

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460564

研究課題名(和文) ウイルス複製蛋白質を標的にしたHPVゲノム排除方法の開発

研究課題名(英文) Mechanisms of degradation of human papillomavirus DNA helicase E1

研究代表者

柊元 巖 (Kukimoto, Iwao)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長

研究者番号：70291127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパピローマウイルスのゲノム複製には、ウイルスDNAヘリカーゼであるE1タンパク質が必要である。本研究は、細胞内でのE1分解機構の解析を行い、E1が自身のATPase活性に依存する形で分解されること、さらにポリユビキチン化を受けてプロテアソーム系で分解されることを明らかにした。また細胞内E1レベルに対する各種阻害剤の効果を調べたところ、ポリADPリボースポリメラーゼの阻害剤XAV939の処理によりE1レベルが上昇した。XAV939の標的を探索した結果、ポリADPリボースポリメラーゼ1がE1の機能を負に制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genome replication of human papillomavirus requires viral replicative DNA helicase E1, and regulation of intracellular E1 levels is important for controlling the virus life cycle. This study aimed to elucidate viral and cellular mechanisms of regulating E1 levels. We found that E1 was degraded in a manner dependent on its own ATPase activity, and that E1 was poly-ubiquitinated and degraded via the proteasome pathway. We further demonstrated that intracellular E1 levels were up-regulated with the treatment of tankyrase inhibitor XAV939, although the potential target of XAV939 for E1 up-regulation was not tankyrase but poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1), suggesting that PARP1 is involved in negative regulation of E1 function.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒトパピローマウイルス 子宮頸癌 ユビキチン タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス(HPV)は、約8 kbの環状DNAゲノムを持つ小型DNAウイルスであり、皮膚に感染する皮膚型と生殖器粘膜に感染する粘膜型とに大きく分類される。約40種類の粘膜型HPVのうち、HPV16などの15種類の遺伝子型は子宮頸癌の原因となることが示されている。HPVは性行為を介して感染して、子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)を引き起こし、10-15年の持続感染期間を経て浸潤癌を発生させる。CIN1などのHPV感染による初期病変では、HPVゲノムは感染細胞の核内で環状エピゾームとして維持されている。一方、CIN3から子宮頸癌への進展にともなって細胞ゲノムへのHPV DNA組込みが起こり、HPVの癌タンパク質E6/E7の高発現細胞が生じると考えられている。HPV組込みは細胞ゲノムのランダムな部位に起こることから、組込みが起こった細胞からHPV DNAを取り除くことは原理的に難しい。そのためHPV感染を排除するには、組込みが起こる前の段階でHPVゲノムを取り除く必要があるが、未だ有効な薬剤は開発されていない。

HPVゲノムがエピゾームとして感染細胞に維持されるには、二つのウイルスタンパク質E1、E2が必要である。E1はウイルスDNAの複製起点に結合して、DNA複製を開始させるDNAヘリカーゼであり、E2はE1を複製起点にリクルートする機能を持っている。最近、CIN1病変から樹立されたHPV16感染細胞株(W12細胞)を用いて、細胞周期のS期阻害剤やチェックポイント阻害剤が、HPVゲノムのコピー数を低下させる作用を持つことが報告されている(J Virol, 2013, Vol. 87:3979)。阻害剤処理によりHPVゲノム上の複製フォークが停止して、細胞ヌクレアーゼによりHPVゲノムが分解されるためと推定されているが、その詳細な分子機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、HPVの複製に必須の働きを持つE1の細胞内での活性制御機構、特に分解機構を明らかにして、HPVゲノム複製機構を標的とした新たなHPV排除方法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

HEK293細胞にN末端にFLAGタグをつけたHPV16 E1の発現プラスミドをトランスフェクトし、種々の阻害剤で処理した後、E1の細胞内レベルの変化を抗FLAG抗体によるウェスタンブロット法にて調べた。

C33A細胞でのHPV DNA複製アッセイ系を用いて、E1分解に関わる細胞ユビキチンリガーゼの探索を行った。384種類の細胞ユビキチンリガーゼ及び関連タンパク質を含む発現プラスミドライブラリーをトランスフェクトして、HPV複製に影響を与える細胞タンパク質をスクリーニングした。

またHEK293細胞で各種の細胞タンパク質をsiRNAノックダウンして、細胞内でのE1レベルの変化をウェスタンブロット法にて調べた。

4. 研究成果

(1) HEK293細胞を用いてE1発現レベルの制御機構について解析を行った。ATPase活性を完全に失ったHPV16 E1変異体(K483A)は、wild-typeと比較して細胞内での発現レベルが著しく上昇した。HPV18 E1の同時発現によりK483Aの発現レベルがwild-typeと同程度に低下したことから、E1が自身のATPase活性に依存する形で分解を受けることが示唆された。細胞をプロテアソーム阻害剤であるMG-132で処理するとE1の発現量が上昇し、ポリユビキチン化されたE1が検出されるようになったことから、ユビキチン・プロテアソーム系にてE1が分解されることが示された。また、HEK293細胞でHA-TR-TUBEタンパク質を共発現させ、ポリユビキチン化されたE1を高感度に検出する実験系を用いて、E1のポリユビキチン化を確認した。

さらにE1の発現により、ユビキチン化された細胞内タンパク質の全量が低下すること、またE1により細胞内のプロテアソーム活性自体が上昇した。これらの結果は、E1が自身のATPase活性によって細胞内ユビキチン・プロテアソーム系の活性化を誘導し、細胞内環境を大幅に変化させることを示している。

(2) 細胞内での分解に必要なE1の分子内ドメインについて解析を行った。E1はN末端制御ドメイン(ND)、DNA結合ドメイン(DBD)、多量体形成ドメイン(OD)、ヘリカーゼドメイン(HD)から構成されている。FLAGタグをN末端に買った付与したHPV16 E1のC末端からの欠失変異体(HDを削った1-439、OD+HDを削った1-359、DBD+OD+HDを削った1-184)の発現プラスミドを作成し、293細胞に導入したところ、これらの欠失変異体はATPase活性を持たないため、細胞内で分解を受けなかった。そこで同時に発現させるHPV18 E1によって、これらの欠失変異体が分解されるかを、抗FLAG抗体によるウェスタンブロットによって検討したところ、三つの欠失変異体は同じように分解を受けた。従って、ND内にE1分解に必要なアミノ酸配列が存在することが示された。一方で、HDだけを含むN末端からのE1欠失変異体は細胞内での発現レベルが低く、HPV18 E1によって分解されたことから、HD内にもE1分解に関わるアミノ酸配列があると考えられた。

(3) C33A細胞でのHPV DNA複製アッセイ系を用いて、E1分解に関わる細胞ユビキチンリガーゼの探索を行った。細胞ユビキチンリガーゼ及び関連タンパク質を含む発現プラスミドライブラリーをスクリーニングした結果、

複製レベルを低下させる細胞タンパク質として FBXW5 が見出された。一方で、HEK293 細胞で FBXW5 をノックダウンしても、E1 レベルに変化は見られなかった。また FBXW5 は cullin RING E3 コピキチンリガーゼの構成タンパク質として働くことから、cullin の NEDD8 化阻害剤 MLN4924 の効果を HEK293 細胞で検討したところ、E1 レベルに大きな変化は認められなかった。これらの結果から、FBXW5 は E1 レベルを下げる以外のメカニズムで、HPV 複製を負に制御していると考えられた。

(4) 細胞内 E1 レベルに対する各種阻害剤の効果を調べる中で、ポリ ADP リボースポリメラーゼであるタンキレースの阻害剤 XAV939 の処理により、HEK293 細胞での E1 レベルが上昇することが分かった。そこで XAV939 の作用点を明らかにするために、XAV939 の標的タンパク質である TNKS1/2 もしくは PARP1 を siRNA ノックダウンして、E1 レベルに対する XAV939 の効果を検討した。その結果、TNKS1/2 ノックダウンでは XAV939 の効果に変化は認められなかった。一方、PARP1 のノックダウンにより、E1 上昇効果が部分的に低下することが分かり、XAV939 の作用点として PARP1 が示唆され、PARP1 が細胞内 E1 レベルを負に制御している可能性が考えられた。また、上述の細胞コピキチンリガーゼのスクリーニングの結果、RNF146 が E1 レベルを著しく上昇させることを見出しており、RNF146 によるコピキチン化によって分解される標的タンパク質として PARP1 が知られていることから、PARP1 が E1 レベルの制御に関わっていることが支持された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

I. Kukimoto, and M. Muramatsu. Genetic variations of human papillomavirus type 16: implications for cervical carcinogenesis. Japanese Journal of Infectious Diseases, 68:169-175 (2015)

I. Kukimoto, S. Mori, S. Aoyama, K. Wakae, M. Muramatsu, and K. Kondo. Hypermutation in the E2 gene of human papillomavirus type 16 in cervical intraepithelial neoplasia. Journal of Medical Virology, 87:1754-1760 (2015)

K. Wakae, S. Aoyama, Z. Wang, K. Kitamura, G. Liu, A. M. Monjurul, M. Koura, M. Imayasu, N. Sakamoto, M. Nakamura, S. Kyo, S. Kondo, H. Fujiwara, T. Yoshizaki, I. Kukimoto, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, T. Nishiyama, and M. Muramatsu. Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by

Next-Generation Sequencing. Virology, 485:460-466 (2015)

Y. Torii, T. Fujii, I. Kukimoto, M. Saito, T. Iwata, H. Takahashi, R. Ichikawa, S. Kawai, S. Otani, and D. Aoki. Comparison of methods using paraffin-embedded tissues and exfoliated cervical cells to evaluate human papillomavirus genotype attribution. Cancer Science, 107: 1520-1526. (2016)

S. Mori, T. Takeuchi, Y. Ishii, T. Yugawa, T. Kiyono, H. Nishina, and I. Kukimoto. Human papillomavirus 16 E6 upregulates APOBEC3B via the TEAD transcription factor. Journal of Virology, 91. e02413-16 (2017)

〔学会発表〕(計 18 件)

森 清一郎、柁元 巖. ヒトパピローマウイルス 16 型のがん蛋白質 E6/E7 による APOBEC3B プロモーターの活性化、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月、横浜

柁元 巖、近藤一成、岩田 卓、川名 敬. 日本人女性の CIN2/3 および子宮頸部浸潤癌での HPV 遺伝子型分布 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月、横浜
森 清一郎、竹内隆正、石井克幸、柁元 巖、ヒトパピローマウイルス 16 型 E6/E7 による APOBEC3B プロモーターの活性化機構、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜

若江亨祥、Ahasan M Monjurul、王 哲、喜多村晃一、森 清一郎、柁元 巖、中村充弘、藤原 浩、村松正道. APOBEC3 は HPV16 Pseudovirion の感染性を低下させる、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月、横浜

増田雄司、柁元 巖、益谷央豪. Mechanisms of ubiquitin chain elongation on p53 by a HECT E3 ligase. E6AP-E6 complex. 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月、横浜

Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Maehama T, Kukimoto I. Wee1 binds to and stabilizes the E1 helicase of human papillomavirus type 16. 29th International Papillomavirus Conference, 2014 年 8 月、シアトル

I. Kukimoto, K. Kondo, M. Muramatsu, and S. Mori. Hypermutation in the E2 Gene of HPV16 in Cervical Intraepithelial Neoplasia. DNA Tumour Virus Meeting, 2015 年 7 月、Trieste

S. Mori, T. Takeuchi, Y. Ishii, and I. Kukimoto. Mechanisms of APOBEC3B Promoter Activation by HPV16 E6. International Papillomavirus

Conference, 2015年9月, Lisbon
I. Kukimoto, S. Mori, and K. Kondo. Hypermutation in the E2 Gene of HPV16 in Cervical Intraepithelial Neoplasia. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月、名古屋
A. Taguchi, K. Nagasaka, K. Kawana, H. Nakamura, I. Kukimoto, K. Oda, and T. Fujii. The significance of the existence of novel HPV16 derived antisense RNAs and the TSS-switch of HPV16 transcriptomes. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月、名古屋
Y. Ishii, S. Mori, T. Takeuchi, and I. Kukimoto. The L2 capsid protein of HPV16 promotes viral uncoating by inhibiting virus entry into the Golgi body through the L2-TRAPPC8 interaction. 第68回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月、福岡
増田雄司、柗元 巖、益谷央豪. HECTタイプユビキチンリガーゼによるK48ユビキチン鎖合成の分子機構 第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月、神戸
Y. Masuda, I. Kukimoto, C. Masutani. Mechanism of Lysine 48-linked Multiple Ubiquitin Chain Synthesis by an HECT Ubiquitin Ligase. EMBO Conference on Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers: From molecular mechanisms to human diseases, 2015年9月、Cavtat, Croatia
S. Mori, T. Kiyono, H. Nishina, and I. Kukimoto. Activation of human APOBEC3B promoter by HPV16 E6 through TEAD transcription factors. 第64回日本ウイルス学会学術集会、2016年10月、札幌
S. Mori, H. Nishina, and I. Kukimoto. TEAD-dependent, YAP/TAZ-independent activation of human APOBEC3B promoter by HPV16 E6. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
T. Fujii, I. Kukimoto, T. Iwata, and D. Aoki. Estimation of HPV genotype attribution using cervical exfoliated cells for monitoring the efficacy of HPV vaccines. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
Y. Masuda, Y. Saeki, S. Yanaka, H. Kawai, I. Kukimoto, K. Kato, K. Tanaka, C. Masutani. Mechanism of multiple lysine 48-linked ubiquitin chain synthesis by E6AP. FASEB Science Research Conference, UBIQUITIN & CELLULAR REGULATION, 2016年6月 Montana, U.S.A.

I. Kukimoto, Y. Tenjimbayashi, Y. Hirose, M. Onuki, K. Matsumoto, S. Mori. Upregulation of APOBEC3B cytidine deaminase by HPV E6 and E7 via the TEAD transcription factor. DNA Tumour Virus Meeting, 2017年7月、バーミンガム

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柗元 巖 (KUKIMOTO, Iwao)
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長
研究者番号：70291127

(2) 研究分担者

なし()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし()