OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Processing of hepatitis C viral polyprotein in Escherichia coli
Author(s)	菰田, 泰正
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82114
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	菰田泰正
論文題名 Title	Processing of hepatitis C viral polyprotein in *Escherichia coli* （大腸菌におけるC型肝炎ウイルスポリプロテインの切断）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

C型肝炎ウイルス（HCV）のゲノムには約3000アミノ酸からなる1本の前駆体ポリプロテインがコードされている。前駆体ポリプロテインは，宿主およびウイルスのプロテアーゼによって切断され，ウイルス粒子を構成する構造タンパク質とウイルスの複製に関係する非構造タンパク質が産生される。本研究の目的は，２つのウイルスプロテアーゼ，Cpro-1およびCpro-2のin vitro活性評価系を構築し，ウイルスプロテアーゼを標的としたHCV治療薬のシード化合物を探索することである。HCVのin vitro培養系が確立されていなかったため，本実験では大腸菌発現系を用いてCpro-1およびCpro-2を発現させ，それらのプロテアーゼ活性を確認し，基質の配列要求性を検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

大腸菌発現系を用いてN末端にmaltose-binding protein（MBP），C末端にdihydrofolate reductase（DHFR）を融合させたHCV前駆体ポリプロテインのアミノ酸残基（aa）897（NS2）からaa 1658（NS4A）の領域，約140 kDaを発現させ，Cpro-1およびCpro-2による前駆体ポリプロテインの切断を検討した。発現したHCVタンパク質を抗MBP抗体，抗NS3抗体および抗DHFR抗体を用いたウエスタンブロットの結果，前駆体ポリプロテインが切断されたMBP-NS2，NS3およびNS4A-DHFRの3種のタンパク質が検出された。NS2/NS3の切断が，真核生物と同様にCpro-1によることを確認するため，活性欠損変異体を用いて検討した。Cpro-1活性欠損変異である952番目のヒスチジンをアラニンに置換したMBP-NS2-NS3-DHFRを発現させるとNS3-DHFRが消失し，切断されていないポリプロテインが検出された。一方，Cpro-2活性欠損変異である1165番目のセリンをアラニンに置換した場合にはNS2/NS3の切断に影響は無かった。さらにCpro-2活性欠損変異を導入したMBP-NS3-NS4A-DHFRを発現させ，NS3/NS4Aの切断を検討した結果，野生型で検出されたNS4A-DHFRが消失した。加えてCpro-1およびCpro-2の切断部位を確認するため，methotrexateカラムを用いてNS3-DHFRおよびNS4A-DHFRをそれぞれ精製し，アミノ酸シークエンスを行った。前者は，aa 1027からの配列 APITAYSQQTR，後者は，aa 1658のセリンに続くリンカーの配列，SKLAIEG?GMISがそれぞれ同定された。

次にCpro-2の基質の配列要求性を調べるため，aa 898（NS2）からaa 1468（NS3）を酵素として，NS3/NS4A以降の非構造タンパク質の切断部位を基質として大腸菌で共発現させ分子間の切断活性を検討した。Cpro-2による4ヶ所の切断部位NS3-NS4A，NS4A/NS4B，NS4B/NS5AおよびNS5A/NS5Bを比較した結果，NS5A/NS5Bが最も切断効率が高かった。一方，分子間反応ではNS3/NS4Aは切断されなかった。NS5A/NS5BのP7位からP8'位の15アミノ酸を用いて基質の長さを検討した結果，P4位からP1'位の5アミノ酸以下では切断されなかった。配列要求性を検討するため，P1，P1'およびP6位のアミノ酸を置換して切断活性を野生型と比較した。P1位のシステインを他の７種のアミノ酸に置換するといずれも切断されなくなった。逆に分子間反応で切断されなかったNS3/NS4AのP1位のスレオニンをシステインに置換すると分子間反応で切断された。次にP1'位のセリンを側鎖の大きいアスパラギン，イソロイシンまたは電荷を持つリジン，アスパラギン酸に置換すると切断効率が顕著に低下した。さらにP6位のアスパラギン酸のみリジンに置換しても切断効率は変化しなかったが，P6位およびP5位両方のアスパラギン酸をリジンに置換すると切断効率が低下した。

〔総　括(Conclusion)〕

大腸菌で発現したCpro-1（NS2-3）がNS2/NS3を切断し，Cpro-2（NS3）が，NS3-NS4A，NS4A/NS4B，NS4B/NS5AおよびNS5A/NS5Bを切断することを確認した。この切断活性は真核生物で発現したCpro-１およびCpro-2と同様であった。Cpro-2の基質配列要求性は，P6位からP1'位の7アミノ酸が必要であること，分子間反応での切断はP1位がシステインであること，P1'位は側鎖が小さく電荷を持たないアミノ酸が適していること，P6位付近に正電荷を持つアスパラギン酸またはグルタミン酸が効率よい切断に必要なことが分かった。

我々はHCV治療薬のシード化合物を探索するため，本実験の結果を基に大腸菌で産生したCpro-2を用いたin vitro活性評価系の構築を開始した。一方，Cpro-1についてはNS2からNS3にまたがる領域が活性に必要で，NS2/NS3の切断により活性を失うことを見出しており，Cpro-1活性体を大量に調製し，in vitro活性評価系を構築することは難度が高いと考えられた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）			菰田　泰正
	（職）		氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	岡本 徹
	副　査	大阪大学教授	小林 剛
	副　査	大阪大学教授	上田 啓次

論文審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）は，1989年にゲノムの一部が特許により報告されたが，ウイルスの実態が不明のままであった。さらに患者のウイルスを試験管内で培養することができなかったため，分子生物学の手法を用いてウイルス増殖機構の解析が開始された。近縁ウイルスとの比較から，HCVの増殖に必要なウイルスプロテアーゼの存在が予想された。本論文では，予想されたウイルスプロテアーゼを大腸菌で発現させ，その活性と特徴を検討している。
結果，大腸菌で発現した2種類のウイルスプロテアーゼによる，ウイルスタンパク質の切断を確認し，その切断部位を同定した。さらに2種類のウイルスプロテアーゼの一つについて基質認識配列を決定した。この結果を基にHCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング系を構築し，抗HCV薬のシード化合物を選抜した。この成果は，HCVプロテアーゼを標的とする抗HCV薬の開発に有用な情報を提供した。よって，本論文は博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。