



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

B型肝炎ウイルスのDNA

polymeraseに対する各種薬剤の阻害効果に関する実
験的研究 特に9- β -D-arabinofuranosyladenine

5'-triphosphate (ara ATP)

と1- β -D-arabinofuranosylthymine 5'-triphosphate
(araTTP) の阻害様式について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 齊藤, 雅也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/15337

氏名(本籍) 齊藤雅也(岐阜県)
 学位の種類 博士(医学)
 学位授与番号 乙第934号
 学位授与日付 平成7年1月18日
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
 学位論文題目 B型肝炎ウイルスのDNA polymerase に対する各種薬剤の阻害効果に関する実験的研究
 特に9-β-D-arabinofuranosyladenine 5'-triphosphate (ara ATP) と1-β-D-arabinofuranosylthymine 5'-triphosphate (araTTP) の阻害様式について
 審査委員 (主査)教授 武藤泰敏
 (副査)教授 江崎孝行 教授 岡野幸雄

論文内容の要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)のDNAは約3200塩基対の環状2本鎖構造をとっており、1カ所の切れ目(nick)を有する完全な長鎖とこれに相補的な短鎖とから成り立っている。HBV粒子内にはDNA polymerase(DNAP)が存在し、長鎖を鋳型として短鎖を3'末端から伸長し、完全な2本鎖DNAを完成させ、HBVの増殖に重要な役割を担っている。したがって、DNAP活性を阻害する物質はHBVの持続感染を断ち切る治療薬となる可能性があり、実際、臨床では9-β-D-arabinofuranosyl adenine (ara A)や9-β-D-arabinofuranosyl adenine monophosphate (ara AMP)が慢性B型肝炎症例の治療薬として開発されている。その作用機序はara A, ara AMPが生体内でリン酸化されarabinofuranosyl adenine triphosphate (ara ATP)となってHBVのDNAP活性を抑制することにあるとされている。

そこで申請者は、これまでに報告されているHBVのDNAP活性測定法の至適条件を改めて検討した上で、動物真核細胞のDNAP阻害剤として知られている種々の物質がHBVのDNAPに対しても阻害効果を発揮するか否かについて実験を行い、ara ATPと1-β-D-arabinofuranosyl thymine triphosphate (ara TTP)についてはその阻害様式についても検討した。

材料と方法

1. HBVのDNAP活性測定に関する基礎的検討

① HBVのDNAP活性を有する溶液(酵素液)ならびに反応液の作製

HBs抗原陽性新鮮凍結血漿を岐阜県赤十字血液センターから供与を受け、HBe抗原陽性の血漿160mlを10,000gで15分間遠心し、その上清を30w/v%蔗糖勾配に重層し、4℃、113,000gで4時間超遠心の後、そのペレットにphosphate buffered saline (PBS)のみを加えた溶液Aと、1% Nonidet P, 0.3%メルカプトエタノール、50%グリセロールを加えた溶液Bを作製した。溶液Aをタンパク定量用に使用し、溶液BをDNAP活性をもつ溶液とし、-20℃で保存した。

酵素液に作用してDNA合成反応を起こさせる反応液の組成は、前述の酵素液25μlを含む総量50μl中で0.05M Tris-HCl buffer (pH7.5, 37℃)、30mM塩化マグネシウム、80mM塩化アンモニウム、0.3mM deoxyadenosine triphosphate (dATP)、0.3mM deoxycytidine triphosphate (dCTP)、0.3mM deoxyguanosine triphosphate (dGTP)、1.2 μM ³H-deoxythymidine triphosphate (dTTP)となるよう調整した。

② 酵素液のDNAP活性の検討

酵素液を0から25μlまで5μlずつ増量し、PBSと反応液25μlを加えて、総量50μlとして攪拌、37℃で3時間 incubationして、酵素液量と反応生成物との関係を、ならびに酵素液25μlと反応液25μlを加えて攪拌後30分毎に4時間まで反応時間を変えて、生成物とincubation時間との関係を検討した。これらの検討ではいずれもincubation終了後試験管内の反応生成物をWhatman社製GF/C glassfiber membraneにのせ乾燥させ、10%トリクロル酢酸で洗浄し、さらにエタノールで洗浄後乾燥、glassfiber membrane上の酸不溶性分画中の³H-dTTPを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

③ 反応液の至適条件についての検討

反応液のpH、塩化マグネシウム濃度、塩化カリウム濃度を変えて、酵素液にDNA合成反応を起こさせる反応液の至適条件を検討した。

2. 各種薬剤のDNAP阻害効果に関する検討

Ara A, ara AMP, ara ATP, 9- β -D-arabinofuranosyl hypoxanthine (ara Hx), 1- β -D-arabinofuranosylthymine (ara T), 1- β -D-arabinofuranosylthymine 5' monophosphate (ara TMP), araTTP, aphidicholin, dideoxythymidine triphosphate (ddTTP), N-ethyl-maleimide (NEM) がHBVのDNApに対し阻害効果をもつか否かについて検討し、さらに ara ATP, ara TTP についてはそれぞれの基質を³H-dATP, ³H-dTTPとして基質濃度と阻害剤の濃度を変化させ、反応生成物に取り込まれたトリチウムを測定し、Lineweaver-Burkのプロットを行い、阻害様式についても検討した。なお、ara ATPの阻害効果についての検討では、総量50 μ l中0.3mM dCTP, 0.3mM dGTP, 0.3mM dTTPとし、反応液中の他の物質の濃度は前述と同様とした。

結果

① 酵素液の量を増加させると反応生成物に取り込まれた³H-dTTPは3時間の反応時間までは酵素液量に依存して直線的に増加した。このことより、この酵素液にはDNAp活性が存在することが確認された。なお、Lowry法で測定したこの酵素液のタンパク濃度は1.23mg/mlであり、この酵素液は0.17pmoles/mg protein/3hrのdTTPの取り込みを示したことになる。

② 反応液の至適条件はpH 7.5で、塩化マグネシウム濃度は30mM以上が必要であった。

③ 動物真核細胞のDNAp α の阻害剤であるaphidicholinにはHBVのDNApに対しては阻害作用はなく、DNAp β , γ に阻害効果をもつddTTPや、DNAp α , β , γ に阻害効果のあるNEMはHBVのDNApに対しても阻害作用が認められた。

また、ara A, ara AMP, ara Hx, ara T, ara TMP自身には*in vitro*ではHBVのDNApに対する阻害作用はみられず、ara ATP, ara TTPに阻害効果が認められた。

④ dATPを基質としたときのara ATPの阻害様式は、Lineweaver-Burkのプロットで反応生成物に取り込まれた³H-dATPの逆数(1/V)は、ara ATPをこの反応系に全く加えない場合と50 μ Mあるいは200 μ Mのara ATPを加えた場合では一致しており、このことからara ATPはHBVのDNA合成反応においてdATPとDNApの結合部位を競合することにより酵素活性を阻害することが示された。同様に、dTTPを基質としたときのara TTPの阻害様式も競合的拮抗であることが示された。

⑤ Lineweaver-Burkのプロットから得られた基質dATPのKmは1.25 μ Mで、dTTPのKmは1.0 μ Mであった。それぞれの阻害剤であるara ATP, ara TTPの濃度を横軸に、反応生成物1/Vを縦軸にとったDixonプロットから得られる阻害係数Kiはara ATPで73 μ M, ara TTPで0.35 μ Mであった。Ki/Km比はara ATP, ara TTPではそれぞれ60.8, 0.35であり、*in vitro*においてはara TTPはara ATPに比し、より低濃度でHBVのDNAp活性を阻害することが示された。

考案

Ara A, ara AMPは当初単純ヘルペスウイルス(HSV)脳炎の治療薬として使用され、慢性B型肝炎症例に対しても抗ウイルス効果を有することが示されているが、ara A, ara AMP自身にはHBVに対する抗ウイルス作用はなく、生体内でara ATPとなって初めてHBVのDNAp活性阻害作用を発揮するものである。本研究においてこのことが確認され、さらにその阻害様式がdATPとの競合によるものであることが示された。

Ara Tは、HSV感染細胞にのみ抗ウイルス作用を発揮し、HSV非感染細胞には全く影響しないことが報告されているが、これは、HSVにはウイルスに特異的なdeoxypyrimidine kinaseが存在するためHSV感染細胞内でのみara Tがara TTPに磷酸化されるためと考えられている。*In vitro*ではara Tの磷酸化物であるara TTPがara ATPに比しより効率よくHBVのDNAp活性を抑制することが明らかとなり、HBV自身またはHBV感染細胞にHSVが有しているdeoxypyrimidine kinaseのようなthymidine kinaseが存在し、生体内でara Tがara TTPに磷酸化されれば、ara Tも慢性B型肝炎症例の治療薬となり得る可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者齊藤雅也は、B型肝炎ウイルス(HBV)のDNA polymerase (DNAp)活性測定の基礎的検討ならびに各種薬剤による阻害効果を検討した結果、ara Tの磷酸化合物であるara TTPがHBVのDNAp活性を競合的に阻害することを見出した。この新知見は肝臓病学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

B型肝炎ウイルスのDNA polymeraseに対する各種薬剤の阻害効果に関する実験的研究

特に9- β -D-arabinofuranosyladenine 5'-triphosphate (ara ATP)と1- β -D-arabinofuranosylthymine 5'-triphosphate (araTTP)の阻害様式について

岐阜大医紀 42(5):405~414, 1994