

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：若手研究（B）
 研究期間：2010～2013
 課題番号：22790443
 研究課題名（和文）ヒトパピローマウイルスのローリングサークル型 DNA 複製の分子機構の
 解明
 研究課題名（英文）Molecular mechanism of rolling circle DNA replication of human
 papillomavirus
 研究代表者
 松尾 理加（楠本 理加）[MATSUO RIKI (KUSUMOTO RIKI)]
 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：90514133

研究成果の概要（和文）：ヒトパピローマウイルス (HPV) のゲノム DNA の複製機構を明らかにする
 目的で、HPV の複製に影響を及ぼす宿主細胞のチロシンキナーゼを 2 つの方法で検索した。
 HPV E1 タンパク質との試験管内での結合を指標として、上位 10 個のチロシンキナーゼを候補
 として得た。また、ペプチドのリン酸化を指標として、上位 7 個のチロシンキナーゼを候補と
 して得た。現在、これらの候補キナーゼとの細胞内結合や、HPV DNA 複製への影響を検討して
 いる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of DNA replication of human
 Papillomavirus, we searched for a factor that affects the virus DNA replication in cells.
 We performed ALPHA screening and identified ten tyrosine kinases that bind to HPV16 E1.
 We also identified peptides phosphorylated by an unknown kinase bound to E1 among a set
 of tyrosine kinase substrate peptides, and speculated seven kinases. Interaction between
 these kinases and E1 in cells and the effects of the kinases to HPV DNA replication will
 be tested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	0	0	0
2012 年度	1,300,000	0	1,300,000
総 計	3,100,000	0	3,100,000

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：ウイルス、がん、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 8 kbp
 の環状二本鎖 DNA をゲノムとするウイルスで
 ある。HPV は、表皮粘膜の基底細胞に侵入し、
 そのゲノムが核内でエピゾームとして維持
 される潜伏感染の状態を確立する。基底細胞
 の分裂時には細胞の DNA 複製と同調して HPV
 DNA も複製、分配され、ウイルスゲノムが娘

細胞でも保持される。やがて基底層から押し
 上げられた感染細胞が角化細胞へと分化を
 始めると、HPV ゲノムの大規模な複製とキャ
 プシ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 (図 1)。

HPV ゲノムにコードされているタンパク質
 は E1、E2、E4-E7、L1 と L2 の 8 つのみで

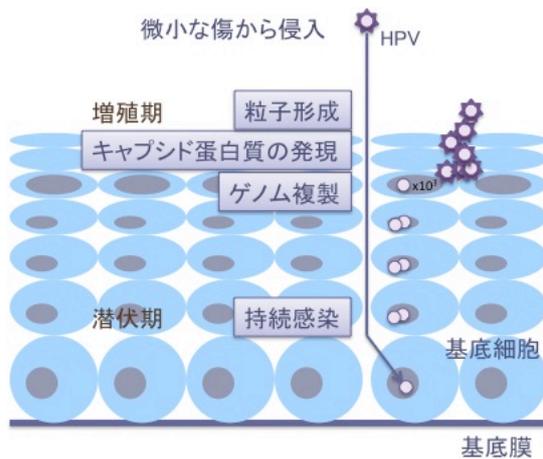


図1 HPVの生活環

ある。その中でE1、E2がHPVゲノムの複製に関与することが示されている。HPV DNAの複製は、HPV複製起点へのE2の結合と、E2によるE1のリクルートにより開始し、細胞の複製タンパク質を利用して進行する。複製様式は、複製フォークが複製起点から両方向に進む θ 型と、複製フォークが一方向に進むRC型の2つあることが示されている。基底細胞が分裂し、HPV DNAを同じコピー数だけ維持する場合は θ 構造型の複製を行い、細胞が分化し、HPVを大量に増幅する場合はRC型の複製を行うことが報告されている。このRC型複製の分子機構は明らかにされていない。

代表者はこれまで、2つのHPV DNA複製様式を同時に検出できる簡便な無細胞複製系を構築した。この実験系を用いて、ニックを入れることがHPV DNAのRC型複製を誘起する重要なステップであることを示唆した。また、HPVが感染しないヒト胎児腎293細胞にはRC型複製を阻害するような因子が存在することを示した。

2. 研究の目的

本研究では、無細胞複製系を用いてHPV DNAのRC型複製に必要な宿主細胞のタンパク質を同定し、その分子機構を明らかにすることを目的とする。さらに、HPV感染細胞がRC型複製を起こす条件を検討し、RC型複製のHPV感染病態における意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) E1タンパク質の翻訳後修飾について

HPVがコードするE1は細胞の様々な複製因子と相互作用し、HPV複製機構を調節していることが知られている。E1はセリン/スレオニンキナーゼと結合し、リン酸化を受けることにより、局在が変化する。そこで、チロシンキナーゼとは結合するのか、またリン酸化は受けるのか、調べることにした。そこで293細胞でN末にFLAGタグを付加したHPV16型のE1を強制発現し、FLAG抗体により免疫沈降を行った。FLAG-E1にATPを加えると、FLAG-E1がリン酸化チロシン抗体により認識された(図2)。FLAG-E1にはチロシンキナーゼが結合しており、そのキナーゼはFLAG-E1をリン酸化する可能性があることを示唆している。

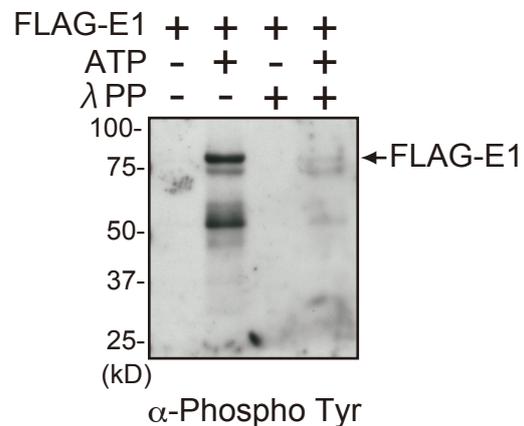


図2 E1タンパク質のチロシンリン酸化
(λ PP: 脱リン酸化酵素)

(2) ALPHAスクリーニングによるE1結合キナーゼの検索

小麦胚無細胞系を用いて約400個のキナーゼを発現し、FLAG-E1と結合するキナーゼをスクリーニングした。検出には化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ(ALPHA)を用いた。

(3) E1結合チロシンキナーゼの基質ペプチドのリン酸化実験によるスクリーニング

293細胞で発現させたFLAG-E1を免疫沈降すると(1)で述べたように、チロシンキナーゼが結合している可能性がある。そこで、145

種類のチロシンキナーゼ基質ペプチドを基質として、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で FLAG-E1 免疫沈降画分によりリン酸化反応を行った。リン酸化されたペプチドを同定し、FLAG-E1 結合キナーゼを推測した。

(4) 組換えチロシンキナーゼによる E1 のリン酸化実験

(2) (3) で得られた E1 結合チロシンキナーゼ候補を組換えタンパク質として発現、精製し、E1 タンパク質をリン酸化するか検討した。

(5) HPV ゲノム複製への影響の検討

子宮頸部由来 C33A 細胞において、同定した E1 結合キナーゼを RNAi によりノックダウンする。この細胞にさらに HPV16 の複製起点の下流にレポーター遺伝子を組込んだプラスミド、E1、E2 発現プラスミドを導入し、HPV ゲノムのコピー数の変化を調べる。W12 細胞は HPV16 ゲノムを安定に維持する子宮頸部由来の細胞である。W12 細胞においても、E1 結合キナーゼをノックダウンし、HPV ゲノムのコピー数の変化を調べる。

4. 研究成果

(1) 小麦胚無細胞タンパク質合成法を用いたスクリーニングと *in vitro* リン酸化実験

FLAG-E1 と結合活性が高かったチロシンキナーゼは FRK, FES, TYK2, CSK, EphA3, EphA7, INSR, HCK, Lyn α , INSR であった。CSK (Src ファミリーのキナーゼ) を除くこれらのキナーゼはいずれも、*in vitro* で E1 をリン酸化することを確認した (図 3)。

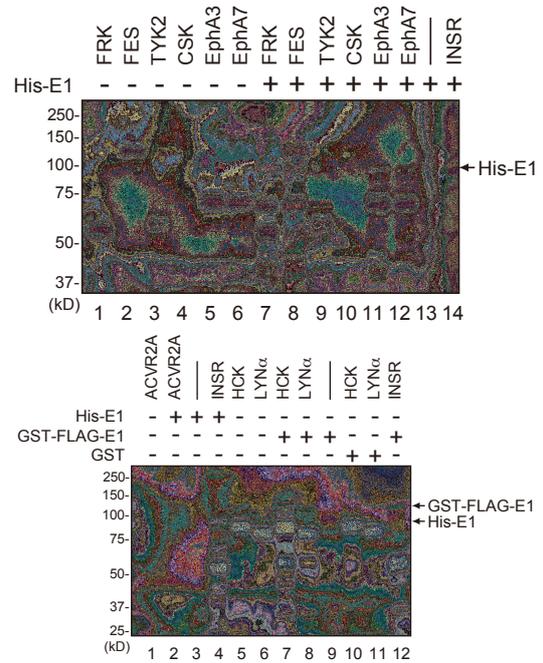
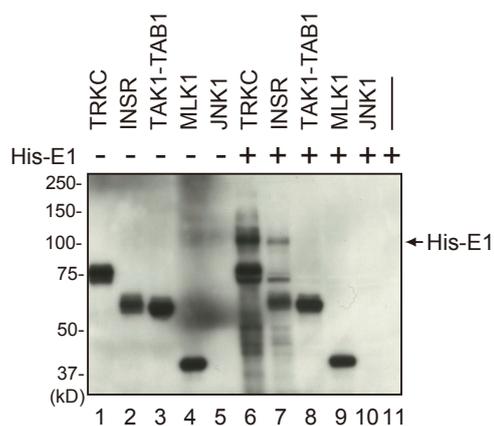


図 3 E1 のリン酸化実験 (リン酸化チロシン抗体による検出)

(2) チロシンキナーゼの基質ペプチドのスクリーニング

293 細胞で強制発現した FLAG-E1 には Ret, EphA5, CSK-1-R, ZAP-70, Epo-R, toroaponin T, cdk2 をリン酸化するチロシンキナーゼが結合している可能性をみいだした。

(3) HPV DNA 複製アッセイ

これらのキナーゼを RNAi 法を用いて C33A 細胞や W12 細胞よりノックダウンし、HPV DNA 複製を検討中である。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kondo K., Uenoyama A., Kusumoto-Matsuo R., Mori S., Ishii Y., Takeuchi T., Kanda T. and Kukimoto I. Genotype distribution of human papillomaviruses in Japanese women with abnormal cervical cytology. *Open Virol J* (Bentham Science

Publishers) 6, 277-283 (2012)

doi:10.2174/1874357901206010277.

- ② Kitamura-Muramatsu Y., Kusumoto-Matsuo R., and Kukimoto I. Novel multiplexed genotyping of human papillomavirus using a VeraCode-allele-specific primer extension method. *Microbiol Immunol* (Wiley-Blackwell) 56, 128-133 (2012)
doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00406.x.
- ③ Mori S., Nakao S., Kukimoto I., Kusumoto-Matsuo R., Kondo K. and Kanda T. Biased amplification of human papillomavirus DNA in specimens containing multiple human papillomavirus types by PCR with consensus primers. *Cancer Sci* (Blackwell Publishing) 102, 1223-1227 (2011)
doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01922.x.
- ④ Kusumoto-Matsuo R., Kanda T. and Kukimoto I. Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes Cells* (Blackwell Science Ltd.) 16, 23-33 (2011)
doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01458.x.
- ⑤ Kusumoto-Matsuo R., Opresko PL., Tahara H. and Bohr, VA. Cooperation of DNA-PKcs and WRN helicase in the maintenance of telomeric D-loops. *Ageing (Albany NY)* (Impact Journals) 2, 274-284 (2010)
<http://www.impactaging.com/papers/v2/n5/full/100141.html>

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・主任研究官