

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22590425

研究課題名（和文）ヒトパピローマウイルス感染初期過程における宿主蛋白質の役割

研究課題名（英文）Identification of a host protein that is necessary for the initial stage of HPV infection

研究代表者

石井 克幸 (Ishii Yoshiyuki)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官

研究者番号 90342899

研究成果の概要（和文）：ヒトパピローマウイルス（HPV）はエンヴェロープの無い小型 DNA ウイルスである。キャプシドは L1 と L2 から構成される。本研究では HPV 感染の初期過程に重要な役割を果たす L2 と特異的に相互作用する宿主蛋白質を同定し、この相互作用に依存した HPV 感染の分子機構の解明を試みた。L2 に特異的に相互作用する細胞内蛋白質 Transport protein particle complex subunit 8 (TRAPPC8) を同定した。この TRAPPC8 は HPV の細胞内侵入に必須な蛋白質であることが分かった。ただし、この侵入機構に L2-TRAPPC8 相互作用は無関係であった。一方、L2 はゴルジ体を特異的に分散することが明らかとなり、この分散は TRAPPC8 ノックダウン細胞のそれと酷似していた。HPV は L1 キャプシドを介した TRAPPC8 に依存したエンドサイトーシス機構を利用して細胞内に侵入した後、L2 が TRAPPC8 の機能を阻害し、感染を成功させると推察された。この L2 による TRAPPC8 の機能阻害はウイルスゲノムがトランスゴルジネットワーク (TGN) から脱出する機構に重要な役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The human papillomavirus (HPV) is a member of the papillomaviridae family of non-enveloped DNA tumor viruses. Differing from enveloped viruses, HPVs are thought to gain cell entry and escape into the cytoplasm using their own strategy. However, the cellular machinery required for the initial infection stage is poorly understood. Here we report that transport protein particle complex subunit 8 (TRAPPC8), a host protein that interacts with HPV minor capsid protein L2, plays a crucial role in the HPV entry process. TRAPPC8-knockdown epithelial cells showed reduced susceptibility to pseudovirus (PsV) transduction and authentic virus infection. TRAPPC8 was present in cytosolic and microsomal fractions of HeLa cells. The C-terminal region was exposed on the cell surface and co-localized with PsV after inoculation with PsV. The entry of PsV and L2-deficient PsV into TRAPPC8-knockdown cells was severely impaired, suggesting that TRAPPC8 plays an important role in HPV entry in a L2 interaction-independent manner. On the other hand, expression of GFP-fused L2s that can interact with TRAPPC8 induced dispersal of Golgi stack structure in HeLa cells, which is a phenotype observed by TRAPPC8 knockdown. These results imply a possibility that during viral intracellular trafficking L2 binding to TRAPPC8 inhibits its function and results in Golgi de-stabilization, which may help an escape of the HPV genome from the trans-Golgi network into the cytoplasm or nucleus after attaining cell entry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,100,000	0	1,100,000

2012年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HPV, L2, TRAPP 複合体, TRAPPC8, エンドサイトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

HPV は環状 2 本鎖 DNA をゲノムとする粒径約 50nm のウイルスである。これまでに 100 以上の HPV 遺伝子型がみつき、そのうち HPV16 型をはじめとする 15 の高リスク型が子宮頸癌の原因となる。HPV はエンヴェローブのないウイルスで、そのキャプシドは主構成蛋白質 L1 と副構成蛋白質 L2 の 2 種類のみで構成されている。このため、細胞接着からウイルスゲノム放出を成し遂げるまでに実にさまざまな細胞内因子を利用していると思われる。しかし、この過程の分子機構はほとんど解明されていない。これは HPV 粒子の調製の困難さに起因する。HPV は感染細胞の分化に連動して産生され、培養細胞ではその調製が著しく困難なのである。

この困難を克服するため、HPV 偽ウイルスの開発が行われ、最近、調製も容易でしかも高い感染価を有する偽ウイルスの開発に成功した。これは、ウイルスゲノムの代わりにレポーター遺伝子をパッケージしたウイルスで、現在ではその有用性が認知され、HPV 感染初期過程の分子機構解明の研究材料として利用されている。

この偽ウイルスを使い、データベースに登録されている HPV51 型には感染株 (Ma 株) と非感染株 (Nu 株) の 2 種類があることを明らかにした。さらに、Nu 株の非感染性の原因が L2 の N 端側の変異であることを突き止め、Nu 株 L2 には相互作用せず、Ma 株 L2 にのみ相互作用する宿主蛋白質 Transport protein particle complex subunit 8 (TRAPPC8: 旧名 KIAA1012) を質量分析とペプチドマスフィンガープリントで同定した。

TRAPPC8 は cDNA がクローニングされ、上皮を含む多くの組織で発現が確認されている。線虫やハエに至る多くの種で保存されているため TRAPPC8 は生物として重要な役割を担っていると考えられるが、その機能は不明である。TRAPPC8 の N 末端側から約 600 アミノ酸までは酵母の Trs85 蛋白質と相同性があるため、TRAPPC8 は Trs85 の機能として報告されている膜融合や小胞輸送、オートファゴソーム形成に関わる機能を有していると考えられる

### 2. 研究の目的

(1) TRAPPC8 が型に共通に HPV 感染に重要であることを複数の HPV 型による感染実験から明らかにする。

(2) TRAPPC8 が HPV 感染初期過程のどこにどう関わるかを TRAPPC8 ノックダウン細胞を作成し、細胞内部の粒子とウイルス DNA の局在から解明する。

(3) TRAPPC8 の生理機能を TRAPPC8 ノックダウン細胞のオルガネラ構造変化から解き明かす。これら解析結果を総合し最終的な目標として TRAPPC8 に関わる HPV 感染初期過程の分子機構モデルを提唱する。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞

HeLa 細胞 (ヒト上皮細胞)、HaCaT 細胞 (ヒト角化細胞)、HEK293FT 細胞 (ヒト胎児腎細胞) を実験に用いた。各細胞は 10%FBS を含む DMEM で培養された。

#### (2)HPV 偽ウイルスの作成と偽ウイルス感染実験

コドン最適化した L1, L2 プラスミドと GFP 発現プラスミドを HEK293FT 細胞にトランスフェクションし、Opti-Prep 密度勾配遠心法により調製した。偽ウイルスを HeLa 細胞へ接種し、GFP 発現細胞を FACS で測定した。

#### (3)HPV31 型 Authentic virion の調製と感染実験

CIN612 9E raft tissues から Opti-Prep 密度勾配遠心法により調製した。ウイルスを HaCaT 細胞へ接種し、E1<sup>+</sup>E4 mRNA を qPCR で測定した。

#### (4)TRAPPC8 抗体の作成

TRAPPC8 の aa1-603 (N1/603) を大腸菌から精製した。また、aa880-894 (P880/894)、aa1270-1285 (P1270/1285) をペプチド合成機で合成した。それぞれをウサギに免疫し、抗血清から IgG を精製した。

#### (5)TRAPPC8 ノックダウン細胞

TRAPPC8 の siRNA (siGENOME set of 4, human TRAPPC8 (KIAA1012, MQ-010645-00-0002, Thermo Fisher Scientific Inc.) を HeLa 細胞または HaCaT 細胞へトランスフェクションした。

#### (6)TRAPPC8 の細胞内画分

HeLa 細胞画分を遠心分離により分離した。また、subcellular protein fractionation kit (Thermo scientific Inc.)により分離した。それぞれの画分中の TRAPPC8 を抗 TRAPPC8 抗体によるウエスタンブロットで検出した。

#### (7)細胞免疫染色

HPV51 型偽ウイルスを HeLa 細胞に接種し、4℃で1時間培養した。マウス抗 L1 抗体とウサギ抗 TRAPPC8 抗体(anti-P880/894)を、続いて抗マウス IgG Alexa Fluor 488 と抗ウサギ IgG Alexa Fluor 555 を細胞に加え、4℃で培養し、細胞を固定化した。細胞表面の蛍光を共焦点蛍光顕微鏡により観察した。

HPV51 偽ウイルスのパッケージ DNA の標識に Click-it™ EdU imaging kit (Life Technologies Corp)を用いた。

細胞内ゴルジ体の標識に抗 GM130 抗体 (610822, BD Biosciences)を用いた。

#### (8)偽ウイルス細胞内侵入実験

HeLa 細胞に HPV 偽ウイルスを接種し培養した。トリプシン処理で細胞を回収し、細胞内部の L1 を抗 L1 抗体によるウエスタンブロットで検出し Typhoon 9410 imager (GE Healthcare UK Ltd.)で定量した。

## 4. 研究成果

### (1)TRAPPC8 と L2 の相互作用

TRAPPC8 は 51, 16, 31 型 L2 に相互作用することが明らかとなった。51, 16, 31 型 L2-FLAG 融合蛋白質発現プラスミドをそれぞれ構築し、HEK293FT 細胞にトランスフェクションした。抗 FLAG 抗体アガロースで免疫沈降し、共沈した TRAPPC8 を抗 TRAPPC8 抗体によるウエスタンブロットで検出した。全ての型の L2 の共沈蛋白質から TRAPPC8 が検出された。さらに、51 型感染株 (Ma 株) と非感染株 (Nu 株) 由来のキメラ L2 蛋白質を作成し、同様の実験を行った。TRAPPC8 は感染力のあるキメラ L2 と共沈する蛋白質からのみ検出された。以上の結果から HPV 感染における L2-TRAPPC8 相互作用の重要性が示唆された。

### (2)HPV 感染における TRAPPC8 の必要性

TRAPPC8 ノックダウン上皮細胞に HPV は感染しないことが明らかとなった。TRAPPC8 の siRNA を HeLa 細胞へトランスフェクションし HPV51, 16, 31 型の偽ウイルスを接種した。細胞を培養後、偽ウイルスの持つレポーター遺伝子 GFP の発現を FACS で測定した。TRAPPC8 ノックダウン HeLa 細胞はすべての偽ウイルスに対して抵抗性を示した。また、3 次元培養法から得られた 31 型 HPV authentic virion を TRAPPC8 ノックダウン角化細胞 HaCaT へ接種した。細胞培養後、HPV31 型ゲノムの初期遺伝子の発現をリアルタイム PCR で測定した。初期遺伝子の発現量は TRAPPC8 ノックダウンレベルと相関して低下した。以上の実験結果により TRAPPC8 は HPV の感染初

期の過程に必要な細胞内蛋白質であることが明らかとなった。

### (3)TRAPPC8 の細胞内局在

TRAPPC8 はミクロソーム画分、サイトゾル画分、核画分に存在した。また、一部の TRAPPC8 は膜画分、細胞膜に存在した。HeLa 細胞内の TRAPPC8 の局在を遠心分離を用いた画分法により検討した。TRAPPC8 はミクロソーム画分、サイトゾル画分の順で多く存在することが明らかとなった。また、同細胞内局在を subcellular protein fractionation kit (Thermo scientific Inc.)により検討した。TRAPPC8 は膜画分、サイトゾル画分、核画分に存在することが明らかとなった。

TRAPPC8 は HPV 接種により細胞表面に出現した。3 種類のウサギ抗 TRAPPC8 抗体 (anti-N1/603, anti-P880/895, anti-P1270/1285) を作成し、これら抗体と HeLa 細胞表面との結合を FACS で測定した。Anti-P880/895 抗体が細胞表面に結合し、この結合は TRAPPC8 をノックダウンすることで減少した。これにより TRAPPC8 の C 端の一部は細胞表面に存在することが明らかとなった。ただし、その量は僅かであった。HeLa 細胞表面の TRAPPC8 を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。Anti-P880/895 に反応するスポットが確認されたが、その数は FACS の結果同様僅かであった。しかし、この細胞に HPV51 型偽ウイルスを接種すると Anti-P880/895 のスポットは増加し、このスポットは偽ウイルスと共局在した。さらに、このスポットの増加と偽ウイルスとの共局在は Nu 株の偽ウイルスや L2 を持たない偽ウイルス接種でも観測された。以上の実験結果から TRAPPC8 の C 端の一部は HPV51 型の L1 キャプシドを介して細胞表面に現れ、その場所はウイルス粒子の結合する細胞表面ドメインに近いことが示唆された。

### (4)HPV 細胞侵入における TRAPPC8 の役割

TRAPPC8 は HPV の細胞内の侵入に必要な蛋白質であった。TRAPPC8 の siRNA を HeLa 細胞へトランスフェクションし、HPV51 (Ma 株), 16, 31 型偽ウイルスを接種した。偽ウイルスの細胞内侵入を抗 L1 抗体によるウエスタンブロットで測定した。TRAPPC8 ノックダウン細胞は全ての偽ウイルスにおいて侵入を抑えた。さらに Nu 株の L2 を持つ HPV51, L2 の無い 51, 16, 31 型偽ウイルスで同様の実験を行った。TRAPPC8 ノックダウン HeLa 細胞はこれら全ての侵入を阻害した。以上の実験結果から TRAPPC8 は HPV の侵入に必要な細胞内蛋白質であることが強く示唆され、その侵入機構は L1 キャプシドを介すもので、L2 は無関係と推測された。

### (5)HPV51 型 Ma 株偽ウイルスと Nu 株偽ウイルスの細胞内局在

EdU 標識したレポータープラスミドを持つ Ma

株, Nu 株それぞれの偽ウイルスを作成した。それぞれを HEK293FT 細胞に接種した後、ウイルスキャプシドを抗 L1 抗体で、パッケージ DNA を Click-it 反応で標識し、局在を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。8 時間後 Ma 株のパッケージ DNA はウイルスキャプシドから離れ細胞質の核周辺領域に分散するように存在し、24 時間後その DNA は核に移行した。一方、Nu 株のパッケージ DNA とキャプシドは共局在した状態で細胞内部に集積し、24 時間後パッケージ DNA とキャプシドは共局在した状態で減少した。

#### (6) L2 の TRAPPC8 機能に及ぼす影響

L2 は TRAPPC8 の機能を阻害することが明らかとなった。L2-GFP 融合蛋白質発現プラスミドを作成し、HeLa 細胞へトランスフェクションした。24 時間後、ゴルジ体の形態を抗 GM130 抗体を用い共焦点蛍光顕微鏡で観測した。Ma 株 L2 を発現する細胞内のゴルジ体は分散した。一方、Nu 株 L2 を発現する細胞内のゴルジ体の構造に変化は無かった。ゴルジ体の分散は TRAPPC8 と相互作用する L2 にのみ観測され、この分散状態は TRAPPC8 siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞と同一であった。以上の実験結果から L2 は TRAPPC8 の持つ機能を阻害できることが示唆された。

TRAPPC8 は L1 キャプシドの侵入に必要であり ((4) の実験)、TRAPPC8 は L1 キャプシドの接種で細胞表面に出現する ((3) の実験)。L2 の TRAPPC8 機能阻害効果をより確かにするため、L2 ペプチドが L1 キャプシドの細胞内侵入を阻害できるかをウエスタンブロットで検討した。Nu, Ma 株 L2 の N 端ペプチド (aa11-200) を大腸菌で発現し精製した。Ma 株 L2 ペプチドは細胞表面とミクロソーム画分の TRAPPC8 に相互作用したが、Nu 株 L2 ペプチドは細胞表面およびミクロソーム画分の TRAPPC8 とは相互作用しなかった。これら L2 ペプチドを 16 型 L1 キャプシドと共に HeLa 細胞へ接種し、細胞内部へ侵入したキャプシドをウエスタンブロットで測定した。Ma 株 L2 ペプチドは L1 キャプシドの侵入を阻害したが、Nu 株 L2 ペプチドはその侵入を阻害することは無かった。以上の実験結果により L2 が TRAPPC8 の機能を抑制できることがより明確になり、N 端の L2 はエンドソーム内腔からその機能を阻害できる可能性も示唆された。

#### (7) 考察

Transport protein particle complex (TRAPP complex) はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) を有する、小胞輸送や膜融合や膜伸長に関わる蛋白質複合体である。酵母において、構成されるサブユニットの種類によって 3 つのタイプ、TRAPPI, TRAPPII, TRAPPIII に分類されている。TRAPPI, TRAPPII は小胞体からゴルジ体、ゴルジ体間の小胞輸送に、TRAPPIII はオートファジーの隔離膜形成と

膜伸長にそれぞれ関与している。サブユニットの組み合わせにより特定の GTPase の活性と小胞輸送を示す。一方、動物細胞では、TRAPP 複合体の種類、特異性は明確化できていない。新たなサブユニットが発見されて続けている。

TRAPPC8 はその N 端領域が酵母 TRAPPIII のサブユニット Trs85 と相同性があることから TRAPPIII のサブユニットに分類される。TRAPPC8 の機能解析はされておらず、細胞内の役割として、オートファジーシステムに関与すること、ゴルジ体層構造の形態に関わること、リシンの毒性に関わることが知られている。

本研究で TRAPPC8 が HPV 感染の初期過程に必要な蛋白質であることを TRAPPC8 ノックダウン細胞による HPV 感染実験により明らかにした。また、TRAPPIII のサブユニットと考えられている TRAPPC11, TRAPPC12 のノックダウン細胞も TRAPPC8 同様 HPV 感染に抵抗性を示すことから TRAPPIII の機能が HPV 感染に重要であることが示唆された。さらに、TRAPPII のサブユニットと考えられる TRAPP9 のノックダウン細胞は HPV 感染にほとんど影響を与えないことから TRAPPII の機能は HPV 感染に無関係と推測できた。それぞれのサブユニットの HPV 感染に対する効果はリシンの毒感受性の効果と非常に良く似ている。HPV はリシンと良く似た細胞内部への侵入と細胞内輸送経路を利用し感染を成功させているかもしれない。

TRAPPC8 は細胞内に広範囲に存在し、細胞膜にも僅かに存在していた。HPV51 型偽ウイルスを HeLa 細胞に接種すると速やかに TRAPPC8 の C 端が細胞表面に提示され、偽ウイルスと共局在を示したことから、TRAPPC8 は細胞表面の HPV 結合因子であるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) 直下に存在すると推測される。TRAPP 複合体のコアサブユニットの一つである TRAPPC4 は syndecan-2 の EFYA モチーフに結合することが知られている。Syndecan-1 から Syndecan-4 の C 端は高度に保存され Syndecan-1 は HPV の細胞表面の結合蛋白質の一つと考えられている。おそらく、TRAPPIII は Syndecan-1 に結合した状態で細胞膜直下に存在していると想像される。TRAPPC8 は典型的なトランスメンブラン (TM) ドメインは無いが、良く似た領域 LKVLVLLTDLSSL (aa 765-777) を C 端側にもつ。TRAPPC8 はこの領域を使って小胞膜を貫通し、HPV 接種後何らかの刺激により、この TRAPPC8 小胞と細胞膜の融合により細胞表面へ出現すると思われる。

HPV 偽ウイルスの細胞内侵入は TRAPPC8 ノックダウン細胞において劇的に抑えられることから TRAPPC8 は HPV の細胞内侵入に重要な蛋白質であることが示唆される。TRAPP



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

石井 克幸 (ISHII YOSHIYUKI)  
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究  
センター・主任研究官  
研究者番号：90342899

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：