

審査の結果の要旨

氏名 金 ソレイ

C型肝炎ウイルス研究において遺伝子型 1b のウイルス培養系が存在しないことが問題となっている。本研究では、培養細胞において効率よく HCV 複製増殖が可能な遺伝子型 2a の JFH-1 株の全長ウイルス遺伝子 cDNA を用いて、その NS3 プロテアーゼ領域を遺伝子型 1b の Con1 株に置き換えたキメラウイルス cDNA を作製した。まず、キメラウイルスのサブジェノミックレプリコン実験により複製効率を向上させる適応変異を同定した。この適合変異を全長のキメラウイルス cDNA に導入し、異なる遺伝子型由来の NS3 プロテアーゼによる HCV 増殖変化の機構を解析した。

その結果、以下の 5 点が明らかとなった。

1. ウイルス遺伝子の一過性複製実験系で、細胞内外の HCV コア蛋白質濃度を経時的に測定した。適応変異を持つキメラウイルス遺伝子を導入した細胞の細胞内コア蛋白質量はトランスフェクション後、72-96 時間で JFH-1 の場合とほぼ同じレベルまで増加した。その一方、上清中のコア蛋白質は 96 時間後に少量検出されたが、JFH-1 と比較してかなり低かった。この結果は、適応変異はキメラウイルスの複製効率は回復できるが、ウイルス粒子産生能は回復できない可能性を示した。
2. キメラウイルス遺伝子導入細胞の培養上清の感染力価は検出できなかった。さらに上清中に分泌された HCV 蛋白質がウイルス粒子の一部であるかを確認するためショ糖密度勾配で解析すると、JFH-1 の場合はウイルス蛋白質と RNA は 1.15 mg/ml の密度にシャープなピークを示した。しかし、キメラウイルスはより軽い密度までブロードなピークであった。これらの結果は、キメラウイルスはウイルス粒子産生能が低いことを示した。
3. キメラウイルスのウイルス粒子産生能が低い理由を調べるため、HCV の感染性ウイルス粒子産生に重要な脂肪滴と HCV コア蛋白質の細胞内の局在を免疫染色で観察した。JFH-1 の場合、コア蛋白質は脂肪滴周囲に局在したが、キメラウイルスの場合、脂肪滴周囲には局在せず、脂肪滴もサイズが小さいことが観察された。異なる遺伝子型の NS3 プロテアーゼの置換によりウイルスゲノム複製は維持されるが、HCV コアの局在や

脂肪滴の性質が変わることが明らかとなった。

4. NS3 プロテアーゼは宿主の RIG-I pathway の IPS-1 を切断することが知られている。そこで IPS-1 の領域を含む Huh7OK1/TG-Luc 細胞を用いて NS3 プロテアーゼの切断効率を解析した結果、キメラウイルスのプロテアーゼ切断効率は JFH-1 に比べて 3 倍程度低下していた。上記 1-3 の結果から、NS3 プロテアーゼは感染性ウイルス粒子産生に重要なことが示されたが、この結果はプロテアーゼ活性の低下がその原因である可能性を示唆した。
5. NS3 プロテアーゼ阻害剤を処理すると、遺伝子型 2a の JFH-1 より NS3 プロテアーゼ領域を遺伝子型 1b の Con1 に置き換えたキメラウイルスに対する阻害効果が大きかった。従って、本研究で作製したキメラウイルスを用いた実験系は、遺伝子型 1b 特異的な NS3 プロテアーゼ阻害剤の効果を検証可能であることが示された。

以上、本研究は遺伝子型 1b 特異的な NS3 プロテアーゼ阻害剤実験系に有用なキメラウイルスを樹立した。さらに、HCV の NS3 プロテアーゼは感染性ウイルス粒子産生に重要な因子であることを初めて示し、このキメラウイルス実験系は NS3 プロテアーゼ機能のメカニズム解析に有用であると考えられ、学位の授与に相当すると認められる。