



Title	Specific Interaction of a 25-kilodalton Cellular Protein, a 40S Ribosomal Subunit Protein, with the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus Genome
Author(s)	福士, 秀悦
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42751
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	福士秀悦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15691号
学位授与年月日	平成12年8月7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	Specific Interaction of a 25-kilodalton Cellular Protein, a 40S Ribosomal Subunit Protein, with the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus Genome (C型肝炎ウイルスのInternal Ribosome Entry Siteと40Sリボソームサブユニット蛋白質の一つである25KDa宿主細胞蛋白質との特異的結合)
論文審査委員	(主査) 教授 永井 克也
	(副査) 教授 山西 弘一 教授 林 紀夫

論文内容の要旨

[目的]

C型肝炎ウイルス(HCV)はゲノムの5'非翻訳領域(NCR)内にInternal Ribosome Entry Site(IRES)とよばれる構造をもつ。一般に真核生物のmRNAはcap依存的翻訳開始機構によって蛋白質合成が行われる。しかし、HCVゲノムRNAからの蛋白質合成は、リボソームがIRESを認識して入り込むことにより開始される。このような内部認識機構は同じプラス一本鎖RNAウイルスである、ポリオウイルス(PV)や脳心筋炎ウイルス(EMCV)などのピコルナウイルス科にも認められる。ピコルナウイルスではリボソームがIRESに結合し翻訳開始複合体を形成するためにはeIF-2, PTB, Laなどの宿主細胞蛋白質が必要であることが明らかにされている。一方、HCVのIRESは塩基配列やRNAの二次構造がピコルナウイルスとは異なる特徴を有することから、そこに結合する宿主細胞蛋白質をはじめ、それらによって形成される翻訳開始複合体、リボソームのHCV IRES認識機構など不明な点が多い。私は、これまでにHCV 5'NCRの欠失変異体と試験官内翻訳系を用いてIRESの機能に必須なゲノムRNAの領域を明らかにしてきた。さらに、HCV IRESによる翻訳に中心的な役割を果たす、IRES結合宿主細胞蛋白質p25を発見した。本研究では、p25が結合するために必要なHCVのIRES領域を決定するとともにp25の性質について検討した。

[方法ならびに成績]

[³²P]UTPでラベルされたHCV 5'NCR全長をふくむRNAをHeLa細胞質抽出液とインキュベートし、UV照射(UVクロスリンク)を行い、SDS-PAGE後オートラジオグラフィーでp25を検出した。p25がHCV 5'NCRのどの部分に結合するか調べるために、HCV 5'NCRの様々な欠失変異体を作製し、HCV 5'NCRとp25のUVクロスリンクの競合RNAとして用いた。HCV 5'NCRのうちnt 47-74あるいはnt 279-331を欠いた競合RNAはHCVとp25の結合を阻害しなかったことから、これらの領域がp25の結合に必須であることが分かった。これらの領域はHCVの翻訳に重要な役割を果たすことが試験官内翻訳系で明らかにされており、さらにHCVのすべてのstrainでほぼ完全に保存されていることから、HCVの増殖に重要な部分であると考えられた。一方、PVおよびEMCVなどのピコルナウイルスのIRESはHCVとp25の結合を競合阻害しなかったことから、これらのウイルスではp25は結合せず、p25-IRESの相互作用はHCVに特異的であると考えられた。

HeLa細胞質抽出液の代わりに、精製した40SリボソームサブユニットをUVクロスリンクに用いた場合でも

HCV 5' NCR と p25の結合が見られたことから、p25は40S リボソームサブユニット蛋白質の一つであることが明らかになった。また、ほかの宿主因子を介さずに HCV 5' NCR と40S リボソームはダイレクトに結合しうることが分かった。p25との結合は、HeLa 細胞のみならず、HCV の増殖が報告されている MT-2, MOLT-4, Daudi 細胞でも見られた。

[総括]

HCV が感染細胞内で増殖するためには、5' NCR に形成される IRES と相互作用する宿主細胞蛋白質が重要な役割を果たす。そのなかの一つである p25は HCV 5' NCR のうち、nt47-74および nt279-331を含む部分に結合することが明らかになった。この領域は HCV の増殖に必須と思われる部分であった。p25は40S リボソームサブユニット蛋白質の一つであり、p25と IRES の結合はピコルナウイルスにみられず、HCV 特異的であった。これらの結果から、p25との結合による40S リボソームサブユニットと IRES のダイレクトな相互作用が HCV の翻訳に重要なステップであり、これまでに知られているピコルナウイルスとは異なるメカニズムで HCV の IRES が機能すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムの5'非翻訳領域 (5' NCR) には Internal Ribosome Entry Site (IRES) が形成され、この部分と宿主細胞側蛋白質の相互作用によってウイルス蛋白質の合成が開始されると考えられている。

本研究では分子量約25kDa の宿主細胞側蛋白質 (p25) の結合が IRES による HCV 蛋白質合成に必須であることを見いだし、その5' NCR における結合領域を決定した。更に、p25を精製し、アミノ酸配列を解析して p25は40S リボソームサブユニットに含まれる蛋白質 (S 5 蛋白質) であることも明らかにした。また、40S リボソームサブユニットが p25 (S 5) を介して HCV ゲノムの5' 非翻訳領域 (IRES) に直接結合することを示す結果を得た。p25と IRES の結合は HCV に特異的であることから、本研究はこれまで知られているポリオウイルスなどの IRES とは異なるメカニズムで HCV IRES が働くことをウイルス学的に検証したものである。このように、本研究は HCV の増殖に必要なウイルス蛋白質合成の分子機構の理解に新知見を与え、C型肝炎の治療における新たな方策を与える可能性があるので、学位に値すると考える。