

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 内山 靖 智

C型肝炎はC型肝炎ウイルス (Hepatitis type C Virus; 以下HCVと略す) の感染により慢性化し、肝硬変、肝臓へ移行することが知られており、我が国における肝臓発症の最大の要因と考えられている。C型肝炎の治療には現在インターフェロン投与が有効であることが知られるが、副作用の多いインターフェロン投与をもってしてもウイルスが消失する患者は1/3以下と考えられ新規治療薬の開発が求められている。C型肝炎の増殖にかかわる非構造領域蛋白 (non-structural proteins; 以下NSと略す) のNS5Bは、ウイルス増殖にもっとも重要と考えられる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。

本論文では、C型肝炎の治療薬としてのRNAポリメラーゼ阻害剤開発のための基盤技術として、活性を保持した酵素蛋白の多量発現法の開発と、安定的なシグナル/ノイズ比を示す活性測定法の開発を行った結果を報告している。

まず、安定的な酵素活性をもつ蛋白質を多量に発現、精製する技術の開発である。NS5B蛋白の疎水性の高いC端側21アミノ酸残基を欠失させ、Glutathione S Transferase (以下GSTと略す) と結合させたGST-NS5BC21蛋白を大腸菌にて多量に発現させる技術を開発した。既存の精製法を改良し、GST融合蛋白精製を高い塩濃度でのグルタチオン添加による溶出で精製効率を改善し、その一方で精製への寄与が低く活性低下につながる2ステップを省略できる方法を開発した。得られた蛋白は凍結保存後も高い活性を保持した。

このGST-NS5BC21蛋白を用いて、RNAポリメラーゼに最適な、テンプレートRNAとして平均鎖長400塩基のポリCを用い、12オリゴヌクレオチドのオリゴGをプライマーに、放射性標識GMPの取り込みをフィルターアッセイで検出する方法を開発した。その際、Mnイオンが2.5-20mMでもっとも高い活性を誘導することを確認し、5mMをアッセイ系に用い、従来のMgイオンを用いた方法の5倍の活性を得る事ができた。本RNAポリメラーゼ活性測定法によりポリオウイルスのRNAポリメラーゼ阻害剤として知られるグリオトキシンがHCV RNAポリメラーゼ活性を阻害することを確認した。

GST-NS5BC21蛋白を用いてSELEX法により、HCV RNAポリメラーゼに高い親和性を有する25マーのオリゴヌクレオチドが選択され、配列が決定された。

本論文HCV RNAポリメラーゼの阻害薬開発に必要な基盤技術として、安定的な酵素蛋白の精製法とハイスループットな活性測定法を開発し、新たなC型肝炎治療薬開発に道をひらき、さらに今後のRNAポリメラーゼ研究に新たな可能性を開拓した。

よって本論文は博士(学術)の学位請求論文として合格と認められる。