

氏名	わた し こう いち 渡 士 幸 一
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 513 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	C 型肝炎ウイルス core タンパク質による宿主細胞転写制御機構の解析

論文調査委員 (主 査)
 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 伊 藤 信 行 教 授 川 寄 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

C 型肝炎ウイルス (HCV) は非 A 非 B 型肝炎の主な原因ウイルスとして 1989 年に同定された。HCV の持続感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がんといった慢性肝疾患の発症と密接に関連していると考えられている。HCV によるこれらの病態の発症機序は現在のところ明らかではないが、これまでに HCV core タンパク質 (core) がその肝疾患発症と関連していることを示唆する報告が蓄積している。すなわち、core を発現するトランスジェニックマウスは肝がんを発症すること、あるいは core を発現するある種の細胞はトランスフォームすることなどがこれまでに報告されている。また core はさまざまなアポトーシス刺激に対する感受性を修飾することが報告されている。著者は、core が宿主細胞のアポトーシス感受性を修飾する分子基盤を明らかにすることを目的とした研究を行い、以下の研究成果を得た。

第一章 HCV core による転写因子 NF- κ B 活性化機構の解析

これまでに当研究室において、HCV core が Fas あるいは TNF- α を介するアポトーシスを抑制することを見い出している。この抗アポトーシス効果は、core による転写因子 NF- κ B の活性化に関連している可能性を示唆する結果が得られたので、筆者は core によるアポトーシス感受性修飾機構を明らかにするために、core による NF- κ B 活性化機構についての解析を行った。

そのためにまず、core 分子内の NF- κ B 活性化に関与する領域の同定を試みた。さまざまな core 欠失変異体を作製し、培養細胞内で発現させてその NF- κ B 活性化能を検討したところ、core の C 末端領域を欠失した場合に NF- κ B 活性化能が消失することがわかった。しかしながら野生型 core が細胞質に局在するのに対してこの C 末端欠失変異体の細胞内局在は核へと変化していたため、core の細胞内局在と NF- κ B 活性化能との関連を検討した。すなわち C 末端領域欠失変異体 core を細胞質に局在化させるように改変した種々の変異体を作製しこれを培養細胞内で発現させて NF- κ B 活性化能を調べた。その結果 core が細胞質内において NF- κ B を活性化していることを示唆するデータを得た。さらに C 末端領域欠失変異体 core を一定条件下で粗面小胞体に局在させた実験により、細胞質の特に粗面小胞体に存在する core が NF- κ B 活性化に必要である可能性が示唆された。また粗面小胞体に局在化させた core にさまざまな欠失を導入することで core の 21 番目から 80 番目のアミノ酸領域が NF- κ B 活性化に関与することを明らかにした。

第二章 HCV core によるレチノイド情報伝達系活性化機構の解析

HCV core 発現細胞におけるさまざまな刺激によるアポトーシスの感受性を検討することにより、今回筆者は新たに、MCF-7 細胞において core は all *trans*-レチノイン酸 (ATRA) により誘導される細胞死を増強することを見出した。またこの細胞死増強作用は、レチノイン酸受容体 (RAR) α の活性化およびその下流遺伝子の発現誘導の増強と相関していることが判明した。そこで筆者は core による RAR の転写活性化の分子機構を明らかにする目的で、core と相互作用する細胞性因子を酵母ツーハイブリッドシステムによりスクリーニングした。その結果、ヒト前立腺 cDNA ライブラリーより Sp110b を同定した。これまで Sp110b の機能は明らかでなかったが、Sp110b は RAR α の転写活性を抑制し、*in vitro*

において ATRA 存在下で RAR α と相互作用することを示唆する結果を得た。これにより Sp110b は RAR α の転写活性を負に制御する転写コファクターであることが示唆された。また core は Sp110b との相互作用を介して、Sp110b の細胞内局在を核から細胞質の特に小胞体膜上に変化させることが示唆された。core による RAR α 転写活性化は、Sp110b 内の core との結合領域から成るペプチド断片との共発現により解除され、また Sp110b とほとんど相互作用が見られなかった core 点変異体は RAR α 転写活性に影響を与えなかった。これにより core による RAR α 転写活性化は core と Sp110b との相互作用が重要であることが示唆された。

以上、著者は HCV core タンパク質が宿主細胞のさまざまな刺激に対するアポトーシス感受性を変化させる分子機構の一端を示した。本研究は HCV による病態形成を司る分子機構を推察する上で有用な知見であるとともに、ウイルスタンパク質による宿主細胞転写の新しい修飾機構を明らかにしたものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

C 型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がんなどの慢性肝疾患の発症に関連していると考えられており、本邦における肝がん患者の約 8 割に HCV の持続感染が見られることが明らかになっている。現在本邦において約 150 万人いると推定されている HCV 感染者からの肝がんの発症者は今後も増加するものと予測されていることから、有効な抗 HCV 剤の開発や、HCV による病態形成のメカニズム解明が急がれる事態となっている。HCV によるこれらの病態の発症機序は現在のところ明らかではないが、これまでに HCV の構造タンパク質の一つである Core タンパク質 (Core) がその肝疾患発症と関連していることを示唆する報告が蓄積している。すなわち、Core を発現するトランスジェニックマウスは肝がんを発症すること、あるいは Core を発現するある種の細胞はトランスフォームすることなどが報告されている。また Core はさまざまなアポトーシス刺激に対する感受性を修飾することが報告されている。本論文は、Core が宿主細胞のアポトーシス感受性を修飾する分子基盤を明らかにしたものであり、得られた成果は以下の通りである。

これまでに HCV Core は、転写因子 NF- κ B の活性化により Fas あるいは腫瘍壊死因子 (TNF)- α を介するアポトーシスを抑制することが示唆されていたので、この Core による NF- κ B 活性化の分子機構についての解析を行った。その結果さまざまな Core 欠失変異体を用いた実験により、Core の C 末端領域を欠失した場合に NF- κ B 活性化能が消失し、その細胞内局在は細胞質から核へと変化することが観察された。そこで Core の細胞内局在と NF- κ B 活性化能との関連を検討したところ、Core が細胞質内において NF- κ B を活性化していることを示唆するデータを得た。さらに C 末端領域欠失変異体 Core の細胞内局在を制御することを可能とした実験系により、細胞質の中でも特に小胞体に局在する Core が NF- κ B 活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。また小胞体に局在化させた Core の変異体解析により、Core の 21 番目から 80 番目のアミノ酸領域が NF- κ B 活性化に関与することを明らかにした。

また、HCV Core 発現細胞におけるさまざまな刺激によるアポトーシスの感受性を検討することにより、本論文で新たに MCF-7 細胞において Core は all *trans*-レチノイン酸 (ATRA) により誘導される細胞死を増強することが判明した。またこの細胞死増強作用は、レチノイン酸受容体 (RAR) α の活性化およびその下流遺伝子の発現誘導の増強と相関していることが観察された。そこで Core による RAR α の転写活性化の分子機構を明らかにする目的で、Core と相互作用する細胞性因子を酵母ツーハイブリッドシステムによりスクリーニングした。その結果、ヒト前立腺 cDNA ライブラリーより Sp110b を同定した。これまで Sp110b の機能は明らかでなかったが、Sp110b は RAR α の転写活性を抑制し、*in vitro* において ATRA 存在下で RAR α と相互作用することを示唆する結果を得た。これにより Sp110b は RAR α の転写活性を負に制御する転写コファクターであることが示唆された。また Core は Sp110b との相互作用を介して、Sp110b の細胞内局在を核から細胞質の特に小胞体膜上に変化させることが示唆された。Core による RAR α 転写活性化は、Sp110b 内の Core との結合領域から成るペプチド断片との共発現により解除され、また Sp110b とほとんど相互作用が見られなかった Core 点変異体は RAR α 転写活性に影響を与えなかった。これにより Core による RAR α 転写活性化は Core と Sp110b との相互作用が重要であることが示唆された。

以上の研究は、HCV Core タンパク質が宿主細胞のさまざまな刺激に対するアポトーシス感受性を変化させる分子機構の一端を示したものである。これは HCV による病態形成を司る分子機構を考える上で有用な知見であるとともに、HCV

における病態形成を阻害する創薬の標的となり得る点や、ウイルスタンパク質による宿主細胞転写の新しい修飾機構を明らかにしたものである点において評価に値すると考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成15年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。