

Title	C型肝炎ウイルスのコア蛋白質フラグメントとプロテアソーム活性化因子PA28 γ の相互作用
Author(s)	鄭, 洋
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72306
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (鄭 洋)

論文題名 C型肝炎ウイルスのコア蛋白質フラグメントとプロテアソーム活性化因子PA28 γ の相互作用

論文内容の要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染は慢性肝炎、肝硬変および肝細胞癌(HCC)の主な原因である。HCVのコア蛋白質はヌクレオカプシドの構成要素としてウイルス粒子を形成する構造蛋白質であるが、核内に存在するプロテアソーム活性化因子PA28 γ と結合すること、および、培養細胞を用いた生化学的実験結果から、コア蛋白質のPA28 γ 依存的分解が、コア蛋白質によって誘発される肝機能障害発生の必須条件であることが報告されていた。しかしながら、精製した蛋白質を用いた*in vitro*における相互作用解析によって、他の因子による影響を避け、より定量的に結合親和性等を評価する研究は報告されていなかった。そこで、本研究では、まずコア蛋白質のN末領域断片(コアフラグメント)とPA28 γ を精製し、溶液中における両者の物性について、超遠心分析沈降速度法(SV-AUC)を用いて解析した。そして、高分子量会合体を形成しないコアフラグメント(Core71)とPA28 γ の相互作用について、等温滴定熱量測定(ITC)と核磁気共鳴法(NMR)を用いて解析した。また、Core71、PA28 γ と20Sプロテアソームの三者の相互作用およびプロテアソーム活性変化について、native PAGEと活性アッセイを用いて解析した。最後に、これらの結果を踏まえて、細胞内におけるコアフラグメントが20Sプロテアソーム活性を阻害するメカニズムを提案した。

まず蛋白質間相互作用に重要と考えられるN末端を保有し、疎水性が高く会合しやすいC末端を除いた長さの違うコアフラグメントを作製し、その物性について、SV-AUCを用いて解析した。その結果、Core151とCore117は溶液中で種々の高分子量会合体の混合物であることが分かった。高分子量会合体混合物は、分光学的測定結果や熱分析結果の解析が著しく困難である。一方、Core71は高分子量会合体を形成していなかった。従って、今回作成したコアフラグメントのうち、Core71が唯一、*in vitro*における分子間相互作用解析に適していると結論した。また、PA28 γ もこれまでの報告と同様、溶液中で7量体を形成していることが確認された。物理化学的実験に適していることが判明したCore71とPA28 γ の相互作用について、ITCとNMRを用いて解析した。ITCの結果から、Core71とPA28 γ は解離定数(K_d) = 15.4 μ Mの強さで相互作用をすることが示された。また、NMRの結果やPA28 γ 変異体のITCの結果から、Core71とPA28 γ との相互作用に、PA28ホモログ同士間で特異的に異なる配列を持つ領域、homolog-specific insert loopが関与していないことも分かった。

PA28 γ はプロテアーゼ活性化因子の一種で、20Sプロテアソームに結合してその活性を促進する働きを持っている。従って、Core71とPA28 γ の相互作用は、PA28 γ と20Sプロテアソームとの複合体形成や、そのプロテアーゼ活性に影響を与える可能性が考えられた。そこで、Core71がPA28 γ -20Sプロテアソーム複合体の形成および活性に及ぼす影響について調べた。まずnative PAGEにより、Core71、PA28 γ と20Sプロテアソーム三者の相互作用を調べた。その結果、Core71はPA28 γ とのみならず、20Sプロテアソームとも結合することが分かった。さらに、Core71とPA28 γ の結合が、PA28 γ と20Sプロテアソームとの結合を阻害せず、逆に促進させる傾向があることが示された。

次に、Core71が20Sプロテアソームの活性にどんな影響を及ぼすか、プロテアソーム活性アッセイを用いて調べた。PA28 γ のホモログであるPA28 α とPA28 β が形成するヘテロ7量体PA28 α/β は、20Sプロテアソームが持つ三つの活性、trypsin-like、chymotrypsin-like、PHGH (Peptidylglutamyl peptide hydrolyzing)すべてを活性化するが、PA28 γ は20Sプロテアソームのtrypsin-like活性のみを活性化する。よって、本研究では、蛍光基質Boc-Leu-Arg-Arg-AMCを用いて、20Sプロテアソームのtrypsin-like活性を評価した。測定の結果、Core71非存在下では、20Sプロテアソームのtrypsin-like活性はPA28 γ の濃度に依存して増加することが示された。一方、Core71存在下では、PA28 γ により上昇した20Sプロテアソームの活性はCore71の濃度に依存して減少していることが分かった。しかし、PA28 γ 非存在下では、Core71単独による20Sプロテアソームの活性変化はなかった。従ってCore71による20Sプロテアソーム活性阻害にはPA28 γ が必須であることが分かった。また、活性アッセイと同じ条件で行ったSDS-PAGEの結果から、Core71自身は20Sプロテアソームにより分解されないことが分かった。つまり、Core71による20Sプロテアソーム活性阻害は、Core71自身が基質となることにより見かけ上活性が阻害されたのではなく、Core71-PA28 γ -20Sプロテアソーム、三者の相互作用によるものであることが示された。これらの結果を踏まえて、細胞内におけるコアフラグメントが20S

プロテアソーム活性を阻害するメカニズムを提案した。HCVに感染した細胞において、成熟コア蛋白質が核内に移行すると、プロテアソームに分解され、Core151を含むいくつかのコアフラグメントが生じる。これらのコアフラグメントのうち、Core71のような短いコアフラグメントは、プロテアソームの基質とならないためそれ以上に分解されることなく、むしろPA28 γ と20Sプロテアソームの相互作用を安定化させ、さらに、その活性を阻害する。プロテアソーム活性化因子は20Sプロテアソーム中への基質の出入りを制御することでその活性を調節すると考えられている。従って、Core71も基質の出入りに影響を与えることで20Sプロテアソーム活性を阻害していると考えられる。

本研究では*in vitro*におけるHCVコアフラグメント(Core71)とPA28 γ との相互作用をITCで評価することに成功した。また、Core71は20Sプロテアソームとも相互作用するだけでなく、PA28 γ と20Sプロテアソームとの相互作用を促進することも示した。プロテアソーム活性アッセイの結果からは、Core71がPA28 γ 存在下で、20Sプロテアソームのtrypsin-like活性を阻害することを明らかとした。これらの結果をもとに、細胞内におけるコアフラグメントが20Sプロテアソーム活性を阻害するモデルを提案した。筆者のモデルは、HCVコア蛋白質がいわば外因性のプロテアソーム調節因子として機能しているという新たな視点を提案するもので、肝細胞におけるHCVの病原性発現メカニズム解明につながるものと期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (鄭 洋)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 大久保 忠恭
	副 査 教授 高木 達也
	副 査 教授 荒井 雅吉

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は、C型肝炎ウイルス (HCV) のコア蛋白質フラグメントとプロテアソーム活性化因子 γ (PA28 γ) の相互作用を明らかにするため、主に等温滴定熱量測定 (ITC) と核磁気共鳴法 (NMR) を用いて解析し、細胞内におけるコアフラグメントが20Sプロテアソーム活性を阻害するモデルを提案した。HCVの感染は慢性肝炎、肝硬変および肝細胞癌 (HCC) の主な原因である。HCVのコア蛋白質はヌクレオカプシドの構成要素としてウイルス粒子を形成する構造蛋白質であるが、核内に存在するプロテアソーム活性化因子PA28 γ と結合すること、および、培養細胞を用いた生化学的実験結果から、コア蛋白質のPA28 γ 依存的分解が、コア蛋白質によって誘発される肝機能障害発生の必須条件であることが報告されていた。しかしながら、精製した蛋白質を用いた *in vitro* における相互作用解析によって、他の因子による影響を避け、より定量的に結合親和性等を評価する研究は報告されていなかった。そこで、申請者は、まずコア蛋白質のN末領域断片 (コアフラグメント) とPA28 γ を精製し、溶液中における両者の物性について、超遠心分析沈降速度法 (SV-AUC) を用いて解析した。そして、高分子量会合体を形成しないコアフラグメント (Core71) とPA28 γ の相互作用について、ITCとNMRを用いて解析した。また、Core71、PA28 γ と20Sプロテアソームの三者の相互作用およびプロテアソーム活性変化について、native PAGEと活性アッセイを用いて解析した。最後に、これらの結果を踏まえて、細胞内におけるコアフラグメントが20Sプロテアソーム活性を阻害するメカニズムを提案した。

まず蛋白質間相互作用に重要と考えられるN末端を保有し、疎水性が高く会合しやすいC末端を除いた長さの違うコアフラグメントを作製し、その物性について、SV-AUCを用いて解析した。その結果、Core151とCore117は溶液中で種々の高分子量会合体の混合物であることが分かった。高分子量会合体混合物は、分光学的測定結果や熱分析結果の解析が著しく困難である。一方、Core71は高分子量会合体を形成していなかった。従って、今回作成したコアフラグメントのうち、Core71が唯一、*in vitro*における分子間相互作用解析に適していると結論した。また、PA28 γ もこれまでの報告と同様、溶液中で七量体を形成していることが確認された。物理化学的実験に適していることが判明したCore71とPA28 γ の相互作用について、ITCとNMRを用いて解析した。ITCの結果から、Core71とPA28 γ は解離定数 (Kd) = 15.4 μ Mの強さで相互作用をすることが示された。また、NMRの結果やPA28 γ 変異体のITCの結果から、Core71とPA28 γ との相互作用に、PA28ホモログ同士間で特異的に異なる配列を持つ領域、homolog-specific insert loopが関与していないことも分かった。

PA28 γ はプロテアーゼ活性化因子の一種で、20Sプロテアソームに結合してその活性を促進する働きを持っている。従って、Core71とPA28 γ の相互作用は、PA28 γ と20Sプロテアソームとの複合体形成や、そのプロテアーゼ活性に影響を与える可能性が考えられた。そこで、Core71がPA28 γ -20Sプロテアソーム複合体の形成および活性に及ぼす影響について調べた。まずnative PAGEにより、Core71、PA28 γ と20Sプロテアソーム三者の相互作用を調べた。その結果、Core71はPA28 γ とのみならず、20Sプロテアソームとも結合することが分かった。さらに、Core71とPA28 γ の結合が、PA28 γ と20Sプロテアソームとの結合を阻害せず、逆に促進させる傾向があることが示された。次に、Core71が20Sプロテアソームの活性にどんな影響を及ぼすか、プロテアソーム活性アッセイを用いて調べた。PA28 γ のホモログであるPA28 α とPA28 β が形成するヘテロ7量体PA28 α/β は、20Sプロテアソームが持つ三つの活性、trypsin-like、chymotrypsin-like、PHGH (Peptidylglutamyl peptide hydrolyzing) すべてを活性化するが、PA28 γ は20Sプロテアソームのtrypsin-like活性のみを活性化する。よって、本研究では、蛍光基質Boc-Leu-Arg-Arg-AMCを用いて、20Sプロテアソームのtrypsin-like活性を評価した。測定の結果、Core71非存在下では、20Sプロテアソームのtrypsin-like活性はPA28 γ

の濃度に依存して増加することが示された。一方、Core71存在下では、PA28 γ により上昇した20Sプロテアソームの活性はCore71の濃度に依存して減少していることが分かった。しかし、PA28 γ 非存在下では、Core71単独による20Sプロテアソームの活性変化はなかった。従ってCore71による20Sプロテアソーム活性阻害にはPA28 γ が必須であることが分かった。また、活性アッセイと同じ条件で行ったSDS-PAGEの結果から、Core71自身は20Sプロテアソームにより分解されないことが分かった。つまり、Core71による20Sプロテアソーム活性阻害は、Core71自身が基質となることにより見かけ上活性が阻害されたのではなく、Core71-PA28 γ -20Sプロテアソーム、三者の相互作用によるものであることが示された。これらの結果を踏まえて、細胞内におけるコアフラグメントが20Sプロテアソーム活性を阻害するメカニズムを提案した。HCVに感染した細胞において、成熟コア蛋白質が核内に移行すると、プロテアソームに分解され、Core151を含むいくつかのコアフラグメントが生じる。これらのコアフラグメントのうち、Core71のような短いコアフラグメントは、プロテアソームの基質とならないためそれ以上に分解されることなく、むしろPA28 γ と20Sプロテアソームの相互作用を安定化させ、さらに、その活性を阻害する。プロテアソーム活性化因子は20Sプロテアソーム中への基質の出入りを制御することでその活性を調節すると考えられている。従って、Core71も基質の出入りに影響を与えることで20Sプロテアソーム活性を阻害していると考えられる。

本研究では*in vitro*におけるHCVコアフラグメント(Core71)とPA28 γ との相互作用をITCで評価することに成功した。また、Core71は20Sプロテアソームとも相互作用するだけでなく、PA28 γ と20Sプロテアソームとの相互作用を促進することも示した。プロテアソーム活性アッセイの結果からは、Core71がPA28 γ 存在下で、20Sプロテアソームのtrypsin-like活性を阻害することを明らかとした。これらの結果をもとに、細胞内におけるコアフラグメントが20Sプロテアソーム活性を阻害するモデルを提案した。以上、本研究から得られた知見は、HCVコア蛋白質が外因性のプロテアソーム調節因子として機能しているという新たな視点を提案し、肝細胞におけるHCVの病原性発現メカニズム解明に資するものであり、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。