

ヒトパピローマウイルス 18 型 E1^{E4} 遺伝子産物の
新規機能に関する研究

梶谷 直子

目次

要旨 1

序論 2-11

結果 12-17

考察 18-23

材料と方法 24-28

謝辞 29

引用文献 30-36

図表は巻末に添付

要旨

Human papillomaviruses (HPVs)の感染は重層上皮組織特異的であり、感染の結果皮膚または粘膜の上皮組織に疣贅・良性腫瘍(乳頭腫)から悪性腫瘍にわたる疾患を引き起こす。Cottontail rabbit papillomavirus (CRPV)による皮膚がん誘導はウイルス誘導性発がんの最初の動物モデルである。HPV の生活環は感染した上皮細胞の分化状態に依存するという特徴を持つ。HPV 感染において細胞内侵入が起こるのは重層上皮組織最下層の基底細胞であり、一方ウイルスの放出が起こるのは組織表層の最も分化の進んだ角質層である。ウイルス生活環の進行には宿主細胞の分化が必要であり、感染細胞の分化段階に応じてウイルス性因子と宿主側因子の密接なクロストークが起こると考えられている。HPV の生活環を理解する上で、各ウイルス因子に関する理解が重要であると考えられる。本論文では HPV ウイルスタンパク質の一つ、E1^{E4} タンパク質に関してその機能を解明する事を目的とした。

HPV18 E1^{E4}をベイト(bait)とした yeast two-hybrid 法を行なった結果、18E1^{E4} の新規相互作用因子としてピメンチンを同定した。また HPV18 E1^{E4} を細胞質内に発現させると凝集体を形成するという事実から、その構造と機能に興味を持たれた。本論文では、HPV E1^{E4} が形成する細胞質内凝集体が“アグリソーム”である可能性を検討した。さらに、この E1^{E4} が形成する凝集体がウイルス生活環において何らかの機能を有するかを調べるために、他の HPV ウイルスタンパク質の発現量に及ぼす影響を検討した。その結果、E1^{E4} が HPV のがん関連遺伝子産物である E6 及び E7 の発現量に影響を与えるという、これまで報告されていない新規の機能を示唆する結果を得た。

序論

1. HPV 感染症

Human papillomavirus (HPV)は環状二本鎖のゲノム DNA を持ち、エンベロープを持たない小型 DNA ウイルスに属する(zur Hausen, 2002)。HPV はヒトの皮膚及び粘膜組織に感染して多様な疣贅・過形成を形成させるが、多くの場合無症候キャリアーとなり、免疫機構の働きにより数年以内に自然排除される。HPV 感染によって引き起こされる疾患として尋常性疣贅 (verruca vulgaris)、扁平疣贅 (verruca plana)、尖圭コンジローマ (condyloma acuminatum)などを挙げることができる。

肛門・生殖器や口腔などの粘膜組織への感染は、おもに性交渉を通じて成立しており、HPV 感染症はクラミジアと並ぶ代表的な sexually transmitted disease (STD)と考えられている(zur Hausen, 2002)。

2. HPV 感染による発がん

2-1. HPV 感染とがん

HPV には現在同定されているだけで約 120 種類以上の型が存在し、その内約 1/3 が粘膜指向型で残りは皮膚指向型である。粘膜指向型 HPV の感染は子宮頸部上皮内腫瘍性病変 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN)、子宮頸がん (cervical cancer)、陰茎がん (penile cancer)、口腔がん (oral cancer)、頭頸部がん (head and neck cancer)などの悪性腫瘍発症との関連が示されている。特に子宮頸がんにおいては、ほぼすべての症例で HPV DNA が確認されており、HPV 感染が子宮頸がん発症の主要な危険因子であることが分かっている(Parkin and Bray, 2006)。このような悪性腫瘍形成能との関連において、粘膜指向型 HPV はハイリスク

型 (例:HPV16, 18, 31)とローリスク型(例:HPV6, 11)の2種類に分類される(Howley, 1996)。なお皮膚指向型の HPV においても、HPV5 が疣贅状表皮発育異常症(epidermodysplasia verruciformis: EV)、HPV8 は皮膚がん(skin cancer)を誘発することが知られており、皮膚指向型 HPV にもハイリスク型に相当するものが存在する(図 1)。

2-2. HPV 感染による発がん機構

まずよく知られているがん抑制遺伝子、p53 と RB について簡潔に説明する(図2)。細胞に DNA 損傷や化学的/物理的ストレスが生じると、センサー分子が機能し p53 が活性化する。活性化した p53 は p21^{WAF1}などを介して cdk 活性を抑制し、その結果 RB が活性型となり G1/S 細胞周期停止を誘導する。この細胞増殖停止期に DNA 損傷などのダメージの除去をおこなう。p53 は状況によっては Baxなどを介してアポトーシス(apoptosis)細胞死を誘導し、異常細胞の排除に機能する。また RB が不活化し異常に細胞周期が進行する条件では、RB/E2F 複合体から遊離した E2F が p14^{ARF}の発現レベルを亢進し、この p14^{ARF}は MDM2 と結合する事で p53 の分解を抑制する。このことにより p14^{ARF}は RB 経路と p53 経路をつないで、異常な細胞増殖シグナルを抑制する安全装置の役割を担っている。85%以上のがんにおいて、ここで示した p53-RB の経路(RB の活性を制御する p16^{INK4a}を含む)に変異が生じており、これらの因子が非常に重要ながん抑制因子であることが報告されている(Moody and Laimins, 2010; Yugawa and Kiyono, 2008)。

ハイリスク型 HPV の代表である HPV16、18 のゲノム DNA は約 8 kb で、6 種類の初期遺伝子(E1, E2, E4, E5, E6, E7)と2種類の後期遺伝子(L1, L2)をコードしている(図 3)。このなかで細胞発がんに関わるとされるものが E6と E7, E5である(図 2, 4)。ハイリスク型の E6 は E6AP (E3 ユビキチンリガーゼ)、p53 と 3 量体を形成し、p53 のポリユビキチン化をおこなうことで分解を促進させる。また E6 は p53 の転写共益因子である CBP/p300 や ADA3 の機能も抑制する

事で p53 経路を二重に阻害する。一方ハイリスク型 E7 は RB と結合し、不活化するによって RB/E2F 複合体から E2F を遊離させることで E2F を活性化し、複製関連タンパク質の発現を転写レベルで促進させる。このようにハイリスク型の E6 と E7 はそれぞれ p53 と RB という主要ながん抑制遺伝子を不活化することで、細胞発がんに寄与していると考えられている。

E6 に関しては他にも、アポトーシス誘導に関わる Bak, FADD, pro-caspase8 の機能を阻害する事、細胞の不死化に関わるテロメラーゼの発現を亢進する事、細胞極性の維持および細胞間接着装置の形成に関わる PDZ ドメインタンパク質を分解する事、上皮細胞の分化に関わる Notch1 を抑制する事などが知られている(Yugawa and Kiyono, 2008)(図 5)。E7 にも多機能が報告されており、分化した細胞内での複製装置再活性化のために RB ファミリーの他にも HDACs (histon deacetylases), p21, p27 などといった多くの宿主因子を標的とする事が知られている。

また生体防御機構に対する回避メカニズムとして、E6 と E7 によるインターフェロン (interferon: IFN) 応答性遺伝子群の発現抑制、E5 による major histocompatibility complex (MHC) クラス I 分子の発現抑制が挙げられる。以上の機構により HPV は感染細胞において細胞死を誘導する事無く細胞増殖能を亢進させ、且つ免疫機構による排除を回避する機構を持つ(Moody and Laimins, 2010; Münger et al., 2004)。

子宮頸がん細胞では、多くの場合 HPV DNA の組み込みが見つかっている。さまざまな組み込みパターンがあるが、E6, E7 遺伝子の発現は高レベルで保持されている。このことも E6 と E7 が細胞のがん化に関わることを強く示している(Doorbar et al., 2012)(図 5)。

E6 と E7, E5 による発がんモデルを簡潔に示す(図 4)。前述のように E6, E7 発現によって異常増殖、不死化が誘導される。加えて E6 はセントロソーム数の整合性に関わる細胞極性の秩序を乱し、E7 はセントロソーム過増幅の誘導及び γ -チューブリンとの相互作用が知られてお

り、これらは細胞の遺伝的不安定性を引き起こす。その結果、HPV 感染細胞では遺伝的不安定性が亢進しており、多段階的に悪性化形質を獲得すると推測される。実際には HPV 感染は多くが不顕性であり HPV 感染から通常約 1 年以内にウイルスは排除され、感染により生じた CIN も約3年以内には自然消退する。ところが感染者の約 10%では3年以上の持続感染が成立し、さらにその一部で数ヶ月から数十年の経過を経て子宮頸がんが発症すると考えられている(Moody et al., 2007)。

2-3. 子宮頸がん予防ワクチン

HPV 感染予防を目的としたワクチンとして Gardasil (Merk and Co.)が 2006 年にアメリカにて承認され、Cervarix (GlaxoSmithKline)が 2007 年にオーストラリアにて承認された。これらは HPV のキャプシドタンパクである L1 で構築した VLP(virus like particle)をワクチンとして用いたものである。日本国内においては Cervarix が 2009 年、Gardasil が 2011 年に承認を受けた(Inoue, 2008)。Cervarix は HPV16 および 18 に対する二価ワクチン、Gardasil は HPV6, 11, 16 および 18 に対する四価ワクチンであり、それぞれの型の HPV 感染を効果的に予防することが期待されている。しかしながら、これらのワクチンは予防ワクチンではあっても治療ワクチンとしては機能せず、そのため HPV 感染および子宮頸がん予防には依然として Pap スメアスクリーニングが最も重要であり、更なる効果的な治療法の確立が望まれている。HPV 由来の悪性腫瘍発症を理解するためにも感染の分子メカニズム及び感染損傷部位の特徴の理解を深める事が重要であることが考えられる。

3. HPV の感染機構

3-1. HPV の遺伝子構造

HPV は共通した遺伝子構造を有す(図 3)。非構造遺伝子をコードした初期領域、構造遺伝

子をコードした後期領域、そして遺伝子発現や複製の制御領域(long control region; LCR)から構成される。

パピローマウイルスの各ウイルスタンパク質の機能に関して図 5 に示す。E1 と E2 は協調してウイルス DNA の複製開始に関与する。E2 はまたウイルス遺伝子の転写因子として機能し、細胞分裂に於けるウイルスゲノムの分配にも関与する事が報告されている。E6, E7 は上述の通り発がん過程、細胞周期制御、ウイルスゲノムメンテナンスに関与する(Münger et al., 2004; Thomas et al., 1999)。E4 と E5 は HPV 生活環の後期過程の制御に関わると推測されているが、各因子の生物学的機能は明確でない(Genther et al., 2003; Nakahara et al., 2005; Wilson et al., 2005)。近年では E5 に関して宿主免疫による感染細胞排除の回避に寄与している可能性が示唆されている(Moody and Laimins, 2010)。L1 及び L2 はウイルスキャプシドタンパク質として機能している。

3-2. 宿主細胞の分化に依存した HPV 複製

HPV の感染標的は重層上皮基底細胞であり、HPV 生活環の進行は上皮細胞の分化段階に依存する(図 7)。正常な扁平重層上皮組織では、基底膜(basal membrane)に接触している細胞(basal cell)のみが唯一分裂能を有する。基底細胞層には上皮幹細胞と、その分裂により生じる数回分裂可能な TA(transient amplifying)細胞が生じる。基底細胞は主に垂直方向に分裂すると理解されている。垂直方向に分裂し基底膜から離れた娘細胞(有棘細胞)は、続けて分化プログラムを開始させ、下層の基底細胞が分裂増殖するたびに表層方向へと押し上げられる。基底膜から一旦離れた細胞は細胞周期を脱し、遺伝子発現パターンを変化させ組織の重層と共に分化を進行させる。上皮組織表層で終末分化を完了させ脱核(顆粒層)し、最終的には上皮組織表面から剥離する(角質層)(Johansson and Schwartz, 2013)。

以上が通常の上皮細胞の分化進行モデルであるが、HPV 感染はその秩序を乱すと考えら

れている。HPV 粒子は粘膜もしくは皮膚に物理的に生じた微傷を通して、基底細胞特異的に感染する。感染レセプターとして α インテグリン、ヘパラン硫酸糖タンパク等が示唆されているが、上皮基底細胞特異的な標的化機構の詳細は不明である(Kines et al., 2009)。侵入、脱殻に続いて、HPV ゲノムが細胞当たり 50~100 コピー複製され核内エピゾームとして核内に維持される(Moody and Laimins, 2010)。ゲノム維持の詳細な機構は明らかとなっていないが、これは HPV 生活環初期過程における最も重要な機能の一つである。このような潜伏感染状態では、ウイルス複製や遺伝子発現は低レベルに制御されており、細胞障害性を発揮することもなく、また宿主の免疫監視機構にも検知されない。このことが感染細胞の排除を難しいものとし、HPV が長期にわたって基底細胞内に維持され続けることを可能とさせる。

感染細胞内でのゲノム維持に続いてウイルス DNA は宿主染色体の複製に協調して、二つの娘細胞に分配される(McBride et al., 2006)。基底膜を離れた感染細胞では細胞分化が開始され、ウイルスの初期遺伝子産物の発現が誘導される。前述の通り HPV ウイルスは自身の DNA 複製酵素を持たないので、自身の DNA 複製を宿主の装置に依存するが、正常な分化ケラチノサイトは細胞周期から脱しており、DNA 複製因子は不活化されている。そこで E6 及び E7 によって、分化を開始した上皮細胞の細胞周期を活性化する。そのため HPV 感染細胞は分化層においても増殖能を有し、そのことは細胞分化の乱れの一因になり、結果組織の過形成を生じさせる。感染細胞の分化プログラム進行に応答して、ウイルス後期プロモーターの活性化およびウイルス転写産物の転写後プロセッシング制御の変化が起こる(Kajitani et al., 2012)。結果、E1、E2、E1⁺E4、E5 をコードした転写産物が質的にも量的にも劇的に変化する(Hummel et al., 1992; Ozbun and Meyers, 1997)。そこではウイルスゲノムのコピー数は数百~数千コピーへと増加する(Bedell et al., 1991)。最も分化の進んだ有棘層上層~顆粒層領域の細胞で、ゲノム増幅に続いてカプシドタンパク質 L1、L2 の合成が起こる。その後、カプシドタンパク質

のアセンブリー及びウイルスゲノムの新規ビリオンへの取り込みが起こり、仔ウイルスが完成する。そして角質化し剥離する上皮細胞とともに仔ウイルスは外界へと放出される。これが HPV の感染モデルである。

以上のように HPV 生活環は重層上皮組織の分化と密接な関係があり、そのため HPV 研究はウイルスそのものとしても興味深い対象であるが、上皮組織の分化制御機構や上皮性多段階発がん機構の解明にもつながることが期待出来るため、生物学的にも重要な意味を持つと考えられる。

3-3. HPV 複製モデル

HPV はこのような複製様式を持つために、通常の単層培養系では実際の感染細胞におけるウイルス動態や病理現象を再現する事は不可能である。このことが 20 世紀初頭にパピローマウイルスが発見されたにも関わらず、ウイルス生活環の解明が進まなかった主な原因である。近年は重層上皮細胞の分化の再現系として高カルシウム培地やセミソリッド(メチルセルロース)培地、3次元皮膚モデル培養系などを用いて HPV 生活環の解析が行なわれている。しかしながら HPV 感染モデルの再現系は未だ十分とは言えず、HPV 生活環を高度に再現できる実験系の構築が望まれており、実際現在も改変が行なわれ続けている(Satsuka and Sakai, 2008)。

4. 本論文の研究対象: E1^{E4} について

HPV 初期遺伝子産物の一つである E1^{E4} はポリストロニックな転写産物から E1 配列と E4 配列間でプロセッシングを受け E1 の N 末端 5 アミノ酸が E4 の上流に融合したタンパク質 E1^{E4} として翻訳される(図 8A)。その機能は未だ十分には理解されていない。臨床切片の免疫組織学から mRNA レベル、タンパク質レベル共に E1^{E4} の発現が感染組織上層で特に顕著であ

る事(Doorbar et al., 1997; Sterling et al., 1993)、それがウイルス DNA 増幅やウイルス後期タンパク質の発現と同時期である事が示されている(図 8B)。また、E1^{E4} 不全 HPV ゲノムからの実験により、①CRPV (cottontail rabbit papillomavirus) E1^{E4} がウイルス DNA 増幅及び後期タンパク質の発現に必要な事(Peh et al., 2004)、②HPV31 E1^{E4} が分化に伴うウイルス DNA 増幅及び感染細胞の細胞周期 S 期維持に関与する事(Wilson et al., 2005)、③HPV16 E1^{E4} が未分化細胞でのウイルスゲノム維持、分化細胞での細胞周期 S 期維持及びウイルス DNA 増幅、分化の乱れに関与する事(Nakahara et al., 2005)、④HPV18 E1^{E4} が基底細胞でのウイルスゲノム維持、未分化細胞の増殖能抑制、分化細胞でのウイルス DNA 増幅及び後期遺伝子発現に関与する事が報告されている(Wilson et al., 2007)一方で、⑤HPV11 E1^{E4} はウイルス DNA 増幅に関与しない事が報告されている(Fang et al., 2006)。このように E1^{E4} がパピローマウイルスの生活環後期において機能を有するかは議論中であるものの、何らかの後期イベントに関与しているという見解が多い(図 9)。

E1^{E4} のタンパク質の性質として報告されている事はこれまで数報存在する(図 9)。E1^{E4} は宿主サイトケラチンと相互作用し、細胞内ケラチンネットワークを崩壊させる事が報告されている。HPV16 E1^{E4} は ERK によるリン酸化を受け構造変化し、サイトケラチンと相互作用しやすくなる事が報告されている(Wang et al., 2009)。また E1^{E4} 自身がアミロイド様の凝集塊を形成する事が明らかにされている(McIntosh et al., 2008)。E1^{E4} を細胞内で過剰発現させると、細胞周期の G2/M arrest を誘導する事が示されており、E1^{E4} が CyclinA/B と相互作用する事が G2/M arrest に影響を与えている可能性が示唆されている。また他にも E1^{E4} に関して、E4-DBP (RNA helicase; RNA processing に関与) (Doorbar et al., 2000)、SRPK1 (mRNA 代謝に関与)(Bell et al., 2007)、及びミトコンドリア (Raj et al., 2004)などとの相互作用が報告されている。HPV1 E4 に関しては、ND10 (HPV ゲノム複製の場と示唆されている)構造体において

PML 体の再配置を起こす事も報告されている(Roberts et al., 2003)。しかしながら、現在までに E1^{E4} の HPV 生活環における機能との関連やその分子メカニズムに迫る報告はほぼ皆無である。

5. E4 による凝集塊形成とアグリソーム

前述した通り、E1^{E4} は細胞質内でアミロイド様の凝集体を形成する。細胞内に形成されるこのような凝集体の一つとして「アグリソーム(aggresome)」が知られている。アグリソームにはプロテアソームや Hsp (heat shock protein) タンパク質が含まれ、中間径フィラメント(ビメンチンやケラチン)の形成するケージ(cage)によって囲まれる、という特徴を有する。アグリソームが形成されると、オートファジー経路が誘発されアグリソームを分解する応答が起こる事が示唆されている(Kopito, 2000)。

このようなアグリソーム／オートファジー系は細菌や原虫の感染に対して防御的機能を果たす事が知られているが(Wileman, 2007)、一部のウイルスに関してはそれがウイルス複製に寄与する事が示されている。このことから、E1^{E4} によって形成された凝集塊も、HPV 複製に何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

6. HPV 生活環の解明に向けて

HPV 生活環に於ける E1^{E4} の発現時期から E1^{E4} が HPV の後期ライフサイクルに関与する可能性がある事、ほぼ全てのパピローマウイルスのゲノムで E4 遺伝子が保存されている事から、私は、E1^{E4} が HPV ウイルス生活環に何らかの寄与をしている可能性を推測し、その機能解明は HPV 生活環の理解を助けると考え、E1^{E4} の機能に注目した。

本論文では E1^{E4} の新規機能の探索を目的とし、HPV18 E1^{E4} をベイト(bait)とした yeast

two-hybrid 法を行なった。その結果 HPV18 E1^{E4} の相互作用の候補タンパク質としてビメンチン(vimentin)を同定した。また、HPV18 E1^{E4} を細胞質内に発現させると凝集体を形成するという事実から、私はこれが機能性を有するのかに疑問を持った。そこで HPV18 E1^{E4} が形成する「ビメンチンが関連する細胞質内凝集体」が“アグリソーム”である可能性を検討した。また HPV18 E1^{E4} 凝集体がウイルス生活環において何らかの機能を有するのかを調べるために、他の HPV ウイルスタンパク質の発現量に及ぼす影響を検討した。

結果

1. E1^{E4} はビメンチンと相互作用する

HPV E1^{E4} タンパク質の機能を探索するために、HPV18 E1^{E4}(以下 18E1^{E4} と表記する) と相互作用する宿主因子の同定を行なった。手法として、18 E1^{E4} をベイト(bait)とした yeast two-hybrid 法を利用した。得られた相互作用候補因子の中から私はビメンチン(vimentin)に注目した。ビメンチンは中間径フィラメント分子に属する細胞骨格系タンパク質であり、細胞分裂や小胞輸送等多くの細胞機能に関与している(Ivaska et al., 2007)。そこで私は、E1^{E4} がビメンチンと相互作用する事で細胞構造や細胞機能の制御に影響を及ぼしているのではないかと考え、E1^{E4} とビメンチンの相互作用を検討することにした。

はじめに 18E1^{E4} とビメンチンの結合を、in vitro の結合実験によって検証した(図 11)。GST 融合 18E1^{E4} は、in vitro 翻訳・合成されたビメンチンと、強くはないが有意の結合性を示した。この結果は、18E1^{E4} とビメンチンの直接的な結合性を示すものである。同様の結合性は HPV11 E1^{E4}(11E1^{E4})でも確認できた(図 11A)。

次に 293T(ヒト腎細胞株, HPV 陰性)細胞内で発現させた 18E1^{E4} と内在性ビメンチンとの相互作用を免疫沈降実験によって調べた。ここでは 18E1^{E4} には N 末に FLAG エピトープタグが付加されており、それを利用して抗 FLAG 抗体により 18E1^{E4} を免疫沈降し、イムノブロット法によって共沈したビメンチンを検出した(図 11B)。この実験により、18E1^{E4} は哺乳類細胞内においてもビメンチンと相互作用しうる事が示された。

さらに CV1(サル腎細胞株, HPV 陰性)細胞を用いて、細胞内での 18E1^{E4} とビメンチンの局在を調べた。通常ビメンチンは細胞内に繊維状に張り巡らされている(図 12A)。細胞内に 18E1^{E4} を発現させると、従来の報告通り E1^{E4} は細胞質に凝集塊を形成する(図 12A,

(Nakahara et al., 2002)。この時、ビメンチンは E1^{E4} 凝集塊に共局在すると同時に、細胞質に分布していたビメンチン繊維が減少した。また 11E1^{E4} を CV1 細胞に発現させた時も 18E1^{E4} 同様に細胞質内に凝集塊を形成しビメンチンとの共局在が確認された(図 12A)。また同様の結果は共焦点顕微鏡にて HeLa (HPV 陽性子宮頸がん由来の上皮細胞株) 細胞でも観察された(図 12B)。共焦点顕微鏡の観察から E1^{E4} 凝集体がビメンチンによって取り囲まれているような像が得られた(図 12B)。以上の結果は、in vitro においても E1^{E4} とビメンチンが相互作用する事を示しており、E1^{E4} は相互作用を介してビメンチンを凝集塊に集める事が示唆された。

2. E1^{E4} 凝集塊はアグリソーム様の構造体である

ヒトヘルペスウイルス-1(human herpesvirus-1; HHV-1)などの感染において細胞質にアグリソーム(aggresome)と呼ばれる構造体が形成される事が知られている(Wileman, 2007)。アグリソームの特徴は、微小管形成中心(MTOC: microtubule organizing center)周辺に形成され、シャペロンタンパク質やユビキチン化タンパク質、histone deacetylase 6(HDAC6)、p62 などが集合している事である(Johnston, 2006)。また、アグリソームはビメンチンによって囲まれていることが知られている(Rodriguez-Gonzalez et al., 2008)(図 10)。E1^{E4} 凝集塊も核周辺に形成され、さらにビメンチンに囲まれている(図 12A, B)ことから、この凝集塊がアグリソームとしての性質を持つ可能性が考えられた。そこで代表的な 3 つのアグリソーム構成因子、シャペロンタンパク質である Hsp40、HDAC6、p62 の細胞内局在をそれぞれの特異的抗体にて確認した(図 13A)。その結果、これらの細胞性因子は、E1^{E4} 発現細胞では、E1^{E4} を含む凝集塊に局在している事が確認できた。さらに、ユビキチン化タンパク質の局在を抗ユビキチン抗体を用いて観察したところ、E1^{E4} 凝集塊にはユビキチン化されたタンパク質が蓄積していた(図 13B)。これら

の結果は、E1^{E4}凝集塊がアグリソーム様構造体である事を示唆している(以下 18E1^{E4}凝集塊の事を 18E1^{E4}アグリソームと表記する)。

一般的にアグリソームは変性タンパク質および関連因子が微小管を介したレトログレード輸送によって MTOC 近傍に集積され形成され则认为られている(図 10)。そこで MTOC の構成因子である γ -チューブリン(γ -tubulin)の局在を調べた(図 14A)。コントロール細胞では、 γ -チューブリンは核周辺に局在する点状の構造、中心体として観察される(図 14A 矢印)。驚いたことに、18E1^{E4}発現細胞では γ -チューブリンは 18E1^{E4}アグリソームに共局在し、正常な中心体は検出できなかった(図 14A)。このことから 18E1^{E4}アグリソーム形成によって正常な中心体もしくは MTOC 構造が失われた事が示唆された。

γ -チューブリンと 18E1^{E4}アグリソームが共局在した事をうけ、次に γ -チューブリンと 18E1^{E4}間の相互作用の有無を検討した。N 末端に FLAG タグを付加した 18E1^{E4}を 293T 細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて 18E1^{E4}を含む複合体を免疫沈降し、抗 γ -チューブリン抗体を用いたイムノブロットによって解析した。その結果、18E1^{E4}と γ -チューブリンが相互作用する事が示され(図 14B)、このことが図 14A で観察された γ -チューブリンと 18E1^{E4}アグリソームの共局在に関連している可能性が示唆された。

3. 18E1^{E4}アグリソーム形成メカニズム

ミスフォールドタンパク質及びユビキチン化タンパク質は HDAC6 を介してモータータンパク質であるダイニン(dynein)と結合する事が知られている(Johnston, 2006)。この複合体は微小管フィラメントに沿って輸送され MTOC 周辺付近でアグリソームを形成する(Kawaguchi et al., 2003)。微小管重合阻害剤であるノコダゾール(nocodazole)はアグリソーム形成を阻害する(図 15)。

通常の HeLa 細胞にノコダゾール処理を施すと、細胞は初期 M 期で細胞周期を停止させ、丸い形態を示した (control, 図 16A)。それに対して、18E1^{E4} 発現細胞は広がったままの形態を示した (18E1^{E4}, 図 16A)。18E1^{E4} の発現によって G2/M 期細胞周期停止が誘導され、異数性細胞 ($\geq 4N$) が蓄積する事が報告されており (Nakahara et al., 2002)、今回の条件では M 期の前で細胞周期が停止している事から (図 16A)、18E1^{E4} の発現によって細胞周期が S 期および G2 期に留まっている事が示唆される。凝集塊形成に関しては、ノコダゾール処理によって、18E1^{E4} アグリソーム形成は顕著に阻害され、小さな 18E1^{E4} 凝集体が細胞質に分散した (図 16A)。このことから 18E1^{E4} アグリソームの集積には機能性を有する微小管ネットワークが必要である事が示唆された。また、ノコダゾール処理細胞において γ -チューブリンが 18E1^{E4} の小さな凝集体中に検出される事から (図 16B)、18E1^{E4} は γ -チューブリンと直接的な相互作用をし、微小管依存的に 18E1^{E4} アグリソームへと集積される事が示唆された。

ダイニン阻害剤である ciliobrevin D を用いて同様の実験を行なった (図 16C)。Ciliobrevin D 処理によって 18E1^{E4} アグリソーム形成が強く阻害され、このことから 18E1^{E4} アグリソーム形成にはダイニン依存的輸送が関与している事が示唆された。

HDAC6 阻害剤である tubacin の効果に関しても同様に試行した (図 16D)。HDAC6 はミスフォールドタンパク質及びユビキチン化タンパク質を含んだ積み荷をダイニンモーター上に乗せて運ぶ事でアグリソーム形成において重要な機能をしていると考えられている (Kawaguchi et al., 2003)。ノコダゾール処理及び ciliobrevin D 処理同様、tubacin 処理によって 18E1^{E4} アグリソームは形成されず細胞質に小さな 18E1^{E4} 凝集体が検出された。

これらの結果から、細胞質内で形成される小さな 18E1^{E4} 凝集体が、微小管フィラメントに沿ってダイニン、HDAC6 依存的レトログレード輸送によって 18E1^{E4} アグリソームが集積される可能性が示唆され、これは従来考えられているアグリソーム形成メカニズムと共通している。

4. プロテアソーム阻害剤は E1^{E4} アグリソーム形成を増強させる

細胞質内においてプロテアソームは中心体周辺、細胞骨格ネットワーク近傍および小胞体表面に局在し、その中でも中心体付近はプロテアソーム依存的プロテオリシスの主要部位と考えられており、プロテオリシスセンターと呼ばれている(Wójcik and DeMartino, 2003)。また、プロテアソーム機能の阻害によって中心体付近でのアグリソーム形成が増強することが報告され(Johnston et al., 1998)、このことはアグリソームの特徴の一つと考えられている(図 17)。

そこで、18E1^{E4} 発現細胞に対する MG132(プロテアソーム阻害剤)の効果を検討し、MG132 処理が 18E1^{E4} アグリソーム形成を増強させる事が明らかとなった(図 18A)。このことは 18E1^{E4} がアグリソーム様構造を形成するという仮定に矛盾しない結果であった。

MG132 処理細胞において 18E1^{E4} の発現レベルを検討した。以前報告されている通り(Nakahara et al., 2002)、18E1^{E4} の大部分は細胞抽出液の不溶性画分にて検出され(図 18B)、これも 18E1^{E4} アグリソーム形成の特徴に一致する。MG132 処理にて、18E1^{E4} の不溶性画分は顕著に増加し、これはアグリソーム形成が増強されたためと考えられる。加えて 18E1^{E4} の可溶性画分も同様に増加しており、これは本来 18E1^{E4} がプロテアソーム依存的な分解を受けている事を示唆する(図 18B)。以上の事より、18E1^{E4} アグリソームが形成されると、不溶性画分に多く形成される事が示唆された(図 18C)。

5. E1^{E4} アグリソームは γ -チューブリンの検出画分を変化させる

18E1^{E4} は細胞抽出液の不溶性画分としてアグリソームに集積する事が示唆されたが、このことは 18E1^{E4} アグリソームにリクルートされる細胞性因子も不溶性画分に集積されることを示唆している。図 14A および図 14B に示した通り、 γ -チューブリンは 18E1^{E4} と相互作用し、そ

のアグリソームにリクルートされた。そこで 18E1^{E4} 発現によって γ -チューブリンのタンパク発現に影響があるかを検討した(図 19A)。 γ -チューブリンの可溶性画分は 18E1^{E4} 発現により減少し、対照的に不溶性画分は増加した。このことから、 γ -チューブリンは 18E1^{E4} アグリソームに不溶性画分として集積されることが示唆され(図 19B)、その結果 γ -チューブリンの活性画分が減少し、図 14A で示したような正常な中心体/MTOC 形成の不備が生ずることが示唆された。

6. 18E1^{E4} アグリソームは HPV がんタンパク質の代謝に関与する

上述した通り、18E1^{E4} は γ -チューブリンをアグリソームに閉じ込めた。そこで、HPV 複製に於ける 18E1^{E4} アグリソームの関与を考察し、アグリソームが他のウイルスタンパク質の封じ込めに関与している可能性を検討した。

CV1 細胞にて、18E1^{E4} の有無によって FLAG タグ融合 18E5、18E6、18E7 の発現量に変化があるかをイムノブロット解析にて検証した(図 20, 図 21)。E5 の発現に関しては影響がなかったが、E6 および E7 の可溶性画分は 18E1^{E4} の発現により顕著な減少(図 20)と、それぞれ不溶性画分への蓄積が観察された(図 21)。ノコダゾール処理によってこの 18E1^{E4} の効果は阻害され(図 22)、このことから 18E1^{E4} アグリソームの形成によって 18E6 および 18E7 の発現調節に関与している事が示唆された。

18E1^{E4} 発現細胞では、E6 および E7 は 18E1^{E4} アグリソームと共局在を示した(図 23)。18E5 の局在は 18E1^{E4} 発現に影響を受けなかった。これらの観察から、主要なウイルスがんタンパク質である E6 および E7 は 18E1^{E4} アグリソームにリクルートされ、不溶性画分へと集積されるという可能性が示唆された。

考察

過剰発現させた HPV E1^{E4} が細胞質内にて凝集塊を形成する事は以前報告されていたが (Doorbar et al., 1991)、その凝集体の機能に関しては不明なままであった。本論文では 18E1^{E4} がアグリソーム様構造 (18E1^{E4} アグリソーム) を形成し、ウイルスがんタンパク質の集積に関与している事を明らかにした。

【18E1^{E4} によるアグリソーム様構造の形成】

私は 18E1^{E4} がビメンチンと相互作用して 18E1^{E4} 凝集体にリクルートする事を明らかにした (図 11, 12)。この事実とアグリソームはビメンチンによって取り囲まれることから、18E1^{E4} がアグリソーム様構造に集積されている事が推測させた。

16E1^{E4} はサイトケラチン 8/18 (CK8/18) とは相互作用するが、ビメンチンとは相互作用しないことが報告されている (Wang et al., 2004)。Wang らのグループでは 16E1^{E4} との相互作用を、合成ビメンチンを用いた *in vitro* 結合アッセイにて検証している。それに対して、私は 18E1^{E4} と内在性ビメンチンとの相互作用を *in vivo* 及び *in vitro* 両方で検討した (図 11A、図 11B)。この異なる実験条件の違いが異なる結果を導いたものと推測される。

アグリソームはユビキチン-プロテアソーム経路もしくはシャペロン依存的リフォールディング機構の処理能力を超えた時にミスフォールドタンパク質/ユビキチン化タンパク質を集積させる機構である (Goldberg, 2003)。アグリソームにはシャペロンタンパク質、ユビキチン化タンパク質、p62、HDAC6 が含まれている事が報告されている (Rodriguez-Gonzalez et al., 2008)。本論文では、これらの因子が 18E1^{E4} 凝集体にリクルートされる事を明らかにした (図 13A, B)。この結果は 18E1^{E4} がアグリソーム様構造体である事を強く示唆するものである。

アグリソームは微小管およびダイニン依存的に形成される。ミスフォールドタンパク質が形成する微小な凝集体は、微小管に沿ってダイニン依存的に MTOC へと輸送される(Johnston, 2006)。ダイニンはモータータンパク質の一つで、微小な凝集体は HDAC6 を介してダイニンと結合する(Kawaguchi et al., 2003)。ノコダゾール(微小管重合阻害剤)、ciliobrevin D(ダイニン阻害剤)、tubacin(HDAC6 阻害剤)が及ぼす 18E1^{E4} 凝集体形成への影響を検証したところ、全ての阻害剤において凝集体形成の阻害が確認された(図 16)。この結果は 18E1^{E4} がアグリソーム様構造体(18E1^{E4} アグリソーム)を形成する可能性を強めた。ビメンチンは、細胞分裂、細胞分化、ストレス応答、細胞運動性、増殖能、アポトーシス、シグナル伝達、ゲノム DNA の構造制御等多岐に渡る機能が知られている。そのため、ビメンチンとの相互作用は、アグリソーム形成以外の機能の可能性も示唆される。現在、18E1^{E4} とビメンチン間の相互作用がアグリソーム形成において機能を有するかどうかを検討中である。

また 18E1^{E4} 凝集体はストレスグラニュールとの類似性もあるが、予備的な実験により、この凝集体にオートファジー関連因子がリクルートされることを確認しており、アグリソーム構造であるという可能性が高いと考えている。

【18E1^{E4} による MTOC の形成不全】

アグリソームは MTOC 近傍に形成される事が知られている(Johnston et al., 1998)。そこで 18E1^{E4} 発現細胞における γ -チューブリン(MTOC の構成因子)の局在を検証し、その結果 γ -チューブリンが 18E1^{E4} アグリソームに共局在する事を明らかにした(図 14A)。18E1^{E4} と γ -チューブリン間の直接的な相互作用が確認され(図 14B)、そのことは γ -チューブリンが 18E1^{E4} アグリソームにリクルートされている事を示唆する。また、ノコダゾール処理は 18E1^{E4} アグリソーム形成を阻害したが、それでも 18E1^{E4} と γ -チューブリンの共局在は検出され(図 16B)、

18E1^{E4} 発現細胞では正常な中心体もしくは MTOC 構造が失われた(図 14A)。正常な MTOC 構造は細胞分裂に必要不可欠である(Bettencourt-Dias and Glover, 2007)。18E1^{E4} は G2/M 細胞周期停止に関与する事が報告されているので、18E1^{E4} による MTOC 形成不全が E1^{E4} 誘導性 G2/M 細胞周期停止に何らかの寄与をしている可能性が考えられる。

【ウイルス複製における 18E1^{E4} アグリソームの機能】

アグリソーム形成はバクテリアや原虫に対する防御機能を有する事が知られているが(Wileman, 2007)、一部のウイルスではアグリソームをウイルス複製に利用している事が報告されている((Wileman, 2007))。特に nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV)に属するウイルス:ポックスウイルス(Poxviruses)、アフリカ豚コレラウイルス(African swine fever virus; ASFV)、イリドウイルス(iridoviruses)、フィコドナウイルス(phycodnaviruses)などは、アグリソーム構造に宿主及びウイルスタンパク質を濃縮させる事でウイルス複製及びアセンブリーを促進させる事が知られている。また一部のレトロウイルス(retroviruses)やヘルペスウイルス(herpesviruses)では、ビメンチンケージは形成されないものの、アグリソームと似た特徴を有するウイルス封入体をセントロソーム周辺領域(pericentriolar sites)に形成し、それをウイルスアセンブリーサイトとしている事が報告されている(Wileman, 2007)。このような事実は 18E1^{E4} アグリソームがウイルス複製に何らかの寄与をしている可能性を示唆している。

図 14 および図 19 で示した通り、18E1^{E4} は γ -チューブリンと結合し、アグリソーム様構造へとリクルートし、その結果 γ -チューブリンの細胞内画分の変化を引き起こすことが示唆された。この γ -チューブリンの集積の結果、正常な中心体/MTOC 構造は失われた。私は 18E1^{E4} アグリソームが他のウイルスタンパク質、特にウイルスがんタンパク質の集積にも関与しているのではないかと推測した。そこで 18E1^{E4} が 18E5、18E6、18E7 の発現レベルに及ぼす影響を

検証した(図 20, 図 21, 図 22)。E5 の発現レベルは E1^{E4} によって変化しなかったが、E6 及び E7 の可溶性画分は顕著に減少した。E6 及び E7 は不溶性画分に検出され、E1^{E4} アグリソームと共局在した(図 23)。これらの観察から E1^{E4} が E6 及び E7 を不活性な凝集体に封じ込め、活性画分を減少させた事が示唆された。現在のところ E1^{E4} と E6 もしくは E7 の直接的な結合活性に関しては検出しておらず、それゆえ E6 及び E7 がアグリソームへとリクルートされる機構を精査する必要があると考えている。

E6 及び E7 の大部分は図 20 で示した通り可溶性画分にて検出された。これらの可溶性画分のタンパク量は E1^{E4} 発現によって明確に減少したが、不溶性画分の増加は穏やかなものだった。この結果から E1^{E4} 発現はこれらがタンパク質の代謝を速める事によって細胞内総量を減少させている事が示唆される。現在 E1^{E4} 発現による E6, E7 のタンパク総量に与える影響に関して検証を進めている。

今回の実験では、HeLa や CV1 細胞において E1^{E4} を過剰発現させた実験系でアグリソーム形成が確認できた。実際の感染部位の分化層でも、E1^{E4} の発現量は細胞の総タンパク質の半分程度を占めることが知られており、ここでのアグリソーム形成が非生理的条件下での現象とは考えられない。実際に皮膚指向型 HPV である HPV1、HPV4、HPV63 に感染した損傷部位において、E1^{E4} 凝集体は細胞内封入体 (intracytoplasmic inclusion bodies) (Egawa, 1994) として疣贅の上層にて観察される。HPV16 感染に関して、E1^{E4} 封入体が CIN1 の分化層にて検出される事が報告されている(Doorbar, 2005; Doorbar et al., 1997)。これらの報告から E1^{E4} アグリソームは感染部位上層にて機能している事が示唆される。

ここで私はウイルス複製における E1^{E4} の機能に関して以下のモデルを提唱する(図 24)。HPV 感染部位における基底細胞および parabasal 細胞において、ウイルスがんタンパク質 E6 及び E7 はウイルス初期プロモーターから発現される。これによって細胞分化は抑制され、細

胞増殖が促進される(Nguyen et al., 2003; Ueno et al., 2006)。これによって感染細胞はその数を増やす事が可能となる。細胞の分化が進むと同時に、ウイルス後期プロモーターが活性化され、E1^{E4} が発現するようになる。E1^{E4} は G2/M 細胞周期停止や endoreduplication を引き起こす(Nakahara et al., 2005)。この細胞環境はウイルスにとってゲノム増幅や遺伝子発現に好ましい環境を与える。さらにE1^{E4}が高発現すると感染部位上層で凝集体形成を誘導し、そこでE1^{E4}はE6及びE7を封じ込め、それらの細胞分化に及ぼす阻害効果を抑制し、結果、細胞の終末分化を誘導する。終末分化はカプシドタンパク質の発現やビリオンアセンブリーに必要であるが、その機構に関して詳細は不明である(Sakakibara et al., 2013)。つまり、E1^{E4}は感染組織上層の細胞で、ウイルス複製能を抑制する事無く、ウイルス後期生活環への移行を可能にするような細胞内環境の変化に寄与しているのではないか。このモデルを検証すべく現在E1^{E4}発現細胞に於けるE6及びE7機能への影響を検討中である。その例としてプレリミナリーなデータではあるが、以下に紹介する。HeLa細胞に18E1^{E4}を導入し、その細胞抽出液に関して、抗RB抗体でイムノブロットした結果、E1^{E4}発現下においてRBタンパク質の発現量の上昇が認められた(図25A)。また、プライマリーな角化細胞にコントロールベクター、および18E7、18E7及び18E1^{E4}を導入し、メチルセルロース培養にて分化誘導をかけた結果、E7導入によって分化マーカー(トランスグルタミナーゼ: TG)の発現量が減少したのに対し、E7に加えてE1^{E4}を導入すると、TG発現量の減少が回復した(図25B)。以上の結果は、先程の仮定モデルを否定しなかった。今後、更なる検討を進めたい。

これまでE1^{E4}凝集体はサイトケラチンネットワークを崩壊させ、そのことが角化細胞からのビリオン放出を促す可能性が報告されている(Doorbar et al., 1991)。今回提唱するモデルはE1^{E4}の新たな機能を示唆しており、ウイルス生活環を理解する上で重要な知見になると考えられる。今後、HPV生活環におけるE1^{E4}の機能に関して三次元培養モデルや臨床検体、動

物モデルを用いてより深い理解を進めたい。

材料と方法

細胞培養、トランスフェクション

HeLa、CV1、293T 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)を添加した Dulbecco's modified minimal essential medium (D-MEM) (和光純薬工業株式会社、大阪、日本)を用いて維持した。細胞のトランスフェクションはリン酸カルシウム法の標準プロトコルにてプラスミド DNA (5 μ g)、ニンジン精子 DNA (5 μ g)(Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)を用いて行なった。

ヒト初代培養ケラチノサイト (human foreskin keratinocytes: HFKs) はクラボウ社 (KURABO Industries, Ltd, Osaka, Japan) より購入した。HFKs の培養は、血清不要ケラチノサイト成長培地 (KGM) (KURABO Industries, Ltd, Osaka, Japan) を用いた。HFKs へのトランスフェクションには、Nucleofector™ キット (Amaxa biosystems, Germany) を利用した。トランスフェクションの効率を pGreenLantern-1 (GIBCO) を同時にトランスフェクションし、GFP 発現を観察する事で検討した。薬剤選択には G418 (最終濃度 80 μ g/mL) およびピューロマイシン (最終濃度 0.4 μ g/mL) を用いた。

メチルセルロース培養

HFKs は 1 well 当り 1×10^6 cells になるように細胞を回収し、6 well plate (接着コーティング無し) にてメチルセルロース培地 (1.5% Methyl cellulose, KGM) 2ml/well で培養した。メチルセルロース培養 24 時間後に回収し、2回洗浄後、その後のアッセイに適した処理をした。

DNA 構築

HPV 18 及び HPV11 ゲノム DNA は Dr. Peter M Howley (Harvard Medical School, Boston,

USA)より提供を受けた。18E1^{E4}、11E1^{E4}、18E5、18E6、18E7 cDNA はそれぞれ PCR によって得た。18E1^{E4} および 11E1^{E4} cDNA は pPC86 ベクター(InvitrogenTM, Life Technologies, Corp., Carlsbad, CA, USA)、pCMV₄ (Nakahara et al., 2002)、pEGFP-C1 (Clontech Lab., Inc., Mountain View, CA, USA)にクローニングした。18E5、18E6、18E7 cDNA は 3xFLAG タグが付加するように pCNV7.1 (Sigma-Aldrich Corp., St. Lois, MO, USA)にクローニングした。

酵母 two-hybrid 法

ProQuestTM Two-Hybrid System (InvitrogenTM, Life Technologies, Corp., Carlsbad, CA, USA)を用いた。18E1^{E4} cDNA は pPC86 ベクターにクローニングした。cDNA ライブラリーとして ProQuestTM Human Fetal Brain cDNA Library (InvitrogenTM, Life Technologies, Corp., Carlsbad, CA, USA)を用いた。スクリーニングは推奨説明書を参考に試行した。

GST プルダウンアッセイ

Glutathione S-transferase (GST)融合 18E1^{E4} もしくは 11E1^{E4} は pGEX-5X ベクター (Promega Corp., Madison, WI, USA)から発現させた。融合タンパク質は大腸菌(BL21 株)にて発現させ、Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)を用いて精製した。³⁵S-methionine 標識タンパク質は TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega Corp., Madison, WI, USA)を用いて合成した。ビメンチン cDNA は HeLa 細胞由来の mRNA を用いて PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本)にて合成した。得られた cDNA は in vitro transcription/translation 用に pGEM-3Zf(+) (Promega Corp., Madison, WI, USA)にクローニングした。

精製 GST 融合タンパク質と ^{35}S -Met 標識ビメンチンは binding buffer (20mM Tris·HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 4mM MgCl_2 , 0.5% Nonidet P-40, 2% skim milk, 2mM dithiothreitol (DTT))中で 4°C 2時間インキュベートした。複合体は sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)にて分離し、GST 融合タンパク質に結合したビメンチンは BAS5000 (富士フィルム、東京、日本)にて検出した。

免疫沈降法およびイムノブロット法

細胞溶解液はプロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク株式会社、京都、日本)と DTT を添加した triple detergent lysis buffer (150mM NaCl, 50mM Tris·HCl (pH8.0), 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate)にて作成した。細胞溶解液は 14,000 rpm、10 分間、 4°C にて遠心分離し、上清を免疫沈降もしくはイムノブロットに用いた。上清は可溶性画分として実験に用いた。沈殿物は 2xSDS sample buffer (0.125M Tris·HCl (pH6.8), 4% SDS, 0.2M DTT, 20% glycerol, 0.001% bromophenol blue)を用いて再懸濁し 10 分間煮沸し得られた懸濁液を不溶性画分とした。実験では、約 1×10^4 の細胞から約 $10\mu\text{g}$ のタンパク量が可溶性画分として得られた。イムノブロット解析には $10\mu\text{g}$ の可溶性画分を各レーン (lane) に流した。不溶性画分はタンパク濃度を測定する事が不可能であったため、 1×10^4 細胞 ($10\mu\text{g}$ 相当) にあたるおおよその量を各 lane に流した。

免疫沈降法において、細胞溶解液は Protein-G agarose (Invitrogen™, Life Technologies, Corp., Carlsbad, CA, USA) および適切な抗体とともに NET-Gel Buffer (150mM NaCl, 50mM Tris·HCl (pH7.5), 0.1% Nonidet P-40, 1mM EDTA, 0.25% gelatin) 中にて 4°C 、4時間以上インキュベートした。Protein-G agarose beads に結合した複合体は 6 回洗浄後、6xSDS sample buffer (0.35M Tris·HCl (pH6.8), 10% SDS, 0.6M DTT, 30% glycerol, 0.012% bromophenol blue)

に懸濁した。

免疫沈降サンプルもしくは細胞可溶化サンプルは SDS-PAGE を行なった後、polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Hybond-P)(GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)へ転写した。 β -アクトチン抗体(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)を用いたイムノブロットによってゲルに流された各サンプルのタンパク量が一定である事を確認した。イムノブロットおよび immunofluorescence analysis (IFA)に用いた抗体は以下の通りである;抗 FLAG ポリクローナル抗体(F7425)、抗 FLAG モノクローナル抗体(F3165)(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)、抗ビメンチン抗体(sc-6260)、抗 DnaJB6 (Hsp40)抗体(sc-100710)、抗 HDAC6 抗体(sc-11420) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)、抗 γ -チューブリン抗体(ab11316)、抗ユビキチン抗体(ab7780) (Abcam plc., Cambridge, UK)、抗 p62 抗体(PM045) (Medical & Biological Laboratory Co., LTD., Nagoya, Japan)。Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies 及び発光試薬(ECL-prime) は GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK にて購入した。抗トランスグルタミナーゼ抗体(BT-621)は Biomedical Technologies Inc., MA, USA にて購入した。抗 RB 抗体(554136)は BD Pharmingen, BD Biosciences, CA, USA にて購入した。化学発光シグナルは化学発光イメージアナライザー(LAS-3000)(富士フイルム株式会社、東京、日本)にて検出した。

Immunofluorescence analysis (IFA)

IFA する細胞はカバーガラス(松浪硝子工業株式会社、大阪、日本)の上に培養し、4% paraformaldehyde (PFA)、室温 5 分、もしくは冷メタノール(γ -チューブリン染色用)、 -20°C 20 分にて固定した。固定後、0.1% Nonidet P-40/phosphate buffered saline (PBS)にて膜透過処

理し 5%脱脂乳にてブロッキングを行なった。サンプルは各種説明書従って希釈した一次抗体でインキュベートした。Alexa Fluor® 488 もしくは 546 標識二次抗体は Molecular Probes®、Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA にて購入した。蛍光顕微鏡 (Axiovert200 及び AxioVision) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) もしくは共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP2 AOBS, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて解析した。

化学阻害剤

阻害剤はトランスフェクション 24 時間後、培地に加えた。24 時間インキュベーション後、細胞はタンパク抽出用に溶解もしくは IFA 用に固定した。ノコダゾール (Nocodazole) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), MG132 (和光純薬工業株式会社、大阪、日本)、ciliobrevin D (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)、tubacin (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Dallas, TX, USA) らは商業的に購入し、Dimethyl sulfoxide (DMSO) にて可溶化しそれぞれ 10 μ M、10 μ M、20 μ M、10 μ M を作用濃度とした。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多数のご指導と適切なお助言を頂きました京都大学ウイルス研究所の酒井博幸先生、立花誠先生に深く感謝の意を表し、暑く御礼申し上げます。また、貴重な意見を戴きました京都大学ウイルス研究所の土方誠先生、京都大学生命科学研究科の酒巻和弘先生、元京都大学ウイルス研究所(現独立行政法人理化学研究所基幹研究所)の眞貝洋一先生、元京都大学ウイルス研究所(現千葉工業大学附属総合研究所)の下遠野邦忠先生、京都大学ウイルス研究所がん遺伝子研究分野の皆様にも深く感謝致します。

引用文献

- Bedell, M.A., Hudson, J.B., Golub, T.R., Turyk, M.E., Hosken, M., Wilbanks, G.D., Laimins, L.A., 1991. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* 65, 2254-2260.
- Bell, I., Martin, A., Roberts, S., 2007. The E1^{E4} protein of human papillomavirus interacts with the serine-arginine-specific protein kinase SRPK1. *J Virol* 81, 5437-5448.
- Bettencourt-Dias, M., Glover, D.M., 2007. Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 451-463.
- Doorbar, J., 2005. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S7-15.
- Doorbar, J., Elston, R.C., Naphine, S., Raj, K., Medcalf, E., Jackson, D., Coleman, N., Griffin, H.M., Masterson, P., Stacey, S., Mengistu, Y., Dunlop, J., 2000. The E1^{E4} protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. *J Virol* 74, 10081-10095.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., Crawford, L., 1991. Specific interaction between HPV-16 E1^{E4} and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352, 824-827.
- Doorbar, J., Foo, C., Coleman, N., Medcalf, L., Hartley, O., Prospero, T., Naphine, S., Sterling, J., Winter, G., Griffin, H., 1997. Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity

synthetic Fabs to E4. *Virology* 238, 40-52.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., Stanley, M.A., 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5, F55-70.

Egawa, K., 1994. New types of human papillomaviruses and intracytoplasmic inclusion bodies: a classification of inclusion warts according to clinical features, histology and associated HPV types. *Br J Dermatol* 130, 158-166.

Fang, L., Budgeon, L.R., Doorbar, J., Briggs, E.R., Howett, M.K., 2006. The human papillomavirus type 11 E1^{E4} protein is not essential for viral genome amplification. *Virology* 351, 271-279.

Genther, S.M., Sterling, S., Duensing, S., Münger, K., Sattler, C., Lambert, P.F., 2003. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 77, 2832-2842.

Goldberg, A.L., 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-899.

Howley, P.M., 1996. Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication, in: N, F.B., M, K.D., M, H.P. (Eds.), *Fields Virology*, 3 ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 2045-2076.

Hummel, M., Hudson, J.B., Laimins, L.A., 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol* 66, 6070-6080.

- Inoue, M., 2008. [Protection against uterine cervical cancer by HPV vaccines].
Uirusu 58, 155-163.
- Ivaska, J., Pallari, H.M., Nevo, J., Eriksson, J.E., 2007. Novel functions of vimentin
in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 313, 2050-2062.
- Johansson, C., Schwartz, S., 2013. Regulation of human papillomavirus gene
expression by splicing and polyadenylation. *Nat Rev Microbiol* 11,
239-251.
- Johnston, J.A., 2006. The Aggresome: Proteasomes, Inclusion Bodies, and Protein
Aggregation., in: Uversky, V.N., Fink, A.L. (Eds.), *Protein Misfolding,
Aggregation, and Conformational Diseases*. Springer US, pp. pp 175-222.
- Johnston, J.A., Ward, C.L., Kopito, R.R., 1998. Aggresomes: a cellular response to
misfolded proteins. *J Cell Biol* 143, 1883-1898.
- Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., Sakai, H., 2012. Productive Lifecycle of
Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial
Differentiation. *Front Microbiol* 3, 152.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., Yao, T.P., 2003. The
deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in
response to misfolded protein stress. *Cell* 115, 727-738.
- Kines, R.C., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Day, P.M., 2009. The initial
steps leading to papillomavirus infection occur on the basement
membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106,
20458-20463.

- Kopito, R.R., 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10, 524-530.
- McBride, A.A., Oliveira, J.G., McPhillips, M.G., 2006. Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell Cycle* 5, 1499-1502.
- McIntosh, P.B., Martin, S.R., Jackson, D.J., Khan, J., Isaacson, E.R., Calder, L., Raj, K., Griffin, H.M., Wang, Q., Laskey, P., Eccleston, J.F., Doorbar, J., 2008. Structural analysis reveals an amyloid form of the human papillomavirus type 16 E1^{E4} protein and provides a molecular basis for its accumulation. *J Virol* 82, 8196-8203.
- Moody, C.A., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., Laimins, L.A., 2007. Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19541-19546.
- Moody, C.A., Laimins, L.A., 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10, 550-560.
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Grace, M., Huh, K., 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78, 11451-11460.
- Nakahara, T., Nishimura, A., Tanaka, M., Ueno, T., Ishimoto, A., Sakai, H., 2002. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol* 76, 10914-10920.
- Nakahara, T., Peh, W.L., Doorbar, J., Lee, D., Lambert, P.F., 2005. Human

- papillomavirus type 16 E1^{E4} contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J Virol* 79, 13150-13165.
- Nguyen, M.L., Nguyen, M.M., Lee, D., Griep, A.E., Lambert, P.F., 2003. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol* 77, 6957-6964.
- Ozbun, M.A., Meyers, C., 1997. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 71, 5161-5172.
- Parkin, D.M., Bray, F., 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/11-25.
- Peh, W.L., Brandsma, J.L., Christensen, N.D., Cladel, N.M., Wu, X., Doorbar, J., 2004. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol* 78, 2142-2151.
- Raj, K., Berguerand, S., Southern, S., Doorbar, J., Beard, P., 2004. E1^{E4} protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol* 78, 7199-7207.
- Roberts, S., Hillman, M.L., Knight, G.L., Gallimore, P.H., 2003. The ND10 component promyelocytic leukemia protein relocates to human papillomavirus type 1 E4 intranuclear inclusion bodies in cultured keratinocytes and in warts. *J Virol* 77, 673-684.
- Rodriguez-Gonzalez, A., Lin, T., Ikeda, A.K., Simms-Waldrip, T., Fu, C., Sakamoto,

- K.M., 2008. Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation. *Cancer Res* 68, 2557-2560.
- Sakakibara, N., Chen, D., McBride, A.A., 2013. Papillomaviruses use recombination-dependent replication to vegetatively amplify their genomes in differentiated cells. *PLoS Pathog* 9, e1003321.
- Satsuka, A., Sakai, H., 2008. [Life cycle of HPV governed by the differentiation program of epithelial cell]. *Uirusu* 58, 165-172.
- Sterling, J.C., Skepper, J.N., Stanley, M.A., 1993. Immunoelectron microscopical localization of human papillomavirus type 16 L1 and E4 proteins in cervical keratinocytes cultured in vivo. *J Invest Dermatol* 100, 154-158.
- Thomas, J.T., Hubert, W.G., Ruesch, M.N., Laimins, L.A., 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8449-8454.
- Ueno, T., Sasaki, K., Yoshida, S., Kajitani, N., Satsuka, A., Nakamura, H., Sakai, H., 2006. Molecular mechanisms of hyperplasia induction by human papillomavirus E7. *Oncogene* 25, 4155-4164.
- Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P., Davy, C., Masterson, P.J., Walker, P.A., Laskey, P., Omary, M.B., Doorbar, J., 2004. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1^{E4} protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol* 78, 821-833.

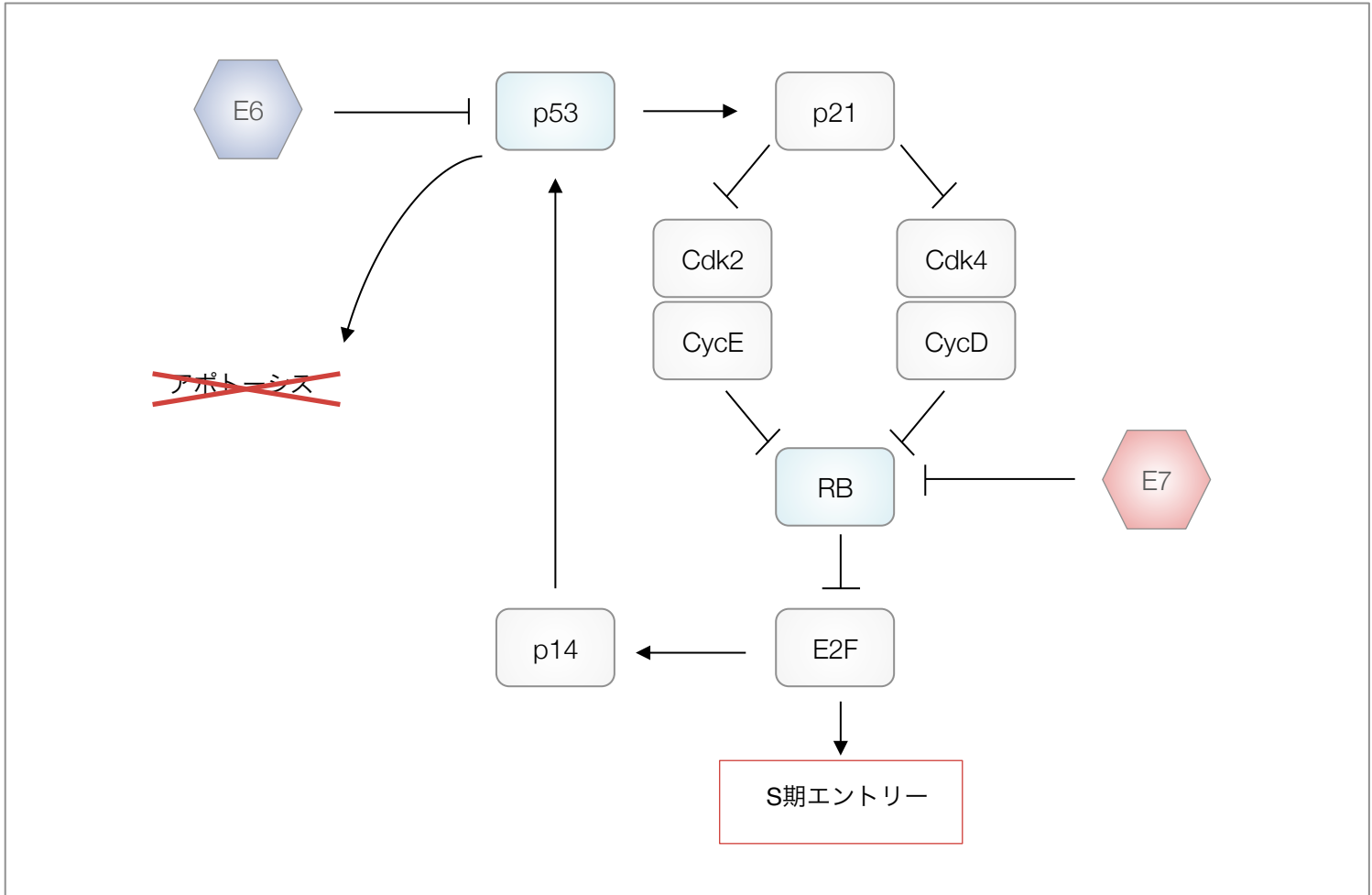
- Wang, Q., Kennedy, A., Das, P., McIntosh, P.B., Howell, S.A., Isaacson, E.R., Hinz, S.A., Davy, C., Doorbar, J., 2009. Phosphorylation of the human papillomavirus type 16 E1^{E4} protein at T57 by ERK triggers a structural change that enhances keratin binding and protein stability. *J Virol* 83, 3668-3683.
- Wileman, T., 2007. Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design? *Annu Rev Microbiol* 61, 149-167.
- Wilson, R., Fehrmann, F., Laimins, L.A., 2005. Role of the E1^{E4} protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 79, 6732-6740.
- Wilson, R., Ryan, G.B., Knight, G.L., Laimins, L.A., Roberts, S., 2007. The full-length E1^{E4} protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. *Virology* 362, 453-460.
- Wójcik, C., DeMartino, G.N., 2003. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 579-589.
- Yugawa, T., Kiyono, T., 2008. [Molecular basis of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses]. *Uirusu* 58, 141-154.
- zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342-350.

図1 HPVの分類

HPV > 120 types			
指向性	リスク度	疾患	型
粘膜	High-risk	子宮頸がん	16, 18
		頭頸部がん	16, 18
	Low-risk	尖圭コンジローマ	6, 11
皮膚	High-risk	皮膚がん	5, 8
	Low-risk	疣贅	1, 2, 4

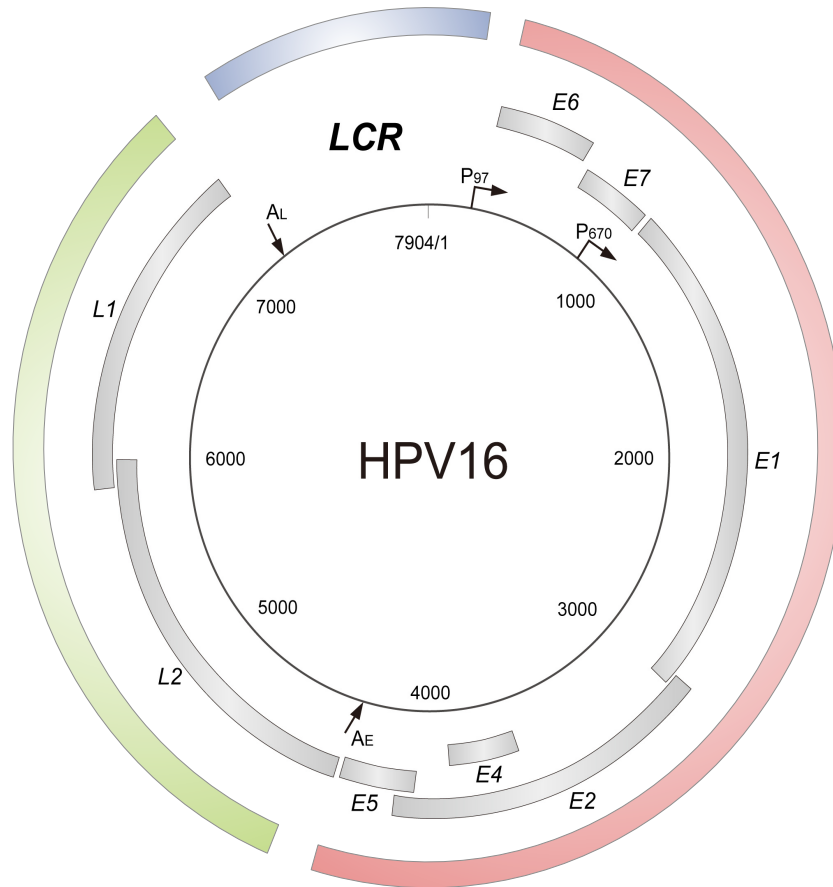
HPVの分類は感染標的となる上皮細胞の指向性によって大別され、悪性化を引き起こしやすいかどうかでHigh-risk型かLow-risk型に分類される。

図2 HPV E6, E7による宿主複製機構の活性化



E2Fが活性化すると、S期エントリーに必要な遺伝子群がONになる。RBはE2Fを抑制する事で、E6はアポトーシスを誘導する事で癌抑制遺伝子産物として機能する。E6, E7はそれぞれp53, RBを分解、抑制する。通常、過剰なE2Fの活性化はp53の活性化を引き起こしアポトーシスを誘導するが、HPV感染細胞ではアポトーシスが誘導されることなく、細胞周期の活性化が持続する。

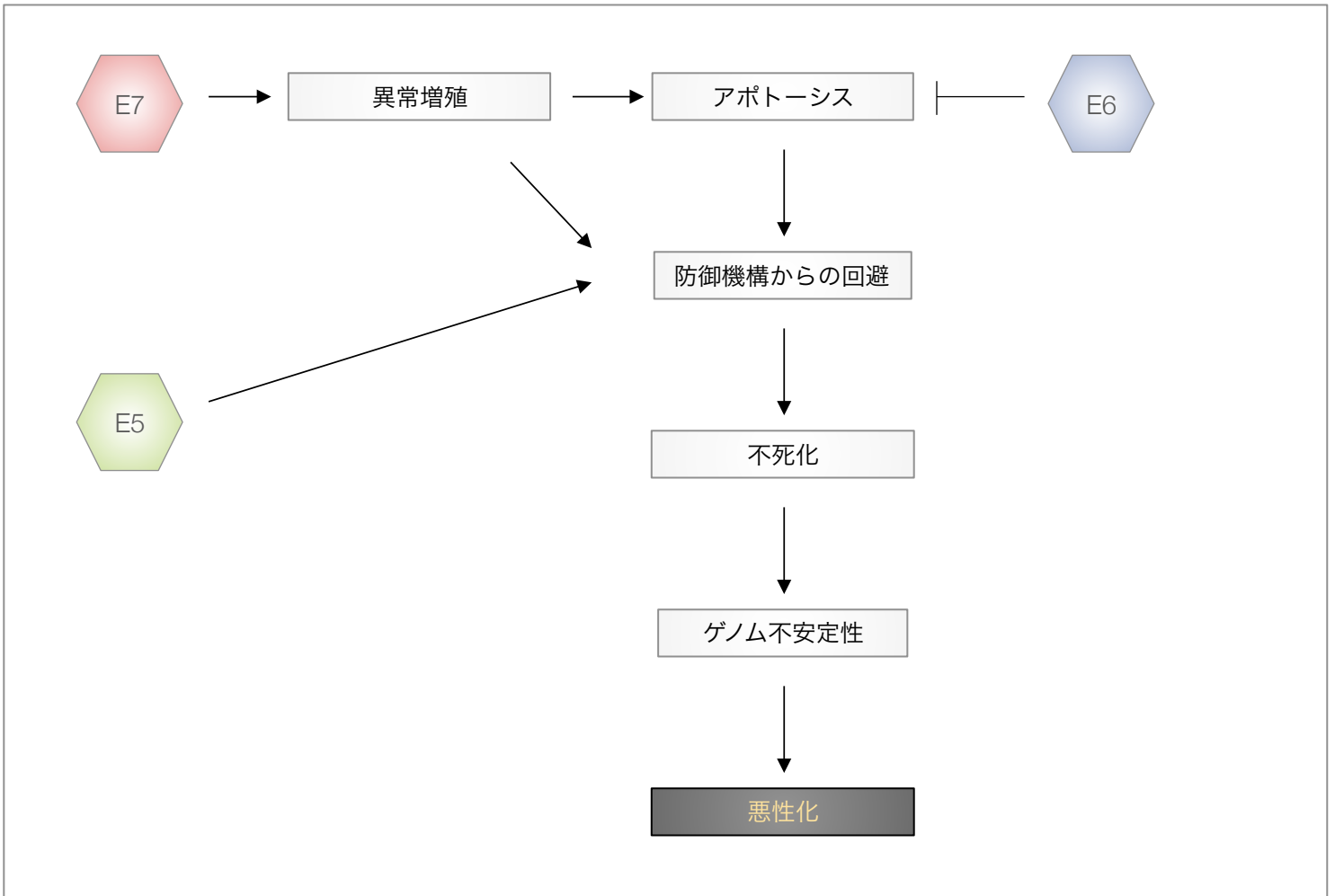
図3 一般的なHPVゲノム構造



制御領域	LCR
初期遺伝子	E6, E7, E1, E2, E4, E5
後期遺伝子	L2, L1

ほとんどのHPVは共通したゲノム構造を有する。HPVゲノムは二本鎖環状構造をとり、各ORFは二本鎖DNAの片側にのみ存在する。各遺伝子は転写調節領域 (Long control region; LCR)、非構造遺伝子群 (初期遺伝子群 : E6, E7, E1, E2, E4, E5) と非構造遺伝子群 (後期遺伝子 : L2, L1) が存在する。LCR内に複製開始点 (origin)、初期プロモーター (P97) およびそれらの調節領域が存在する。E7内に後期プロモーター (P670) が存在する。

図4 HPVウイルス因子による発がんメカニズムのモデル図

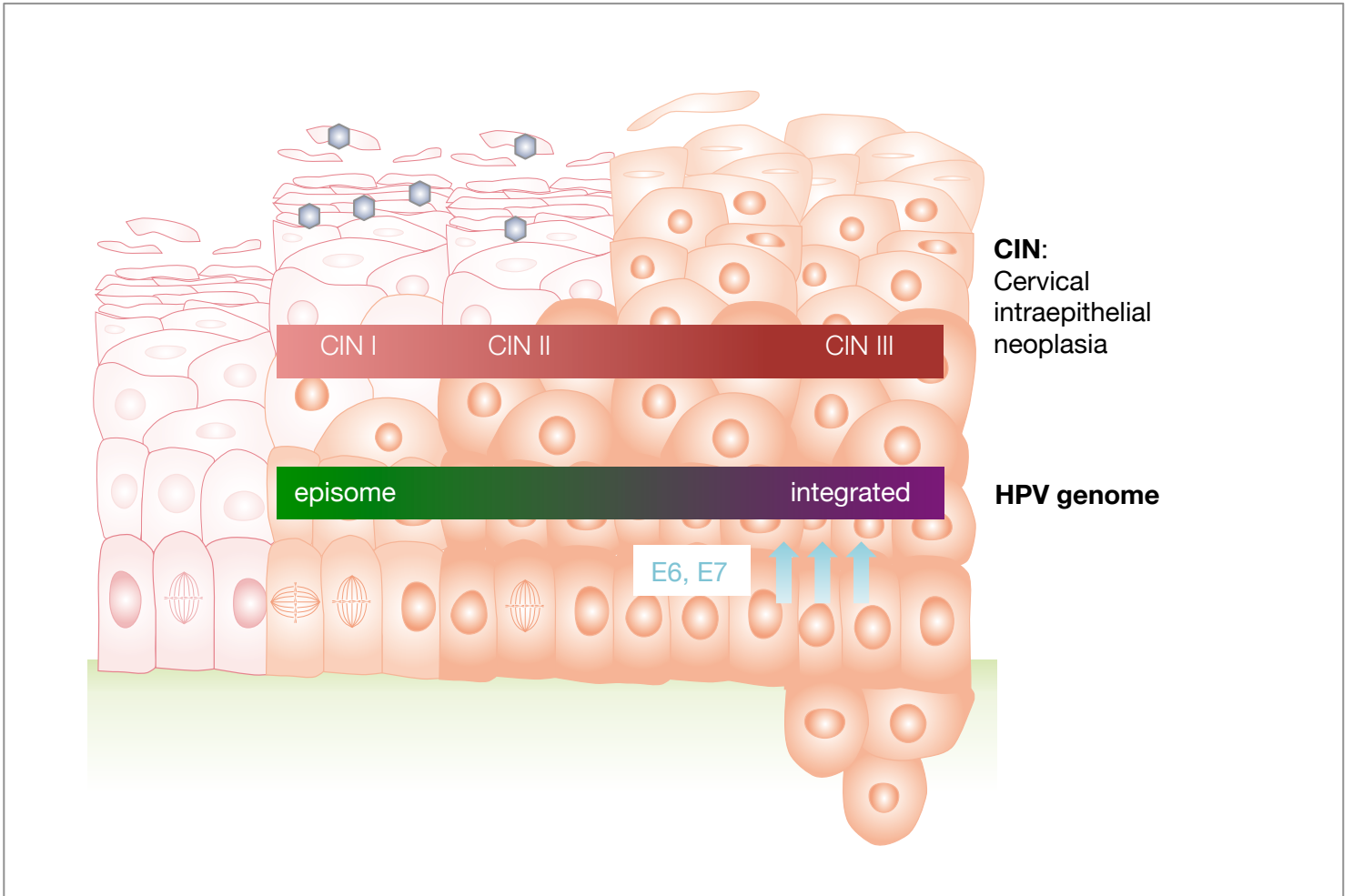


E7による過剰な増殖誘導はアポトーシスを誘導するが、E6の機能によって抑制される。ここには示していないが、E6, E7は細胞分化の抑制を引き起こす事も知られている。E6とE7が協調的に機能する事で不死化を誘導する。E5はE6, E7の機能を補助的に促進させると考えられている。E6とE7が増殖、アポトーシス、不死化、ゲノム不安定性に関わる制御因子を標的にする事で細胞のトランスフォーメーション及び悪性化を誘導する。

図5 HPVウイルス因子の機能

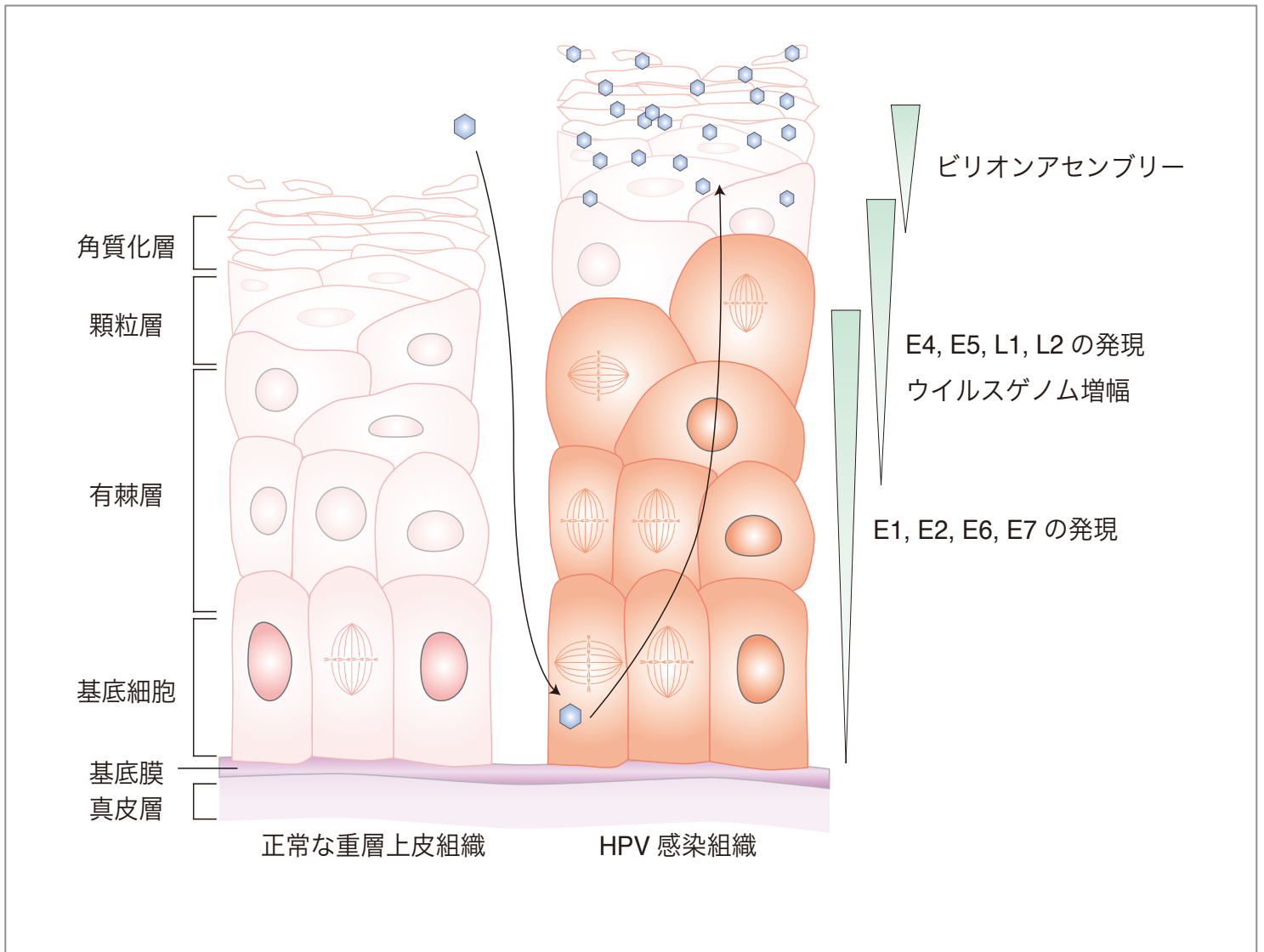
ウイルス生活環における機能	活性	標的因子
E1		
ウイルスゲノムの複製	DNA binding活性, Helicase, ATPase RPA, topoisomerase, polymerase alpha-primase	
E2		
ウイルス遺伝子の転写	転写活性/転写抑制, DNA binding 活性	Brd4, ChlK4
ウイルスゲノムの複製	分裂時のDNA分配	
ウイルスゲノム維持		
E6		
宿主DNA複製装置の再活性化	種々の細胞性因子との相互作用	p53 , ADA3, p300/CBP, E6AP, SP1, cMyc, NFX1-91, TERT
増殖、不死化、アポトーシス 阻害		FAK, FADD, Caspase 8, BAX, BAK, IRF3, PDZ proteins
ゲノム維持		
E7		
宿主DNA複製装置の再活性化	種々の細胞性因子との相互作用	RB , p107, p130, HDAC, E2F6, p21, p27, CDK/cyclin, ATM, ATR
増殖、不死化、アポトーシス 阻害		Gamma-tubulin
ゲノム維持		
E4		
?	ケラチンネットワーク崩壊 G2/M細胞周期停止	Cytokeratin8/18,
E5		
シグナル伝達系への影響	レセプターの半減期に作用	EGFR, PDGFR, V-ATPase, MHC1, TRAIL receptor, FAS receptor
免疫機構からの回避		MHCI
L1		
主要カプシドタンパク質		
L2		
マイナーカプシドタンパク質		

図6 HPVゲノムの状態と感染組織の悪性度には相関がある



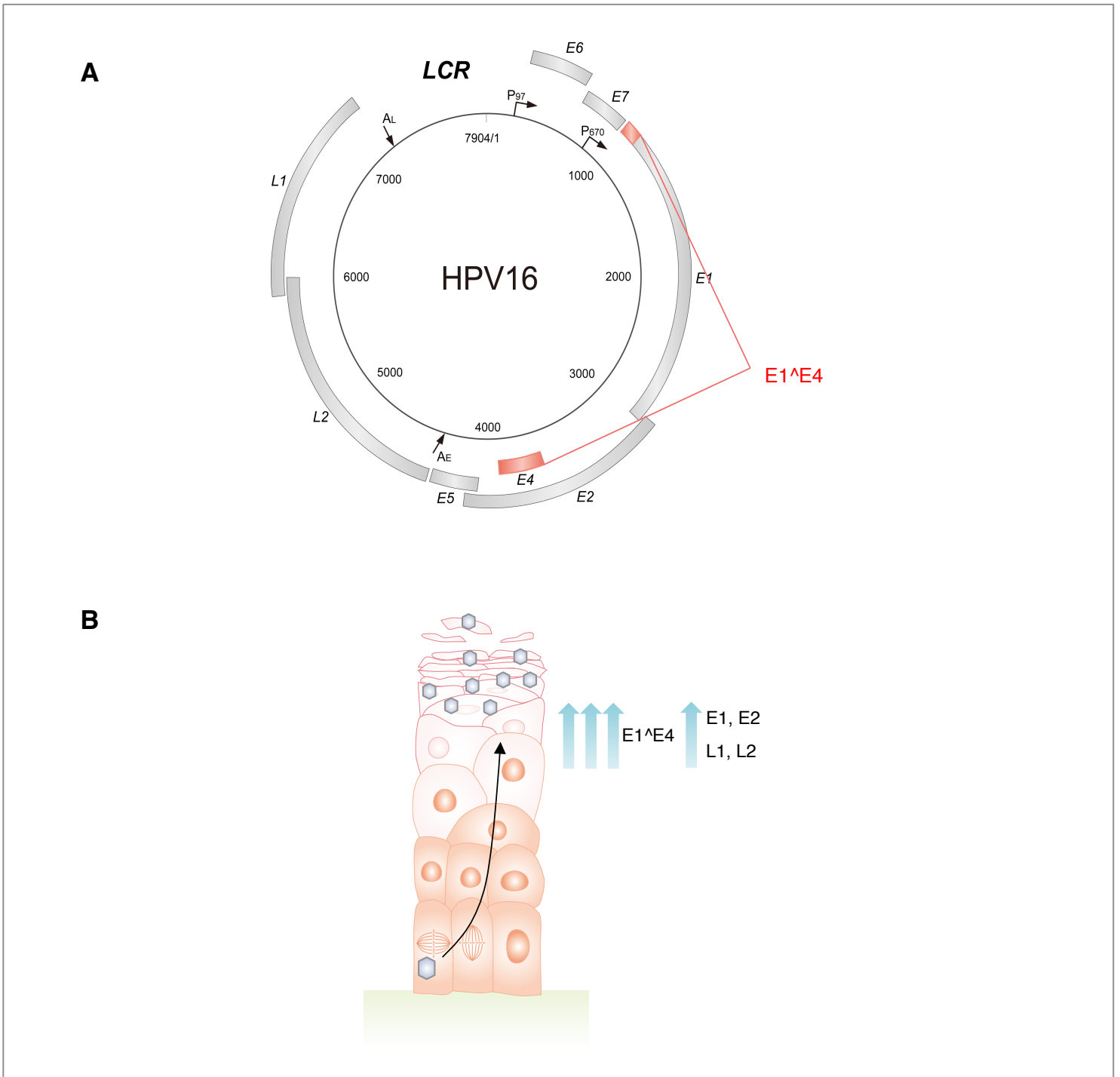
子宮頸部における組織の悪性度は子宮頸部上皮内腫瘍（CIN; cervical intraepithelial neoplasia）にて評価される。CINⅢまで進んだような感染組織では多くの場合、E6, E7の発現亢進が見られ、その時のゲノムの状態はE6, E7が保存されるようにインテグレーションされている。このため、HPVゲノムの状態と子宮頸がんの悪性度には相関があると考えられている。

図7 ライフサイクルの進行は宿主上皮細胞の分化に依存する



正常な重層扁平上皮組織（左）は基底細胞のみが複製能を有する。基底細胞が分裂して基底膜を離れると細胞は分化を開始する。基底細胞が分裂するごとに上方へ押し上げられ、それとともに分化を進行させる。上皮表層で終末分化を遂げ、角質化した死細胞は剥離する（垢）。HPV感染は上皮の微傷を通して上皮基底細胞特異的に起こる（右）。感染した基底細胞におけるウイルスゲノムメンテナンス確立の後、ウイルス因子の発現によりparabasalな細胞も増殖能を有し、結果組織の過形成を誘導する。ウイルスDNA増幅および後期遺伝子の発現は分化の進んだ上皮組織上層で起きる。最も分化の進んだ表層細胞でビリオンが形成され、細胞の剥離とともに外界へビリオンが放出される。

図8 HPV E1^{E4}



A. E1^{E4}転写産物は、E1のN末5アミノ酸分の配列がE4配列内のスプライスアクセプターサイトへスプライスされる事で生ずる。E1^{E4}転写産物の発現制御は初期プロモーターから後期プロモーターへのプロモータースイッチ、初期ポリAサイトの抑制、E4配列内に存在するスプライス抑制エレメントの抑制、などのメカニズムが明らかになっており、それらのバランスが細胞の分化状態によって制御を受けると考えられている。

B. E1^{E4}の高発現は感染部位上層、後期遺伝子産物の発現や後期ライフサイクルの進行と同時期である事から、E1^{E4}はHPV後期ライフサイクルに何らかの寄与をする事が示唆されている。

図9 E1^E4の機能

・ ウイルスライフサイクルへの関与：議論中

		CRPV	HPV31	HPV16	HPV18	HPV11
初期	HPVゲノム維持			✓	✓	
後期	HPV DNA増幅	✓	✓	✓	✓	✗
	S期 維持		✓	✓		
	後期遺伝子発現	✓			✓	

・ 宿主因子との相互作用

Cytokeratin 8/18	(構造タンパク質)
Cyclin A/B	(細胞周期制御)
E4-DBP	(RNA helicase)
SRPK1	(mRNA metabolism代謝)
ミトコンドリア	(代謝、アポトーシス)

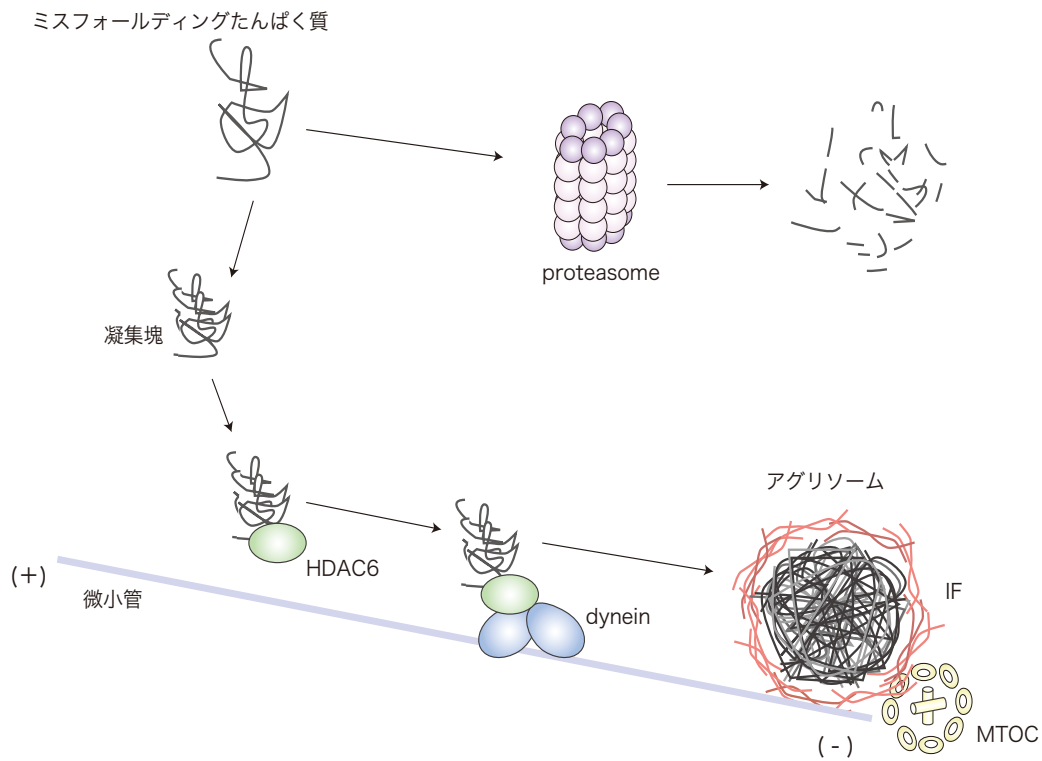
・ 細胞周期G₂/M arrest誘導

・ 自己凝集：アミロイド様構造

E1^E4のウイルスライフサイクルへの関与は現在議論中である。この解析には、HPVウイルスのライフサイクルを正確に・簡便に・安定して再現できる系の確立が望まれる。

いくつかの宿主因子との相互作用の報告はあるものの、続報が発表されない状況である。また、E1^E4発現による細胞周期G₂/M arrestの誘導、E1^E4タンパク質のアミロイド様自己凝集塊の形成が報告されているが、いずれもHPVライフサイクルにおける生物学的意義は不明なままである。

図10 アグリソーム (aggresome) は凝集体の集積所として機能する構造である

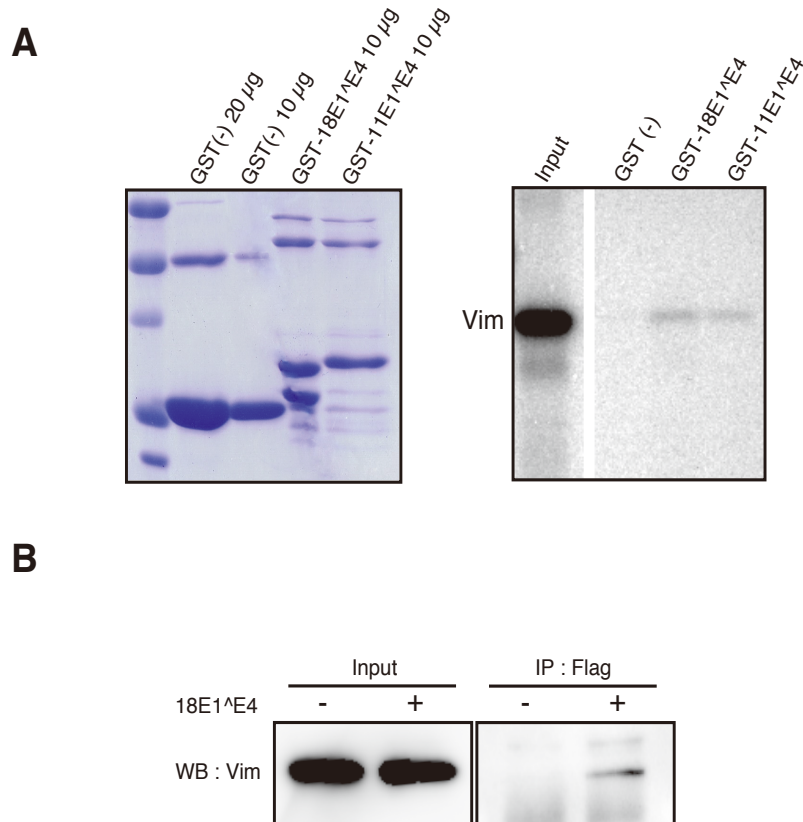


Aggresome

- ・ Hsp40, HDAC6, p62, Ub化タンパク質等が含まれる
- ・ MTOC近傍に形成
- ・ vimentinなどの中間径フィラメント (IF) に囲まれる

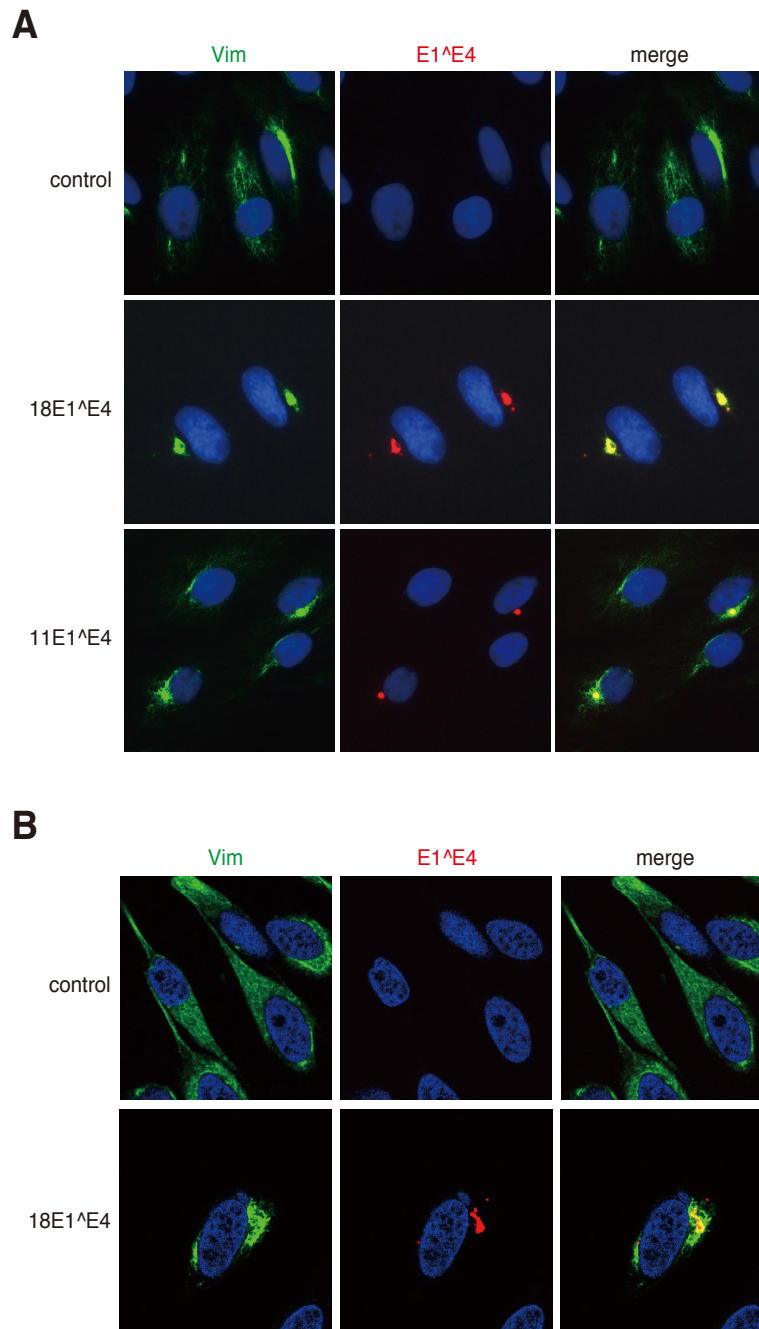
(AJ Berk, Oncogene, 2005)より改変

図11 18E1^E4とVimentinのin vitro相互作用



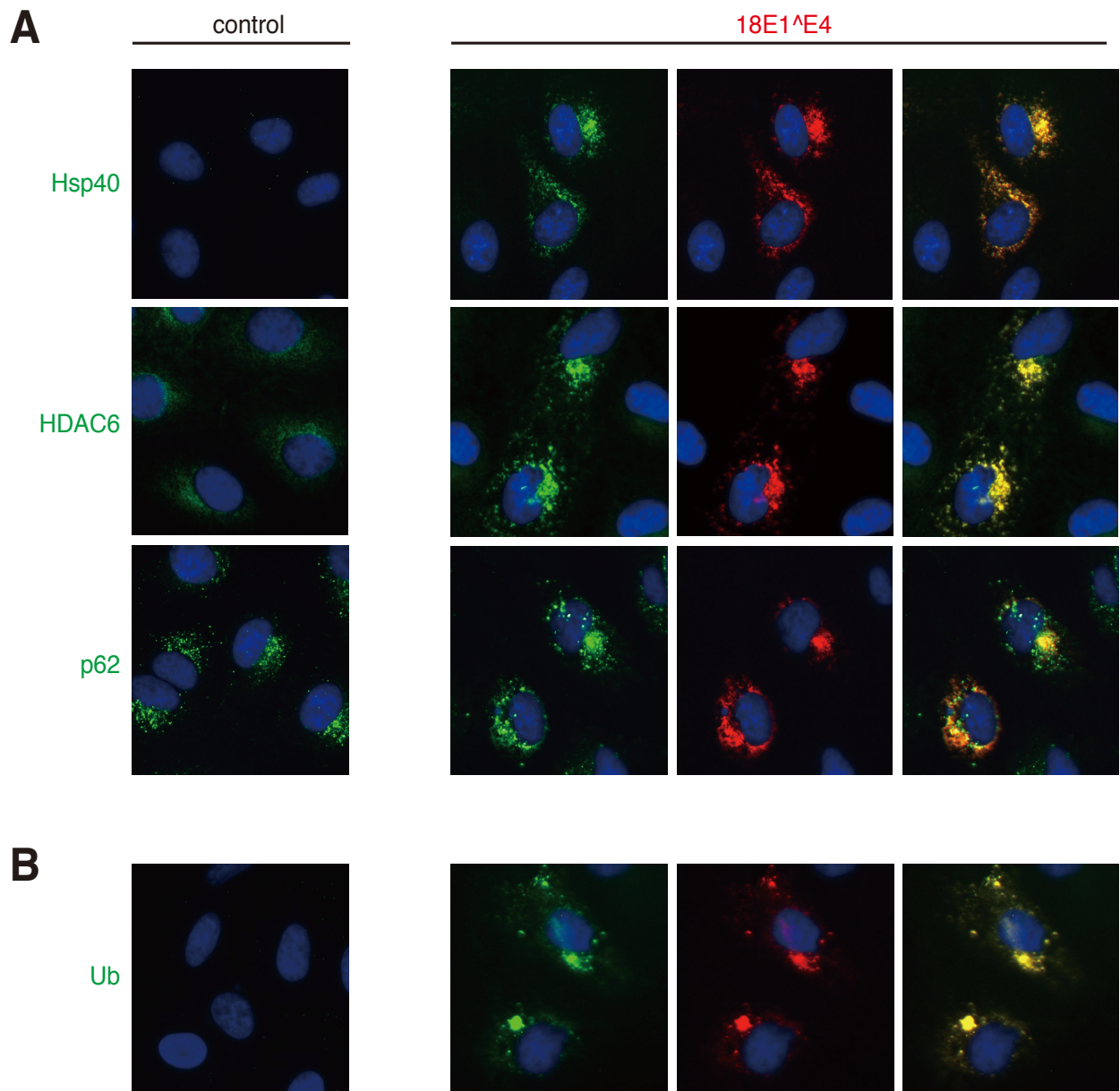
- A. GST-E1^E4とin vitro転写・翻訳ビメンチンとでGSTプルダウンアッセイを行なった。この実験に用いたGST融合タンパク質はCoomassie染色 (Coomassie Brilliant Blue; CBB staining) にて確認した (左パネル)。GSTタンパク質 (10 μ g) と結合したビメンチンは右パネルに示した。『Input』は各アッセイに用いたin vitro転写・翻訳ビメンチンを示している。
- B. 過剰発現させたFLAG-18E1^E4と内在性ビメンチンの結合を検討した。293T細胞にFLAG-18E1^E4発現プラスミドをトランスフェクションし、細胞抽出液を抗FLAG抗体で免疫沈降後、抗ビメンチン抗体を用いてイムノブロットした。

図12 18E1^{E4}とVimentinのin vivo相互作用



- A. CVI細胞における内在性ビメンチン (Vim, 緑) とFLAG-E1^{E4} (E1^{E4}, 赤) の細胞内局在。核はDAPIで染色した。18E1^{E4}凝集体において、ビメンチンとの共局在は大多数の細胞 (≧約70%) で観察された。
- B. 共焦点顕微鏡を用いた解析。HeLa細胞にてFLAG-18E1^{E4}凝集体 (赤) はビメンチン (緑) に周囲を取り囲まれている像が得られた。

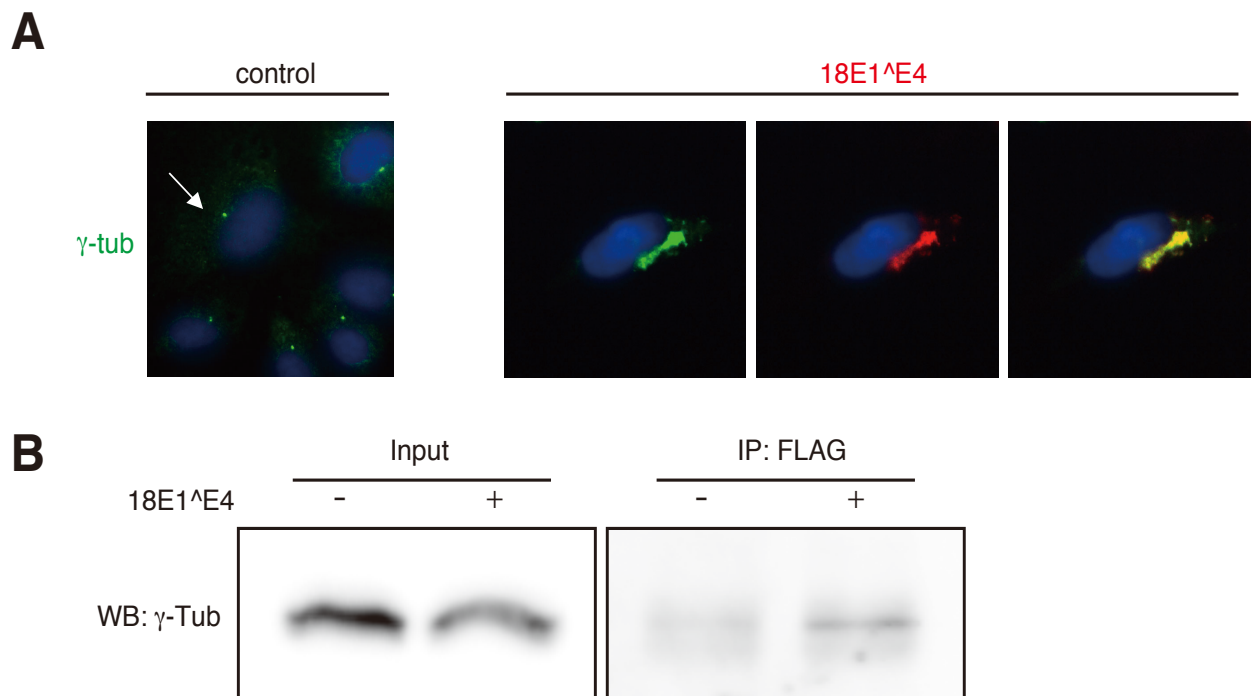
図13 18E1^{E4}凝集体とアグリソーム関連因子のin vivo相互作用



A. CV1細胞におけるアグリソーム関連因子（Hsp40，HDAC6，p62：緑）とFLAG-E1^{E4}（E1^{E4}，赤）の細胞内局在。核はDAPIで染色した。Controlはトランスフェクションにおけるmockを示す。

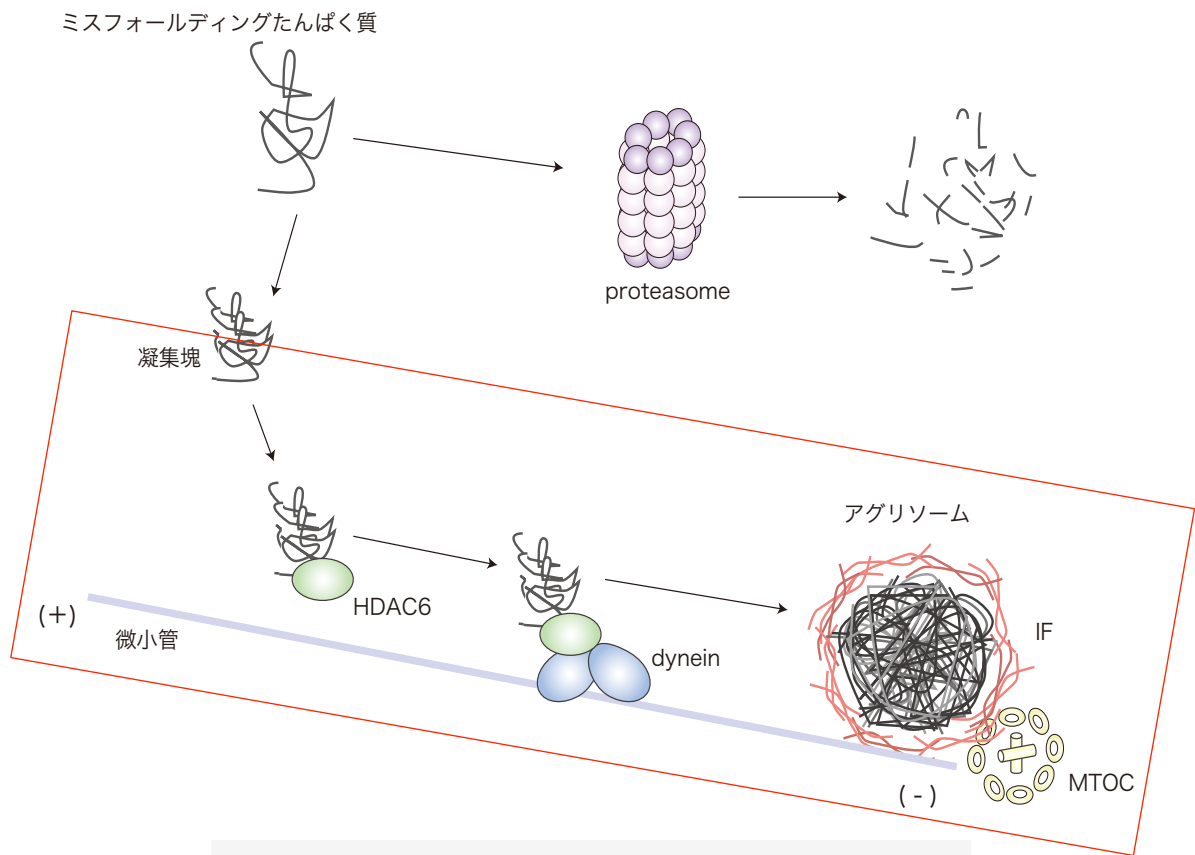
B. CV1細胞内でユビキチン化タンパク質（Ub，緑）はFLAG-18E1^{E4}凝集体（赤）に蓄積した。

図14 18E1^E4凝集体とMTOC (microtubule organizing center: 微小管形成中心)の相互作用



- A. CV1細胞における18E1^E4凝集体（赤）とMTOC（微小管形成中心；microtubule organizing center：緑）の局在。MTOCは抗 γ -tubulin抗体で染色すると核の近くの小さな点として検出される（control, 矢印）。18E1^E4発現細胞では正常なMTOC構造が認められなかった。
- B. γ -tubulinと18E1^E4のin vitro相互作用。FLAG-18E1^E4発現293T細胞の細胞抽出液を抗FLAG抗体で免疫沈降後、 γ -tubulin抗体でイムノブロット解析した。Aで見られた18E1^E4凝集体と γ -tubulinの共局在は、直接的な相互作用も関与している事が示唆された。

図15 アグリソーム形成メカニズム

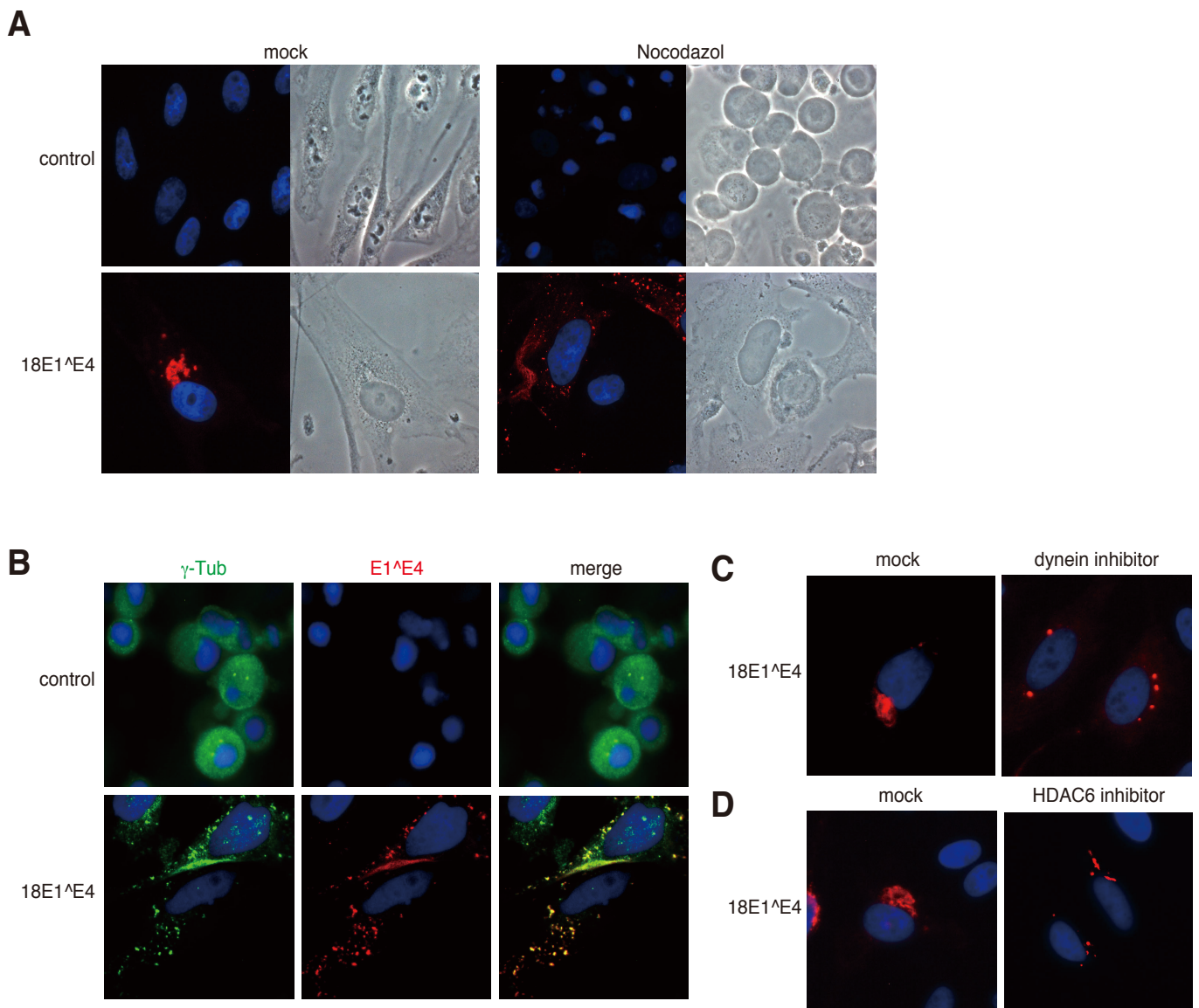


Aggresomeの形成メカニズム

- ・ HDAC6, dyneinを介した微小管輸送依存的
- ・ nocodazole処理によって形成が阻害される

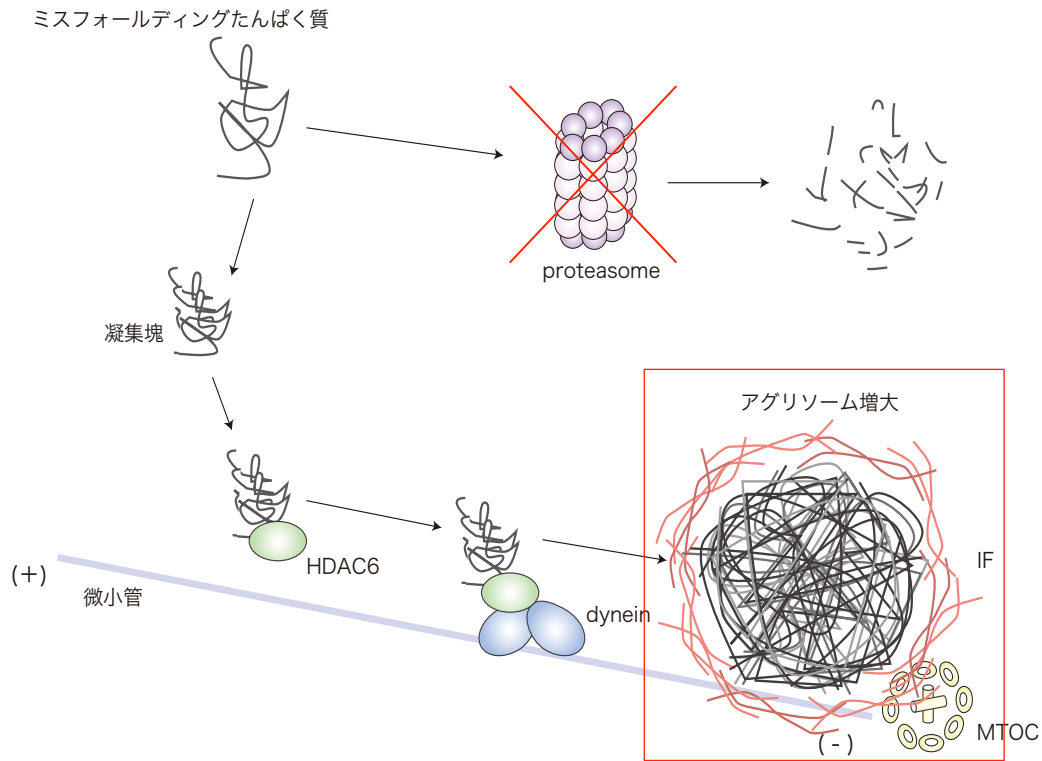
(AJ Berk, Oncogene, 2005)より改変

図16 18E1^E4凝集体形成はdynein, HDAC6を介した微小管輸送依存的だった



- A. ノコダゾール処理は18E1^E4凝集体形成を阻害した。HeLa細胞にFLAG-18E1^E4発現プラスミドを導入し、トランスフェクション24時間後にノコダゾール (10 μ M) 処理をした。処理24時間後、細胞を4% PFAで固定し、抗FLAG抗体 (赤) で染色した。ノコダゾール処理した18E1^E4発現細胞では、大きな凝集体形成が抑制され小さな凝集体が細胞質内を分散した。
- B. Aと同条件の細胞で抗 γ -tubulin抗体 (緑) 染色も加えて行った。ノコダゾール処理による凝集体形成阻害後も γ -tubulinは小さな18E1^E4凝集体と共局在した。
- C. 18E1^E4凝集体に対するciliobrevin D (ダイニン阻害剤) の影響。
- D. 18E1^E4凝集体に対するtubacin (HDAC6阻害剤) の影響。
- C, D共に18E1^E4凝集体形成を阻害した。これらの結果はE1^E4凝集体形成がダイニン、HDAC6を介した微小管輸送依存的であることを示唆した。

図17 プロテアソーム阻害によってアグリソームは増大する



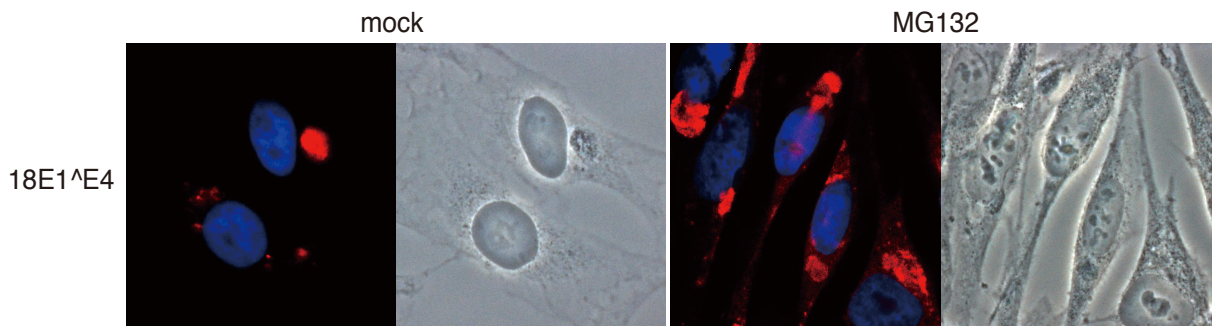
プロテアソーム (Proteasome)

- ・ MTOC周辺、細胞骨格ネットワーク近傍、小胞体表面に局在
- ・ プロテアソーム阻害はアグリソーム形成を増大させる

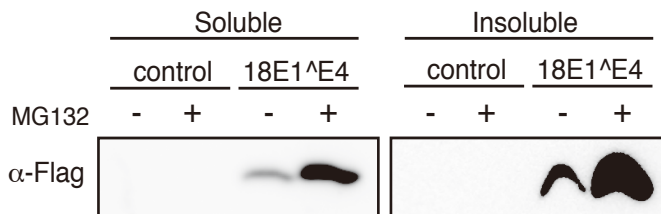
(AJ Berk, *Oncogene*, 2005)より改変

図18 18E1^ΔE4凝集体形成プロテアソーム阻害によって増大した

A



B



C

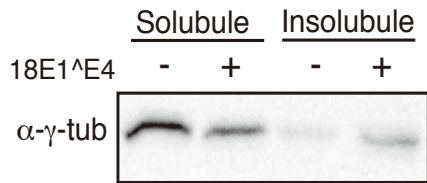
		Mock	MG132
E1 ^Δ E4 フラクション	可溶性	+	++
	不溶性	++	++++
凝集体形成		++	++++

E1^ΔE4凝集体の多くが不溶性画分である可能性を示唆

- A. MG132処理は18E1^ΔE4凝集体形成を増大させた。FLAG-18E1^ΔE4導入HeLaは、トランスフェクション24時間後にMG132 (10 μM)で処理した。処理24時間後に4% PFAで固定し、抗FLAG抗体 (赤) にて染色した。
- B. Aと同様に処理した細胞の細胞溶解液の可溶性画分、不溶性画分に関して抗FLAG抗体を用いてイムノブロット解析を行なった。18E1^ΔE4は多くが不溶性画分に検出され、MG132処理によって顕著に検出レベルが増加した。
- C. MG132処理に対してE1^ΔE4の検出される分画の変化と凝集体形成の挙動をまとめた。MG132処理によって凝集体形成が増大し、その時の不溶性画分が顕著に増加した事から、18E1^ΔE4凝集体は主に不溶性画分である可能性が示唆された。

図19 18E1^{E4}は γ -tubulinの検出されるフラクションを変化させた

A



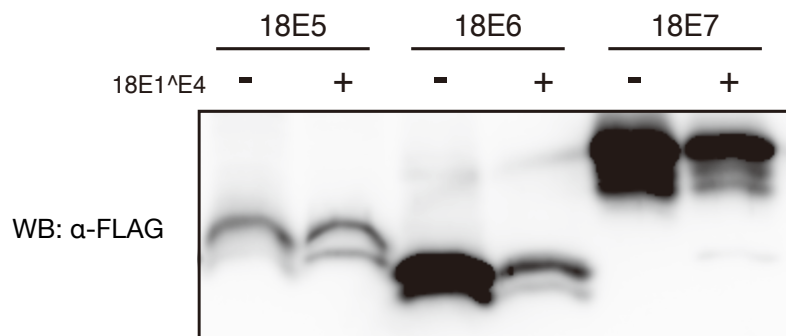
B

	可溶性画分		不溶性画分	
	control	E1 ^{E4} 発現	control	E1 ^{E4} 発現
γ -tub	++	+	-	+
凝集体	-	+	-	++

E1^{E4}アグリソームへの γ -tubulinのリクルート
 →可溶性画分減少・不溶性画分増加の可能性

- A. 18E1^{E4}との相互作用が示された γ -tubulinは、18E1^{E4}発現によって検出される分画に変化が生じる。FLAG-18E1^{E4}導入HeLa細胞の細胞溶解液の可溶性画分、不溶性画分に関して抗 γ -tubulin抗体を用いてイムノブロット解析を行なった。
- B. Aの結果と18E1^{E4}凝集体形成の相関性をまとめた。この結果から、18E1^{E4}凝集体が形成されると、 γ -tubulinは凝集体にリクルートされて、不溶性画分へとフラクションの変化を起こす事が示唆された。

図20 18E1^{E4}による18E6, 18E7の可溶性画分の減少



CV1細胞に18E1^{E4}及びFLAG-18E5, -18E6, もしくは-18E7を共発現させた。トランスフェクション48時間後の細胞の細胞溶解液に関して、可溶性画分を抗FLAG抗体 (FLAG-18E5, -18E6, -18E7の検出) を用いてイムノブロット解析を行なった。18E1^{E4}発現細胞において18E6および18E7の発現量の減少が認められた。

図21 18E1^{E4}による18E6, 18E7の不溶性画分の増加

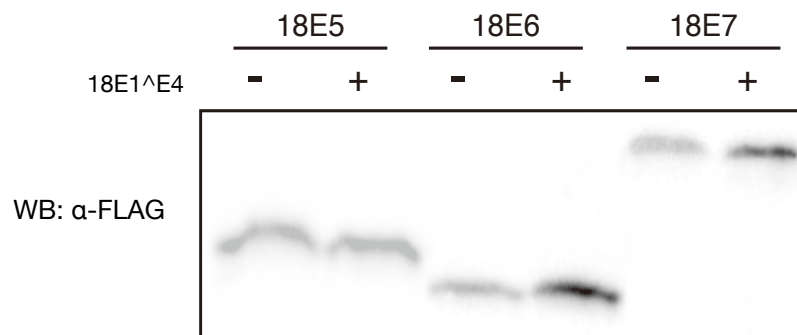
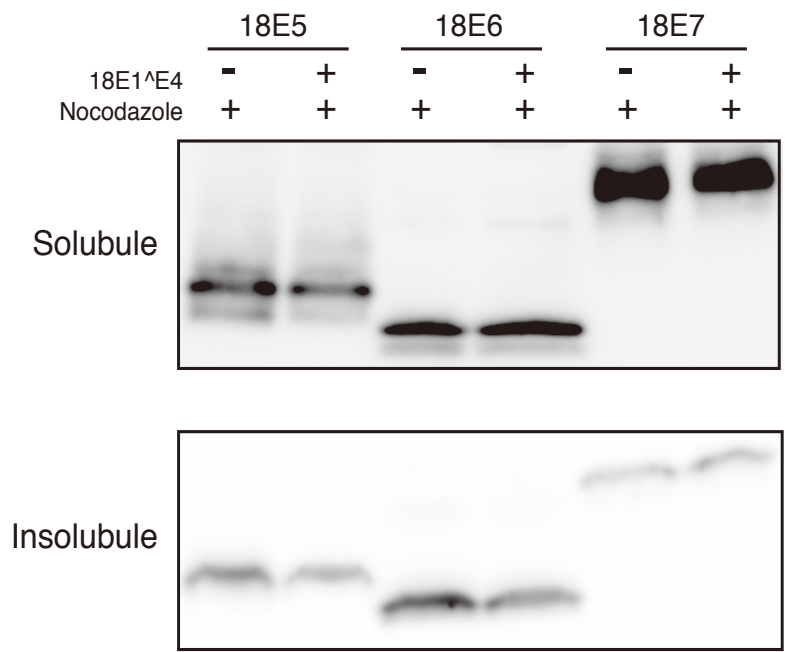


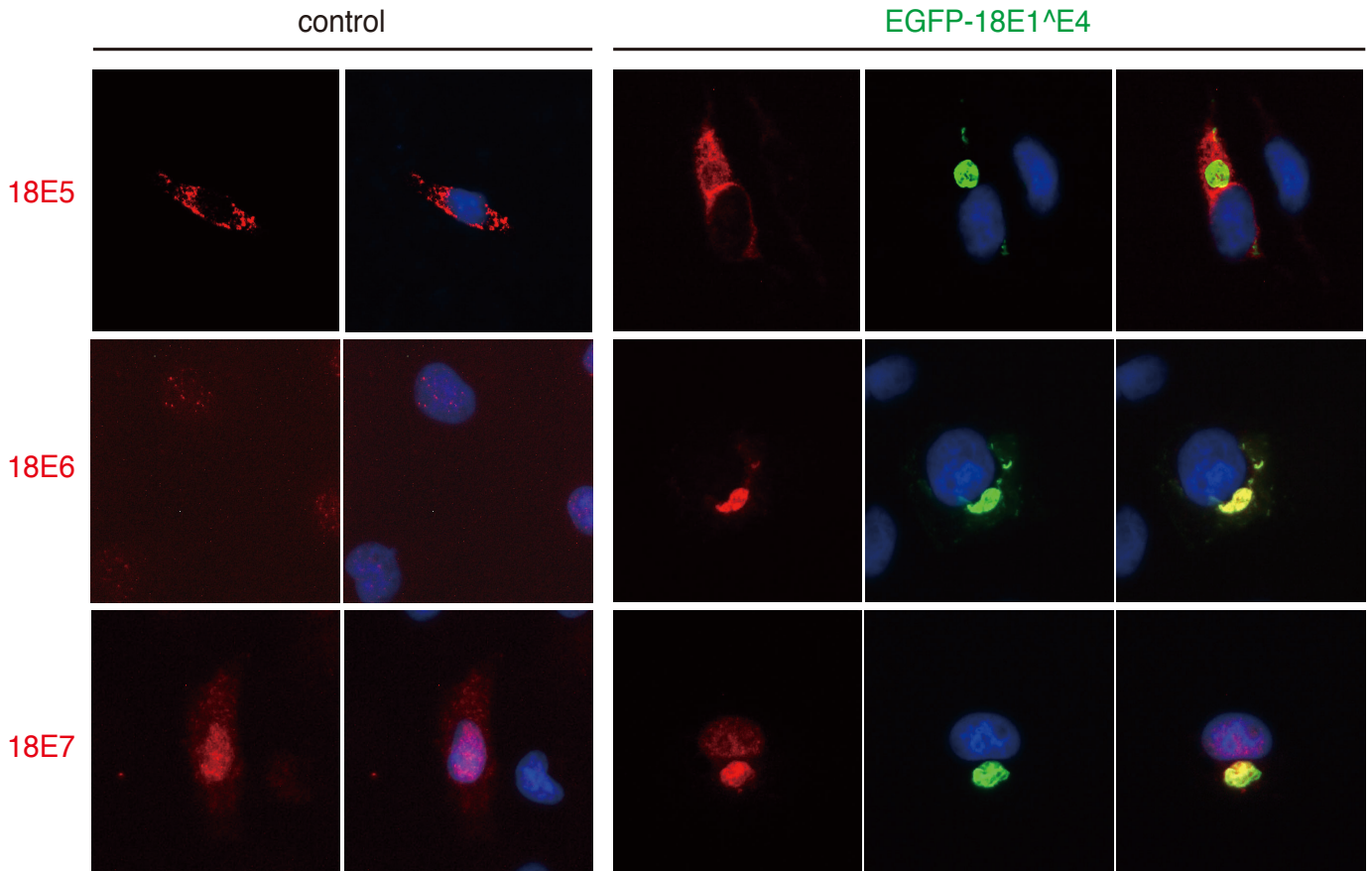
図20と同じ細胞の細胞溶解液に関して、不溶性画分を抗FLAG抗体（FLAG-18E5, -18E6, -18E7の検出）を用いてイムノブロット解析を行なった。18E1^{E4}発現細胞において18E6および18E7の検出量の増加が認められた。

図22 凝集体形成阻害による18E1^E4による18E6, 18E7発現量調節効果の消失



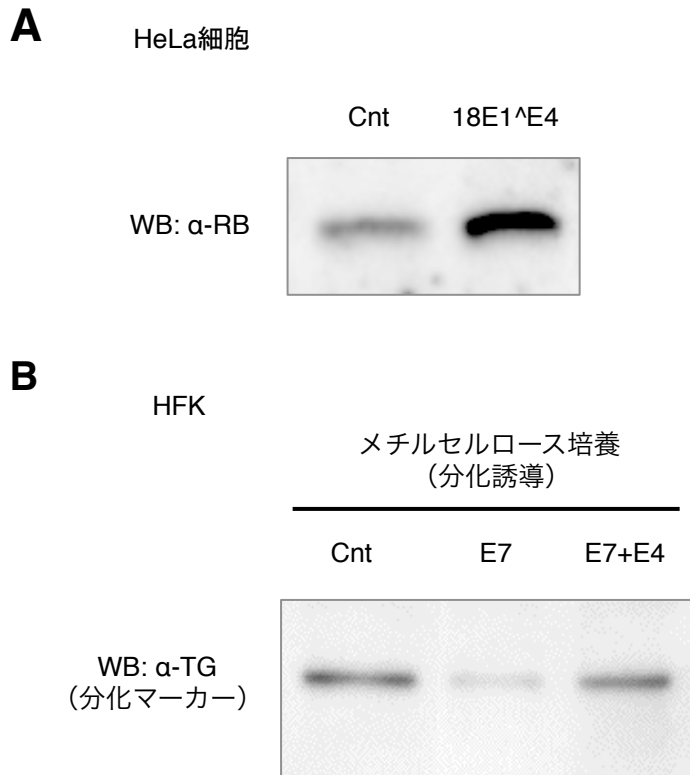
18E1^E4による18E6, 18E7の検出フラクションの変化誘導に対する凝集体形成阻害の効果を検討した。図20および図21と同様にトランスフェクションした細胞に、トランスフェクション24時間後にノコダゾール処理を施し、その細胞溶解液に関して、イムノブロット解析を行なった。ノコダゾールによって18E1^E4凝集体の形成を阻害すると、図20, 図21で認められた18E1^E4発現細胞による18E6および18E7の発現量調節の効果が認められなくなった。

図23 18E1^E4アグリソームへの18E6, 18E7のリクルート



18E6, 18E7は18E1^E4凝集体に蓄積した。CV1細胞にEGFP-18E1^E4 (緑) とFLAG-18E5, E6, E7 (赤) の細胞内局在を観察した。細胞は各発現プラスミド導入48時間後に4% PFA固定し、抗FLAG抗体 (赤) で染色した。図20, 21で18E1^E4発現による影響を受けなかった18E5は、18E1^E4凝集体への蓄積は見られなかった。一方で、18E1^E4発現によって検出されるフラクションに変化のあった18E6, 18E7に関しては18E1^E4凝集体への蓄積が観察された。

図25 E1^ΔE4による一部のE7活性抑制の可能性



- A. HeLa細胞にFLAG-18E1^ΔE4を導入し、トランスフェクション48時間後の細胞抽出液に関して、抗RB抗体にてイムノブロット解析を行なった。E1^ΔE4発現細胞ではRB検出量の上昇が認められた。
- B. HFKsの分化誘導実験。18E7単独もしくは18E7、18E1^ΔE4共導入したHFKsをメチルセルロース培養にて分化誘導を施した。その細胞抽出液に関して角化細胞の分化マーカーであるトランスグルタミナーゼ (TG) の発現量をイムノブロットにて解析した。分化マーカーの発現はE7発現によって減少し、それはE1^ΔE4発現によって回復することが示唆された。

以上の結果は、図24の仮定モデルを否定しない結果である。