Mutational analysis of hepatitis C virus NS5B in the subgenomic replicon cell culture

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/2297/15879

学位授与番号	甲第 1642 号
学位授与年月日	平成 16 年 6 月 30 日
氏　　名	馬　　媛　媛
学位論文題目	Mutational Analysis of Hepatitis C Virus NS5B in the Subgenomic Replicon Cell Culture (サブゲノムレプリコン培養細胞におけるC型肝炎ウイルスNS5Bの変異解析)
論文審査委員	主　査　教　授　福　田　龍　二 副　査　教　授　市　村　　宏 　　教　授　山　本　　博

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）非構造蛋白NS5BはRNA依存性RNAポリメラーゼ（以下RdRp）活性を有し、ウイルス複製の中心酵素である。HCV-JK1株の組換え型NS5Bを用いた *in vitro* RdRP活性測定系を用いた解析で、RdRP酵素間で保存されているモチーフ以外のNS5Bの5残基が、RdRP活性に必須であることが報告されている。これらの残基が、*in vivo*のHCV複製に果たす生物学的役割は不明であった。

本研究では、HCV-M1LE株由来の改良型HCVレプリコンを用い、NS5BのRdRP活性に必須或いは重要である残基のHCV複製への役割を検討し、以下の結果を得た。

1．JK1株でRdRP活性に必須であると同定された5アミノ酸残基は、M1LE株で保存されていた。この5残基の何れかの1残基をアラニンに置換したM1LEレプリコンは、何れも *in vivo* HCV複製が観察されなかった。したがって、この5残基がHCV複製に必須である。

2．JK1由来NS5Bを有するM1LEキメラサブゲノムレプリコンを作成し、HCV複製効率の検討を行なったところ、HCV複製が殆ど観察されないという興味ある結果を得た。

3．各種キメラNS5B、M1LE NS5BのJK1型点置換変異などのM1LEキメラサブゲノムレプリコンを作成し、HCV複製を測定した。その結果、効率的なHCV複製には、M1LE型のaa220とaa280が必須であり、aa213とaa231は重要な影響を与えた。JK1 NS5Bのこれら4残基をM1LEと同じ残基に置換したキメラサブゲノムレプリコンは野性型M1LEレプリコンと同程度のHCV複製効率を示した。

4．各種キメラ或いは点置換変異を導入したNS5Bを大腸菌系で発現精製し、これらの蛋白のRdRP活性を、低濃度下で測定した。その結果、HCV複製の効率とRdRPの活性とは良く相関していた。しかし、弱いRdRP活性を示すJK1などのNS5Bは、in vivoでHCV複製能を全く示さなかった。

5．RdRP活性が弱いJK1などのNS5B蛋白は、野性型M1LEに比較して、低濃度下で高い温度感受性を示した。HCV複製に必須または重要な役割を果たす今回見い出した4残基は、活性ポケット近傍に位置し、酵素活性の安定性に寄与する可能性が示唆された。

これらの結果は、HCV複製にRdRP活性が前提として必要であり、細胞に導入されたサブゲノムレプリコンRNAの複製には、低濃度で高いRdRP活性を発揮するNS5Bが不可欠であることを示唆した。NS5Bの酵素活性とHCV複製の系統的解析から両者の相互関連を明らかにした今回の結果は、HCVの分子生物学の発展に寄与し、またHCV複製を標的とする阻害剤をデザインするために資する新しい知見であり、学位に値する労作と評価された。