



C型肝炎ウイルス非構造蛋白NS4Aの翻訳抑制作業

岩永, 康裕

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2355

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002355>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【131】

氏 名・(本 籍) 岩永 康裕 (佐賀県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博い第1369号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成13年3月31日

【学位論文題目】

C型肝炎ウイルス非構造蛋白 NS4A の翻訳制御作用

審 査 委 員

主査 教授 堀田 博

教授 黒田 嘉和 教授 中村 俊一

<緒言>

C型肝炎ウイルス（HCV）は、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。HCV 感染の約 70～90%は慢性化し、10～20 年後に少なくとも 20%が肝硬変へと進展する。また、肝細胞癌とも関係している。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、少なくとも 6 種類のゲノタイプと 60 種類以上のサブタイプに分類されている。ウイルスゲノムは約 3,000 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おり、それ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、NS4B、NS5A、NS5B）に切断される。

NS4A は NS3 プロテアーゼと安定した複合体を形成し、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。また NS5A の高リン酸化にも関連している。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。また、NS4A と NS3 が複合体を形成した時の翻訳抑制に及ぼす影響についても検討した。

<材料と方法>

1. プラスミドの構築

NS4A 全領域 (NS4A-F; 1-54) を pSG5 に組み込み、発現プラスミド pSGns4A/1658-1711 を作製した。NS4A の種々の欠失変異蛋白 [NS4A (1-40)、NS4A (18-54)、NS4A (18-40)] を発現するプラスミド (それぞれ pSGns4A/1658-1697、pSGns4A/1676-1711、pSGns4A/1676-1697) も同様に作製した。また、NS4A と NS3 の複合体に関する実験用に、NS3 の N 末端 2/3 (NS3 Δ C) を発現する pSGns3/1027-1459、NS3/NS4A 部位で切断される蛋白 [NS3/NS4A(+)] を発現する pSGns3/4A/1027-1711(MO94AJ)、NS3/NS4A 部位で切断不能な HCV-1bJ 株の変異体 [NS3/NS4A(-)] を発現する pSGns3/4A/1027-1711(HCV-1bJ) の 3 種類の発現プラスミドを作製した。クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子の上流にそれぞれ p21WAF1、p53、SV 40、RSV、c-fos プロモーターを持つ CAT レポータープラスミドとして、pWWP-CAT (p21WAF1 プロモーター)、0.7p53-CAT (マウス p53 プロモーター)、pSV2-cat (SV40 初期プロモーター)、pRSV-cat (ラウス肉腫ウイルス LTR)、pBL-fos-CAT (ヒト c-fos プロモーター)を使用した。

2. CAT アッセイ

それぞれの発現プラスミドと CAT レポータープラスミドを種々の比率で混合し、Ltk⁻細胞にトランスフェクトした。細胞を 48 時間後に回収し、ソニケーション後、細胞抽出液を遠心分離で回収し、その CAT 活性を測定した。

3. RT-PCR による転写レベルの半定量

CAT アッセイ時と同様に、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 RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 解析にて CAT mRNA 量を半定量した。

4. 試験管内翻訳反応における NS4A の効果

一定の比率で混合した pSGns4A/1658-1711 mRNA と pSGp21 mRNA の試験管内翻訳反応を Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate を用いて行い、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。

<結果>

1. NS4A による p21WAF1 CAT レポーター遺伝子発現に及ぼす影響

CAT アッセイによる解析で、NS4A は p21WAF1 CAT レポーター遺伝子発現を量依存性に抑制した。

2. NS4A による種々の CAT レポーター遺伝子発現の抑制

NS4A は、p21WAF1 プロモーター以外にも、マウス p53 プロモーター、SV40 初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス LTR、ヒト 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をすべて抑制した。各プロモーター間で NS4A の抑制度に有意差を認めず、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。

3. NS4A による CAT レポーター遺伝子の転写に及ぼす影響

CAT アッセイの時と同様に、NS4A と p21WAF1 CAT レポーターを一過性に発現させた細胞中の CAT mRNA 量を RT-PCR で半定量した。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 CAT アッセイ時のような差異は認められなかった。

4. NS4A による試験管内翻訳反応の抑制

試験管内翻訳反応系では、NS4A mRNA と p21WAF1 mRNA を一定の比率で混合後の p21WAF1 の発現量は、対照に比べて抑制された。

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 CAT アッセイにて解析した。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。

6. NS4A による翻訳機構抑制における NS3 との複合体形成の効果

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。

<考察>

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。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 量を半定量したが、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。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。つまり 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。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。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。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。

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。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。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1371 号	氏 名	岩永 康裕
論文題目	C型肝炎ウイルス非構造蛋白NS4Aの翻訳抑制作用		
審査委員	主 査 堀 田 博 副 査 黒 田 嘉 和 副 査 中 村 俊 一		
審査終了日	平成 13 年 3 月 9 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

C型肝炎ウイルス (HCV) は、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おり、その感染の約70～90%は慢性化する。ウイルスゲノムはプラス鎖の一本鎖RNAで、全長約9,600塩基からなり、約3,000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る。前駆体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開裂を受け、少なくとも10種類のウイルス蛋白 (Core、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B) を生じる。

NS4AはNS3プロテアーゼと安定した複合体を形成し、NS3/NS4AやNS4B/NS5A部位での切断に補助因子として働いたり、NS4A/NS4BやNS5A/NS5B部位でのプロセッシングを増強したりする。またNS5Aの高リン酸化にも関連している。しかしながら、それ以外の機能はほとんど分かっていない。本研究は、宿主細胞の転写あるいは翻訳に及ぼすNS4Aの影響を調べ、その責任領域を明らかにするとともに、NS4AとNS3が複合体を形成した時の翻訳抑制に及ぼす影響について検討したものである。

結果の概略は以下のとおりである。

1. NS4Aによるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 発現の抑制

CATアッセイによる解析で、NS4Aはp21WAF1 CATレポーター遺伝子発現を用量依存的に抑制した。また、マウスp53プロモーター、SV40 初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスLTR、ヒトc-fosプロモーターを持つそれぞれのCATレポーター遺伝子を用いた場合にも、同様の発現抑制がみられた。その抑制の程度は各CATレポーター遺伝子の間で明らかな差は認められず、NS4Aによる抑制にはプロモーター特異性のないことが示唆された。

2. NS4Aによる転写後抑制・翻訳抑制

CATアッセイと平行して作製した細胞におけるCAT mRNAの定量的RT-PCR解析により、NS4AによるCAT発現の抑制は転写レベルのものでないことが明らかになった。一方、NS4A mRNAとp21WAF1 mRNAを用いた試験管内翻訳反応系で、NS4Aはp21WAF1の

翻訳を抑制することが示唆された。

3. NS4A欠失変異体を用いた解析で、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アミノ酸あるいは中央領域18-40アミノ酸は抑制活性を全く示さなかった。この成績より、NS4AのN末端18アミノ酸が翻訳抑制に重要であることが示唆された。

4. NS3とNS4Aを*trans*に共発現させた場合でもCAT活性の抑制がみられたが、NS4A単独による抑制に比べると、その程度は弱かった。また、NS3/NS4A部位で分子内切断されるポリ蛋白を*cis*に発現させた場合には、*trans*に共発現させた場合と同様に、弱い抑制作用が認められるのみであった。一方、NS3/NS4A部位で分子内切断できない変異体ポリ蛋白を発現させた場合には、より強いCAT活性の抑制がみられた。

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が、HCVにおいても同様に、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。

以上、本研究は、C型肝炎ウイルス蛋白の転写と翻訳に及ぼす影響について解析したものであるが、従来ほとんど行われていなかったNS4Aの翻訳抑制とそれに必要な責任領域の同定ならびにNS3をはじめとする他のC型肝炎ウイルス蛋白の影響を明らかにしたものであり、HCVについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。