

論文の内容の要旨

論文題目 C型肝炎ウイルスの増殖を制御する新規宿主因子の解析

氏名 後藤 耕司

C型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus; HCV) は血液感染を主たる感染経路とし、高率に慢性化して肝硬変・肝癌の主要な原因となっている。現行の治療では奏効率は平均して 50%と満足いくものではなく、さらなる HCV 治療の研究・開発が望まれるが、HCV 増殖メカニズムの詳細は未だ不明な点が多い。

9.6kb からなるウイルスゲノムからは 1 本の長い precursor protein が翻訳され、宿主及びウイルス自身のプロテアーゼにより、N 末端から順に core、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B の各ウイルス蛋白にプロセッシングされる。この中で、特に NS5A 蛋白質は複製～粒子形成に至るまで、HCV 生活環の多くの部分で中心的役割を果たしており、また、これまでにウイルス増殖過程は細胞内の膜構造上で起きていることが明らかとなってきた。そこで、今回、HCV 生活環に関わる宿主因子を効率よく同定するために、この NS5A 蛋白質と細胞内膜構造に注目し、NS5A と相互作用し、膜画分に分布する宿主蛋白を検索・解析した。その結果、NS5A と相互作用

して膜画分に分布する 18 種の宿主蛋白質が同定され、HCV cell culture system および subgenomic replicon system を用いた RNAi スクリーニングにより、そのうち 4 種の蛋白質が HCV 増殖に関与する可能性が示唆された。今回は、そのうち、HCV の蛋白翻訳と RNA 複製の 2 つの過程に関与する可能性が示唆された embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila-like 1 (ELAVL1) について、さらに詳細な解析を行った。

ELAVL1 (HuR) は 3 つの RNA 結合領域 (RNA recognition motif: RRM1、RRM2、RRM3) とその間をつなぐ hinge region からなる RNA 結合蛋白質で、広範な細胞に発現して、mRNA の安定性や mRNA からの蛋白翻訳を修飾している。これまでに ELAVL1 は HCV RNA の 3' UTR に結合すること、monocistronic replicon のウイルス複製に関与すること、また HCV IRES の dual reporter assay で HCV IRES 依存性翻訳に関与することが報告されていたが、ウイルス蛋白との相互作用や RNA 複製への関与など、詳細な機能は未だ解析されていなかった。

今回、co-immunoprecipitation assay により ELAVL1 は NS5A および NS3 と相互作用することが明らかとなり、欠失変異体を用いた解析で NS5A とは domain II で相互作用し、また NS3 とは helicase 領域で相互作用することが示唆された。IP-RT-PCR を用いた解析では、感染細胞内での ELAVL1 と HCV RNA との相互作用が確認された。また、ELAVL1 の immunodepletion を用いた cell-free translation assay、および全長ウイルス RNA (JFH-1 株) を用いた cell-based translation assay によって、ELAVL1 の HCV 翻訳への関与がより明確に示された。さらに membrane flotation assay を用いた解析で ELAVL1 が replication complex に含まれ、さらに ELAVL1 特異抗体により cell-free での HCV replication が抑制されることから、RNA 複製への関与も明らかとなった。したがって ELAVL1 は HCV 生活環において多機能蛋白質として作用していることが解明された。

ELAVL1 の欠失変異体を用いた co-immunoprecipitation assay および biotinylated

HCV RNA を用いた RNA pulldown assay により、ELAVL1 は、NS5A とは hinge region で、NS3 とは RRM2 で、HCV RNA とは RRM1 で相互作用することが示された。そこで、siRNA に抵抗性の wobble mutant の欠失変異体を ELAVL1 に対する shRNA を持続発現する細胞に強制発現し、gain-of-function を観察したところ、hinge region および RRM2 の欠失変異体では HCV 翻訳が回復するが、RRM1 の欠失変異体では HCV 翻訳の回復を認めなかった。このことから、NS5A および NS3 との相互作用ではなく、HCV RNA と ELAVL1 の相互作用が HCV 翻訳に重要であることが明らかとなった。一方で、hinge region、RRM2、RRM1 のいずれの欠失変異体でも RNA 複製は回復せず、RNA 複製には ELAVL1 と NS5A、NS3、HCV RNA のすべてとの相互作用が重要であることが示された。実際、membran flotation assay を用いた解析では、NS5A と相互作用しない hinge region 欠失 ELAVL1 (ELAVL1 dh) は replication complex に誘導されず、ELAVL1 dh の強制発現細胞では HCV RNA および NS3 の replication complex への導入も阻害された。また HCV RNA と相互作用しない RRM1 欠失 ELAVL1 の強制発現でも、HCV RNA の replication complex への分布の阻害が観察された。これまでにウイルスの NS4B や宿主の VAP-A/B が replication complex 形成の膜上での基盤となっていることが示唆されてきたが、今回の結果から ELAVL1 は HCV RNA 上での安定した replication complex の維持に関与しており、NS5A との相互作用を介して脂質ラフト上への分布に寄与しているものと考えられた。さらに ELAVL1 の細胞質・核間の shuttling 配列が存在する hinge region に NS5A が結合することで、ELAVL1 の分布を制御していると推測された。

本研究の結果から、ELAVL1 の阻害は replication complex の維持を困難とし、RNA 複製を抑制すると推測される。既に ELAVL1 の機能を阻害する小分子が分離・報告されており、それら小分子化合物の抗 HCV 効果も期待される。現在、プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、NS5A 阻害剤などウイルスを標的とした抗ウイルス薬が多く

開発途上にあるが、ウイルスの半減期はおよそ 3 時間、1 日に 10^{12} virions が産生・消滅するとされ、ウイルスの高い複製効率と RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの proofreading 活性の欠如により、ゲノム RNA の変異率は $\sim 10^{-3}$ base substitutions/genome site/ year と高率なため、速やかな耐性変異出現が懸念される。耐性出現の観点からは、HCV 生活環に関わる宿主因子は有望な治療標的と考えられる。宿主因子を標的とした場合、常に生理作用の阻害による副作用出現が問題となるが、ELAVL1 阻害剤は細胞毒性が低いことが分かっており、今後の臨床応用への期待も高い。本研究は HCV 複製の新たなメカニズムを明らかとし、さらに、開発が望まれる宿主因子を標的とした新薬開発にも有用な知見を与えるものである。