

Title	C型肝炎ウィ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PA28γ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			

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

平成 30 年度

博士学位論文

C型肝炎ウィ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 PA28γの相互作用

大阪大学大学院薬学研究科 創成薬学専攻 高分子化学分野

鄭 洋

略語一覧	2
序論	3
本論	8
第一章 HCV コアフラグメントと PA28γの相互作用解析	8
第一節 背景	8
第二節 結果と考察	8
第一項 HCV コアフラグメントと PA28γの物性解析	8
第二項 Core71と PA28γの相互作用解析	12
第三項 Core44-71 と PA28γの相互作用解析	17
第二章 Core71 によるプロテアソーム活性阻害	19
第一節 背景	19
第二節 結果と考察	19
第一項 Core71、PA28γと20S プロテアソームの相互作用解析	19
第二項 20S プロテアソームの活性変化	22
第三項 Core71 による 20S プロテアソーム活性阻害メカニズム	25
結語	27
謝辞	28
実験の部	29
参考文献	37

略語一覧

HCV	hepatitis C virus
НСС	hepatocellular carcinoma
E1	envelope protein 1
E2	envelope protein 2
NS	non-structural protein
SP	signal peptidase
SPP	signal peptide peptidase
PA28	proteasome activator 28
CD	circular dichroism
SV-AUC	sedimentation velocity-analytical ultracentrifugation
ITC	isothermal titration calorimetry
Kd	dissociation constant
NMR	nuclear magnetic resonance
Tg	transgenic
PCR	polymerase chain reaction
PHGH	peptidylglutamyl peptide hydrolyzing

序論

2017 年 WHO の報告によれば、世界中の約七千百万人が C 型肝炎ウィルス (HCV)に感染している [1]。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。フラビウィルス科に属する HCV は一本鎖 RNA ウィルスで、 長さ 9.6 kb の+鎖型 RNA を持ち、そこから約 3000 アミノ酸で構成される一本の 前駆体蛋白質が翻訳される。前駆体蛋白質はウィルスおよび宿主由来のプロテ アーゼで切断され、コア蛋白質、エンベロープ 1(E1)とエンベロープ 2(E2) の 3 個の構造蛋白質、および p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A と NS5B の 7 個 の非構造(NS)蛋白質が作られる (Fig. 1) [2]。コア蛋白質は HCV の RNA ゲノム を包み込んでヌクレオカプシドを形成する。その外側に、宿主由来の脂質二重 膜と E1、E2 からなるエンベロープが形成される。E2 は、宿主細胞表面にある CD81、クローディン-1 やオクルディンと複合体を形成し、HCV が宿主細胞に侵 入する際に重要な役割を果たす [3]。非構造蛋白質は HCV の RNA 複製、前駆体 蛋白質の修飾に関わっている。



Figure 1. HCV の RNA から翻訳される前駆体蛋白質。

前駆体蛋白質から作られるこれら 10 個の蛋白質のなかでも、コア蛋白質は HCV の 7 つの主要なジェノタイプの間で最も高度に保存されている [4, 5]。コ ア蛋白質のアミノ酸配列は RNA 結合や自己会合に関与するドメイン 1、膜結合 に関与するドメイン 2、およびシグナルペプチドであり、最終的に成熟コア蛋白 質からは除去されるドメイン 3 から構成されている [6, 7]。HCV に感染した宿 主細胞において、まず小胞体のシグナルペプチダーゼ(SP)により、未成熟コア蛋 白質が E1 から切り離される。その後、シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)が、 ドメイン 2 とドメイン 3 の間を切断することで、成熟コア蛋白質が生じる。過 去には、SPP が切断する場所をコア蛋白質の 173 位の残基と 174 位の残基の間 とし、成熟コア蛋白質の長さを 173 残基とする報告もあった [8]。しかし近年の 研究から、SPP が切断する場所はコア蛋白質の 179 位の残基と 180 位の残基の 間で、成熟コア蛋白質の長さは 179 残基であることが分かっている [9]。

コア蛋白質はヌクレオカプシドの構成要素としてウィルス粒子を形成する構 造蛋白質である。しかし、ウィルス全長ではなく、コア蛋白質のみを発現させ たトランスジェニックマウス(CoreTg マウス)において、インスリン抵抗性、脂 肪肝、HCC といった病態発現が認められることが明らかとなり、HCV 感染によ る慢性肝疾患の発生にコア蛋白質自体が関わっていることが示唆された [10-13]。また近年の研究より、コア蛋白質は多くの細胞内蛋白質と相互作用し、 アポトーシス、オートファジー、細胞周期や腫瘍形成を含む様々な細胞機能を 調節していることが分かった [14-18]。そこでコア蛋白質の各部位の構造や物性、 および動態が注目されてきた。

近年、コア蛋白質の一部と結合できる抗体 19D9D6 が見つかり、その複合体 の立体構造が X 線結晶構造解析により決定された [19]。両者の結合には 14 個の 分子間水素結合が重要な役割を果たしており、コア蛋白質側で水素結合に関与 する領域はアミノ酸配列中の 29 番目から 39 番目までの 11 残基であることが分 かった [19]。この領域は疎水性残基に富み、RNA結合に関与する可能性があり、 HCV の感染性ウィルス産生にとって非常に重要な領域であることも報告されて いる [20-23]。また、コア蛋白質 N 末端側 82 残基(Core82)だけでも RNA と結合 でき、RNA 存在下ではコア蛋白質と同じく、ヌクレオカプシド様粒子を形成す ることが示された。また Core82 の円偏光二色性(CD)スペクトル解析から、Core82 はランダムコイルであることが分かった。すなわち、特定の二次構造を取らず、

4

柔軟性に富んでいるため、Core82 は天然変性蛋白質に分類される [24]。一般に 天然変性蛋白質はその柔軟性のため、様々な蛋白質と結合でき、多様な働きを 持つことが知られている [24]。つまり、コア蛋白質のN末端側は、RNA および 蛋白質との結合を介して、様々な機能に関与する可能性がある。

一方、ドメイン1とドメイン2からなる成熟コア蛋白質(Core179)の一部は微小管および微小管結合モーター蛋白質(ダイニンとキネシン)の作用を介して核へと移行することが明らかとなったが (Fig. 2) [6, 25-27]、その際ドメイン2が脂肪滴と結合することで、核周辺に脂肪滴が蓄積し、HCVのウィルス粒子産生を促進することが示された。脂肪滴と結合でき疎水性が高いドメイン2を持つことから、Core179は非常に凝集体を作りやすい [20]。



Figure 2. コア蛋白質の各ドメイン。シグナルペプチダーゼ(SP)の分解により、未成熟コ ア蛋白質(Core191)がエンベロープ蛋白質 E1 から切り離される。Core191 は細胞質に局在 するが、シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)により、シグナルペプチドであるドメイン 3 が切断され、成熟コア蛋白質(Core179)ができ、細胞核内に移行する。

2003年、核内に移行するコア蛋白質はプロテアソーム活性化因子 PA28γと結合することが発見され、両者の細胞内における相互作用および共局在が確認された [28]。PA28γは、20S プロテアソームのプロテアーゼ活性を促進する蛋白質

である PA28α および PA28β のホモログとして発見された蛋白質である。PA28α と PA28β は細胞質に局在してヘテロ 7 量体を形成し、MHC class I 抗原提示に関 わるペプチドの産生に重要な働きをしている。一方、PA28γ は核内に局在しホモ 7 量体を形成しており、核内のプロテアソーム活性化機能を持つ [29]。また、 PA28γ は p53 と p53 を抑制する E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 蛋白質の 結合を強めることで、p53 の分解を促進し、アポトーシスや細胞老化を抑えるこ とも明らかになっている [30, 31]。

PA28γは核内において、プロテアソームによるコア蛋白質のユビキチン非依存 的分解に関与している [32]。さらに、CoreTgマウスにおいて PA28γ 遺伝子をノ ックアウトすると、細胞核内でコア蛋白質が蓄積したが、それによる肝機能障 害は著しく抑制されていた。従ってコア蛋白質の PA28γ 依存的核内局在および 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と示 唆された [33]。最近では、PA28γ 依存的に分解されたコア蛋白質の断片が、細 胞質におけるコア蛋白質のユビキチン依存性プロテアソーム分解を阻害するこ とで、HCV の増殖を促進することも報告された [34]。

先述したように、これまで、コア蛋白質および PA28γ それぞれの機能に関し ては多くの知見が報告されてきた [15, 17, 30, 31, 35, 36]。しかし、両者の相互作 用に関する研究は限られている。また、数少ないこれらの報告では、主に両者 を発現させた培養細胞内における両者の相互作用が調べられ、コア蛋白質 -PA28γ 間の相互作用の詳細は明らかとなっていない。精製した蛋白質を用いた 溶液中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 的に結合親和性などを評価することができる。そこで、本研究では、コア蛋白 質フラグメントと PA28γ を精製し、溶液中における両者の物性および分子間相 互作用を解明するために、物理化学的手法を用いた解析を行った。

第一章では、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蛋白質断片(コアフラグ メント)を作製し、その物性を解析した。その結果、物理化学的実験に適してい ることが判明した Core71 と PA28yの相互作用について、等温滴定熱量測定(ITC)

6

と核磁気共鳴法(NMR)を用いて解析した。

第二章では、Core71 および PA28γ と 20S プロテアソームの三者について相互 作用を native PAGE を用いて解析し、またプロテアソーム活性アッセイを用いて、 Core71 が 20S プロテアソーム活性にどのような影響を与えるか調べた。また、 以上の結果を踏まえて、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。

本論

第一章 HCV コアフラグメントと PA28γ の相互作用解析 第一節 背景

序論で述べたように、細胞内における HCV コア蛋白質と PA28γの相互作用お よび共局在は確認されている [28]。CoreTg マウスにおける HCC の発生に両者 の相互作用が寄与していることが示唆された [33]。しかし、*in vitro* における両 者の分子間相互作用は未だ定量的に評価されていない。そこで、本章では、コ ア蛋白質と PA28γの直接相互作用について、物理化学的手法を用いて解析を行 った。

第二節 結果と考察

第一項 HCV コアフラグメントと PA28y の物性解析

HCV コア蛋白質のC末端領域であるドメイン2は脂肪滴や小胞体膜と結合す る機能を持っているため、非常に疎水性の高い領域である。そのため、溶液中 でコア蛋白質が自己会合する可能性が高く、物理化学的手法を用いた実験に適 しないことが考えられる。そこで、本研究では、分子間相互作用において重要 と考えられるコア蛋白質のN末端領域を保有し、C末端領域を除去したフラグ メント三種を作製し、それらの物理化学的性質を解析した。まずはコア蛋白質 の Met1-Leu151 までのフラグメント、Core151 を作製した。Core151 は最初に PA28γ と核内で共局在することが確認されたフラグメントである [28]。次に、 疎水性の高いドメイン2 を除き、ドメイン1のみで構成された(Met1-Arg117)フ ラグメント、Core117を作製した。コア蛋白質のドメイン1にも自己会合に関わ る領域(Pro82- Arg117)が存在している (Fig. 2) [6]。また、Leu44-Pro71 が PA28γ との相互作用に寄与していると報告された [28]ことから、N 末端から当該領域 を含む (Met1-Pro71) フラグメント、Core71 も作製した。これらのフラグメン トは、いずれも大腸菌を用い、精製のための His タグを付加して発現させたもの を精製して用いた。

精製した各コアフラグメントが溶液中で二次構造を保持しているかどうかを、 円偏光二色性(CD)スペクトルを用いて解析した。その結果、三つのフラグメン トすべてがランダムコイルの典型的なスペクトルを示し、二次構造をとってい ないことが分かった(Fig. 3)。すなわち、天然変性蛋白質であることが報告され ている Core82 [24]同様に、今回作成したフラグメントも天然変性蛋白質である ことが分かった。



Figure 3. Core151、Core117 および Core71 の CD スペクトル。(A) Core151、(B) Core117、(C) Core71 すべてがランダムコイル特有なスペクトルを示した。

これらのコアフラグメントの溶液中での会合状態を調べるため、超遠心分析 沈降速度法(SV-AUC)を用いて解析を行った。温度 20 ℃、ローターの回転数 60,000 rpm、緩衝液: 500 mM NaCl-PBS で測定を行い、沈降係数 *s*_{20,w}の分布 c(*s*) を求めた (Fig. 4)。



Figure 4. Core151、Core117 および Core71 の超遠心分析沈降速度法の測定結果。(A) (B) Core151 と Core117 は 10-30 S にかけて高分子量会合体の形成が観測された。(C) Core71 は高分子量会合体を形成しなかった。

SV-AUC の結果から、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。

次に、PA28y についても同じように大腸菌を用いて発現させ、精製した。CD スペクトルを測定した結果から、PA28y は、既に X 線結晶構造が報告されてい る PA28a および PA28β 同様に、 α ヘリックスに富んだ二次構造を保持している ことが示された (Fig. 5)。



Figure 5. PA28γ \mathcal{O} CD $\mathcal{A}^{\wedge}\mathcal{O} \vdash \mathcal{V}_{\circ}$

また、PA28γの会合状態を調べるため、SV-AUC を用いて解析を行った。温度 20 、ローターの回転数 30,000 rpm、緩衝液:500 mM NaCl-PBS で測定を行い、 沈降係数 *s*_{20,w}の分布 c(*s*)を求めた (Fig. 6)。解析の結果、8.3 S の成分が大部分を 占めていることが分かった。沈降係数 *s*_{20,w}から見積もった分子量は 216 kDa で あった。アミノ酸配列から予測される PA28γの分子量は 29.5 kDa なので、溶液 中の PA28γ は、電子顕微鏡像から同定された結果 [29]と同様、7 量体を形成し ていることが分かった (Table 1)。



Figure 6. PA28γの超遠心分析沈降速度法の測定結果。8.3 Sの成分が大部分を占めており、沈光係数 *s*_{20,w}から見積もった分子量は 216 kDa であった。

Table 1	1. <i>S</i> _{20,w}	値かり	ら求め	た分子	量と	PA28y	の分子	量の比較。
---------	------------------------------------	-----	-----	-----	----	-------	-----	-------

s _{20,w} から算出したMw (A)	PA28γ単量体のMw (B)	(A)/(B)
216 kDa	29.5 kDa	7.3

第二項 Core71 と PA28y の相互作用解析

Core71 と PA28y との分子間相互作用を調べるために、等温滴定型熱量計(ITC) を用いて測定を行った。熱量計のセル側には 35 µM (7 量体換算の濃度)の PA28y を入れ、シリンジ側の 800 µM の Core71 を滴下したところ、両者の結合は発熱 反応を示し、下に示す滴定曲線が得られた(Fig. 7)。ここから結合の解離定数(Kd) は 15.4 µM と算出され、Core71 と PA28y は相互作用をすることが示された。



Figure 7. Core71 と PA28γの ITC 測定結果。両者が *K*d = 15.4 μM の強さで結合すること が分かった。

PA28γ がどのように 20S プロテアソームの基質認識に関わっているかについ ては、不明な点が多い。ホモログである PA28α と PA28β の立体構造からは、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、 20S プロテアソームの結合面と反対側に位置することが示唆されている (Fig. 8)。 homolog-specific insert loop 自体の立体構造は、おそらくその高い柔軟性のため、 未だ決定されていない [37, 38]が、その配置から 20S プロテアソームへ取り込ま れる基質と最初に相互作用する部位であると考えられる。そこで Core71 が PA28γ の homolog-specific insert loop に結合するかどうかを調べるため、PA28γ の全体構造に影響しないよう、homolog-specific insert loop を 5 アミノ酸 (Gly-Gly-Ser-Gly-Gly) からなる短いリンカーに置換した変異体、PA28γΔloop を設計し (Fig. 9)、Core71 との相互作用を解析した。



20Sプロテアソーム結合部位(bottom)

Figure 8. PA28γ 七量体の立体構造モデル。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 は柔軟性が高いため、特定の立体構造は持たな いと考えられるが、PA28γ-20S プロテアソーム複合体のトップ側に存在する。従って、 基質の取り込みに関与していると考えられる。

- A MASLLKVDQEVKLKVDSFRERITSEAEDLVANFFPKKLLELDSFLKEPILNIHDLTQIHSDMN LPVPDPILLTNSHDGLDGPTYKKRRLDECEEAFQGTKVFVMPNGMLKSNQQLVDIIEKVKP EIRLLIEKCNTVKMWVQLLIPRIEDGNNFGVSIQEETVAELRTVESEAASYLDQISRYYITRAK LVSKIAKYPHVEDYRRTVTEIDEKEYISLRLIISELRNQYVTLHDMILKNIEKIKRPRSSNAETLY
- B MASLLKVDQEVKLKVDSFRERITSEAEDLVANFFPKKLLELDSFLKEPILNIHDLTQIHSDMN LGGSGGMLKSNQQLVDIIEKVKPEIRLLIEKCNTVKMWVQLLIPRIEDGNNFGVSIQEETVAE LRTVESEAASYLDQISRYYITRAKLVSKIAKYPHVEDYRRTVTEIDEKEYISLRLIISELRNQYV TLHDMILKNIEKIKRPRSSNAETLY

Figure 9. PA28γΔloopの作製。(A) PA28γのアミノ酸配列。homolog-specific insert loop に相当 する領域は赤色で示した。(B) PA28γΔloop のアミノ酸配列。homolog-specific insert loop を GGSGG に置き換えた。 Core71 と PA28y Δ loop との直接相互作用を調べるために、ITC を用いて測定を 行った。熱量計のセル側には 35 μ M (7 量体換算の濃度)の PA28y Δ loop を入れ、 シリンジ側の 800 μ M の Core71 を滴下したところ、下に示す滴定曲線が得られ た(Fig. 10)。両者の結合は発熱反応を示し、結合の解離定数(*K*d)は 14.1 μ M と算 出された。この結果から、Core71 と PA28y、PA28y Δ loop それぞれの結合の強さ に差はなく、Core71 との結合には、PA28y の homolog-specific insert loop が寄与 していないと示された。



Figure 10. Core71 と PA28 γ Δloop の ITC 測定結果。両者が Kd = 14.1 μ M の強さで結合することが分かった。

さらに、核磁気共鳴法(NMR)を用いて Core71 が PA28y homolog-specific insert loop に与える影響を調べた。PA28y 七量体は合計で 1778 アミノ酸からなり、分 子量 210 kDa の巨大分子である。従って、分子全体の回転拡散が制限されるこ とから多くの¹H についてその横緩和時間は非常に短くなり、NMR シグナルの 線幅が増大して溶液 NMR での観測は困難である。しかし、メチル基については、 分子内回転によって横緩和時間が長くなり、NMR での測定が可能であると予想 された。そこで、PA28y の homolog-specific insert loop に 1 残基だけ存在するシス テイン残基(Cys92)に注目し、ジスルフィド結合を用いて、このシステイン残基 だけを ¹³CH₃ で標識することで (Fig. 11)、Core71 との相互作用を NMR で観測す ることを試みた。NMR 測定の結果、Core71 の有無による化学シフト変化は確 認されなかった (Fig. 12)。ITC の測定結果と同様、PA28y の homolog-specific insert loop は Core71 と直接に相互作用していないことが示された。また Core71 結合によってその構造変化が誘起されていないことが示され、PA28y における Core71 結合部位は、homolog-specific insert loop から離れたボトム側に位置する と考えられた。



Figure 11. PA28γ homolog-specific insert loop の同位体標識。図中では PA28γ homolog-specific insert loop 配列上にある Cys92 がボールで表示されている。パネル内に示すように、Cys92 のチオール基に-S-¹³CH₃ ラベルが導入される。



Figure 12. NMR による Core71 と PA28γ homolog-specific insert loop の相互作用測定結果。 Core71 存在下と非存在下における化学シフト変化は観測されなかった。

第三項 Core44-71 と PA28y の相互作用解析

前項で Core71 が PA28γ と結合することが明らかとなった。これは第二節の第 一項で述べたように、コア蛋白質ドメイン1の Leu44-Pro71 が PA28γ との相互作 用に寄与している [28]という先行研究と矛盾しない。そこで、相互作用部位を 限定すべく、コア蛋白質の Leu44-Pro71 で構成されるペプチド、Core44-71 を用 意した。Core71 と同様、ITC を用いて、PA28γ との直接相互作用を調べた。熱 量計のセル側には 35 μM (7 量体換算の濃度)の PA28γ を入れ、シリンジ側の 700 μM の Core44-71 を滴下したところ、複合体形成による発熱は観測されたが、単 純な結合モデルでは説明できないような滴定曲線が得られた(Fig. 13 A)。



Figure 13. Core44-71 と PA28γ および PA28γΔloop の ITC 測定結果。(A) Core44-71 と PA28γ の ITC 測定結果。両者の複合体形成による発熱は観測されたが、単純な結合モデルでは なかった。(B) Core44-71 と PA28γΔloop の ITC 測定結果。こちらも両者の複合体形成に よる発熱は観測されたが、単純な結合モデルではなかった。

Core44-71 と PA28γΔloop についても、同様な条件で ITC 測定を行ったが、図 に示すように PA28γ と同じような結果が得られ(Fig. 13 B)、PA28γΔloop も Core44-71 と複合体形成による発熱は観測されたが、単純な結合モデルでは説明 できないような滴定曲線が得られた。従って、Core71 と PA28γ との相互作用に おいては、Core71 の Met1-Arg43 領域も何らかの役割を果たしていると考えられ た。

第二章 Core71 によるプロテアソーム活性阻害

第一節 背景

第一章において、HCV コア蛋白質フラグメント Core71 が、溶液中で PA28γ と結合することが ITC を用いて確認された。序論で述べたように、PA28γ 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 PA28γ の相互作用は、PA28γ 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、第二章では、Core71 が PA28γ-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。第二節の第一項では、ま ず Core71、PA28γ と 20S プロテアソーム三者の相互作用を調べた。第二項で は Core71 が 20S プロテアソーム活性にもたらす変化を調べた。第三項では、 第一項と第二項の結果を踏まえて、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提案した。

第二節 結果と考察

第一項 Core71、PA28y と 20S プロテアソームの相互作用解析

20S プロテアソームは 28 個のサブユニットが会合して形成される超分子複合体であり、発現精製した個々のサブユニットから再構成することは困難である。従って、高濃度を要する ITC 測定に供する試料を用意することができない。よって、本項では、赤血球由来 20S プロテアソームを用い、native PAGEにより Core71 および PA28γ との相互作用を解析した。これまでに、Core71 とPA28γ との結合が確認され、またプロテアソーム活性化因子である PA28γ と 20S プロテアソームが結合することもすでに知られているので、最初に Core71 と

20S プロテアソームが結合するかどうかを調べた。Core71 と 20S プロテアソー ムを混合して、native gel で泳動した結果、Core71-20S プロテアソーム複合体に 対応するバンドが確認され、Core71 と 20S プロテアソームが結合することが分 かった (Fig. 14)。



Figure 14. Core71 と 20S プロテアソームの native PAGE。(lane 1) 20S プロテアソーム単体。(lane 2) Core71 と 20S プロテアソームの混合物。20S プロテアソームのバンドが薄くなり、その上に、Core71-20S プロテアソーム複合体のバンドが確認された。Core71 と 20S プロテアソームが結合することが分かった。

次に、Core71、PA28γ と 20S プロテアソーム三者の相互作用解析を、native PAGE で調べた (Fig. 15)。PA28γ と 20S プロテアソームを単独で native PAGE で泳動させた場合、シングルバンドが観測された (Fig. 15 lane 1 and lane 2)。 両者を混合したサンプルでは、PA28γ-20S プロテアソーム複合体のバンドは 確認されなかったものの、PA28γ のバンドが薄くなっており、また、20S プロ テアソームのバンドが上側にシフトする傾向がみられた(Fig. 15 lane 3)。同様 の結果が PA28γ のホモログである PA28α/β と 20S プロテアソームを用いた研 究でも報告されている [39]。これは、ユビキチン依存性分解を促進するプロテ アソーム活性化因子である 19S 制御因子と 20S プロテアソームの複合体は明瞭 にシフトしたシングルバンドを示す [40] ことと対照的である。このことから、 PA28γ と 20S プロテアソームとの結合は比較的弱く、native PAGE の条件では解 離会合によりシフトバンドを示さないことが示唆される。一方、Core71 と PA28γ を混合したサンプルでは、PA28γ より遅い移動度を示し PA28γ-Core71 複合体 に相当すると考えられる明瞭なシングルバンドが確認された (Fig. 15 lane 4)。 これは ITC の結果と一致し、両者の相互作用を支持する結果である。20S プ ロテアソーム、Core71 と PA28γ、三者を混合したサンプルでは、PA28γ のバン ドが完全になくなり、20S プロテアソームのバンドも lane 3 に比べ薄くなり、 そしてさらに上側にシフトする傾向をみせた (Fig. 15 lane 5)。この結果は、 Core71 と PA28γ の結合が、PA28γ と 20S プロテアソームとの結合を阻害せず、 むしろ促進する傾向があることを示している。



Figure 15. Core71、PA28γと20S プロテアソーム三者の native PAGE。(lane 1) PA28γ単体。(lane 2) 20S プロテアソーム単体。(lane 3) PA28γと20S プロテアソームの混合物。 PA28γ単体のバンドが薄くなり、20S プロテアソーム単体のバンドは上側にシフトする傾向をみせた。(lane 4) Core71と PA28γの混合物。両者の複合体のバンドが確認された。(lane 5) 三者の混合物。PA28γ単体のバンドが完全になくなり、20S プロテアソーム単体のバンドも lane 3 に比べ薄くなり、さらに上側にシフトする傾向をみせた。

第二項 20S プロテアソームの活性変化

本項では、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。PA28γのホモログである PA28α と PA28β が形成するヘテロ 7 量体 PA28α/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、PA28γ は 20S プロテアソームの trypsin-like 活性のみを 活性化する [29]。よって、本研究でも 20S プロテアソームの trypsin-like 活性を 評価した。trypsin-like 活性測定には蛍光基質 Boc-Leu-Arg-Arg-AMC を用いた。

まずは、20S プロテアソームに異なる濃度の PA28γ を加え、PA28γ による 20S プロテアソーム活性化を調べた。各サンプルを調製して、4 時間インキュベー トした。PA28γ 非存在下で 20S プロテアソームに分解された基質の蛍光強度 を1とし、異なる濃度の PA28γ を加えたサンプルと 20S プロテアソーム単独 時との比率を図に示した。測定の結果、20S プロテアソームによる基質の分 解は PA28γ の濃度に依存して増加することが示され、精製 PA28γ 蛋白質が十 分な 20S プロテアソーム活性化作用を示すことが確認できた (Fig. 16)。



Figure 16. PA28γによる 20S プロテアソーム活性化。異なる濃度(0, 0.06, 0.1, 0.2, 0.6 μg) の PA28γ存在下で、20S プロテアソームに分解された Boc-Leu-Arg-Arg-AMC の蛍光強度 を、20S プロテアソーム単独時に対する比率として図に示した。エラーバーは n = 3 の標 準偏差(S.D.)を示した。t 検定により、20S プロテアソーム単独と PA28γ(0.6 μg)のサンプ ル間で、p<0.01 で有意な上昇が認められた。(**p<0.01)

次に、最も 20S プロテアソーム活性化を示した条件(PA28y = 0.6 µg)下で、異 なる濃度の Core71 による 20S プロテアソーム活性変化を調べた。測定の結果、 PA28y 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。一方、PA28y 非存在下で、Core71(0.4 µg)のみ を 20S プロテアソームに加えても、20S プロテアソーム単独時の活性に影響 を与えなかった。つまり、Core71 は PA28y に依存して、20S プロテアソーム 活性を阻害することが分かった (Fig. 17)。Core71 は、PA28y-20S プロテアソー ム複合体の活性調節因子のように作用することが示された。



Figure 17. Core71 は PA28γ に依存して、20S プロテアソーム活性を阻害する。異なる 濃度(0.016, 0.08, 0.2, 0.4 μg)の Core71 を PA28γ 存在下と非存在下の 20S プロテアソーム に添加した。20S プロテアソームに分解された Boc-Leu-Arg-Arg-AMC の蛍光強度を、20S プロテアソーム単独時に対する比率として図に示した。エラーバーは n = 3 の標準偏差 (S.D.)を示した。t 検定により、PA28γ(0.6 μg)と PA28γ(0.6 μg) + Core71(0.4 μg)のサンプル 間で、p<0.05 で有意な減少が認められた。(*p<0.05)

序論で述べたように、HCV コア蛋白質自身はユビキチン依存的およびユビキ チン非依存的な二つの経路を通じて、プロテアソームに分解される [32, 34, 41]。 よって、HCV コア蛋白質と同様、コアフラグメントである Core71 自体も 208 プロテアソームの基質となって分解される可能性がある。その場合、上記のア ッセイにおいては、Core71 が蛍光基質の分解を競合的に阻害することにより、 見かけ上調節因子として作用している可能性も否定できない。その可能性を 検討するため、プロテアソーム活性アッセイにおいて Core71 によって最もプ ロテアソーム活性が阻害された条件(0.6 μg の PA28γ と 0.4 μg の Core71)下で、 SDS-PAGE を用いて、Core71 が分解されるか調べた。プロテアソーム活性ア ッセイと同様、4 時間インキュベートしたのち、Core71 単独のサンプルと Core71 に PA28γ と 20S プロテアソームを加えたサンプルを SDS-PAGE で泳動 させた。その結果、Core71 単独と、三者の混合物とでは、Core71 のバンドに 変化は見られなかった。従って Core71 は PA28γ-20S プロテアソーム複合体に 分解されず、その基質とならないことが示唆された (Fig. 18)。



Figure 18. SDS-PAGE による Core71 分解確認。(lane 1) 0.4 µg の Core71。(lane 2) 0.4 µg の Core71、0.6 µg の PA28γ と 0.07 µg の 20S プロテアソーム。lane 1 と比べ、Core71 の バンドに差はなかった。

第三項 Core71 による 20S プロテアソーム活性阻害メカニズム

以上の結果をもとに、宿主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する (Fig. 19)。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 [7, 28]。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 PA28γ 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 [42-44]。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。

近年、PIP30 蛋白質が PA28γ と 20S プロテアソームの相互作用を促進し、かつ PA28γ-20S プロテアソーム複合体の活性を阻害するこが示され、内因性の PA28γ 調節因子として機能していることが報告された [45]。生化学的実験は PIP30 が 基質の PA28γ-20S プロテアソーム複合体への出入りを阻害していることを示唆 している [45]。PIP30 は PA28α/β とは結合せず、PA28γ と特異的に結合すること から、PIP30 が結合する領域は PA28γ の homolog-specific insert loop であると考え られた。一方、Core71 による 20S プロテアソーム活性の低下も PA28γ に依存し ているが、Core71 の結合に homolog-specific insert loop は関わっていない (Fig. 10)。 よって、筆者は Core71 が PA28γ と 20S プロテアソームの間にある開口部を閉塞 させることで、20S プロテアソームの機能を阻害すると考えた (Fig. 19)。その結 果、核内において、p21^{Cip1}、p16^{INK4A} や p19^{Arf}のような細胞周期を調節する蛋白 質のユビキチン非依存性プロテアソーム分解が阻害される可能性がある [46-48]。



Figure 19. Core71 の 20S プロテアソーム活性阻害メカニズム。成熟コア蛋白質が核に入るとホストプロテアソームの分解を受け、Core71 のような短いフラグメントができる。 PA28y 非存在下では 20S プロテアソーム活性に影響しないが、PA28y 存在下では、Core71 は PA28y-20S プロテアソーム複合体に結合し、その活性を下げる。

また、最近では、核内における 26S プロテアソーム複合体(19S 調節因子-20S プロテアソーム)と 30S プロテアソーム複合体(19S 調節因子-20S プロテアソーム -19S 調節因子)の存在が低温電子断層撮影(cryo-ET)や蛍光顕微鏡などにより発見 された [49-51]。これらの結果から、核内でのハイブリッドプロテアソーム複合 体(19S 調節因子-20S プロテアソーム-PA28y)の存在も示唆された。Core71 による プロテアソーム開口部の閉塞はハイブリッドプロテアソーム複合体の活性を下 げることができ、また、Core71 による PA28y-20S プロテアソーム相互作用促進 は 26S や 30S プロテアソーム複合体の形成にも影響することが考えられる。こ れらの作用により、Core71 は核内のユビキチン依存性プロテアソーム分解をも 阻害することができる。従って、Core71 のような HCV コア由来フラグメントは、 核内プロテアソーム活性を阻害し、核内蛋白質の発現量制御や品質管理機構を 破綻させうる。その結果、細胞周期の異変を引き起こされれば、HCC の進展に つながると考えられる [15]。この現象は、PA28y 依存的に進行すると考えられ ることから、HCV コア蛋白質による病態発現が、PA28y 遺伝子ノックアウトに より回避されるメカニズムと関連している可能性が示唆される。 結語

本研究では *in vitro* における HCV コアフラグメント(Core71)と PA28y 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、PA28y 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 PA28y 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。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導いただきました大阪大学大学院薬学研究 科高分子化学分野 大久保忠恭教授、吉田卓也准教授、河原一樹助教に謹んで感 謝の意を表します。研究期間を通じて多くの重要な御意見を頂きました近畿大 学理工学部 島本茂講師、並びに、大阪大学薬学研究科 小林祐次名誉教授、大 阪大学工学部 丸野孝浩研究員に深く感謝申し上げます。

本論文を作成するにあたり、有益なご指導を賜りました大阪大学大学院薬学 研究科 情報・計量薬学分野 高木達也教授、並びに、大阪大学大学院薬学研究 科 天然物創薬学分野 荒井雅吉教授に厚くお礼申し上げます。

多くの場面で御協力いただきました大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分 野の皆様に深く感謝を申し上げます。

また、修士課程1年間および博士後期課程3年間において特別研究奨励金を 支給していただきました小林国際奨学財団に深く感謝いたします。

最後に、研究活動に理解を示し、長い学生生活の間ずっと見守ってくれた両 親に心より感謝いたします。

28

実験の部

材料

His タグ切断に用いるトロンビンは Sigma-Aldrich 社より購入した。ヒトの 20S プロテアソームは Boston Biochem 社より購入した。プロテアソーム活性 アッセイに使用した蛍光基質およびプロテアソーム阻害剤は Peptide Institute 社 より購入した。その他の試薬はすべて Nacalai Tesque 社より購入した。

方法

コアフラグメントの発現・精製

コアフラグメント-6×His を発現するプラスミドを作製するために、コア蛋白 質をコードする DNA 断片を His タグ融合蛋白質発現用の pET-21a ベクターに組 み込んだ。コア蛋白質の DNA 断片をそれぞれ Nde I と Xho I の制限酵素認識サ イトを含むプライマーを用いて PCR 法で増幅し、Nde I と Xho I で切断して、 pET-21a の Nde I と Xho I サイトに組み込んだ。

作製したプラスミドを用いて、大腸菌株の一種である BL21 (DE3)を形質転換 した。pET-21a にはアンピシリン耐性遺伝子が組み込まれているので、37 ℃ の LB 培地(アンピシリン 50 mg/L 添加)で選択培養を行った。培地の OD₆₀₀ が 0.6 の 時点で培地中に最終濃度が 0.5 mM となるように IPTG を添加し、約 4 時間コア フラグメント-6×His を誘導し、遠心(4000 g, 15 min)により集菌した。

集菌した大腸菌を Phosphate 緩衝液 Saline(PBS: 136.9 mM NaCl, 7.75 mM Na2HPO4, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄)で懸濁し、氷上で超音波破砕を行うことで、菌体を破砕した。この溶液を遠心処理(22,000 g, 30 min)し、沈殿物と上清を分けた。さらに沈殿物を 8 M Urea, 500 mM NaCl-PBS で懸濁し、氷上で超音波破砕を行った。この溶液を遠心処理 (22,000 g, 30 min)することで、コアフラグメント-6×His を可溶化することができた。

上清を HisTrap Chelating カラムにアプライし、8 M Urea, 500 mM NaCl-PBS 20mM Imidazole でカラムを洗い、8 M Urea, 500 mM NaCl-PBS 500 mM Imidazole でコアフラグメント-6×His を溶出した。

続いて、溶出したコアフラグメント-6×His を、公称分画分子量(NMWL):3 kDa のアミコンチューブを用いて、数回の遠心(4500 g)により溶媒から Urea を除き、 濃縮した。濃縮されたサンプルは液体窒素で凍結させ、実験に用いるまで、-80°C に保存した。

PA28γ の発現・精製

PA28γをコードする DNA 断片を 6×His 融合蛋白質発現用の pET-15 ベクター に組み込み、6×His-PA28γ蛋白質を発現するプラスミドを作製した。作製したプ ラスミドによって、大腸菌株の BL21(DE3)を形質転換した。pET-15 にはアンピ シリン耐性遺伝子が組み込まれているので、37 °C の LB 培地(アンピシリン 50 mg/L 添加)で選択培養をおこなった。培地の OD₆₀₀ が 0.6 に達した時点で培地中 に最終濃度が 0.5 mM となるように IPTG を添加し、約4時間 6×His-PA28γ を誘 導し、遠心(4000 g, 15 min)により集菌した。集菌した大腸菌を Phosphate 緩衝液 Saline(PBS: 136.9 mM NaCl, 7.75 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄)に 懸濁させ、氷上で超音波破砕を行い、菌体を破砕した。この溶液を遠心処理(22000 g, 30 min)することで、6×His-PA28γ を可溶性画分に得ることができた。

上清をフィルター処理(0.8 μm)し、HiTrap Chelating カラム(キレートカラム)に アプライして、500 mM NaCl-PBS の緩衝液で 0-500 mM イミダゾールの濃度勾配 によって、6×His-PA28γ を溶出した。溶出した 6×His-PA28γ を NMWL : 10 kDa のアミコンチューブを用いて、数回の遠心(4500 g)により濃縮した。スロンビン を添加し、20 °C で 24 時間放置して、PA28γ から His タグを切断した。

スロンビン処理の終えた PA28γ サンプルを Superdex 200 (ゲルろ過カラム)に アプライして、500 mM NaCl-PBS の緩衝液でゲルろ過を行い、溶出した PA28γ を NMWL: 10 kDa のアミコンチューブを用いて、数回の遠心(4500 g)により濃縮

30

した。濃縮されたサンプルは液体窒素で凍結させ、実験に用いるまで、-80°C に 保存した。

円偏光二色性(CD)スペクトル解析

測定機器には J-720W(日本分光製)を用い、0.1 cm セルを使用した。

コアフラグメントの溶媒は PBS とし、蛋白質濃度は 16.5 μM、温度は 20 °C、 積算回数 16 回で測定を行った。

PA28γの場合、0.01 cm セルを使用した。溶媒は 500 mM NaCl-PBS とし、蛋白 質濃度は 66 μM、温度は 20 °C、積算回数 16 回で測定を行った。

得られた楕円率 θ (mdeg)を方程式(1)により平均モル残基楕円率[θ] (deg cm² dmol⁻¹) に換算した。

$$[\theta] = \theta \cdot 100/(1 \cdot \mathbf{c} \cdot \mathbf{A}) \tag{1}$$

1は cm 単位の光路長、c は蛋白質のモル濃度、A は測定した蛋白質のアミノ酸残基数である。

超遠心分析沈降速度法(SV-AUC)

分析用超遠心機は Optima XL-I 分析用遠心機(Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を使用し、ローターは Beckman An-60Ti (4 穴)、アルミ製の Double-sector センタ ーピース、サファイアウィンドウを用いた。コアフラグメントの場合は回転数 60,000 rpm とし、PA28 γ の場合は回転数 30,000 rpm とした。溶媒は 500 mM NaCl-PBS とし、測定間隔は 2 min とした。得られた測定データについてはプロ グラム Sedfit を用いて解析し、標準化した沈降係数 $s_{20,w}$ と存在比 C(s)を作図し た [52]。

等温滴定熱量測定(ITC)

等温滴定型熱量計は MicroCal iTC₂₀₀ (Malvern Panalytical, Malvern, UK)を使用 した。セル側には 35 μ M (7 量体換算) の PA28γ または PA28γ Δ loop を 200 μ L 入 れ、シリンジ側には 800 μ M の Core71 を 40 μ L 入れ、2 分毎に 2 μ L の Core71 溶液を 20 回滴下した。緩衝液はセル側、シリンジ側ともに 1 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP), 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 500 mM NaCl-PBS とし、測定温度は 25°C とした。測定終了後、得られたデー タをデータ解析ソフト Origin 7.0 (Microcal Software)を用いて 1:1 結合モデルで フィッティングし、解離定数(*Kd*)を計算した。

PA28γAloop プラスミドの作製

変異体プラスミド作製には、forward primer:GGTGGCTCTGGCGGTATGCTG AAAAGCAACCAGCAGCTG と reverse primer:CATACCGCCAGAGCCACCGAG ATTCATGTCAGAGTGGATCTG を使用した。プライマーおよび PA28 γ のテンプ レートプラスミドを含む PCR 反応液を Table 2 に示すように調製し、Table 3 に 示したプロトコールに従い、inverse PCR によりプラスミド全長を増幅した。そ の後、PCR 産物に制限酵素 DpnI を 1 μ L 加え、37°C で 1 時間放置したのち、80°C で 20 分処理した。Table 4 に示すような条件で、50°C で 30 分処理し、PCR 産物 を閉環させた。処理後の反応液 3 μ L で DH5 α を形質転換し、生じたコロニーか ら変異体を含むクローンを得た。

10 µM forward primer	1 µL
10 µM reverse primer	1 µL
PA28γ template plasmid	1 µL
滅菌水	7 µL
Q5 2X Master Mix	10 µL

Table 2. PCR 反応液組成。

Table 3. PCR プロトコール。

98°C	30 sec	
98 ℃	10 sec	ו
57 °C	20 sec	x 25 cycle
€ 72°C	3 min 💪	J
72 °C	2 min	
10°C	∞	

Table 4. プラスミド閉環処理。

Dpnl反応産物	2 µL
滅菌水	3 µL
NEB builder HiFi DNA Assembly Maxter Mix	5 µL

Cys の¹³CH₃-S-標識

PA28γ に還元剤として適量の 0.1M TCEP 溶液(中性)を加え、25°C で 2 時間放置した。反応バッファーは 1 mM EDTA, 500 mM NaCl-PBS とし、脱気しながら 氷冷をした。10°C で NAP-10 カラムを使用して、2 時間 TECP 処理した PA28γ の溶媒を反応バッファーに置換し、前もって準備した 100 mM Methyl Methanethiosulfonate (MMTS)-¹³CH₃ を Cys 残基の 1.5-2.0 モル当量加え、4°C でオ ーバーナイト反応させた。最後に、NMWL: 10 kDa のアミコンチューブを用い て、¹³CH₃-S-標識後の PA28γ の溶媒を測定バッファー(1 mM EDTA, 500 mM NaCl-PBS)に置換し、必要に応じて濃縮し、NMR 測定に用いた。

NMR 滴定実験

NMR 測定は Agilent Technologies 社製 INOVA 600 で行い、プローブは ¹H/¹³C/¹⁵N Z 軸 PFG 三重共鳴型を用いた。測定温度は 30°C とした。スペクト ルの FT 処理は NMRPipe (NIH)を使用した [53]。

Native PAGE

溶媒をPBSとする蛋白質サンプルは25°Cで15 minインキュベートしたのち、 0.5 μL のサンプルバッファー(キシレンシアノール FF を適量溶かした 50% glycerol 250 mM Tris-HCl バッファー)を加え、4%のポリアクリルアミドゲルに アプライし、泳動バッファー(90 mM Tris, 90 mM ホウ酸)、4.5 時間(100V, 4°C) 泳動した。最後にクーマシーブリリアントブルー(CBB)で染色した。各タンパク 質サンプルのゲルへの添加量は以下の表に示す (Table 5 - 7)。

Table 5. Core71 と 20S プロテアソームの native PAGE (Fig.14) のサンプル調製。

Figure 14.	lane 1	lane 2
Core71	-	0.08 µg
20Sプロテアソーム	0.35 µg	0.35 µg

Table 6. Core71、PA28γと20S プロテアソーム三者のnative PAGE (Fig.15)のサンプル調製。

Figure 15.	lane 1	lane 2	lane 3	lane 4	lane 5	
Core71	-	-	-	0.08 µg	0.08 µg	
20Sプロテアソーム	-	1.4 µg	1.4 µg	-	1.4 µg	
ΡΑ28γ	0.84 µg	-	0.84 µg	0.84 µg	0.84 µg	

Figure 18.	lane 1	lane 2
Core71	0.2 µg	0.2 µg
20Sプロテアソーム	-	3.5 ng
ΡΑ28γ	-	0.03 µg

Table 7. Core71 分解確認の SDS-PAGE (Fig.18) のサンプル調製。

プロテアソーム活性アッセイ

プロテアソーム活性アッセイには black flat-bottom 96-well plates (Nunc)を用いた。溶媒は PBS とし、最終液量 100 μ L で 25°C、4 時間インキュベートしたのち、 SpectraMax M5e マイクロプレートリーダー(Molecular Devices Japan)で切断された基質 Boc-Leu-Arg-Arg-AMC の蛍光強度を測定した(励起光 360 nm, 発光 460 nm)。各タンパク質サンプル、蛍光基質の濃度およびプレートへの添加量(μ L)は以下の表に示す (Table 8 and 9)。プロテアソーム阻害剤 Z-leu-leu-Nva-CHO (MG-115)はネガティブコントロール(NC)として用いた。

	PBS	20S (10 nM)	PA (700 nM)	阻害剤 (10 mM)	基質 (2 mM)	
blank	90				10	
	80	10			10	
NC	78	10		2	10	
	77	10	3		10	
	75	10	5		10	
	70	10	10		10	
	50	10	30		10 添加量(total 100	μL)) μL

Table 8. PA28γによる 20S プロテアソーム活性化を評価するプロテアソーム活性アッセ イのサンプル調製。阻害剤はZ-leu-leu-Nva-CHO (MG-115)、基質は Boc-Leu-Arg-Arg-AMC。

	PBS	20S (10 nM)	PA (700 nM)	Core71 (1 µM)	基質 (2 mM)
blank	90				10
	80	10			10
	50	10	30		10
	30	10		50	10
	48	10	30	2	10
	40	10	30	10	10
	25	10	30	25	10
		10	30	50	添加量(μL) 10 ^{total} 100 μL

Table 9. Core71 による 20S プロテアソーム活性阻害を評価するプロテアソーム活性アッセイのサンプル調製。

参考文献

- [1] World Health Organization, Global hepatitis report 2017 (2017).
- [2] D. Moradpour, F. Penin, C.M. Rice, Replication of hepatitis C virus, Nat Rev Microbiol, 5 (2007) 453-463.
- [3] S. E. Krieger, M. B. Zeisel, C. Davis, C. Thumann, H. J. Harris, E. K. Schnober, C. Mee, E. Soulier, C. Royer, M. Lambotin, F. Grunert, V. L. Dao Thi, M. Dreux, F. L. Cosset, J. A. McKeating, C. Schuster, T. F. Baumert, Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2–CD81–Claudin-1 associations, Hepatology, 51(2010) 1144-1157.
- [4] P. Simmonds, D. B. Smith, F. McOmish, P. L. Yap, J. Kolberg, M. S. Urdea, E. C. Holmes, Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions, J Gen Virol, 75 (Pt 5) (1994) 1053-1061.
- [5] D.B. Smith, J. Bukh, C. Kuiken, A.S. Muerhoff, C.M. Rice, J.T. Stapleton, P. Simmonds, Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource, Hepatology, 59 (2014) 318-327.
- [6] R.K. Lyn, G. Hope, A.R. Sherratt, J. McLauchlan, J.P. Pezacki, Bidirectional lipid droplet velocities are controlled by differential binding strengths of HCV core DII protein, PLoS One, 8 (2013) e78065.
- [7] Y. Mori, K. Moriishi, Y. Matsuura, Hepatitis C virus core protein: its coordinate roles with PA28gamma in metabolic abnormality and carcinogenicity in the liver, Int J Biochem Cell Biol, 40 (2008) 1437-1442.
- [8] M. Hijikata, N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, K. Shimotohno, Gene mapping

of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitroprocessing analysis, Proc Natl Acad Sci U S A, 88 (1991) 5547-5551.

- [9] V. Pène, C. Hernandez, C. Vauloup-Fellous, J. Garaud-Aunis, A. R. Rosenberg, Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment, J Viral Hepat, 16 (2009) 705-715.
- [10]S. Aizawa, T. Okamoto, Y. Sugiyama, T. Kouwaki, A. Ito, T. Suzuki, C. Ono, T. Fukuhara, M. Yamamoto, M. Okochi, N. Hiraga, M. Imamura, K. Chayama, R. Suzuki, I. Shoji, K. Moriishi, K. Moriya, K. Koike, Y. Matsuura, TRC8-dependent degradation of hepatitis C virus immature core protein regulates viral propagation and pathogenesis, Nat Commun, 7 (2016) 11379.
- [11]K. Moriya, H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, K. Koike, The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice, Nat Med, 4 (1998) 1065-1067.
- [12]K. Moriya, H. Yotsuyanagi, Y. Shintani, H. Fujie, K. Ishibashi, Y. Matsuura, T. Miyamura, K. Koike, Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice, J Gen Virol, 78 (Pt 7) (1997) 1527-1531.
- [13]Y. Shintani, H. Fujie, H. Miyoshi, T. Tsutsumi, K. Tsukamoto, S. Kimura, K. Moriya, K. Koike, Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance, Gastroenterology, 126 (2004) 840-848.
- [14] R. B. Ray, L. M. Lagging, K. Meyer, R. Ray, Hepatitis C Virus Core Protein Cooperates with ras and Transforms Primary Rat Embryo Fibroblasts to Tumorigenic Phenotype, J Virol, 70 (1996) 4438-4443.

- [15] M. Irshad, P. Gupta, K. Irshad, Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection, World J Hepatol, 9 (2017) 1305-1314.
- [16]M. Honda, S. Kaneko, T. Shimazaki, E. Matsushita, K. Kobayashi, L. H. Ping, H. C. Zhang, S. M. Lemon, Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells, Hepatology, 31 (2000) 1351-1359.
- [17] M. Suhail, S. S. Sohrab, A. Qureshi, M. Tarique, H. Abdel-Hafiz, K. Al-Ghamdi, I. Qadri, Association of HCV mutated proteins and host SNPs in the development of hepatocellular carcinoma, Infect Genet Evol, 60 (2018) 160-172.
- [18]J. Wang, R. Kang, H. Huang, X. Xi, B. Wang, J. Wang, Z. Zhao, Hepatitis C virus core protein activates autophagy through EIF2AK3 and ATF6 UPR pathway-mediated MAP1LC3B and ATG12 expression, Autophagy, 10 (2014) 766-784.
- [19]Y. T. Wang, Z. Y. Su, C. L. Chen, Potential of mean force of the hepatitis C virus core protein–monoclonal 19D9D6 antibody interaction. Biophys Chem, 145 (2009) 86-90.
- [20] S. Boulant, C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin, J. P. Lavergne, Hepatitis C Virus Core Protein IS a Dimeric Alpha-Helical Protein Exhibiting Membrane Protein Features, J Virol, 79 (2005) 11353-11365.
- [21] A.J. Pérez-Berná, A. S. Veiga, M. A. Castanho, J. Villalaín, Hepatitis C virus core protein binding to lipid membranes: the role of domains 1 and 2, J Viral Hepat, 15 (2008) 346-356.
- [22] M. Matsumoto, S. B. Hwang, K. S. Jeng, N. Zhu, M. M. Lai, Homotypic Interaction and Multimerization of Hepatitis C Virus Core Protein, Virology, 218

(1996) 43-51.

- [23] A. G. Angus, A. Loquet, S. J. Stack, D. Dalrymple, D. Gatherer, F. Penin, A. H. Patel, Conserved glycine 33 residue in flexible domain I of hepatitis C virus core protein is critical for virus infectivity, J. Virol, 86 (2012) 679-690.
- [24]J. B. Duvignaud, C. Savard, R. Fromentin, N. Majeau, D. Leclerc, S. M. Gagné, Structure and dynamics of the N-terminal half of hepatitis C virus core protein: An intrinsically unstructured protein. Biochem Biophys Res Commun, 378 (2009) 27-31.
- [25]F. Roohvand, P. Maillard, J. P. Lavergne, S. Boulant, M. Walic, U. Andréo, L. Goueslain, F. Helle, A. Mallet, J. McLauchlan, A. Budkowska, Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network, J Biol Chem, 284 (2009) 13778-13791.
- [26]K. Okamoto, Y. Mori, Y. Komoda, T. Okamoto, M. Okochi, M. Takeda, T. Suzuki, K. Moriishi, Y. Matsuura, Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation, J Virol, 82 (2008) 8349-8361.
- [27] V. Oehler, A. Filipe, R. Montserret, D. da Costa, G. Brown, F. Penin, J. McLauchlan, Structural analysis of hepatitis C virus core-E1 signal peptide and requirements for cleavage of the genotype 3a signal sequence by signal peptide peptidase, J Virol, 86 (2012) 7818-7828.
- [28]K. Moriishi, T. Okabayashi, K. Nakai, K. Moriya, K. Koike, S. Murata, T. Chiba, K. Tanaka, R. Suzuki, T. Suzuki, T. Miyamura, Y. Matsuura, Proteasome activator PA28gamma-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein, J Virol, 77 (2003) 10237-10249.

- [29] J. Li, X. Gao, J. Ortega, T. Nazif, L. Joss, M. Bogyo, A.C. Steven, M. Rechsteiner, Lysine 188 substitutions convert the pattern of proteasome activation by REGgamma to that of REGs alpha and beta, EMBO J, 20 (2001) 3359-3369.
- [30]Z. Zhang, R. Zhang, Proteasome activator PA28γ regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation, EMBO J, 27(2008) 852–864.
- [31] J. Liu, G. Yu, Y. Zhao, D. Zhao, Y. Wang, L. Wang, J. Liu, L. Li, Y. Zeng, Y. Dang,
 C. Wang, G. Gao, W. Long, D. M. Lonard, S. Qiao, M. J. Tsai, B. Zhang, H. Luo, X.
 Li, REGgamma modulates p53 activity by regulating its cellular localization, J Cell
 Sci, 123 (Pt 23) (2010) 4076-4084.
- [32] R. Suzuki, K. Moriishi, K. Fukuda, M. Shirakura, K. Ishii, I. Shoji, T. Wakita, T. Miyamura, Y. Matsuura, T. Suzuki, Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: a ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent mechanism, J Virol, 83 (2009) 2389-2392.
- [33]K. Moriishi, R. Mochizuki, K. Moriya, H. Miyamoto, Y. Mori, T. Abe, S. Murata, K. Tanaka, T. Miyamura, T. Suzuki, K. Koike, Y. Matsuura, Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis, Proc Natl Acad Sci U S A, 104 (2007) 1661-1666.
- [34]K. Moriishi, I. Shoji, Y. Mori, R. Suzuki, T. Suzuki, C. Kataoka, Y. Matsuura, Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus, Hepatology, 52 (2010) 411-420.
- [35]J. M. Yersak, H. L. Montie, E. S. Chevalier-Larsen, Y. Liu, L. Huang, M. Rechsteiner, D. E. Merry, The 11S Proteasomal Activator REGγ Impacts Polyglutamine-Expanded Androgen Receptor Aggregation and Motor Neuron

Viability through Distinct Mechanisms, Front Mol Neurosci, 10 (2017) 159.

- [36]S. Yeom, H. Jeong, S. S. Kim, K. L. Jang, Hepatitis B virus X protein activates proteasomal activator 28 gamma expression via upregulation of p53 levels to stimulate virus replication, J Gen Virol, 99 (2018) 655-666.
- [37]E. M. Huber, M. Groll, The Mammalian Proteasome Activator PA28 Forms an Asymmetric alpha4beta3 Complex, Structure, 25 (2017) 1473-1480 e1473.
- [38] J.R. Knowlton, S.C. Johnston, F.G. Whitby, C. Realini, Z. Zhang, M. Rechsteiner, C.P. Hill, Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha), Nature, 390 (1997) 639-643.
- [39] P. Cascio, M. Call, B.M. Petre, T. Walz, A.L. Goldberg, Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes, EMBO J, 21 (2002) 2636-2645.
- [40] S. Elsasser, M. Schmidt, D. Finley, Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis, Methods Enzymol, 398 (2005) 353-363.
- [41]J. Kwak, I. Tiwari, K.L. Jang, Hepatitis C virus core activates proteasomal activator 28gamma expression via upregulation of p53 levels to control virus propagation, J Gen Virol, 98 (2017) 56-67.
- [42]K. Hu, J.B. Jastrab, S. Zhang, A. Kovach, G. Zhao, K.H. Darwin, H. Li, Proteasome substrate capture and gate opening by the accessory factor PafE from Mycobacterium tuberculosis, J Biol Chem, 293 (2018) 4713-4723.
- [43] J. Witkowska, M. Gizynska, P. Grudnik, P. Golik, P. Karpowicz, A. Gieldon, G. Dubin, E. Jankowska, Crystal structure of a low molecular weight activator Blm-pep with yeast 20S proteasome insights into the enzyme activation mechanism, Sci Rep, 7 (2017) 6177.

- [44]D.M. Smith, S.C. Chang, S. Park, D. Finley, Y. Cheng, A.L. Goldberg, Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry, Mol Cell, 27 (2007) 731-744.
- [45]B. Jonik-Nowak, T. Menneteau, D. Fesquet, V. Baldin, C. Bonne-Andrea, F. Mechali, B. Fabre, P. Boisguerin, S. de Rossi, C. Henriquet, M. Pugniere, M. Ducoux-Petit, O. Burlet-Schiltz, A.I. Lamond, P. Fort, S. Boulon, M.P. Bousquet, O. Coux, PIP30/FAM192A is a novel regulator of the nuclear proteasome activator PA28gamma, Proc Natl Acad Sci U S A, 115 (2018) E6477-E6486.
- [46]X. Chen, L.F. Barton, Y. Chi, B.E. Clurman, J.M. Roberts, Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome, Mol Cell, 26 (2007) 843-852.
- [47] T. Kobayashi, J. Wang, H. Al-Ahmadie, C. Abate-Shen, ARF regulates the stability of p16 protein via REGgamma-dependent proteasome degradation, Mol Cancer Res, 11 (2013) 828-833.
- [48]X. Li, L. Amazit, W. Long, D.M. Lonard, J.J. Monaco, B.W. O'Malley, Ubiquitinand ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway, Mol Cell, 26 (2007) 831-842.
- [49]S. Albert, M. Schaffer, F. Beck, S. Mosalaganti, S. Asano, H.F. Thomas, J.M. Plitzko, M. Beck, W. Baumeister, B.D. Engel, Proteasomes tether to two distinct sites at the nuclear pore complex, Proc Natl Acad Sci U S A, 114 (2017) 13726-13731.
- [50]C.G. Pack, H. Yukii, A. Toh-e, T. Kudo, H. Tsuchiya, A. Kaiho, E. Sakata, S. Murata, H. Yokosawa, Y. Sako, W. Baumeister, K. Tanaka, Y. Saeki, Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of

the 26S proteasome, Nat Commun, 5 (2014) 3396.

- [51]C. Enenkel, Proteasome dynamics, Biochim Biophys Acta, 1843 (2014) 39-46.
- [52] J. Dam, P. Schuck, Calculating sedimentation coefficient distributions by direct modeling of sedimentation velocity concentration profiles, Methods Enzymol, 384 (2004) 185-212.
- [53]F. Delaglio, S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, J Biomol NMR, 6 (1995) 277-293.