

氏 名	しょう じ いく お 夫 勝 二 郁 夫
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1873 号
学位授与の日付	平 成 9 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	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Proteolytic activity of NS3 serine proteinase of hepatitis C virus efficiently expressed in <i>Escherichia coli</i> . (大腸菌で効率良く発現させた C 型肝炎ウイルス NS3 セリンプロテイナーゼの蛋白質切断活性)
論文調査委員	(主 査) 教 授 石 本 秋 稔 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 千 葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

C型肝炎には、高率に慢性化し、肝硬変、肝細胞癌へ移行する重篤な感染症である。インターフェロン (IFN) が C 型慢性肝炎の治療に用いられているが、著効例は50%に満たない。また、重篤な副作用もあり、特異的な抗ウイルス薬の開発が望まれている。

C型肝炎ウイルス (HCV) は、約9400塩基のプラス鎖 RNA ウイルスで、フラビウイルス科に属する。近年の研究で、HCV の構造蛋白質の 3 カ所の切断は宿主細胞由来のシグナラーゼ、非構造蛋白質の NS2/3 は NS2/3 プロテイナーゼ、NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A, NS5A/5B は NS3 セリンプロテイナーゼにより切断されることが示された。そこで、ウイルス蛋白のプロセシングに必須な NS3 セリンプロテイナーゼが抗 HCV 薬の標的として注目されている。詳細な生化学的解析や構造解析を進めるために本酵素の単離精製が必要であるので、大腸菌を用いて大量発現、精製を試みた。

1. NS3 セリンプロテイナーゼの発現と精製

T7 プロモーター下に NS3 の N 末端198アミノ酸領域を挿入し、N 末端側に His-tag を付加したプラスミド pET3440、及び活性中心の Ser¹¹⁶⁵ 残基、His¹⁰⁸³ 残基を Ala 残基に置換した変異体を作製した。これら大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、isopropylthio-beta-D-galactoside (IPTG) で発現を誘導した。約 29 kDa の NS3 蛋白の発現が認められた。基質として NS5 蛋白を発現するプラスミド pACYCET6690 を作製した。pET3440 または変異体を同一菌体内で発現させ、抗 NS5A 抗体を用いたイムノブロット法で解析したところ、pET3440 では NS5A/5B 間の切断がみられたが、変異体では切断されなかった。これより、発現させた NS3 蛋白がセリンプロテイナーゼ活性を有することが確認された。また、Ni キレートアフィニティークラムで3440蛋白を部分精製 (90%以上) した。

2. 試験管内切断活性

NS5 蛋白を基質にして3440蛋白の酵素活性を検討した。3440蛋白と NS5 蛋白を反応させたところ、

NS5A/5B 間の切断がみられた。一方、変異体では切断が認められなかった。これより、部分精製された NS3 蛋白がセリンプロテイナーゼ活性を有することが確認された。

3. 阻害剤の検索

フラビウイルス科の黄熱病ウイルスでは、セリンプロテイナーゼに変異を導入するとウイルスの複製が阻害される。よって、NS3 セリンプロテイナーゼの阻害剤は HCV の複製を阻害すると期待される。そこで、既知のセリンプロテイナーゼ阻害剤の影響を検討した。阻害剤存在下に 3440 蛋白と NS5 蛋白を同時に大腸菌内で発現させ、NS5 の切断産物を検討した。antipain, aprotinin, leupeptin, p-amidinophenyl methanesulfonyl fluoride (APMSF) 等では、高濃度でも阻害作用がなかった。一方、N-p-tosyl-L-lysine chloromethyl keton (TLCK) では 5 mM という高濃度で切断活性が阻害された。この系は HCV 複製の阻害剤の検索に有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

C 型肝炎は高率に慢性化し、肝硬変、肝癌に移行する重篤な感染症である。インターフェロン療法は有効な治療法であるが、インターフェロンに抵抗性の慢性肝炎が約 7 割存在するといわれており、難治性の C 型慢性肝炎に対する新しい治療法が切望されている。本研究は、C 型肝炎ウイルス (HCV) がコードする NS3 セリンプロテイナーゼを抗ウイルス薬の標的として注目し、HCV ポリプロテインのプロセッシングを分子生物学的に解析するとともにその阻害剤のスクリーニング系を構築することを目的とした。まず大腸菌系を用いて NS3 セリンプロテイナーゼを効率良く発現し、精製することに成功し、細胞内、試験管内で酵素活性を測定できる系を構築した。この系を利用し、いろいろな既知のセリンプロテイナーゼ阻害剤の影響を検討したところ、阻害作用を示すものと示さないものとにわかれた。特に N-p-tosyl-L-lysinechloromethylketon (TLCK) が切断活性を阻害することを見出し、この系は NS3 セリンプロテイナーゼ阻害剤の検索に有用であることが明らかになった。

以上の研究は HCV のプロセッシング機構の解明に貢献し、抗 HCV 薬開発のための基礎的研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 9 年 1 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。