

## 論文の内容の要旨

論文題目 C 型肝炎ウイルスコア蛋白質による宿主遺伝子発現の  
変化および発現調節機構に関する研究

指導教官 木村哲教授

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 堤 武也

C型肝炎ウイルス (HCV) は、輸血後非 A 非 B 型肝炎の主要な原因であり、HCV の持続感染は高率に肝細胞癌 (HCC) をもたらすが、HCV による肝発癌の機序は未だはっきりとは解明されていない。私が所属する研究室は以前に、HCV のコア蛋白を肝臓に恒常的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、肝臓の steatosis や HCC が発生したことを報告した。このことからコア蛋白が HCV による肝発癌において重要な役割を果たしていることが示唆される。HCV による肝発癌の機序を解明する戦略として、*in vivo* においてコア蛋白の発現により肝臓内のどのような遺伝子の発現が変化しているかを、このトランスジェニックマウスの肝臓を材料としてサブトラクション法により検討したところ、脂質代謝に関与する遺伝子、細胞増殖・分化に関与する遺伝子などが得られた。その中には脂質代謝に関与するものとして catalase や stearyl-CoA desaturase が、細胞増殖・分化に関与するものとして retinol binding protein が含まれていた。これらの遺伝子の発現は、核内転写因子である peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )、retinoid X receptor- $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) によりそれぞれ転写調節されることが知られている。RXR $\alpha$ は核内ホルモン受容体

ファミリーの一員であり、ホモ二量体を形成してレチノイドによる細胞増殖や分化のシグナル伝達に関与するだけでなく、他のいくつかの核内ホルモン受容体とヘテロ二量体を形成し、様々な遺伝子の転写を調節することが知られており、その中でPPAR $\alpha$ と二量体を形成することにより、主として脂質の輸送や代謝に関与する遺伝子の発現に関与している。そこで今回の研究では、核内受容体の中心的役割を果たしているRXR $\alpha$ とHCVコア蛋白との相互作用について検討を行った。

まず *in vitro* の系を用いて、コア蛋白とRXR $\alpha$ が結合するか否かを検討した。その結果、GST pull-down assay により、HCV コア蛋白とRXR $\alpha$ が *in vitro* において直接的に相互作用することが示された。さらにRXR $\alpha$ の欠失変異体を用いた解析では、コア蛋白はRXR $\alpha$ の中のDNA結合領域と相互作用することが示された。RXR $\alpha$ のDNA結合領域には二つのジンクフィンガー構造があるが、それらの一方もしくは両方の構造をアミノ酸置換により破壊した変異体においても、DNAとの結合はできなかったがコア蛋白との結合は保たれていたことから、RXR $\alpha$ のジンクフィンガー構造はコア蛋白との相互作用には必要ではないことが示唆された。さらに培養細胞内におけるコア蛋白とRXR $\alpha$ との相互作用を免疫沈降法にて検討したところ、リン酸化阻害剤の共存下でコア蛋白とRXR $\alpha$ との共沈が認められたことから、コア蛋白とRXR $\alpha$ が細胞内においても相互作用することがわかり、そしてこの相互作用は主として核内で生じていることが考えられた。これらの結果から、コア蛋白とRXR $\alpha$ が、*in vitro* 及び *in vivo* において相互作用することが示唆された。

次にこの相互作用がRXR $\alpha$ のDNA結合活性や転写活性にどのような影響を与えるかを検討した。大腸菌内で発現させたRXR $\alpha$ と、組換えバキュロウイルスに感染させた昆虫細胞内で発現させたコア蛋白をそれぞれ部分精製し、<sup>32</sup>PでラベルしたRXR $\alpha$ 結合塩基配列を含むオリゴヌクレオチドとRXR $\alpha$ との結合を、コア蛋白存在下及び非存在下でゲルシフトアッセイにより検討した。その結果、コア蛋白の存在下では、RXR $\alpha$ とDNAとの複合体に相当するバンドの強度がコア蛋白の量依存的に増強しており、コア蛋白によるRXR $\alpha$ のDNA結合活性の増強が示唆された。また、実際に培養細胞内におけるコア蛋白の共発現によるRXR $\alpha$ の転写活性の変化を、レポーターアッセイにより検討した。その結果、コア蛋白を発現している細胞では、そうでない細胞に比して、RXR $\alpha$ の転写活性が2倍程度に増強していた。この増強効果は、RXR $\alpha$ のリガンドである9-cisレチノイン酸の存在下、及び非存在下のいずれにおいても認められた。そしてこの増強効果は、HCVのコア蛋白、エンベロープ蛋白を共発現する細胞においても認められたが、エンベロープ蛋白のみを発現する細胞では認められなかった。さらに、RXR $\alpha$ とヘテロ二量体を形成するPPAR $\alpha$ の、コア蛋白による転写

活性の変化も同様に検討したところ、PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$ ヘテロ二量体の転写活性もコア蛋白を発現している細胞で3倍程度に増加していた。これらの結果より、HCV コア蛋白がRXR $\alpha$ と相互作用することにより、RXR $\alpha$ のDNA結合活性、またRXR $\alpha$ のホモ及びヘテロ二量体の転写活性を増強することが示唆された。コア蛋白によるRXR $\alpha$ のDNA結合活性や転写活性の増強の機序はまだ解明できていないが、コア蛋白によるRXR $\alpha$ の転写活性の変化が、細胞内における宿主遺伝子の発現を変化させ、脂質代謝異常や細胞増殖・分化の異常をきたし、steatosis や carcinogenesis といった、HCV コアトランスジェニックマウスや実際のHCV 慢性感染患者に認められる病態をもたらしている可能性が考えられる。

今回の研究により、HCV コア蛋白がRXR $\alpha$ と相互作用しその転写活性を増強し、RXR $\alpha$ により発現調節される遺伝子の発現を変化させる、という新しい知見が得られた。この知見は、HCV によるsteatosis や carcinogenesis といった病態を解明するうえで、有用と考えられる。