

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目      デルタ肝炎ウイルス蛋白が活性化する細胞内シグナル伝達

指導教官      小俣政男 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

内科学専攻

氏名    五藤 忠

**[研究の背景および目的]**

デルタ肝炎ウイルス (HDV)は、B型肝炎ウイルス (HBV)と共存することによってのみ感染可能な肝炎起因ウイルスで、デルタ抗原はこのウイルスにコードされた唯一の蛋白である。デルタ抗原には二種のアイソフォーム、ラージ抗原とスモール抗原が存在、それぞれ214、195アミノ酸残基から成り、アミノ末端からの195アミノ酸が共通である。

スモール抗原が HBV発現を抑制するにもかかわらず、臨床的に HDV感染は HBV単独感染と比べ、HBVとの同時感染にて劇症化を、また HBVキャリアへの重感染にて重症化を生じ易い。同じくスモール抗原には殺細胞能力があるといわれているが、なぜ HDV感染が劇症化、重症化し易いかは分かっていない。一方で HDV感染は HBV単独感染よりも肝癌の発症年齢が若い、また B型肝炎硬変症例で肝癌発症の高危険因子であるとの報告がある。しかし、HDV慢性感染における肝発癌の分子生物学的機構も解明されていない。

そこで、HDVが発現するただ2つの蛋白、ラージ抗原とスモール抗原に着目、HDV感染細胞内の現象を解明するため、これら蛋白が5つの細胞内シグナル伝達経路に与える影響を検討した。調べた経路は、Serum Response Factor (SRF)、Serum Response Element (SRE)、Activator Protein-1 (AP-1)、Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、そして cyclic AMP Response Element (CRE) dependentな pathwayで、いずれも細胞増殖、アポトーシスに関わる。

## 【方法】

HDV完全長 cDNAを含む pSVLD3を鋳型とし、ラージ抗原、スモール抗原コード領域を PCR法にて増幅、 $\beta$ アクチンプロモーターと CMVエンハンサーを持つプラスミド pCXN2にサブクローニングした (pCXN2-DL, pCXN2-DS)。同様にFLAG エピトープタグとラージ抗原の融合蛋白発現プラスミドを構築した。また、GAL4-DNA結合ドメイン (GAL4-DBD)と ラージ抗原、Elk1、SRFの融合蛋白発現ベクターを使用した。

5つの細胞内シグナル伝達経路 (SRF, SRE, AP-1, NF- $\kappa$ B, CRE)活性化の検出のため、レポータープラスミドを用いた。プラスミドは、それぞれの経路特異的な転写因子の結合する配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に複数持つ。各合成レポーターに加え、SRF結合配列 (CArG box)、SRE (Ets モチーフ + CArG box) をナチュラルにもつ、ラット平滑筋特異的遺伝子 SM22 $\alpha$ プロモーター、ヒト *c-fos* 遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に導入したプラスミドを使用、さらにそれぞれの CArG boxに変異を導入、SRF結合不能なプラスミドも構築した。転写因子 Elk1、SRFの活性化測定のレポーターとして、ルシフェラーゼ遺伝子上流に GAL4-UASをもつ pFR-Lucを用いた。

HeLa、HuH-7、HepG2細胞に各レポーターと、デルタ抗原発現プラスミドまたは親ベクターをトランスフェクション、ルシフェラーゼアッセイを行った。また、pFR-Luc、GAL4-DBDとElk1または SRFの融合蛋白発現プラスミド、そしてデルタ抗原発現プラスミドまたは親ベクターをトランスフェクション、転写因子の活性化能を検討した。デルタ抗原の有無での相対活性をもとめ、t-testにて検定、0.05以下の p値をもって有意差有りと判定した。

SRFの CArG boxへの結合能を検討するため、ゲルシフトアッセイを行った。一過性のトランスフェクションでは10~20%の細胞にしかプラスミドは導入されないため、プラスミド導入細胞の濃縮目的に、MACSelect systemを用いた。

デルタ抗原の発現、Elk1、リン酸化 Elk1は、ウェスタンブロットにて検出した。

生体内で HDVは HBVと共存するため、SRE経路活性化に関し、7種の HBV発現蛋白とラージ抗原との相互作用をレポーターアッセイで検討した。

## 【結果】

pCXN2-DL, pCXN2-DSをトランスフェクションした細胞抽出液を用いたウェスタンブロット法にて両デルタ抗原の発現を確認した。

合成配列を持つ5種のレポータープラスミドとデルタ抗原発現プラスミドをHeLa細胞にトランスフェクション、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ラージ抗原はSRF依存性 pathwayを $4.0 \pm 1.2$ 倍 (mean  $\pm$  SD)に、SRE依存性 pathwayを $2.5 \pm 1.0$ 倍に活性化した。残りの3つの pathwayは活性化しなかった。一方、スモール抗原は5つの pathwayいずれも活性化しなかった。SRF依存性 pathway活性化は、ラージ抗原の容量依存的に増強、また、この活性化はHuH-7細胞、HepG2細胞でも同様に認められた。スモール抗原は、このラージ抗原によるSRF依存性 pathwayの活性化には全く影響を与えなかった。

次にラージ抗原のSRF依存性 pathway活性化機構を検討した。デルタ抗原は核蛋白であるため、それ自体の転写活性化能を検討したが、ラージ抗原に転写活性化能は認めなかった。そこでSRFの転写活性化能に対する影響を調べたところ、ラージ抗原は、SRFの転写活性化能を2.5倍に増強した。しかし、EMSAにおいて、DNA-SRF complexのバンドの増強は認めなかった。次にナチュラルにCArG boxを2つ持つラットSM22 $\alpha$ プロモーターに対する影響を検討、ラージ抗原は $3.3 \pm 0.5$ 倍にSM22 $\alpha$ プロモーターからの転写を活性化した。2つのCArG box共に変異を導入したところ、ラージ抗原の効果は1.8倍に減少した。

ラージ抗原はSRE依存性 pathwayも活性化する。SREは、CArG boxとその上流に位置するElk1の結合配列であるEtsモチーフから構成されているので、Elk1に対する作用を調べた。レポーターアッセイでElk1の転写活性化能を、ウェスタンブロットにてElk1のリン酸化を検討したが、ラージ抗原はいずれにも影響を与えなかった。そこで実際にSREを持つヒト*c-fos*プロモーターに対する影響を検討した。ラージ抗原はwild type *c-fos*プロモーターを $1.8 \pm 0.3$ 倍に活性化したが、CArG boxに変異をいれると、この効果はほぼ消失した。ラージ抗原はElk1を活性化せず、ラージ抗原による*c-fos*プロモーターの転写活性化は、SRF依存性であることが示された。

HDVはHBVと共存するため、最後にHBV発現蛋白とラージ抗原との相互作用を検討したところ、SRE pathway活性化において、HBx蛋白とラージ抗原の相乗作用が認められた。

### [考察]

細胞内シグナル伝達とウイルス蛋白に関しては今までに多くの研究があるが、その中で SRFをターゲットとした報告も散見される。例えば、成人 T細胞白血病ウイルスの Tax蛋白は SRFに直接結合して転写を活性化し、ポリオマウイルスの Middle T antigenは細胞質において Rac蛋白を活性化することにより SRFを活性化する。ラージデルタ抗原は核内蛋白であるが、免疫沈降法にて SRFとの結合は認められなかった。また、プロテインキナーゼ A (PKA)が SRFの核移行に必要なとの報告があり、実際これは EMSAにて SRF-CArG box complexのバンドを増強したが、ラージ抗原にはこの作用がなかった。また、PKAは CRE依存性 pathwayを活性化するが、ラージ抗原が CRE依存性 pathwayを活性化しないことと合わせると、ラージ抗原による SRF依存性 pathwayの活性化は、PKA非依存性と考えられる。以上の結果から、ラージ抗原は、未知のメカニズムで SRF依存性 pathwayを活性化しているものと考えられた。

どのようにラージ抗原が SRF依存性 pathwayを活性化するかは、はっきりしない。しかし、核内蛋白ラージ抗原には転写活性化能がないこと、デルタ肝炎ウイルスは自身の複製のために、RNAポリメラーゼ IIといった宿主の蛋白を必要とするが、ラージ抗原はこの複製を抑制すること、からラージ抗原がある転写因子や RNAポリメラーゼ II関連蛋白と結合、これによりウイルス複製抑制、一方で SRFを活性化すると思われる。

ラージ抗原はラット SM22 $\alpha$ プロモーターを CArG box依存性に活性化した。CArG boxは多くの筋特異的遺伝子のプロモーター領域に共通して同定される配列である。SM22 $\alpha$ 以外にも、 $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin)や骨格筋アクチンのプロモーターに存在するが、ラージ抗原はこれらの筋特異的遺伝子の転写を促進するかもしれない。 $\alpha$ -SMAは活性化された肝 stellate細胞で発現しており、肝線維化に深く関わっている。ゆえに、ラージ抗原が SRFを介して  $\alpha$ -SMAの転写を促進、肝 stellate細胞の活性化に関与、肝線維化を引き起こしている可能性が考えられる。また、ラージ抗原は SRFを介して c-fosプロモーターからの転写を活性化した。さらに HBxと協調的に SREを活性化することが分かった。多くの実験で、c-Fosが各種増殖因子の細胞応答に重要な役割を演じ、その逸脱した発現が、癌化を引き起こすといわれている。デルタ肝炎担癌患者は B型肝炎単独担癌患者に比べて若く、また、HDV感染はB型肝炎硬変症例で、肝細胞癌発症の高危険因子であることが報告されており、ラージ抗原が c-Fos発現を引き起こし、それによって、細胞増殖、ひいては癌化を促進している可能性が示唆された。