

方法

NS5Bの精製

HCV-BK (genotype 1b) の NS5B 領域を大腸菌発現プラスミドに組み込み、大腸菌に導入、発現誘導後、大腸菌を破碎し、Glutathione-Sepharose™ 4B により GST-NS5B を回収し、さらに Poly(U)-Sepharose™ 4B で精製した。また thrombin protease を用いて GST を除去した NS5B 蛋白も精製した。

3'-UTR mRNA libraryの構築とNS5Bに高親和性結合するmRNAの選別

NS5B が結合する部位は翻訳に関与しない 3'非翻訳領域 (3'-UTR) である可能性が高いと考え、ヒト肝細胞 3'-UTR cDNA library を作製した。

HepG2 細胞より total RNA を抽出し、RNase T1 を用いて RNA の部分的切断を行った。その後、oligo(dT) beads により mRNA を回収し、RT-PCR により cDNA を合成した。polyacrylamide gel から 75~150 塩基のサイズの cDNA を切り出し、T7 promoter を含む vector に組み込んだ。約 10 万のサイズの cDNA library plasmid を Not I で消化し、T7 RNA polymerase を用いて in vitro transcription を行い、RNA を合成して 3'-UTR library pool 0 とした。

GSH-agarose に GST-NS5B を吸着させ、そこに RNA を加え、蛋白に結合した NS5B に高親和性結合する RNA を回収した。回収した RNA は RT-PCR により増幅し、それを鋳型として in vitro transcription を行い、NS5B に高親和性結合する pool RNA を得た。以上を 1 サイクルとして、pool 8 までサイクルを繰り返し、NS5B に高親和性結合する RNA pool を得た。

RNAのNS5B結合能の評価

RNA pool より単離した RNA クローンを ³²P で標識し、GST-NS5B と結合反応を行い、結合強度を dot blot 法で評価した。galectin-1, mRNA と ribosomal protein S4, X-linked (RPS4X), mRNA に関しては RNA gel mobility shift experiment を用いて、さらに詳細な解析を行った。それぞれの 3'-UTR 全長、前半部分、後半部分を合成し ³²P で標識して解析した。galectin-1 3'-UTR mRNA の後半部分にはステムループ構造が存在するため、その 5'端・3'端の欠失 RNA も解析した。

RdRp assay

poly(C)-oligo(G)システムを用いて NS5B の RdRp 活性を測定した。³H]GTP を用いて RdRp により生成された RNA 鎖を標識し、エタノールで沈殿させた。沈殿した RNA をグラスフィルターで捕捉し、液体シンチレーションカウンターで活性を測定した。さらに galectin-1 と RPS4X の 3'-UTR RNA の competitor としての影響を、RdRp 活性を測定することにより解析した。

結果

mRNA 3'-UTR libraryの作製と高親和性mRNAの選別

mRNA 3'-UTR library, pool 0 の 71 サンプルのインサート配列は平均 68.9 塩基であり, poly(A)配列は平均 17.2 塩基であった.

pool 0 から pool 8 までの RNA probe を用いて NS5B への結合能を解析した. pool 5 まではサイクルを重ねる毎に結合能が増強していることが確認された. そのため最も結合能の強い pool 5 の個々のクローンを解析した. 結合能の強いクローンより galectin-1, RPS4X のさらなる解析を行うこととした.

NS5Bとの結合の解析

galectin-1 は GST には結合せず, NS5B のみに結合することを gel shift assay で確認した. また, 3'-UTR RNA を用いて行った gel shift では galectin-1 3'-UTR の後半部分に強い結合が見られた. また RPS4X は 3'-UTR 全体で強い結合が見られ, 前後半に分けた配列では結合能が著しく低下した. galectin-1 3'-UTR の後半部分にはステムループ構造があるが, 近傍の single strand を欠失させると結合が低下した.

in vitro の RdRp を RPS4X は非常に強く抑制した. また galectin-1 も抑制は見られたが, 濃度を 250nM にしても 70%の抑制であった. 結合の強い galectin-1 後半部分も RdRp 抑制は乏しかった.

考察

HCV-NS5B と高親和性結合を示す 3'-UTR を有する mRNA を同定するために 3'-UTR library の構築と pool RNA からの選別を行った. RNaseT1 による RNA の切断処理と cDNA のサイズ分けを行うことで 3'-UTR に焦点を絞った library を構築できたと考えられる. 得られたクローンにおけるインサート配列は平均約 70 塩基であり, 全体の約 37%を占める 75 塩基以下の 3'-UTR の配列は 96%以上カバーしていた. 短い 3'-UTR のクローンでもコーディング領域は僅かしか含まれなかった (コーディング全体の 1-2%). また, 比較的長い 3'-UTR ではコーディング領域が全く含まれなかった. 今回のサイズ分けはほぼ至適と考えられた.

selection では pool 毎の結合強度は 2 サイクル目から急速に増加し, 4~5 サイクル目でほぼプラトーに達した. この結果からは比較的多くの種類の肝細胞内 RNA が NS5B に結合するものと考えられた.

同定した 6 つ高親和性クローンの 3'-UTR には共通の配列は認められず, NS5B が多様な RNA 配列を認識しうることを示唆された. 同定されたクローンには短いステムと小さなループが多く見られた. 強い結合が見られた galectin-1 の後半部分にもステムループ構造が存在しており, NS5B との結合に重要と考えられた. また single strand 部分を欠失させることで結合が大きく低下することが認められ, single strand 構造も結合に関与している可能性が示唆された. 一方, RPS4X は single strand 構造をとること

が予想された。前半部分や後半部分よりも 3'-UTR 全体に強い結合が見られ、分断した付近の配列が結合に関与している可能性が考えられた。分断部位の 3 塩基下流には polyadenylation signal があり、galectin-1 の後半部分で欠失させた 5' 端も polyadenylation signal に一致していたことから NS5B が polyadenylation signal 近傍の配列を認識している可能性も考えられた。

mRNA と NS5B の結合により RdRp 活性の抑制もしくは RdRp による mRNA の複製が起きる可能性がある。RPS4X は *in vitro* で RdRp 活性を強く抑制しており、発現量も多いことから抑制的に働く可能性が考えられた。galectin-1 は強い結合を示したが RdRp 活性の抑制は軽度であった。この 2 つの RNA の結合能はほぼ同等であったが、活性抑制の差違の原因の一つとして結合部位の違いが考えられる。また、RdRp により RNA の複製が起きるとしても RPS4X は発現量が多いため影響は比較的少ないと考えられる。galectin-1 は元々の発現量が少なく変化率が大きいと考えられる。galectin-1 は T-Cell のアポトーシスを誘導することが知られており、HCV の感染した T-cell 内で複製され、その発現量が増加するならば持続感染に有利に働く可能性があると考えられる。

この方法を用いて、NS5B に結合する mRNA をさらに同定し、NS5B と mRNA の相互作用についてさらに解析したい。また、同定された遺伝子が RdRp により複製されるか、*in vivo* でも結合するかは今後の重要な検討課題であり、解析を進めていきたい。

結論

- 1) 肝細胞内 mRNA 3'非翻訳領域の cDNA library を構築した。
- 2) library の中から NS5B に高親和性結合を示す mRNA を選別し、その中から galectin-1, RPS4X の 3'-UTR を解析した。