

論文審査の結果の要旨

氏名 安東 友美

本論文は二章からなる。第一章は C 型肝炎ウイルス(HCV)複製複合体における ATP 制御の可視化と機能解析、第二章は C 型肝炎ウイルスゲノムの quasispecies 解析について述べられている。

第一章では、HCV 複製細胞内の ATP 分布について包括的な解析が行われ、ウイルス複製による宿主細胞内 ATP 分布の攪乱が報告された。

HCV 感染が単なる肝炎だけでなくインスリン抵抗性や脂肪肝などの代謝異常も引き起こしていることが明らかになっている。また、HCV 感染が糖代謝に影響を与えること、ATP が HCV の複製を亢進することが報告されている。糖代謝異常が ATP の代謝異常を介して HCV 複製の活性化に繋がっている可能性が考えられたが、複製細胞における ATP の機能は明らかになっていなかった。そこで近年報告された、FRET 技術を利用して細胞内 ATP の時間的・空間的な分布・変動を可視化するプローブ(ATeam)を用いて、HCV 複製細胞における ATP の分布を検証することを目的に研究が行われた。

ATeam を HCV 複製細胞に発現させ非複製細胞と比較したところ、HCV 複製細胞の細胞質で ATP 濃度が低下していた。複製複合体を含む膜画分の ATP 消費量を解析したところ、非複製細胞と比較して ATP の消費量が約 2 倍に亢進していた。複製を阻害したところ、ATP 消費量は非複製細胞と同等まで低下した。複製による ATP 消費量の亢進が、HCV 複製細胞の ATP レベル低下の一因であることが示唆された。HCV 複製時の複製複合体内の ATP 濃度を解析可能な系(HCV-ATeam)を構築した。HCV が複製しない NS5A-ATeam 単独発現細胞と比較したところ、細胞質はおよそ 2 mM から 1 mM に低下している一方、複製複合体の存在を示す顆粒状の部位では 5 mM という非常に高い ATP 濃度であった。複製を阻害したところ、短時間の阻害では細胞質、複製複合体共に ATP 濃度が亢進する一方、長時間の阻害ではどちらも Huh-7 細胞同等まで低下した。HCV の複製が ATP 分布の攪乱の原因であることが示唆された。

本研究では HCV が複製している細胞内での ATP 分布の攪乱について、複製との関連が検証された。これまでウイルス複製が ATP の分布に及ぼす影響は解析されておらず、有用な知見が得られたと評価する。HCV 複製細胞で ATP 分布の大幅な変化が実際の患者内で起きているならば、生体内の生理活性に大きく影響していると考えられる。ATP の分布変化を引き起こすメカニズムや HCV 感染増殖系を用いた検証等、今後の進展に期

待したい。

第二章では、次世代シーケンサーを用い、一人の HCV 陽性患者血清から複数の HCV の配列全長を決定する手法の開発が行われた。

HCV ゲノムは多種性(quasispecies)を保有し、感染中和抗体や抗ウイルス薬投与に適合すると考えられている。これまでの HCV 研究では、各塩基について優位に存在する塩基をつなげたコンセンサス配列が一般的に用いられており、ウイルスゲノムの変異も多くはコンセンサス配列に対する変化と理解されてきた。従来の PCR およびクローニング技術では HCV の多種性に対応しきれないために、quasispecies や個々のウイルスゲノム全長にわたる網羅的な解析は全く行われていない。本研究では次世代シーケンスを従来の PCR 法と組み合わせ、HCV ゲノムの多種性をウイルスゲノム全長にわたり解析する手法の開発が行われた。本論文では HCV 陽性血清 1 検体を解析し報告した。患者血清中に少なくとも 3 種類の独立したウイルスゲノム RNA 配列が存在することが示された。C 型慢性肝炎患者の標準治療法であるインターフェロン/リバビリン併用療法の感受性を決定する因子は複数報告されているが、その相関関係は明らかになっていない。今回、複数の感受性因子が一種類の配列上に共存していることが初めて確認された。

本研究は HCV ゲノム RNA が持つ複数の代表配列が、病原性、薬剤感受性、宿主の免疫反応などさまざまな淘汰圧力に対してどのように寄与しているのかを解析可能なツールと成りうる。開発された手法がどの程度の存在比の種まで解析できるのか、また系の確認を他の手法を用いて行う必要がある。今後、quasispecies の割合、経時変化、治療による変化等が解析可能になれば、非常に有益な手法に発展すると思われる。

なお、本論文第一章は今村博臣、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗、渡邊俊樹との共同研究であるが、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上赤字を含めて 1960 字