

審査の結果の要旨

氏名 加藤 順

本研究は C 型肝炎ウイルス (HCV) の産生する蛋白を細胞内で発現させる系を構築し、非構造蛋白 NS4A、NS4B が、細胞内で蛋白合成に与える影響と、その機序について解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 7 種の HCV 蛋白(core、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)を哺乳細胞発現ベクターにサブクローニングし、transient に HCV 各蛋白を細胞内に発現させる系を構築した。
2. HCVの7種の蛋白が、細胞内で蛋白発現に与える影響についてレポーターアッセイを用いて調べたところ、NS4AおよびNS4B蛋白を発現させると、コントロールと比較してルシフェラーゼ蛋白発現は30%から40%まで抑制された。一方、他のHCV蛋白を発現させた際には、レポーター発現に明らかな影響は見られなかった。また、このNS4AおよびNS4B蛋白によるレポーター蛋白発現抑制は、用量依存性に認められた。さらに、NS4A、NS4B蛋白は、細胞の種類、プロモーターの種類、レポーターの種類に関係なく、レポーター蛋白発現を抑制した。
3. RNaseプロテクションアッセイにてレポーターのメッセンジャーRNA量を測定したところ、ルシフェラーゼのメッセンジャーRNA量は、NS4A、NS4B蛋白を発現させても、大きな差は見られなかった。この結果から、NS4A、NS4B蛋白は、遺伝子の転写を阻害するのではなく、翻訳の過程を阻害するという可能性が示された。
4. NS4A、NS4B蛋白のHCV IRESからの翻訳に与える影響について、バイシ

ストロニックレポーターを用いて調べたところ、NS4A、NS4B蛋白発現により、シーパンジールシフェラーゼ活性も、ホタルルシフェラーゼ活性も両方減少し、NS4A、NS4B蛋白は、キャップ依存性翻訳と、HCV IRESからのキャップ非依存性翻訳のいずれも抑制することが示された。

5. これまで他のウイルスが影響を与えることが知られている翻訳因子に、HCV NS4A、NS4B蛋白が同様に影響を与えるのかを検討した。すなわち、NS4A、NS4B蛋白を発現させ、濃縮回収したHeLa細胞において、eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G)、poly(A) binding protein (PABP)、eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1)、eIF4Eの状態を、イムノプロットにて解析した。しかし結果としては、NS4A、NS4B蛋白は、それらの翻訳因子には特に影響を与えなかった。
6. ドキシサイクリン制御下にNS4A蛋白の発現を誘導できる細胞株 (HeTON4A細胞) を樹立し、この細胞株においてもNS4A蛋白が蛋白発現を抑制するかを調べた。NS4A蛋白を発現していない状態のHeTON4A細胞に、レポータープラスミドをトランスフェクションし、その後、NS4A蛋白を発現させる群と、NS4A蛋白を発現させない群にわけ、それぞれの群でルシフェラーゼアッセイを行い両群間でその活性を比較した。すると、NS4Aを発現させた群で、発現させなかった群に比べtransientに発現させた時よりは程度が低いものの、蛋白発現抑制効果を認めた。この結果から、NS4A蛋白の蛋白発現抑制効果は、transient transfectionによる大量発現の系ばかりでなく、少量でもNS4A蛋白が発現してくる際に認められることが確認された。
7. HeTON4A細胞を用いて、NS4A蛋白の細胞増殖に与える影響を調べた。NS4A蛋白が発現している細胞では、NS4A蛋白が発現していない細胞に比べて、その増殖速度が有意に減少した。しかし、NS4A蛋白が発現している

ときに細胞死がみられるというようなことはなかった。この結果から、NS4A蛋白の発現は、おそらくその蛋白発現抑制効果によって、細胞増殖に不都合であるが、致死的ではない影響を与えるものと考えられた。

以上、本論文は HCV NS4A、NS4B 蛋白の新たな働きを発見し、HCV 感染の臨床にも新たな視点を与えるものと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。