

氏 名	みや 成 悠 介
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 76 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 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	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	C 型肝炎ウイルスのゲノム RNA 複製機構の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 藤 田 尚 志 教 授 杉 田 昌 彦

論 文 内 容 の 要 旨

C型肝炎ウイルス(HCV)はフラビウイルス科に属するプラス鎖RNAウイルスである。HCVの感染は慢性肝炎さらには肝がんの原因となると考えられている。これらの疾患発症のメカニズムを明らかにし、HCVを効率よく排除する方法を構築するためには、ウイルスの生活観を解明する必要がある。しかしながら、これまでHCVの生活観を効率よく再現できる系が存在しなかったために、その詳細はほとんど解明されていなかった。最近、HCVサブゲノムRNAが効率よく自律複製し、増殖維持される培養細胞系(以下、このような細胞をレプリコン複製細胞と略す)の構築が報告された。このレプリコン細胞内ではHCVの複製が再現されていると考えられているが、その複製に関する詳細な分子メカニズムは未だ明らかにされていない。今回、申請者はこの系を利用してHCVゲノムの複製メカニズムについて解析を試みた。

細胞をサポニンであるジギトニンで処理することによって細胞膜を部分的に透過性にすることができる。このような細胞はセミインタクト細胞と呼ばれ、細胞内に外部から物質を容易に導入することができ、細胞内の様々な現象を再現するのに広く用いられている。申請者はセミインタクト-レプリコン複製細胞をRNA合成に必要な基質を含む反応溶液中でインキュベートし、その細胞内でウイルスRNAの合成活性が検出されるかどうかを検討した。その結果、このセミインタクト-レプリコン複製細胞内ではプラス鎖およびマイナス鎖レプリコンRNAの合成が効率よく検出された。これはレプリコン複製細胞内に存在するHCVの複製複合体によるRNA合成の結果であり、HCVゲノム複製の詳細な分子メカニズムの解明、さらには抗HCV薬のスクリーニングに利用することが可能であると考えられた。そこで、HCVの複製が細胞内のどのような環境で、どのようにしておこなわれているかを明らかにするために、申請者はこの複製複合体によるRNA合成活性を様々な条件の下に検討した。その結果、HCVの複製複合体は脂質二重膜によって覆われた構造体の内部に形成され、その構造体の内部でRNA合成反応がおこなわれていることが明らかになった。さらに、ウイルスRNAとごく一部のNSタンパク質のみが複製複合体の内部に局在し、RNA合成に関与していると考えられた。一方、大部分のNSタンパク質は複製複合体の外部に存在し、RNA合成には直接関与していないことが示唆された。また、マイナス鎖RNAゲノムはその殆どが複製複合体の内部に局在するのに対して、プラス鎖RNAゲノムは複製複合体の内部および細胞質の両方に局在することが明らかとなった。これは複製複合体によって合成されたプラス鎖RNAゲノムが細胞質に放出されたためと考えられた。今後、このような複製複合体がどのようにして形成され、どのように複製がおこなわれるのかを詳細に解析する必要がある。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

世界の約3%の人口がC型肝炎ウイルスに感染しており、我が国においても200万人以上がHCVに感染していると推定されている。HCV感染者の約半数程度は、肝硬変、肝がんへと病態が確実に悪化していくことからC型肝炎は予後の悪い深刻な感染症と言える。HCVの生活観を解明することによって、HCVを効率良く排除できるような抗HCV剤の開発に重要な手掛かりを与えることができる。申請者の研究は、HCVのゲノムRNA複製機構を明らかにするために、*in vit-*

roでHCVの複製活性を検出することのできる系を確立し、その複製機構を詳細に解析することを試みたものである。これまで、HCVの複製反応は、ウイルスタンパク質の細胞内局在に関する研究から、小胞体膜等の細胞内膜系の細胞質側でおこなわれると類推されていた。しかしながら、これまでHCVの複製を再現する系が存在しなかった為に、HCVのゲノムRNA複製に関する詳細な分子機構は全く明らかにされていなかった。申請者は、HCVの複製を再現しているレプリコン複製細胞をジギトニンで処理した、セミインタクト-レプリコン複製細胞を用いることによって、HCVの複製活性を効率よく検出することができる系を確立した。このセミインタクト細胞をプロテアーゼ、ヌクレアーゼ、界面活性剤等で処理し、その後の複製活性の変化を解析することによって、HCVの複製が脂質二重膜によって覆われた膜構造体の内部でおこなわれていることを明らかにした。また、一部のNSタンパク質のみが複製複合体の内部に存在し、RNA合成に機能していることを、生化学的な解析により明らかにした。さらに、HCV RNAのプラス鎖とマイナス鎖の細胞内局在を、特に複製複合体の内部なのか外部なのかに注目して、*in situ* hybridization, Northern blotting, Slot blot hybridization法を用いて、詳細な解析がおこない見るべき成果を出した。一連の研究から、申請者は博士課程中に取得すべき実験技能を十分に取得し、また、得られた実験結果を充分理解し、その実験結果に基づく作業仮説を考え、それを検証するための研究を進める能力を十分身に付けていると思われる。

申請者の確立したHCVゲノム複製を検出する系は、複製機構の解析に非常に有用であるばかりではなく、HCVのゲノムRNA複製を阻害するような抗HCV薬のスクリーニングにも応用できると考えられる。また、膜構造によって覆われた複製複合体の形成機構を解析することによって、複製複合体の形成阻害をターゲットとした抗HCV薬の発見に寄与と思われる。この様に、本研究の意義は多岐にわたっており、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値のあるものと認められる。なお、本学位授与申請者は平成18年1月24日に論文内容と、それに関連した口頭試問を受け、合格と認められた。