

学位論文の内容の要旨

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		

(論文要旨)

ミトコンドリア外膜に局在するFK506結合タンパクであるFKBP8は、そのTPR領域で生体内に存在するHsp90とC型肝炎ウイルス (HCV) 由来の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、カルシウムイオン受容タンパクであるS100タンパクは、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Ca²⁺受容タンパクであるS100A1/A2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S100A2/A6が阻害することを報告してきた。今回、我々は、Ca²⁺存在下のS100タンパクが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タンパクは、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タンパクは、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タンパクが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。

まず、形質転換した大腸菌を使用し、FKBP8 (38)・NS5A・NS5A・S100のそれぞれの蛋白質を抽出し精製を行った。Ca²⁺存在有無下でFKBP8と各S100タンパクを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タンパク、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タンパク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タンパクを過剰発現させ、イオノマイシン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の強さで結合することを認めた。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、半定量的ではあるがWestern blot法にて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。HCVの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、また、シャペロン作用でも結合しているが、S100タンパクはNS5A、Hsp90との結合を阻害する。また、レプリコン細胞内のNS3の発現を抑えたため、イオノマイシン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タンパクは、

10-12kDaの分子量で2つのEFハンドモチーフを有し、少なくとも25種のサブファミリーから成り、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、翻訳、細胞分化、細胞生存など、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。今回の我々の結果は、FKBP8/FKBP38のTPR領域とS100タンパクでの関係がNS5A-FKBP8/FKBP8-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タンパク-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。

掲載誌名	Liver International		第 33 卷, 第 5 号
(公表予定) 掲載年月	2013年 5月	出版社(等)名	Wiley-Blackwell
Peer Review	<input checked="" type="radio"/> 有 • <input type="radio"/> 無		

(備考) 論文要旨は、日本語で1,500字以内にまとめてください。