

審査の結果の要旨

氏名 堤 武也

本研究は C 型肝炎ウイルス (HCV) に感染した肝臓の特徴的な病態である肝臓の steatosis や肝細胞癌の発生の機構を明らかにするため、HCV コア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓における遺伝子発現の変化の解析をふまえて、脂質代謝や細胞増殖・分化の遺伝子発現に関わる転写因子であるレチノイド X レセプター (RXR α) と HCV コア蛋白との関わりを検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. HCV コア蛋白が、RXR α と in vitro (GST pull-down assay) において結合し、そしてその結合領域は、RXR α の DNA 結合領域であることが示された。RXR α の DNA 結合領域には、DNA との結合に重要と考えられている二つの zinc finger 構造が存在するが、この構造をとらないような変異体の解析より、この構造はいずれも DNA との結合には不可欠であるが、コア蛋白との結合には必要ではないことが示された。
2. HCV コア蛋白と RXR α が in vivo (細胞内) においても相互作用することが、免疫沈降法によりコア蛋白と RXR α が共沈することにより示された。この共沈は、これらの蛋白を発現する細胞をリン酸化阻害剤存在下で培養したときに明確に検出され、また RXR α の C 末側を認識する抗体でのみ検出された。またこれらの蛋白の相互作用は主として核内であった。
3. RXR α およびコア蛋白をそれぞれ大腸菌、組換えバキュロウイルスの系により発現、部分精製し、コア蛋白が RXR α の DNA 結合活性に与える影響を electrophoretic mobility shift assay により検討したところ、コア蛋白の存在下で量依存的に RXR α の DNA 結合活性が増加することが示された。
4. RXR α の homodimer により転写調節される遺伝子である cellular retinol binding protein II (CRBP II) のプロモーター領域の下流に luciferase 遺伝子を組み込んだプラスミドを、コア蛋白を transient に発現する細胞とそうでない細胞に transfection

し luciferase 活性を測定したところ、コア蛋白を発現する細胞で 2 倍程度の活性の増加が認められた。この活性の増加は RXR α の活性化リガンドである 9-cis retinoic acid の存在および非存在下いずれにおいても認められた。PPAR α -RXR α heterodimer により転写調節される acyl-CoA oxidase 遺伝子のプロモーターについても同様に検討を行ったところ、コアを発現する細胞で活性の増加が認められた。これらのことから、コア蛋白が細胞内において RXR α homodimer および PPAR α -RXR α heterodimer の転写活性を増強することが示唆された。

5. HCV コアトランスジェニックマウスの肝臓内における CRBP II 遺伝子の発現を RT-PCR により検討したところ、ノントランスジェニックマウスに比してトランスジェニックマウスの肝臓においてこの遺伝子の発現の増加が認められた。したがって、*in vivo* においてもコア蛋白が RXR α の転写活性を増強している可能性が考えられた。

以上、本論文は HCV コア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における遺伝子発現の変化の解析をふまえ、コア蛋白が RXR α と相互作用し、その DNA 結合活性や転写活性を増強することを示した。HCV コア蛋白と宿主蛋白との相互作用についてはこれまでにいくつかの報告がなされているが、本研究で示されたコア蛋白と RXR α との相互作用ならびにその影響については新しい知見であり、HCV 感染における肝臓の steatosis および肝細胞癌の発生の機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。