

Title	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 Binds to Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) Terminal Repeat Sequence and Modulates KSHV Replication in Latency
Author(s)	大崎, 恵理子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45527
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	おおきき えりこ 大崎恵理子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19285 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 Binds to Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) Terminal Repeat Sequence and Modulates KSHV Replication in Latency (ポリ ADP リボースポリメラーゼ 1 はカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの末端反復配列に結合し、潜伏感染におけるウイルスゲノムの複製を調節する)
論文審査委員	(主査) 教授 山西 弘一 (副査) 教授 青笹 克之 教授 生田 和良

論文内容の要旨

[目的]

カポジ肉腫や primary effusion lymphoma (PEL) などの原因ウイルスであるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) はこれらの細胞に潜伏感染しそのゲノムは一見同じ数で維持されている。KSHV のゲノムの両端には、Terminal repeat (TR) と呼ばれる、801 bp のユニットが数十 kbp 繰り返された配列が存在する。TR は KSHV の潜伏感染時に発現している Latency-associated nuclear antigen (LANA) に結合し、その存在下で episomal に複製する。すなわち TR は LANA 依存性に複製起点として機能し、潜伏感染におけるウイルスの複製・分配・維持に重要な因子であると考えられているが、その詳細なメカニズムは未だに不明である。そこで、TR と LANA による新たな機能を明らかにすることを目的に、TR 結合因子の同定を試みた。

[方法ならびに成績]

CNBr-activated セファロースビーズに TR を結合させた DNA カラムを作製し、KSHV 感染細胞 (BC3) と非感染細胞 (BJAB) の細胞抽出液の結合分画を得た。このとき、BSA や poly (dI-dC)、超音波処理した salmon sperm DNA を加えることによって非特異的な結合を抑え、また同程度の長さの lytic replication 時の複製起点の部分配列に結合するフラクションと比較することにより、TR 特異的に結合する因子を同定した。その結果、真核生物における複製開始因子であり、pre-replication complex (pre-RC) の一員である origin recognition complex (ORC)、CDC6、minichromosome maintenance 7 (MCM7) などが、LANA 依存的に TR へ結合することが示された。KSHV における TR への pre-RC の結合は、本研究で初めて示された。さらに、MALDI-TOF/MS 分析によって、感染細胞非依存的に TR に結合する因子として、poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) を同定した。PARP1 は、ターゲットとなるタンパク質に ADP リボシル基を付加することによってそのタンパク質の機能を制御することが知られており、最近の報告においてセントロメアタンパクや中心体との相互作用が明らかになっている。PARP1 の TR 内結合部位

をゲルシフトアッセイによって決定したところ、LANA 結合部位の約 200 bp 上流で結合し、間接蛍光抗体法でも、PARP1 は感染細胞において LANA と共局在することが証明された。そして、リボシル化の基質となるビオチン化ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) と精製 PARP1 により、LANA が PARP1 によってリボシル化されることが示された。さらに、KSHV 感染細胞において、PARP1 のリボシル化活性を調節する薬剤で処理した後、リアルタイム PCR により KSHV ゲノムのコピー数の変動を調べたところ、ハイドロキシウレアによりリボシル化活性を上げるとコピー数が減少し、ナイアシンアミドにより活性を下げるとコピー数が増加することが明らかになった。

[総括]

本研究により、KSHV において宿主の複製開始因子が LANA 依存的に TR に結合することで細胞周期と同調した KSHV のゲノムの複製を遂行していることが示唆された。LANA への依存性は LANA と複製開始因子との相互作用を示唆する。今後いくつかの複製開始因子のうちどの因子が LANA の初期標的因子になっているのかを明らかにすることで、潜伏感染におけるウイルス複製の詳細を解明する予定である。また、PARP1 は TR 内の特異的な配列に結合し、近傍に結合する LANA をリボシル化のターゲットにしていることを明らかにした。LANA のリボシル化により、ウイルスゲノムの複製や維持に影響を与えていることが明らかとなった。PARP1 は中心体やセントロメアにも介在しゲノムヌクレオソームの構造や染色体の分配に関わっていることが示されているため、ウイルスゲノムの分配・維持における LANA や PARP1 の機能について解析する予定である。

論文審査の結果の要旨

申請者は、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) のゲノムの複製・維持機構を解明することを目的に、KSHV のゲノムの末端反復配列 (TR) に結合する因子の同定を行なった。その結果、TR 結合因子としてウイルス潜伏感染因子である LANA 依存性の ORC、cdc6、Mcm などの宿主複製開始因子と、非依存性のポリ ADP リボースポリメラーゼ 1 (PARP1) を同定した。宿主複製開始因子は、LANA 依存性に KSHV ゲノムの TR に結合し、宿主の細胞周期と同調して複製を行なっていることを初めて示した。さらに PARP1 に関し、KSHV において PARP1 は TR 内の LANA 結合部位の近傍に結合し、LANA をポリ ADP リボシル化することによって KSHV ゲノムのコピー数を調節することを明らかにした。これらの研究から得られた結果は、潜伏感染時の KSHV ゲノムの複製・維持機構の解明やウイルス排除に役立つ新しい知見である。したがって、申請者の論文は博士 (医学) の学位授与に値すると考えられる。