





学位論文審査の結果の要旨

平成25年5月23日

審査委員	主査	上田 夏生 		
	副主査	松永 卓也 		
	副主査	桑原 知己 		
願出者	専攻	分子情報制御医学	部門	病態制御医学 
	学籍番号	06D737	氏名	谷 丈二
論文題目	Ca ²⁺ /S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			

〔要旨〕

FKBP8は、そのTPR領域で生体内に存在するHsp90とNS5Aに各々と結合し、複合体を形成し相互作用することがHCVの複製において重要であることが報告されている。また、S100は、カルシウムイオン (Ca²⁺) 存在下でTPR標的タンパクの調節因子であると示唆されてきた。我々は以前にFKBP8のN末端側に58残基少ないだけでその他の配列が全く同じであるFKBP38がHsp90との結合をS100が阻害し、また、Hsp70/90がCa²⁺存在下でTPR領域含むKLC、HopやTom70との結合をS100が阻害することを報告してきた。Ca²⁺存在下のS100が2つの異なる機序でHCVの複製を調整することを証明することとした。第1に、S100は、FKBP8のTPR領域と相互作用して、FKBP8と結合しているHsp90と競合する。第2に、これらのS100は、FKBP8とNS5Aの間の相互作用を阻害する。これらの観察により、Ca²⁺存在下S100がFKBP8とその相互作用を阻害することによってHCV複製を調整することができることを検証する。

Ca²⁺存在有無下でFKBP8と各S100をPull down Assay・Biacoreにて結合実験を施行した。異なる長さで作成し、また、point mutationを行ったFKBP38を使用し各S100、NS5AとHsp90のFKBP38上の結合部位を確認し、FKBP8とNS5A、FKBP8とHsp90の結合がCa²⁺存在下でS100にて阻害されるかをReplacement Assayをおこなった。Genotype 1b型のHCVレプリコン細胞 (s0 cell) を使用し、遺伝子導入にてS100を過剰発現させ、イオノフォアにて細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇惹起し、Ca²⁺依存的にレプリコン細胞内で複製が抑制しているかをWestern blot法を用いてNS3にて半定量的に確認した。

FKBP8は、Pull down法にてS100A1、S100A2、S100A6、S100B、S100Pカルシウム依存的に結合し、BiacoreにてS100A6>S100A2>S100A1>S100P>S100B>>CaMの強さで結合した。また、S100A1、S100A2、S100A6、S100B、S100P、NS5A、Hsp90はN末端に58残基の相違のあるFKBP38のTPR領域で結合することが証明され、Ca²⁺存在下のS100は、FKBP8のTPR領域でのNS5AとHsp90の結合を競合的に阻害した。s0 cellを使用し結合強度の強い3種類のS100A1、S100A2、S100A6を過剰発現させた系においても、半定量的にWestern blotにてNS3の発現が減少した。

C型肝炎ウイルス複製は細胞質で起こり、NS3、NS4A、NS5AとNS5Bと宿主因子からなるレプリコン複合体によって媒介される。NS5Aは、HCV複製において重要な役割を果たし、HCVの抗ウイルス治療の重要な役割を担う。FKBP8/NS5A/Hsp90の複合体は、FKBP8のTPR領域で結合しているが、S100はNS5A、Hsp90との結合を阻害し、レプリコン細胞内のNS3の発現を抑えたため、A23187の処置による細胞内Ca²⁺の増加が

S100タンパクとFKBP8/FKBP38の結合を刺激し、細胞内でHCV複製の抑制に関係する可能性を示した。S100は、カルシウムホメオスタシス、タンパク質のリン酸化の調節、細胞成長、細胞運動性、細胞周期調節など、多様な機能をもつことが提唱されるも、十分な解明を示していない。今回の結果は、FKBP8/FKBP38のTPR領域とS100の関係がNS5A-FKBP8/FKBP38-Hsp90複合体形成の調節に関わり、カルシウム依存的にその調節機構がHCVの複製に影響することを初めて証明した。つまり、S100-TPR領域の相互作用を通じて新しい細胞内のCa²⁺シグナル経路を提示した。

【審査時質問】

- ・Western blot時にNS5Aでなく、NS3を選んだ理由は何か？：数種のNS5Aの抗体を使用するも、十分に発現するものがなく、既報で使用されたNS3で発現確認した。
- ・RNA定量はできなかったのか？：sOcellを使用した。Biochemical and Biophysical Research Communications 306 (2003) 756-766にて同じ細胞でRT-PCRにてウイルス定量を行っており可能だったと考えられるが、技術的理由で実施しなかった。
- ・HCV感染細胞でのS100発現はあるか？：Fig6でも示したように、Huh7にHCVを感染させたsOcellには発現が認められた。JFH-1においてサイトカインアレイにて発現を認めたが、その他の感染細胞においては、文献も含めて報告はない。
- ・正常細胞と感染細胞でS100の発現は変化するか？：培養細胞においては、WB法で発現を確認したが、定量できていないので変化は証明できていない。また、文献も含めて報告はありません。
- ・FK506がウイルス動態にどのような影響を与えるか？：Watashiらの報告 (Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. Hepatology. 2003 ;38:1282-8) のように、HCVの複製を抑制することが報告されている。
- ・作業仮説では、三者結合阻害が複製阻害につながるとなっているが、NS3の発現抑制がHCV複製抑制となるのか？：NS3の発現抑制だけではHCV複製抑制することができると言い切ることはできない。RT-PCRにてウイルス量を定量する必要がある。今回の論文は、NS3の発現低下でHCVの複製に影響を与える可能性を示唆するに留めた。
- ・結合実験でのカルシウムイオン濃度が高いのではないか？：カルシウムイオン濃度は、細胞外では1~2mMに、細胞内ではその約1000分の1の濃度の、50~100nMに維持されており、今回使用したカルシウムイオン濃度は、細胞内の濃度からは逸脱している。既報でも0.2mM-1mMのカルシウムイオンが選択されている。
- ・イオノフォアを長時間使用することで細胞毒性がなかったか？：(2008) J. Cell. Physiol. 215: 708-714, の実験方法を引用し、施行した。0.1-10μMの間で検討したところ、5μMが24時間細胞が生存できる最高濃度であった。
- ・今回、S100をFKBP8と結合実験させ、結合したS100を使用し実験を進めているが、結合したS100と結合していないS100では構造上での相違はあったか？：今回は結合実験のみ施行した。結合が構造上の相違や他の因子により変化するかは、証明していない。また、過去の既報でもその実験は行っていない。今後の検討課題にしたい。
- ・FKBP8とFKBP38は1つの遺伝子由来か？：1つの遺伝子由来でできたタンパクである。(Fischer, G., and Aumuller, T. (2003) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 148, 105-150, 2. Harrar, Y., Bellini, C., and Faure, J. D. (2001) Trends Plant Sci. 6, 426-431)。
- ・Stagの大きさは？：S-tagはどんなタンパク質のN末端またはC末端に取り付けられることができる Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser構造のアミノ酸配列をもつMW1748.91のタグ (R. T. Raines et al., The S-Tag Fusion System for Protein Purification. (2000) Methods Enzymol. 326, 362-367)。

以上のようにいずれの質問に対しても適切な回答が行われた。以上の結果を総合的に判断して、審査員は一致して本論文が博士論文としてふさわしいものであると判断した。

掲載誌名	Liver International第 33 巻, 第 号		
(公表予定) 掲載年月	2013年 月	出版社(等)名	Wiley-Blackwell

(備考) 要旨は、1,500字以内にまとめてください。