

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 「B 型肝炎ウイルス X 蛋白と相互作用する宿主因子の
同定および機能解析」

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 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 田中 康雄

[研究の背景および目的]

B 型肝炎ウイルス(Hepatitis B virus, HBV)は慢性肝炎、肝硬変、肝癌の主要な病原因子である。HBV はヘパドナウイルス科に属する約 3,200 塩基からなる不完全二重鎖環状 DNA ウイルスで、HBV ゲノムには 4 つの open reading frame (ORF)が存在する。そのひとつ HBV X 蛋白(Hepatitis B virus X protein, HBx)は全長 154 アミノ酸からなる蛋白質である。HBx のウイルス内での役割は必ずしも明らかではないが、ウイルスの感染や増殖に重要な蛋白と考えられている。また肝細胞において、ウイルス蛋白及び宿主蛋白の転写活性化に関与していることが知られている。同時に HBx のトランスジェニックマウスなどによる解析より、HBx が肝発癌へ直接関与している可能性も示唆されている。従来 HBx の生体内での機能を調べるために宿主側の結合因子の探索が行われてきたが、その細胞内での役割は依然として不明な点が多い。

今回 affinity purification の手法と質量分析計を用いて HBx の新規結合蛋白の同定を行い、その機能解析を行った。前半では結合蛋白の同定として、ヒト正常培養肝細胞の lysate を組換え HBx を固相化したビーズとインキュベーションし、結合分子の affinity purify を行った。そして特異的に結合した蛋白を質量分析計にて解析した。その結果、新規の宿主側の結合因子として heat shock protein 60(Hsp60)を見出した。後半では、この HBx と Hsp60 について、細胞内での結合、結合の責任領域、細胞内での局在を調べ、両者の細胞内での機能的な役割をアポトーシスの系を用いて検討した。

[方法]

結合蛋白の同定として、大腸菌を用いて GST-HBx、及び GST を作成し、ビーズに固相化した。それらとヒト正常培養肝細胞の lysate をインキュベーションし、結合分子の affinity purify を行った。結合してきた蛋白は SDS-PAGE にて展開後、銀染色し

GST-HBx に特異的なバンドを切り出して、ゲル内プロテアーゼ消化を行いペプチド断片として抽出した後、質量分析計 Nanoflow liquid chromatography (nanoLC) – nanoelectrospray ionization (nanoESI) – MS/MS (nanoLC/nanoESI/MS/MS)にてプロテイン・シーケンスを行った。その結果をデータベース検索エンジン MASCOT™を用いて MSDB データベースに対して検索し、蛋白質を同定した。

同定した蛋白は、HBx との細胞内での結合を確認するために 293 細胞を用いて免疫沈降およびウェスタンブロットを行った。また HBx の Hsp60 との結合の責任領域も、HBx の欠失変異体を用いた免疫沈降にて解析した。細胞内での局在は Huh7 を用いて免疫蛍光染色を行い、蛍光像は共焦点顕微鏡を使い観察した。アポトーシスの評価は Huh7 を用いた TUNEL assay にて行った。

[結果]

HBx と相互作用する新規蛋白を同定するために、GST-HBx を用いて affinity purification を行った。約 56kDa の蛋白が HBx に特異的に結合したため、このバンドを切り出して、ゲル内プロテアーゼ消化を行い、抽出されたペプチド断片を質量分析計にて解析した。このバンドからは human chaperonin GroEL (Hsp60, PIR Accession #A32800)が同定された。

HBx と Hsp60 の細胞内での結合を確認するために、免疫沈降、及びウェスタンブロットを行った。GFP-HBx と Hsp60-HA を 293 細胞にトランスフェクション後免疫沈降を行ったところ、両者の細胞内での結合が確認された。また、GFP-HBx を細胞内にトランスフェクションし内在性の Hsp60 との結合も確認された。

HBx の Hsp60 との結合の責任領域を決定するために HBx の欠失変異体を用いて免疫沈降、及びウェスタンブロットを行った。pEGFP-X および、その欠失変異体 pEGFP-X Δ (5-87)、pEGFP-X(1-117)、pEGFP-X(1-87)、pEGFP-X(68-117)を用いて同様の免疫沈降を行い、内在性の Hsp60 との結合を調べたところ、X(1-87)のみ Hsp60 との結合が認められなかった。従って HBx が Hsp60 と結合するにはアミノ酸 88-117 の領域が必要と考えられた。

HBx と Hsp60 の細胞内での局在を調べるために、Huh7 を用いて免疫細胞染色を行った。GFP-HBx を発現させ、内在性の Hsp60 及びミトコンドリアを免疫染色した結果、HBx と Hsp60 はミトコンドリアで共局在することが示された。

最後に HBx 及び Hsp60 のアポトーシスに対する影響を調べた。Huh7 に HBx をトランスフェクション後、TUNEL 染色と HBx の免疫染色を行い、HBx が発現している細胞のうち、TUNEL 陽性の細胞の数を計測した。HBx, X(1-87), Hsp60 それぞれ単独のアポトーシス誘導能を比較した。HBx 単独の場合約 40%の細胞が TUNEL 陽性となった。また Hsp60 と結合できない変異体 X(1-87)では約 33%の細胞が TUNEL 陽性であり、この両者は有意差を認めなかった。また Hsp60 単独の場合は約 10%の細胞にしかア

ポトーシスの誘導は認められず、これは空ベクターのコントロールとほぼ同程度であった。以上より HBx、及び X(1-87)はアポトーシス誘導能をもち、Hsp60 は単独ではアポトーシス誘導能を持たないことが示された。

次に HBx 単独の場合と、同量の HBx に約 3 倍量の Hsp60 を共発現させた場合で TUNEL 陽性細胞の割合を検討した。この系では HBx 単独の場合で約 18%の細胞が TUNEL 陽性細胞であったが、Hsp60 を加えたことにより TUNEL 陽性細胞の割合は約 42%と有意に増加した($p < 0.05$)。逆に Hsp60 と結合できない HBx の変異体 X(1-87)では、単独でのアポトーシス誘導能はあるものの(約 15%)、Hsp60 を共発現させても TUNEL 陽性細胞の増加は認められなかった(約 10%)。以上より Hsp60 は HBx と結合することにより、そのアポトーシス誘導能を増強することが示された。

[考察]

Hsp60 は大腸菌の GroEL と約 60%の相同性がある。GroEL の基質には疎水性の α または β ヘリックスが 2 つ以上存在し、両者は疎水結合を利用して結合すると言われている。HBx には α ヘリックスの部位が 2 箇所(アミノ酸 75-88,109-131)あるという報告もあり、HBx アミノ酸 1-87 の変異体ではその片方が欠失するため、Hsp60 との結合能が弱くなる可能性が考えられる。

今までの報告では、HBx の局在は主に細胞質で、一部が核に存在するといわれている。そのうち、小池ら、また Siddiqui らは HBx がミトコンドリアへ局在すると報告している。同時に Hsp60 はその大部分がミトコンドリアに存在することが報告されている。以上より HBx と Hsp60 の相互作用は、過剰発現の系によるアーチファクトというよりは、生理的なものと考えられる。

HBx のアポトーシス作用に関しては、HBx はアポトーシスを誘導するという報告と、逆に抗アポトーシス作用を持つという相反したデータが報告されている。その中で前述のように HBx がミトコンドリアに局在することを示している二つのグループは、ミトコンドリアが HBx によるアポトーシス誘導の直接の標的であることも報告している。小池らは、HBx がミトコンドリアに存在し、ミトコンドリアの凝集、膜電位の低下、チトクローム C の放出を引き起こし、それが細胞死を誘導することを報告している。Siddiqui らも HBx がミトコンドリアの HVDAC と結合し、ミトコンドリアの膜電位の低下を引き起こすことを報告している。

また本研究中、HBx によるアポトーシス誘導機序に二種類の新しい知見が報告があった。ひとつは HBx が c-FLIP (cellular FADD-like ICE inhibitory proteins) と結合し、そのアポトーシスの抑制機能を阻害しアポトーシスを誘導するという報告である。また、別のグループは HBx が引き起こす細胞内のカルシウムシグナルの変化がアポトーシスに強く関係していることを示している。

逆に HBx は抗アポトーシス作用を有するという報告もあり、その働きに関してはい

まだはっきりとした結論がでていない。しかしこれらの結果を合わせて考えると、HBxはこの相反する両者の働きを微妙に調節していることで、HBVの慢性感染の維持に働いている可能性も考えられる。

Hsp60の相互作用がどのような機序でHBxのアポトーシス誘導能を高めているかは現時点では不明である。しかし仮説を立てるならば、Hsp60はHBxと細胞内で結合することにより、その構造を安定化し、アポトーシスをはじめとする様々な細胞内機能を増強するのではないかと考える。その詳細に関しては、今後検討する必要があると思われる。

今回、HBxの宿主側の結合因子のひとつとして、Hsp60を見出し、その機能解析を行った。今後このようなウイルス蛋白と宿主蛋白との相互作用と機能の検討をひとつひとつ積み重ねていくことで、B型ウイルス肝炎の病態生理の全貌を明らかにしていくことが重要と思われる。