

Title	Ubiquitin-Mediated Degradation of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Processing at Its Carboxyl Terminus
Author(s)	鈴木, 亮介
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/43240
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	鈴木 亮介
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16517 号
学位授与年月日	平成13年9月25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	Ubiquitin-Mediated Degradation of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Processing at Its Carboxyl Terminus (C末端側の切断によるC型肝炎ウイルスコア蛋白質のユビキチン-プロテアソーム系による分解の制御)
論文審査委員	(主査) 教授 松浦 善治 (副査) 教授 岡田 雅人 教授 塩田 達雄

論文内容の要旨

【目的】

C型肝炎ウイルス(HCV)はヒトに肝炎を引き起こす原因ウイルスである。また患者の多くは肝炎から肝硬変を経て肝癌を発症するため、公衆衛生上極めて重要な病原ウイルスといえる。HCVのコア蛋白質は多量体としてウイルス粒子内部のヌクレオキャプシドを形成していると考えられる。またこのコア蛋白質はHCVおよび宿主細胞の遺伝子発現に影響を及ぼしたり、アポトーシスや細胞増殖へ関与するとする報告も多く、多機能な蛋白質として注目されている。最近ではコア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスが開発されたが、生後一定の時期に肝細胞癌を発症することが明らかになり、コア蛋白質は肝発癌因子のひとつとしても一層注目を浴びようになってきた。本研究では、このように多くの機能を有するHCVコア蛋白質が、細胞周期や癌に関わる分子の制御に必要な不可欠な役割を果たしているユビキチン-プロテアソーム分解系により、制御されている可能性を明らかにする事を目的とした。

【方法ならびに成績】

HCVコア蛋白質をコードするcDNAを、CAGプロモーターの下流に挿入した発現プラスミドを作製した。このプラスミドをヒト腎臓由来細胞である293T細胞に導入し、コア蛋白質の発現量に対するプロテアソームインヒビターの影響をウエスタンブロット法により調べた。またコア蛋白質の発現レベルの相違が、転写・翻訳効率の違いによるものか、あるいは蛋白質の不安定性によるのかを明らかにするために、発現レベルを標準化する事が可能なUPR法を用いてウエスタンブロットおよびpulse-chase/免疫沈降を行い、コア蛋白質の安定性に対するプロテアソームインヒビターの影響について検討した。さらにコア蛋白質のユビキチン化を検討するために、His-ユビキチンとコア蛋白質を293T細胞で同時に発現させ、His-ユビキチン化されたコア蛋白質の検出をウエスタンブロット法により試みた。

全長191アミノ酸のコア蛋白質を哺乳動物細胞を用いて発現させると、そのC末端側173アミノ酸付近で切断を受け、その結果生じる21kDの蛋白質(p21)と、切断を受けない23kDの蛋白質が検出できる。この2種類の蛋白質の発現量はプロテアソームインヒビターの影響を受けなかった。一方でプロテアソームインヒビター存在下でのみ、新たに約17kDの蛋白質(p17)が検出された。ウエスタンブロットに用いた抗体のエピトープはコア蛋白質のN-末端側に存在するため、この17kDのバンドはp21がさらにC末端側でプロセッシングを受けたものだと考えられた。またプロテアソームインヒビター非存在下ではこのp17は検出されない事から、p17はプロテアソームで分解される不安定な

蛋白質である事が示唆された。さらに転写・翻訳レベルを標準化して解析した結果、p21はインヒビター処理、未処理で発現量の差は認められなかった。これに対して17kDの蛋白質に相当するC末端を欠損した152アミノ酸からなるコア蛋白質は、p21に比べて発現量が低下していた。またこの蛋白質は、プロテアソームインヒビター存在下では発現量が顕著に増加していた。さらに pulse-chase/免疫沈降により経時的な蛋白量の変化を解析したところ、p21は安定な蛋白質であるのに対して、C末端を欠損した153アミノ酸からなるコア蛋白質は、半減期の短い不安定な蛋白質であり、プロテアソームインヒビターによってその分解が抑えられた。C末端を欠損した不安定なコア蛋白質と安定なコア蛋白質 (p21) のユビキチン化を調べたところ、不安定なコア蛋白質では複数のユビキチン鎖の付加が認められたが、安定なコア蛋白質では一つのユビキチンが付加されたもののみ検出された。

【総括】

HCVのコア蛋白質は、ウイルス蛋白質のポリプロテインから細胞内のペプチダーゼによって切断を受け、p21とp23を生じる。本研究により、p21が少なくとも一部ではさらに切断を受けてC末端側が欠損した17kDの蛋白質 (p17) が生じることが明らかとなった。p21とp23が安定な蛋白質であるのに対してp17は不安定な蛋白質であり、またプロテアソームインヒビターによりその分解が阻害されることから、プロテアソームで積極的に分解される蛋白質であることが示唆された。この不安定なコア蛋白質がマルチユビキチン鎖を形成するのに対して、安定なコア蛋白質はわずかに1分子のユビキチンの結合のみが認められた。これらの事からコア蛋白質の安定性は、C末端側の疎水性領域のプロセッシングにより制御され、この領域をプロセッシングされたコア蛋白質はマルチユビキチン鎖を形成し、ユビキチン-プロテアソーム分解系により速やかに分解されることが示唆された。安定なコア蛋白質は1分子のユビキチンが結合したもののみが検出された事から、コア蛋白質の安定性は修飾されるユビキチン分子数に依存する可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス (HCV) は輸血後肝炎の主要な原因ウイルスであり、HCV感染と肝癌発症の相関も明らかにされている。HCVのコア蛋白質は肝発癌因子をはじめとした多機能な蛋白質として注目されている。コア蛋白質は前駆体蛋白質からシグナルペプチダーゼによって切断され、p23として生成され、さらにそのC末端側が切断された成熟型のp21にプロセスされる事が知られている。申請者はp21のC末端側がさらに切断された17kDの蛋白質 (p17) が産生されることを明らかにするとともに、p17がマルチユビキチン鎖を形成し、プロテアソームで積極的に分解されることを明らかにした。一方、成熟型のp21にはユビキチンが1分子のみ結合し、p17に比べて安定であった事から、コア蛋白質の安定性はC末端側の疎水性領域のプロセッシングにより制御されていることが示唆された。

本研究は、HCVコア蛋白質のユビキチン-プロテアソーム系による分解制御機構を明らかにするとともに、HCVによる肝炎、肝癌の発症メカニズムを理解する上でも重要な知見を与えるものである。したがって、学位の授与に十分値するものと考えられる。