

# Hepatitis C Virus(HCV)NS5A Binds RNA-dependent RNA Polymerase(RdRP) NS5B and Modulates RNA-dependent RNA Polymerase Activity

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-04 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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4642">http://hdl.handle.net/2297/4642</a>

## 【総説】

## 第一回 高安賞優秀賞受賞論文

論文 「Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Binds RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP)  
NS5B and Modulates RNA-dependent RNA Polymerase Activity」

THE JOURNAL of BIOLOGICAL CHEMISTRY

Vol.277, No.13, pp.11149-11155

2002年3月掲載

## C型肝炎ウイルス (HCV) NS5AのRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRP) であるNS5Bへの結合能ならびにRdRP活性に対する影響に関する検討

代田 幸博 (しろた ゆきひろ)

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は多くの症例において持続感染となり、慢性肝炎を惹起する。さらに慢性肝炎は肝硬変、肝細胞癌へと進展するため臨床医学において大きな問題となっており、HCV感染機構ならびに複製機構の解明が急務となっている。HCVは約9.5kbの(+)鎖RNAウイルスで、翻訳されたポリ蛋白は宿主とウイルスの蛋白分解酵素によってN末端よりC、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5Bに分解されると考えられている(図1)。NS5BはRNAポリメラーゼに共通したGDDモチーフを有していることよりRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRP) であると考えられ、我々はこれまでC末端に位置する膜結合ドメインを切断することにより可溶性に成功した大腸菌組み替えタンパク質NS5Btを用いた実験によりRdRP活性の特性を*in vitro*の実験系にて明らかにしてきた<sup>1)</sup>。NS5Bの上流に位置するNS5Aは、宿主因子によりリン酸化を受けること<sup>2)</sup>、NS5A内のinterferon sensitivity-determining region (ISDR)と命名された領域の変異が慢性肝炎患者におけるインターフェロン治療の感受性に関与していること<sup>3)</sup>、さらに培養細胞系でのHCV RNA自己複製系の成立にNS5A内の変異、adaptive mutationsが関わっていること<sup>4)</sup>が報告され、NS5AがHCV複製において重要な役割を果たしていることが示唆されている。今回我々はNS5AがHCV複製酵素の一構成因子である可能性を検討するため、複製の中心的酵素、RdRPであるNS5Bとの関係を検討した。

NS5AとNS5Bの結合能を検討するため、両者をそれぞれFLAGとglutathione S-transferase (GST)にて標識した大腸菌組み替えタンパク質として精製し、GST pull-down法にて*in vitro*の系にて検討した。FLAG-NS5AはGST蛋白ではpull-downされなかったがGST-NS5Btによってpull-downされ、NS5Aと

NS5Btが直接的かつ特異的に結合することが明らかとなった(図2)。次に*in vivo*での相互作用を検討するため、C末端側にFLAGを標識したcFLAG-NS5AとGST-NS5BをCOS1細胞に一過性共発現させ、GSTレジンにて共沈し、Western BlottingにてcFLAG-NS5Aを検出した。また結合領域を決定するため、NS5AのNあるいはC末端切断変異体、さらに中抜き変異体を作成し検討した。結果、NS5Aは*in vivo*においてもNS5Bと相互作用し、その結合にはNS5A内の105-162と277-334アミノ酸に渡る両領域がそれぞれ必須であることが明らかとなった(図3、4)。この結合特性はNS5BtとNS5B間で差を認めず、NS5B膜結合領域の切断はNS5Aとの相互作用に影響しないことが示された。さらにN末端側にFLAGを標識したnFLAG-NS5Aを用いた場合も同様の結果であり、NS5Aへの標識は結合特性に影響しないことも明らかとなった。この結合特性は大腸菌組み替えタンパク質を用いたGST pull-down法でも再現され、*in vitro*においても両領域が結合必須領域であることが示された(図2)。興味深いことに今回我々が同定したこの二つの結合必須領域は、これまでNS5Aで報告されている4A結合領域(4ABS)、リン酸化領域、そしてISDRのいずれとも異なる領域であった(図4)。

次に我々はNS5BのRdRP活性に対するNS5Aの影響を検討するため、poly(A) dependent UMP incorporation assayを行った。FLAGあるいはGST標識NS5Aの大腸菌組み替えタンパク質は、この実験を行う上で充分量の精製が困難であったためHis標識NS5Aを用いた。GST pull-down法による検討で、His-NS5Aも同様のNS5B結合特性を有していた。NS5A/NS5Bモル比が0.1以下の場合RdRP活性は20から30%亢進したが、その後モル比を上昇させるにつれて活性は抑制され、モル比が5から10ではほぼ完全に抑制された。この効果はNS5Bへの結合能を失った2つの中抜き変異体では認められず、NS5AのRdRP活性の修飾はNS5AとNS5Bの結合を介した反応であることが明らかとなった(図5)。

今回の検討でNS5AがNS5Bと直接結合すること、その結合にはNS5A内の二つの領域が必要であること、さらにこの結合を介してNS5BのRdRP活性を修飾することが示され、NS5AがHCV複製酵素の一構成因子であることが明らかとなった。この知見に基づいて、NS5AとNS5B以外のウイルスタンパク質との相互作用、宿主因子との関わり、そしてNS5Aリン酸化の

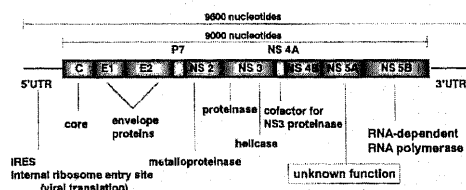
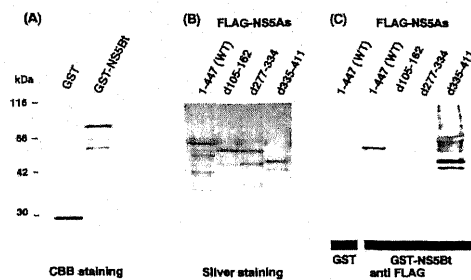
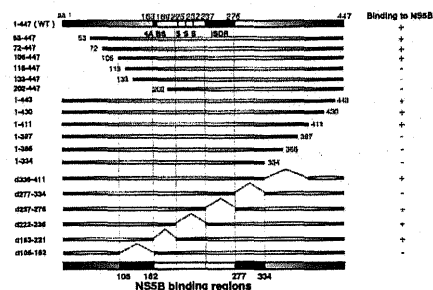


Fig. 1. Schematic representation of HCV structure.



THE JOURNAL of BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.277, No.13, pp 11149-11155 2003 年 掲載  
 Fig. 2. Detection of HCV NS5A and NS5B complexity *in vitro* by GST pull-down assay and mapping of NS5B binding regions on NS5A. A, partially purified bacterial recombinant protein GST (lane 1) and GST-NS5Bt (lane 2) were separated by SDS-10% PAGE and detected by Coomassie Brilliant Blue staining. B, partially purified bacterial recombinant protein FLAG-NS5A wild type (lane 1) and internally deleted mutants, FLAG-NS5A d105-162 (lane 2), d277-334 (lane 3), and d335-411 (lane 4) were separated by SDS-10% PAGE and detected by silver staining. Approximately 0.2  $\mu$ g of FLAG-NS5A wild type and mutants were mixed with 1  $\mu$ g of GST-NS5Bt and pulled down with GST resin after preblocking by 1% bovine serum albumin. After washing with PBST, each bound protein was fractionated by SDS-10% PAGE and subjected to Western blot analysis with anti-FLAG monoclonal antibody (C, lanes 2-5). 0.2  $\mu$ g of FLAG-NS5A wild type was mixed with 1  $\mu$ g of GST after preblocking and then pulled down, fractionated, and detected as GST-NS5Bt (C, lane 1).

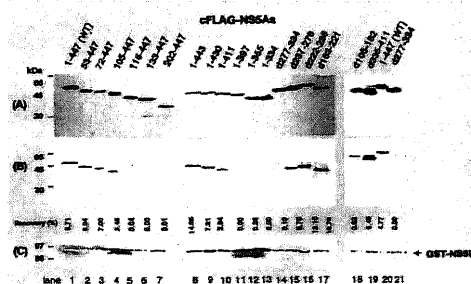


THE JOURNAL of BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.277, No.13, pp 11149-11155 2003 年 掲載  
 Fig. 4. Schematic representation of the amino- or carboxyl-terminally and internally truncated NS5A proteins used for coprecipitation and GST pull-down assay and mapping of NS5B binding regions on NS5A. The thin angled lines indicate internally deleted regions. The results of the binding assay shown in Figs. 1-3 are summarized at the right. 4ABS, S, and ISDR at the top are putative domains previously reported for the NS5A binding site, serine residues essential for hyperphosphorylation, and interferon sensitivity-determining region, respectively. The NS5B binding regions predicted from the results of binding assay both *in vivo* and *in vitro* are indicated by shaded boxes at the bottom.

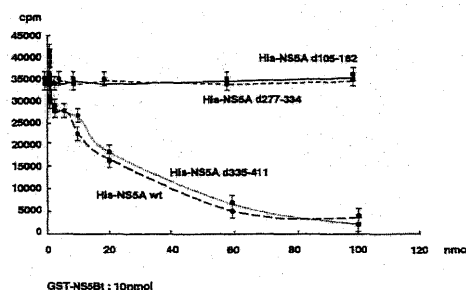
ウイルス複製に対する影響などについて、今後さらなる検討を進めていく必要があると考えられる。

文 献

1) Yamashita T, Kaneko S, Shiota Y, Qin W, Nomura T, Kobayashi K, Murakami S. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the c-terminal region. *J Biol Chem* 273: 15479-15486, 1998



THE JOURNAL of BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.277, No.13, pp 11149-11155 2003 年 掲載  
 Fig. 3. Interaction between NS5A and NS5B proteins *in vivo* and mapping the NS5B binding regions on NS5A. COS1 cells were transiently cotransfected with mammalian expression vectors, cFLAG-NS5As (wild type and amino- or carboxyl-terminally and internally truncated mutants) and pNKGST-NS5B (lanes 1-21). A, total lysates were fractionated by SDS-10% PAGE and subjected to Western blot analysis with anti-FLAG monoclonal antibody (input). B, coprecipitants by GST resin were washed with PBS containing 0.5% Triton X-100, fractionated by SDS-10% PAGE, and detected by Western blot analysis with anti-FLAG antibody (output). Signal intensities of input and output in Western blot analysis were quantified by NIH Image version 1.62 software, and percentages of recovered proteins were calculated. We defined that NS5As interact with NS5B at more than 1% recovery. C, the nitrocellulose membranes used for Western blot analysis of coprecipitants with anti-FLAG antibody were reprobed with anti-GST monoclonal antibody.



THE JOURNAL of BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.277, No.13, pp 11149-11155 2003 年 掲載  
 Fig. 5. His-NS5A modulates the NS5B RdRp activity. 10 nmol of purified GST-NS5Bt in the presence of 0, 0.2, 0.6, 1, 2, 6, 10, 20, 60, and 100 nmol of wild type or internal deletion His-NS5A were examined by poly (A)-dependent UMP incorporation assay. The effect of His-NS5A/d163-221 was similar to that of the wild type His-NS5A (data not shown). Bar, S.E. of three independent experiments. Weak stimulation effects of wild type and mutant NS5A proteins were observed when the molar ratio of His-NS5A to GST-NS5Bt is less than 0.1.

2) Reed K E, Xu J, Rice C M. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein *in vitro* and *in vivo*: properties of the NS5A-associated kinase. *J Virol* 71: 7187-7197, 1997  
 3) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334: 77-81, 1996  
 4) Blight K J, Kolykhalov A A, Rice C M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290: 1972-1975, 2000

Profile

所属  
 金沢大学医学部がん医科学専攻がん制御学がん遺伝子治療学協力研究員  
 (石川済生会金沢病院消化器内科医長)  
 1994年 金沢大学医学部卒業  
 2002年 金沢大学大学院医学系研究科 (内科系専攻内科学第一) 修了  
 現在の専門 (興味を持っている事)  
 臨床: 消化器内科 基礎研究: 肝疾患における遺伝子発現

