

論文内容の要旨

論文題目 C型肝炎ウイルス NS5A タンパク質による ウイルス産生の制御機構の解析

指導教員 渡邊 治雄

東京大学大学院 医学系研究科

平成 19 年 4 月進学

医学博士課程 病因・病理学専攻

岡本 有加

[背景・目的]

C 型肝炎ウイルス (HCV) は、1989 年 Choo らにより非 A 非 B 型肝炎の原因ウイルスとして同定された、フラビウイルス科ヘパシウイルス属の RNA ウイルスである。感染患者の約 50 から 80 % で持続感染が成立し、十数年から数十年という長い年月の後、肝硬変を経て肝細胞がんに至る。全世界での感染患者は 2 億人近くおり、重大な社会問題である。

その非構造タンパク質の一つである NS5A は、膜結合型のリン酸化タンパク質であり、3 つのドメイン構造をとる。この内 Domain I は RNA 結合部位を有し、欠損変異体などを用いた実験、細胞培養において見られる適応変異からウイルスのゲノム RNA 複製に重要だと考えられている。Domain II は、インターフェロン感受性決定領域 (interferon sensitivity determining region (ISDR)) を含んでおり、インターフェロン治療の反応性に関与する。Domain III は genotype 及び株間での配列保存性が低く、この領域への外来遺伝子の挿入により感染性粒子産生が著しく低下することが知られている。また、C 末端側のセリン残基のリン酸化と Core-NS5A の相互作用が粒子形成には必須だと報告されている。このように、NS5A は非構造タンパク質ではあるが、ウイルスの

ゲノムRNA複製だけでなく感染性粒子形成にも重要な役割を果たしている。しかし、その制御機構は多くが未解明である。そこで、本研究では、培養細胞内に効率的に複製増殖が可能でありウイルスの生活環の全過程を解析可能なJFH-1株を用い、そのNS5Aを様々な株に置き換えたキメラ体のウイルス産生を比較することにより、NS5Aによるウイルス産生の制御機構を解析した。

[結果]

JFH-1株のNS5Aを、細胞内での複製能・粒子産生能等が異なるH77株(genotype 1a), Con1株(genotype 1b)及びJ6株(genotype 2a)のNS5Aに置換したキメラ体を作製した。*In vitro*で合成した全長キメラRNAをHuh 7.5.1細胞に導入し、経時的に3日間、細胞内及び上清中のCoreタンパク質の量をELISAで定量した。その結果、JFH-1株のNS5Aをこれらの株で置き換えたキメラ体は全て複製増殖し、培養上清中にCoreタンパク質を認めた。しかし、その程度は各キメラ体間により異なり、J6株のNS5Aに置換したJFH-1/5A-J6では亢進し、H77株に置換したJFH-1/5A-H77及びCon1株に置換したJFH-1/5A-Con1では減弱していた。次にこれらの株のNS5Aによる置換がウイルスの生活環のどの段階に影響しているかについて検討した。翻訳及び複製過程についてはルシフェラーゼをレポーターとしたサブゲノミックレプリコンを用いた検討を行った。その結果、JFH-1/5A-J6ではJFH-1/WTに比較してわずかな複製能の低下を認めたが、JFH-1/5A-H77及びJFH-1/5A-Con1では1/2程度まで低下していた。翻訳について差は認められなかった。また、Huh7-25を用いて培養上清中のCoreタンパク質量の差異の原因について検討した。*In vitro*で合成した全長キメラRNAを導入し、導入後2日目の細胞内及び上清中のCoreタンパク質を定量すると共にウイルスの感染力価を測定した。Intracellular specific infectivityを細胞内のウイルス感染力価を細胞内

Core タンパク質量で補正することで、分泌効率を上清中のウイルス感染力価を細胞内のウイルス感染力価で割ることでそれぞれ算出した。その結果、JFH-1/5A-J6 では intracellular specific infectivity が約 9 倍に亢進し、JFH-1/5A-H77 では約 1/3 倍、JFH-1/5A-Con1 では約 1/15 倍に減弱していた。分泌効率に有意な差は認めなかった。

これらの結果から、JFH-1/5A-J6 は JFH-1/WT に比べて顕著に高い粒子形成効率を示したため、このキメラ体のウイルス粒子形成過程について、以降の解析を行った。NS5A がウイルス粒子形成過程に関与する分子機構として、NS5A-5B 間のプロセッシング効率、複製と粒子形成の切り替えに関与すると考えられる NS5A のリン酸化状態、脂肪滴(Lipid Droplet(LD))周囲における NS5A と Core との相互作用などが報告されており、これらについて検討を行った。

まず、NS5A-5B 間のプロセッシングについて検討した。NS3/4A による NS5A-5B 間のプロセッシングに必須なアミノ酸を含む NS5A の C 末端の 10 アミノ酸配列を比較した結果、J6 株と JFH-1 株において差異を認めた。これが粒子形成効率に影響している可能性を検討するため、NS5A の C 末端のみを J6 株由来の配列に置き換えたキメラ体(JFH-1/5AcJ6)及び JFH-1/5A-J6 の NS5A の C 末端の 10 アミノ酸を JFH-1 株由来の配列に置き換えた変異体(JFH-1/5A-J6cJFH-1)を作製し、ウイルス産生能を比較した。サブゲノミックレプリコンを用いて翻訳及び複製を評価し、Huh7-25 細胞を用いて粒子形成効率及び分泌効率を評価した。その結果、JFH-1/5AcJ6 は JFH-1/WT と比較して、JFH-1/5A-J6 と同程度の粒子形成効率の亢進が認められた。また、JFH-1/5A-J6cJFH-1 の粒子形成効率は JFH-1 株と同程度であった。翻訳、複製能、及び分泌効率に有意な変化は見られなかった。そこで、これらの変異体のプロセッシング効率をパルスチェイス法により検討した。T7 RNA ポリメラーゼをコードする組換え

ワクシニアウイルスを感染させた細胞に、キメラ体プラスミドを導入し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン/システインでラベルしたタンパク質を合成させた。抗 NS5B 抗体で免疫沈降し、放射性シグナルを利用して、未切断の NS5AB のバンドと切断された NS5B のバンドを検出し、量を比較した結果、JFH-1/5AcJ6 において JFH-1/WT と比較してプロセッシング効率の上昇を認めた。

次に、NS5A のリン酸化状態についての検討を行った。NS5A には高リン酸化型と低リン酸化型の状態が存在し、その比率により、粒子形成効率が影響されることが報告されている。また、Domain III 内のセリン残基のリン酸化が Core との相互作用に必須であることも知られている。そこで、粒子形成効率の異なった JFH-1/WT 及び JFH-1/5AcJ6 の合成 RNA を細胞に導入し、経時的に NS5A のリン酸化状態をウエスタンブロットングにより比較したが、差は認められなかった。

更に、LD 周囲における NS5A と Core との相互作用がウイルスの粒子形成過程において必須であることから、JFH-1 株の Core と JFH-1, H77, Con1 及び J6 株の NS5A を 293T 細胞に強制発現し、免疫沈降を行って相互作用を比較した。その結果、J6 株と JFH-1 株の NS5A は JFH-1 株の Core との相互作用の強度は同程度であり、NS5A の C 末端の配列の置換も相互作用に影響を及ぼさなかった。一方、H77 及び Con1 株の NS5A と JFH-1 株の Core との相互作用は JFH-1 株より強かった。

[考察]

本研究では、JFH-1 の NS5A を他の株由来に置き換えたキメラ体を作製し、これらのウイルス産生能を比較することで NS5A がウイルスの生活環にどのように関与しているかを検討した。その結果、(1)全てのキメラ体においてウイルス産生が可能であった。(2)しかしその程度は株間によって大きく異なっており、JFH-1/5A-J6 におけるウイ

ルス産生の亢進は、その高い粒子形成効率に依存し、JFH-1/5A-H77 及びJFH-1/5A-Con1
のウイルス産生の低下はそれらの複製及び粒子形成効率の低下に因ることが明らか
になった。 (3)NS5A-5B間のプロセッシング効率がJ6 株のNS5Aによる置換キメラ体の粒
子形成効率に重要である可能性が示唆された。

JFH-1/5AcJ6 では、NS5A の C 末端付近の 2438 及び 2438 番のアミノ酸配列が NS5A-5B 間のプロセッシング効率を上昇させることにより粒子形成に関わる NS5A の量が増加し、粒子形成効率が亢進したのであると考えている。本研究は、NS5A によるウイルス粒子形成の制御機構に新たな知見を与えると共に、今回作製した NS5A のキメラ体は培養細胞内での全長の感染増殖系が JFH-1 株に限られている中で、様々な genotype の NS5A に対する薬剤の効果を評価できるものとして有用であると考えられる。