

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2009.03) 9巻1号:52～54.

平成19年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題
HPV18型E7蛋白質と動原体蛋白質CENP-Cの結合とその機能解析

玉川 進、山本雅大、柳沼裕二、小川勝洋

**6) HPV 18型 E7 蛋白質と動原体蛋白質 CENP-C の
結合とその機能解析**

研究代表者 玉川 進
山本 雅大
柳沼 裕二
小川 勝洋

[研究目的]

ヒトパピローマウイルス (HPV) は、パポーパウイルス科に分類され、皮膚以外にも口腔、生殖器などの扁平上皮に接触感染し、腫瘍を形成する。1970年代より遺伝子の塩基配列に基づいた型別が行われ、現在、100種類以上の型に分類されている。HPV のうち約半数 (HPV 1, 5, 8, 14, 20, 21, 25, 47型等) は皮膚型と呼ばれ、手や足などの皮膚に感染し乳頭腫を形

成する。その他の型 (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41-45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 70型) は性器・粘膜型と呼ばれ、生殖器に感染し、尖圭コンジローマの原因となる場合もあり、また、子宮頸癌との関連も注目されている。HPV の癌化のメカニズムについては、HPV の E6, E7 蛋白が癌蛋白質の性質を備え、細胞の不死化に関与していることが報告されている。現在 HPV はローリスク型とハイリスク型に分類されている。ローリスク型の HPV は、尖圭コンジローマや乳頭腫との関連が認められている。一方、ハイリスク型の HPV は尖圭コンジローマからほとんど検出されないが、子宮頸部の高度前癌病変や子宮頸癌組織内から検出されている。特に近年は若年者の HPV 感染が問題となり、近い将来、若年者の子宮頸癌の増加が危惧されている。従って本研究ではハイリスク型の HPV18 型 E7 の詳細な機能を検討するために HPV18 型 E7 と結合する蛋白質の同定を行った。

[研究方法]

Yeast Two-Hybrid system による HPV18 型 E7 と相互作用する遺伝子の同定

a) HPV18E7DNA の plasmid pDEST32 へのクローニング

子宮頸癌細胞株 HeLa S3 細胞から DNA を抽出し、PCR 法にて HPV18E7 DNA を合成し plasmid pDEST32 へ、大腸菌の DH5 α を用いてサブクローニングする。得られた plasmid pDEST32-HPV18E7 が実際に導入された遺伝子産物を発現しているか否かを、Western blot 法にて確認する。

b) fetal brain cDNA library の plasmid pPC86 へのクローニング

fetal brain mRNA は life technology 社より購入したランダムプライマーとロックドッキングオリゴ (dT) 25 d (A/C/G) プライマーを用いて cDNA を合成する。合成された cDNA に EcoRI-NotI-SalI アダプターを付加する。得られた cDNA を plasmid pPC86 へ大腸菌の DH5 α を用いてサブクローニングし、pPC86-fetal brain cDNA library を作製する。

c) pDEST32-HPV18E7 の酵母 MaV203 への transformation

Competent MaV203 を作成後、常法に従って plasmid pDEST32-HPV18E7 を用いて transformation し、SC-

Leu plate にてコロニー MaV203 (pDEST32-HPV18E7) の選択を行う。

d) pPC86-fetal brain cDNA library の MaV203 (pDEST32-HPV18E7) への transformation

12.5 μ g の pPC86-fetal brain cDNA library plasmid 用いて酵母 MaV203 (pDEST32-HPV18E7) の transformation を行い、25枚の15cm SC-Leu-Trp-His+3AT plate 上で30 $^{\circ}$ Cにて60時間培養し、replica clean を行ってさらに30 $^{\circ}$ Cにて72時間培養し、増殖するコロニーを以下の実験に用いる。

e) HPV18E7 と相互作用する候補遺伝子の単離

得られたコロニーを SC-Leu-Trp plate 上で30 $^{\circ}$ Cにて48時間培養後、replica clean を行って、選択培地である SC-Leu-Trp-Ura plate, SC-Leu-Trp+0.2%5FOA plate, SC-Leu-Trp-His+3AT plate, さらに X-Gal Assay のためのナイロン膜を上に乗せた YPAD plate 上で30 $^{\circ}$ Cにて24時間培養する。他の3種類の選択培地は replica clean を行って、さらに選択培地上で30 $^{\circ}$ Cにて48時間培養する。SC-Leu-Trp-Ura plate, SC-Leu-Trp-His+3AT plate 上で発育し、SC-Leu-Trp+0.2%5FOA plate 上で発育しないコロニーが HPV18E7 と相互作用する候補遺伝子である。

[成績]

1 : HPV 型 18 E7 蛋白と相互作用する遺伝子としてヒト胎児脳 cDNA ライブラリーから 9.5×10^6 個の transformants をスクリーニングした。pPC86 vector の insert の外側の primer を用いて PCR を行い、fragment size の等しいもの同士を HaeIII, AluI による切断パターンを比較し (Figure1)、最終的に14個の候補遺伝子を同定した。

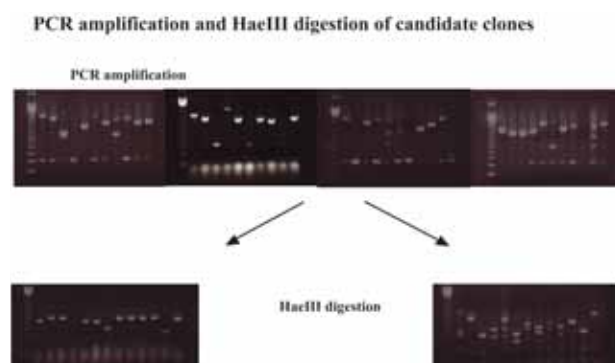


Figure 1

- 2 : HPV型18 E7 蛋白と相互作用する遺伝子として同定した14個の候補遺伝子のうち、既知の遺伝子として、Rb, p130, Dna J protein も含まれていた。
- 3 : HPV型18 E7 蛋白の新規の interactor として動原体の構成成分である CENP-C を同定した。
- 4 : HPV18 型 E7 蛋白と CENP-C 蛋白の結合には E7 の CR2 領域、CENP-C の C 末領域が重要であることを明らかにした。
- 5 : CENP-C はローリスク型の 4, 6, 11 型の E7 とは結合しなかったが、ハイリスク型の 16, 18, 55 型の E7 とは結合した。この結合は coimmunoprecipitation にても確認された (Figure2)。
- 6 : 少数例の検討ではあるが、婦人科癌で CENP-C 遺伝子にミスセンス変異が認められた (Figure3)。

[考察]

体細胞の細胞周期において最も顕著な変化が観察さ

れるのはM期である。酵母においてはわずか30分程度、哺乳動物細胞でも1時間くらいの時間のあいだに染色体凝集、染色体集合、染色体分離、細胞質分裂とめまぐるしい動きが観察される。なかでも染色体とスピンドル間の結合をモニターしている紡錘体形成チェックポイントはセントロメア上の構造体であるキネトコアで生じておりその制御は多彩な因子の秩序だった挙動によって実現されている。染色体数の不安定性は多くの癌細胞に見いだされる共通の特徴で、均等な染色体分配を維持する監視機構(スピンドルチェックポイント)の失活が、染色体数の異常(anuploidy)を引き起こし、癌化、あるいは癌の進行に深く関与することが指摘されている。その中でも動原体を介する異常と中心体を介する異常がスピンドルチェックポイントの破綻として解析されている。我々は動原体の内層を構成するセントロメア蛋白のひとつである CENP-C と HPV18 型 E7 蛋白質が相互作用し、CENP-C の機能を阻害する可能性を明らかにした。CENP-C はM期において、倍加した染色体の動原体に紡錘糸が付着し、正確に均等に染色体を各々の極に分配するのに関与している。従来より HPV18 型 E7 蛋白質を発現させると anuploidy を誘発することが知られており、従って HPV 18 型 E7 蛋白質と CENP-C の結合により、CENP-C の機能が障害され anuploidy が生じると考えられる。以上より動原体の構成蛋白質である CENP-C は癌における anuploidy 発生に重要であることを明らかにした。

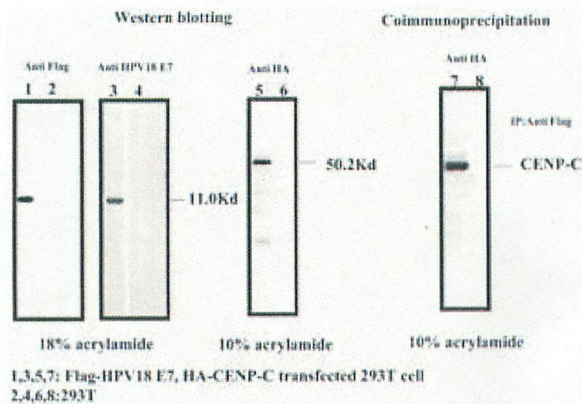


Figure 2

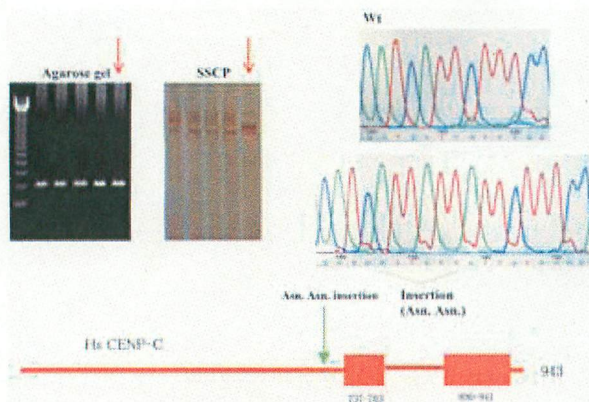


Figure 3