



Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that impair p53 interaction and anti-apoptotic activity of NS3

田中, 基文

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3576

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003576>

※ 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。



【 97 】

氏 名・（本 籍） 田中 基文 （ 徳島県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1719号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that
impair p53 interaction and anti-apoptotic activity
of NS3

（C型肝炎ウイルス蛋白 NS3 の p53 相互作用活性と
抗アポトーシス活性を阻害する NS3 の点変異について）

審 査 委 員

主 査 教 授 山村 博平
教 授 横崎 宏
教 授 東 健

<緒言>

C型肝炎ウイルス（HCV）は、1989年に非A非B型肝炎の原因ウイルスとして同定され、現在全世界で1.7億人の感染者がいると推定されている。感染すると高率に慢性化し、肝硬変、さらには肝細胞癌を引き起こすことが知られている。ウイルス遺伝子は、全長9.6kbのプラス一本鎖RNAからなり、約3000アミノ酸からなるポリプロテインをコードしている。ポリプロテインは、宿主のシグナルペプチダーゼおよびウイルスがコードする2つのプロテアーゼにより切断され、成熟ウイルス蛋白として4つの構造蛋白（core, E1, E2, p7）と6つの非構造蛋白（NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B）が産生される。

非構造蛋白の1つであるNS3は多機能蛋白であり、アミノ末端1/3領域はキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を有してNS3-5Bポリプロテインの切断を担い、またカルボキシ末端領域はRNAヘリケース活性を有することが知られている。さらに細胞の癌化における関与も示唆されており、NS3がNIH3T3細胞やラットの線維芽細胞の悪性形質転換を引き起こすことや、NIH3T3細胞のアポトーシスを抑制するといった報告がなされている。

一方、p53は癌抑制蛋白としてDNA損傷によるアポトーシスや細胞周期調節の鍵となる分子であるが、いくつかの癌ウイルス（ヒトパピローマウイルス、アデノウイルス、SV40、ヒトB型肝炎ウイルス）では、ウイルス蛋白によるp53機能抑制が起きていることが知られている。HCVにおいて

も、NS3がアミノ末端領域で野生型p53と結合して核内に移行し、またNS3がp53依存性のp21^{waf1}転写活性を抑制するといった報告があり、癌化のメカニズムを探る上でp53に及ぼす影響が注目されている。今回我々は、以前同定したp53と相互作用するNS3アミノ末端領域において、鍵となるアミノ酸を同定し、さらにそのアミノ酸の変異によって、NS3のもつ抗アポトーシス活性およびセリンプロテアーゼ活性が抑制されることを発見したので報告する。

<材料と方法>

1. 発現プラスミドの構築および一過性蛋白発現

全長NS3(NS3-full)およびアミノ末端領域における種々の欠失変異体、点変異体の発現プラスミドを作製した。100アミノ酸以下の短い欠失変異体の場合はGST融合蛋白とした。また野生型p53および変異型p53発現プラスミド、免疫沈降実験のネガティブコントロールとしてのNS4B発現プラスミド、プロテアーゼ活性測定の基質としてのNS5A/5BΔC発現プラスミドをそれぞれ作製した。これらのプラスミドをHeLa細胞またはHuh7細胞に導入し、一晚インキュベートした後、以下の実験に用いた。

2. 免疫沈降

種々のNS3変異体またはNS4Bをp53と一過性共発現させたHeLa細胞

から溶解バッファーにて発現蛋白を抽出し、抗p53抗体にて免疫沈降を行ない、ウェスタンブロット法にてp53との結合の有無をみた。

3. 免疫蛍光染色

NS3変異体とp53遺伝子を導入したHuh 7細胞を固定後、NS3とp53を蛍光抗体により二重染色し、それぞれの細胞内局在をみた。

4. NS3構成的発現細胞株の樹立

NS3変異体の遺伝子を G418 耐性遺伝子とともにNIH3T3細胞に導入し、G418にて発現細胞をセレクションし、2週間後にコロニーを単離した。クローナルバリエーションを避けるために、NS3変異体ごとに発現クローンを5株ずつ得、それらを混合したものを用いた。

5. 細胞生存率の測定

NS3構成的発現細胞株をアクチノマイシンD（10 ng/ml）で処理し、72 時間後に WST-I 法にて細胞数を測定し、細胞生存率を算出した。

6. プロテアーゼ活性の測定

HeLa 細胞に変異NS3および基質としてのNS5A/5BΔCを一過性共発現させ、NS3プロテアーゼによる切断産物であるNS5Aをウェスタンブロット法により定量化し、変異NS3ごとにプロテアーゼ活性を算出した。

<結果>

1. NS3のp53結合領域として aa 41-45, aa 106-110, aa 156-160 の3カ

所存在することが分かった。なお、NS4Bではp53との結合は見られず、NS3のp53との結合は特異的なものであると考えられた。

2. 上記の3領域を別個に含む60~80アミノ酸の3つのNS3欠失変異体において、それぞれアラニン (A) への単独点変異を導入して解析したところ、

F43A, L106A, V158A の変異によりp53と結合しなくなった。

3. さらに長い領域としての NS3/1-180 および NS3-full に上記の3アミノ酸変異 (F43A, L106A, V158A) による影響をみたところ、

L106A 変異によりp53との結合が著明に減弱した。F43A 変異ではその影響は限定的であり、V158A 変異では変化がなかった。なお、細胞質に局限する変異型p53を用いた場合にも、同様の結果が得られた。

4. 免疫蛍光染色では、NS3/1-180, NS3-full はそれぞれp53との共発現により完全に核内に移行するが、それらの L106A 単独点変異体ではp53共発現によるNS3の核内移行はみられず、細胞質に局限した。

5. アクチノマイシンDによるアポトーシスの解析では、NS3/1-180 発現細胞は対照細胞に比べてアポトーシスが有意に抑制された。一方、

NS3/1-180/L106A 発現細胞ではNS3の抗アポトーシス活性が有意に抑制された。

6. NS3のセリンプロテアーゼ活性は L106A, F43A の点変異により著明に抑制された。

＜考察＞

今回の研究では、HCVのNS3-fullおよびアミノ末端領域（NS3/1-180）において、アラニンへの点変異によりp53との結合が阻害されるアミノ酸（Leu¹⁰⁶, Phe⁴³）を同定した。我々は以前、NS3におけるアミノ末端側146アミノ酸（aa 29-174）がp53と相互作用し、NS3のアミノ末端2/3領域（aa 1-433）がアクチノマイシン依存性アポトーシスを抑制すること、またNS3アミノ末端120アミノ酸（aa 1-120）の二次構造の多様性が、HCV感染患者における発癌のリスクと関連があることを報告しており、これらのことから、NS3のアミノ末端領域がHCVの癌原性において重要な役割を担っていると考えられた。今回は、NS3のさらに短い領域（aa 1-180）においても同様にアポトーシスが抑制された一方で、L106A点変異を加えるとNS3の抗アポトーシス活性が有意に阻害されることが明らかとなった。これはL106A点変異によりp53との結合が著明に抑制されたことに起因すると考えられ、Leu¹⁰⁶はNS3アミノ末端領域のなかでも癌原性の鍵となるアミノ酸のひとつである可能性が示唆された。

細胞の悪性形質転換においてアポトーシスの阻害は必須であるが、細胞内で起こる他の出来事も必要であろう。実際、NS3アミノ末端2/3領域やNS3/1-180を安定発現するNIH3T3細胞において、アポトーシスの抑制はみられたものの、典型的な悪性形質は表さなかった。これは、NS3アミノ末端領域発現NIH3T3細胞が悪性形質転換をきたしたとする他グループの報告

とは異なるが、この違いはNS3の配列や発現レベル、細胞の性格などの違いによるものかもしれない。HCVによる発癌のメカニズムを完全に理解するにはさらなる研究が必要であろう。

L106AとF43A点変異はNS3のプロテアーゼ活性も抑制した。NS3のプロテアーゼ領域の結晶構造解析によると、43位と106位の残基は3つのプロテアーゼ活性中心の1つである139位のセリンに立体的に近接している。このことが、NS3におけるp53結合とプロテアーゼ活性という関連のない2つの性質が単一点変異により阻害されたことの原因であると推測された。実際、我々が調べた200株のHCV臨床分離株にはこれらの変異を認めなかったが、そのような変異を有する株は、複製に必須の酵素活性の低下によって十分複製できずに排除されたためではないかと考えられた。

以上の結果より、NS3の106位あるいは43位の残基を特異的に阻害する低分子化合物が、HCVの腫瘍原性と複製能力の両面にわたり阻害す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1721号	氏 名	田中 基文
論文題目 Title of Dissertation	Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that impair p53 interaction and anti-apoptotic activity of NS3 C型肝炎ウイルス蛋白 NS3 の p53 相互作用活性と 抗アポトーシス活性を阻害する NS3 の点変異について		
審査委員 Examiner	主 査 山 村 博 平 Chief Examiner 副 査 横 崎 宏 Vice-examiner 副 査 栗 健 Vice-examiner		
審査終了日	平成 18 年 2 月 16 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

<p>C型肝炎ウイルス(HCV)は、1989年に非A非B型肝炎の原因ウイルスとして同定され、現在全世界で約1.7億人の感染者がいると推定されている。感染により高率に慢性化し、肝硬変や肝癌を引き起こす。ウイルス遺伝子は全長9.6kbのプラス一本鎖RNAからなり、約3000アミノ酸からなるポリプロテインをコードしている。ポリプロテインは、宿主のシグナルペプチダーゼおよびウイルスがコードする2つのプロテアーゼにより切断され、成熟ウイルス蛋白として3つの構造蛋白(core, E1, E2)と少なくとも6つの非構造蛋白(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)が産生される。</p> <p>HCVの発癌メカニズムの詳細は未だ明らかではないが、HCVによるアポトーシスの阻害や種々の細胞内シグナル伝達の攪乱が重要な役割を果たしていると考えられる。これまでにいくつかのHCV蛋白の関与についての研究がなされているが、なかでも、NS3においてはNIH3T3細胞やラットの線維芽細胞の悪性形質転換を引き起こすことや、NIH3T3細胞のアポトーシスを抑制するといった報告がある。NS3は本来セリンプロテアーゼ活性およびRNAヘリカーゼ活性というウイルス複製に必須の機能を有する蛋白であるが、このように細胞の癌化における関与も示唆されている。</p> <p>一方、p53は癌抑制蛋白としてDNA損傷によるアポトーシスや細胞周期調節の鍵となる分子であるが、いくつかの癌ウイルス(ヒトパピローマウイルス、アデノウイルス、SV40、ヒトB型肝炎ウイルス)では、ウイルス蛋白によるp53機能抑制が起きていることが知られている。HCVにおいても、NS3がアミノ末端領域で野生型p53と会合して核内に移行し、またNS3がp53依存性のp21^{waf1}転写活性を抑制するといった報告があり、癌化のメカニズムを探る上でp53に及ぼすNS3の影響が注目されている。</p> <p>これまでに、NS3のp53結合部位はアミノ末端側180アミノ酸に存在することが明らかとなっているが、これをより狭い領域に絞り込むことが出来れば、NS3のp53への結合およびその機能阻害作用を阻止する低分子化合物を作製することが可能になると考えられる。そこで本研究では、NS3のp53結合部位をより詳細に解析し、さらに、そのp53結合部位の変異が細胞のアポトーシスにどのような影響を及ぼすかを調べ、NS3の病眼的意義について検討した。</p>
--

まず、種々の NS3 欠失変異体および野生型 p53 を培養細胞に発現させ、免疫沈降法により両者の結合の有無をみたところ、NS3 における p53 結合領域が 3 カ所同定され、さらにアラニンへの単一点変異体を用いた解析により、それぞれ Phe ⁴³ 、Leu ¹⁰⁶ 、Val ¹⁶⁸ が結合に関与していることが明らかになった。なかでも Leu ¹⁰⁶ のアラニンへの変異 (L106A) により、NS3 アミノ末端 180 アミノ酸および全長 NS3 の p53 との結合が著明に抑制された。他の 2 つの部位のアラニンへの変異 (F43A, V158A) では、その抑制の程度は軽度であった。免疫蛍光染色による NS3 の局在観察においては、野生株 NS3 でみられる p53 との核内共局在が L106A 変異により全く認められなくなった。以上より NS3 の p53 結合部位として Leu ¹⁰⁶ が最も有力であると考えられた。
次に、野生型および変異型の NS3 を構成的に発現する NIH3T3 細胞および非発現対照細胞を作製し、L106A 変異の有無によりアクチノマイシン D 誘導性アポトーシスに相違があるか否かについて調べた。野生型 NS3 発現細胞では、以前の報告と同様に、対照細胞に比べてアポトーシスは有意に抑制されたが、L106A 変異 NS3 発現細胞ではアポトーシスの抑制は認められなかった。すなわち、L106A 変異により NS3 と p53 の結合が減弱したために、NS3 の有する p53 機能抑制作用が消失したと考えられた。
また NS3 セリンプロテアーゼ活性も L106A および F43A 変異によって有意に抑制されることがわかった。p53 結合能とプロテアーゼ活性という NS3 の 2 つの機能が単一点変異により抑制される理由として、Leu ¹⁰⁶ および Phe ⁴³ がプロテアーゼ活性中心である Ser ¹³⁹ に立体構造的に近接しているということが考えられた。
以上、本研究は、C 型肝炎ウイルス蛋白 NS3 の p53 結合部位を単一アミノ酸レベルで同定し、かつその変異により NS3 の抗アポトーシス活性が減弱することを明らかにしたものである。また、変異により NS3 のプロテアーゼ活性も同時に抑制されるという興味深い結果が得られた。このアミノ酸あるいはその近傍領域に特異的に作用する低分子化合物の作製により、ウイルスの腫瘍原性および複製能の両面にわたって抑制する可能性を示したという点で、医学的に価値ある研究であると考えられる。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。