



C型肝炎ウイルス非構造蛋白NS4Aの翻訳抑制作用

岩永, 康裕

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 61(4):179-188

(Issue Date)

2001-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00044708>



C型肝炎ウイルス非構造蛋白NS4Aの 翻訳抑制作用

岩 永 康 裕

神戸大学医学部微生物学講座

(指導：堀田 博教授)

〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-1

TEL: 078-382-5502

FAX: 078-382-5519

(平成13年2月8日受付)

(要 約)

C型肝炎ウイルス (HCV) の NS4A は NS3 セリンプロテアーゼ活性増強作用や NS5A の高リン酸化等にも関与している蛋白であるが、その他の機能についてはほとんど知られていない。今回の我々の CAT アッセイを用いた研究により、NS4A は遺伝子産物 (蛋白) の発現を抑制することが明らかとなった。NS4A による遺伝子産物発現の抑制のメカニズムを解析するために、まず RT-PCR を用いて転写レベルで解析したが NS4A による抑制は認められず、それ以降の段階が重要であることが強く示唆された。そこで、試験管内翻訳反応系で NS4A の翻訳機構に及ぼす影響を解析したところ、遺伝子産物発現量はコントロールに比べて抑制された。以上より NS4A が翻訳抑制作用を有することが示された。さらに今回、NS4A 欠失変異体を用いて翻訳機構抑制に関与する NS4A の責任領域を解析したところ、N 末端 18 アミノ酸が翻訳機構抑制に必要な領域であることが分かった。また、NS4A は NS3 の N 末端部と結合し複合体を形成することが報告されているため、その複合体の翻訳抑制に及ぼす影響についても検討した。それぞれに抑制作用があったが、その効果にはばらつきを認めた。いずれにしても、NS4A 自身が翻訳抑制作用を有することは明らかであり、HCV において NS4A が宿主細胞内で翻訳を抑制することにより、その持続感染に有利な働きを行っている可能性が示唆された。

(諸 言)

C型肝炎ウイルス (HCV) はフラビウイルス科に

属し、輸血後肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因ウイルスとして広く知られている⁽¹⁾。HCV 感染の約 70 から 90% は慢性化し^(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)、10 から 20 年後少なくとも 20% が肝硬変へと進んでいく。そしてまた肝細胞癌とも関係している^(2, 5)。ウイルスゲノムはプラス鎖の一本鎖 RNA で、全長約 9,600 塩基からなる。塩基配列にかなりの変化があり、最近少なくとも 6 個の主なゲノタイプと 60 個のサブタイプに分類されている^(9, 10, 11)。また、約 3,010-3,033 アミノ酸残基からなる前駆体ポリプロテインをコードしていて、産生されたポリプロテインは、宿主細胞のシグナルペプチダーゼとウイルスがコードする 2 つのプロテアーゼによって少なくとも 10 個のウイルス蛋白 (Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A, NS5B) に切断される^(12, 13, 14)。

NS4A は NS3 プロテアーゼと安定した複合体を形成していて 3/4A と 4B/5A 部位での切断に補助因子として働いたり、4A/4B と 5A/5B 部位でのプロセッシングを増強したりする^(15, 16, 17)。また NS5A の高リン酸化にも関連している^(18, 19)。しかしながら、その機能はほとんど分かっていない。

今回の研究では、転写または翻訳に及ぼす NS4A の影響を調べるとともに、その責任領域を明らかにすることを目的とした。

(方 法)

プラスミドの構築

HCV-1bj 株⁽²⁰⁾の NS4A 全領域をプライマー J4A-1-S (sense, 5'-GGAGGAATTCGTCATGAGCACCTGGGTGCT-3'; 下線部, *EcoRI* 認識部位; 太字, 翻訳開始コドン) と J4A-54-AS (antisense, 5'-CGCTGAATTCCTACAGG

キーワード: C型肝炎ウイルス, 非構造蛋白 NS4A, 翻訳抑制

CAGTACGCGGCCA-3'; 下線部, *Eco*RI認識部位; 太字, 停止コドンの相補的配列) を使用して PCR 法を用いて増幅した。*Eco*RI で処理後, 増幅フラグメントを pSG5 (Stratagene) に組み込み, 発現プラスミド pSGns4A/1658-1711 を作製した。また, NS4A (全長 54 アミノ酸) の種々の欠失変異蛋白 (1 から 40 アミノ酸, 18 から 54 アミノ酸, 18 から 40 アミノ酸) を発現するプラスミド (それぞれ pSGns4A/1658-1697, pSGns4A/1676-1711, pSGns4A/1676-1697) もプライマー J4A-1-S, J4A-40-AS (antisense, 5'-GGAGGAATTCCTACCAGAGCCGCAAGGACT-3' 下線部, *Eco*RI 認識部位; 太字, 停止コドンの相補的配列), J4A-18-S (sense, 5'-GCACGAATTCGCTATGAGGCGGAGTCCTTG-3' 下線部, *Eco*RI 認識部位; 太字, 翻訳開始コドン) と J4A-54-AS の適当な組み合わせによって, 同様に作製した。NS3ΔC (aa1027-1459)⁽²¹⁾ をコードする cDNA フラグメントは, HCV-BK146 cDNA を鋳型としてプライマー NS3-Eco-1 (sense, 5'-GGGGAATTCGCCATGGCGCCCATCACGGCCTACTC-3'; 下線部, *Eco*RI 認識部位; 太字, 翻訳開始コドン) と NS3-Eco-3 (antisense, 5'-GTCGAATTCCTAGGTGACACATGTGTTACA-3'; 下線部, *Eco*RI 認識部位; 太字, 停止コドンの相補的配列) を用いて, PCR により作製した。NS3/NS4A 全領域は, プライマー NS3-

Eco-1 と NS4A-2 (antisense, 5'-GAGGATTCCTAACA CTCTTCCATCTCATC-3'; 下線部, *Eco*RI 認識部位; 太字, 停止コドンの相補的配列) を用いて pMO94AJ から増幅された NS3/NS4A 部位で切断される NS3/NS4A(+) と, NS3-Eco-1 と J4A-54-AS を用いた NS3/NS4A 部位で切断不能な HCV-1bJ 株の変異体 NS3/NS4A(-) の 2 種類のフラグメントを増幅した。これらのフラグメントを pSG5 にサブクローンし, 発現プラスミド pSGns3/1027-1459, pSGns3/4A/1027-1711(MO94AJ), pSGns3/4A/1027-1711(HCV-1bJ) を作製した。HCV ゲノム構造の略図と発現プラスミドの構成に使用した cDNA フラグメントを図 1 に示す。

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子の upstream にそれぞれ waf-1, p53, SV40, RSV, c-fos プロモーターを持つ CAT レポータープラスミドは, これまでに報告されたものを使用した。つまり pWWP-CAT (p21WAF1 promoter)⁽²²⁾, 0.7p53-CAT (mouse p53 promoter)⁽²³⁾, pSV2-cat (SV40 early promoter)⁽²⁴⁾, pRSV-cat (Rous sarcoma virus long terminal repeat)⁽²⁵⁾, pBL-fos-CAT (human c-fos promoter)⁽²⁶⁾ を使用した。

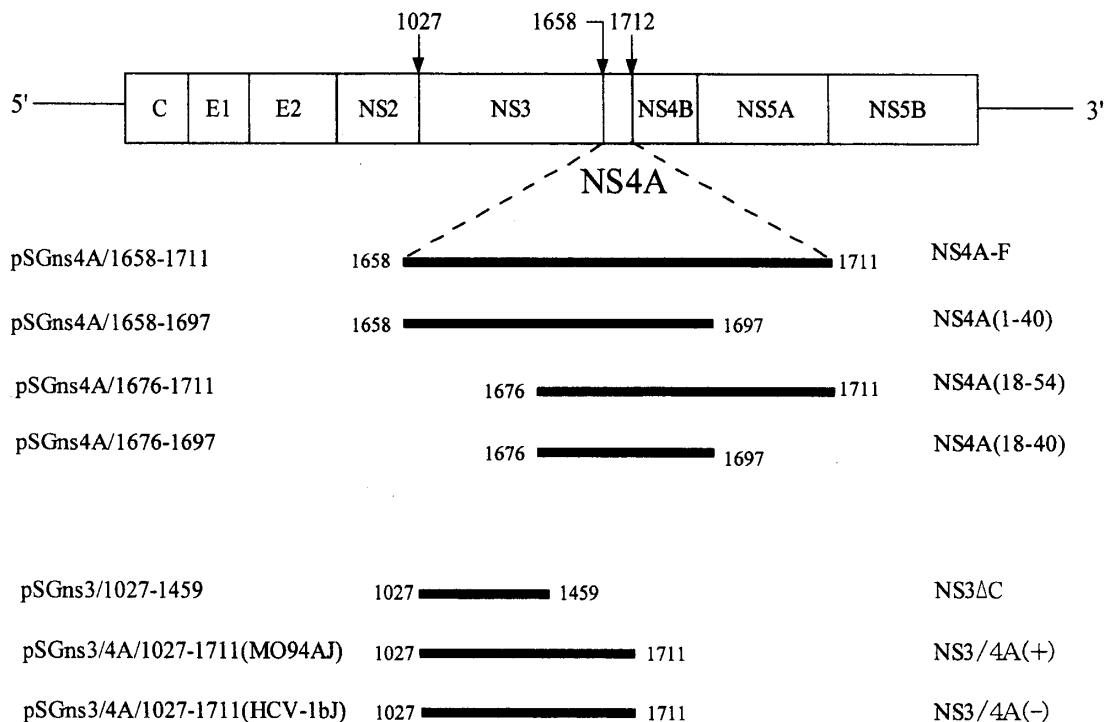


図 1 HCV ゲノム構造と発現プラスミドに用いられた cDNA フラグメントの略図。発現プラスミドと組換え蛋白の名前を記す。番号はアミノ酸の位置。

細胞培養

Ltk⁻細胞は10%ウシ胎児血清を加えたダルベッコ培地中で培養した。

CAT アッセイ

約 1×10^6 個の細胞を直径 10cm の組織培養プレートにまき、一晚培養した。それぞれの NS4A 発現プラスミドと CAT レポータープラスミドを種々の比率で混合し、リン酸カルシウム法⁽²⁷⁾にて細胞にトランスフェクトした。pSG5 プラスミドをコントロールベクターとして使用した。細胞を 48 時間後に回収し、250mM トリス塩酸 (pH7.8) 緩衝液中でソニケーション (140W, 2 分) により破碎した。細胞抽出液は遠心分離 (10,000rpm, 5 分) により回収し、その CAT 活性を測定した⁽²⁸⁾。すなわち、20 μ l の細胞抽出物を 0.05 μ Ci の ¹⁴C-標識クロラムフェニコール、0.5mM アセチル Co A、250mM トリス塩酸 (pH7.8) と混合し、37°C で 5 時間反応させた。反応混合液は酢酸エチルにより抽出し、薄層クロマトグラフィーによりシリカゲル上に展開した。アセチル化された、あるいはアセチル化されていないクロラムフェニコールをオートラジオグラフィーにより識別し、その放射活性を BAS2000 イメージアナライザー (フジフィルム) を用いて測定した。

RT-PCR による転写レベルの半定量

CAT アッセイの時と同様に、培養細胞に NS4A 発現プラスミドと CAT レポータープラスミドをトランスフェクトし、48 時間後に細胞を回収した。その細胞から、TRIzol 溶液を用いて RNA を抽出し、RT-PCR を行った。RT-PCR 反応は、まず CAT cDNA に対するプライマー (sense, 5'-TGTACCTATAA CCAGACCGT-3', antisense, 5'-GCGGCATCAGCACCTTGT-3') あるいは G3PDH cDNA に対するプライマー (F, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', R, 5'-TCCACCACCTGTT GCTGTA-3') を用いて 60°C 30 分逆転写を行い、続いて 94°C で変性、50°C でアニーリング、72°C で伸長反応を行った。定量評価のために、まず一定の回数 (20, 25, 30, 35, 40 サイクル) で PCR 反応を行い、25-35 サイクルが増幅の対数期内であることを確認した。G3PDH は定量的 RT-PCR 解析における内部コントロールとして用いた。

試験管内翻訳反応における NS4A の効果

試験管内翻訳反応は既報の方法に従った⁽²⁹⁾。まず、pSGns4A/1658-1711 を XbaI で線状 DNA とし、RiboMAX RNA Production System-T7

(Promega) を用いた NS4A-F RNA 転写の鋳型として用いた。転写反応は capped RNA を合成するために 3mM ⁷mGpppG (New England Biolabs) の存在下で行った。その後、反応混合液を DNA 分解酵素で消化して鋳型 DNA を取り除き、Rneasy Mini Kit (Qiagen) を用いて合成された mRNA を精製した。p21WAF1 の発現プラスミド pSGp21 も XbaI で線状 DNA とし、上記と同様にして p21WAF1 の mRNA を精製した。試験管内翻訳反応には Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate (Promega) を用い、5 : 1 の比率で混合した pSGns4A/1658-1711 mRNA と pSGp21 mRNA の翻訳反応をプロトコルに従って行った。その後、p21WAF1 蛋白の発現を抗 p21 モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により解析し定量した。また NS5B の発現プラスミド pSGns5B を XbaI で線状 DNA とし、同様にして mRNA を作製して、NS4A に対するコントロールとして使用した。

(結 果)

NS4A による p21WAF1 CAT レポーター遺伝子発現に及ぼす影響

p21WAF1 プロモーターを持つ CAT レポーター遺伝子 (pWWP-CAT) 発現に及ぼす NS4A の効果を CAT アッセイにより解析した。pWWP-CAT 1 μ g に対して pSGns4A/1658-1711 を 0 (対照), 1, 5, 10, 15 μ g と増量していくと、それにしたがって対照 (100%) に比べて CAT 活性は抑制された (図 2)。つまり NS4A は p21WAF1 CAT レポーター遺伝子発現を量依存性に抑制した。この実験において、pSGns4A/1658-1711 を 0, 1, 5, 10, 15 μ g と増量した時、混合するコントロールベクター pSG5 は 15, 14, 10, 5, 0 μ g と減量し、DNA の総量が変わらないようにして遺伝子導入効率が一定になるよう工夫した。

NS4A による種々の CAT レポーター遺伝子発現の抑制

p21WAF1 プロモーター以外に、p53, SV2, RSV, c-fos プロモーターを持つそれぞれの CAT レポーター遺伝子発現に及ぼす NS4A の影響についても解析した。抑制度が顕著になるように、図 2 の結果を考慮して、各種 CAT レポーター遺伝子 1 μ g に対してそれぞれ 15 μ g の pSGns4A/1658-1711 を混合し、CAT 活性を測定した。NS4A は、これらのプロモーターを持つ CAT レポーター遺伝子発現をすべて抑制した

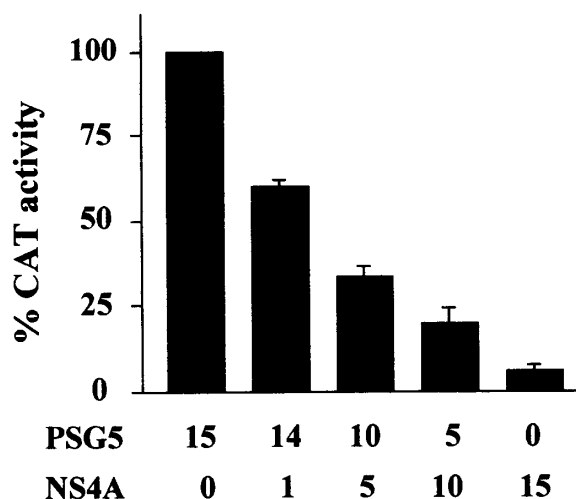


図2 p21WAF1 CAT レポーター遺伝子発現に及ぼす NS4A の効果。pWWP-CAT 1 μ g に対して PSGns4A/1658-1711 をそれぞれ 0, 1, 5, 10, 15 μ g の比率で Ltk⁻細胞にトランスフェクションした。48 時間後に細胞を回収し、CAT アッセイに供した。pSGns4A/1658-1711 が 0 μ g, コントロールベクター pSG5 が 15 μ g 時の CAT 活性を 100% とした。3 回の独立した実験結果の平均値と標準偏差を示す。

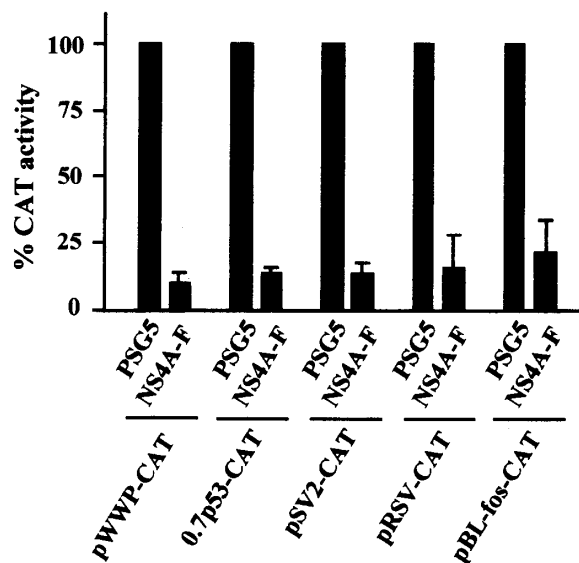


図3 種々の CAT レポーター遺伝子発現に及ぼす NS4A の効果。Waf-1, p53, SV2, RSV, c-fos プロモーターを持つそれぞれの CAT レポーター遺伝子 1 μ g に対してそれぞれ pSGns4A/1658-1711 15 μ g を混合し、細胞にトランスフェクションした後、CAT 活性を測定した。コントロールはコントロールベクター pSG5 のみの時の CAT 活性値で、これを 100% とした。3 回の独立した実験結果の平均値と標準偏差を示す。

(図3)。各プロモーター間で NS4A の抑制度に違いがあるか分散分析法で検定したが、有意差を認めなかった。したがって、NS4A の各プロモーターに対する遺伝子発現抑制に特異性はないことが示唆された。

NS4A による CAT レポーター遺伝子の転写に及ぼす影響

CAT レポーター遺伝子に対する NS4A の効果を転写レベルで解析するために、CAT アッセイの時と同様に、pSGns4A/1658-1711 と pWWP-CAT を一過性に発現させた細胞から RNA を抽出し、それを用いて CAT mRNA 量を RT-PCR で半定量した。G3PDH mRNA は内部コントロールで、対照群と NS4A 群とで RNA 総量がほぼ一致していることを示している。サイクル数が増すと、G3PDH mRNA 量は各群とも同じように増加した。CAT mRNA 量も同様にサイクル数にしたがって増加したが、各群間で CAT アッセイ時のような差異を認めなかった (図4)。

NS4A による試験管内翻訳反応の抑制

Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate(promega)を用いた試験管内翻訳反応系を用いて、NS4A による翻訳機構の抑制が解析された。NS5B は CAT ア

ッセイによる解析で CAT レポーター遺伝子発現の抑制効果が認められなかったことから (未発表成績)、ここでは発現蛋白コントロールとして使用した。試験管内翻訳反応系で、NS4A mRNA と p21WAF1 mRNA を 5 : 1 の比率で混合し、p21WAF1 発現量を測定したところ、その発現量は、NS5B を用いた対照に比べて、 $65.6 \pm 12.8\%$ に抑制された (図5)。

翻訳抑制に関与する NS4A の責任領域の解析

NS4A 欠失変異体を用いて翻訳抑制に関与する NS4A の責任領域を解析した。NS4A 欠失変異体は図1に示したように、N 末端領域 1-40 アミノ酸、C 末端領域 18-54 アミノ酸、あるいは中央領域 18-40 アミノ酸から成っている。CAT アッセイには pWWP-CAT を試験 CAT レポータープラスミドとして使用した。N 末端領域 1-40 アミノ酸は NS4A 全領域とほぼ同程度に CAT 活性を抑制したが、C 末端領域 18-54 アミノ酸と中央領域 18-40 アミノ酸は抑制活性を示さなかった (図6)。p53 プロモーターを持つ 0.7p53-CAT を CAT レポータープラスミドとして使用した場合にも、上記と同様の結果が得られた (未発表成績)。

NS4A による翻訳機構抑制における NS3 との複合

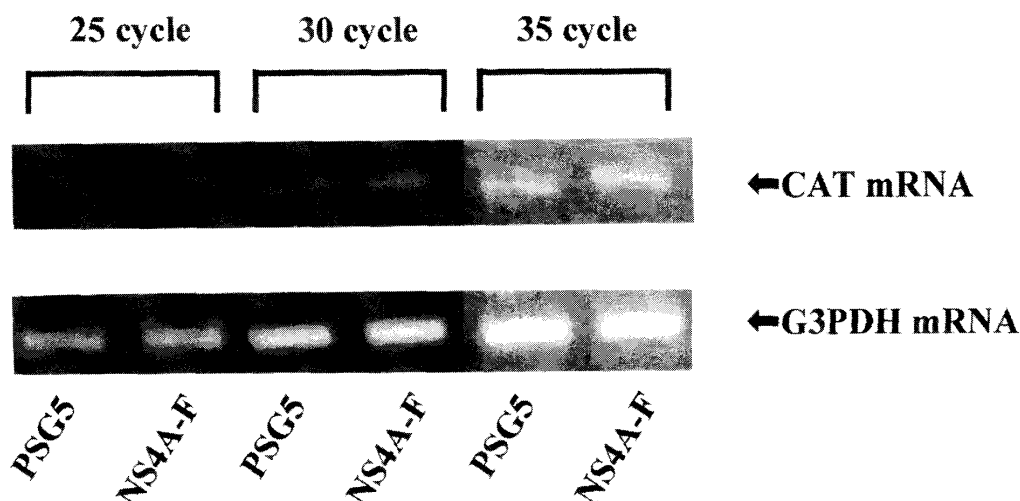


図4 RT-PCRによるCATレポーター遺伝子転写レベルの半定量。pSGns4A/1658-1711またはpSG5とpWWP-CATをそれぞれ一過性に発現させた細胞から抽出したRNAを用いて、CATmRNA量をRT-PCRで半定量した。G3PDHは内部コントロールとして用いた。

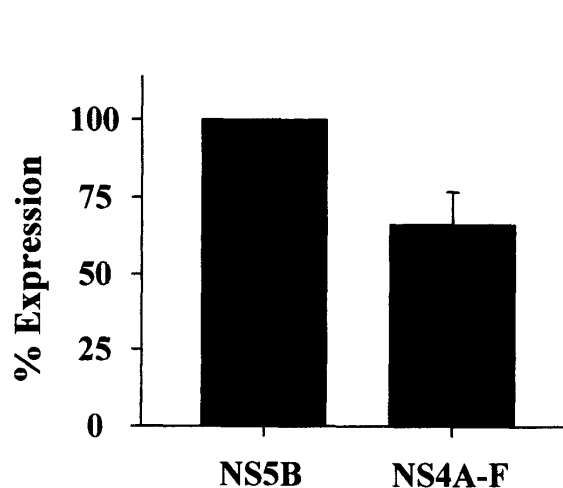


図5 試験管内翻訳反応におけるNS4Aの効果。Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate (Promega)を用いた試験管内翻訳反応系で、NS4A mRNAとp21WAF1 mRNAを5:1の比率で混合し、プロトコールに従って翻訳反応を行った。p21WAF1蛋白の発現を抗p21モノクローナル抗体を用いて、ウェスタンブロット法により解析し定量した。また、NS4Aに対するコントロールとしてNS5Bを用い、この時のp21WAF1蛋白の発現量を100とした。

体形成の効果

NS3とNS4Aを*trans*に共発現させたり、NS3とNS4Aが*cis*に発現後NS3/NS4A部位で切断を受けるプラスミドpSGns3/4A/1027-1711(MO94AJ)や、NS3/NS4A部位で切断不能な変異体を発現するpSGns3/4A/1027-1711(HCV-1bJ)を用いて、翻訳抑制に及ぼすNS3とNS4Aの複合体形成の影響

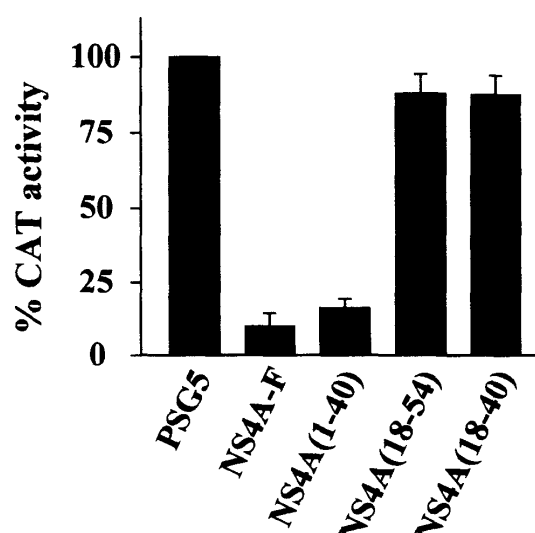


図6 NS4A欠失変異体を用いた翻訳抑制に關与するNS4Aの責任領域の同定。NS4Aの欠失変異蛋白(NS4A(1-40), NS4A(18-54), NS4A(18-40))を発現するプラスミド(pSGns4A/1658-1697, pSGns4A/1676-1711, pSGns4A/1676-1697) 15 μ gとpWWP-CAT 1 μ gをそれぞれ混合し、細胞にトランスフェクションした後、CAT活性を測定した。コントロールベクターpSG5のみの時のCAT活性値を100%とした。3回の独立した実験結果の平均値と標準偏差を示す。

について検討した。それぞれに抑制作用があったが、その効果にはばらつきがあり、各CAT活性間に有意差を認めた(図7)。すなわち、NS3とNS4Aを*trans*に共発現させると、CAT活性は抑制されたが、NS4A-F単独による抑制に比べると、その程度は弱かった。また、NS3とNS4Aが*cis*に発現しNS3/NS4A部位で切断されるNS3/NS4A(+)を

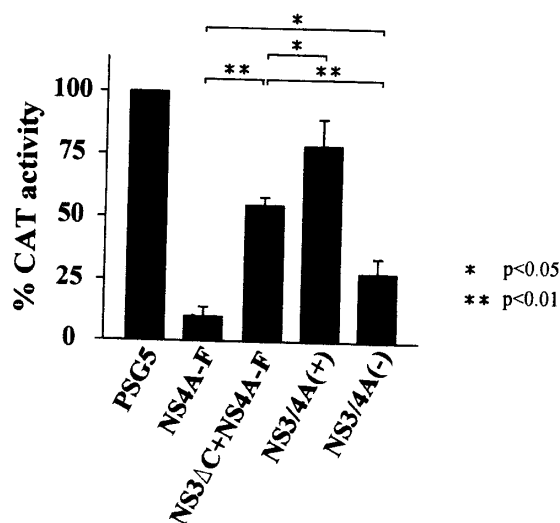


図7 NS4A と NS3 の複合体形成の効果。NS3 と NS4A を *trans* に共発現させたり (NS3Δ C + NS4A-F), NS3 と NS4A が *cis* (NS3/4A(+)) に発現するプラスミド pSGns3/4A/1027-1711(MO94AJ), あるいは NS3/NS4A 部位で切断不能な変異体 (NS3/4A(-)) を発現する pSGns3/4A/1027-1711(HCV-1bJ) を用いて, 翻訳抑制に及ぼす NS3 と NS4A の複合体形成の影響を CAT アッセイにて解析した。pWWP-CAT 1 μg に対して上記のプラスミドをそれぞれ 15 μg ずつ混合し, 細胞にトランスフェクションした後, CAT 活性を測定した。コントロールベクター pSG5 のみの時の CAT 活性値を 100% とした。3 回の独立した実験結果の平均値と標準偏差を示す。

用いた場合にも, その抑制の程度は弱かった。一方, NS3/NS4A 部位で切断不能な変異体 NS3/NS4A(-) では, 上記 2 つの複合体よりも CAT 活性は強く抑制されたが, これも NS4A-F 単独の場合よりは弱かった。なお, 0.7p53-CAT を CAT レポータープラスミドとして用いた場合にも, 同様の結果が得られた (未発表成績)。

(考 察)

NS4A は NS3 セリンプロテアーゼ活性増強作用^(15, 16, 17) や, NS5A の高リン酸化等にも関与している蛋白^(18, 19) であるが, その他の機能についてはほとんど知られていない。今回の我々の CAT アッセイを用いた研究により, NS4A は, プロモーターの種類に拘わらず, 遺伝子産物 (蛋白) の発現を抑制することが明らかとなった (図 2, 3)。NS4A による遺伝子産物発現の抑制のメカニズムを解析するために, RT-PCR を用いて CAT mRNA 量を半定量した。RNA

総量がほぼ一致するように整えられたコントロール群と NS4A 群間で, CAT mRNA 量に差は認められなかった (図 4)。この結果から, NS4A が遺伝子発現を抑制するのは転写レベルではなく, それ以降の段階であることが強く示唆された。そこで, 試験管内翻訳反応系で NS4A の翻訳機構に及ぼす影響を解析したところ, 遺伝子産物発現量はコントロールに比べて抑制された (図 5)。この時, NS4A mRNA と p21WAF1 mRNA は 5 : 1 の比率で混合したが, この抑制の程度は, CAT アッセイにおける同比率での共発現時の NS4A による抑制と比較すると小さいものであった。試験管内 (無細胞) 反応系と培養細胞内での反応という実験系の違いによるものか, あるいはその他の理由に基づくものかについては, 現時点では明らかにすることはできなかった。しかし, いずれにしても, NS4A が翻訳抑制作用を有することが, 本研究により初めて示された。

さらに今回, NS4A 欠失変異体を用いて翻訳機構抑制に関与する NS4A の責任領域を解析した。NS4A 欠失変異体として, 疎水性に富む N 末端領域 1-40 アミノ酸, 親水性に富む C 末端領域 18-54 アミノ酸, そして NS3 との結合に重要な部位である中央部領域の 18-40 アミノ酸が作製された。C 末端領域 18-54 アミノ酸や中央領域 18-40 アミノ酸に比べて, N 末端領域 1-40 アミノ酸は NS4A 全領域とほぼ同程度に CAT 活性を抑制した (図 6)。この結果より, N 末端 18 アミノ酸が翻訳機構抑制に必要な領域であることが示された。

NS4A は NS3 の N 末端部と結合し, 複合体を形成することが報告されている^(30, 31)。そこで NS3 と NS4A を *trans* に共発現させたところ, CAT 活性は抑制されたが NS4A-F 単独による抑制に比べると, その程度は弱かった。また, NS3 と NS4A が *cis* に発現し NS3/NS4A 部位で切断される NS3/NS4A(+) ではさらに抑制が弱かった。一方, NS3/NS4A 部位で切断不能な変異体 NS3/NS4A(-) では, 上記 2 つの複合体よりも CAT 活性は強く抑制されたが, これも NS4A-F 単独の場合よりは弱かった (図 7)。これらの結果より, 以下のことが考えられる。まず, 翻訳機構が細胞質リボソーム上にあることを考えると, 複合体の局在と翻訳抑制の程度とが相関する。また, NS4A は種々の蛋白と容易に結合するが, NS3/NS4A 部位で切断不能な変異体 NS3/NS4A(-) は, 他の蛋白との結合を免れることによって, NS3/NS4A(+) に比べて強い抑制活性を有する可能性が考えられる。一方, NS3ΔC は HCV-BK 株, NS3/NS4A(+) は MO94AJ 株, NS3/NS4A(-) は HCV-

1bJ 株由来とそれぞれ異なる株由来のため、NS3 の N 末端部の構造の違いにより、NS3 と NS4A との相互作用が異なることも考慮に入れる必要がある。いずれにしても、NS4A 自身が翻訳抑制作用を有することは明らかであるが、その詳細な機序についてはさらなる解析が必要である。

ポリオウイルスやアデノウイルスではさまざまなウイルス蛋白が宿主細胞の蛋白発現を抑制し、その感染に有利に働くことが報告されている^(32, 33, 34)。同様に、HCV においても NS4A が宿主細胞内で翻訳を抑制することにより、その持続感染に有利な働きを行っている可能性が示唆された。

(謝 辞)

この研究を行うに当たって御指導頂いた神戸大学医学部微生物学講座堀田博教授、石戸聡先生、藤田恒憲先生、及び長野基子先生に感謝致します。

(文 献)

- 1) Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G., Choo, Q. L.: Molecularbiology of the hepatitis C viruses: implication for diagnosis, development and control of biral disease. *Hepatology* 14: 381-388, 1991.
- 2) Alter, H. J.: To C or not to C: these are the questions. *J. Am. Soc. Hematol.* 85: 1681-1695, 1995.
- 3) Alter, M. J., margolis, H. S., Krawczynski, K., Judson, F. N., Mares, A., Alexander, W. J., Hu, P. Y., Miller, J. K., Gerber, M. A., Sampliner, R. E., Meeks, E. L., Beach, M. J.: The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N. Engl. J. Med.* 327: 1899-1905, 1992.
- 4) Barrera, J. M., Bruguera, M., Ercilla, M. G., Gil, C., Celis, R., Gil, M. P., Del Valle Onorato, M., Rodes, J., Ordinas, A.: Persistant hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 21: 638-644, 1995.
- 5) National Institutes of Health.: National Institutes of Health Consensus development conference panel statement: management of hepatitis C. *Hepatology* 26: 2S 10S.
- 6) Prince, A. M., Brotman, B., Inchauspe, G., Pascual, D., nasoff, M., Hosein, B., Wong, C. Y.: Patterns of prevalence of hepatitis C virus infection in posttransfusion non-A, non-B hepatitis. *J. Infect. Dis.* 167: 1296-1301, 1993.
- 7) Thomas, D. L., Vlahov, D., Solomon, L., Cohn, S., Taylor, E., Garfein, R., Nelson, K. E.: Correlates of hepatitis C virus infection among injection drug users. *Medicine (Baltimore)* 74: 212-220, 1995.
- 8) van der Poel, C. L., Cuypers, H. T. M., Reesink, H. W., Weiner, A. J., Quan, S., di Nello, R., van Boven, J. J. P., Winkel, I., Mulder-Folkerts, D., Exel-Oehlers, P. J., Schaasberg, W., Leentvaar-Kuypers, A., Polito, A., Houghton, M., Lelie, P. N.: Confirmation of hepatitis C virus infection by new fourantigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 337: 317-319, 1991.
- 9) Mellor, J., Holmes, E. C., jarvis, L. M., Yap, P. L., Simmonds, P.: The International hCV Collaborative Study Group. *J. Gen.Virol.* 76: 2493-2507, 1995.
- 10) Doi, H., Aprichartpiyakul, C., Ohba, K., Mizokami, M., Hotta, H.: Hepatitis C virus (HCV) subtype prevalence in Chiang Mai, Thailand, and identification of novel subtypes of HCV major type 6. *J. Clin. Microbiol.* 34: 569-574, 1996.
- 11) Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shin-i, T., Simmonds, P., Smith, D., Stuyver, I., Weiner, A.: Classification, nomenclature and database development for hepatic is C virus (HCV) and related virus: proposals for standardization. *Arch. Virol.* 143: 2493-2503, 1998.
- 12) Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., Rice, C. M.: Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J. Virol.* 67: 2832-2843, 1993.
- 13) Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., mcCourt, D. W., Rice, C. M.: Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific

- products with different termini. *J. Virol.* 68 : 5063-5073, 1994.
- 14) Mizushima, H., Hijikata, M., Asabe, S., Hirota, M., Kimura, K., Shimotohno, K.: Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J. Virol.* 68 : 6215-6222, 1994.
 - 15) Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., Jacobsen, H.: Kinetic and structural analysis of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* 68 : 5045-5055, 1994.
 - 16) Failla, C., Tomei, L., DeFrancesco, R.: Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 68 : 3753-3760, 1994.
 - 17) Lin, C., Pragai, B., Grakoui, A., Xu, J., Rice, C. M.: Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. *J. Virol.* 68 : 8147-8157, 1994.
 - 18) Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., Shimotohno, K.: Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J. Virol.* 69 : 3980-3986, 1995.
 - 19) Neddermann, P., Clementi, A., De Francesco, R.: Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J. Virol.* 73 : 9984-9991, 1999.
 - 20) Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I., Okayama, H.: Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* 65 : 1105-1113, 1991.
 - 21) Muramatsu, S., Ishido, S., Fujita, T., Itoh, M., Hotta, H.: Nuclear localization of the NS3 protein of hepatitis C virus and factors affecting the localization. *J. Virol.* 71 : 4954-4961, 1997.
 - 22) el-Deiry, W. S., Tokino, T., Waldan, T., Oliner, J. D., Velculescu, V. E., Burrell, M., Hill, D. E., Healy, E., Rees, J. L., Hamilton, S. R.: Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 55 : 2910-2919, 1995.
 - 23) Ronen, D., Rotter, V., Reisman, D.: Expression from the murine p53 promoter is mediated by factor binding to a downstream helix-loop-helix recognition motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 4128-4132, 1991.
 - 24) Hotta, Y., Inana, G.: Expression of human ornithine aminotransferase (OAT) in OAT-deficient Chinese hamster ovary cells and fibroblasts of gyrate atrophy patient. *Jpn. J. Ophthalmol.* 36 : 28-32, 1992.
 - 25) Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I., Howard, B. H.: The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 6777-6781, 1982.
 - 26) Shimizu, K., Kawasaki, H., Morisawa, T., Nakamura, M., Yamamoto, E., Yoshikawa, N., Doita, M., Shiozawa, K., Yonehara, S., Chihara, K., Shiozawa, S.: Spontaneous and cytokine regulated c-fos gene expression in rheumatoid synovial cells: resistance to cytokine stimulation when the c-fos gene is overexpressed. *Ann. Rheum. Dis.* 59 : 636-640, 2000.
 - 27) Hotta, H., Ross, A. H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M. V., Ricciardi, R. P., Tsujimoto, Y., Croce, C. M., Kopprowski, H.: Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* 48 : 2955-2962, 1988.
 - 28) Hotta, H., Miyamoto, H., Hara, I., Takahashi, N., Homma, M.: Genomic structure of the ME491/CD63 antigen gene and functional analysis of the 5'-flanking regulatory sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185 : 436-442, 1992.
 - 29) Mamiya, N., Worman, H. J.: Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J. Biol. Chem.* 274 : 15751-15756, 1999.
 - 30) Failla, C., Tomei, L., DeFrancesco, R.: An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J. Virol.* 69 : 1769-1777, 1995.

- 31) Satoh, S., Tanji, Y., Hijikata, M., Kimura, K., Shimotohno, K.: The N-terminal region of hepatitis C virus nonstructural protein 3(NS3) is essential for stable complex formation with NS4A. *J. Virol.* 69 : 4255-4260, 1995.
- 32) Webster, K. A., Muscat, G. E., Kede, S. L.: Adenovirus E1A products suppress myogenic differentiation and inhibit transcription from muscle-specific promoters. *Nature* 332 : 553-557, 1988.
- 33) Huang, J. T., Schneider, R. j. : Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis is prevented by the drug 2 amiropurine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 7115-7119, 1990.
- 34) Huang, J. T., Schneider, R. J.: Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* 65 : 271-280, 1991.

Translational Suppression by Nonstructural Protein 4A of Hepatitis C Virus

Yasuhiro Iwanaga

Department of Microbiology, Kobe University School of Medicine,
7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017
(Director : Professor Hak Hotta)

ABSTRACT

NS4A, which is a non-structural protein of hepatitis C virus, forms a stable complex with the NS3 proteinase and is required as a cofactor for cleavage at the 3/4A and 4B/5A sites, enhancing the processing at the 4A/4B and 5A/5B sites. NS4A is also involved in the hyperphosphorylation of NS5A. However, the other functions of NS4A are hardly understood. In this study, we demonstrated that NS4A suppressed the gene expression using CAT assay. To analyze the underlying mechanism, we performed semi-quantitative RT-PCR to determine transcription levels. Our results showed that NS4A did not suppress transcription, suggesting that the suppression of the gene expression was mediated post-transcriptionally by NS4A. The effect of NS4A on *in vitro* translation was then analyzed. The results obtained revealed that NS4A suppressed *in vitro* translation. In addition, the responsible region of NS4A to suppress translation was analyzed with deletion mutants of NS4A. Our results suggested that the amino-terminal 18 residues of NS4A played an important role in the translational suppression. Since NS3 is known to form a stable complex with NS4A, effects of NS3 on NS4A-mediated translational suppression were analyzed. NS4A-mediated translational suppression was partially negated by NS3 when NS3 was co-expressed in either *trans* or *cis* if, in the latter case, the junction between NS3 and NS4A could be cleaved. However, a mutant NS3/NS4A protein that was unable to cleave the junction still possessed the ability to suppress translation. It has been reported that the proteins of viruses such as poliovirus and adenovirus suppress protein expression of the host cell resulting in an ideal environment for infection. Similarly, it appears likely that HCV NS4A suppresses translation of the host cell to work favorably for the establishment of HCV infection.