

[別紙1]

### 論文の内容の要旨

論文題目 C型肝炎ウイルスコア蛋白によるp53機能の増強とその機序

指導教官 小俣政男 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 大塚 基之

### [研究の背景および目的]

C型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus, HCV) は、慢性肝炎・肝硬変・肝臓癌の主要な病原因子と考えられている。HCVからは、3個の構造蛋白質(core, E1, E2)と6個の非構造蛋白質(NS2, 3, 4A, 4B, 5A, 5B)が、3,010アミノ酸から成る前駆体より産生される。HCVは実験に用いる感染培養系が存在しないこともあり、慢性感染に伴う病態の分子生物学的機構は十分解明されているとはいえない。従って当面はこれらウイルス蛋白質の機能解析を通して、感染によって起きる細胞の生物学的な変化を明らかにすることが重要と考えられる。

いっぽう、代表的な癌抑制遺伝子として知られる p53 は、細胞の DNA 障害など各種ストレスを契機に活性化すると、主に転写因子として作用し CDK Inhibitor である p21 や、Bcl family の Bax や Noxa 等 様々な遺伝子の転写を誘導し、細胞周期の停止や apoptosis を導くことが知られている。

今回の研究に先立ち、HCV 感染が細胞に及ぼす影響を明らかにするため、我々は HCV が産生する E1, E2, p7 を除くすべての蛋白質をおのおの細胞内で発現させ主要な細胞内シグナル伝達系への影響を検討し、core 蛋白質が NF- $\kappa$ B, AP-1, SRE 関連経路を活性化することをみいだした。

しかしながら、HCV の産生する各蛋白質が p53 機能にどのような影響を与えるのか、さらにはその機序について、詳細に検討したものは現在までほとんど認められない。そこで今回の研究では、HCV の各蛋白質が 感染細胞の p53 機能にどのような影響を及ぼすのか、とくに主要な p53 の下流遺伝子である p21 の転写調節に与える影響を検討し、さらに その機序についての解析を行った。

## [方法]

HCV1b 型の core, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B の各領域を PCR 法にて増幅、CAG プロモーターを持つプラスミド pCXN2 にクローニングした。Core 蛋白質については HA タグを付加した C 端欠失体あるいは N 端欠失体も作製した。同様に p53 発現ベクターあるいは GAL4 DNA 結合ドメイン (GAL4 BD) と p53、VP16 または core 蛋白質との融合蛋白質発現プラスミドも構築した。基本転写因子群の構成要素である、TBP, TAF 18, 20, 28, 32, 70 の各発現ベクターも同様に pCXN2 あるいは pCXN2-HA ベクターにクローニングした。

p21 プロモーターに与える影響を検討するため、p21 のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に持つレポータープラスミドを用いた。確認のため p53 結合配列を人工的に複数個つないだ配列をもつレポーターも使用した。GAL4 BD 関連の活性化測定には、ルシフェラーゼ遺伝子上流に GAL4-UAS をもつもの (pFR-luc) を用いた。

HepG2、SAOS2 をはじめとする細胞にレポーターと HCV 各蛋白質発現プラスミドをトランスフェクションしルシフェラーゼアッセイを行った。p53 が欠損している細胞を用いる場合は必要に応じ p53 発現ベクターもトランスフェクションした。すべてのルシフェラーゼアッセイは親ベクターのみの場合に対する相対活性をもとめ有意差を検定した。

p53 あるいは p21 の蛋白質発現量はウェスタンブロットにて検出した。

Core 蛋白質が p53 機能を増強することが判明したため、core 蛋白質存在下における p53 の DNA 結合能の変化をゲルシフトアッセイにて検討した。また、pFR-Luc、GAL4 BD-p53 融合蛋白質発現プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイで p53 の転写活性化能に core 蛋白質が与える影響を検討した。

さらに、core 蛋白質が p53 蛋白質と相互作用するか否かを、GST-p53 蛋白質を作製し検討をおこなった。

さらにそのうえで、core 蛋白質と基本転写因子群との相互作用の有無を免疫沈降法あるいはリコンビナント蛋白質との結合実験で検討した。

## [結果]

HCV の各蛋白質が p53 機能に与える影響を調べるため、まず p53 欠損細胞である SAOS-2 細胞に、一定量の p53 発現プラスミドと、主な p53 標的遺伝子である p21 のプロモーターをもつレポータープラスミドを、7種の HCV 各蛋白質を発現するプラスミドそれぞれと共発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、core 蛋白質を発現した場合にのみ、 $5.4 \pm 0.7$  (mean  $\pm$  S.D.) 倍の p21 プロモーターの活性増強を認めた。この効果は HepG2 細胞における内在性の p53 に対しても同様に認められ、また core 蛋白質の発現量依存的であった。この効果は p53 欠損細胞では p53 を発現しないと認められず、かつ core 蛋白質は p53 結合配列のみをつないだレポーターも活性化したことから p53 依存的と考えられた。実際に core 蛋白質を発現すると p53 の蛋白質量は変化しないものの、p21 蛋白質量は core 蛋白質の発現量依存性に増加した。

つぎに p21 プロモーター活性化に関わる core 蛋白質の領域を検討したところ、core 蛋白質の N 端 62 アミノ酸欠失ではその効果が消失した。

次に core 蛋白質の p53 活性化機構を検討した。Core 蛋白質の発現によって EMSA 上 p53 の DNA 結合能は約 1.7 倍増強した。さらに、core 蛋白質は Gal4BD-p53 による転写も増強し、p53 の転写活性化能そのものも増強することが示唆された。

さらにこの機序を調べるため、core 蛋白質と p53 蛋白質の結合の有無をみた。その結果 core 蛋白質は p53、特に大きく p53 の C 端側と結合した。core 蛋白質自身には転写活性化能は認められなかったが、基本転写因子群と core 蛋白質との相互作用を免疫沈降及び in vitro の結合実験でみたところ、core 蛋白質は TAF 28 と結合した。

## [考察]

p53 とウイルス蛋白質に関しては、たとえば EBV の NA2 蛋白質や adenovirus E1A などいくつかのウイルス蛋白質が p53 機能を増強すると報告されている。しかしこれらの蛋白質の多くはウイルス複製に関わる非構造蛋白質であり、さまざまなウイルス性あるいは細胞性遺伝子の転写活性化因子として働いており、p53 機能の増強のメカニズムの多くは p53 の産生増加によって説明されている。しかしながら、今回の研究では構造蛋白質である core 蛋白質が p53 の蛋白質量はふやさずに、その機能を活性化することを示した。この core 蛋白質による p53 の機能増強作用は、

core 蛋白質が p53 の DNA 結合能を増し p53 の転写活性化能そのものも増強するという 2 つの機序でおきると考えられた。今回の検討で、core 蛋白質は p53 の C 端側に結合する結果を得たが、この部分には p53 自身の DNA 結合能を負に制御している領域を含んでいる。p53 の活性化において 14-3-3 蛋白質がこの制御領域に結合し、結果として p53 の DNA 結合能を増加させることが報告されていることから、core 蛋白質も同様に p53 と結合することでその DNA 結合能を高めている可能性がある。また、core 蛋白質自身には転写活性化能は認められなかったが core 蛋白質は基本転写因子群の構成要素のひとつである TAF28 と結合した。このことから、core 蛋白質は p53 と結合すると、そこに TAF28 をリクルートする結果、TBP など他の基本転写因子との複合体をつくりやすくし、全体として p53 の転写活性化能をあげる co-activator として作用している可能性も考えられる。

p53 など転写因子は主に核内に存在するが、core 蛋白質は N 端に核移行シグナルをもち、実際 core 蛋白質は細胞質に主に存在するが一部は核にも認められる。今回の検討で N 端を欠いた core 蛋白質には、p53 機能の増強作用は認められなかったことから、N 端を欠損した core 蛋白質は核移行ができず、その結果 p53 機能増強作用が失われた可能性も考えられた。今後は core 蛋白質の発現による p53 のリン酸化などの修飾がおきている可能性も検討する必要があるものと思われる。

今回の研究中に、Lu らが我々と同様に core 蛋白質が p53 機能を増強するという報告をしたが、そのメカニズムは不明であった。今回我々は core 蛋白質による p53 機能増強作用を示すだけでなく、考えられる作用機序も明らかにしたが、その際に、core 蛋白質が基本転写因子群の構成要素のひとつである TAF28 と結合することも見出した。Core 蛋白質はこれまでも様々な遺伝子のプロモーターを活性化することが報告されているが、そのメカニズムについてはほとんどが不明のままである。今回示した core 蛋白質と TAF28 との結合は、core 蛋白質によるさまざまな遺伝子プロモーター活性に与える影響の一般的なメカニズムを解明する手がかりになるかもしれない。

我々はこれまでに core 蛋白質による主に細胞増殖や抗アポトーシスに関わる情報伝達系の活性化作用を明らかにしてきたが、core 蛋白質はいわばこれと対峙する作用をもつ p53 機能をも活性化することで、感染細胞に微妙なバランスをもたらしているとも考えられる。

今後このようなウイルスおよび細胞の分子ひとつひとつの相互作用と機能の検討とを積み重ねていくことで C 型ウイルス肝炎の病態生理の全貌を明らかにできるものとする。