

〈3〉 DNA複製開始因子によるヒトパピローマウイルス複製制御

吉田 健一

明治大学農学部生命科学科分子発生学研究室

ヒトパピローマウイルス(以下、HPV)のゲノムDNA複製が、宿主細胞のDNA複製開始因子により制御されているか、解明を試みた。細胞株としてヒト大腸癌由来HCT116(以下、+/+)と、DNA複製開始阻害に働くGemininのdestruction box配列を相同組み換えにより除去し、本来G1期に分解されるGemininを安定的に存在させたHCT116細胞(以下、Gem+)、並びにテトラサイクリンによりDNAヘリケースMCM7の発現調節を可能にしたHCT116細胞(以下、MCM7-onおよびMCM7-off)を用いた。また、プラスミドとしてHPVの複製開始領域(以下、LCR)、E1、E2をコードするpFS101を使用した。

上述した細胞株にプラスミドを一過性に発現させ、制限酵素DpnIの切断パターンを指標としたサザンブロットで解析した。即ち、大腸菌で複製したトランスフェクション前のプラスミドはdam methylationを保持しているためDpnIによる切断を受けるが、動物細胞内で複製したプラスミドはDpnI耐性となる。また、プラスミドをハイグロマイシン処理で安定発現させ、+/+とDNA複製開始因子改変細胞のコロニー数の多少から細胞内複製の割合を比較した。結果、pFS101の細胞内複製はGemininにより抑制され、MCM7により増強された。

HPV LCRのどの配列がDNA複製開始因子の結合配列となっているのか、GemininおよびMCM7抗体によるクロマチン免疫沈降を実施した。結果、LCR全域をカバーするプライマーで結合が検出された。以上の実験結果から、HPVのゲノム複製にGemininやMCM7を含むDNA複製開始因子が関与する可能性が強く示唆された。

MCM7 : Minichromosome maintenance 7