

論文の内容の要旨

論文題目 C型肝炎 RNA ポリメラーゼの解析と活性測定法の開発

氏名 内山 靖 智

C型肝炎は、C型肝炎ウイルス(HCV)の感染により高頻度に慢性化し、慢性肝炎が20-30年続いた後、肝臓へと移行することが知られている。C型肝炎治療に関してはこれまで主としてインターフェロンが用いられているが、有効例は約1/3とされており、無効例への治療法については確立されていない。HCVの有する非構造タンパク質のうちNS5bタンパク質はRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を有することが報告されている。NS5bタンパク質は、プラス鎖のHCV RNAからマイナス鎖のRNA、さらにマイナス鎖のRNAからプラス鎖のRNAへの複製を触媒する酵素である。その阻害剤がHCVのインターフェロン療法に付加する薬剤となる可能性が高いと考えられる。

本研究においては、C型肝炎の治療薬としてRNAポリメラーゼ阻害剤のスクリーニングのための基盤技術として、活性を保持した酵素タンパク質の多量発現方法の開発と、安定的かつ良好なシグナル/ノイズ比を示す活性測定法の開発を行った。また得られた酵素活性を有するNS5bタンパク質に結合するRNA配列の同定をインビトロ選択法により行った。

第一には、安定的な酵素活性をもつタンパク質を多量に精製する技術の開発である。既存の NS5b 発現、精製法では、酵素活性が安定せず疎水性部分を含むため可溶性の問題があり、ポリオウイルスの RNA ポリメラーゼ活性と比べ、百分の一程度の活性しか得られていないことが阻害剤開発を困難にしている。

まず発現ベクターとして、構造予測から疎水性の高い C 末端 21 アミノ酸残基を欠失させ、N 末端には精製効率を向上させるため glutathione S-transferase (GST) に結合した NS5b タンパク質(以下 GST-NS5bC21 と略す)を発現するコンストラクトを作成した。大腸菌を用いた GST-NS5bC21 の発現は、温度感受性が強い事を発見し、25°C で多量の GST-NS5bC21 タンパク質を発現することに成功した。

次ぎの問題は発現タンパク質の精製であるが、既存の精製法は 5 段階以上の煩雑なものであり、精製途上で酵素活性、酵素タンパク量ともかなりの部分が失われてしまう問題があった。そこで GST 融合タンパク質の精製法を高い塩濃度のもとでグルタチオン添加による溶出とすることで精製効率を改善し、その一方で精製への寄与が低くタンパク質量、酵素活性の喪失の原因となる 2 つのステップを省略できた。

得られたタンパク質分画は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動上で、GST-NS5bC21 に相当する 94 kDa タンパク質と、マイナーな混入物として 70 kDa のタンパク質が確認された。NS5b タンパク質に対するモノクローナル抗体でのイムノブロット解析によりこの 70 kDa タンパク質は GST-NS5bC21 の分解産物と考えられ、比較的純度の高い GST-NS5bC21 タンパク質を多量に精製する方法が確立された。この酵素標品は下記に述べる活性測定法において安定的な活性を示し、1 回ならば -70°C での凍結保存後も活性低下は見られなかった。

第二は、阻害剤開発のための安定的で良好なシグナル/ノイズ比を示す活性測定法の開発である。既存の NS5b ポリメラーゼ活性測定法は、ラベルした核酸の取り込みの絶対値自体が非常に低く、これがハイスループットな薬物スクリーニングを困難にしている。本研究では多量に利用可能となった GST-NS5bC21 タンパク質を用い、多数検体に応用しうるフィルターアッセイ法の開発を進めた。

RNA ポリメラーゼの活性測定反応系には、鋳型 RNA、プライマー、酵素タ

ンパク質濃度、二価陽イオンの適正条件の決定が必要である。平均鎖長 400 塩基のポリ C を鋳型に、12 ヌクレオチドのオリゴ G をプライマーとし、 $[^3\text{H}]\text{GMP}$ の取り込みをフィルターアッセイ法により検討した。最適な条件として鋳型 RNA 50 ng、プライマー 50 nM が選ばれた。既存の方法の問題点は酵素濃度との容量依存性に問題があり、特に酵素量を 50 nM 以上に上昇させるとパラドキシカルに酵素活性が抑制されることであった。今回のアッセイ系では 50 nM までの酵素濃度に依存した直線的な酵素活性の上昇が示され、酵素活性抑制は 450 nM まで認められなかった。

NS5b の RNA ポリメラーゼ活性には二価の陽イオンが必要である。本研究では Mn イオンが 2.5–20 mM で最も高い活性を誘導することを確認し、5 mM をアッセイ系に用い、既存の Mg イオンを用いた方法の 5 倍の活性を得ることができた。これら以外の二価陽イオンには活性促進効果は認められなかった。

ポリオウィルスの RNA ポリメラーゼ阻害剤として知られるグリオトキシンは、本活性測定法に用いて HCV NS5b RNA ポリメラーゼも阻害することが確認された。

HCV の NS5b RNA ポリメラーゼは HCV 3'末端の RNA からコピーバック方式でマイナス鎖を合成することが知られるが、NS5b タンパク質がどのような RNA 配列に高い親和性を有するかは知られていない。本研究で高い活性を示す GST-NS5bC21 が多量に利用可能となった。そこでインビトロ選択法によりこのタンパク質への高い親和性を有する RNA 配列の同定を試みた。25 ヌクレオチドのランダム RNA プールから、GST アガロースにより GST-NS5bC21 と結合する RNA を沈降させ、それを RT-PCR 法により増幅することを 7 サイクル行った後に得られたクローンは、GST-NS5bC21 に高い親和性を示した。7 サイクル目で得られた RNA のクローンを増幅し、その塩基配列を決定した。

本研究では、NS5b RNA ポリメラーゼの阻害剤開発に必要な基盤技術として、簡便で安定的な酵素の精製と、ハイスループットな活性測定法を開発した。得られた酵素標品は活性測定のみでなく、結合 RNA の同定などにおける広い応用可能性を示した。これらの基盤技術は、HCV RNA ポリメラーゼ阻害剤のハイスループットなスクリーニングを可能とし、新たな C 型肝炎治療薬開発に道を開くために重要なものである。