

論文内容の要旨

論文題目 C 型肝炎ウイルスコア蛋白質と結合する
新規宿主因子の同定と解析

指導教員 小池和彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程 内科学専攻

阿部 克俊

C 型肝炎ウイルス (HCV) の core 蛋白は 191 アミノ酸からなり、ウイルスヌクレオキャプシドの主構成成分である上に、宿主細胞の転写、細胞増殖、アポトーシス、脂肪化などに影響を及ぼす生理活性を有した多機能蛋白であり、HCV の病原性発現機構に重要な役割を果たすと考えられている。これまでに HCV core 蛋白と相互作用を示す宿主因子が多数報告されているが、HCV core 蛋白の病原性は未だ不明な点が多い。Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) は RNA 結合能を有する蛋白群である。また、多くの hnRNPs で転写調節や翻訳抑制による蛋白発現の制御など多様な機能が報告され、発癌への関与が示唆されている。本研究では、HCV core 蛋白の未知の生理活性や病原性を明らかにするためにまず HCV core 蛋白と結合する新規宿主因子の同定を試

み、蛋白間相互作用解析を行った。

Tandem Affinity Purification(TAP)法の変法である MEF-tag 精製法および質量分析法により、新規 HCV core 蛋白結合因子として hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F を同定した。293T 細胞および Huh-7 細胞を用いて哺乳動物細胞内での結合を免疫沈降法により解析した。結果、hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F はいずれも強制発現した HCV core 蛋白と哺乳動物細胞内で特異的な結合が認められた。また、hnRNP H1, hnRNP F は HCV 持続感染細胞内の HCV core 蛋白とも特異的に結合した。細胞免疫染色により細胞内局在の検討をした結果、hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F と強制発現した HCV core 蛋白は Huh-7 細胞内で核周囲で共局在することが示唆された。精製蛋白を用いて両者の結合が蛋白-蛋白の直接結合であるかの検討をした。精製 hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F を用いて GST pull-down 法により精製 GST-HCV core 蛋白との結合を解析した結果、精製 hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F と精製 HCV core 蛋白は結合し、両者の結合は蛋白-蛋白の直接結合であることが示された。

hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F と HCV core 蛋白の結合が確認できたため、次にそれぞれの結合領域を hnRNP H1, hnRNP F, HCV core 蛋白の各欠損変異体を用いて解析した。各欠損変異体は、昆虫細胞および大腸菌で発現、精製したものをを用いた。その結果、hnRNP H1 は、少なくとも HCV core 蛋白の aa 1-43 と aa 92-111 の 2 箇所では結合することが示唆された。また、hnRNP F は、少なくとも HCV core 蛋白の aa 1-43 と aa 66-91 の 2 箇所では結合することが示唆された。HCV core 蛋白の aa 1-43 の領域は hnRNP H1, hnRNP F に共通した結合領域であった。hnRNP H1, hnRNP F の HCV core 蛋白との結合領域の解析も同

様に行った。hnRNP H1 の HCV core 蛋白との結合領域は、hnRNP H1 に 3 カ所存在する RRM 領域のうちの C 末端側の 2 つの RRM (RRM2 および RRM3) を含む領域であることが示された。hnRNP F の HCV core 蛋白との結合領域は、aa 1-288 (RRM3 領域よりも N 末端側の領域) にあることが示された。

hnRNP H1, hnRNP F と HCV core 蛋白はいずれも RNA 結合蛋白であることや HCV core 蛋白の hnRNP H1, hnRNP F との結合領域 (aa 1-43) が RNA binding site (aa 1-75) と重なることから、両者の結合に RNA が関与している可能性が考えられた。そこで、両者の結合に対する RNA の影響を検討した。結果、RNase A を添加することにより hnRNP H1, hnRNP F と HCV core 蛋白の結合は増強し、HCV IRES RNA および tRNA を加えることにより容量依存的に阻害された。以上の結果より、両者の結合は蛋白-蛋白の直接結合であり、その結合は RNA によって阻害されることが示された。また、その結合阻害作用における RNA の配列特異性は低いことが示された。HCV core 蛋白の hnRNP H1, hnRNP F 結合領域は、HCV core 蛋白の RNA 結合領域と重なっていることから、RNA は HCV core 蛋白と hnRNP H1, hnRNP F の結合に対して競合阻害している可能性が考えられる。

hnRNP H1, hnRNP F は細胞内で RNA プロセッシング、polyadenylation などに関与している。HCV core 蛋白が hnRNP H1, hnRNP F の相互作用により Bcl-X などの宿主細胞内の RNA プロセッシング制御や polyadenylation に影響し、病原性を獲得している可能性は十分考えられる。HCV core 蛋白と hnRNP H1, hnRNP F の相互作用による hnRNP H1, hnRNP F の機能への影響の解析は、HCV core 蛋白による発癌機構を考える上でも必要である。また、HCV core 蛋白は

HCV ゲノム RNA とキャプシドを形成するほか、IRES 依存性翻訳の調節にも関与している。hnRNP H1, hnRNP F が HCV core 蛋白と相互作用を介し、ウイルス粒子産生や HCV の翻訳調節などの HCV のライフサイクルの調節機構として機能している可能性についてさらなる解析が必要である。