



Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis

野村, 有紀

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-06-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2953

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002953>

※ 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。



氏 名 野村 有紀
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博ろ第 2015 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付 平成 19 年 6 月 13 日

【 学位論文題目 】

Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates onmitochondria and renders the cells prone to undergoingmitochondria-mediated apoptosis (C 型肝炎ウイルス NS4A のミトコンドリア集積とそれを介したアポトーシスの誘導)

審 査 委 員

主 査 教 授 横崎 宏
教 授 寺島 俊雄
教 授 東 健

C型肝炎ウイルス (HCV) は、主に血液を介してヒトに感染し、肝炎を引き起こすが、その多くは慢性化して、10~20年という長い経過をへた後に肝硬変、肝癌などを発症することが知られている。HCV 感染は宿主の免疫反応による細胞傷害だけでなく、肝細胞に感染することでアポトーシスおよびネクローシスを引き起こし、肝機能障害を引き起こすと考えられているが、その詳細なメカニズムについては、未だに不明な点が多く、それぞれのタンパク質の機能解析が重要であると考えられる。そこで、我々は非構造タンパク質の一つである NS4A についてその動態を解析した。

HCV の遺伝子構造は、およそ 9,600 塩基の 1 本鎖 RNA から成り立っており、発現するタンパク質は N 末端側に主にウイルス粒子を構成する構造タンパク質、その下流にウイルスゲノムの複製やプロセシングに必要な非構造タンパク質がコードされている。非構造タンパク質の一つである NS4A は 54 アミノ酸からなるタンパク質で、NS3 と複合体を形成し、プロテアーゼ活性のコファクターとして機能することが知られている。他にも HCV の他のタンパク質とも複合体を形成することによって RNA 複製複合体を小胞体へ引き寄せる役割を果たしていることが明らかとなってきた。しかし NS4A 単独での機能については詳細が不明のままであった。

本研究では NS4A を肝癌由来の細胞である Huh7 細胞に単独発現させたところ、NS4A は核周囲にリング状の局在を示した。ミトコンドリア、ゴルジ体および、小胞体のオルガネラマークターを用いた二重染色によって、ミトコンドリアと一致して染色される像が認められた。さらに電子顕微鏡観察にて NS4A はミトコンドリア表面および内部に分布している様子が認められた。細胞分画にても NS4A を単独発現させた細胞と、レブリコン導入細胞 (HCV の RNA ゲノムの一部が細胞内で自己複製される細胞系) のいずれの細胞系においても、小胞体だけではなくミトコンドリアにも NS4A が局在していることが分かった。一方、他の HCV タンパク質である Core、NS4B、NS5A についてはミトコンドリアと一部局在が一致したが、ミトコンドリアの分布と局在が完全に一致し、ミトコンドリア自身の分布を核周囲に変化させている像は、NS4A だけで認められた。さらにこうした NS4A の動態が、細胞にとってどのような影響を及ぼすのかの解析を行った。

NS4A がミトコンドリアの細胞内分布と一致することから、ミトコンドリア膜に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。Rho123 によるミトコンドリア膜電位の解析により、NS4A を発現させた細胞においては、スタウロスボリンでアポトーシスを誘導させた細胞と同様に、ミトコンドリア膜電位の有意な低下が認められた。またミトコンドリア膜電位の崩壊に伴ってミトコンドリア内膜に存在するチトクロム C が細胞質全体に放出されることが、免疫染色によって明らかとなった。他の HCV タンパク質ではごく一部の細胞にチトクロム C 放出が認められるだけなのに対して、NS4A およびその N 末端領域のペプチドを発現させた細胞において、約 80% の細胞でチトクロム C 放出像が認められた。このことから、NS4A がミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。アポトーシスは Fas/TNF α 受容体を介した経路と、ミトコンドリアを介した経路の 2 つの経路から成り立っていることが知られている。前者は Caspase-8 の活性化によって誘導されるが、後者はミトコンドリアからのチトクロム C 放出に引き続き Apaf-1 や procaspase-9 などを含むアポトゾームと呼

ばれる構造体を誘導することで、最終的に Caspase-3 の活性化を惹き起こしアポトーシスを誘導する。ここで、NS4A によってアポトーシスが誘導されているとすれば、チトクロム C の放出に統いて、アポトゾームの活性化、さらに、Caspase-3 の活性化が生じることが知られている。

本研究では NS4A 発現細胞において核染色を行ったところ、スタウロスボリンでアポトーシス誘導した細胞に見られる核の断片化と同様の像が認められた。さらに Caspase-8 の活性化ではなく Caspase-3 の活性化が認められ、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導が示唆された。また NS3 を同時に発現させるとアポトーシス作用が一部抑制される傾向があった。細胞レベルで見たところ、Huh 7 細胞に NS4A を単独発現させると細胞死が誘発された。一方で、他の HCV タンパク質を発現した細胞や、NS3 を NS4A と共に発現させると細胞死は生じにくいことがわかった。以上から NS4A はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導する一方で他のタンパク質が共存すると NS4A のアポトーシス作用が抑制されることが示唆された。またレブリコン導入細胞では、単独発現系に比べて、より HCV 自然感染に近い条件下であると考えられるが、アクチノマイシン D 投与によって細胞死が生じやすいことが我々の研究で示された。ここで、アクチノマイシン D に対する感受性が高い原因の 1 つとして、NS4A によるミトコンドリア膜電位の不安定性が関与している可能性が考えられる。

我々の研究から NS4A 発現細胞にて、アポトーシス誘導が生じやすい状況が生じることが示されたが、HCV 感染によって認められる細胞傷害に何らかの関与がある可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2017 号	氏名	野村 有紀
論文題目 Title of Dissertation	<p>Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis</p> <p>C型肝炎ウイルスNS4Aのミトコンドリア集積とそれを介したアポトーシスの誘導</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 横崎 宏</p> <p>副査 Vice-examiner 寺島 俊雄</p> <p>副査 Vice-examiner 栗 健</p>		
審査終了日	平成 19 年 5 月 16 日		

(要旨は 1000字～2000字程度)

C型肝炎ウイルス (HCV) は、主に血液を介してヒトに感染し、肝炎を引き起こすが、その多くは慢性化して、長い経過をへた後に肝硬変、肝癌などを発症することが知られている。HCV 感染は宿主の免疫反応による細胞傷害だけでなく、肝細胞に感染することでアポトーシスおよびネクローシスを引き起こし、肝機能障害を引き起こすと考えられているが、その詳細なメカニズムについては、未だに不明な点が多く、それぞれのタンパク質の機能解析が重要であると考えられる。そこで、申請者は、非構造タンパク質の一つである NS4A についてその動態を解析した。

NS4A を肝癌由来細胞である Huh7 細胞に単独発現させたところ、NS4A は核周囲にリング状の局在を示し、オルガネラマーカーを用いた二重染色によって、ミトコンドリアと一致して染色される像が認められた。さらに電子顕微鏡観察および細胞分画法にて、NS4A 単独発現細胞とレプリコン導入細胞 (HCV の RNA ゲノムの一部が細胞内で自己複製される細胞系) のいずれの細胞系においても、小胞体だけでなくミトコンドリアにも NS4A が局在していることが分かった。さらに NS4A 単独発現細胞では、ミトコンドリア自身の分布を核周囲に変化させている像が認められた。次にこうした NS4A の動態が、細胞にとってどのような影響を及ぼすのかの解析を行った。

NS4A がミトコンドリアの細胞内分布と一致することから、ミトコンドリア膜に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。Rho123 によるミトコンドリア膜電位の解析により、NS4A 発現細胞においては、スタウロスボリンでアポトーシスを誘導させた細胞と同様に、ミトコンドリア膜電位の有意な低下が認められた。またミトコンドリア膜電位の崩壊に伴ってミトコンドリア内膜に存在するチトクロム C が細胞質全体に放出されることが、免疫染色によって明らかとなった。他の HCV タンパク質ではごく一部の細胞にチトクロム C 放出が認められるだけなのに対して、NS4A およびその N 末端領域のペプチドを発現させた細胞において、約 80% の細胞でチトクロム C 放出像が認められた。このことから、NS4A がミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。続いて NS4A 発現細胞において核染色を行ったところ、スタ

ウロスボリンでアポトーシス誘導した細胞に見られる核の断片化と同様の像が認められた。さらに Caspase-8 の活性化ではなく Caspase-3 の活性化が認められ、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導が示唆された。さらに細胞レベルで見たところ、Huh 7 細胞に NS4A を発現させると細胞死が誘発された。

一方、NS3 を NS4A と共に発現させた場合や他の HCV タンパク質を発現するレプリコン導入細胞では、そのままでは細胞死は生じにくいが、ごく軽度のアポトーシス誘発刺激（低濃度アクチノマイシン D 处理）により、強いアポトーシスが誘導されることが明らかになった。ここで、アクチノマイシン D に対する感受性が高い原因の 1 つとして、NS4A によるミトコンドリア膜電位の不安定性が関与している可能性が考えられる。

以上、本研究は、NS4A 発現によって、アポトーシス誘導が生じやすい状況が生じることを示し、HCV 感染による肝細胞障害及びミトコンドリア障害のメカニズムを考える上で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。