

氏名(国籍)	黄 竣 成 (韓国)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博甲第2555号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Analysis of Interaction between NS3 Protease Domain of HCV and Its Specific RNA Aptamer (HCVのNS3プロテアーゼドメインとそれに特異的なRNAアプタマーの相互作用の解析)
主査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副査	筑波大学教授 農学博士 祥雲 弘文
副査	筑波大学教授 農学博士 田仲 可昌
副査	筑波大学助教授 医学博士 中山 和久
副査	生命工学工業技術研究所室長 薬学博士 西川 諭

論文の内容の要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎の主な病原体で肝硬変、肝ガンへの移行も推測されており、抗ウイルス剤の開発が切望されている。HCVのNS3プロテアーゼはウイルスの前駆体タンパク質をプロセシングして機能型成熟タンパク質を生成する役割を持ち、ウイルスの増殖には必須のトリプシン様のプロテアーゼである。NS3プロテアーゼはHCV亜種間でもよく保存されており、現在、治療薬の標的とされているが、有効なプロテアーゼ阻害剤は見つかっていない。最近、インビトロ選択法により30Ntsのランダム配列を持つRNAプールからNS3プロテアーゼに特異的に強く結合し、そのプロテアーゼ活性を抑えるRNAアプタマー(G9-I, -II, -III, 鎖長74ヌクレオチド)が創出され、阻害剤のシーズとしての期待が持たれていた。

本研究ではアプタマー・タンパク質間の相互作用を解析するため、3種類のアプタマーのうち最もメインに得られたG9-Iアプタマー(二次構造はステムI, ステムループII, ステムループIIIからなる)とNS3プロテアーゼドメイン(Δ NS3)の種々の変異体を作成し、結合活性、阻害活性を測定し、それぞれの重要領域を明らかにすることを目的とした。特にNS3プロテアーゼドメイン上の結合部位の探索を行った。

3種類のアプタマーの共通配列であるGA(A/U)UGGGAC(ループIII)に焦点をあてアプタマーの変異体を作成し、阻害活性を調べた。その結果、これらのアプタマーはいずれも阻害活性を大きく失い、機能上非常に重要であることが分かった。さらに本研究に先立ち明らかにされていた、ステムループII部分の非重要性の結果とあわせて、G9-Iアプタマーの阻害活性に必要な領域を明らかにした。

G9-Iアプタマーの阻害様式は非拮抗阻害の様式を示した。このことはアプタマーの結合部位はNS3プロテアーゼの触媒部位ではないことを示唆するものである。そこで分子表面の正電荷アミノ酸に着目し、Cluster I(Arg24, Lys26, Lys68), Cluster II(Arg117, Arg118, Arg119, Arg123)ならびにCluster III(Arg130, Arg161, Lys165)の正電荷アミノ酸をアラニンに置換し、機能を探るAlanine-scanning mutagenesis法により解析した。表面プラズモン共鳴法により各変異酵素に対するG9-Iアプタマーの結合・解離速度、解離定数を測定し、野生型 Δ NS3と比較・解析を行った。Cluster I, IIの変異酵素はいずれも Δ NS3と同じ解離定数($K_d = 5-8nM$)を示したが、Cluster IIIの変異酵素は K_d 値が5倍から100倍以上になり、結合能が落ちていることが分かった。特にR161A変異酵素は著しい低下が認められ、アプタマーの結合残基であることが強く示唆された。次にG9-Iアプタマー

による阻害活性をIC₅₀値で調べた。その結果、表面プラズモン共鳴測定の結果と同様に、Cluster IならびにCluster IIの変異酵素はいずれもΔNS3と同じく1 μM以下であった。一方、Cluster IIIの変異酵素はR161A変異酵素が25 μMのIC₅₀値を示し、阻害効果を著しく失っていることが分かった。R130A/R161A/K165Aも同様に、R130Aも中程度の影響が見られた。なおこれらの変異酵素のプロテアーゼ活性はもとのΔNS3と同じであった。このように二つの異なる実験系でCluster IIIの正電荷アミノ酸、特に161番目のアルギニンがアダプターとの相互作用に決定的な役割をしていることを明らかにした。

最近明らかにされた、NS3タンパク質（プロテアーゼ/ヘリカーゼ）のX線結晶解析に基づく立体構造でもこの残基はプロテアーゼ、ヘリカーゼドメイン間のコンフォメーション変化に重要な役割を果たしていることが示唆されている。このようにアダプターが直接、触媒部位や基質結合部位に関わらずとも、そのタンパク質の機能に大きな影響を与えるような部位に結合しやすいということは、RNAの構造認識の機構を考える上で非常に興味深い。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はC型肝炎ウイルス（HCV）のNS3プロテアーゼに特異的に結合し、その作用を抑えることから、阻害剤のシーズと期待されているRNAアダプターとNS3プロテアーゼとの相互作用を詳しく解析したもので、特にNS3プロテアーゼドメイン上の結合部位の探索を目的にしたものである。

著者はRNAアダプター、NS3タンパク質それぞれの重要領域を明らかにするため、部位特異的変異導入の手法により、種々の変異体を作成し、それらの相互作用、活性を測定することにより必要な部位を明らかにした。アダプターに関しては3種類に共通の配列の重要性を実験的に解明し、3種類の中で主なG9-Iアダプターの阻害活性に必要な領域を初めて明らかにした。一方、G9-Iアダプターの阻害が拮抗阻害の様式であることを見出し、アダプターの結合部位はNS3プロテアーゼの触媒部位ではないことを示した。この結果に基づき、酵素分子表面の正電荷アミノ酸が結合部位ではないかと云う仮説をたて、種々のアラニン置換変異体を作成し、NS3タンパク質との結合能、阻害活性から3つの正電荷アミノ酸クラスターの中で161Argを含むクラスターがアダプターの結合部位であることを初めて明らかにした。この部位はごく最近の立体構造解析から酵素のエキソサイト（触媒部位ではないが酵素の機能上重要な部位）と示唆され、著者は実験的にそのことを初めて示した。本研究はアダプター結合部位の探索からHCVのNS3プロテアーゼの機能発現に重要な部位を特定できた点で極めて意義深い成果である。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。