

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890289
 研究課題名（和文） ヒトパピローマウイルスのDNA複製モード切換えの分子機構の解明
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of switch in the mode of human papillomavirus DNA replication
 研究代表者
 松尾 理加（楠本理加）[MATSUO RIKKA (KUSUMOTO RIKKA)]
 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・厚生労働技官
 研究者番号：90514133

研究成果の概要（和文）：

子宮頸癌の原因であるヒトパピローマウイルス(HPV)の上皮細胞における DNA 複製について解析を行った。まず、試験管内で上皮細胞の抽出液と HPV の DNA を用いて、HPV の DNA 複製を検出する反応系を作製した。その系を用いて、上皮細胞の抽出液では2つの様式で DNA 複製が行われていることを示した。また、このうち1つの様式は胎児腎細胞では抑制されており上皮細胞に特異的であることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

To dissect a profile of DNA replication of human papillomavirus (HPV), which is the responsible virus for cervical cancer, in the epithelium cells, we analyzed replication of an HPV origin-containing plasmid in extracts prepared from the cells. HPV DNA replicates with two modes in epithelial cells. One of the modes was inhibited in human embryonic kidney 293 cells, suggesting that the mode is specific to epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1340000	0	1340000
2009 年度	1200000	0	1200000
年度			
年度			
年度			
総計	2540000	0	2540000

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：子宮頸癌、ヒトパピローマウイルス、DNA 複製

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス (HPV) は約8000塩基対の環状二本鎖DNAをゲノムとするウイルスである。HPVは生殖器粘膜の基底細胞に侵入し、そのゲノムは核へと運ばれ一過的に複製して50-200コピーの核内エピゾームとなり、

ウイルス増殖を起こさない潜伏持続感染となる。基底細胞の分裂時には細胞DNA複製と同調してHPV DNAも複製され、娘細胞に分配されてウイルスゲノムが保持される（潜伏期）。基底層から押し上げられた娘細胞が角化細胞への分化を始めると、HPVゲノムの大規模複製とキ

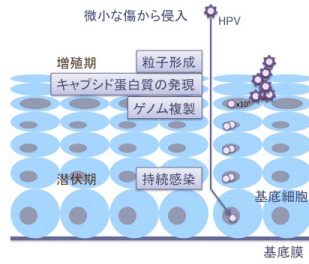


図1 HPVの生活環

キャピドタンパク質の産生が起こり、ウイルス粒子が放出される(増殖期)(図1)。このようにHPV DNA複製の頻度は潜伏期と増殖期とで大幅に異なり、HPVはDNA複製モードを分化の前後で切換えている可能性が考えられた。

HPVは自らのゲノム複製のために二つのウイルスタンパク質(E1とE2)を持ち、まずHPV複製起点にE2が結合し、そこにDNAヘリケースであるE1を呼び込むことでDNA複製を開始させる。感染細胞が未分化の状態では、HPV DNAはシータ構造を取った複製起点から両方向に複製される。一方、HPV DNAをエピゾームとして保持するヒト培養細胞では、細胞が分化を始めるとローリングサークル(RC)型機構でHPVゲノムが複製されることが報告されていた。ウシパピローマウイルスでも、RC型複製モードにてウイルスゲノムが複製されることが示されており、このDNA複製モードの切換えが、増殖期に向かう重要なステップである可能性があった。

2. 研究の目的

複製関連因子の精製および *in vitro* DNA複製解析を駆使することで、「HPVのDNA複製モード切換えの分子機構」を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 二つのDNA複製モードを同時に検出する無細胞HPV DNA複製系の構築

DNA複製モード切換えを解析するために、シータ構造型とRC型モードの両者を同時に検出する *in vitro* アッセイ系を構築する。HPV DNAの複製起点を含むDNA断片を、プラスミド pUC19に挿入した約4.5 kbの環状二本鎖DNAを基質として用いる。既に分化誘導後にRC型DNA複製が起こると報告されているW12細胞(16型HPVを安定にもつ上皮細胞)をカルシウム添加により分化誘導して抽出液を調製し、DNA基質の複製反応を行わせる。DNA複製産物を一次元電気泳動し、シータ構造を取った環状DNA

と、RC型コンカテマーDNAの両者を同時に検出する。

(2) DNA複製モード切換えに関わるタンパク質の検索

他の生物において複製モードの切換えを誘導すると考えられている基質DNA上のニックがHPVの複製モードの切換えにも関与するか検討する。(1)の系でDNA基質にあらかじめニックを挿入し、RC型複製産物が増加するか調べる。ニックを導入する蛋白質や複製モード切換えに関わるタンパク質を、細胞抽出液より検索する。

4. 研究成果

(1) 角化細胞抽出液を用いたHPV DNA複製系の構築

基質DNAと分化W12細胞抽出液、HaCaT上皮細胞抽出液を用いて複製反応を行ったところ、シータ構造型複製産物である環状の複製産物と巨大な複製産物が検出された(図2)。巨大な複製産物は制限酵素処理により基質DNAのサイズに変換されることからRC型複製産物であると考えられた。つまり、2つのDNA複製モードを同時に検出する無細胞HPV DNA複製系を構築することができた。

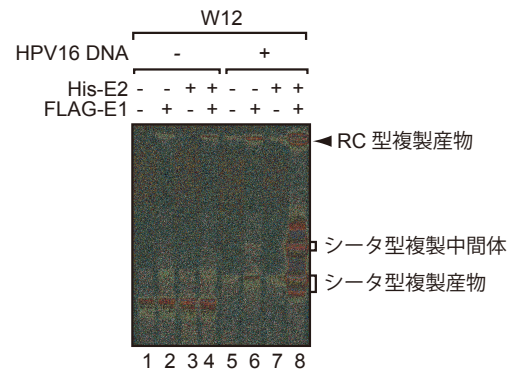


図2 W12細胞抽出液における2つのDNA複製様式

(2) DNA複製モード切換えに関わるタンパク質の検索

この系を用いて①上皮細胞の抽出液では分化誘導に関わらず、RC型とシータ構造型の複製産物が生成されること、②基質にニックを導入することで、RC型の複製産物が増加するがニックの位置による差はみられないこと、③W12細胞の代わりに胎児腎293細胞の抽出液を用いると、シータ構造型の複製産物のみが生成されること、④未分化のW12細胞抽出液を用いてもRC型の複製産物が検出されることが

わかった。④の結果は研究開始当初の予想に反しており、上皮細胞の分化により複製モードが切替わるわけではないという可能性がでてきた。また、①と③の結果よりRC型複製産物は上皮細胞抽出液に特異的であったことから、W12細胞抽出液にはシータ型からRC型複製モードへの切替えに関わる分子が存在する可能性、または293細胞ではRC型複製が抑制されている可能性がでてきた。そこで、W12細胞抽出液を用いた(1)の系に293細胞抽出液を加えて複製反応を行った。293細胞抽出液の添加により、シータ構造型複製産物には変化がみられなかったが、RC型複製産物が減少した(図3)。このことから、293細胞にはRC型複製を阻害する因子が存在することが示唆された。

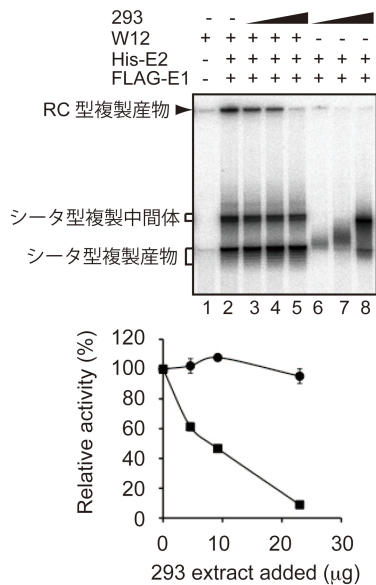


図3 293細胞抽出液によるRC型複製の阻害

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

①松尾理加、神田忠仁、終元巖
無細胞系におけるヒトパピローマウイルス DNA
のローリングサークル型複製
第33回日本分子生物学会年会
2009年12月横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 理加 (楠本理加)

[MATSUO RIKA (KUSUMOTO RIKA)]

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究
センター・厚生労働技官
研究者番号：90514133

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：