

論文の内容の要旨

論文題目 **C型肝炎ウイルスのコア蛋白質の核内輸送と
細胞の核-細胞質間輸送系に対する影響**

氏名 **磯山 毅**

序

C型肝炎は肝硬変や肝細胞癌といった重篤な症状に進行するウイルス性肝炎であり、その病原体であるC型肝炎ウイルス(HCV)はフラビウイルス科に属する。HCVは約9500ヌクレオチドからなる1本のプラス鎖RNAをゲノムとしてもち、そのゲノムは約3000アミノ酸からなる1つの蛋白質前駆体をコードしている。この前駆体は宿主のシグナルペプチダーゼ及びウイルスのプロテアーゼにより切断されて少なくとも10個のHCV蛋白質が産出される。HCVのコア蛋白質はウイルス粒子構成成分であるが、そのN末端側に核移行シグナル(NLS)様配列をもつ。全長のHCVコア蛋白質p21及びシグナルペプチダーゼにより切断されたコア蛋白質p19は細胞質、核内の両方に存在し、C末端側が欠失したコア蛋白質p16は核内に局在化する。

本研究では、分子遺伝学的操作が容易である出芽酵母、*Saccharomyces cerevisiae*を真核細胞のモデル系として用いて、HCVコア蛋白質の細胞内分布メカニズムについて解析することを目的とした。また、コア蛋白質の分布メカニズムが細胞側蛋白質の核-細胞質間輸送に及ぼす影響についても検討した。

C型肝炎ウイルスのコア蛋白質の酵母における細胞内分布

HCVコア蛋白質p21、p19、及びp16を出芽酵母細胞内で発現させ、抗コア抗体を用いてWestern blottingを行ったところ、それらの発現が確認された。また、p21は哺乳動物細胞内に

おいてと同様に、シグナルペプチダーゼにより p19 様分子に切断されることが示唆された。

次に、出芽酵母細胞内における HCV コア蛋白質の細胞内分布を免疫染色法を用いて検討した。p21、p19 は細胞質、核内の両方に存在し、細胞質では主に核の周辺に存在することが観察された。また、p21 よりも p19 の方が核局在性は強い。一方、p16 は核内に局在していることが明らかになった (Fig. 1)。この結果は、これまでに報告されている哺乳動物細胞での HCV コア蛋白質の細胞内分布パターンと一致しており、コア蛋白質の細胞内分布に関する研究を遂行する上で出芽酵母を用いた実験系が哺乳動物細胞の良いモデル系となり得ることが示唆された。

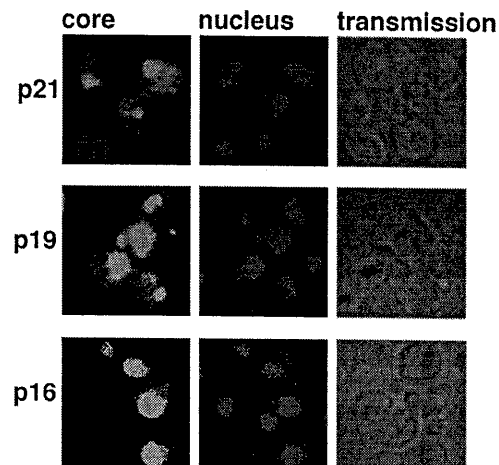


Fig. 1 Subcellular localization of HCV core proteins in yeast cells

C 型肝炎ウイルスのコア蛋白質の酵母における核内輸送

一般に、分子の細胞質から核への輸送、すなわち核内輸送は、NLS をもつ分子が細胞質において核内輸送受容体に結合し、その受容体との複合体として核内に運ばれる過程である。その際、低分子量 GTPase である Ran は細胞質では GDP 結合型として、核内では GTP 結合型として存在し、輸送される複合体の核膜孔の通過と核内での解離の過程で作用すると考えられている。

そこで、核局在性を示す HCV コア蛋白質 p16 についてその核内輸送がこのような能動的な輸送機構によるか、つまり Ran 依存性であるかを検討した。Ran の出芽酵母ホモログである Gsp1p の温度感受性変異酵母株、*gsp1-1* 細胞を用い、遺伝学的解析を行った。許容温度である 25°C では p16 は核内に局在していたが、制限温度である 37°C にすると全体的に存在するようになった (Fig. 2)。この結果は、

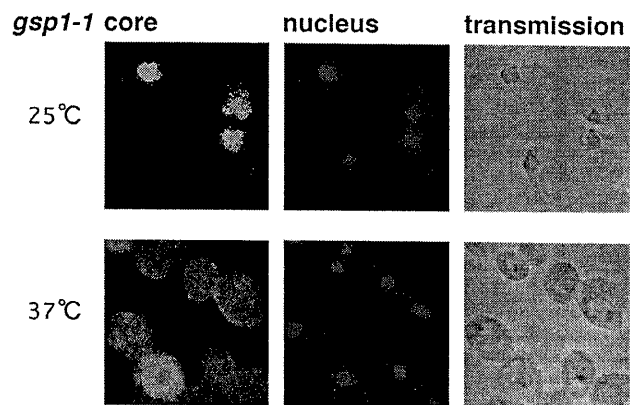


Fig.2 Nuclear accumulation of HCV core protein requires Ran/Gsp1p

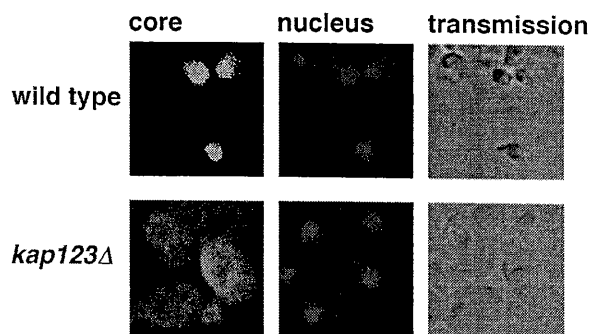


Fig. 3 Nuclear import of HCV core protein is mediated by Kap123p in yeast cells

HCV コア蛋白質の核内輸送は Ran 依存的な能動輸送であることを示している。

出芽酵母では全ゲノム塩基配列が明らかにされ、9種類の核内輸送受容体の存在が報告されている。それぞれの核内輸送受容体に関する変異株を用いて HCV コア蛋白質の酵母における核内輸送受容体の同定を行ったところ、*KAP123* 欠失変異酵母株、*kap123Δ* 細胞においてのみ p16 の核内輸送は観察されなかった (Fig. 3)。つまり、HCV コア蛋白質の出芽酵母における核内輸送受容体は Kap123p であることが明らかになった。

C 型肝炎ウイルスのコア蛋白質による真核細胞蛋白質の核内輸送阻害

HCV コア蛋白質の核内輸送は細胞の核-細胞質間輸送系に影響する可能性がある。コア蛋白質による真核細胞蛋白質の核-細胞質間輸送に対する作用を検討するために、核-細胞質間輸送についてよく研究されている出芽酵母の AP-1 様転写因子、Yap1p をターゲット分子として用いた。Yap1p は N 末端側の NLS により細胞質から核へ、C 末端側の核外移行シグナル (NES) により核から細胞質へ、つまり両方向へ定常的に、また Ran 依存的に輸送されているが、酸化ストレスにより核から細胞質への輸送、すなわち核外輸送が特異的に阻害される。しかしながら、核内輸送は行われるので、Yap1p は核局在化し、標的遺伝子の転写を活性化することが明らかにされている。そこで、Yap1p の転写活性及び細胞内分布を指標として HCV コア蛋白質の核-細胞質間輸送への影響について解析した。

Yap1p は AP-1 結合部位に結合し転写を活性化することが知られているので、SV40 AP-1 部位により誘導されるレポーター遺伝子 *lacZ* を有する酵母株を用いた β -galactosidase assay により、HCV コア蛋白質の Yap1p 依存的転写活性に対する影響を検討した。その結果、HCV コア蛋白質の発現により Yap1p による転写活性は抑制されることが示された。

次に、HCV コア蛋白質による Yap1p 依存的転写活性の阻害が Yap1p の細胞内分布によるのかを検討するために、GFP を融合させた Yap1p を観察することで、Yap1p の細胞内分布に及ぼすコア蛋白質の影響を解析したところ、Yap1p の酸化ストレスによる核局在化はコア蛋白質により阻害されることが明らかになった。

さらに、酸化ストレスの影響を除くために、Yap1p の NLS のみを GFP に融合し発現させることで、Yap1p NLS 依存的核内輸

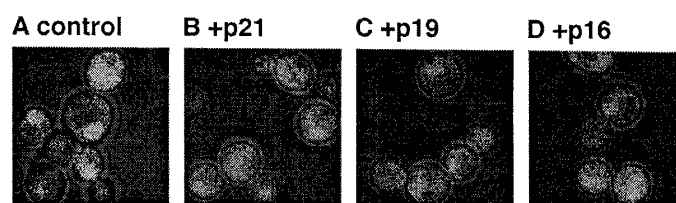


Fig. 4 Effect of HCV core proteins on nuclear import by Yap1p NLS

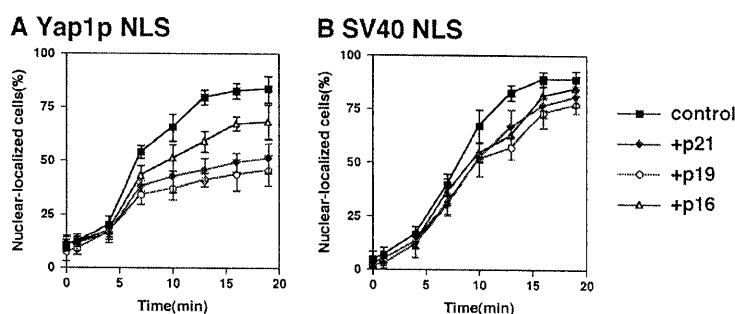


Fig. 5 HCV core proteins inhibit import by Yap1p NLS, but not import by SV40 NLS

送に対する HCV コア蛋白質の影響について観察した。コントロールでは GFP-Yap1p NLS 融合蛋白質は核局在化するが、HCV コア蛋白質によりこの Yap1p NLS 依存的核内輸送は阻害されることが示された (Fig. 4)。

また、NES の存在する C 末端側を欠失した Yap1p を GFP に融合させて用いた核内輸送に関する速度論的な解析からも、HCV コア蛋白質による Yap1p の核内輸送阻害は支持された。この阻害作用は p21、p19 の方が p16 より強いことも示唆された。これに対して、SV40 T 抗原の NLS について同様の実験を行ったところ、コア蛋白質による影響はほとんど見られなかった (Fig. 5)。この結果から、HCV コア蛋白質による核内輸送阻害には特異性があることが明らかとなった。

C 型肝炎ウイルスのコア蛋白質による核内輸送阻害のメカニズム

HCV コア蛋白質による Yap1p の核内輸送阻害のメカニズムを解明するために、Yap1p の核内輸送受容体について検討した。酸化ストレス及び NES の存在する C 末端側を欠失した Yap1p (1-571) を用いて、核内輸送受容体に関する変異酵母株について観察したところ、*PSE1* 温度感受性変異酵母株、*pse1-1* 細胞においては許容温度である 25°C では野生酵母株と同様に Yap1p は核局在化するが、制限温度である 37°C にすると全体的に存在するようになった (Fig. 6)。つまり、Yap1p の核内輸送受容体は Pse1p であることが同定された。

さらに、大腸菌で発現、精製したりコンビナント蛋白質を用いて *in vitro* の蛋白質間相互作用について解析した。Pse1p は GST 融合蛋白質として、Yap1p は His-tag 付加蛋白質として用いた。その結果、Yap1p は GST とは結合しないが、GST-Pse1p とは直接結合することが明らかになった (Fig. 7A)。

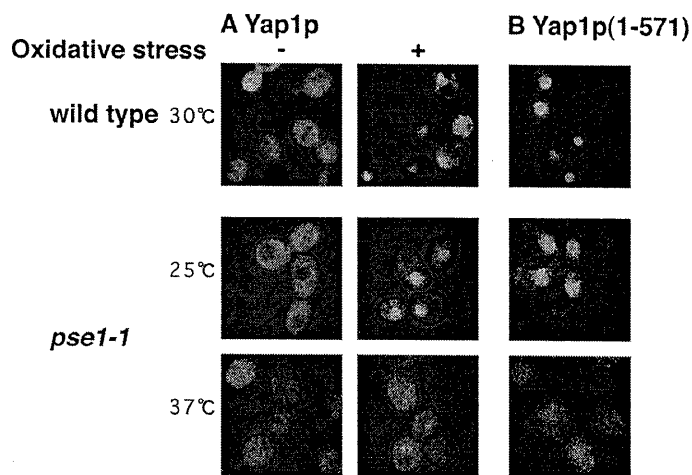


Fig. 6 Nuclear import of Yap1p is mediated by Pse1p

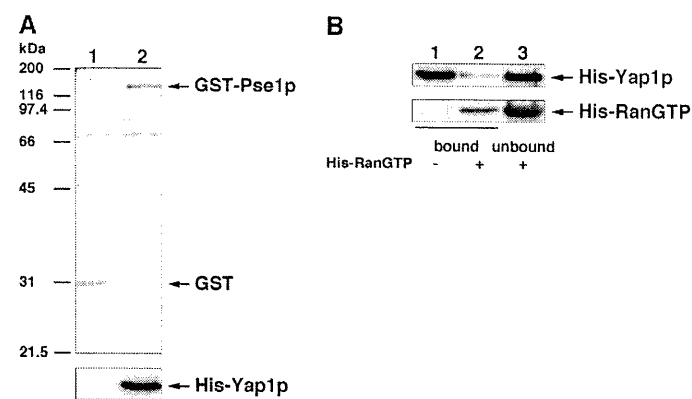


Fig. 7 Yap1p interacts directly with Pse1p, and the interaction is dissociated by RanGTP

また、核内輸送受容体とそれにより運ばれる分子の結合は GTP 結合型 Ran により解離することが知られている。そこで、Yap1p と Pse1p との複合体に RanGTP を加えたところ、Pse1p と結合している Yap1p 量は減少し、非結合型として存在するようになったことから、RanGTP により Yap1p と Pse1p との複合体は解離することが示された (Fig. 7B)。以上の結果から、Yap1p の核内輸送受容体は Pse1p であることが明らかになり、HCV コア蛋白質のものとは異なっていた。

そこで、Yap1p と Pse1p の相互作用に対する HCV コア蛋白質の影響について *in vitro* 結合実験により検討した。コア蛋白質の存在下で Yap1p と Pse1p を反応させたところ、Yap1p と Pse1p との結合はコア蛋白質により濃度依存的に抑制された (Fig. 8)。この結果から、HCV コア蛋白質による Yap1p の核内輸送受容体への結合阻害が核内輸送阻害のメカニズムであることが示唆された (Fig. 9)。細胞質に存在するコア蛋白質が Yap1p と結合している、あるいはコア蛋白質が Pse1p と結合しているために、Yap1p と Pse1p の相互作用が抑制されて、コア蛋白質は Yap1p の核内輸送を阻害するものと考えられる。

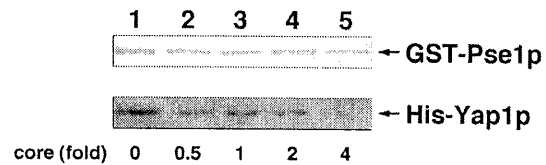


Fig. 8 HCV core protein inhibits the interaction of Yap1p with Pse1p

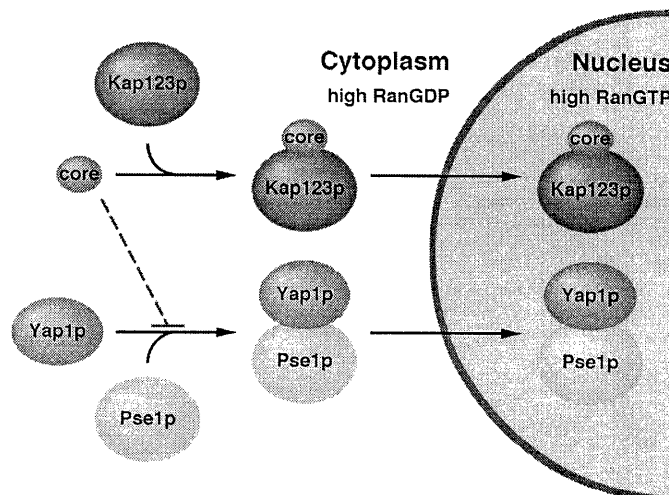


Fig. 9 Possible inhibition mechanism of Yap1p nuclear transport by HCV core protein

結論

1. HCV コア蛋白質は出芽酵母細胞内においても哺乳動物細胞内と同様の細胞内分布を示す。
2. HCV コア蛋白質は酵母内において Ran 依存的に Kap123p により核内輸送される。
3. HCV コア蛋白質は Yap1p の核内輸送受容体への結合を抑制することで Yap1p の核内輸送を阻害する。
4. HCV コア蛋白質は細胞側蛋白質の核内輸送を阻害することにより細胞の代謝機能に影響すると予想される。
5. HCV コア蛋白質は哺乳動物細胞においても酵母における核-細胞質間輸送系に対する影響と類似した作用をもつ可能性がある。