

論文の内容の要旨

論文題目 C型肝炎ウイルス コア蛋白質による宿主細胞の核内輸送系の攪乱

氏名 村山 麻子

序論

C型肝炎は肝硬変や肝細胞癌といった重篤な症状に進行するウイルス性肝炎であり、その病原体はC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) である。HCVはフラビウイルス科に属し、約9500塩基からなる一本のプラス鎖RNAをゲノムとして持ち、そのRNAは約3000アミノ酸からなる一つの蛋白質前駆体をコードしている。この前駆体は宿主のシグナルペプチダーゼおよびウイルスのプロテアーゼにより切断されて、少なくとも10個のHCV蛋白質が作り出される。HCVのコア蛋白質はウイルス粒子構成成分であり、そのN末端側に3つの核移行シグナル (NLS) 様配列を持つ。また、C末端側には疎水性アミノ酸に富んだ領域を持ち、前駆体蛋白質の合成の際に小胞体 (ER) へ運ばれ、ER膜上で宿主のシグナルペプチダーゼにより前駆体から切り離される。さらに、ER膜上で宿主のシグナルペプチドペプチダーゼによりC末端側の膜貫通領域の内部で切断され、成熟したコア蛋白質 (p21) となる。コア蛋白質を動物細胞で発現させると、細胞質に網状に局在することから、ERに局在化していると考えられている。また、HCVコア蛋白質は出芽酵母内でも動物細胞内と同様の局在を示すため、動物細胞内と核-細胞質間輸送系が類似している出芽酵母をモデル系として用いた分子遺伝学的研究が行われ、C末端領域を欠損させたコア蛋白質は出芽酵母内では核内輸送受容体の一つであるKap123pにより核内輸送されることが明らかとなっている。また、出芽酵母の転写因子の一つであるYap1pの核内輸送をHCVコア蛋白質が阻害することも明らかとなっており、出芽酵母内では、HCVコア蛋白質が核-細胞質間輸送を乱していることが示唆された。そのことから、動物細胞内でもコア蛋白質は同様の核内輸送阻害を起こすことが予想された。そ

ここで本研究では、動物細胞内でコア蛋白質が宿主細胞の核-細胞質間輸送に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、コア蛋白質内部に存在する NLS 様配列に着目して、コア蛋白質と核-細胞質間輸送受容体との相互作用を検討した。

C型肝炎ウイルス コア蛋白質 (C 末端欠損変異体) の核内輸送に必要な領域の決定

HCV コア蛋白質の N 末端に存在する 3 つの塩基性アミノ酸に富んだ NLS 様配列のうち、核内輸送を担うのはどの領域なのかを調べるために、動物細胞内で C 末端領域欠損コア蛋白質および、各 NLS 様配列欠損コア蛋白質を EGFP に融合して発現させ、その局在を観察した (Fig. 1)。

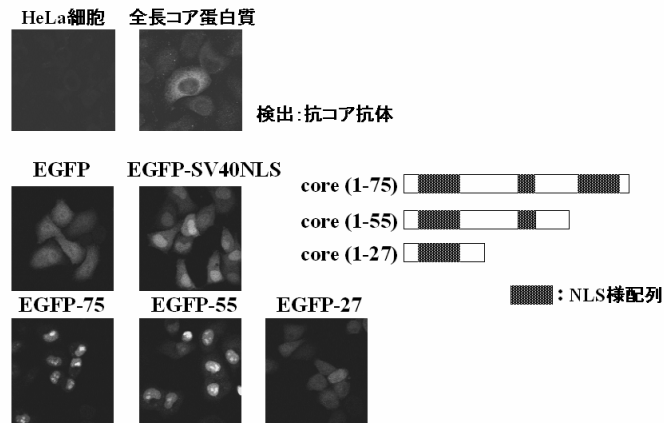


Fig. 1 EGFP融合 HCV コア蛋白質 (C 末端欠損変異体) の細胞内局在

その結果、3 つの NLS 様配列のうち、少なくとも 2 つがあれば核局在するが、NLS 様配列が一つだけでは NLS として機能しないことが明らかとなった。

C型肝炎ウイルス コア蛋白質の N 末端領域核内輸送受容体との結合

一般に、分子の細胞質から核内への輸送、すなわち核内輸送は、NLS を持つ分子が細胞質において核内輸送受容体に結合し、その受容体との複合体として核内に運ばれる過程である。動物細胞において、核-細胞質間輸送受容体は Importin β ファミリー核-細胞質間輸送受容体と、Importin β とヘテロダイマーを形成して機能する Importin α ファミリー核-細胞質間輸送受容体が知られている。そのうち、核内輸送に関わる可能性がある Importin β ファミリー核-細胞質間輸送受容体と Importin α ファミリー核-細胞質間輸送受容体について、293 細胞でそれぞれの受容体に FLAG タグを付加して強制発現させた細胞抽出液と GST 融合 HCV コア蛋白質 C 末端領域欠損変異体 (GST-core75) を用いた GST pull down assay を行った (Fig. 2)。

その結果、すべての Importin α ファミリー核-細胞質間輸送受容体と、いくつかの Importin β ファミリー核-細胞質間輸送受容体が GST-core75 に結合することが明らかとなった。HeLa 細

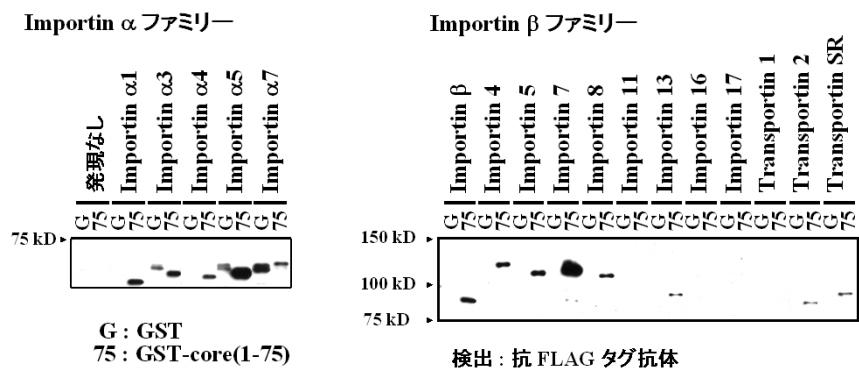


Fig. 2 HCV コア蛋白質 N 末端領域と結合する核-細胞質間輸送受容体の探索 (GST-pull down assay)

胞 S100 ライセートを用いて GST pull down assay を行った結果、GST-core75 は内在の核内輸送受容体にも結合することが明らかになった。また、核移行能のある core75、core55 は内在の核内輸送受容体に結合したが、核移行能を失った core27 は核内輸送受容体との結合能も失っていた。精製した Importin α および Importin β と GST-core75 を用いた GST pull down assay を行った結果、HCV コア蛋白質 N 末端領域と核内輸送受容体は直接結合することが明らかになった。

C 型肝炎ウイルス コア蛋白質の N 末端領域による古典的 NLS の核内輸送阻害

Importin α /Importin β ヘテロダイマーにより核内輸送される NLS として、SV40 ラージ T 抗原の NLS に代表される塩基性アミノ酸に富んだ古典的 NLS が知られている。

コア蛋白質の N 末端領域が Importin α 、Importin β とともに結合することから、コア蛋白質の N 末端領域が古典的 NLS の核内輸送に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、SV40 ラージ T 抗原の NLS を輸送基質として用いたトランスポートアッセイを行い、コア蛋白質による影響を観察した (Fig. 3)。その結果、GST-core75 を加えた場合のみ、核内に蓄積する GST-NLS-GFP が減少した。これは、GST-core75 存在下でのみ GST-NLS-GFP の核内輸送が阻害されたことを意味している。

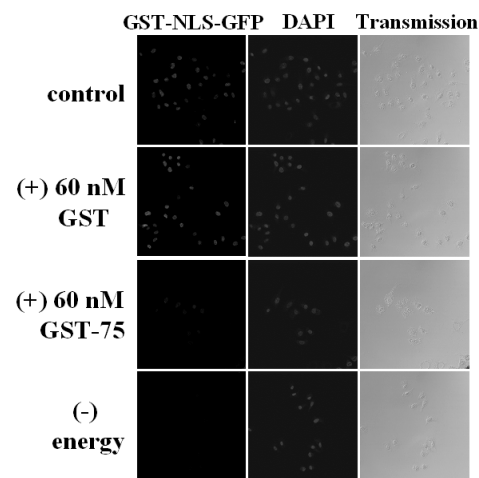


Fig. 3 セミンタクト細胞を用いた HCV コア蛋白質による古典的 NLS の核内輸送の阻害の観察

C 型肝炎ウイルス コア蛋白質の N 末端領域は古典的 NLS と核内輸送受容体との結合を阻害する

トランスポートアッセイにおいて観察された HCV コア蛋白質の N 末端領域による古典的 NLS の核内輸送の阻害のメカニズムを明らかにするために、*in vitro* における核内輸送受容体と古典的 NLS との結合を HCV コア蛋白質の N 末端領域が阻害するか検討した (Fig. 4A)。GST を加えても、結合する GST-NLS-GFP の量に変化は見られなかったが、

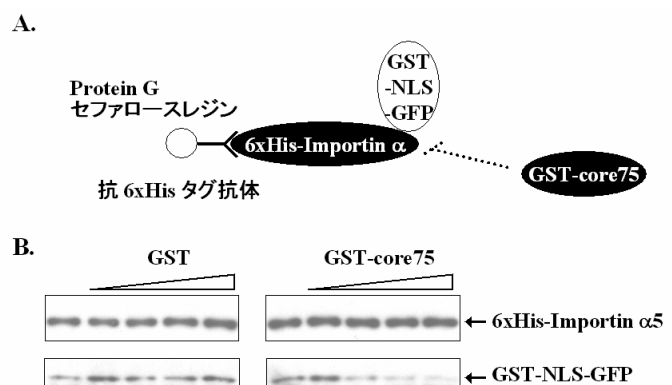


Fig. 4 古典的 NLS と核内輸送受容体の *in vitro* における結合を HCV コア蛋白質の N 末端領域が阻害する

HCV コア蛋白質の N 末端領域存在下では、濃度依存的に古典的 NLS と核内輸送受容体の結合が阻害された (Fig. 4B)。以上の結果より、HCV コア蛋白質の N 末端領域による古典的 NLS の核内輸送の阻害は、HCV コア蛋白質により古典的 NLS と核内輸送受容体の結合が阻害された結果起こることが示唆された。

C 型肝炎ウイルス コア蛋白質による宿主蛋白質の核内輸送阻害のモデル

通常の細胞内では、蛋白質は、あるものは恒常的に、あるものは細胞内シグナルに反応して、細胞質に豊富に存在する核内輸送受容体を利用して核内に輸送され、そこで機能を発揮することで、細胞の代謝機能を正常に保っている。しかし、コア蛋白質が存在すると、

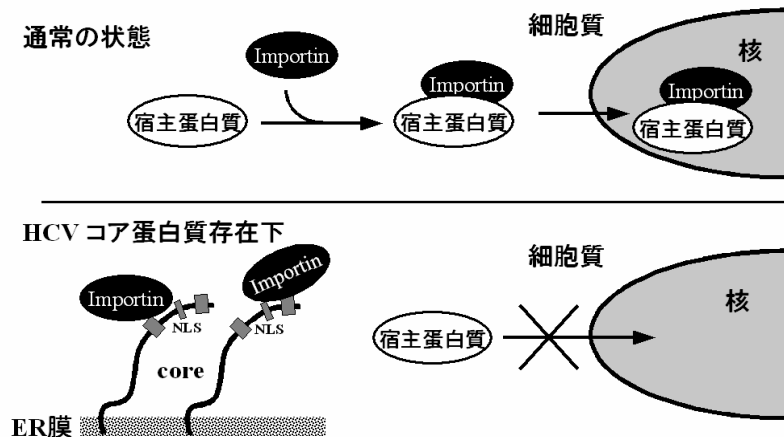


Fig. 5 HCV コア蛋白質による宿主細胞蛋白質の核内輸送阻害のモデル

一部の核-細胞質間輸送受容体は ER 膜上に局在しているコア蛋白質と、その N 末端領域に存在する NLS 様配列を介して結合すると考えられる (Fig. 5)。つまり、細胞質に可溶性成分として存在する核-細胞質間輸送受容体の絶対量が減少し、様々な蛋白質の核内輸送の効率が低下すると考えられる。その結果、核局在化が不十分になり、十分に機能を発揮できなくなる蛋白質が出てくることが考えられる。つまり、このようなコア蛋白質による核内輸送系の攪乱が、HCV 感染による細胞障害性や、その後の病原性発現の原因の一端を担っていると考えられる。

結論

1. HCV コア蛋白質の N 末端領域には 3 つの NLS 様配列があるが、実際に核内輸送が行われるためにはそのうちの少なくとも 2 つが必要であった。
2. 核移行能を持つ HCV コア蛋白質の N 末端領域と結合する動物細胞内の核-細胞質間輸送受容体を探索したところ、Importin α 、Importin β を始めとして多くの核-細胞質間輸送受容体と結合した。
3. 核移行能を持つ HCV コア蛋白質の N 末端領域は内在の核内輸送受容体とも結合した。
4. HCV コア蛋白質の N 末端領域 NLS 様配列欠損変異体の核移行能は核-細胞質間輸送受容体との結合能と一致していた。核移行能を持つ HCV コア蛋白質の N 末端領域と核内輸送受容体との結合は直接結合であった。
6. 核移行能を持つ HCV コア蛋白質の N 末端領域は古典的 NLS の核内輸送を阻害した。
7. 核移行能を持つ HCV コア蛋白質の N 末端領域は古典的 NLS と核内輸送受容体と

の結合を阻害した。

8. 実際の細胞内では HCV コア蛋白質は ER 膜上に局在しているため、核内輸送受容体の一部を ER 膜上に保持し、量を減少させることで、宿主細胞内の核内輸送系を攪乱していると考えられる。