The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	C型肝炎ウイルス複製酵素の分子機能に関する研究
Author(s)	内田, 征男
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44148
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

【1】

氏　　名	内田征男（うちだまさお）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　17757　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科薬品化学専攻
学位論文名	**C型肝炎ウイルス複製酵素の分子機能に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授　今西　武 （副査） 教授　前田　正知　　教授　土井　健史　　教授　西原　力

論文内容の要旨

わが国における肝癌による死亡者数は年々増加の傾向にあり、平成11年度には3万人を超え、25年前から3倍以上増加している。本邦における肝癌の90%以上は肝細胞癌であり、その最大の原因としてC型肝炎ウイルス（HCV）関連の肝細胞癌の増加が挙げられる。HCVは1988年に発見された一本鎖（+）鎖RNAウイルスである。ゲノムには、およそ3000アミノ酸残基よりなるポリタンパク質をコードして、宿主やウイルス自身のプロテアーゼによりN末端側からカプシドを構成しているコアタンパク質（C）、エンベロープを構成しているE1、E2、p7、ウイルス粒子には存在しない非構造タンパク質であるNS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5Bの順に成熟したウイルスタンパク質へとプロセシングされる。NS3のC末端側にはRNAヘリカーゼ活性があり、ウイルスゲノムの複製時に二本鎖RNAを一本鎖に解く。NS5Aは、高リン酸化部位を持つタンパク質で、NS5BはRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRp）活性を持ち、HCVの複製に直接関わるタンパク質である。

現在ではHCV抗体を用いたスクリーニング法が確立されたため、先進国では輸血による感染の危険性はほとんど除かれたが、発展途上国など医療環境の未発達な地域においては、いまだに感染の危険性が高い。HCVは感染すると高い確率で慢性肝炎に移行し、非常に長い年月をかけて肝硬変、さらに肝細胞癌へと徐々に進行していく。肝細胞癌はいまだに治療不可能な癌であるため、なるべく早い段階でウイルスの排除を目的にした抗ウイルス治療が必要である。これまではIFNが唯一の抗HCV治療薬であったが、この治療における大きな問題点として副作用の強さと著効率の低さが挙げられる。最近、ヌクレオシドアナログの抗ウイルス剤リバビリンとIFNとの併用療法も行われるようになったが、その効果はいまだに満足のいくものではない。

RdRpは真核細胞には存在しない酵素であり、この複製機構を解明することは慢性C型肝炎の新しい治療法の開発に役立つと考えられる。NS5Bは、そのアミノ酸配列に（+）鎖RNAウイルスのRdRpに共通した活性モチーフであるGDDモチーフを持つ。組換えタンパク質を用いた実験より、NS5B単独でRdRp活性を持つことがインビトロの系で報告されていたが、HCVのビリオンを用いた感染細胞の系が存在せず、その詳細な複製機構についての解析はほとんど進んでいない。そこで著者は、HCVの複製機構解明の手掛かりとしてRdRp活性を持つNS5Bと直接相互作用するウイルス由来タンパク質を探索して、それがNS5Bのコファクターであるかインビトロ RdRp反応系を用いて検討を試みた。

まず、HCV由来タンパク質のうちコアタンパク質と、非構造タンパク質を真核細胞内で強制発現させて各タンパ

ク質の単独での局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。次に、これらのタンパク質と NS5B を同時に発現させた場合、その局在に変化が見られるかを指標に NS5B と相互作用するタンパク質の同定を試みた。COS-7 細胞内で蛍光タンパク質 EGFP 融合 NS5B は、単独発現で小胞体に局在していた。コアタンパク質は単独発現では細胞質内に粒子を形成していたが、NS5B と同時発現させると NS5B と同じ小胞体に観察され相互作用することが示された。コアタンパク質の長期発現が肝炎の症状の一因と考えられるため、この複合体の形成がゲノム RNA の複製への関与以外にコアタンパク質による宿主への細胞障害などの作用を制御する可能性も示唆される。さらにコアタンパク質はNS5BのC末端側97アミノ酸と結合することが欠失変異体を用いた免疫沈降法による共沈実験で示された。NS3は単独発現させると核内に局在していた。しかし、NS5B と同時発現させると NS3 の局在は細胞質に移行して NS5B と同じ局在を示し、複合体を形成していることが示唆された。NS3 は RNA ヘリカーゼ活性を持っていることから、NS3 が複製段階で関与していることが予想される。NS5A のみを発現させた時の局在は、NS5B と同じ分布をしていたため、この複合体形成は免疫沈降法を用いて両者の相互作用を示した。NS5A は宿主の転写活性化能を有するため、このタンパク質は NS5B のコファクターとして機能する可能性も考えられる。

今回、NS5B と相互作用することが示されたコアタンパク質、NS3、NS5A の 3 種類が RdRp 反応のコファクターであるか検討するため、バキュロウイルス感染系と大腸菌発現系を利用して組換えタンパク質を取得して、インビトロ RdRp 反応系を構築した。精製 NS5B を用いて非特異的な RNA を鋳型に RdRp 反応を行なうと、鋳型の 3' 末端をプライマーにしたコピーバックの結果による 2 倍体 RNA 産物が検出された。大腸菌で発現させた NS5B は、バキュロウイルス発現系で取得した NS5B に比べて RdRp 活性が 10 倍以上高いことが示された。この精製した大腸菌由来 NS5B は、ウイルスのゲノム配列を含む特異的な鋳型 RNA を用いた場合でも、効率的に新生鎖の合成反応が行えた。この系に、NS5B と相互作用するウイルス由来タンパク質をそれぞれ添加してみると、コアタンパク質と NS3 は RdRp 反応がほとんど見られなかった。このことから、これらのタンパク質は NS5B による RdRp 反応のインヒビターとして作用したことが示唆された。一方、NS5A を NS5B と等モル添加した場合は RdRp 活性が 20%低下したが、NS5A の量を 1/10 に減らした場合にはその活性はおよそ 50%上昇する結果が得られた。このことより NS5A が NS5B による RdRp 活性を制御する正のコファクターであることが示唆される。

今回の実験で HCV 複製機構を制御するウイルス由来因子が同定されたことにより、今後の抗 HCV 薬の新規ターゲット探索、または新しい HCV 慢性肝炎の治療法や創薬の開発につながる重要な知見を得られたと確信している。

論文審査の結果の要旨

C 型肝炎ウイルスは、慢性肝炎、肝硬変そして肝癌を引き起こす主要な原因ウイルスであり、これを標的とした医薬品の開発が注目されている。C 型肝炎ウイルスは 10 種のタンパク質を産生するが、このうち NS5B とよばれるタンパク質は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を有しており、この機能がウイルス特有のものであるため、この分子が抗ウイルス薬開発の標的分子として特に注目を集めている。

この背景の下、内田君は、C 型肝炎ウイルスの NS5B タンパク質について、分子生物学的アプローチにより、NS5B タンパク質の活性発現に関与するウイルス由来タンパク質の探索、及びインビトロ RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性系の構築を行った。

その結果、細胞内で NS5B タンパク質と相互作用するものとして、コアタンパク質、NS3、NS5A を同定した。また、大腸菌発現系により精製した NS5B を用いて、ウイルス特異的配列を含む鋳型を基質とした、改良型インビトロ RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性評価系の構築に成功した。さらにこの評価系を用いて、NS5B と相互作用するタンパク質について活性を評価したところ、NS5A は正に、コアタンパク質と NS3 は負に、NS5B の活性を制御することを明らかにした。

以上の結果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。