RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant Hepatitis C Virus NS5B protein truncated at the C-terminal region

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/15432

学位授与番号	医博甲第1325号
学位授与年月日	平成10年6月30日
氏名	山下竜也
学位論文題目	RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated the C-termanal region
論文審査委員	主査 教授 福田龍二
	副査 教授 山本博
	教授 原田文夫

内容の要旨及び審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス（以下HCV）のポリペプチドの最もC末端に位置するNS5B蛋白には他のウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼ（以下RdRP）に共通するモチーフである“GDD”モチーフが存在するため，ウイルス複製酵素であるRdRPをコードすると考えられ，近年昆虫細胞発現系を用いその活性が証明された。今回大腸菌発現系を用い活性を保持するNS5B蛋白を精製しその生化学的特性と細胞内局在性を検討した。

大腸菌発現系にはグルタチオンーSートランスフェラーゼ（以下GST）発現系，および培養細胞発現系を用いた。RdRP活性の測定にはpoly(A)を鋳型，oligo(U)$_{14}$をプライマーとしてUMPの取り込みを測定する方法を用いた。

全長NS5Bは不溶性であるが，アミノ酸配列よりC末端に疎水性でアンカー領域と予測される領域（aa. 2989-3005）を発見し，その部位を含む21アミノ酸を欠損した変異NS5B（以下NS5Bt）を作成し精製することに成功した。精製した分画は9.41pmole/μg/hrの特異活性を示し，相対活性で約10000倍に精製可能であった。この反応はプライマー，および鋳型依存性でDNAもプライマーとして用いることができた。他のポリメラーゼ活性，ターミナルトランスフェラーゼ活性は示さなかった。生化学的特性は以前報告されているものとほぼ同じであった。GDDモチーフの変異，NS5Bt-m1，比較的塩基性アミノ酸の多い部位（aa. 2919-2924，2693-2699）の置換変異，NS5Bt-m2，m3はいずれも活性を示さなかった。試験管内転写により作成したHCV-RNAを用いた検討ではHCV RNA特異性は認められなかった。細胞内局在は全長NS5Bは細胞質核膜周囲に存在するのに対し，NS5Btは核内に特徴的塊状を呈して分布した。アンカー領域の変異NS5Bt-m4も核内局在性を示した。

今回大腸菌発現系を用い，HCV NS5Bにコードされる RdRPの精製法を確立した。その過程でC末端にアンカー領域を発見し，その領域は活性には必須ではなく，培養細胞においてNS5Bを細胞質核膜周囲に留める働きがあることを発見した。NS5Btの生化学的特性は以前報告されたものとほぼ同じであったが，ターミナルトランスフェラーゼ活性は示さなかった。これらの結果はウイルス複製を標的とした抗ウイルス薬の開発に寄与するものと考えられる。

以上，本研究は実体がほとんど解明されていないC型肝炎ウイルスのRNAポリメラーゼの研究に大きく貢献し得る系を開発したものであり，学位に値すると判断された。