

論文内容の要旨

論文題目 C型肝炎ウイルス翻訳制御機構の解析

指導教官 野本明男教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程 病因・病理学専攻

村上恭子

C型肝炎ウイルス（HCV）の翻訳開始は5'末端側の非翻訳領域から翻訳領域にかけて存在している internal ribosomal entry site (IRES) 構造に依存している。

近年、様々な mRNA で3'末端側構造による翻訳促進活性が報告されている。HCV RNA からの翻訳開始も3'末端が関与している可能性が考えられた。私は HCV 3'末端特異的構造である 3'X 及び poly(U/C) tract に着目し、HCV IRES 依存的翻訳効率に及ぼす影響を検討した。

当研究室で樹立した HCV-MA 株の全長 cDNA より、塩基番号 1286 から 8785 に相当する領域を欠損した cDNA (MA Δ cDNA) を構築した。この cDNA を

元に 3'末端に関する様々な欠損変異 RNA を作製し、翻訳効率に与える影響を無細胞蛋白合成系を用いて調べた。

3'X が欠損していた場合、翻訳活性は低下した。コントロールとして用いた 3'X のアンチセンスをもつ RNA においては翻訳活性は低下しなかった。3'末端に存在する二次構造が 3'-5'exonuclease による RNA の分解を抑制し、RNA の安定性に影響を与えることが他の mRNA において報告されている。そのため翻訳反応中の各時間にける残存完全長 RNA の量を定量した。その結果、3'X を欠損していた場合は RNA の安定性が低下していることが確認された。この安定性の低下は翻訳反応阻害時においても同様であった。よって、3'X 欠損による翻訳効率の変化は RNA の安定性変化による結果であることが示唆された。また、3'X は 3'-5'exonuclease 等による分解から RNA を保護する機能をもつことが示唆された。

次にもう一つの HCV RNA 特異的構造である poly(U/C)tract に着目し、この構造が HCV IRES 依存的翻訳効率に及ぼす影響を検討した。Poly(U/C)tract を完全に欠損させた場合、翻訳活性は上昇した。この活性上昇の程度は無細胞蛋白合成系に加える RNA 量により変化した。よって、RNA に結合する何らかの因子が poly(U/C)tract による翻訳効率の制御に関与していることが示唆された。RNA の安定性は poly(U/C)tract 欠損によって影響を受けていなかった。

Poly(U/C)tract の 3'末端 7 塩基とそのさらに 3'側に位置する 3'X 内の二次構造 SL3 領域は polypyrimidine tract binding protein (PTB)が結合することが

報告されている。また、この蛋白は HCV IRES 領域への結合も報告されていた。私は 5'側と 3'側の相互作用にこの PTB が関与しているのではないかと考え、3'X 部分の PTB 結合に必須であると考えられている SL3 領域を欠損した RNA を用いて翻訳効率の検討を行った。

まず、SL3 が欠損していた場合、翻訳効率は上昇した。また、PTB 結合に必要とされる poly(U/C)tract3'末端 7 塩基 UUUUCUU や 3'X 内 SL3 が残っていても poly(U/C)tract の大半が欠損していた場合は翻訳効率は上昇した。これらの結果より 3'末端による翻訳効率の抑制には poly(U/C)tract 及び 3'X 内 SL3 の両構造が必要であることが示唆された。

以上の結果を確認するため、PTB を大腸菌で発現させ、精製した。この精製 PTB を無細胞蛋白合成系に加えたところ、PTB を加えることにより、3'末端側の PTB 結合部位の欠損変異の有無に関わらず翻訳効率は減少した。よって、SL3 及び poly(U/C)tract による翻訳効率の減少には PTB の関与は薄いこと、PTB による翻訳抑制は 3'末端以外に作用点が存在していることが示唆された。

そこで、RNA を 3'末端からさらに削り短くしたところ、PTB による翻訳効率への影響は MA Δ の塩基番号 1041 から 8928 (387 塩基長) の間で差が見られた。PTB の結合を UV クロスリンクを用いて確認したところ、MA Δ の塩基番号 1171 から 1285 領域、及び塩基番号 8786 から 8928 領域に PTB 結合部位が存在することが確認できた。