

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 279 号		学位申請者	馬渡 誠一
審査委員	主査	馬場 昌範	学位	博士 (医学)
	副査	橋口 照人	副査	堀内 正久
	副査	吉家 清貴	副査	吉満 誠

主査および副査の5名は、平成26年2月19日、学位申請者の馬渡誠一君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) Figure 4b の3段目の NS3/4A の wild type と変異型において、抗 HA 抗体のバンドの部位が違うのはなぜか。

(回答) point mutation により分子量や分子構造が変化した影響と思われる。

質問2) 通常測定する C4 濃度と C4 断片濃度との関連はあるか。また、通常の C4 の検査方法で C4 断片を測定できるのか。

(回答) C 型肝炎患者血清における検討では、C4 濃度と C4 断片濃度の関連はなかった。また、通常の C4 の検査方法では C4 断片は測定できなかった。

質問3) 細胞上清中の C4 断片を解析していたが、細胞内で NS3/4A プロテアーゼが C4 を切断しているのか。また、NS3/4A プロテアーゼは細胞外に分泌されるのか。

(回答) 細胞溶解液の C4 断片も解析したが、C4 断片を検出できなかった。C4 を細胞内に遺伝子導入した過去の報告においても、細胞内に C4 断片を検出できていない。今回の検討でも細胞内で C4 を切断しているが、検出ができなかったと推測している。また、HCV 抗体の第一世代は NS3/4A 領域をターゲットにしており、NS3/4A プロテアーゼが細胞外に分泌される可能性もあるため、細胞外で C4 を切断している可能性も否定できない。

質問4) 今回の細胞実験は P2 レベルでの実験か。

(回答) P2 レベルでの実験で、浜松医科大学感染症学講座と共同研究を行った。

質問5) ALT 正常者と慢性肝炎患者血清のプロテオーム解析で C4 α 鎖の断片が検出され、今回の研究では C4 γ 鎖の断片が検出されたが、その違いは何か。

(回答) プロテオーム解析で C4 α 鎖の断片が検出されたことは今回の検討のきっかけであり、C4 γ 鎖の切断との直接の関連は検討していない。

質問6) In vitro の実験で、NS3/4A プロテアーゼと C4 を 30°C ではなく、生体に近い 37°C で混合した方がよい結果が出たのではないか。また、何分混合したか。

(回答) 37°C では検討していないが、今回使用した NS3/4A プロテアーゼは市販の recombinant のものであったこと、過去の溶血試験の報告で C4 を 30°C で反応させていたことから、30°C で 30分混合した。

質問7) NS3/4A プロテアーゼは C4 のその他の部位は切断しないのか。

(回答) C4 のその他の部位にも cysteine/alanine や cysteine/serine 配列を認めるが、今回の検討では、その他の部位の切断は確認できていない。NS3/4A プロテアーゼは基質特異性があり、NS3/4A プロテアーゼの

切断にはこれらの配列以外に、切断部位の6アミノ酸N末端側に酸性アミノ酸が存在することが必要であるという報告がある。

質問8) VX950の生化学的な阻害様式は何か。

(回答) VX950は分子量約680の分子で、NS3/4Aプロテアーゼを競合阻害する。

質問9) Figure 4で用いられているC4抗体はいずれのサブユニットも認識するのか。

(回答) C4 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖のいずれも認識すると考えられる。

質問10) NS4Aがco-factorとして働くことにより、プロテアーゼ活性は何倍上がるのか。

(回答) 具体的に活性が何倍上がるという報告はない。NS4AのN末端部分は膜貫通型の α -helixを形成し、C末端部分はHCV-RNAの複製やウイルス粒子産生にかかわっているとされる。

質問11) NS3/4Aプロテアーゼがcysteine/alanineやcysteine/serine間を切断するとfreeの-SH基を有するcysteine同士がdimerを形成する可能性も考えられるが、生体内ではFigure 1cのような還元型のcysteine残基を有する形でのみ存在すると考えているのか。

(回答) 今回の検討ではN末端アミノ酸解析から切断部位を同定したが、C末端領域の検討を行っていないため、断片3のC末端がcysteineであるとは限らないと考える。

質問12) 肝細胞内でNS3/4AプロテアーゼはC4を細胞内輸送のどの段階で切断するのか。

(回答) NS3/4Aプロテアーゼは小胞体膜やミトコンドリア膜上に存在すると考えられているが、切断された異常な立体構造であるC4が細胞内で処理されずに分泌されるためには、小胞体-ゴルジ装置の細胞内輸送後に切断されていると推測する。

質問13) 非還元下でのSDS-PAGEは行ったか。

(回答) 今回の検討では行っていない。

質問14) Figure 1cで、F1の部分で切断された場合の残りの断片はF3と思われるが、F2の部分で切断された場合の残りの断片はどうなっているのか。

(回答) F3のC末端部分の検討はしていないが、F3のバンドが本当は2つあった可能性がある。

質問15) 生化学的な実験で、VX950は0.5-5 μ MでHCVのプロテアーゼ活性を抑えるとされているが、Figure 3の溶血試験で使用したVX950の濃度が100 μ Mと高い理由はなぜか。低い濃度で検討しているか。また、VX950が溶血を阻害した原因は何か。

(回答) 100 μ Mよりも低い濃度でも検討したがFigure 3のような結果は出なかった。その理由として、溶血試験で使用したバッファーが、VX950のプロテアーゼ阻害反応に最適な状況ではないことで、比較的高濃度のVX950が必要であったものと推測される。また、VX950が高濃度であったため、補体に非特異的な反応が引き起こされ、VX950が溶血を阻害したと考えられる。

質問16) HCV replicon細胞からC4 γ は分泌されるのか。

(回答) HCV replicon細胞では検討していないが、今回使用したHuh7細胞からのC4 γ 分泌は検出されなかった。

質問17) ALT高値と肝線維化とどちらが先に起こるのか。

(回答) ALTは肝細胞が破壊された際に逸脱する酵素で、肝の再生が繰り返される結果、肝線維化が引き起こされるため、ALT高値が先に起こると考えられる。

質問18) Figure 4で免疫沈降後にC4抗体を用いてウェスタンブロットを行っているが、同じメンブレン上に検出されたC4 γ とC4断片の比率はどのようになっているか。

(回答) 同一メンブレン上のC4 γ とC4断片の濃度の定量化を行っていないため、比率は検討していない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと結論し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。