

[課程 2]

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 英貴

本研究は、子宮頸癌の主要リスクファクターであるパピローマウイルスのゲノム DNA に結合する宿主細胞蛋白質の探索、およびその機能の解明を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. ウイルス粒子を構築するキャプシド蛋白質の転写を担う HPV16 型後期プロモーター領域に配列特異的に結合する宿主細胞蛋白質として核小体蛋白質 nucleolin を同定した。
2. ゲルシフトアッセイにより、試験管内において nucleolin は HPV16 ゲノム塩基番号 604-614 に配列特異的に結合することが示された。
3. HeLa 細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により、細胞内で nucleolin が HPV16 ゲノムに結合していることが示された。
4. HPV の感染は粘膜の裂傷からウイルス粒子が基底細胞層に侵入し、成立すると考えられている。ヒト正常表皮角化細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により、nucleolin は HPV ゲノムに結合することが示された。そのため、HPV 初期感染の場である基底細胞内で nucleolin が HPV ゲノムに結合していることが強く推測された。
5. ヒト子宮頸部異形成患者より分離された細胞株 W12 は HPV16 ゲノムをエピゾームとして保持する。W12 細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により、nucleolin は内包する HPV ゲノムに結合していることが示された。HPV の慢性持続感染の場である異形成細胞において nucleolin が HPV ゲノムに結合する証拠を得た。
6. HeLa 細胞を用いて nucleolin に対するショートヘアピン RNA を持続的に発現させることでノックダウンを行うことに成功した。この細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより nucleolin が HPV プロモーター活性に与える影響を解析したが、転写活性への影響は否定的であった。
7. HPV 複製には HPV ゲノムから転写される非構造蛋白質 E1、E2 が不可欠である。HEK-293T 細胞質抽出液と組み替え E1、E2 蛋白質、HPV DNA プラスミドを混合した無細胞複製系を構築し、nucleolin が HPV DNA 複製に関与するか検討したが、複製への影響は否定的であった。

以上、本論文は HPV ゲノムの生活環の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。