The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Intramembrane Proteolysis and Endoplasmic Reticulum Retention of Hepatitis C Virus Core Protein
Author(s)	岡本, 貴世子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46154
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

【55】

氏　　名	岡　本　貴世子（おかもと　きよこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　20112　号
学位授与年月日	平成18年3月24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	Intramembrane Proteolysis and Endoplasmic Reticulum Retention of Hepatitis C Virus Core Protein （C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内プロセシングと細胞内局在）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松浦　善治 （副査） 教　授　生田　和良　　教　授　塩田　達雄

論　文　内　容　の　要　旨

【　目　　的　】

C型肝炎ウイルス（HCV）に感染すると高率に慢性化し、脂肪肝、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する確率が高くなる。HCVは約10 kbの＋鎖RNAをゲノムとして持ち、これを鋳型に単一鎖の約3000アミノ酸からなる前駆蛋白質が翻訳される。宿主細胞あるいはウイルス自身の蛋白質分解酵素によってその前駆蛋白質は切断され、コア蛋白質を含む10種のウイルス蛋白質が生成される。N末端に存在するコア蛋白質はシグナルペプチダーゼによって191アミノ酸の前駆体として切断され、さらに小胞体膜内に存在するシグナルペプチドペプチダーゼ（SPP）によって、C末端膜貫通領域が解裂されて成熟する。コア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスが脂肪肝を経て肝細胞癌を高率に発症することから、コア蛋白質がHCV感染による肝癌発症に重要な役割を演じていると考えられている。しかしながら、HCVコア蛋白質のプロセシング、細胞内局在、そして脂肪肝・肝細胞癌発症のメカニズムは依然として不明な点が多い。本研究は、HCVコア蛋白質の細胞内局在とSPPによる切断に必須なアミノ酸残基を同定し、コア蛋白質のSPPによるプロセシング過程を明らかにすることを目的とした。

【　方法ならびに成績　】

1. コア蛋白質の小胞体局在に必須な領域の同定

緑色蛍光蛋白質を融合させた各種コア蛋白質変異体の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。191アミノ酸残基の前駆体とN末端から128番目までのアミノ酸残基を欠損させたコア蛋白質は主に小胞体に局在したのに対し、151番目まで欠損させた変異体は小胞体に局在しなかった。したがって、コア蛋白質が小胞体に局在するためにはC末端膜貫通領域（164-186残基）以外に128から151の疎水性アミノ酸領域、特に疎水性を担う、Leu^{139}、Val^{140}、Leu^{144}の3アミノ酸残基が重要であることが示唆された。

2. コア蛋白質C末端膜貫通領域の切断に必須な領域の決定

コア蛋白質のLeu^{139}、Val^{140}、Leu^{144}をAlaに置換し、両末端に各々異なるエピトープタグを付加した変異体を293T細胞に発現させて免疫ブロット法で解析した。N末端タグで検出した場合、野生型コア蛋白質より3 kDa大きな分子量のバンドが検出された。このバンドがC末端タグに対する抗体で検出できたことから、SPPによって切断さ

れていないコア蛋白質と考えられた。したがって、SPPによるコア蛋白質C末端膜貫通領域の切断には、膜貫通領域より上流に存在する Leu^{139}、Val^{140}、Leu^{144} が必須であることが示唆された。一方、コア蛋白質の SPP による切断部位は膜貫通領域内に存在する。そこで、コア蛋白質の膜貫通領域に種々の変異を入れた変異体を作製し同様に解析した。Ile^{176} と Phe^{177} を、それぞれ Ala と Leu に置換したコア蛋白質では、野生型に比べて 3 kDa 大きな分子量をもつ未切断バンドが検出された。したがってC末端膜貫通領域内の Ile^{176} と Phe^{177} が SPP によるプロセスに重要であることが示唆された。

3. SPPとコア蛋白質の相互作用

ヒト肝臓 mRNA より SPP 遺伝子をクローニングし、プロテアーゼの活性中心と考えられている二つの Asp を Ala に置換した loss of function 変異体を作製した（SPP D219A および SPP D265A）。これらの変異体と HCV コア蛋白質を細胞に共発現させたところ、コア蛋白質の C 末端膜貫通領域の切断が抑制された。SPPD219A とコア蛋白質が免疫沈降したことから、HCV コア蛋白質は SPP と結合し、SPP はその C 末端膜貫通領域を切断することが示唆された。

4. SPPによる切断とコア蛋白質の細胞内局在との関連性

SPP によって切断されない緑色蛍光蛋白質融合コア蛋白質の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。SPP により切断を受ける野生型コア蛋白質は主に小胞体に局在したが、SPP に切断されない変異体は小胞体近傍に観察されるものの、小胞体と局在は一致しなかった。一方、C 末端膜貫通領域には変異を入れていない Leu^{139}、Val^{140}、Leu^{144} の Ala 置換体や 128 から 151 アミノ酸領域を欠損させたコア蛋白質は核に局在した。以上の成績から、SPP によって切断されることがコア蛋白質の小胞体膜局在に必須であり、Leu^{139}、Val^{140}、Leu^{144} がコア蛋白質の小胞体局在を規定していることが示唆された。

【 総　　括 】

HCV コア蛋白質は SPP によって C 末端膜貫通領域が切断されることが示された。一方、コア蛋白質の変異体を用いた解析から、SPP の切断部位である C 末端膜貫通領域に加え、その上流の疎水性アミノ酸残基が重要であることが示された。それらのアミノ酸残基の変異によってコア蛋白質の細胞内局在が変化したことから、SPP はコア蛋白質の成熟と活性発現に重要な役割を果たしているものと思われる。

論文審査の結果の要旨

本論文では C 型肝炎ウイルス（HCV）コア蛋白質の小胞体局在に必要な領域とコア蛋白質の成熟機構について検討を行った。HCV はウイルスの細胞培養系や動物実験系が確立されておらず、ウイルス粒子形成機構や病原性発現機構については不明な点が多い。したがって、キャプシドを形成するコア蛋白質の成熟過程や局在について解析することは HCV 粒子形成機構の解明に一助を与えると考えられる。

HCV コア蛋白質の小胞体局在には aa139-144 と C 末端膜貫通領域の二つの疎水性領域が必要であることを示した。また、この領域はコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼ（SPP）によるプロセス、つまり成熟に重要であった。したがって、この二つの領域がウイルス粒子形成に重要であることが本研究により示唆された。さらに SPP とコア蛋白質の結合を初めて確認した。

岡本貴世子さんの研究内容は未だ不明な点の多い HCV のウイルス粒子形成機構を解明していく上で重要な現象を数多く見出しており、学位の授与に値すると考えられる。