

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: 2017-10-05 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/2297/15754

学位授与番号	甲第1546号		
学位授与年月日	平成14年9月30日		
氏名	代田 幸博		
学位論文題目	Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Binds RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP) NS5B and Modulates RNA-dependent RNA Polymerase Activity (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)		
論文審査委員	主査	教授	市村 宏
	副査	教授	福田 龍二
		教授	佐藤 博

内容の要旨及び審査の結果の要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)の非構造タンパク質 NS5A はウイルス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が詳細は明らかでない。今回 NS5A が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、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである NS5B との関係を検討した。NS5A と NS5B の *in vitro* での結合能を検討するため、それぞれを FLAG と 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 法を行った。なお NS5B は C 末端膜結合ドメインを切断し可溶化した NS5Bt を用いた。さらに *in vivo* での結合ならびに結合領域の検討のため、C 末端 FLAG 標識 NS5A 野生体あるいは N 末端、C 末端切断、中抜き変異体と 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 法にて NS5A を検出した。また NS5A に対する FLAG 標識の影響を検討するため N 末端 FLAG 標識 NS5A を用いた検討も行った。更に NS5B の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性に対する 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充分量の精製が困難であったため、この検討には His 標識 NS5A を用いた。得られた結果は以下のように要約される。

1. NS5A と NS5Bt は *in vitro* で直接的かつ特異的に結合する。
2. NS5A と NS5B は *in vivo* においても相互作用する。
3. *in vivo*, *in vitro* ともに両者の結合には NS5A 内の 105-162 と 277-334 アミノ酸領域が必須である。
4. 両者の相互作用は NS5Bt と NS5B 間で差はなく、NS5A に対する標識も影響しない。
5. NS5A は NS5B の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を修飾し、この修飾は両蛋白の結合を介した反応である。

以上より、NS5A が二つの領域を介して NS5B と直接結合し RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ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。

本研究は、C型肝炎ウイルス複製機構を説明する新しい知見であり、学位に値すると判断された。