

Title	Cleavage of viral RNA and inhibition of viral translation by hepatitis C virus RNA-specific hammerhead ribozyme in vitro.
Author(s)	大川, 和良
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41057
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 〈/a〉 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 大 川 和 良 お お 大 川 和 良
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 4 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 12 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Cleavage of viral RNA and inhibition of viral translation by hepatitis C virus RNA-specific hammerhead ribozyme in vitro. (ハンマーヘッド型リボザイムによるC型肝炎ウイルス RNA の特異的切断とウィルス翻訳の抑制)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 正二 (副査) 教 授 松 澤 佑 次 教 授 山 西 弘 一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

C型肝炎に対する治療として、インターフェロンをはじめとする抗ウイルス療法が広く行われているが、その効果は十分とは言えず、新しい治療法の開発が望まれている。最近、特定の遺伝子の発現を抑制する新しい手段として、リボザイムが注目されている。本研究では、C型肝炎ウイルス(HCV)RNAをターゲットとしたハンマーヘッド型リボザイムを作成し、ターゲットRNAの切断活性ならびにウィルス翻訳の抑制効果について検討した。

〔方法ならびに成績〕

HCV RNA コア領域に切断部位を有する3種類のリボザイム(Rz408, Rz584, Rz708)を作成した。これらはそれぞれHCV RNAを408番目, 584番目, 708番目の塩基の3'端で切断するようにデザインした。また、細胞内でのリボザイムの安定性を高めると報告されている、T7 terminator 配列を3'側に付加したリボザイム(Rz408T, Rz584T, Rz708T)も検討に加えた。陰性コントロールとして、アンチセンス部分にランダムな配列を有するリボザイム(NRz, NRzT)も作成した。一方、ターゲットRNAには、5'非翻訳領域とコアの全領域、ならびにE1領域の一部からなる1217塩基の合成HCV RNAを用いた。リボザイムとターゲットHCV RNAはいずれもin vitro transcriptionによって合成した。リボザイムによるターゲットHCV RNA切断活性はcleavage assayによって検討した。すなわち、リボザイムと³²PでラベルしたターゲットHCV RNAを混合し、50 mM Tris-Cl, 20 mM MgCl₂の存在下で、37°Cでインキュベーションを行い、その産物をポリアクリルアミド-尿素ゲル上で電気泳動したのち、オートラジオグラフィによって特異的切断を確認した。リボザイムによるHCV翻訳の抑制効果については、リボザイムとターゲットRNAをモル比50:1の割合で混合し、³⁵Sメチオニンの存在下で、ウサギ網赤血球ライセート中で30°C, 2時間のin vitro translation反応後、SDS-PAGE, オートラジオグラフィを行い、画像解析システムにてターゲットHCV RNA由来の約30 kDaのバンド強度の定量を行うことで検討した。

cleavage assayでは、いずれのリボザイムにおいてもターゲットHCV RNAの特異的切断が確認され、その切断活性は用量依存性かつ時間依存性であった。リボザイムとターゲットRNAをモル比1000:1の割合で混合し、2時間反

応させた時の切断効率は、Rz408 50%、Rz584 34%、Rz708 25%、Rz408T 11%、Rz584T 9%、Rz708T 16%であり、Rz408で最も効率が高かった。一方、陰性コントロールリボザイム (NRz, NRzT) では、ターゲット RNA の切断は認められなかった。リボザイムによる HCV 翻訳の抑制効果に関しては、NRz または NRzT による翻訳活性を100%とした時、Rz408 55%、Rz584 44%、Rz708 25%、Rz408T 52%、Rz584T 70%、Rz708T 39%であり、いずれのリボザイムでも HCV 翻訳の抑制効果が認められたが、その抑制の程度は Rz708で最も高く、約75%に達した。また、T7 terminator 配列を有さないリボザイムと有するリボザイムとの比較では、HCV RNA の切断活性と HCV 翻訳抑制効果の両方とも、T7 terminator 配列を有さないリボザイムの方が、有するリボザイムよりも高い傾向が認められた。

〔総括〕

本研究において作成したハンマーヘッド型リボザイムによって、HCV RNA の切断活性が認められ、また HCV 翻訳の cell-free の系における抑制効果も認められた。この結果は、リボザイムが C 型肝炎に対する新しい遺伝子治療として応用できる可能性を示唆するものと思われた。

論文審査の結果の要旨

最近、新しい遺伝子治療の手段としてリボザイムが注目されている。本研究では、C型肝炎ウイルス (HCV) RNA をターゲットとしたハンマーヘッド型リボザイムによる、HCV 抑制効果についての基礎的検討がなされた。HCV core 領域内のそれぞれ異なる部位に切断サイトを有する3種類のリボザイムが検討された。無細胞系におけるターゲット HCV RNA の切断活性の検討では、リボザイムによるターゲット HCV RNA の特異的切断が確認された。cell lysate の系における HCV 翻訳の抑制効果の検討では、最高約75%の抑制効果がみられた。また、培養細胞系における HCV 蛋白発現抑制効果の検討では、最高約70%の抑制効果が認められた。

以上のように、本研究は、リボザイムがC型肝炎に対する新しい遺伝子治療として応用できる可能性を示唆しており、今後のC型肝炎の新しい治療法の開発に大きく寄与すると考えられ、学位に値すると判断する。