 VP2 及 VP2  $\Delta$  C13 蛋白可進入核內，而 VP2  $\Delta$  C29 所轉染的細胞只在 cytoplasm 的區域有螢光，顯示 VP2  $\Delta$  C29 蛋白無法被送入核內。綜合起來說明了 VP2 具有 NLS domain 且位於 C-端之 13-29 個氨基酸的區域中。

另一方面，DNA binding domain 根據推測是在 VP2 的 C-端 13 個氨基酸的區域，故以表達出來之 VP2 及 VP2  $\Delta$  C13 蛋白質在 *in vitro* 中以 Southwestern 的方法來進行 DNA binding affinity assay，我們以 hot DNA 為 probe，來觀察 VP2 及 VP2  $\Delta$  C13 結合 DNA 的差異，發現完整的 VP2 蛋白具有 DNA binding affinity，而 VP2  $\Delta$  C13 蛋白則完全喪失了 DNA binding affinity，說明了 DNA binding domain 位於 C-端之 13 個氨基酸的區域中。而在 C-端這 13 個氨基酸之中有些是 positive charge 之氨基酸 (Lys, Arg)，推測可能與 DNA 的結合有關，故以 PCR 設計了 C-端 13 個 point mutation 的 VP2 mutants，分別為 P1, P2 ... P12, P13 發現 P9 (Lys-336), P13 (Lys-332) 其氨基酸改變後，其 DNA binding affinity 顯著減弱，推測 VP2 蛋白 C-端之第 9, 13 個氨基酸在 DNA binding 功能中扮演重要的角色。

綜合上述結果證明了 JCV 之 VP2 具有 NLS 及 DNA binding 的功能，並可推測細胞遭受病毒感染後在 cytoplasm 所合成的 VP2 次要結構蛋白可藉由自己的 NLS 入細胞核，再藉由 DNA binding domain 在核內參與 DNA 包裹的部分過程，這些結果對於 viral capsid 組裝路徑之完整性提供了重要的訊息。

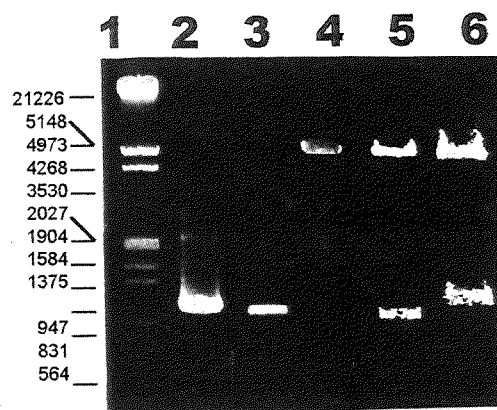


圖 1. JCV VP2 基因的 PCR 產物及 DNA 載體 pGEX4T 之電泳分析。  
 利用 PCR 技術從類風濕性關節炎病人的尿液中將 JCV Taiwan-3 strain VP2 次要結構蛋白基因 amplify 出來 (lane 2)，跑電泳可於 1% Agarose gel 上，觀察其為正確分子量約 1Kb。VP2 PCR 產物經 BamHI 處理 (lane 3)。lane 4 為 pGEX4T 經 BamHI 及 CIP 處理後之產物。lane 5 為 BamHI 處理之 pGEX4T-JCV VP2，lane 6 為 Bgl II 處理正接之 pGEX4T-JCV VP2。

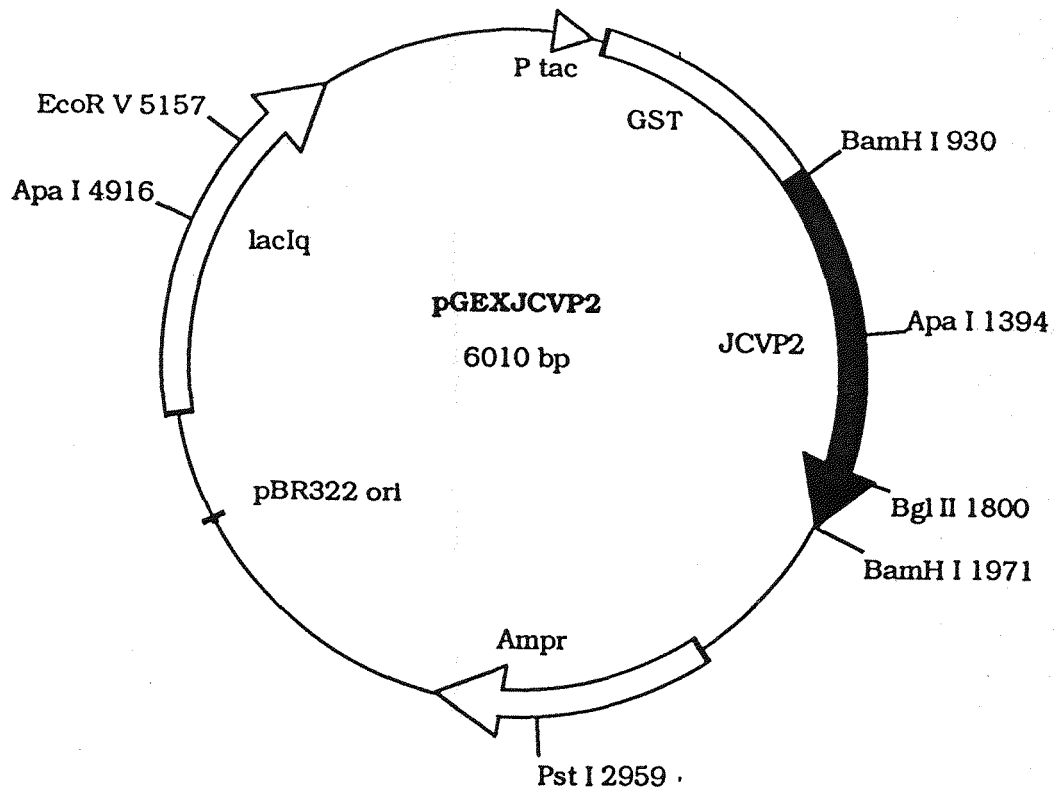


圖 2. pGEX4T-JCV2 之構築。將 JCV VP2 接入 pGEX-4T 載體之 BamHI 位置。

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	ATGGGTGCCG	CACTGCACT	TTTGGGGGAC	CTAGTTGCTA	CTGTTTCTGA	GGCTGCTGCT	GCCACAGGAT	TTTCAGTAGC	80
81	TGAAATGCT	GCTGGAGAGG	CTGCTGCTAC	TATAGAAGTT	GAAATGTCAT	CCCTTGCTAC	TGTAGAGGGG	ATTACAAGTA	160
161	CCTCTGAGGC	TATAGCTGCA	ATAGGCCCTTA	CTCCTGAAAC	ATATGCTGTA	ATTACTGGAG	CTCCGGGGGC	TGTAGCTGGG	240
241	TTTGCTGCAT	TGGTCAATC	TGTAACGGT	GGTAGTGCCTA	TTGCTCAGGT	GGGATATAGA	TTTTTTGCTG	ACTGGGATCA	320
321	TAAAGTTTCA	ACAGTTGGGC	TTTTTCAGCA	GCCAGCTATG	GCTTTACAGT	TATTTAATCC	AGAAGACTAC	TATGATATTT	400
401	TATTTCTG	AGTGAATGCC	TTTGTTAACA	ATATTCACTA	TTTAGATCCT	AGACATTGGG	GCCCTTCCTT	GTTCTCCACA	480
481	ATCTCCAGG	CTTTTGGAA	TCTTGTTAGA	GATGATTTGC	CATCTTTAAC	ATCTCAGGAA	ATTCAAAGAA	GAACCCAAAA	560
561	ACTATTTGTT	GAAAGTTTAG	CAAGGTTTTT	GGAAGAAACT	ACTTGGGCAA	TAGTTAATTC	ACCAAGTTAC	TTATATAAAT	640
641	ATATTTTACA	CTATTATTCT	AGATTGTCTC	CAGTTAGGCC	CTCTATGGTA	AGGCAAGGTG	CCCCAAGGGA	GGGAACCTAT	720
721	ATTTCCTTTG	GCTACTCATA	CACCCAAAGT	ATAGATGATG	CAGACAGCAT	TCAAGAAGTT	ACCCAAAGGC	TAGATTTAAA	800
801	AACCCCAAAT	GTGCAATCTG	GTGAATTTAT	AGAGAAAAGT	ATTGCACCAG	GAGGTGCAAA	TCAAAGATCT	GCTCCTCAAT	880
881	GGATGTTGCC	TTTACTTTTA	GGGTTGTACG	GGACTGTAAAC	ACCTGCTCTT	GAAGCATATG	AAGATGGCCC	CAACAAAAAG	960
961	AAAAGGAGAA	AGGAAGGACC	CCGTGCAAGT	TCCAAAACCT	CTTATAAGAG	GAGGAGTAGA	AGTTCTAGAA	GTTAA	1035
	10	20	30	40	50	60	70	80	

圖 3. Taiwan-3 JCV VP2 的核苷酸序列分析。全長由起始密碼到終止密碼共有 1035 bp。

```

1/1
ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG GGG GAC CTA GTT GCT ACT GTT TCT GAG GCT GCT GCT
Met gly ala ala leu ala leu leu gly asp leu val ala thr val ser glu ala ala ala
61/21
GCC ACA GGA TTT TCA GTA GCT GAA ATT GCT GCT GGA GAG GCT GCT GCT ACT ATA GAA GTT
ala thr gly phe ser val ala glu ile ala ala gly glu ala ala ala thr ile glu val
121/41
GAA ATT GCA TCC CTT GCT ACT GTA GAG GGG ATT ACA AGT ACC TCT GAG GCT ATA GCT GCA
glu ile ala ser leu ala thr val glu gly ile thr ser thr ser glu ala ile ala ala
181/61
ATA GGC CTT ACT CCT GAA ACA TAT GCT GTA ATT ACT GGA GCT CCG GGG GCT GTA GCT GGG
ile gly leu thr pro glu thr tyr ala val ile thr gly ala pro gly ala val ala gly
241/81
TTT GCT GCA TTG GTT CAA TCT GTA ACT GGT GGT AGT GCT ATT GCT CAG GTG GGA TAT AGA
phe ala ala leu val gln ser val thr gly gly ser ala ile ala gln val gly tyr arg
301/101
TTT TTT GCT GAC TGG GAT CAT AAA GTT TCA ACA GTT GGG CTT TTT CAG CAG CCA GCT ATG
phe phe ala asp trp asp his lys val ser thr val gly leu phe gln gln pro ala met
361/121
GCT TTA CAG TTA TTT AAT CCA GAA GAC TAC TAT GAT ATT TTA TTT CCT GGA GTG AAT GCC
ala leu gln leu phe asn pro glu asp tyr tyr asp ile leu phe pro gly val asn ala
421/141
TTT GTT AAC AAT ATT CAC TAT TTA GAT CCT AGA CAT TGG GGC CCT TCC TTG TTC TCC ACA
phe val asn asn ile his tyr leu asp pro arg his trp gly pro ser leu phe ser thr
481/161
ATC TCC CAG GCT TTT TGG AAT CTT GTT AGA GAT GAT TTG CCA TCT TTA ACA TCT CAG GAA
ile ser gln ala phe trp asn leu val arg asp asp leu pro ser leu thr ser gln glu
541/181
ATT CAA AGA AGA ACC CAA AAA CTA TTT GTT GAA AGT TTA GCA AGG TTT TTG GAA GAA ACT
ile gln arg arg thr gln lys leu phe val glu ser leu ala arg phe leu glu glu thr
601/201
ACT TGG GCA ATA GTT AAT TCA CCA GTT AAC TTA TAT AAT TCA GAC TAT TAT TCT
thr trp ala ile val asn ser pro val asn leu tyr asn tyr ile ser asp tyr tyr ser
661/221
AGA TTG TCT CCA GTT AGG CCC TCT ATG GTA AGG CAA GGT GCC CAA AGG GAG GGA ACC TAT
arg leu ser pro val arg pro ser met val arg gln gly ala gln arg glu gly thr tyr
721/241
ATT TCC TTT GGC TAC TCA TAC ACC CAA AGT ATA GAT GAT GCA GAC AGC ATT CAA GAA GTT
ile ser phe gly tyr ser tyr thr gln ser ile asp asp ala asp ser ile gln glu val
781/261
ACC CAA AGG CTA GAT TTA AAA ACC CCA AAT GTG CAA TCT GGT GAA TTT ATA GAG AAA AGT
thr gln arg leu asp leu lys thr pro asn val gln ser gly glu phe ile glu lys ser
841/281
ATT GCA CCA GGA GGT GCA AAT CAA AGA TCT GCT CCT CAA TGG ATG TTG CCT TTA CTT TTA
ile ala pro gly gly ala asn gln arg ser ala pro gln trp met leu pro leu leu leu
901/301
GGG TTG TAC GGG ACT GTA ACA CCT GCT CTT GAA GCA TAT GAA GAT GGC CCC AAC AAA AAG
gly leu tyr gly thr val thr pro ala leu glu ala tyr glu asp gly pro asn lys lys
961/321
AAA AGG AGA AAG GAA GGA CCC CGT GCA AGT TCC AAA ACT TCT TAT AAG AGG AGG AGT AGA
lys arg arg lys glu gly pro arg ala ser ser lys thr ser tyr lys arg arg ser arg
1021/341
AGT TCT AGA AGT TAA
ser ser arg ser OCH

```

圖 4. JCV VP2 (Taiwan-3 strain) 的氨基酸序列分析。利用電腦程式 (DNA strider) 將分析出的 JCV VP2(Taiwan-3 strain) DNA 序列轉譯成氨基酸序列的結果。全長共有 344 個氨基酸組成。

Enzyme	Site	Use	Site position (Fragment length)		Fragment order				
AlwN I	cagnnn/ctg	1	1( 73)	2	74( 962)	1			
Apa I	gggcc/c	1	1( 458)	2	459( 577)	1			
Bbv II	gaagac	2/6	1( 381)	2	382( 654)	1			
Bcn I	ccs/gg	1	1( 222)	2	223( 813)	1			
Bgl II	a/gatct	1	1( 864)	1	865( 171)	2			
BspM I	acctgc	4/8	1( 920)	1	921( 115)	2			
Dra I	ttt/aaa	1	1( 794)	1	795( 241)	2			
Hae I	wgg/ccw	1	1( 182)	2	183( 853)	1			
HgiA I	gwgw/c	1	1( 217)	2	218( 818)	1			
Hinf I	g/antc	1	1( 497)	2	498( 538)	1			
Hpa II	c/cgg	1	1( 222)	2	223( 813)	1			
Msp I	c/cgg	1	1( 222)	2	223( 813)	1			
Nci I	cc/sgg	1	1( 222)	2	223( 813)	1			
Sac I	gagct/c	1	1( 217)	2	218( 818)	1			
Ssp I	aat/att	1	1( 429)	2	430( 606)	1			
Stu I	agg/cct	1	1( 182)	2	183( 853)	1			
Alw I	ggatc	4/5	2	1( 314)	2	315( 130)	3	445( 591)	1
Ava II	g/gwcc	2	2	1( 26)	3	27( 949)	1	976( 60)	2
Ban I	g/gyrcc	2	2	1( 3)	3	4( 693)	1	697( 339)	2
Ban II	grgcy/c	2	2	1( 217)	3	218( 241)	2	459( 577)	1
Bsm I	gaatgc	1/-1	2	1( 413)	1	414( 353)	2	767( 269)	3
BstY I	r/gatcy	2	2	1( 443)	1	444( 421)	2	865( 171)	3
Fok I	ggatg	9/13	2	1( 127)	3	128( 753)	1	881( 155)	2
HinC II	gty/rac	2	2	1( 423)	1	424( 201)	3	625( 411)	2
Hpa I	gtt/aac	2	2	1( 423)	1	424( 201)	3	625( 411)	2
Hph I	ggtga	8/7	2	1( 618)	1	619( 201)	3	820( 216)	2
Nde I	ca/tatg	2	2	1( 199)	2	200( 735)	1	935( 101)	3
PpuM I	rg/gwccy	2	2	1( 25)	3	26( 949)	1	975( 61)	2
Rsa I	gt/ac	2	2	1( 157)	2	158( 748)	1	906( 130)	3
Sec I	c/cnngg	2	2	1( 222)	3	223( 262)	2	485( 551)	1
SfaN I	gcatc	5/9	2	1( 126)	3	127( 630)	1	757( 279)	2
Xba I	t/ctaga	2	2	1( 657)	1	658( 366)	2	1024( 12)	3
Bsp1286 I	gdgch/c	3	3	1( 217)	4	218( 241)	2	459( 239)	3

—接下頁—

圖 5. Taiwan-3 JCV VP2 DNA 的 endonuclease 切點的彙整。  
 Endonuclease 的名稱、切割點及切割點數、切後 DNA 片段大  
 小的序列，以切割點的數目為彙整。

—接上頁—

BstN I	cc/wgg		3	698( 338) 1 1( 405) 1 847( 189) 3	406( 80) 4	486( 361) 2
Dpn I	ga/tc		3	1( 315) 2 866( 170) 3	316( 129) 4	445( 421) 1
EcoR II	/ccwgg		3	1( 405) 1 847( 189) 3	406( 80) 4	486( 361) 2
Mae III	/gtnac		3	1( 261) 2 916( 120) 4	262( 516) 1	778( 138) 3
Mbo I	/gatc		3	1( 315) 2 866( 170) 3	316( 129) 4	445( 421) 1
Sau3A I	/gatc		3	1( 315) 2 866( 170) 3	316( 129) 4	445( 421) 1
Dde I	c/tnag		4	1( 46) 5 284( 249) 2	47( 117) 4 533( 503) 1	164( 120) 3
Hae III	gg/cc		4	1( 183) 4 677( 269) 2	184( 276) 1 946( 90) 5	460( 217) 3
Mbo II	gaaga	8/7	4	1( 381) 1 592( 348) 2	382( 166) 3 940( 96) 4	548( 44) 5
ScrF I	cc/ngg		4	1( 222) 2 486( 361) 1	223( 183) 4 847( 189) 3	406( 80) 5
Alu I	ag/ct		5	1( 77) 4 219( 15) 6	78( 96) 3 234( 120) 2	174( 45) 5 354( 682) 1
EcoO109 I	rg/gnccy		5	1( 25) 5 459( 217) 3	26( 432) 1 676( 299) 2	458( 1) 6 975( 61) 4
Mae I	c/tag		5	1( 30) 5 659( 131) 4	31( 418) 1 790( 235) 2	449( 210) 3 1025( 11) 6
Sau96 I	g/gncc		6	1( 26) 6 460( 217) 3 976( 60) 4	27( 432) 1 677( 269) 2	459( 1) 7 946( 30) 5
Mse I	t/taa		7	1( 373) 1 526( 88) 5 796( 236) 2	374( 51) 6 614( 12) 7 1032( 4) 8	425( 101) 4 626( 170) 3
Nla IV	ggg/ncc		8	1( 3) 8 458( 1) 9 712( 234) 3	4( 22) 6 459( 238) 2 946( 30) 5	26( 432) 1 697( 15) 7 976( 60) 4
Bbv I	gcagc	8/12	9	1( 51) 5 58( 30) 6 103( 72) 3 348( 688) 1	52( 3) 8 88( 12) 7 175( 69) 4	55( 3) 9 100( 3) 10 244( 104) 2
Fnu4H I	gc/ngc		10	1( 6) 8 55( 3) 10 100( 3) 11 244( 104) 2	7( 45) 5 58( 30) 6 103( 72) 3 348( 688) 1	52( 3) 9 88( 12) 7 175( 69) 4
Mnl I	cctc	7/7	11	1( 48) 4 145( 16) 10 680( 29) 7 874( 134) 3	49( 48) 5 161( 5) 11 709( 142) 2 1008( 3) 12	97( 48) 6 166( 514) 1 851( 23) 9 1011( 25) 8

151 sites found

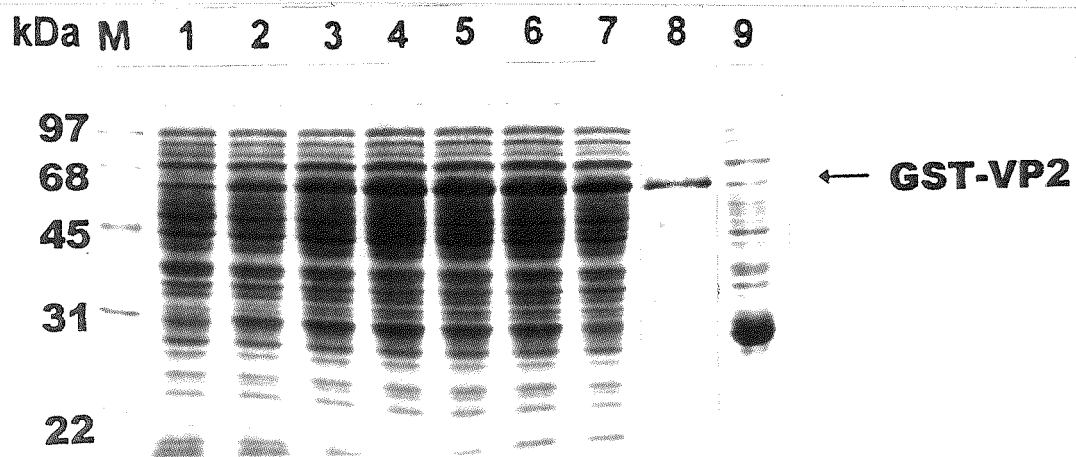


圖 6. 誘導 GST-JCV VP2 蛋白表現。pGEX4T-JCV VP2 / JM109 *E.coli* 加入 inducer (IPTG) 前(lane 1)及加入 IPTG 誘導後 1、2、3、4、5、6 小時(lane 2-7)的菌液以 12.5% SDS-PAGE 分析。lane 8 是 electroelution 純化之 GST-JCV VP2。lane 9: 只表達 GST 蛋白的 pGEX4T / JM109 total lysate。



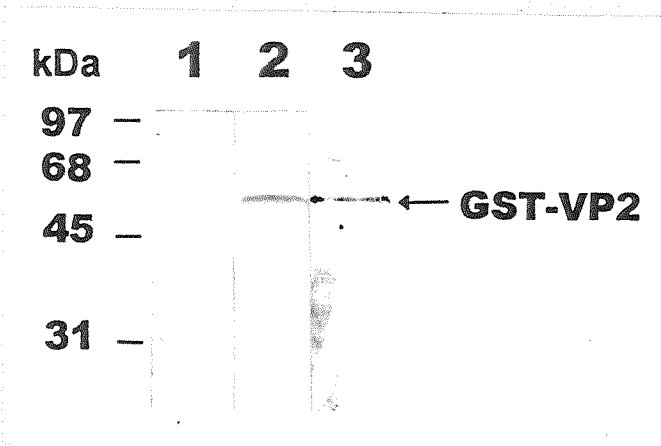


圖 7. Western blot 鑑定 JCV VP2-GST 蛋白質。抗原經由 SDS-PAGE 後，轉印至 nitrocellulose paper 後，進行 Western blot，偵測兔子抗體反應。Lane 1 : non-induced *E. coli* / JM109 lysate ; lane 2 : induced JM109/JCVP2-pGEX4T lysate ; lane 3 : electroeluted GST-JCVP2 。

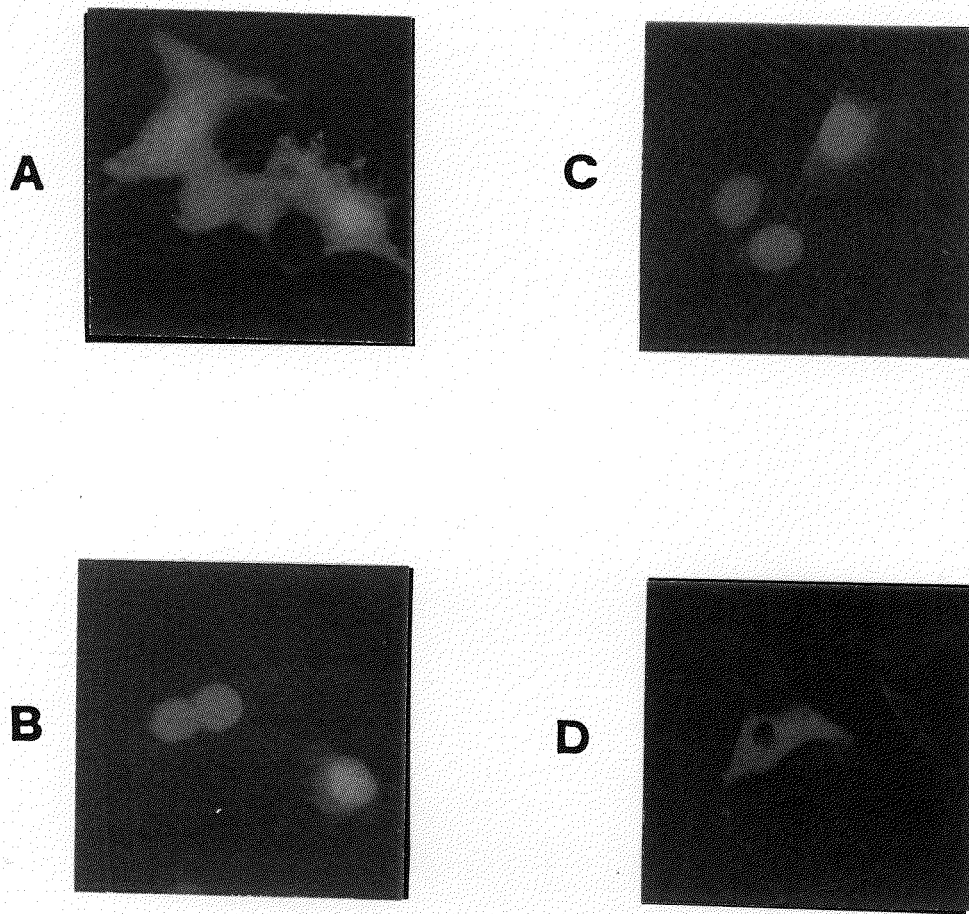


圖 8 . pEGFP-CI / VP2 及 VP2  $\Delta$  C13 , VP2  $\Delta$  C29 在 COS-7 中表達後所存在的位置。(A) pEGFP-CI , (B)pEGFP-CI/VP2 及 (C)pEGFP-CI / VP2  $\Delta$  C13 , (D) pEGFP-CI / VP2  $\Delta$  C29 所轉染的 COS-7 cell , 在轉染 48 小時後螢光顯微鏡內之影像。

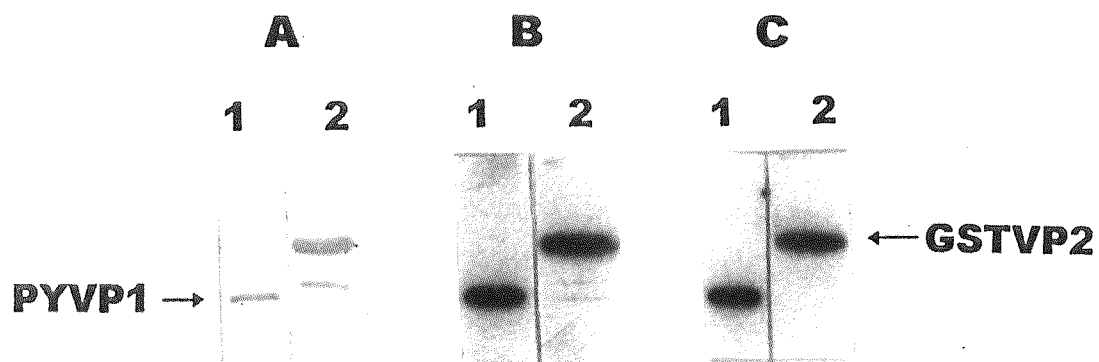


圖 9. JCV2 之 DNA binding assay。將已經 induced 表達 PyVP1 及 GST-JCVP2 之 *E.coli* total lysate 以 SDS-PAGE 分離，轉印至 nitrocellulose paper，再進行 Western blot 及 Southwestern DNA binding assay。A：為 PyVP1 及 GST-JCVP2 之 Western blot。B：以 JCV genomic DNA 為 probe 的 Southwestern。C：以 pGem-7 為 probe 的 South-Western。Lane 1 為 PyVP1，lane 2 為 GST-JCVP2。

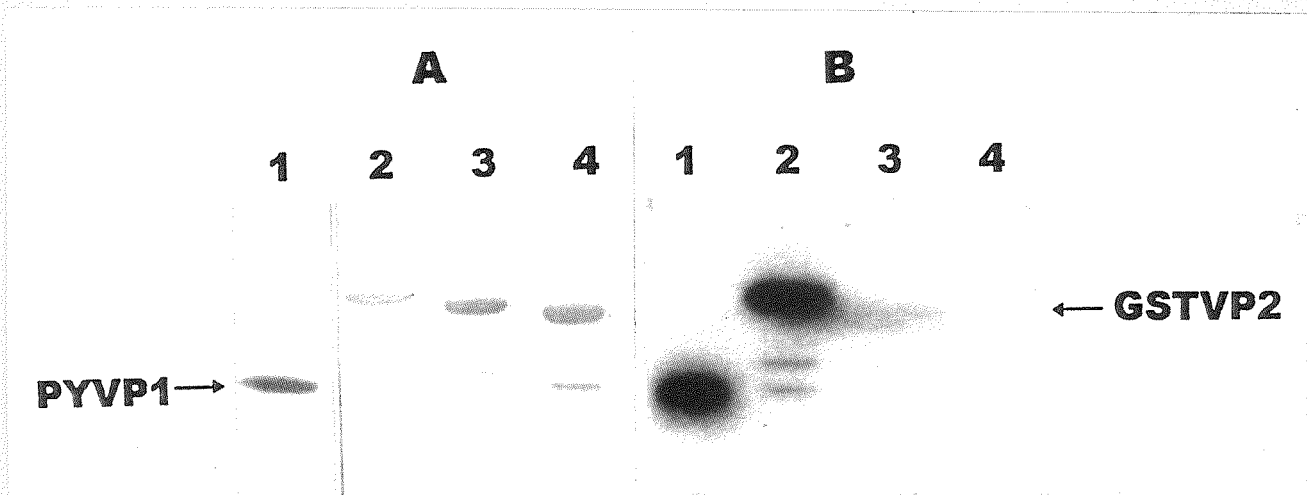


圖 10. JCVP2、JCVP2  $\Delta$  C13 與 JCVP2  $\Delta$  C29 之 DNA binding assay。PyVP1(lane 1)、GST-JCVP2(lane 2)、JCVP2  $\Delta$  C13-GST(lane 3)與 JCVP2  $\Delta$  C29-GST(lane 4)以 SDS-PAGE 分離之後，再轉 nitrocellulose paper，分別以 Western blot 鑑定(A)及 DNA probing(B)。

	332	Lys-Thr-Ser-Tyr-Lys-Arg-Arg-Ser-Arg-Ser-Ser-Arg-Ser	344
Wt-VP2			
P1-VP2		-----Gly	
P2-VP2		-----Gly----	
P3-VP2		-----Ala-----	
P4-VP2		-----Gly-----	
P5-VP2		-----Gly-----	
P6-VP2		-----Gly-----	
P7-VP2		-----Gly-----	
P8-VP2		-----Gly-----	
P9-VP2		-----Met-----	
P10-VP2		-----Phe-----	
P11-VP2		-----Ala-----	
P12-VP2		----Ile-----	
P13-VP2		Ile-----	

圖11. JCVP2-GST 13個C端點突變後之氨基酸改變。

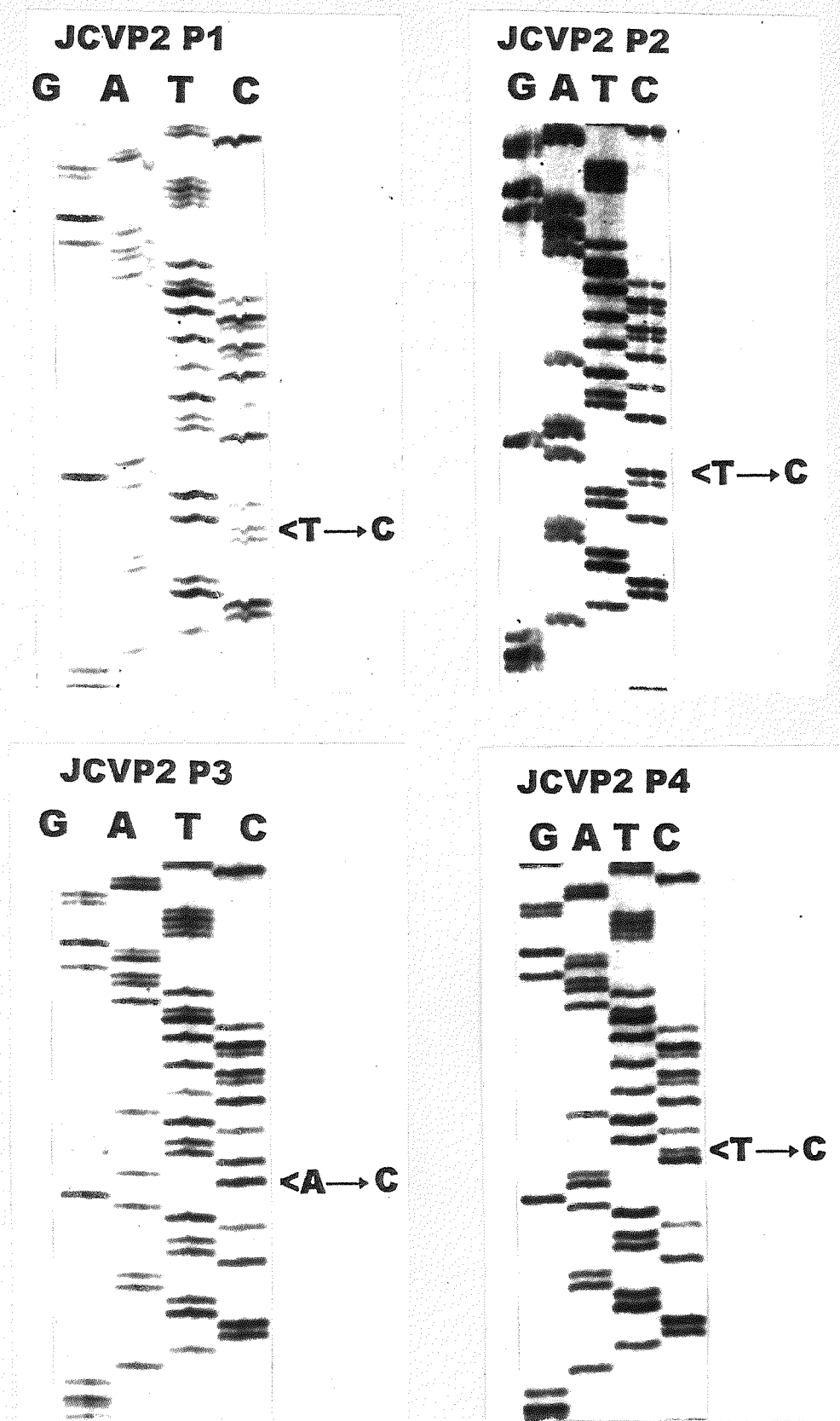
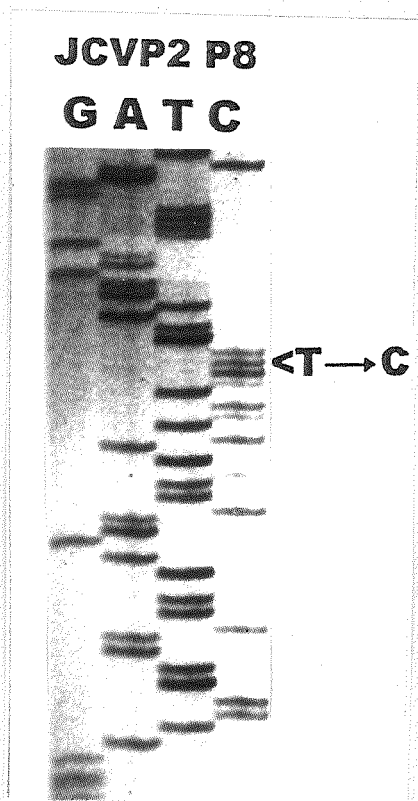
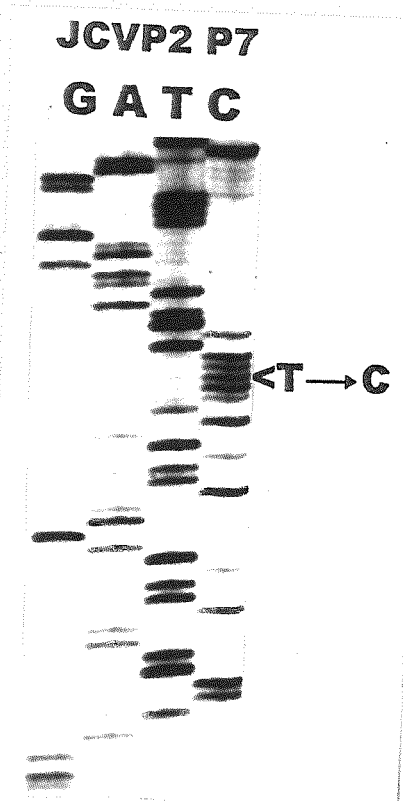
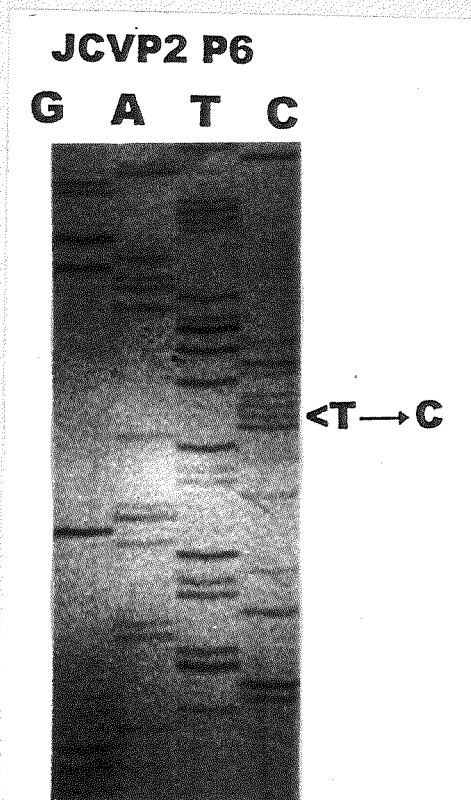
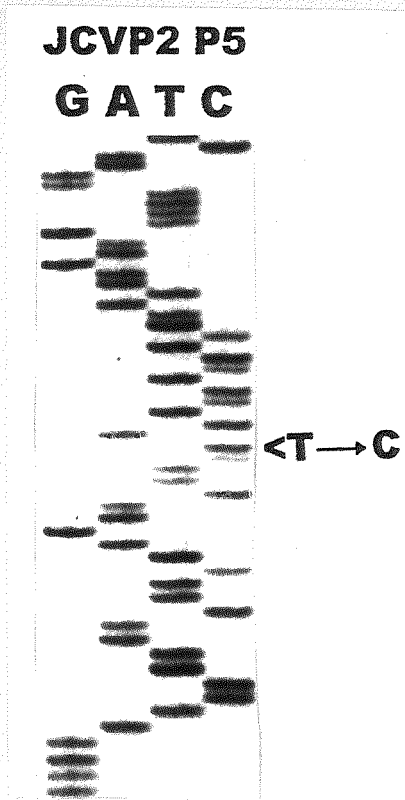
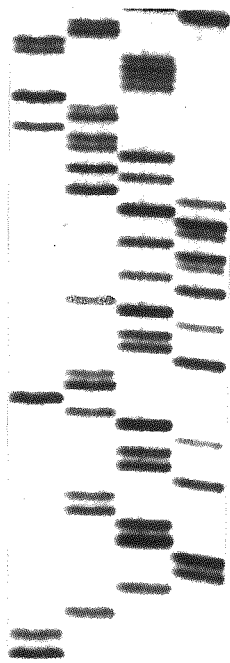


圖 12. JCV VP2 之 C-端 13 個點突變，以 DNA 序列分析鑑定。



JCVP2 P9

G A T C



←T→A

JCVP2 P10

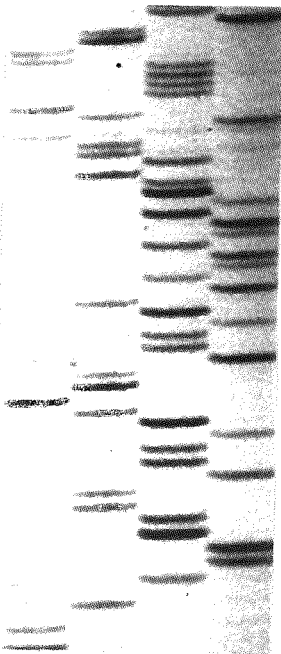
G A T C



←T→A

JCVP2 P11

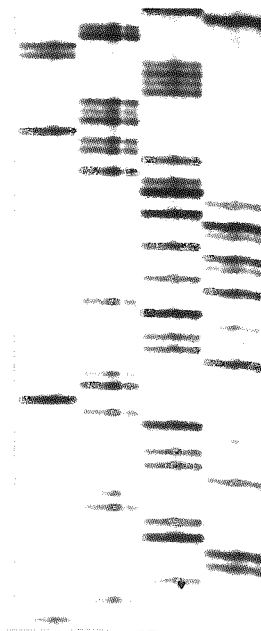
G A T C



←A→C

JCVP2 P12

G A T C

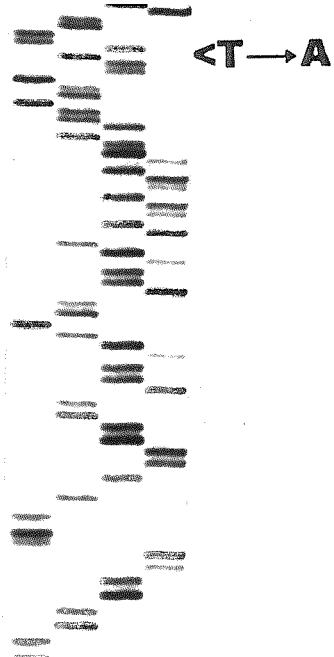


←G→A



JCVP2 P13

GATC



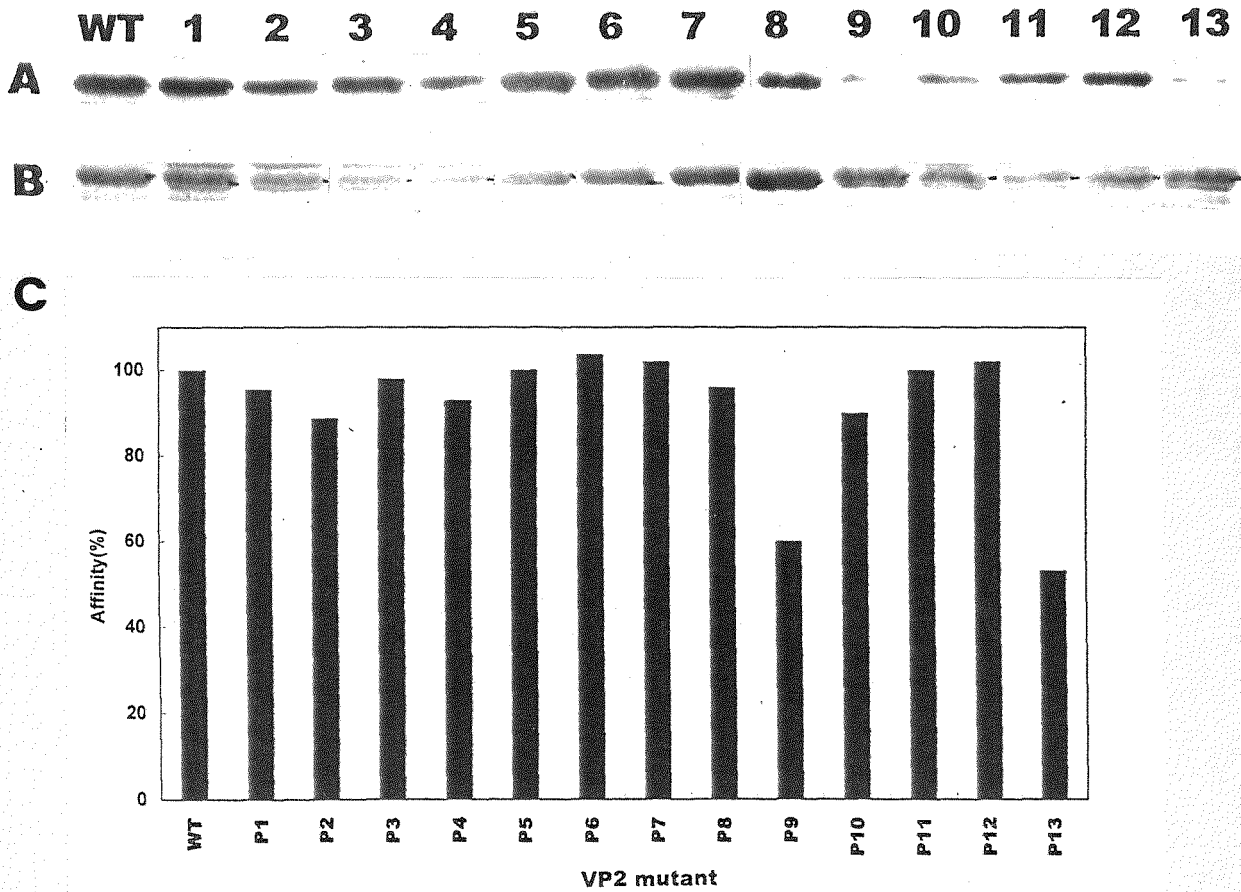


圖 13. VP2 及 VP2 13 個點突變 mutants 之 DNA binding affinity assay。VP2 及 13 個 mutants 經 SDS-PAGE 分離後，轉印至 NC paper 後行 Southwestern(A)、Western blot(B)及 densitometry(C)偵測 VP2 mutants 之 DNA 結合強度。WT 為 VP2-GST，lane 1 → lane 13 為 P1 → P13。

Table1. The primers used for cloning and sequencing of Taiwan-3 JCV VP2 gene

Primer	Sequences (5' →3')	Location
JCV2S1	CACTTGGGATCCATGGGTGCCGCACTTGCAC <del>TTTTG</del>	1-24/VP2
JCV2AS1	CACTTGGGATCCTTAACTTCTAGAACTTCTACTCCT	1012-1035/VP2
JCV2AS2	CACTTGGGATTCTTATTCTATAAATTCACCAGATTGCAG	811-834/VP2
JCV2AS3	CACTTGGGATCCTTATAAGTAACTGGTGAATTAGCTAT	610-633/VP2
JCV2AS4	CACTTGGGATCCTTAAATATTGTTAACAAGGCATTCAC	411-435/VP2
JCV2AS5	CACTTGGGATCCTTATACAGCCCCGGAGCTCCAGTTAT	211-234/VP2
pGexN-25	GAAGCTATCCCACAAATTGATAAGT	807-931/pGEX-4T-1
pGexC-25	CAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG	1037-1061/pGEX-4T-1

Table 2. Variation of endonuclease recognition sites between Taiwan-3 and Mad-1 JCV VP2 genes

Altered nucleotide number	Nucleotide alteration		Altered restriction site	
	Mad-1	Taiwan-3	Mad-1	Taiwan-3
531	C	A	Mnl I	non
626	C	T	Alu I	Hpa I Mse I Hinc II
698	T	G	non	Bsp1286 I Nla IV Ban I
726	T	C	Hae III Hae I Eae I Bal I	non

Table 3. Amino acid changes among Mad-1, GS/B and Taiwan-3 JCV VP2

Codon changes			Amino acid affected	Amino acid changes		
Mad-1	GS/B	Taiwan-3		Mad-1	GS/B	Taiwan-3
ACT	ACT	TCT	87	Thr	Thr	Ser
TTG	TTG	GTG	97	Leu	Leu	Val
GCC	TCT	TCT	175	Ala	Ser	Ser
GCT	GTT	GCT	209	Ala	Val	Ala
GCT	GCT	GTT	219	Ala	Ala	Val
GTT	GTT	GGT	233	Val	Val	Gly
CAC	CAC	TAC	245	His	His	Tyr
AGA	AAA	AAA	279	Arg	Lys	Lys

**Table.4 The primers used for PCR generation of VP2 mutants**

Peptide	primer	sequence ( 5' to 3' )	Location/VP2
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
WT	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACT TCT ACT CCT	1009—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
Δ C13	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA GGA ACT TGC AGC GGG	978—993
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
Δ C29	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ATC TTC ATA TGC TTC	931—942
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P1	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACC TCT AGA	1026—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P2	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCC AGA ACT	1023—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P3	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGC ACT TCT	1020—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P4	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACC TCT ACT	1017—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P5	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACT TCC ACT CCT	1014—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P6	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACT TCT ACC CCT CCT	1011—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P7	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT CTC AGA ACT TCT ACT CCC CCT CTT	1008—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P8	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACT TCT ACT CCT CCC CTT ATA	1005—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P9	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACT TCT ACT CCT CCT CAT ATA AGA	1002—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P10	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACT TCT ACT CCT CCT CTT AAA AGA AGT	999—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P11	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACT TCT ACT CCT CCT CTT ATA AGC AGT TTT	996—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TTG	1—24
P12	antisense	CAC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACT TCT ACT CCT CCT CTT ATA AGA AAT TTT GGA	993—1035
JCVP2	sense	CAC TTG <u>GGA TCC</u> ATG GGT GCC GCA CTT GCA CTT TT	1—24
P13	antisense	AC TTG GGA TCC TTA ACT TCT AGA ACT TCT ACT CCT CCT CTT ATA AGA AGT TAT GGA ACT	990—1035

## 参考文献

1. Aksmit, A. J., E. O. Major, and J. G. Ghatak (1987) Diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by brain biopsy with biotin labeled DNA:DNA *in situ* hybridization. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 46, 556-566.
2. Aksmit, A. J., P. Mourrain, J. L. Sever, and E. O. Major (1985) Progressive multifocal leukoencephalopathy: investigation of three cases using *in situ* hybridization with JCV virus biotinylated DNA probe. Ann. Neurol. 18, 490-496.
3. Andrews, C. A., K. V. Shah, R. W. Daniel, M. S. Hirsch, and R. H. Rubin (1988) A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. J. Infect. Dis. 158, 176-181.
4. Baker, T. S., J. Drak, and M. Bina. 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. Barkan, A., R. C. Welch, and J. E. Mertz (1987) Missense mutations in the VP1 gene of simian virus 40 that compensate for defects caused by deletions in the viral agnogene. J. Virol. 61, 3190-3198.
6. Beckman, A. M., K. V. Shah, and B. L. Padgett (1982) Propagation and primary isolation of papovavirus JC in epithelial cells derived from human urine. Infect. Immun. 38, 774-777.
7. Beckman, A. M., K. V. Shah (1983) Propagation and primary isolation of JCV and BKV in urinary epithelial cell cultures, Polyomaviruses and Human Neurological Disease. Sever, J. L. and D. L. Madden, eds., Alan R. Liss, New York , pp.3-14.
8. Bergsma, D. J., D. M. Olive, S. W. Hartzell, and K. N. Subramanian (1982) Territorial limits and functional anatomy of the simian virus 40 replication origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 381-385.

9. Bollag, B., W. F. Chuke, and R. J. Frisque (1989) Hybrid genomes of the polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40: Identification of sequences important for efficient transformation. *J. Virol.* 63, 863-872.
10. Bosch, E. P., P. A. Cancilla, and S. H. Cornell (1976) Computerized tomography in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch. Neurol.* 33, 216.
11. Brady, J. N., V. D. Winston, and R. A. Consigli. 1978 Characterization of a DNA-Protein complex and capsomere subunits derived from polyoma virus by treatment with ethyleneglycol-bis-*N,N'*-tetraacetic acid and dithiothreitol. *J. Virol.* 27:193-204.
12. Brooks, B. R., and D. L. Walker (1984) Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol. Clin.* 2, 299-313.
13. Brown, P., T. Tsai, D. C. Gajdusek (1975) Seroepidemiology of human papovaviruses. *Am. J. Epidemiol.* 102, 331-340.
14. Byrne, B. J., M. S. Davis, J. Yamaguchi, D. J. Bergsma, and K. N. Subramanian (1983) Definition of the simian virus 40 early promoter region and demonstration of a host range bias in the enhancement effect of the simian virus 40 72-base-pair repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 721-725.
15. Caputo, A., A. Corallini, and M. P. Grossi (1983) Episomal DNA of a BK virus variant in a human insulinoma. *J. Med. Virol.* 12, 37-49.
16. Carroll, B. A., B. Lane, D. Norman, and D. Enzmann (1977) Progressive multifocal leukoencephalopathy-diagnosis by computerized tomography. *J. Radiol.* 122, 137-141.
17. Carswell, S., and J. C. Alwine (1986) Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J. Virol.* 60, 1055-1061.



18. Chang, D.C., C-Y. Fung, W-C. Ou, P-C. Chao, S-Y. Li, M-L Wang, Y-L. Huang, T-Y. Tzeng, and R.-T. Tsai. 1997. Self Assembly of the JC Virus Major Capsid Protein VP1 Expressed in Insect Cells. *Journal of General Virol.* In press.
19. Chang, D.C., W-C. Ou, K.-K. Liao, M-L Wang, and C-Y. Fung. 1996. "Cloning, Expressing and Purification of the Recombinant Polyomavirus VP1 and Characterization of its DNA Binding Domain. *The Chung Shan Med. J.* 7:1-12.
20. Chang, D.C., Z-M., Liou, W-C. Ou, R.-T. Tsai, K-Z. Wang, M-L Wang, and C-Y. Fung. 1996. Production of the Antigen and the Antibody of the JC Virus Major Capsid Protein VP1. *J. of Virol. Methods.* 59:177-187.
21. Chang, D.C., M-L Wang, W-C. Ou, R.-T. Tsai, C.-Y. Fung, and Y.-J. Hwang. 1996. A Simple Method to Detect Human Polyomavirus DNA in Urine by Polymerase Chain Reaction. *J. of Virol. Methods.* 58:131-136.
22. Chang, D.C., R-T. Tsai, M-L Wang, and W-C. Ou. 1996. Different Genotypes of Human Polyomaviruses Found in Patients with Autoimmune Diseases in Taiwan. *J. of Med. Virol.* 48:204-209 .
23. Chang, D.C., M-L Wang, W-C. Ou, M-S. Lee, H-N. Ho, and R-T. Tsai. 1996. Genotypes of Human Polyomaviruses in Urine Samples of Pregnant Individuals in Taiwan. *J. of Med. Virol.* 48:95-101.
24. Chang, D. C., X. Cai, and R. A. Consigli (1993) Characterization of the DNA binding properties of the polyomavirus structural proteins VP1, VP2, and VP3. *J. Virol.* 67, 6322-6327.
25. Chang, D. C., J. I. Haynes, J. H. Brady, and R. A. Consigli (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.
26. Chang, D. C., J. I. Haynes, J. N. Brady, and R. A. Consigli (1992) Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology.* 191, 978-983.
27. Chenciner, N., G. Meneguzzi, and A. Corallini (1980) Integrated and free viral DNA in hamster tumors induced by BK virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 975-979.

28. Cikes, M., E. Beth, N. Guignard, D. L. Walker, B. L. Padgett, and G. Giraldo (1977) Purification of simian virus 40 and JC T-antigens from transformed cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* 59, 889-894.
29. Clever, J., and H. Kasamatsu. 1991. Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology* 181:78-90.
30. Coleman, D. V., S. D. Gardner, C. Mulholland, V. Fridiksdottir, A. A. Porter, R. Lilford, and H. Valimarsson (1983) Human polyomavirus in pregnancy. A model for the study of defence mechanisms to virus reactivation. *Clin. Exp. Immunol.* 53, 289-296.
31. Coleman, D. V., M. R. Wolfendale, R. A. Daniel, N. K. Dhanjal, S. D. Gardner, P. E. Gibson, and A. M. Field (1980) A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J. Infect. Dis.* 142, 1-8.
32. Conomy, J. P., M. A. Weinstein, D. Norman, D. Agamanolis, and W. S. Holt (1976) Computed tomography in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Am. J. Roentgenol.* 127, 663-665.
33. Dan, H., S. C. Harrison, (1994) Interactions among the Major and Minor Coat Proteins of Polyomavirus. *J. Virol.* 68: 3982-3989.
34. David, A.D., Peggy, P. Li, Linda, M. Lee, and Kasamatsu, H. (1995) Essential Role of the Vp2 and Vp3 DNA-Binding Domain in Simian Virus 40 Morphogenesis. *J. Virol.* 69: 1115-1121.
34. Daniel, R., K. Shah, D. Madden, and S. Stagno (1981) Serological investigation of the possibility of congenital transmission of papovavirus JC. *Infect. Immun.* 33, 319-321.
36. Dean, F. B., P. Bullock, Y. Murakami, C. R. Wobbe, L. Weissabach, and J. Hurwitz. 1987. Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV 40 large T antigen unminds DNA containing the SV40 origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 16-20.

37. Deb, S., A. L. DeLucia, C. P. Baur, A. Koff, and P. Tegtmeyer (1986) Domain structure of the simian virus 40 core region of replication. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1663-1670.
38. Deb, S., A. L. DeLucia, A. Koff, and P. Tegtmeyer (1986) The adenine-thymine domain of the simian virus 40 core region directs DNA bending and coordinately regulates DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4578-4584.
39. Deb, S. A., and P. Tegtmeyer (1987) ATP enhances the binding of simian virus 40 large T antigen to the origin of replication. *J. Virol.* 61, 3649-3654.
40. DeCaprio, J. A., J. W. Ludlow, J. Figge, J. Y. Shew, A. C. H. Huang, W. H. Lee, E. Marsilio, and E. Paucha (1988) SV40 LT Antigen forms a specific complex with the product of retinoblastoma susceptibility gene. *Cell.* 54, 275-283.
41. Deininger, P., Esty, A., LaPorte, P., and Freidmann, T. (1979) Nucleotide sequence and genetic organization of the polyoma late region : features common to the polyoma early region and SV40. *Cell* 18, 771-779.
42. DiMaio, D., and D. Nathans (1980) Cold sensitive regulatory mutants of simian virus 40. *J. Mol. Biol.* 140, 129-142.
43. Dodson, M., F. B. Dean, P. Bullock, H. Echols, and J. Hurwitz (1987) Unwinding of duplex DNA from the SV40 origin of replication by T antigen. *Science.* 238, 946-967.
44. Dynan, W. S., and R. Tjian (1983) The promoter-specific transcription factor SP1 binds to upstream sequences in the SV 40 early promoter. *Cell.* 35, 79-87.
45. Dyson, N., R. Bernards, S. H. Friend, L. R. Gooding, J. A. Hassell, E. O. Major, J. M. Pipas, T. Vandyke, and E. Harlow (1990) Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J. Virol.* 64, 1353-1356.
46. Dyson, N., K. Buchkovich, P. Whyte, and E. Harlow (1989) The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus. *Cell.* 58, 249-255.

47. Gharakhanian, E., Takahashi, J., Clever, J., and 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6607-6611.
48. Gharakhanian, E., and Kasamatsu, H. (1990) Two Independent Signal, Anuclear Localization Signal and a Vp1-Interactive Signal, Reside within the Carboxy-35 Amino Acid of SV40 Vp3. *Virology* 178:62-71
49. 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.
50. Fareed, G.C., K. K. Takemoto, and M. A. Gimbrone Jr (1987) Interaction of simian virus 40 and human papovaviruses BK and JC with human vascular endothelial cells, in Schlessinger D (ed); *Microbiology*, Washington DC, American Society for Microbiology, pp 427-431.
51. Feigenbaum, L., K. Khalili, E. Major, and G. Khoury (1987) Regulation of the host range of human papovavirus JCV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3695-3698.
52. Frisque, R. J., D. B. Rifkin, and D. L. Walker (1980) Transformation of primary hamster brain cells with JC virus and its DNA. *J. Virol.* 35, 265-269.
53. Frisque, R. J., G. L. Bream, and M. T. Cannella (1984) Human polyomaviruse JC virus genome. *J. Virol.* 51, 458-469.
54. Gardner, S. D., E. F. MacKenzie, C. Smith, and A. A. Porter (1984) Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J. Clin. Pathol.* 37, 578-586.
55. Gerard, R., and Y. Gluzman (1986) Functional analysis of the role the A+T-rich region and upstream flanking sequences in simian virus 40 DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4570-4577.

56. Gharakhanian, E., Takahashi, J., and Kasamatsu, H. (1987) The carboxyl 35 amino acids of SV40 Vp3 are essential for its nuclear accumulation. *Virology* 157,440-448.
57. Gibson, W.(1974) Polyoma virus proteins : a description of the structural protein of the virion based on polyacrylamide gel electrophoresis and peptide analysis. *Virology* 62,319-336.
58. Gibson, P. E., A. M. Field, S. D. Gardner, and D. V. Coleman (1981) Occurrence of IgM antibodies against BK and JC polyomaviruses during pregnancy. *J. Clin. Pathol.* 34, 674-679.
59. Gillock, E.T., S. Rottinghaus, D.C. Chang, X. Cai, S.A. Smiley, and R.A. Consigli. 1997. Polyomavirus Major Capsid Protein VP1 Is Capable of Packaging Cellular DNA When Expressed in the Baculovirus System. *J. of Virol.* 71:2857-2865.
60. Gillock, E., S. Rottinghaus, A. Paulsen, S. Smiley, D.C. Chang, and R. A. Consigli. 1997. The Effect of Microgravity on the Stability and Assembly of Viral Proteins. *Space Techn.* In Press.
61. Grinnell, B. W., B. L. Padgett, and D. L. Walker (1983) Distribution of non-integrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 147, 669-675.
62. Kasamatsu, H., and Nehorayan, A., (Vp1 affects intraxellular localization of Vp3 polypeptide during simian virus 40 infection. *Pro. Natl. Acad. USA* 76:2808-2812.
63. Haggerty, S., D. L. Walker, and R. J. Frisque (1989) JC virus-simian virus 40 genomes containing heterologous regulatory signals and chimeric early regions: Identification of regions restricting transformation by JC virus. *J. Virol.* 63, 2180-2190.
64. Hertz, G. Z., M. R. Young, and J. E. Mertz (1987) The A+T- rich sequence of the simian virus 40 origin is essential for replication and is involved in bending of the viral DNA. *J. Virol.* 61, 2322-2325.

65. Hinds, P., C. Finlay, and A. J. Levine (1989) Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.* 63, 739-746.
66. Horgan, T. F., B. L. Padgett, D. L. Walker, E. C. Borden, and Z. Frias, 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.
67. Horgan, T. F., E. C. Borden, J. A. McBain, B. L. Padgett, and D. L. Walker 1980. Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. *Ann. Intern. Med.* 92, 373-378.
68. Houff, S. A., E. O. Major, D. A. Katz, C. V. Kufta, J. L. Sever, S. Pittaluga, R. J. Roberts, and J. Gett 1988 Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *N. Eng. J. Med.* 318, 301-305.
69. Iwamura, Y., K. Mitamura, and K. Yanagi (1986) Transforming potential of DNA of human PLC/PRF/5 hepatoma cell line. *Intervirology*. 26, 223-227.
70. Clever, J., David A.D., H. Kasamatsu (1993) Identification of a DNA Binding Domain in Simian Virus 40 Capsid Protein Vp3 and Vp3. *J. Biol. Chem.* 268:29877-20883.
71. Khalili, K., J. Brady, and G. Khoury (1987) Translational regulation of SV40 early mRNA defines a new viral protein. *Cell.* 48, 639-645.
72. Kozak, M (1984) Selection of initiation sites by eukaryotic ribosomes: Effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic. Acids. Res.* 12, 3873-3893.
73. Kozak, M (1984) Complication and analysis of sequences upstream from the transcriptional start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic. Acids. Res.* 12, 857-872.

74. Lane, B., B. A. Carroll, and T. A. Pedley (1978) Computerized cranial tomography in cerebral diseases of white matter. *Neurology*. 28, 534-544.
75. Lee-Chen, G. J., and M. Woodworth-Gutai (1986) Simian virus 40 DNA replication: functional organization of regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3086-3093.
76. Li, J. J., P. W. C. Peden, R. A. F. Dixon, and T. Kelly (1986) Functional organization of simian virus 40 origin of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1117-1128.
77. Liddington, R. C., Y. Yang, J. Moulai, R. Sahli, T. L. Benjamin, and S. C. Harrison (1991) Structure of simian virus 40 at 3.8A resolution. *Nature*. 354, 278-284.
78. Lin, W., T. Hata, and H. Kasamatsu. (1984) Subcellular distribution of viral structural proteins during simian virus 40 infection. *J. Virol.* 50: 363-371.
79. London, W. T., S. A. Houff, D. L. Madden, D. A. Fuccillo, M. Gravell, W. C. Wallen, A. E. Palmer, J. L. Sever, B. L. Padgett, D. L. Walker, G. M. Zu Rhein, and T. Ohashi. 1978 Brian tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus). *Science*. 201, 1246-1249.
80. Lynch, K. J., and R. J. Frisque (1990) Identification of critical elements within the JC virus DNA replication origin. *J. Virol.* 64, 5812-5822.
81. Lynch, K. J., and R. J. Frisque. 1991 Factors contributing to the restricted DNA replicating activity of JC virus. *Virology*. 180, 306-317.
82. Major, E. O., P. Mourrain, and C. Cummins. 1984 JC virus-induced owl monkey glioblastoma cells in culture: Biological properties associated with the viral early gene product. *Virology*. 136, 359-367.
83. Major, E. O., A. E. Miller, P. Morrain, R. G. Traub, E. deWidt, and J. Sever 1985. Establish of a line of human fetal glial cells that support JC virus multiplication. *Proc. Natl. Sci. USA* 82, 1257-1261.

84. Mandl, C., D. L. Walker, and R.J. Frisque. 1987. Derivation and characterization of POJ cells, transformed human fatal glial cells that retain their permissivity for JC virus. *J. Virol.* 61, 755-763.
85. Matsuda, M., K. Nagashima, and W. Mori (1987) Origin of the medulloblastoma experimentally induced by human polyomavirus JC. *J. Natl. Cancer. Inst.* 79, 585-591.
86. McMillen, J., and R. A. Consigli. 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.
87. Mew, R. T., G. Lecatsas, O. W. Prozesky, and E. H. Barley. 1981. Characteristics of BK papovavirus DNA prepared directly from human urine. *Intervirology.* 16, 14-19.
88. Miller, J. R., R. E. Barret, C. B. Britton, M. L. Tapper, G. S. Bahr, P. J. Bruno, M. D. Marquardt, A. P. Hays, J. G. I. I. I. McMurtry, J. B. Weissman, and M. S. Bruno. 1982. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a male homosexual with T-cell immunodeficiency. *N. Eng. J. Med.* 307, 1436-1438.
89. Miranda, A., L. Babiss, P. Fisher. 1983. Transformation of human skeletal muscle cells by SV40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6581-6585.
90. Norio Ishii, Akira Nakanishi, Masayasu Yamada, Michael H. Macalalad, and Harumi Kasamatsu. 1994. Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of simian virus 40 structural protein. *J. Virol.* 68, 8209-8216.
91. O'Neill, F. J., L. Renzetti, T. H. Miller, and R. Stevens (1988) Transformation of human cells by a polyomavirus containing complementing JCV and RFV genomes. *Virus. Res.* 11, 109-125.
92. Ortwin, R., K. Manfred, M. Hermann, and H. Gerd (1988) The genome of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology.* 165, 74-86.



93. Ou, W.-C., R.-T. Tsai, M.-L. Wang, C.-Y. Fung, T.-H. Hseu, and D.C. Chang . 1997. Genomic Cloning and Sequencing of Taiwan-3 JC Virus from the Urine of a Rheumatoid Arthritis Patient. *J. Form. Med. Ass.* In press
94. Ou, W.-C., T.-H.Hseu, and D. C. Chang. 1997. Self-assembly and nucleic acid encapsidation of human neurotropic JC virus major capsid protein VP1 expressed in *E.coli* . In preparation.
95. 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, 656-662.
96. Padgett, B. L., and D. L. Walker (1980) Human papovavirus JCV: Natural story, timorigenicity and interaction with human cells in culture. *Cold Spring Harbor Conf. Cell. Prolif.* 7, 319-327.
97. Pater, A., M. M. Pater, and G. Di Mayorca (1980) The arrangement of the genome of the human papovavirus. *BK Virus. J. Virol.* 36, 480-487.
98. Rayment, I., T. S. Baker, D. L. D. Caspar, and W. T. Murakami (1982) Polyoma virus capsid structure at 22.5 A resolution. *Nature.* 295, 110-115.
99. Rentier-Delrue, F., A. Lubiniecki, and P. M. Howley (1981) Analysis of JC virus DNA purified directly from human progressive multifoacal leukoencephalopathy brains. *J. Virol.* 38, 761-769.
100. Resnick, J., and T. Shenk (1986) Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell to cell spread of virus. *J. Virol.* 60, 1098-1106.
101. Roberts, B. 1989. Nuclaeer location signal-mediated protein transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1008, 263-280
102. Richard J. Frisque, Gary L. Bream, and Maria T. Cannella. 1984. Human polyoma virus JC virus genome. *J. Virol.* 51, 458-469.

103. Seif, I., G. Khoury, and R. Dhar (1979) The genome of human papovavirus BKV. *Cell*. 18, 963-977.
104. Shein, H. M., and J. F. Enders (1962) Transformation induced by SV 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, 1164-1172.
105. Shein, H. M (1967) Transformation of astrocytes and destruction of spoglioblasts induced by a simian tumor virus (SV40) in cultures of human fetal neuroglia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26, 60-76.
106. Sieda, E (1979) The primary sequence of the late region polyoma virus DNA II. The expression of the late genes and comparison with DNA sequences of SV40 and BKV. *Nucleic acids. Res.* 6, 157-160
107. Simmons, D. T (1980) Characterization of tau antigens isolated from uninfected and simian virus 40-infected monkey cells and papovavirus-transformed cells. *J. Virol.* 36, 519-525.
108. Silverman, L., and L. J. Rubinstein (1965) Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leucoencephalopathy. *Acta. Neuropathol.* 5, 215-224.
109. Stahl, H., P. Droge, and R. Knippers (1986) DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *EMBO J.* 5, 1939-1944.
110. Subramanian, K. N., and T. Shenk (1978) Definition of the boundaries of the origin of DNA replication in SV 40. *Nucleic Acids Res* 5, 3635-3642.
111. Sue E. Delos, Lynne Montross, Robert B. Moreland, and Robert L. Garcea. 1993. Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 protein in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alter VP2/VP3 subcellular location. *Virology* 194, 393-398.

112. Takemoto, K. K (1980) Human polyoma viruses: Evaluation of their possible involvement in human cancers, in Essex M, Todaro G, zur Hansen H (eds): *Viruses in Naturally Occurring Cancers, Book A: Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory. 7, 311-319.
113. Takemoto, K. K., and H. Linke, T. Miyamura (1979) Persistent BK papovavirus infection of transformed human fetal brain cells. I. Episomal viral DNA in cloned lines deficient in T-antigen expression. *J. Virol.* 29, 1177-1185.
114. Tooze, J. 1981. *DNA tumor virus*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbort, NY
115. Tsai, R.-T., T.-Y. Tzeng, C.-Y. Fung, W.-C. Ou, M.-L. Wang, Y.-L. Huang and Chang, D.C. 1997. Characterization of the Antisera against JC Virus by Immunoblotting and Hemagglutination Inhibition. *J. Med. Virol.* Submitted.
116. Tsai, R.-T., M.L. Wang, W.-C. Ou, Y.-L. Lee, S.-Y. Li, C.-Y. Fung, Y.-L. Huang, T.-Y. Tzeng, and D.C. Chang. 1997. "Viruria incidence of JC virus is higher than that of BK virus in Taiwan". *J. Med. Virol.* In press.
117. Tzen, T.-Y. and D. C. Chang. 1997. Molecular investigation of immunoreactivities and interacting domains of human polyomavirus JCV major capsid protein VP1. Master Thesis.
118. 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.
119. 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.
120. Willoughby, E., R. W. Price, B. L. Padgett, D. L. Walker, and B. Dupont. 1980. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML); *in vitro* cell-mediated immune responses to mitogens and JC virus. *Neurology.* 30, 256-262.

121. Wold, M. S., J. J. Li, and T. J. Kelly. 1987. Initiation of simian virus 40 DNA replication *in vitro*: Large-tumor-antigen and origin-dependent unwinding of the template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3643-3647.
122. Wroblewska, Z., M. Wellish, and D. Gildea. 1980. Growth of JC virus in adult human brain cell cultures. *Arch. Virol.* 65, 141-148.
123. Wychowski, C., D. Benichou, and M. Girard. 1987. The intranuclear location of simian virus 40 polypeptide VP2 and VP3 depend on a specific amino acid sequence. *J. Virol.* 61, 3862-3869.
124. Xiaoyin Cai, Deching Chang, Scott Rottinghaus, and Richard A. Consigli. Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus protein. *J. Virol.* 68, 7609-7613.
125. Yamaguchi, M., and M. L. DePamphilis (1986) DNA binding site for a factor(s) required to initiate simian virus 40 DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1646-1650.