

平成30年6月6日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860310

研究課題名(和文) ヒトパピローマウイルスの増殖期における相同組換えを利用したDNA複製機構の解明

研究課題名(英文) Recombination mediated HPV DNA replication during the reproductive phase

研究代表者

松尾 理加(楠本理加)(Matsuo (Kusumoto), Rika)

名古屋大学・環境医学研究所・学振特別研究員(RPD)

研究者番号：90514133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パピローマウイルスのE1のタンパク質量が調節されていることが、潜伏・増殖期の両方において重要である。本研究では、16型ヒトパピローマウイルスのE1とG2/Mチェックポイントタンパク質であるWee1は細胞内で結合することを示した。また、様々なヒト細胞からWee1をノックダウンすると、強制発現させたE1のタンパク質量が低下した。逆にWee1を過剰発現させると、E1のタンパク質量が増加した。HPV16ゲノムを維持するW12細胞よりWee1をノックダウンするとHPV16 DNAのコピー数が低下した。これらのことは、E1はWee1により安定化されて、HPVゲノムの維持を正しく行うことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We identify Wee1, a major regulator at G2/M phase transition, as a cellular factor that interacts with HPV16 E1. Wee1 knockdown reduced the protein levels of exogenously expressed HPV16 E1 in various human cell lines, which resulted from mostly proteasome-independent degradation of E1. Conversely, overexpression of Wee1 increased the level of FLAG-tagged HPV16 E1 in cells. Furthermore, in vitro pull-down assays demonstrated that Wee1 directly bound to HPV16 E1 through the helicase domain, and this domain was required for E1 degradation by Wee1 knockdown. Interestingly, protein levels of the HPV16 E1 ATPase/helicase mutants were not decreased by Wee1 knockdown. Finally, Wee1 knockdown as well as Rad51 knockdown, the main factor of DNA recombination, reduced HPV16 DNA level in W12 cells, which maintain HPV16 genome as episome. Thus, we propose that E1 helicase/ATPase is stabilized by Wee1 to perform faithful maintenance replication of the viral genome.

研究分野：DNA修復

キーワード：HPV E1 DNA複製 Wee1

1. 研究開始当初の背景

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、潜伏感染の状態を確立する。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ゲノムの大規模な増殖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(増殖期)。HPVは細胞の分化前には(シータ)構造型の複製を行い、分化後にはローリングサークル型のDNA複製に切換えて、その効率を上げると考えられている。ローリングサークル型DNA複製では、head-to-tailにタンデムに連なった直鎖状HPV DNAを生成する(図1)。ウイルス粒子を産生するためには、直鎖状HPV DNAを1ゲノムサイズに切断し、環状化して(以下、切断-環状化と略した)エピゾームDNAとして存在する必要があるが、この過程は全くわかっていない。

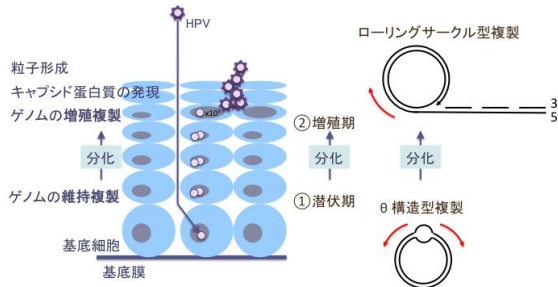


図1 HPVの生活環

2. 研究の目的

HPV増殖期におけるHPV DNAの「無細胞切断-環状化反応系」を構築し、細胞の相同組換え因子やヌクレアーゼ、HPVタンパク質の関与を検証し、その分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 16型HPV(HPV16)ゲノムを維持する子宮頸部病変由来W12細胞より、siRNA法により相同組換え因子をノックダウンする。細胞をカルシウム添加により分化させ、分化前後の細胞からHPV DNAをHirt法により抽出し、Real-Time PCRにより定量する。ノックダウンすることで分化後にHPV DNAのコピー数が減少するような組換え因子を探索する。
- (2) 分化W12細胞から調製した抽出液と、HPVがコードする複製タンパク質(E1 DNAヘリカーゼ、E2 HPV複製起点結合因子) HPV複製起点を含むプラスミドDNAを用いて、サザンプロット法にて、直鎖状HPV DNAの切断-環状化反応を解析する無細胞系を構築する。抽出液を分画し、その結果を参考に順次、精製タンパク質と置き換え、最終的には反応の再構成を行う。

4. 研究成果

- (1) Rad51 ノックダウンによるHPV DNAのコピー数の変化

未分化のW12細胞より代表的な相同組換え因子であるRad51をノックダウンしてもHPV16 DNAのコピー数に変化はなかったが、分化させた細胞では、コピー数がRad51ノックダウンにより減少した。このことはRad51が増殖期のHPV DNAの複製に重要であることを示唆している。

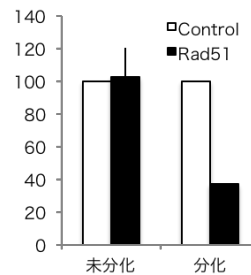


図2 Rad51 ノックダウン未分化/分化W12細胞におけるHPV エピゾーム量の変化

- (2) Wee1 ノックダウンによるHPV DNAのコピー数の変化

切断-環状化反応にはエンドヌクレアーゼが必須であるが、構造特異のエンドヌクレアーゼであるMus81はG2/M期チェックポイント因子であるWee1と結合することが報告されている。未分化・分化したW12細胞よりWee1をノックダウンするとHPV16 DNAのコピー数が減少した。このことはWee1が潜伏期・増殖期のHPV DNAの複製に重要であることを示唆している。

- (3) HPV16 E1とWee1の結合

FLAG-HPV16 E1とWee1-HAを胎児腎HEK293細胞やHPV DNA陰性の子宮頸がんC33A細胞で過剰発現し、タグを用いた免疫沈降法により両者が結合することを明らかにした。また、GST融合タンパク質として両者の欠失変異体を作製し、N-terminal RegulatoryドメインであるWee1(215-290)とATPase/helicaseドメインであるHPV16 E1(440-649)を介して両者が結合することを示した。

- (4) HPV16 E1タンパク質の発現レベル

293細胞、U-2 OS細胞、HeLa細胞よりWee1をノックダウンすると、FLAG-HPV16 E1 mRNA発現量に変化はなかったが、タンパク質発現量が減少した。プロテアソーム阻害剤であるMG132の添加によりWee1ノックダウンによるFLAG-HPV16 E1タンパク質発現量の低下は、一部軽減した。このことは、Wee1ノックダウンによりHPV16 E1タンパク質は、プロテアソームを介した分解とプロテアソーム以外による分解を受けることを示唆している。

ATPase/helicase ドメインである E1(440-469)を欠失させた FLAG-HPV16 E1 や ATPase/helicase 点変異体である FLAG-HPV16 E1(K483A)や FLAG-HPV16 E1(R537A/L540A)タンパク質発現量は Wee1 をノックダウンしても変化はなかった。このことは、Wee1 ノックダウンによる HPV16 E1 タンパク質分解には E1 の ATPase/helicase が必要であることを示唆している。

FLAG-HPV16 E1 タンパク質発現量は Wee1-HA タンパク質の発現量に依存して増加した。

(5) APC 活性化による HPV16 E1 の分解の影響

Wee1 ノックダウンにより APC(Anaphase promoting complex)が活性化することが報告されている。293 細胞より APC のコアサブユニットである Cdc27 をノックダウンすると E1 タンパク質の発現量が増加した。このことは、16E1 が APC により分解されることを示唆している。293 細胞より Cdc27 と Wee1 をノックダウンした時の E1 タンパク質の発現量は、Cdc27 をノックダウンした時に比べて著しく低下した。このことは、Wee1 ノックダウンによる E1 タンパク質の分解の大部分は、APC に依存しないことを示唆している。

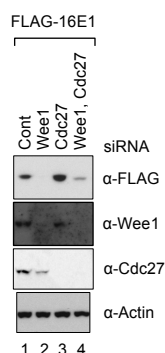


図3 Wee1、Cdc27 ノックダウン 293 細胞における HPV16 E1 タンパク質

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3件)

Kashiwaba S., Kanao R., Masuda Y., Kusumoto-Matsuo R., Hanaoka F. and Masutani C. USP7 is a suppressor of PCNA ubiquitination and oxidative stress-induced mutagenesis in human cells. *Cell Reports*, 13, 2072-2080 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.11.014.
Taguchi A., Nagasaka K., Kawana K., Hashimoto K., Kusumoto-Matsuo R.,

Plessy C., Thomas M., Nakamura H., Bonetti A., Oda K., Kukimoto I., Carninci P., Banks L., Osuga Y. and Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology. *J Virol.*, 89, 2448-2452 (2015) 査読有
DOI: 10.1128/JVI.03433-14.

Azuma Y., Kusumoto-Matsuo R., Takeuchi F., Uenoyama A., Kondo K., Tsunoda H., Nagasaka K., Kawana K., Morisada T., Iwata T., Aoki D. and Kukimoto I. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. *Jpn J Clin Oncol.*, 44, 910-917 (2014) 査読有
DOI: 10.1093/jjco/hyu112.

[学会発表](計13件)

松尾(楠本)理加, 増田雄司, 金尾梨絵, 益谷央豪. DNA ポリメラーゼ と Rad18 のタンパク質間相互作用に関する解析. ConBio2017/第40回日本分子生物学会年会 (2017)

益谷央豪, 金尾梨絵, 松尾(楠本)理加, 増田雄司. ゲノムの安定化と不安定化をもたらす損傷乗り越え DNA 複製の制御機構の解析. ワークショップ「加齢関連疾患の発生と治療に関わる DNA 損傷と細胞老化」. ConBio2017/第40回日本分子生物学会年会 (2017)

松尾(楠本)理加, 増田雄司, 金尾梨絵, 益谷央豪. DNA ポリメラーゼ と Rad18 のタンパク質間相互作用に関する解析. 第24回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ (2017)

Masutani C., Kanao R., Kusumoto-Matsuo R., Masuda Y. Regulation of translesion synthesis by PCNA ubiquitination. The 2nd Biosignal Research Center International Symposium (ICEM-ACEM 2017 Satellite Symposium on DNA Repair), Environmental Stress and Genome Damage Response: Biosignals from Molecule to Disease (2017)

益谷央豪, 松尾(楠本)理加, 金尾梨絵, 増田雄司. タンパク質間相互作用による DNA ポリメラーゼ・イータの制御. 日本放射線影響学会第60回大会 (2017)

益谷央豪, 金尾梨絵, 松尾(楠本)理加, 増田雄司. 損傷乗り越え DNA 複製の制御機構の解析. 日本薬学会第137年会 (2017)

益谷央豪, 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 松尾(楠本)理加, 花岡文雄, 増田雄司. USP7 は PCNA のユビキチン化を制御して酸化的 DNA 損傷による突然変異を抑制する

第 34 回染色体ワークショップ/第 15 回
核ダイナミクス研究会(2016)

Kanao R., Kashiwaba S., Masuda Y.,
Kusumoto-Matsuo R., Hanaoka F. and
Masutani C. Suppression of PCNA
ubiquitination and oxidative
stress-induced mutagenesis by USP7.
The 10th 3R (Replication,
Recombination and Repair) symposium
(2016)

益谷央豪, 金尾梨絵, 柏葉脩一郎, 松
尾(楠本)理加, 増田雄司. PCNA の翻訳
後修飾の可逆的な制御による突然変異
抑制機構の解析. 日本放射線影響学会第
59 回大会 (2016)

Masutani C., Kashiwaba S.,
Kanao R., Kusumoto-Matsuo R., Hanao
ka F. and Masuda Y. USP7 supresses
H₂O₂-induced mutagenesis by
regulating PCNA ubiquitination in
human cells. Gordon Research
Conference, Mutagenesis (2016)

金尾梨絵, 柏葉脩一郎, 増田雄司, 松尾
(楠本)理加, 花岡文雄, 益谷央豪. PCNA
のモノユビキチン化の制御によるヒト細胞
での酸化的 DNA 損傷誘発突然変異抑制
機構. 日本薬学会第 136 年会(2016)

益谷央豪, 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 松尾
(楠本)理加, 花岡文雄, 増田雄司. PCNA
のユビキチン化を制御して過酸化水素
誘発突然変異を抑制するヒト細胞のメ
カニズム. 第 38 回日本分子生物学会年
会 (2015)

金尾梨絵, 柏葉脩一郎, 増田雄司, 松尾
(楠本)理加, 花岡文雄, 益谷央豪. 酸化
損傷によって誘導される PCNA のモノユ
ビキチン化を制御する新規メカニズム
の解析. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修
復ワークショップ (2015)

5 . 研究組織

(1)研究代表者

松尾 理加 (Matsuo, Rika)

名古屋大学・環境医学研究所・学振研究員
(RPD)

研究者番号 : 90514133