

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

2003

渡士 幸一

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

2003

渡士 幸一

目次

緒言	1
第一章 HCV Core による転写因子 NF- κ B 活性化機構の解析	4
実験方法	5
実験結果	
第一節 Core の NF- κ B 活性への影響	7
第二節 Core による NF- κ B 活性化には Core の細胞質局在が重要である	8
第三節 Core は主に小胞体の細胞質側表面に局在する	10
第四節 Core による NF- κ B 活性化には Core が小胞体膜に局在することが重要である	11
第五節 Core による NF- κ B 活性化には Core の 21 番目から 80 番目のアミノ酸領域が関与する	13
考察	15
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	17
実験方法	18
実験結果	
第一節 Core は all <i>trans</i> -レチノイン酸による細胞死を増強する	22
第二節 Core はレチノイン酸受容体を介する転写を活性化する	23
第三節 Core と相互作用する細胞性因子の探索	25
第四節 Sp110b はその中央領域を介して Core と相互作用する	25
第五節 Sp110b はレチノイン酸受容体を介する転写を抑制する	27
第六節 Sp110b のさまざまな組織における発現	28
第七節 Core は Sp110b の細胞内局在を核から細胞質の小胞体へと変化させる	30
第八節 Core による RAR α 転写活性化は Sp110b の核からの隔離により引き起こされる	33
第九節 Core による Sp110b の核からの隔離により ATRA による細胞死の増強が引き起こされる	34
考察	36
総括および結論	40
謝辞	41
発表論文目録	42
引用文献	43

緒言

C型肝炎ウイルス (HCV) は輸血後非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 [1] [2] [3]。HCV の慢性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 [4]。現在本邦において 200 万人以上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 による病態形成のメカニズムは現在まで明らかとなっていないが、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、慢性持続感染あるいはがん化と密接に関連していることを示唆する報告がなされている。Core を発現するトランスジェニックマウスは肝脂肪化を引き起こした後に肝がんを発症すること [5]、また Core はある種の培養細胞をトランスフォームする能力を有すること [6]、細胞増殖を亢進すること [7]、さらにはさまざまな刺激によるアポトーシス感受性を変化させること [8] [9] などがこれまでに報告されている。これまでに当研究室においても、Core は 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を報告している [8]。また今回筆者は新たに、Core がレチノイドによる細胞死を増強することを見い出した。Core により引き起こされるこれらの効果は、それぞれ宿主免疫機構からの回避による HCV 感染の慢性化、慢性肝炎時に見られる持続的炎症を増強することによる肝疾患の悪性化に関連することが推察された。

そこで筆者はこれら Core による細胞死感受性修飾の分子機構についての研究を行った結果、これらの現象はそれぞれ Core による転写因子 NF- κ B の活性化、核内受容体レチノイン酸受容体 (RAR) の活性化と密接に関連していることを示唆する結果を得た。これまでもさまざまな因子を介する転写が Core 発現細胞で修飾されていることが報告されている [7] [8] [10] [11] [12]。しかしながら Core によるこれら転写修飾がどのような分子機構を介して引き起こされているかについては、ほとんど満足な説明がなされていないのが現状である。そこで筆者は Core による NF- κ B、RAR 転写活性化の分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。本研究において筆者は、Core の細胞内局在がその宿主転写制御に重要であることを明らかとし、Core による宿主細胞における転写活性化モデルを提唱した。これは細胞質ウイルスタンパク質によるこれまでにない宿主転写の制御様式であると考えられ、HCV Core にとどまらず、分子生物学一般においても重要な知見が得られたものと考えている。

これらの研究成果について、以下に第一章、第二章に分けて論述する。

なお、本文中あるいは図中で使用した略語は以下の通りである。

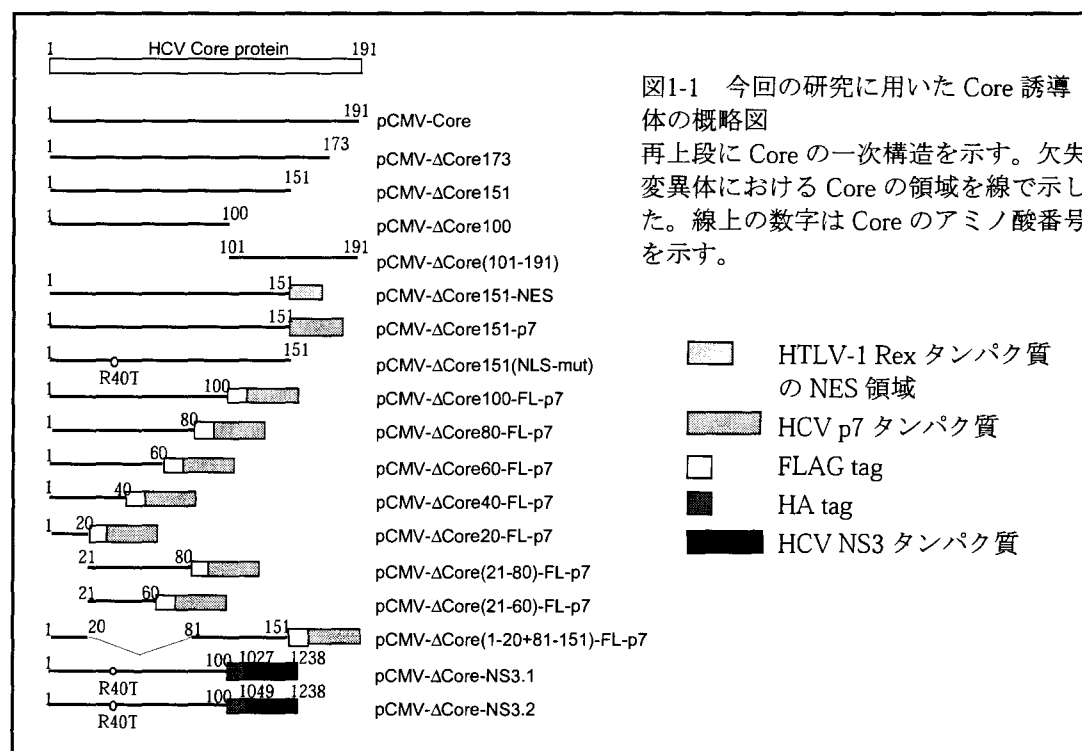
ACTR :	hRAR β -stimulatory protein
AIB-1 :	gene amplified in breast cancer
Apo :	apolipoprotein
ATRA :	all <i>trans</i> -retinoic acid
BSA :	bovine serum albumin
CBB :	coomassie brilliant blue
CBP :	CREB(cAMP responsive element binding protein) binding protein
CBR :	core binding region of Sp110b
cDNA :	complementary DNA
DAPI :	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOX :	doxycycline
DTT :	dithiothreitol
ETDA :	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA :	ethylene glycol bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FBS :	fetal bovine serum
GAPDH :	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GRIP1 :	glucocorticoid receptor-interacting protein 1
HCV :	hepatitis C virus
HEPES :	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HIV :	human immunodeficiency virus
HPV :	human papillomavirus
HRP :	horseradish peroxidase
HSV :	herpes simplex virus
HTLV :	human T cell leukemia virus
I κ B :	Inhibitor of NF- κ B
IKK :	I κ B kinase
IPTG :	isopropyl 1-thio- β -D-galactoside
IRF :	interferon regulatory factor
MDC :	monodansylcadaverine
MEKK :	MEK (MAP kinase-ERK kinase) kinase
NES :	nuclear export signal
NF- κ B :	nuclear factor- κ B

NIK :	NF- κ B-inducing kinase
NLS :	nuclear localization signal
NS :	nonstructural protein
PAGE :	polyacrylamide gel electrophoresis
PARP :	poly(ADP-ribose)polymerase
PBE :	PBS supplemented with EDTA
PBS :	phosphate-buffered saline
PBS-T :	phosphate-buffered saline-tween 20
p/CIP :	CBP-interacting protein
PCR :	polymerase chain reaction
PHD :	plant homeobox domain
PMSF :	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF :	polyvinylidene difluoride
RAC3 :	RAR-interacting protein
RAR :	retinoic acid receptor
RARE :	retinoic acid receptor binding element
RT :	reverse transcription
RTase :	reverse transcriptase
RXR :	retinoid X receptor
SDS :	sodium dodecyl sulfate
SODD :	silencer of death domain
SRC-1 :	steroid receptor coactivator-1
TIF2 :	transcription intermediary factor 2
TK :	thymidine kinase
TNF :	tumor necrosis factor
TNFR 1 :	tumor necrosis factor receptor 1
Tris :	tris (hydroxymethyl) aminomethane
tTGase :	tissue transglutaminase

第一章

HCV Core による転写因子 NF- κ B 活性化機構の解析

これまで当研究室において Core は 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報告している [8]。ウイルス感染細胞は通常、細胞傷害性 T 細胞やナチュラルキラー細胞による上記経路を介するアポトーシスの誘導により排除されることが知られている [13]。このことより Core 発現細胞におけるこれらアポトーシス抑制作用は、宿主免疫細胞からの回避に関連していることが考えられた。そこで筆者は Core による上記アポトーシス抑制作用の分子機構について検討を行った。その結果この現象には Core による転写因子 NF- κ B の活性化が重要であることを示唆する結果を得た。NF- κ B は抗アポトーシス作用以外にも、炎症反応、細胞増殖などさまざまな生理活性に関連していることが知られており [14]、Core による NF- κ B 活性化は HCV 感染によるさまざまな病態形成に関連する可能性が考えられた。そこで本章では Core による NF- κ B 活性化の分子機構を明らかにすることを目的とした研究を行った。



実験方法

1) プラスミド作製

今回用いた発現プラスミドの構造を図 1-1 に示した。

2) 細胞培養

NIH3T3, HepG2, MDCK Tet off-Core 細胞は 10 % ウシ胎児血清 (FBS) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (日水) 中で培養を行った。

3) トランスフェクション

プラスミド DNA の細胞へのトランスフェクションには FuGENE 6 トランスフェクション試薬 (Roche) を用いて行った。OPTI-MEM (Invitrogen) 40 μ l に FuGENE 6 を 1.2 μ l 加え、室温で 5 分放置した後、各プラスミド DNA を合計 0.8 μ g 加えた。さらに室温で 15 分放置した後に、この DNA 溶液を細胞培養液中に混合してトランスフェクションを行った。

4) イムノブロット法

トランスフェクション 40 時間後の細胞の培地を除いて、リン酸緩衝液 (PBS) で一回洗浄した細胞を 2×sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH6.8), 4 % SDS, 20 % グリセロール, 10 % 2-メルカプトエタノール) で溶解させた。超音波処理を 5 分行い、さらに 100 °C で 5 分煮沸したものを細胞溶解液として SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) により分画した。PVDF 膜 (MILLIPORE) にタンパク質を転写した。5 % スキムミルク (生協) /PBS-T でブロッキングを行った PVDF 膜に一次抗体として 5 % スキムミルクで 4000 倍希釈した抗 Core 抗体 (東京都臨床医学総合研究所 小原道法博士より供与された)、1000 倍希釈した抗 nonstructural protein (NS) 4A 抗体あるいは 1000 倍希釈した抗 FLAG 抗体 (M2; SIGMA) を 3 時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄した後、5 % スキムミルクで 3000 倍希釈した HRP 標識二次抗体で 40 分処理して免疫複合体を形成させた。PBS-T で 3 回洗浄し、化学発光法 (Western Lightning; Perkin Elmer) により各々のタンパク質を検出した。

5) レポーターアッセイ

ルシフェラーゼ活性はデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイキット (Promega) を用いて、ルミノメーターにより定量した。トランスフェクション 40 時間後の細胞を passive lysis buffer (Promega) 80 μ l で 15 分処理し、遠心上清から 10 μ l を luciferase assay reagent II (Promega) 100 μ l と反応させることによりルシフェラーゼ

活性を測定した。レポータープラスミドとして、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に NF- κ B 結合エレメントと基本転写プロモーターを有する pNF- κ B-Luc (Stratagene) を用いた。このアッセイにおいては単純ヘルペスウイルス (HSV) チミジンキナーゼ (TK) プロモーターにより誘導される ウミシイタケルシフェラーゼ (pRL-TK; Promega) の活性をあわせてモニターすることにより、各サンプル間の条件の差異を補正した。

6) ゲルシフトアッセイ法

10 ng/ml TNF- α を 30 分間処理したトランスフェクション 40 時間後の細胞を PBS で 1 回洗浄し、PBS 1 ml 中セルスクレイパーで回収した。低速遠心で得られた沈殿を低張液 (10 mM HEPES (pH7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) で 4 °C, 15 分処理し、その遠心沈殿画分を回収した。さらに高塩濃度液 (20 mM HEPES (pH7.9), 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) で 4 °C, 30 分処理し、その遠心上清を核タンパク質画分として回収した。得られた核タンパク質量を定量し、10 μ g を binding buffer, poly(dI-dC)-poly(dI-dC) 中で NF- κ B 結合配列を含む [32 P] 標識オリゴヌクレオチド (5'-AGCTTCAACAGAGG GGACTTTCCGAGAGGCTCGA-3') と混合し、室温で 30 分間結合反応を行った。これを 4 °C で電気泳動を行い、固定液 (10 % エタノール, 12 % 酢酸) で 30 分処理後、ゲル乾燥機でろ紙にトランスファーした。NF- κ B/オリゴヌクレオチド複合体はイメージアナライザーによって検出した。

7) 間接免疫蛍光法

トランスフェクション 40 時間後の細胞を PBS で 1 回洗浄し、2 % パラホルムアルデヒドで固定を行った。PBS で 2 回洗浄後 0.05 % Triton X-100 で 15 分、あるいは 40 μ g/ml ジギトニンで 5 分の処理を行った。PBS で 2 回洗浄後、10 % FBS, 1 % BSA/PBS で 1000 倍希釈した抗 Core 抗体、500 倍希釈した抗 NS4A 抗体あるいは 500 倍希釈した抗 FLAG 抗体を一次抗体として 3 時間反応させた。PBS で 4 回洗浄して、10 % FBS, 1 % BSA/PBS で 1000 倍希釈した Alexa 488 標識あるいは Alexa 568 標識二次抗体 (Molecular Probes) を 40 分処理して免疫複合体を形成させた。このとき同時に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を加えた。PBS で 4 回洗浄した後、プレート内のカバーガラスを 0.05 % p-フェニレンジアミン添加マウント剤でプレパラートにセットし、蛍光顕微鏡により各タンパク質の細胞内局在を観察した。

実験結果

第一節 Core の NF- κ B 活性への影響

本研究ではまず HepG2, NIH3T3 細胞において、Core 発現による NF- κ B 活性への影響を調べた。レポーターアッセイにより Core 発現細胞では空ベクターをトランス

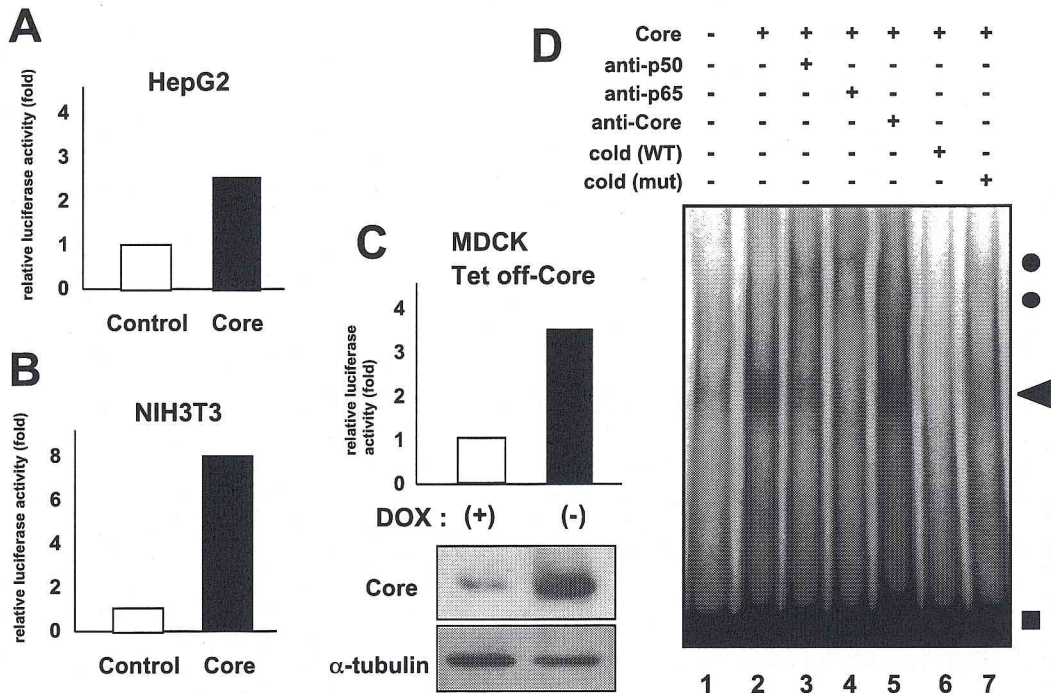


図1-2 Core 発現の NF- κ B 活性に対する影響

(A)(B) HepG2 細胞 (A)、NIH3T3 細胞 (B) に pNF- κ B-Luc 0.05 μ g, pRL-TK 0.05 μ g および pKS+/CMV (Control) あるいは pCMV-core (Core) 0.5 μ g をトランスフェクションした。40 時間後に細胞溶解液を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性をウミシイタケルシフェラーゼ活性で割った相対値を算出した。データは3回の独立した実験のルシフェラーゼ活性の相対比の平均を示す。

(C) MDCK Tet off-Core 細胞を用いてドキシサイクリン (DOX) 100 ng/ml 存在下 ((+))、非存在下 ((-)) において、(A) と同様にルシフェラーゼ活性を測定した。またこれらの条件において、Core あるいは α -tubulin の各タンパク質をイムノブロット法によって検出した (下のパネル)。

(D) NIH3T3 細胞に pKS+/CMV (レーン 1) あるいは pCMV-core (レーン 2-7) をトランスフェクションした。40時間後に TNF- α 10 ng/ml を処理し、さらに30分後に核抽出物を回収した。この核抽出物を用いて、抗 p50 抗体 (anti-p50) (レーン 3)、抗 p65 抗体 (anti-p65) (レーン 4)、抗 Core 抗体 (anti-Core) (レーン 5)、放射標識プローブの 100 倍量の非放射標識プローブ (cold (WT)) (レーン 6)、放射標識プローブの 100 倍量の点変異塩基を導入した非放射標識プローブ (cold (mut)) (レーン 7) とともに結合反応を行い、泳動した。パネルの上に +/- で Core、各抗体、各非放射標識プローブの有無を示す。四角、矢印、丸印はそれぞれ遊離プローブ、NF- κ B 複合体シフトバンド、抗体によるスーパーシフトバンドを示す。

フェクションした細胞に比べて、それぞれ 2-3 倍、7-8 倍の NF- κ B 転写活性がみられた (図 1-2A, B)。同様の結果は MCF-7, 293, Jurkat, COS-7 細胞などにおいても得られた (未発表)。また、テトラサイクリンにより Core 発現量を制御できる MDCK 細胞株 (MDCK Tet off-Core) においても、Core を発現誘導した場合は非誘導時と比較して 3-4 倍の NF- κ B 活性化が見られた (図 1-2C)。さらに TNF- α 刺激細胞から抽出した NF- κ B の DNA 結合能をゲルシフトアッセイ法により検討したところ、Core をトランスフェクションした細胞ではコントロール細胞に比べて有意にシフトバンドの増強が観察された (図 1-2D レーン 1, 2)。このバンドは NF- κ B エレメントを有する非放射性プローブの存在下で消失し (図 1-2D レーン 6, 7)、NF- κ B サブユニットである p50 あるいは p65 に対する抗体の処理によりスーパーシフトした (図 1-2D レーン 3-5) ことから、Core は NF- κ B の DNA 結合活性を上昇させることが示唆された。以上のことから、さまざまな細胞において Core の発現は NF- κ B 活性化を引き起こすことが示唆された。

第二節 Core による NF- κ B 活性化には Core の細胞質局在が重要である

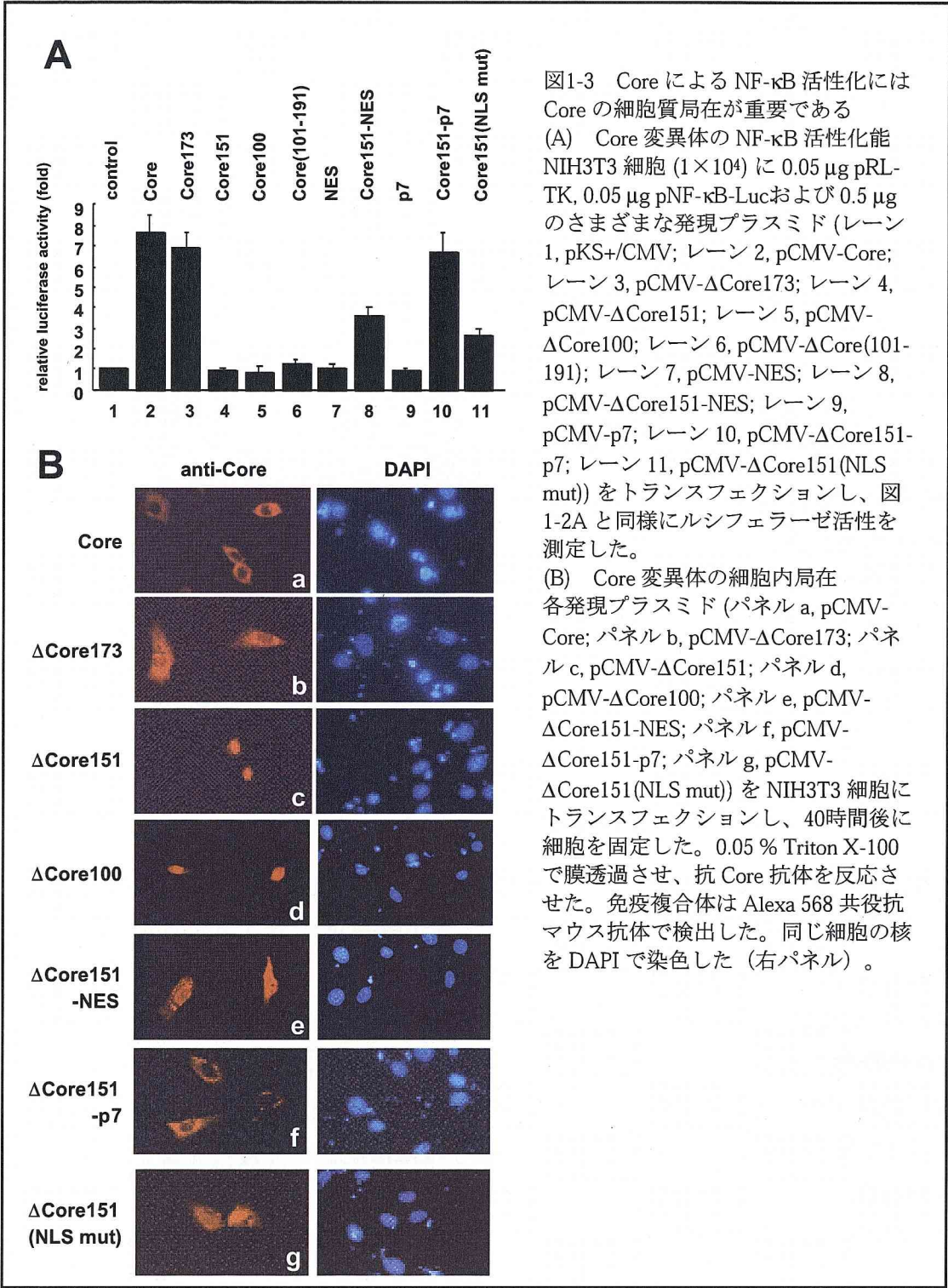
Core 分子内の NF- κ B 活性化に関与する領域を同定するために、Core の C 末端領域をさまざまに欠失させた変異体の NF- κ B 活性化能を調べた。C 末端 18 アミノ酸 (C173)、40 アミノ酸 (C151)、91 アミノ酸 (C100) をそれぞれ欠失させた Core を発現させた NIH3T3 細胞において各タンパク質発現を確認した (未発表) 後に、レポーターアッセイによりそれぞれの Core タンパク質欠失変異体の NF- κ B 活性化能を測定した。その結果、C173 には野生型 Core (C191) と同様、空ベクターをトランスフェクションしたコントロールと比べて 7-8 倍の NF- κ B 活性化能が認められたが、C151 あるいは C100 にはこのような NF- κ B の活性化能はみられなかった (図 1-3A レーン 1-5)。この結果から Core による NF- κ B 活性化には Core のカルボキシ (C) 末端約 40 アミノ酸領域が必要であることが考えられた。そこで次にこの Core の C 末端領域のみをコードする変異体 (Δ Core(101-191)) を用いて調べたが、これは NF- κ B 活性化を引き起こさなかった (図 1-3A レーン 1, 6)。一方それぞれの Core 欠失変異体の細胞内局在を間接免疫蛍光法により調べた。図 1-3B に示すように、C191 は細胞質の特に核周辺部、C173 は核および細胞質、C151 と C100 は主に核内に局在していることがわかった (図 1-3B パネル a-d)。これにより NF- κ B 活性化には Core が細胞質に局在することが必要である可能性が考えられた。そこで NF- κ B 活性化能が認められず、核に局在する C151 を細胞質に局在化させた場合、NF- κ B 活性化能がどのようになるかを調べた。細胞質局在化には以下の 3 つの方法を用いた。

1) 核外輸送シグナル配列 (NES) の融合

2) シグナル配列の融合

3) Core 内の推定される核局在化シグナル配列 (NLS) への変異の導入

まず、1) の方法として、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) Rex タンパク質の NES を C151 の C 末端に融合させることにより、核から細胞質への能動輸送を促進することを試みた [15]。2) の方法として、シグナル配列を C151 の C 末端側



に融合させることにより小胞体膜への局在化を試みた。シグナル配列としては HCV p7 タンパク質を用いた [16]。3) の方法は、Core 分子内の NLS の機能を失わせることを目的とした変異の導入である。以前の報告より、Core 分子内においては 38 番目から 43 番目のアミノ酸領域 (PRRGPR) が最も強く機能する NLS であることが示唆されている [17]。そこでこの NLS の機能を失わせる目的で 40 番目のアミノ酸のアルギニンをスレオニンに置換した変異体を作成した。

NIH3T3 細胞においてこれら変異タンパク質の細胞内局在を調べたところ、C151 の NES 融合タンパク質 (C151-NES) および NLS に変異を導入した C151 (C151(NLS mut)) は核および細胞質、C151 の p7 融合タンパク質 (C151-p7) は細胞質の特に核周辺部にそれぞれ局在がみられた (図 1-3B パネル e-g)。このような変異タンパク質を発現させた細胞における NF- κ B 活性は、C151 を発現させた細胞と比較してそれぞれ、C151-NES は約 4.1 倍、C151(NLS mutant) は約 3.3 倍、C151-p7 は約 9.6 倍と、いずれの変異タンパク質発現によっても有意な NF- κ B 活性化がみられた (図 1-3A レーン 4, 8, 10, 11)。各変異タンパク質の発現量はほぼ同レベルである (未発表) ことと、融合タンパク質作製に用いた NES や p7 それ自体では NF- κ B の活性化は引き起こされなかった (図 1-3A レーン 7, 9) ことから、C151 を細胞質に局在化させることにより NF- κ B 活性が上昇することが明らかとなった。以上の結果は HepG2 細胞でも同様に認められた (未発表)。

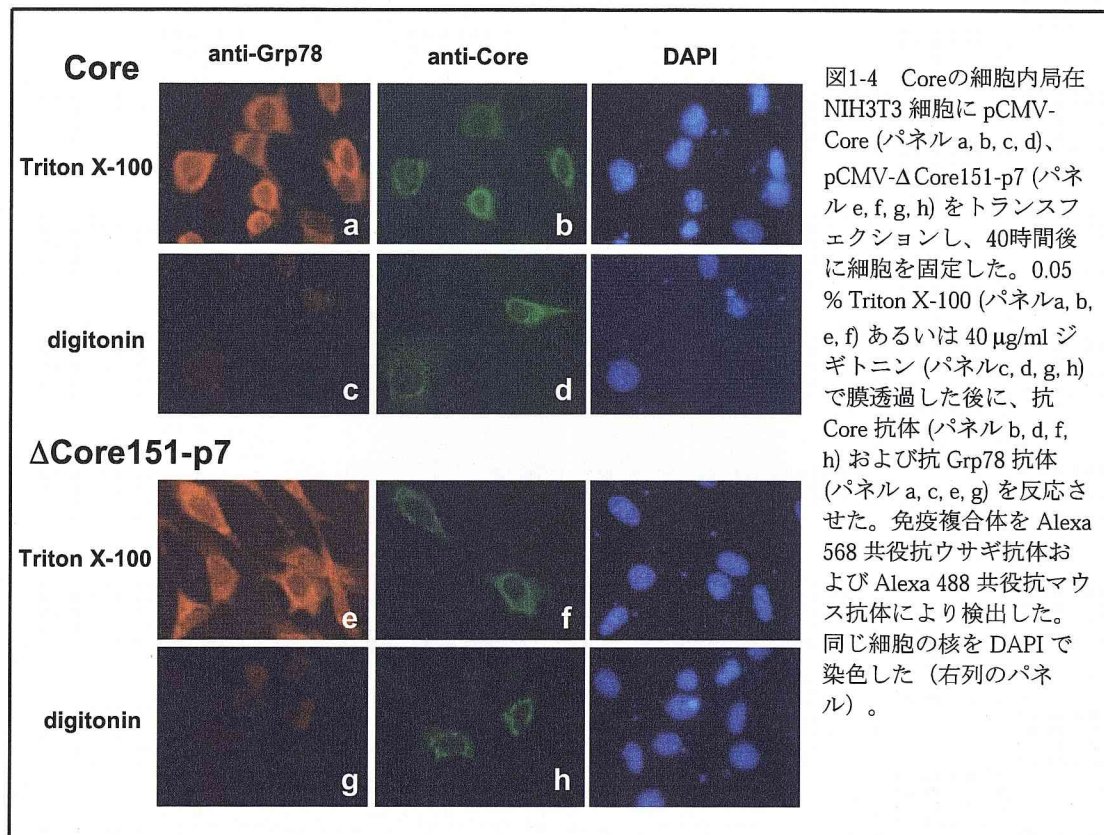
以上の結果より次のことが示唆された。

- 1) Core による NF- κ B 活性化には Core が細胞質に局在していることが必要である。
- 2) Core による NF- κ B 活性化には Core の C 末端領域ではなくむしろアミノ (N) 末端側 151 アミノ酸が重要である。

第三節 Core は主に小胞体の細胞質側表面に局在する

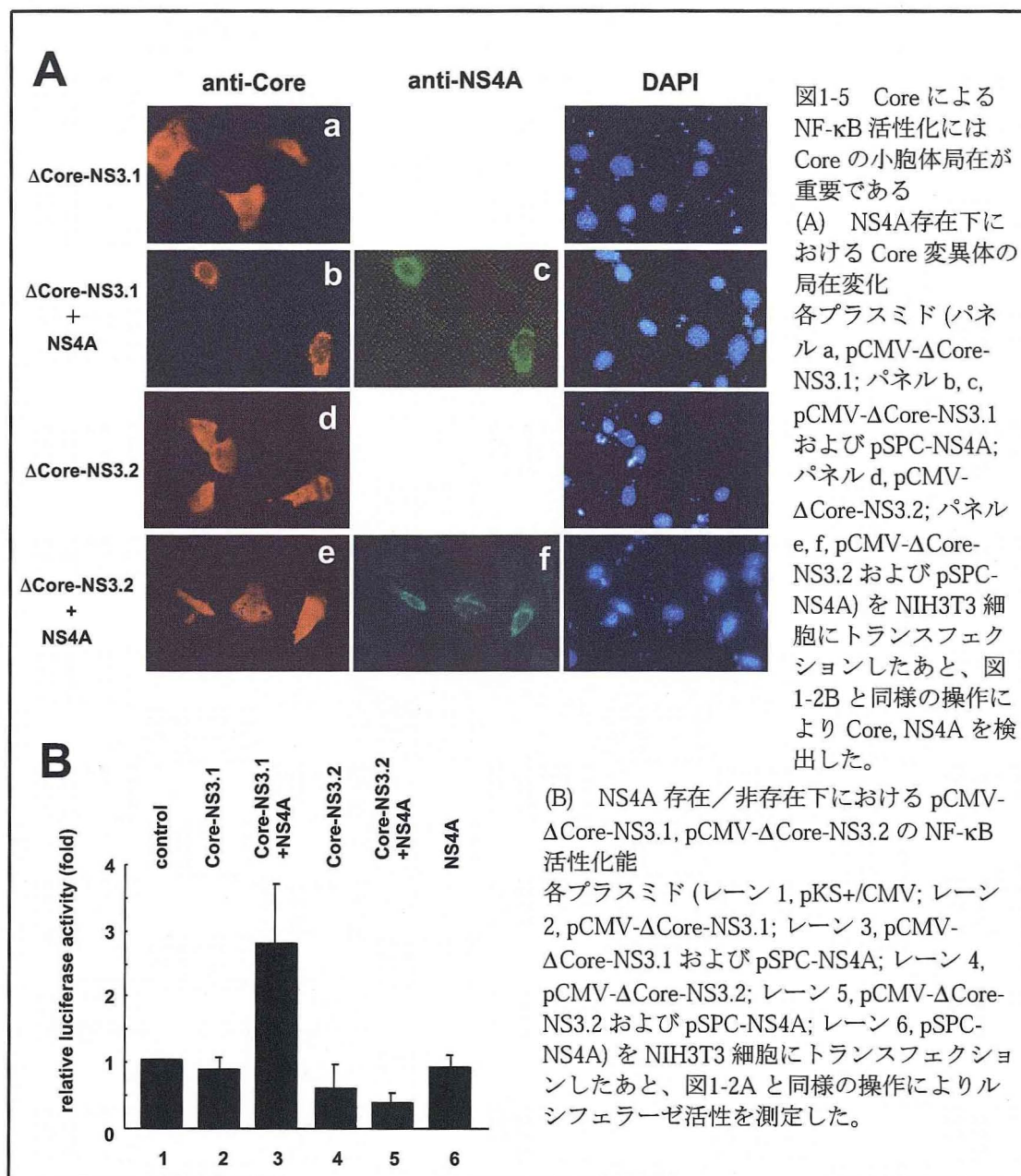
上記のように、C191 と同様に細胞質の特に核周辺部に強い局在がみられた C151-p7 は、C191 と同等の高い NF- κ B 活性化能を有していた。これにより、この核周辺部への Core の局在がその NF- κ B 活性化能に重要である可能性が考えられた。そのため、まず C191 および C151-p7 の細胞内局在をより詳細に検討した。この実験においては小胞体内腔のマーカータンパク質である Grp78 [18] と共に、発現させた C191 および C151-p7 を間接免疫蛍光した。その結果、Triton X-100 により膜透過処理した細胞においては、C191 および C151-p7 と Grp78 はほぼ同様の免疫蛍光像を示した (図 1-4 パネル a, b, e, f)。このことより C191 および C151-p7 は主に小胞体に局在することが示唆された。さらに細胞膜を特異的に膜透過させるためにジギトニン [19] を処理した細胞においては、小胞体の内腔側に局在することが知られている Grp78 はほ

ほとんど検出されなかった (図 1-4 パネル c, g)。このような条件下においても、C191 および C151-p7 は Triton X-100 処理時と同様に、核周辺部に検出された (図 1-4 パネル d, h)。以上の結果により、C191 および C151-p7 は主に小胞体の細胞質側表面に局在することが示唆された。



第四節 Core による NF- κ B 活性化には Core が小胞体膜に局在することが重要である

以上の結果より、Core による NF- κ B 活性化には Core が小胞体の細胞質側表面に局在することが重要である可能性が考えられた。この可能性について検討するために、C 末端欠失変異体 Core を小胞体膜表面に特定条件下で局在させることが可能な実験系を構築した。この実験系では Core 変異体に HCV NS3 タンパク質 (NS3) の N 末端領域を融合したタンパク質 (Δ Core-NS3.1) を用いた。NS3 の N 末端領域は、小胞体膜上に局在する HCV NS4A タンパク質 (NS4A) と結合することが知られている [20]。よってこの相互作用を利用して、NS4A の存在下において Δ core-NS3.1 を小胞体膜上に局在化させることを試みた。またコントロールとして Δ core-NS3.1 から NS4A と相互作用する NS3 の領域を欠失させた変異体 (Δ Core-NS3.2) も作製した。

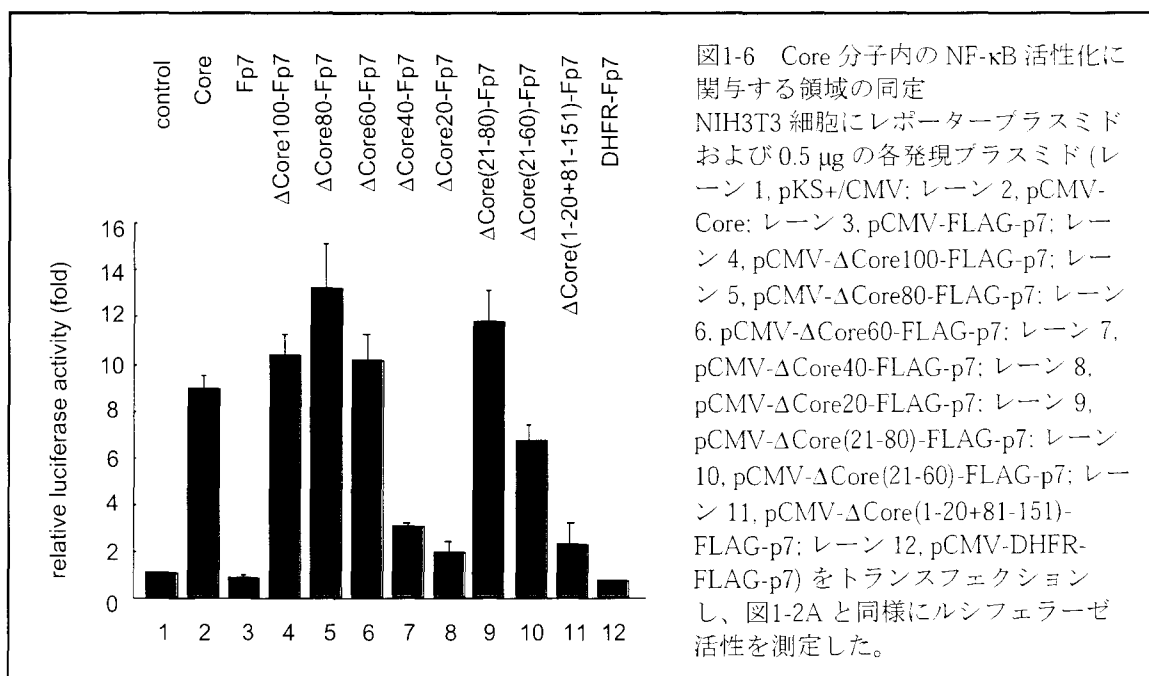


Δ Core-NS3.1, Δ Core-NS3.2, NS4A の各々の単独で発現させたときのタンパク質発現、また Δ Core-NS3.1 と NS4A を共に発現させたとき、 Δ Core-NS3.2 と NS4A を共に発現させたときのそれぞれのタンパク質発現量がそれぞれ同等であることを確認した (未発表)。次に Δ Core-NS3.1, Δ Core-NS3.2 をそれぞれ単独で発現させたとき、あるいは NS4A と共に発現させたときそれぞれの細胞内局在を調べた。その結果、 Δ Core-NS3.1 を単独で発現させたときは細胞質及び核に一樣に局在していた (図 1-5A パネル a)。しかしながら、NS4A を共に発現させた場合には Δ Core-NS3.1 は NS4A と共局在して細胞質の核周辺部に強い集積が見られた (図 1-5A パネル b, c)。一方、 Δ Core-NS3.2 は NS4A の発現の有無にかかわらず細胞質及び核に一樣な局在を示した (図 1-5A パネル d-f)。このような条件下において、各タンパク質を発現させた際

の NF- κ B 活性をレポーターアッセイ法で調べた。ΔCore-NS3.1, ΔCore-NS3.2, NS4A の各タンパク質を単独で発現させたとき、また ΔCore-NS3.2 と NS4A を共に発現させたときは有意な NF- κ B 活性化は認められなかった (図 1-5B レーン 2, 4-6)。それに対して ΔCore-NS3.1 と NS4A を共に発現させたときには ΔCore-NS3.1 単独で発現させたときに比べて約 2.9 倍の転写活性化がみられた (図 1-5B レーン 2, 3)。ΔCore-NS3.1 および ΔCore-NS3.2 をそれぞれ p7 と融合させて核周辺部に局在化させた場合には NF- κ B 活性化能を有することが確認されている (未発表) ことから、この Core 変異体は、細胞質及び核に一樣に局在しているときには NF- κ B 活性化能がないか極めて低い、細胞質の核周辺部に集積させることにより NF- κ B を活性化することが示された。以上のことより Core による NF- κ B 活性化には Core が小胞体膜表面に局在することが重要であることが示唆された。

第五節 Core による NF- κ B 活性化には Core の 21 番目から 80 番目のアミノ酸領域が関与する

NF- κ B 活性化に関与する Core タンパク質内の領域を同定するために、Core のさまざまな領域を FLAG タグを付加した p7 (Fp7) に融合させて NF- κ B 活性化能を検討した。各発現プラスミドをトランスフェクションした NIH3T3 細胞においてこれらのタンパク質の発現レベルがほぼ同等であることを確認した (未発表)。次に、細胞内局在を調べるとこれらのタンパク質はすべて C191 ならびに C151-p7 と同様に、細胞質の核周辺部に検出された (未発表)。そこでそれぞれの融合タンパク質について



NF- κ B 活性化能を検討したところ、C 末端欠失変異体 Core の Δ Core100, Δ Core80, Δ Core60 ではコントロールに比べて有意な NF- κ B 活性化がおこったが、 Δ Core40, Δ Core20 では顕著な活性化はみられなかった (図 1-6 レーン 4-8)。また N 末端および C 末端をともに欠失した変異体 Core では Δ Core(21-80) は C191 と同程度の強い活性化がみられ、 Δ Core(21-60) ではある程度の活性化がみられた (図 1-6 レーン 9, 10)。反対に C151 から 21 番目から 80 番目のアミノ酸領域を欠失させたものについては活性化能がなかった (図 1-6 レーン 11)。HepG2 細胞においても、同様の結果が得られた (未発表)。Fp7、そして Core と同等の大きさをもつ細胞性因子であるジヒドロ葉酸還元酵素をこれに融合した DHFR-Fp7 の発現では NF- κ B 活性化は見られなかった (図 1-6 レーン 3, 12) ことより、ここで認められた活性は Core タンパク質領域に特異的なものであることが示唆された。以上の結果により、Core による NF- κ B 活性化には、Core の 21 番目から 80 番目のアミノ酸領域が関与していると示唆された。

考察

本研究結果により、Core による NF- κ B 活性化には Core が細胞質に局在していることが重要であることが示された。このことは細胞質に存在する NF- κ B 活性化制御機構が Core によって活性化されることを示唆している。一般に NF- κ B は定常状態では細胞質でその阻害タンパク質である Inhibitor of NF- κ B (I κ B) と複合体を形成して不活性状態として存在している。NF- κ B の活性化は、I κ B がリン酸化され、ひきつづき分解されることによって引き起こされる。I κ B の分解によって NF- κ B はその複合体から遊離し、核へと移行することによりその転写活性化能を示すことが知られている [21]。この経路において I κ B をリン酸化する I κ B kinase (IKK) や、またその IKK をリン酸化して活性化させることが報告されている NF- κ B-inducing kinase (NIK), MEK kinase 1 (MEKK1) などはずべて主に細胞質に存在することが知られている。したがって Core はこれら細胞質を伝搬する NF- κ B 活性化経路のいずれかの段階を修飾している可能性が考えられる。また本研究では Core は細胞質の中でも特に小胞体膜上に局在化することで NF- κ B を活性化していることが示唆された。このことから Core が局在する小胞体細胞質側表面に Core の標的因子が存在する可能性が考えられる。現在までのところ NF- κ B 活性化経路を構成する上記分子の中で特に小胞体膜に局在する分子は報告されていない。しかしながら酵母ツーハイブリッド法を用いた解析から、Core は Lymphotoxin- β receptor [22] や TNF receptor 1 (TNFR1) [23] の細胞内領域と結合する可能性がこれまでに示されている。一般的に細胞膜受容体などの膜タンパク質は小胞体膜上のリボゾームでタンパク質の翻訳が行われ、その後ゴルジ体を経て細胞膜へと移行し、細胞膜タンパク質となる。したがってこれらのタンパク質の細胞質領域は、その合成過程に粗面小胞体存在する Core と相互作用する可能性があると考えられる。こうした細胞内膜上の分子間相互作用は、細胞性因子である silencer of death domains (SODD) と TNFR1 などの間にも認められている [24]。SODD は TNFR1 などの細胞質領域と小胞体あるいはゴルジ体で相互作用することにより、TNF 刺激によるシグナル伝達に抑制的に機能することが報告された。現在 Core が細胞膜の内側に存在することを示す報告はなされていないが、Core の少なくとも一部がこれらのタンパク質と小胞体膜上で結合し、SODD のようにこれらと共に細胞膜まで運ばれ細胞膜上でこれら受容体タンパク質を介して NF- κ B 活性を修飾するのかもしれない。

今回示された Core タンパク質の NF- κ B 活性化領域のアミノ酸配列とこれまで報告のある NF- κ B 活性化能をもつタンパク質とのホモロジー解析をおこなった結果、Core の 28-39 番目のアミノ酸領域 (GQIVGGVYLLPR) が HTLV-1 Tax の 61-74 番目のアミノ酸領域 (GRVIGSALQFLIPR) と 71 % の類似性を有することがわかった。現在

Tax のどの領域が NF- κ B 活性化に作用しているかは不明である。今回認められた領域配列が機能的なものであるかどうか解析をすすめることによって、Core のみならず Tax の NF- κ B 活性化メカニズムの解明に重要な情報がえられるかも知れない。

筆者は HepG2 細胞、MCF7 細胞を用いた実験により、Core は NF- κ B の活性化を介してアポトーシスに抑制的に働くことを示唆するデータを得た。NF- κ B の活性化はこうしたアポトーシス抑制作用以外にもいくつかの生理活性を示すことが知られている。Rat-1 細胞は HTLV-1 Tax によってトランスフォームすることが知られており、これには Tax による NF- κ B の活性化が必要であることが示されている [25]。Core もいくつかの培養細胞をトランスフォームする能力を有すること [6] や、Core 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスは肝がんを誘発する [5] など Core が細胞のがん化に関与することを示唆する報告もなされている。また NF- κ B は炎症反応に関連するさまざまなサイトカイン類の発現を調節する転写因子である [14] が、一方 HCV による慢性肝炎時に持続的炎症がおこることは広く知られていることである [26]。したがってこれらの現象に、Core による NF- κ B の活性化がなんらかの関与がある可能性も考えられる。こうした HCV による病態形成の原因を明らかにするためにも Core による NF- κ B 活性化機構のさらなる解析が望まれる。

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

筆者は Core 発現細胞にさまざまな刺激を加えて細胞死を誘導させることにより、Core の細胞死感受性に対する効果について検討を行った。その結果いくつかの細胞死刺激の中で、Core は all *trans*-レチノイン酸 (ATRA) による細胞死を増強することが明らかとなった。この現象は、ATRA の核内受容体であるレチノイン酸受容体 (RAR) の転写活性化および、その下流遺伝子のひとつで ATRA によるアポトーシスに関与すると報告されている tissue transglutaminase (tTGase) の発現増強と相関関係があることが観察された [27] [28]。RAR は tTGase の他にもいくつかの脂質代謝関連タンパク質の発現を制御していることが知られている [29] ことから、Core による RAR 転写の活性化はこのような細胞死感受性以外にも、Core トランスジェニックマウスにおいて見られる脂質代謝の異常にも関与している可能性が考えられた。

そこでこの章では、Core がどのような分子メカニズムを介して RAR を活性化しているのかを明らかにすることを目的とした研究を行った。

実験方法

1) 細胞培養

MCF-7、Huh-7、293T、COS-7、Hela、SN1A2 細胞は 10 % FBS 含有 DMEM 中で培養を行った。

2) トランスフェクション

プラスミド DNA の細胞へのトランスフェクションには、第一章と同様に FuGENE 6 トランスフェクション試薬を用いた。

3) Core を恒常的に発現する細胞株の樹立

Core 発現プラスミド pLXSH-core あるいは空ベクター pLXSH を MCF-7 細胞にトランスフェクションした後、250 μ g/ml ハイグロマイシン B (Wako) を含む培地で細胞を選択した。2-3 週間後に、形成されているコロニーをクローニングすることにより、いくつかの細胞クローンを樹立した。

4) イムノブロット法

イムノブロット法は第一章と同様に行った。抗 Core 抗体、抗 α -tubulin 抗体 (Ab-1; Calbiochem)、抗 FLAG 抗体 (M2; Sigma)、抗 SC-35 抗体 (Sigma) を一次抗体として用いた。

5) レポーターアッセイ法

レポータープラスミドとして、基本転写プロモーターの上流に 3 コピーの RAR α 結合配列 (RARE) を有する pRARE-Luc を用いた。トランスフェクション 24 時間後に細胞溶解液を回収し、luciferase assay reagent II と反応させることによりレポーター活性を測定した。

6) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

Core の N 末端 80 アミノ酸領域を LexA DNA 結合領域を含む pHybLex/Zeo ベクター (Invitrogen) にサブクローニングした。これをベイトプラスミドとして Hybrid Hunter (Invitrogen) のプロトコールにしたがって、酵母 L40 株内でヒト前立腺 cDNA ライブラリー (Clontech) をスクリーニングした。5 $\times$ 10⁶ のトランスフォーマントをヒスチジン要求性および β -ガラクトシダーゼ活性を指標として選択した。ヒスチジン非要求性かつ β -ガラクトシダーゼ活性を有するクローンを単離し、ベイトプラスミドを有する酵母株にトランスフォーメーションした。ベイトプラスミド依存的に

β -ガラクトシダーゼ活性を示すクローンを選別し、シーケンス解析を行った。

7) グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) pull down アッセイ法

GST、GST 融合 Sp110 (GST-Sp110)、GST 融合 Sp110b (GST-Sp110b)、GST を融合した Core の 1-80 アミノ酸領域 (GST-core80) の各タンパク質を、大腸菌 BL21 株 (Amersham Bioscience) において 1 mM IPTG 存在下で 37 °C、3 時間誘導させることにより調製した。これらのタンパク質をグルタチオンセファロースレジン (Amersham Bioscience) により単離した。結合バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) で 4 回洗浄した後、*in vitro* で [³⁵S] 標識合成したタンパク質と 4 °C で 1 時間インキュベートした。この [³⁵S] 標識タンパク質は、TNT T7 quick coupled transcript/translation system キット (Promega) を用いて、0.25 μ g の pcDNA3 ベクター由来各発現プラスミドを L-[³⁵S]-メチオニン (Amersham Bioscience) 存在下で反応させることにより合成した。結合バッファー (図 2-3A の実験では、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.5 % デオキシコール酸ナトリウム, 0.05 % SDS, 1 mM DTT, 1 mM PMSF からなるバッファーを用いた) で 5 回洗浄後、レジンに精製された標識タンパク質を SDS-PAGE した後、オートラジオグラフィーで検出した。

8) 免疫沈降法

細胞を IP バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 % NP-40) で溶解し、遠心後、上清を抗 FLAG 抗体 (M2; Sigma) またはマウスノーマル IgG (Zymed Laboratories) と 4 °C で 1 時間インキュベートした。免疫複合体はプロテイン G セファロースレジン (Amersham Bioscience) と吸着させ、IP バッファーで 4 回洗浄することにより回収した。免疫沈降物はイムノブロット法により検出した。

9) ノーザンブロット法

ヒト組織由来トータル RNA (Clontech) を ULTRAhyb (Ambion) を用いて、ノーザンハイブリダイゼーション法により解析した。プローブは HindIII-XbaI 消化した pCMV-Sp110b を鋳型とし、5'-TGAGGCTGTCCCTCTTGG-3' をプライマーとして、[³²P]-dCTP (Amersham Bioscience) 存在下 PCR により調製した。

10) RT-PCR

Sp110 と Sp110b mRNA の発現レベルの相対比を半定量 RT-PCR により算出した。この系においてはプライマーとして Sp110 および Sp110b に共通のセンスプライマー (5'-GTTGAATTCATGCTCCAAGTGGTGGATAAG-3') と、それぞれに固有のアンチ

センスプライマー (5'-GTTCTCGAGTCAAGGAAGAGTCCAG-3'および5'-GTTCTCGAGTTATTCTTGGAGGACAG-3') をプライマーに用いて、同時に PCR を行った。MEGAscript T7 キット (Ambion) により、pcDNA-Sp110 あるいは pcDNA-Sp110b から *in vitro* 合成した Sp110 および Sp110b の RNA をスタンダードサンプルとした。培養細胞からのトータル RNA の抽出にはセパゾール-RNA I super (ナカライテスク) を用いた。tTGase mRNA の検出には 5'-GCATGGTCAACTGCAACGATG-3'および 5'-GGGCGCATCGTACTTGGTG-3'をプライマーに用いた。

1 1) Sp110 および Sp110b に対する抗体の作製

Sp110 および Sp110b に対するウサギポリクローナル抗体は keyhole limpet hemocyanin (KLH) を共役させた合成ペプチド STPSDKKGKKRKRC (Sp110 あるいは Sp110b の 270-283 アミノ酸領域に相当する) をウサギに免疫することにより回収した。

1 2) 間接免疫蛍光法

細胞を固定後、0.05 % Triton X-100 により膜透過した。この章では抗 FLAG 抗体 (M2; Sigma)、抗 myc 抗体 (9E10; Santa Cruz)、抗 Core 抗体 (515S)、抗 RAR α 抗体 (C-20; Santa Cruz)、および Sp110 と Sp110b を認識する抗体を一次抗体として用いた。免疫複合体は第一章と同様に Alexa 488 あるいは Alexa 568 (Molecular Probe) を共役した二次抗体により検出した。同じ細胞の核を DAPI により染色した。

1 3) 細胞溶解液の分画

細胞を回収し、バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) 中でホモジェナイズした。3900 rpm で 7 分遠心した後、沈殿を核画分として回収した。上清はさらに 7000 rpm で 5 分遠心し、その上清を 50000 rpm で 1 時間超遠心した。沈殿、上清はそれぞれミクロソーム画分、細胞質画分として回収した。

1 4) 細胞死の算出

さまざまな刺激を加えた後の、浮遊している細胞および付着している細胞をまとめて回収した。これらの細胞をトリパンブルーで染色し、青く染まった細胞を死細胞としてその割合を測定した。各実験では約 500 個の細胞をそれぞれカウントした。

1 5) 発現プラスミドがトランスフェクションされた細胞の選別

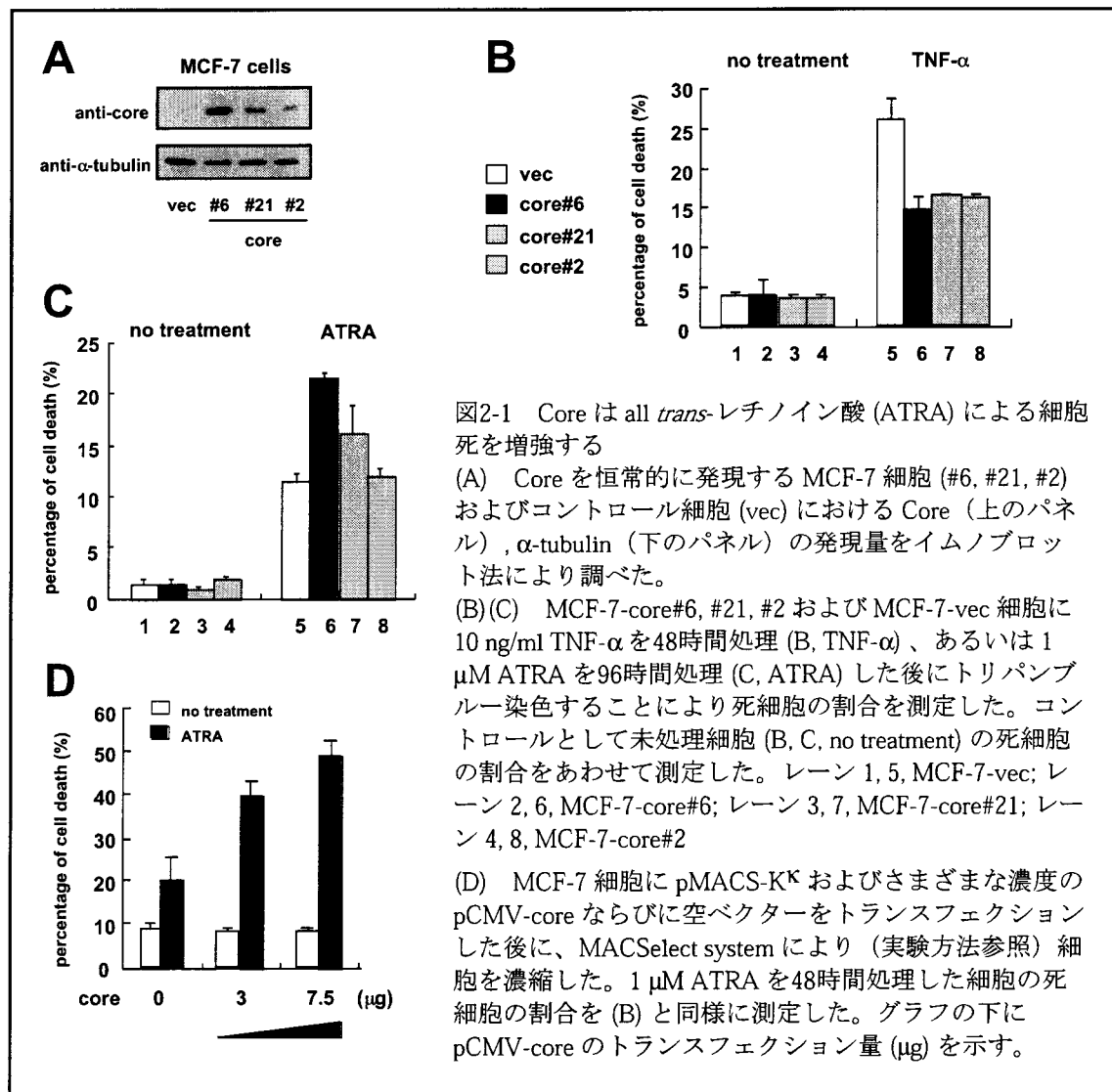
一過性にトランスフェクションされた細胞とされていない細胞の混ざりの細胞集団からトランスフェクションされた細胞を特異的に濃縮する際には、MACSelect

system (Miltenyi Biotec) キットを用いた [8]。pMACS-K⁺を含むプラスミドをトランスフェクションした 24 時間後に、細胞をトリプシンで処理し、PBE (0.5 % BSA, 5 mM EDTA, PBS) 中に懸濁した。磁性ビーズを添加し、15 分間インキュベートして細胞と磁性ビーズを反応させた。これを磁性カラムで分画することにより、トランスフェクション細胞を特異的に濃縮した。

実験結果

第一節 Core は all *trans*-レチノイン酸による細胞死を増強する

さまざまな刺激による細胞死感受性に Core がどのような効果を及ぼすかを検討した。そのためにまず Core を恒常的に発現する MCF-7 細胞株を樹立した。本研究においては、Core 発現量の異なる 3 種類のクローン株 (MCF-7-core#2, #6, #21) およびコントロールとして Core 発現プラスミドのかわりに空ベクターをトランスフェクションしたクローン株 (MCF-7-vec) を主に用いた (図 2-1A)。これらの細胞株をさまざまな細胞死誘導剤で刺激した後に、各クローンにおける細胞死の程度をトリパンブルー染色することにより算出した。試したさまざまな細胞死誘導剤の中で、TNF- α による細胞死は、第一章の序論で述べたように、Core 発現細胞において有意に抑制された (図 2-1B)。この細胞死抑制作用は、発現量が比較的少ない MCF-7-core#2



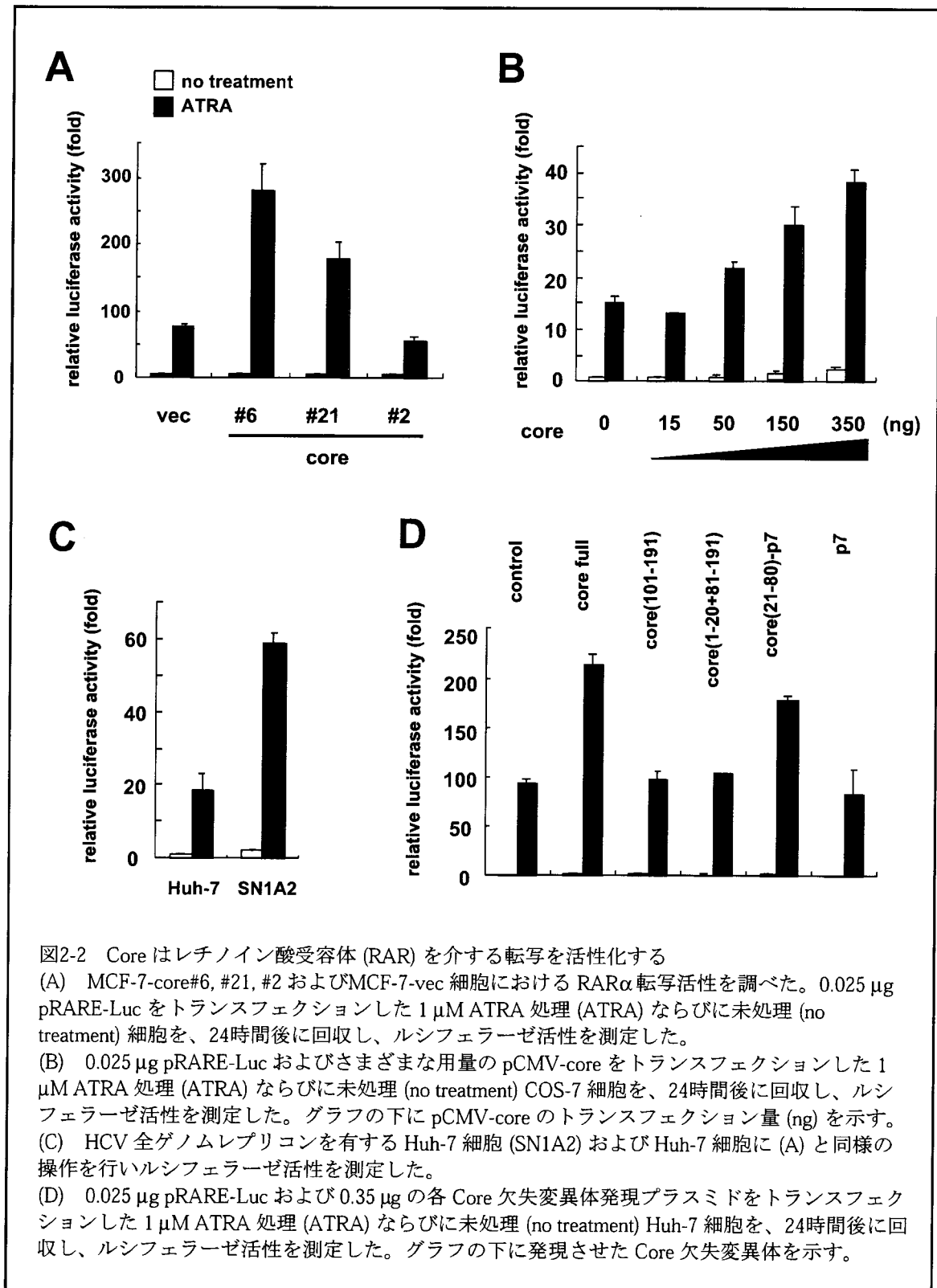
においても見られた。一方今回新たに all *trans*-レチノイン酸 (ATRA) による細胞死は、Core の発現量に依存して増強することが観察された (図 2-1C)。この現象は Core を一過性に発現させた MCF-7 細胞においても観察された (図 2-1D)。以上のことより、Core は ATRA により誘導される細胞死を増強することが示唆された。

第二節 Core はレチノイン酸受容体を介する転写を活性化する

ATRA による細胞死の詳細な機構は現在のところ明らかではないが、ATRA の核内受容体であるレチノイン酸受容体 (RAR) を介する転写の活性化とその下流遺伝子の発現誘導が重要であることが報告されている [27]。そこでこれらの細胞における RAR による転写活性をレポーターアッセイにより検討した。このアッセイにおいてはルシフェラーゼの上流に基本転写プロモーターと 3 コピーの RAR α 結合エレメント (RARE) を有するプラスミドをレポータープラスミドとして用いた。図 2-2A に示すように、Core を恒常的に発現する MCF-7 細胞においては、Core の発現量および図 2-1C に示した ATRA 誘導細胞死の増強作用と相関して、RAR α を介する転写が活性化していることが確認された。また Core を一過性に過剰発現させた COS-7 細胞においても RAR α 活性が Core の用量依存的に上昇していることが観察された (図 2-2B)。同様の結果は Core を一過性に発現させた 293T、Huh-7、Hela 細胞などでも確認された (未発表)。また、HCV 全ゲノムのレプリコンを有する Huh-7 細胞 (SN1A2) においても RAR 活性はその親株である Huh-7 細胞と比較して有意に上昇が見られた (図 2-2C)。以上の結果より、Core は RAR を介する転写を活性化することが示唆された。

次に、さまざまな Core 欠失変異体を用いて、Core 分子内の RAR α 転写活性化に関与する領域の同定を行った。野生型 Core は第一章の図 1-4 で示したように、主に小胞体膜上に局在することが示唆された。また Core はその C 末端領域を欠失することにより、細胞内局在が小胞体膜上から核へと変化することが示された (図 1-3B)。そのため C 末端を欠失させた Core 変異体を用いる場合、第一章の図 1-6 で行ったように小胞体膜への局在化シグナルを持つ HCV p7 との融合タンパク質を用いた。その結果すべての欠失変異体の細胞内局在は、野生型 Core と同じく細胞質の核周辺部であることが確認された (未発表)。図 2-2D に示すように、Core の N 末端領域 100 アミノ酸を欠く欠失変異体 (core Δ (101-191)) あるいは 21-80 アミノ酸領域を欠く欠失変異体 (core Δ (1-20+81-191)) を発現させた Huh-7 細胞におけるレポーター活性は、空ベクターをトランスフェクションしたコントロール細胞と比較して転写活性化は認められなかった。一方、21-80 アミノ酸領域のみを含むタンパク質 (core Δ (21-80)-p7) を発現させた細胞におけるレポーター活性は、空ベクターあるいは p7 のみを発

現させた細胞と比較して約2倍に活性化されることが判明した。このことから、Core による RAR α を介する転写活性化は Core の 21-80 アミノ酸領域 (core Δ (21-80)) を介して行われることが示唆された。



第三節 Core と相互作用する細胞性因子の探索

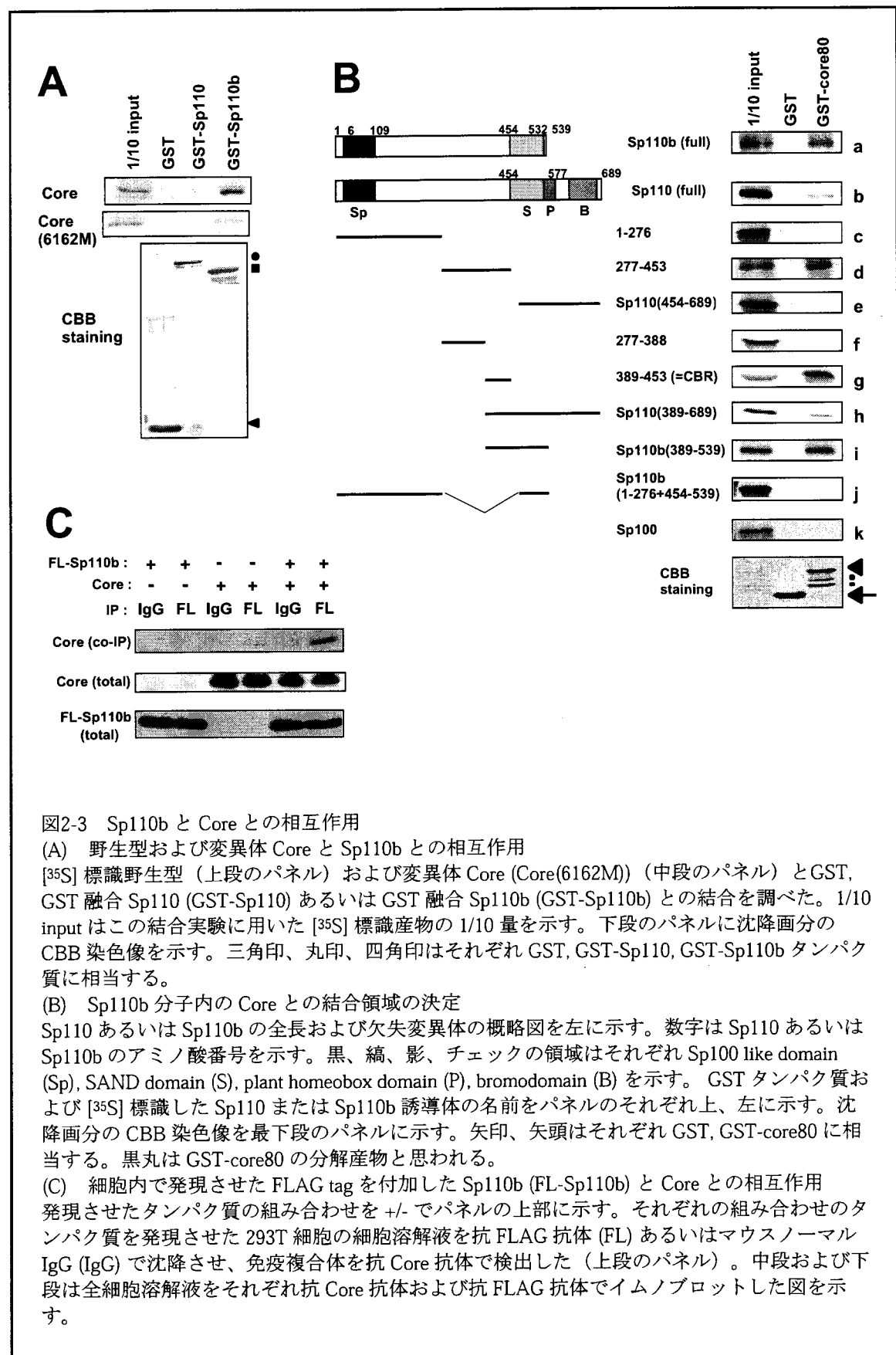
Core による RAR α を介する転写活性化の分子メカニズムを明らかにするために、酵母ツーハブリッドスクリーニングによって、core Δ (21-80) と相互作用する細胞性因子の同定を行った。ベイトに Core の N 末端 80 アミノ酸 (core80) を LexA DNA 結合領域に融合したタンパク質を用いて、ヒト前立腺 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。スクリーニングに用いた約 5×10^6 クローンのトランスフォーマントのうち、129 クローンがゼオシン存在下、トリプトファン、ヒスチジン非依存的に生育し、 β -ガラクトシダーゼ活性を示した。シーケンス解析により、これらは 6 つの独立したタンパク質をコードするプラスミドから成ることが判明した。

これらの候補分子の中で、RAR α による転写活性に影響を与えていると考えられる分子として、RAR α による転写を活性化すると報告されている Sp110 のスプライシングバリエーションである Sp110b を見出した [30]。

第四節 Sp110b はその中央領域を介して Core と相互作用する

そこでまず Core と Sp110b の結合を確認するために、*in vitro* における結合実験を行った。GST を融合させた全長 Sp110 あるいは Sp110b (GST-Sp110、GST-Sp110b) を大腸菌で発現させ、溶菌後、グルタチオンセファロースレジンを用いてアフィニティー精製した。これらをウサギ網状赤血球溶血液を用いて [35 S]-メチオニン存在下で合成した全長 Core とともにインキュベートした。図 2-3A に示すように、[35 S] 標識 Core はグルタチオンセファロースレジンを用いることにより、GST-Sp110b とは共沈したが、GST-Sp110 とは共沈が見られなかった (図 2-3A 上パネル)。これは GST を融合させた core80 (GST-core80) と [35 S] 標識した Sp110 あるいは Sp110b を用いた結合実験においても観察された。すなわち図 2-3B に示すように、*in vitro* 合成した Sp110b は効率よく GST-core80 と共沈したが、Sp110 はごく少量が沈降画分に見られたのみであった (図 2-3B パネル a, b)。これらの結果より、Sp110b は Sp110 と比較してより効率よく Core と相互作用することが示唆された。Sp110 および Sp110b と相同性を有する Sp100 [30] は GST-core80 と共沈が見られなかった (図 2-3B パネル k) ことより、Core と Sp110b との相互作用は特異的なものであると考えられた。

次に、さまざまな欠失変異体を用いた GST pull down アッセイ法により、Sp110b 分子内の Core との相互作用に関わる領域を同定した。図 2-3B に示すように、Sp110b の 277-453 アミノ酸領域では GST-core80 との共沈が見られたが、Sp110 の 1-276 アミノ酸領域あるいは 454-689 アミノ酸領域では見られなかった (図 2-3B パネル c-e)。



逆に Sp110b より 277-453 アミノ酸領域のみを除いたものでは GST-core80 と共沈しなかった (図 2-3B パネル j) ことより、Core との結合には Sp110b 分子内の 277-453 アミノ酸領域が必要十分であると示唆された。さらにこの領域を分割した欠失変異体を用いることにより、Sp110b の 389-453 アミノ酸領域が Core との相互作用に関与することが示された (図 2-3B パネル f, g)。したがって Sp110b のこの領域を Core 結合領域 (CBR) と名付けた。CBR は Sp110, Sp110b ともに有するが、上記のように Core と Sp110 との親和性は非常に弱いものであると考えられた。同様の結果は CBR を含む Sp110 および Sp110b の C 末端領域を用いた結合実験によっても得られた (図 2-3B パネル h, i)。これらの結果より、Sp110 の C 末端領域は Core との相互作用に阻害的に作用する可能性が考えられた。

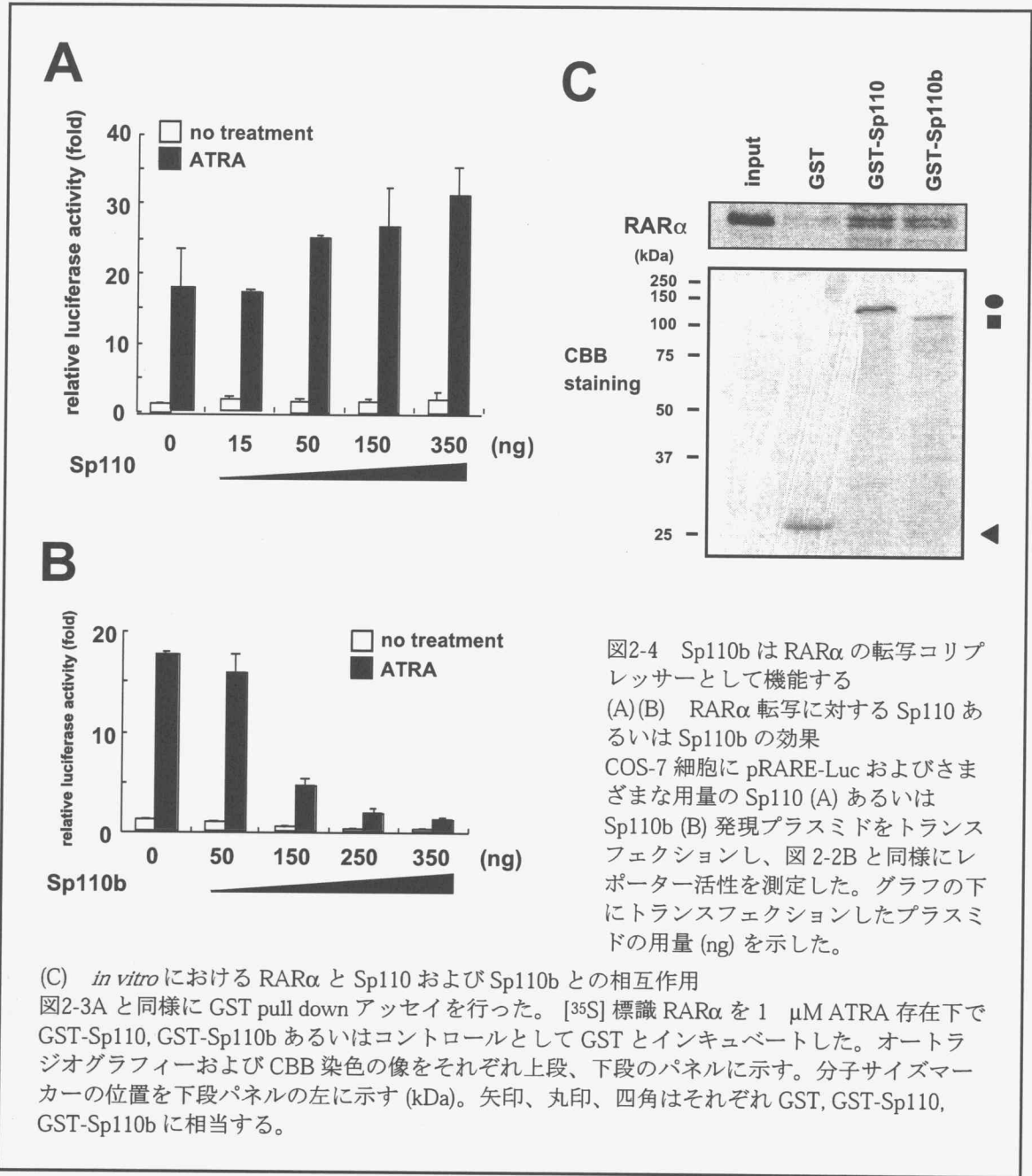
Core と Sp110b との相互作用をさらに確認するために、293T 細胞を用いた免疫沈降実験を行った。図 2-3C に示すように、Core あるいは FLAG タグを付加した Sp110b のみを発現させた細胞の溶解液からは、抗 FLAG 抗体で沈降させた免疫複合体中に Core は検出されなかった。しかしながら両タンパク質を発現させた細胞の溶解液を抗 FLAG 抗体によって沈降させた免疫複合体中からは Core が検出された。コントロールとしたマウスノーマル IgG による沈降物中からは Core は検出されなかった。

以上の結果より、Sp110b は Core と相互作用することが示唆された。

第五節 Sp110b はレチノイン酸受容体を介する転写を抑制する

Sp110 はこれまでに RAR α を介する転写を活性化することが報告されている [30] が、Sp110b の機能は不明である。そこで Sp110b の機能を明らかにするために、RAR α 転写における Sp110b の影響をレポーターアッセイ法により検討した。これまでに報告されているように、過剰発現させた Sp110 は RAR α を介する転写を活性化することが確認された (図 2-4A)。これに対して Sp110b は用量依存的に転写活性を約 1/10 にまで顕著に抑制することが観察された (図 2-4B)。RARE を有しないコントロールレポータープラスミドの転写活性はこれらのタンパク質の発現により影響を受けなかった (未発表) ことより、Sp110b は RAR α を介する転写を抑制することが示唆された。

Sp110 および Sp110b 分子にはその 525-529 アミノ酸領域 (LGELL) に、リガンド結合型核内受容体との結合モチーフ LXXLL [31] の存在が見られたので、RAR α との結合を GST pull down アッセイ法により検討した。図 2-4C に示すように、1 μ M ATRA 存在下において GST-Sp110 および GST-Sp110b は RAR α との共沈が見られたことより、*in vitro* における RAR α と Sp110 あるいは Sp110b との相互作用が示された。さらに細胞内において Sp110 および Sp110b は、Sp110 についてこれまでに報告



されたように [30]、主に核に局在が見られ、特に核内で顆粒状に強い局在が見られた (図 2-6A パネル 2, 9, 30)。RARα もまたこれまでに報告があるように主に核に局在していた (図 2-6A パネル 3-5, 10-12) [32]。

以上の結果より、Sp110b は核内において相互作用を介して RARα 活性を負に制御する転写コファクターである可能性が示唆された。

第六節 Sp110b のさまざまな組織における発現

ヒト各組織における Sp110b の発現を、Sp110b の 5'末端領域を [³²P] 標識したプロ

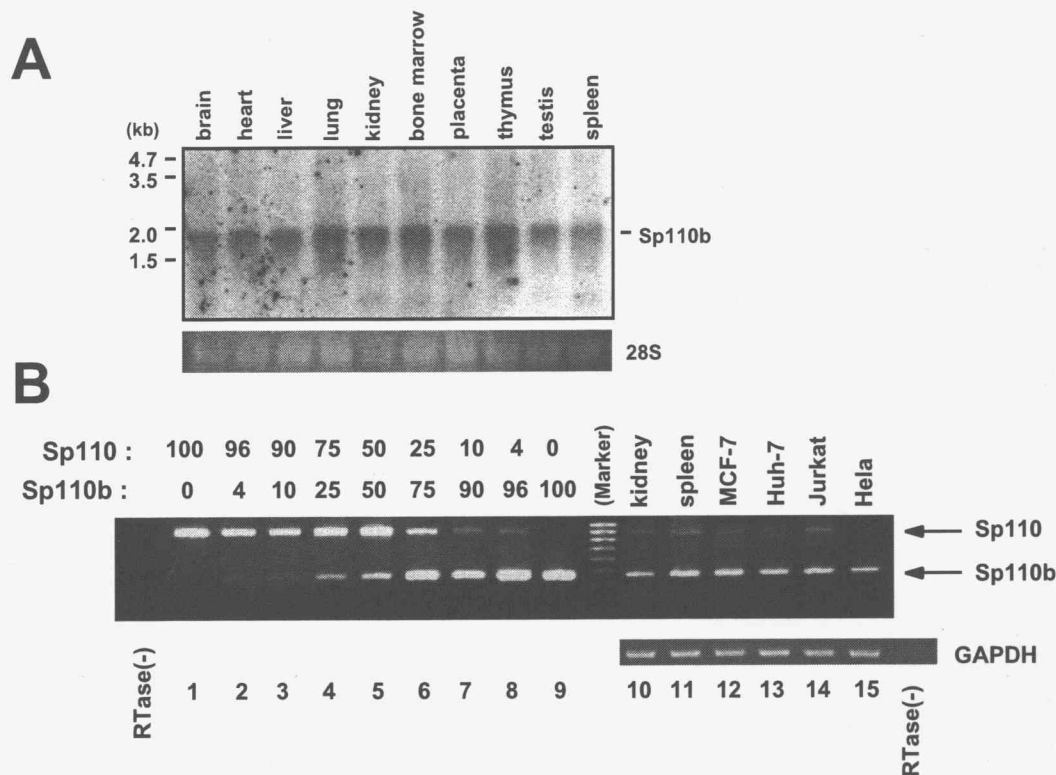


図2-5 Sp110 および Sp110b mRNA の各組織及び細胞株における発現

(A) ノーザンブロット法による検出

ヒト脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、骨髄、胎盤、胸腺、精巣、脾臓の各トータル RNA 10 µg を、³²P 標識 Sp110b 断片をプローブとしてノーザンブロットにより解析した（上のパネル）。28S rRNA のエチジウムブロマイド染色像をコントロールとして示した（下のパネル）。分子サイズマーカーの位置 (kb) を上パネルの左に示した。

(B) RT-PCR 法による検出

ヒト腎臓（レーン 10）、脾臓(11)、MCF-7 (12)、Huh-7 (13)、Jurkat (14)、Hela (15) 細胞由来のトータル RNA を RT-PCR 法により増幅した（上のパネル）。コントロールとして同様のサンプルにおいて GAPDH mRNA を検出した（下のパネル）。RTase(-) は逆転写酵素を除いて反応させたコントロールを示す。またスタンダードとして、*in vitro* 合成した Sp110 および Sp110b RNA をさまざまな割合で混合したもの (fg) を鋳型としたサンプルを示した（レーン 1-9）。

ープを用いてノーザンブロット法により調べた。図 2-5A に示すように、約 1.9 kb のバンドが調べたすべての組織において検出された。Sp110 および Sp110b mRNA はそれぞれ約 2.3 kb、約 1.9 kb と報告されている [30] ことより、このバンドは Sp110b mRNA に対応すると考えられる。この実験において 2.3 kb の Sp110 mRNA は見られなかった。これらのサンプルにおける Sp110 と Sp110b mRNA の発現レベルを比較するために、RT-PCR による半定量を行った。図 2-5B レーン 10-15 に示すように、Sp110 mRNA のバンドはヒト脾臓およびヒト T リンパ球由来の Jurkat 細胞から抽出したトータル RNA において検出されたが、その他の組織および細胞株では検出されなかった。しかしながら、調べたすべての組織および細胞株において Sp110b mRNA は Sp110 mRNA よりも多量に存在することが観察された。*In vitro* 合成した Sp110, Sp110b

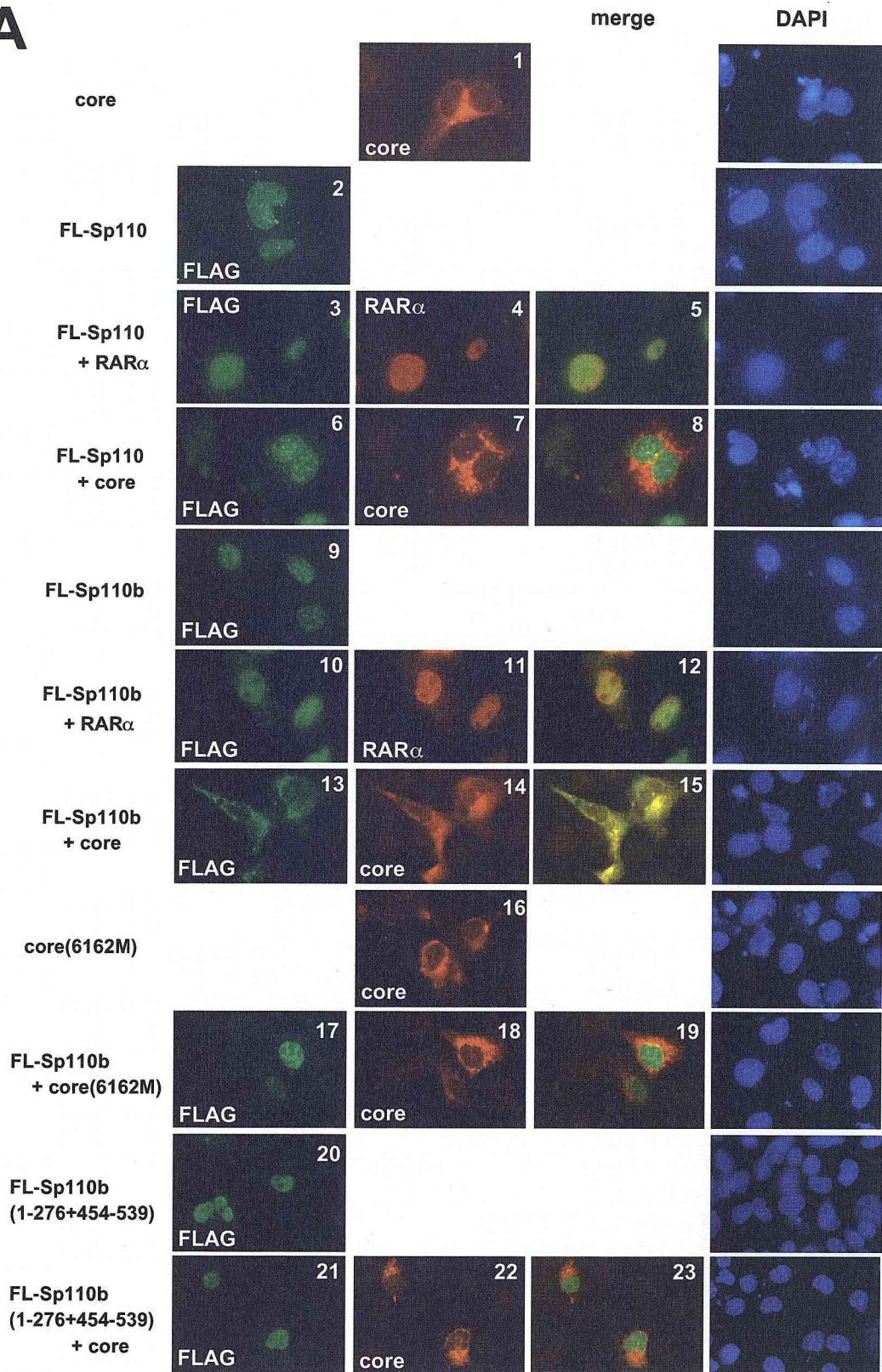
mRNA をさまざまな割合で混ぜてこの系の鋳型とした実験 (図 2-5B) により、Sp110b mRNA の発現量は非リンパ組織、リンパ組織において Sp110 mRNA のそれぞれ約 10 倍、3-5 倍であると算出された。この結果は Sp110、Sp110b とともに認識する抗体により、Hela、Huh-7 細胞において Sp110 は検出されず、Sp110b のみが検出されたというデータ (未発表) と一致する。以上より、Sp110b mRNA はさまざまな組織に広く、Sp110 mRNA より多量に発現すると示唆された。

第七節 Core は Sp110b の細胞内局在を 核から細胞質の小胞体へと変化させる

Sp110b が主に核に局在するのに対して、Core は主に小胞体に局在することが知られている。それにもかかわらず上記のように Sp110b と Core が相互作用すると考えられたので、次に二者が細胞内のどこで相互作用するかを間接免疫蛍光法により調べた。図 2-6A パネル 13-15 に示すように、Sp110b の細胞内局在は Core 発現により核から細胞質の核周辺部へと劇的に変化した。対照的に Sp110 は Core 発現の有無にかかわらず主に核に局在がみられた (図 2-6A パネル 2, 6-8)。他のよく知られた核タンパク質である p53 [33] あるいは poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) [34] の局在は、Sp110 と同様に Core の発現により影響を受けなかった (未発表) ことより、Core は Sp110b の細胞内局在を特異的に変化させることが示唆された。この現象を Hela 細胞における内在性 Sp110b タンパク質において検討した。Core 非存在下では上記のように核染色パターンが得られた (図 2-6A パネル 30)。しかしながら Core を発現するいくつかの細胞では外来性 Sp110b と同様に核周辺部に局在することが認められた (図 2-6A パネル 31-33)。この抗体を用いた場合、イムノブロット法により、Hela 細胞において Sp110 はほとんど検出されなかったが Sp110b は検出されたことより、この核周辺部の内在性タンパク質は主に Sp110b であると考えられた。以上のことより、Core は Sp110b の局在を変化させることが示唆された。

Core と Sp110b との共局在を確認するために、細胞溶解液を核 (N)、ミクロソーム膜 (MM)、細胞質 (C) 画分に分画し、各画分の Sp110b を検出した (図 2-6B)。分画実験の精度を保証するために SC-35 [35]、Core [36]、 α -tubulin をそれぞれ各画分において検出したところ、それぞれ核、ミクロソーム膜、細胞質に主に検出された (図 2-6B 下のパネル)。Sp110b の単独発現においては、Sp110b は主に核に局在が見られたが、第一章図 1-4 において小胞体膜の細胞質側表面に主に局在することが示された Core との共発現では、Sp110b はミクロソーム膜に局在変化することが観察された (図 2-6B 上のパネル)。この結果より、Core の発現により Sp110b は Core が主に局在する小胞体の細胞質側表面に局在変化することが示唆された。

A



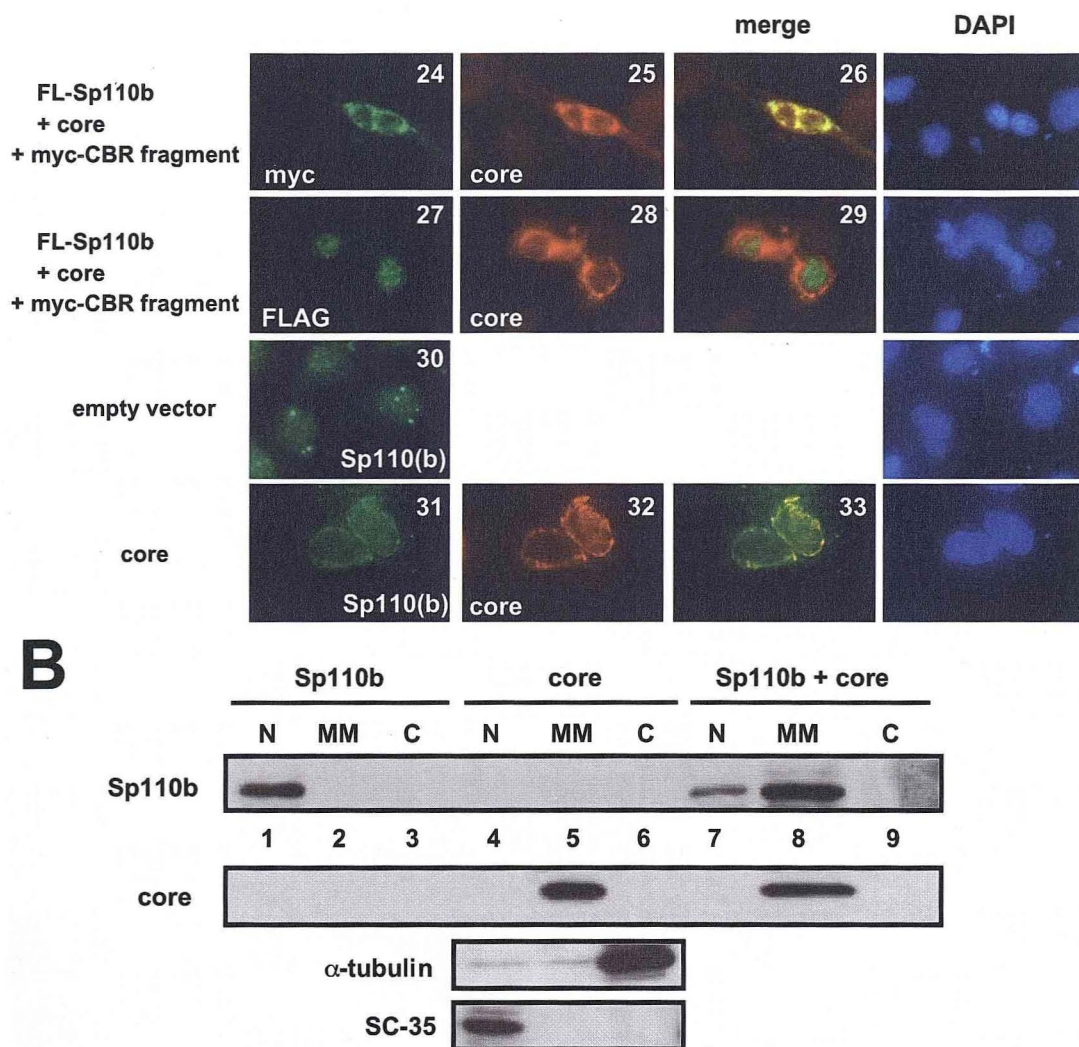


図2-6 Sp110b の細胞内局在は Core により核から細胞質へと変化する

(A) 発現プラスミドとして pCMV-core (パネル 1), pCA-Sp110 (2), pCA-Sp110 および pSG5-RAR α (3-5), pCA-Sp110 および pCMV-core (6-8), pCMV-Sp110b (9), pCMV-Sp110b および pSG5-RAR α (10-12), pCMV-Sp110b および pCMV-core (13-15), pCMV-core(6162M) (16), pCMV-Sp110b および pCMV-core(6162M) (17-19), pCMV-Sp110b(1-276+454-539) (20), pCMV-Sp110b(1-276+454-539) および pCMV-core (21-23), pCMV-Sp110b, pCMV-core および pcDNA-Sp110b(389-453) (myc-CBR fragment) (24-29) を COS-7 細胞に、あるいは pKS+/CMV (30)、pCMV-core (31-33) をインターフェロン γ 300 U/ml を処理した Hela 細胞にトランスフェクションした。抗 FLAG 抗体 (パネル 2, 3, 6, 9, 10, 13, 17, 20, 21, 27, 緑で示す)、抗 myc 抗体 (パネル 24, 緑で示す)、Sp110 および Sp110b に対する抗体 (パネル 30, 31, 緑で示す)、抗 Core 抗体 (パネル 1, 7, 14, 16, 18, 22, 25, 28, 32, 赤で示す)、抗 RAR α 抗体 (パネル 4, 11, 赤で示す) を一次抗体として用いてタンパク質を検出した。緑及び赤を重ねあわせた像 (merge) は、パネル 5, 8, 12, 15, 19, 23, 26, 29, 33 に示した。同じ細胞の核を DAPI により染色した (右のパネル)。

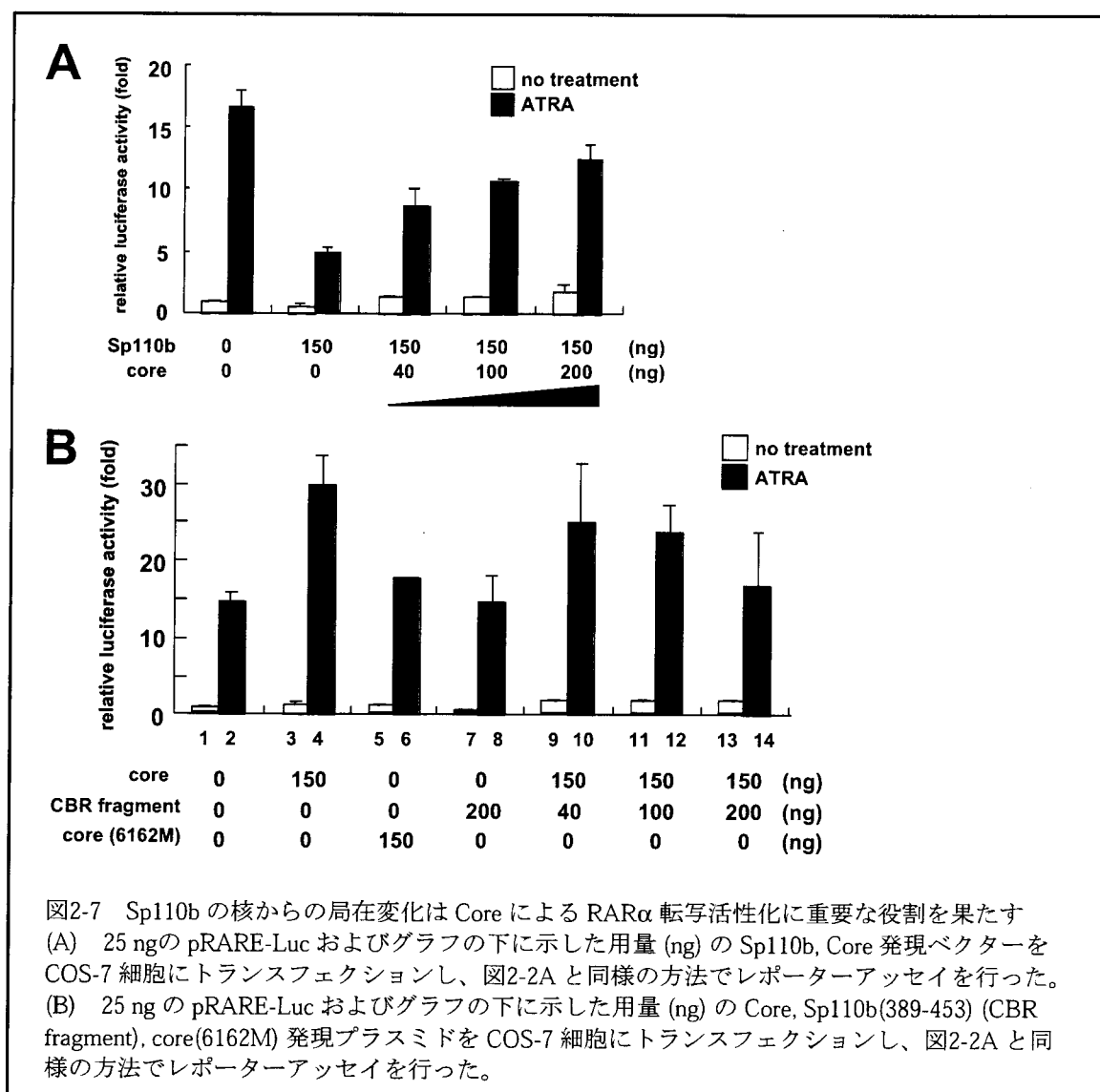
(B) 細胞内分画を段階遠心により行った。発現プラスミドとして pCMV-Sp110b (レーン 1-3)、pCMV-core (4-6)、pCMV-Sp110b および pCMV-core (7-9) を 293T 細胞にトランスフェクションした。細胞をホモジェナイズした後、実験方法で記載した方法にしたがって、核 (N)、ミクロソーム (MM)、細胞質 (C) 画分に分画した。各画分の Sp110b, Core, α -tubulin, SC-35 各タンパク質をイムノブロット法により検出した。

Core による Sp110b の局在変化の分子メカニズムを明らかにするために、まず変異体実験を行った。Core の 1-80 アミノ酸領域にさまざまな点変異を導入し、Sp110b との相互作用を検討した。その結果、*in vitro*において Sp110b と相互作用しない Core の点変異体として、61 番目および 62 番目のアルギニンをそれぞれグリシン、ロイシンに置換した Core(6162M) を得た (図 2-3A 中段のパネル)。この Core(6162M) の発現は Sp110b の局在に変化を与えなかった (図 2-6A パネル 16-19)。また CBR を含まず *in vitro*において Core との結合が見られなかった Sp110b(1-276+454-539) (図 2-3B パネル j) の局在は Core により変化が見られなかった (図 2-6A パネル 20-23)。さらに Core による Sp110b の局在変化は、Core と Sp110b との相互作用の競合ペプチドとして Sp110b の CBR からなるペプチド断片 (myc-CBR) を過剰発現することにより効率良く阻害された。この競合ペプチドは細胞質の核周辺部で Core と共局在することが確認されたが (図 2-6A パネル 24-26)、このペプチドの存在下では、Sp110b は Core が発現している場合であっても主に核に局在していた。(図 2-6A パネル 27-29)。以上のことより、Core による Sp110b の局在変化には Core と Sp110b との相互作用が重要であることが示唆された。

第八節 Core による RAR α 転写活性化は Sp110b の核からの隔離により引き起こされる

上記の結果より、核内で RAR α の転写コリプレッサーとして働くと考えられる Sp110b は、Core によって核から隔離されることにより機能的に不活化される可能性が考えられたので、これをレポーターアッセイ法により検討した。図 2-7A に示すように、Core の発現によりその用量依存的に Sp110b 過剰発現による転写抑制効果の解除が見られた。Core の発現の有無に関わらず、Sp110b の発現レベルは一定であった (未発表) ことより、Core は Sp110b の RAR α への転写抑制効果を機能的に不活化することが示唆された。

Sp110b の核から細胞質への局在変化が Core による RAR α の転写活性化に関与しているかどうかを検討するために、競合阻害実験を行った。この Sp110b の局在変化を競合するペプチド断片が Core による RAR α 転写活性化へどのように影響するかを調べた。競合ペプチドとして CBR ペプチド断片を発現させると (図 2-6A パネル 24-29)、Core による RAR α 転写活性化は、CBR ペプチド断片の用量に依存して阻害されることが観察された (図 2-7B レーン 3, 4, 9-14)。CBR ペプチド断片のみの発現では RAR α 転写活性に影響しなかったことより (図 2-7B レーン 7, 8)、この競合ペプチドは Core による転写増強作用を特異的に抑制することが示された。さらに Sp110b の局在を変化させなかった Core(6162M) は転写活性にほとんど影響を持たなかった



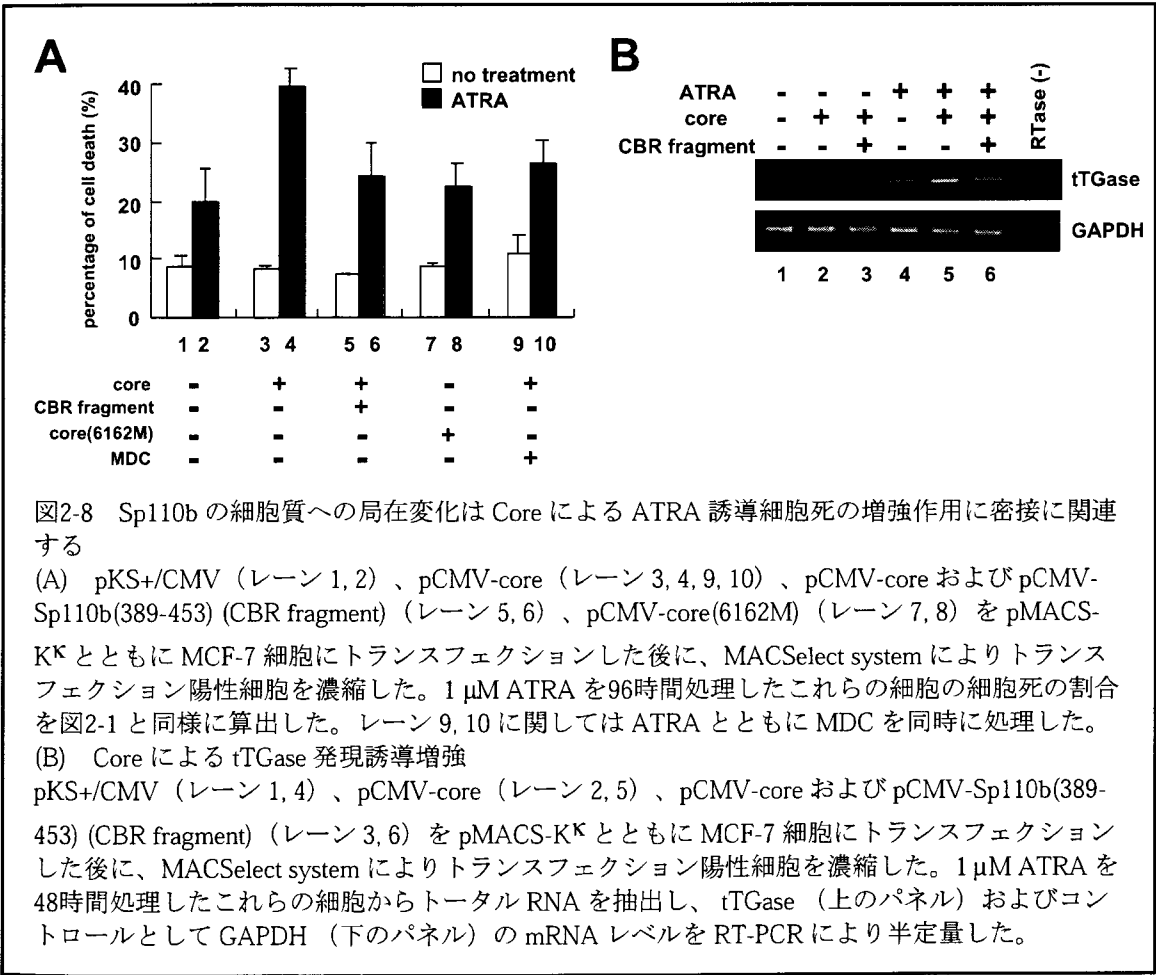
(図 2-7B レーン 5, 6)。以上の結果より、Core による RAR α 転写活性化は、核における転写コリプレッサーと考えられる Sp110b の核から細胞質への局在変化を介して行われると結論づけられた。

第九節 Core による Sp110b の核からの隔離により ATRA による細胞死の増強が引き起こされる

Core による Sp110b の局在変化が、図 2-1 において示された Core の ATRA 誘導細胞死の増強作用に関連をもつかどうかを検討した。これまでに ATRA によるアポトーシスは tissue transglutaminase (tTGase) の発現誘導が重要であるという報告がなされている [27] [28]。そこでまず、Core が tTGase の発現誘導に影響を及ぼすかどうかを調べた。その結果、Core 発現細胞においては ATRA による tTGase の発現誘導が

増強していることが観察された（図 2-8B レーン 4, 5）。また tTGase 活性阻害剤である monodansylcadaverine (MDC) [37] を処理することにより、第一節で述べた Core による ATRA 誘導細胞死の増強作用が抑制された（図 2-8A レーン 3, 4, 9, 10）。これより、この系において Core による ATRA 誘導細胞死の増強作用は、Core による tTGase 発現誘導の増強が関わっている可能性が考えられた。そこでこの Core による tTGase 発現誘導の増強ならびに細胞死の増強作用が、Sp110b の局在変化によるものであるかどうかを、第八節の実験と同様に競合ペプチドを用いて検討した。その結果、競合ペプチドとして用いた CBR ペプチド断片を発現させると、tTGase 発現誘導の増強および細胞死の増強作用は解除されることが観察された（図 2-8A レーン 1-6、B レーン 4-6）。さらに Sp110b の局在を変化させない Core の点変異体 Core(6162M) は細胞死を増強させないことが明かとなった（図 2-8A レーン 7, 8）。

以上の結果より、Core と Sp110b との相互作用とそれによる Sp110b の核からの隔離は、ATRA により誘導される内在性遺伝子発現の増強と、それにともなう細胞死の増強という表現系に関与することが示唆された。



考察

RAR α の転写コリプレッサーとしての Sp110b

今回の研究において、Core と相互作用し、その細胞内局在が変化する細胞性因子として Sp110b を同定した。Bloch らの報告では、Sp110b は転写コアクチベータ Sp110 のスプライシングバリエーションとして報告された [30] が、その機能に関してはこれまで不明であった。今回 Sp110b は *in vitro* において ATRA 存在下で RAR α と相互作用し、RAR α を介する転写を抑制し、RAR α と同様に主に核に局在することが明らかとなった。さらにさまざまなヒト組織において広く発現していることが確認された。これらの結果により、発現がリンパ組織に限局している Sp110 とは異なり、Sp110b は RAR α の活性を抑制状態に保つ、より一般的な転写コリプレッサーであることが示唆された。

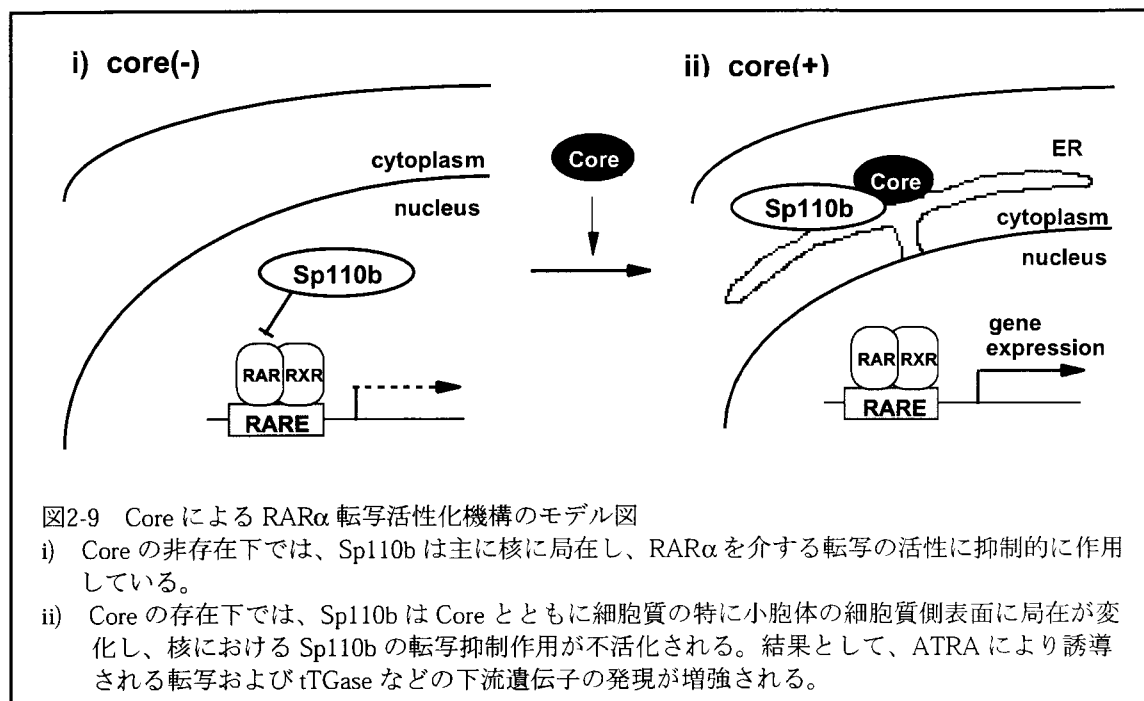
Sp110 と Sp110b の構造上の相違は Sp110 に存在する C 末端領域の存在の有無であるといえる。この領域には plant homeobox domain (PHD) および bromodomain が存在する (図 2-3B)。PHD の機能は現在ほとんど明らかでないが、bromodomain はアセチル化リジン残基と相互作用する構造であることが知られている [38]。またこの構造は転写制御に関わる多くのタンパク質に見られ、遺伝子発現の活性化に重要な役割をもつことが知られているヒストンアセチル基転位酵素活性と関連していると考えられている [39]。これらの事実に基づくと、Sp110 の bromodomain はその転写コアクチベータ活性に重要で、この領域をもたない Sp110b は転写活性化作用をもたないと推察することが可能である。したがって Sp110b の転写抑制作用は、Sp110 あるいは他のコアクチベータと、RAR α が含まれる転写複合体を競合するためであるかもしれない。これらの因子が関与する転写制御の分子機構についてさらなる解析が必要である。

Core による RAR α 活性化における Sp110b の役割

今回の研究により、Core は直接的な相互作用を介して Sp110b の細胞内局在を特異的に核から細胞質の特に小胞体へと変化させることが示唆された。この時 Sp110 の局在は変化させなかった。Sp110 と Sp110b の構造的な相違は、上記のように Sp110 の C 末端領域の有無であり、この領域がこの局在変化という現象に影響を与えられる。GST pull down アッセイの結果により Sp110 の C 末端領域は Core との相互作用に阻害的に作用すると考えられた。これはこの領域が Core との相互作用に立体的な障害となるからかもしれない。加えて、この領域に結合する特定の細胞性因

子が Core と Sp110 との結合を妨害し、結果として細胞内における Core との親和性がさらに低下する可能性も考えられる。Sp110b が核と細胞質間をシャトルしていることが考えられるが、一方 Sp110 分子内には核内のクロマチンを認識し、これに結合する bromodomain が存在することから、Sp110 は核に留まっている可能性がある。実際、SWI/SNF リモデリング複合体タンパク質である HBRM の bromodomain を欠失させることで、このタンパク質の核への局在は失われることが報告されている [38]。この点において、Sp110 の C 末端領域に存在する bromodomain は、核の駐留に機能していることが考えられる。

今回の研究により、Core は Sp110b がその RAR α 転写抑制作用を発揮する核から細胞質の特に小胞体へと局在変化させることにより、結果的に Core は RAR α を介する転写を活性化するというモデルが提唱される (図 2-9)。



これまでに Core がさまざまな転写因子や遺伝子プロモーターの活性を修飾することが報告されている [7] [8] [10] [11] [12]。そのうちのいくつかでは、Core は主に小胞体に局在しているにもかかわらず、直接結合することにより転写因子の転写活性を修飾すると推察されている。しかしながら、これらにおいては Core が細胞のどこで転写因子と結合するかは示されていない。この相互作用と転写修飾との関係もやはり明確ではない。したがって今回の研究は、Core による特定の転写因子の活性修飾メカニズムを示したはじめての報告であると思われる。最近、Core はレチノイド X 受容体 (RXR) α と相互作用し、その転写活性を上げるという報告がなされた [11]。この報告においても、両者が結合する細胞内の場所は明らかではない。この論文の著者たちは Core による RXR α 活性化メカニズムは不明であるが、Core は RXR α の

コファクターとして作用するかもしれないと推察している。今回の研究で Core はコファクターと考えられる Sp110b と細胞質で相互作用し、Sp110b のコリプレッサー機能を阻害することが示された。これは Core のコファクター様作用のメカニズムを解明したものであると考えられる。

CBP/p300, SRC-1, TIF2/GRIP1, RAC3/ACTR/pCIP/AIB-1 などのよく知られた転写コファクター群は、特定というよりはむしろ複数の転写因子の制御に関与していることが知られている [40]。またこれらの転写コファクターは以下のような異なった情報伝達経路間のクロストークに重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。NF- κ B とグルココルチコイド受容体は、細胞内の有限量の CBP や SRC-1 との結合を互いに拮抗しあうことにより、その転写活性を互いに抑制しあうことが報告された [41]。同様の関係は AP-1 とアンドロゲン受容体 [42]、NF- κ B と p53 などの間に見い出された。Sp110b がこれらのコファクターのように複数の転写因子の制御に関わっているかどうかは明らかではないが、Core によるさまざまな転写因子への効果のいくつかは、Sp110b の局在変化によって引き起こされる転写コファクターのバランス変化によって説明がつくかもしれない。この点に関してさらなる解析が望まれる。

ある種のウイルスタンパク質が、転写コファクターとの相互作用により細胞の転写活性を修飾するということはすでにいくつか報告されている。アデノウイルス E1A [43]、ヒト免疫不全ウイルス I 型 (HIV-1) Tat [44]、HTLV-1 Tax [45]、パピローマウイルス (HPV) 16 型 E6 [46] といったウイルスタンパク質は、CBP/p300 を拮抗することによりさまざまな転写因子の活性を制御することが報告されている。HTLV-1 Tax はまた SRC-1 から CBP/p300 を競合することにより、ステロイド受容体あるいはレチノイド受容体を介する転写を抑制することが示唆されている [47]。アデノウイルス E1B は PCAF と結合し、p53 と PCAF との相互作用を物理的に妨害することを介して p53 の転写活性を抑制することが示された [48]。HPV E7 はプロモーターにヒストン脱アセチル化酵素をリクルートすることによりインターフェロン制御因子 (IRF)-1 活性を阻害することが報告された [49]。以上のようなさまざまなウイルスタンパク質による転写制御はすべて核内でのイベントであると考えられる。しかしながら、Core と Sp110b との相互作用は細胞質の特に小胞体膜で起こっていることが示されたことより、これはウイルスタンパク質が宿主細胞転写を制御する今までにないメカニズムであると思われる。この機構においては、ウイルスタンパク質がその局在部位を利用して、転写コファクターの細胞内局在を変化させることが本質的であると示唆された。

RAR はアポリポタンパク質 (Apo) A-I, Apo C-III、コレステリルエステル変換酵素などといった脂質代謝関連タンパク質の発現を制御していることが知られている

[29]。このことから今回の結果より HCV 感染細胞において脂質代謝が Core により修飾されている可能性が考えられる。たしかに、HCV 感染者の肝臓には高頻度に肝臓の脂肪化が見られる [50]。また Core トランスジェニックマウスでは肝脂肪化が引き起こされることが報告されており [51]、これはレチノイド受容体の活性化と関連があると考察されている [11]。今回明らかにした転写コファクターのバランス変化により引き起こされる生理学的な変化についてさらなる解析を行うことにより、HCV による病態形成の分子メカニズムの一端が解明されるものと期待される。

総括および結論

本研究において著者は、C 型肝炎ウイルス Core タンパク質が宿主細胞転写へおよぼす影響およびその分子機構についての解析を行い、以下の新知見を得た。

- 1) これまで当研究室で報告してきた、Core の Fas あるいは TNF- α を介するアポトーシスに対する抑制作用がどのように引き起こされるかについて研究を行った。その結果 Core はさまざまな細胞株において転写因子 NF- κ B を活性化することが示唆された。Core によるこの NF- κ B 活性化には、その細胞内局在が重要な鍵を握っており、細胞質の特に小胞体膜に局在する Core がこの転写活性化に関与するものであると考えられた。
- 2) 一方、Core は ATRA により誘導される細胞死を増強することが明らかとなった。これは Core によるアポトーシス促進タンパク質である tTGase の発現増強と、核内受容体 RAR の転写活性化を介している可能性が考えられた。この Core による RAR の転写活性化は、Core が転写コリプレッサーと考えられる Sp110b を核から細胞質へ隔離することにより引き起こされると示唆された。

以上の結果より Core は宿主細胞のさまざまな因子を介する転写を、その小胞体に局在するという性質により制御していることが明らかとなった。またこの転写修飾機構は、アポトーシス感受性などの宿主細胞の性質を変化させていることが考えられた。本研究の成果は、C 型肝炎ウイルスによる病態形成の分子メカニズムを考える上で、有用な知見であると考えられる。

謝辞

本研究に際しまして、多岐にわたり御指導と御鞭撻を賜りました京都大学ウイルス研究所教授 下遠野邦忠 先生に慎んで感謝の意を表します。また、直接ご指導いただき、多くの有益なご助言をいただきました京都大学ウイルス研究所助教授 土方 誠 先生、京都大学医学部附属病院消化器内科助手 丸澤宏之 先生に心から感謝いたします。

また、本研究にご協力いただき多くの時間を共有してきました土井崇広氏、田川綾子氏ならびに日々の生活においてさまざまなアドバイスをいただきました改田厚氏、同じチームとしてともに研究生活を過ごさせていただきました松本美貴子氏、小柳三千代氏、さらに京都大学ウイルス研究所ヒトがんウイルス研究分野のすべての方々に深く感謝いたします。

最後になりましたが、筆者をかげながら支えて下さいました両親、多くの友人、先生方にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

発表論文目録

本研究の一部は以下の論文として公表済みあるいは公表予定である。

- 1) Watashi, K., Hijikata, M., Marusawa, H., Doi, T., and Shimotohno, K.
Cytoplasmic Localization Is Important for Transcription Factor Nuclear Factor- κ B
Activation by Hepatitis C Virus Core Protein through Its Amino Terminal Region
Virology 286 (2001): 391-402
- 2) Shimotohno, K., Watashi, K., Tsuchihara, K., Fukuda, K., Marusawa, H., and
Hijikata, M.
Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation
J. Gastroenterol. 37 (Suppl 13) (2002): 50-54
- 3) Watashi, K., Hijikata, M., Tagawa, A., Doi, T., Marusawa, H., and Shimotohno, K.
Modulation of Retinoid Signaling by a Cytoplasmic Viral Protein via Sequestration
of Sp110b from Nucleus
(投稿中)

引用文献

1. Alter, H. J., Purcell, R. H., Shih, J. W., Melpolder, J. C., Houghton, M., Choo, Q. L., and Kuo, G. (1989) *N Engl J Med* **321**, 1494-1500.
2. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989) *Science* **244**, 359-362.
3. Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., Miyamura, T., Dienstag, J. L., Alter, M. J., Stevens, C. E., and et al. (1989) *Science* **244**, 362-364
4. Tsukuma, H., Hiyama, T., Tanaka, S., Nakao, M., Yabuuchi, T., Kitamura, T., Nakanishi, K., Fujimoto, I., Inoue, A., Yamazaki, H., and et al. (1993) *N Engl J Med* **328**, 1797-1801
5. Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., and Koike, K. (1998) *Nat Med* **4**, 1065-1067.
6. Ray, R. B., Lagging, L. M., Meyer, K., and Ray, R. (1996) *J Virol* **70**, 4438-4443.
7. Tsuchihara, K., Hijikata, M., Fukuda, K., Kuroki, T., Yamamoto, N., and Shimotohno, K. (1999) *Virology* **258**, 100-107.
8. Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T., and Shimotohno, K. (1999) *J Virol* **73**, 4713-4720.
9. Ray, R. B., Meyer, K., and Ray, R. (1996) *Virology* **226**, 176-182.
10. Shrivastava, A., Manna, S. K., Ray, R., and Aggarwal, B. B. (1998) *J Virol* **72**, 9722-9728.
11. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. (2002) *Hepatology* **35**, 937-946.
12. Lu, W., Lo, S. Y., Chen, M., Wu, K., Fung, Y. K., and Ou, J. H. (1999) *Virology* **264**, 134-141.
13. O'Brien, V. (1998) *J Gen Virol* **79** (Pt 8), 1833-1845
14. Pahl, H. L. (1999) *Oncogene* **18**, 6853-6866
15. Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S., and Cullen, B. R. (1995) *Cell* **82**, 485-494
16. Mizushima, H., Hijikata, M., Asabe, S., Hirota, M., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1994) *J Virol* **68**, 6215-6222
17. Suzuki, R., Matsuura, Y., Suzuki, T., Ando, A., Chiba, J., Harada, S., Saito, I., and Miyamura, T. (1995) *J Gen Virol* **76** (Pt 1), 53-61
18. Haas, I. G. (1994) *Experientia* **50**, 1012-1020
19. Liu, J., Xiao, N., and DeFranco, D. B. (1999) *Methods* **19**, 403-409

20. Satoh, S., Tanji, Y., Hijikata, M., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1995) *J Virol* **69**, 4255-4260
21. Karin, M. (1999) *Oncogene* **18**, 6867-6874
22. Matsumoto, M., Hsieh, T. Y., Zhu, N., VanArsdale, T., Hwang, S. B., Jeng, K. S., Gorbalenya, A. E., Lo, S. Y., Ou, J. H., Ware, C. F., and Lai, M. M. (1997) *J Virol* **71**, 1301-1309
23. Zhu, N., Khoshnan, A., Schneider, R., Matsumoto, M., Dennert, G., Ware, C., and Lai, M. M. (1998) *J Virol* **72**, 3691-3697
24. Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W., and Goeddel, D. V. (1999) *Science* **283**, 543-546
25. Yamaoka, S., Inoue, H., Sakurai, M., Sugiyama, T., Hazama, M., Yamada, T., and Hatanaka, M. (1996) *Embo J* **15**, 873-887
26. Shimotohno, K. (2000) *Semin Cancer Biol* **10**, 233-240
27. Joseph, B., Lefebvre, O., Mereau-Richard, C., Danze, P. M., Belin-Plancot, M. T., and Formstecher, P. (1998) *Blood* **91**, 2423-2432.
28. Oliverio, S., Amendola, A., Rodolfo, C., Spinedi, A., and Piacentini, M. (1999) *J Biol Chem* **274**, 34123-34128.
29. Staels, B. (2001) *J Am Acad Dermatol* **45**, S158-167.
30. Bloch, D. B., Nakajima, A., Gulick, T., Chiche, J. D., Orth, D., de La Monte, S. M., and Bloch, K. D. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 6138-6146.
31. Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997) *Nature* **387**, 733-736.
32. Chambon, P. (1996) *Faseb J* **10**, 940-954.
33. Ferrigno, P., and Silver, P. A. (1999) *Oncogene* **18**, 6129-6134.
34. Schreiber, V., Molinete, M., Boeuf, H., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. (1992) *Embo J* **11**, 3263-3269.
35. Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B., Montecino, M., Choi, J., Zaidi, K., and Javed, A. (2000) *J Cell Sci* **113**, 2527-2533.
36. Watashi, K., Hijikata, M., Marusawa, H., Doi, T., and Shimotohno, K. (2001) *Virology* **286**, 391-402.
37. Ou, H., Haendeler, J., Aebly, M. R., Kelly, L. A., Cholewa, B. C., Koike, G., Kwitek-Black, A., Jacob, H. J., Berk, B. C., and Miano, J. M. (2000) *Circ Res* **87**, 881-887.
38. Zeng, L., and Zhou, M. M. (2002) *FEBS Lett* **513**, 124-128.
39. Dyson, M. H., Rose, S., and Mahadevan, L. C. (2001) *Front Biosci* **6**, D853-865.
40. Leo, C., and Chen, J. D. (2000) *Gene* **245**, 1-11.

41. Sheppard, K. A., Phelps, K. M., Williams, A. J., Thanos, D., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Gerritsen, M. E., and Collins, T. (1998) *J Biol Chem* **273**, 29291-29294.
42. Fronsdal, K., Engedal, N., Slagsvold, T., and Saatcioglu, F. (1998) *J Biol Chem* **273**, 31853-31859.
43. Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1995) *Nature* **374**, 81-84.
44. Ariumi, Y., Kaida, A., Hatanaka, M., and Shimotohno, K. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 556-561.
45. Van Orden, K., Yan, J. P., Ulloa, A., and Nyborg, J. K. (1999) *Oncogene* **18**, 3766-3772.
46. Patel, D., Huang, S. M., Baglia, L. A., and McCance, D. J. (1999) *Embo J* **18**, 5061-5072.
47. Scoggin, K. E., Ulloa, A., and Nyborg, J. K. (2001) *Mol Cell Biol* **21**, 5520-5530.
48. Liu, Y., Colosimo, A. L., Yang, X. J., and Liao, D. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 5540-5553.
49. Park, J. S., Kim, E. J., Kwon, H. J., Hwang, E. S., Namkoong, S. E., and Um, S. J. (2000) *J Biol Chem* **275**, 6764-6769.
50. Fiore, G., Fera, G., Napoli, N., Vella, F., and Schiraldi, O. (1996) *Eur J Gastroenterol Hepatol* **8**, 125-129.
51. Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Koike, K. (1997) *J Gen Virol* **78**, 1527-1531.