

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19021

研究課題名(和文) ウイルスタンパク質のチロシンリン酸化に着目したC型肝炎ウイルス増殖機構の解析

研究課題名(英文) Tyrosine phosphorylation of a viral protein in the hepatitis C virus life cycle

研究代表者

山内 翔太 (Yamauchi, Shota)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教

研究者番号：00728941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)のキャリア数は全国で150万人以上と推定されている。HCVは肝細胞への侵入後、ウイルスRNAの複製とウイルスタンパク質の合成を繰り返し、これらを部品としてウイルス粒子を形成する。ウイルス粒子は肝細胞の分泌機構を介して放出され、別の肝細胞に感染する。本研究では、HCVのウイルスタンパク質NS5Aのc-Ablによるチロシンリン酸化が、ウイルス粒子の形成に促進的に働いていることを発見した。また、抗HCV活性を有するinterferon (IFN)-alphaとIFN-lambdaのシグナル伝達機構の違いを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：More than 1.5 million people are infected with hepatitis C virus (HCV) in Japan. Following entry into the host hepatocyte, the RNA genome of HCV is translated into viral proteins and replicated by the viral proteins. Viral RNA and proteins are assembled into virus particles, which are released from the host hepatocyte through the secretory pathway and infect other hepatocytes. In this study, we found that tyrosine phosphorylation of the HCV NS5A protein by c-Abl promotes virus particle assembly. We also reveal the difference between the signaling mechanisms of the antiviral cytokines interferon (IFN)-alpha and IFN-lambda.

研究分野：生化学 ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス インターフェロン

### 1. 研究開始当初の背景

HCV は 3 種類の構造タンパク質と 7 種類の非構造タンパク質を有する RNA ウイルスである。構造タンパク質がウイルス RNA とともにウイルス粒子の一部をなすのに対し、非構造タンパク質は宿主(肝細胞)タンパク質を利用することで、ウイルス RNA の複製やウイルス粒子の形成を担う。本研究で着目した非構造タンパク質 NS5A は、ウイルス RNA の複製とウイルス粒子の形成の両方に必要なリン酸化タンパク質である。低リン酸化型(p56)の NS5A はウイルス RNA の複製を、高リン酸化型(p58)の NS5A はウイルス粒子の形成をそれぞれ促進するとされる。NS5A をリン酸化するキナーゼの一つとして、セリン/スレオニンキナーゼであるカゼインキナーゼが同定されている。これに加え、申請者の所属研究室は、NS5A が未同定のチロシンキナーゼにリン酸化されることを報告した(Nakashima, K. *et al.*, *PLoS ONE*, 2012)。また、NS5A は Src、Fyn、Syk、c-Abl といったチロシンキナーゼと会合することが報告されていた(Macdonald, A. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 2004; Inubushi, S. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 2008; Nakashima, K. *et al.*, *PLoS ONE*, 2012)。しかしながら、HCV のライフサイクルにおけるチロシンキナーゼの役割はほとんど解明されておらず、上皮増殖因子受容体(EGFR)のキナーゼ活性が、HCV の細胞内への侵入に必要であることが、報告されている程度であった(Lupberger, J. *et al.*, *Nat. Med.*, 2011; Zona, L. *et al.*, *Cell Host Microbe*, 2013)。

IFN-alpha と IFN-lambda は異なる受容体と結合する IFN であるが、JAK-STAT 経路を介して似たような遺伝子群(ISG)の発現を誘導し、HCV の増殖を抑制する。IFN-alpha と IFN-lambda のシグナル伝達の違いはほとんど知られていなかった。

### 2. 研究の目的

NS5A チロシンリン酸化の意義に焦点を当

て、HCV 増殖の分子機構を解析した。HCV のカプシド(ウイルス核酸を取り囲む殻)タンパク質である core は、リピッドドロップレット(脂質を蓄える細胞内小器官)上でウイルス RNA と結合し、ヌクレオカプシドを形成すると考えられている(Miyanari, Y. *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2007)。ヌクレオカプシドは、小胞体内へ陥入することで、小胞体膜由来のウイルスエンベロープを獲得し(エンベロープメント)、ウイルス粒子となる。NS5A のチロシンリン酸化がウイルスライフサイクルのどの過程に必要であるかを、変異型 HCV を用いて明らかにした。

また、IFN-alpha と IFN-lambda が HCV の増殖を抑制する際のシグナル伝達機構を特に STAT 1 と STAT2 に焦点を当て解析した。

### 3. 研究の方法

予備実験において、c-Abl による NS5A Y330 のリン酸化がウイルス粒子形成に必要であることを既に見出していたが、このリン酸化がウイルス粒子形成のどの過程に必要であるかを、変異型 HCV の解析を通じて絞り込んだ。

#### 変異型 HCV の作成

ウイルス粒子形成効率が比較的高く、HCV の感染実験で近年広く用いられている J6/JFH キメラ株と Huh7.5 肝癌細胞を本研究でも用いた(ロックフェラー大学 Rice 教授より入手; Lindenbach, B.D. *et al.*, *Science*, 2005)。ウイルスの全長ゲノムをコードするプラスミド(pFL-J6/JFH)とこれに変異を加えたプラスミド(pFL-J6/JFH NS5A Y330F)をテンプレートとして、*in vitro* 転写(MEGAscript T7 kit; Ambion)を行った。合成されたウイルス RNA をエレクトロポレーション(Gene Pulser Xcell; BIO-RAD)で Huh7.5 細胞に導入し、ウイルス粒子を形成させた。また、NS5A 抗体(9E10; Rice 教授

より入手)を用いた蛍光免疫染色(TCS SPII 共焦点顕微鏡; Leica)により、NS5A Y330F の局在を調べた。

### ヌクレオカプシド形成の評価

NS5A のチロシンリン酸化がヌクレオカプシド形成に必要である可能性を、免疫沈降・qRT-PCR により検証した (Masaki, T. *et al.*, *J. Virol.*, 2008)。ウイルス RNA を導入した細胞を溶解し、core 抗体(C7-50; Abcam)を用いた免疫沈降を行った。Core と共沈した RNA を qRT-PCR により定量した(StepOne Plus; Lifetechnologies)。

### CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト細胞の作成と解析

IFN-alpha と IFN-lambda が HCV の増殖を抑制する際の STAT1 と STAT2 の必要性を CRISPR/Cas9 システムを用いて解析した。lentiCRISPR vector (Sanjana, NE *et al.*, *Nat. Methods*, 2014) により、STAT1 と STAT2 のノックアウトクローンを作成し、HCV に感染させ、IFN-alpha または IFN-lambda で刺激した。

#### 4. 研究成果

NS5A の Y330 が HCV の粒子形成に必要であるかを調べるために、HCV のゲノム RNA に NS5A Y330F 変異を導入した。この変異型ウイルスでは細胞内外のウイルスタイトルが90%以上低下していた。一方、NS5A Y330F 変異を持つサブジェノミックレプリコンは野生型と同様の複製能を示した。これらの結果は NS5A Y330 がウイルス粒子形成に関わることを示唆している。

NS5A は Core タンパク質依存的にリピッドドロップレットに局在し、HCV の粒子形成を促進する。そこで、c-Abl による NS5A のリン酸化が NS5A の細胞内局在に影響を与える可能性を検討した。c-Abl ノックダウン細胞において、NS5A はコントロール細胞内と同様にリピッドドロップレットに局在していた。また、NS5A Y330F 変異を導入し

たウイルスにおいても、NS5A のリピッドドロップレットへの局在に目立った変化は見られなかった。したがって、c-Abl は NS5A のリピッドドロップレットへの局在には不要と考えられる。また、変異型ウイルスにおいても core と RNA の結合は野生型ウイルスと同程度であった。以上の結果から、NS5A のチロシンリン酸化はヌクレオカプシドのエンベロープメントに關与する可能性が考えられた。

IFN-alpha は STAT1 ノックアウト細胞において、C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制できるのに対し、STAT2 ノックアウト細胞では抑制できなかった。これに対し、IFN-lambda は STAT1 ノックアウト細胞と STAT2 ノックアウト細胞のどちらにおいても、C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制できなかった。また、マイクロアレイを用いた解析により、IFN-alpha は STAT1 ノックアウト細胞においても、ほぼ全ての ISG の発現を誘導できることがわかった。これらの結果は、IFN-alpha と IFN-lambda は STAT1 に対する依存性において異なることを示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Yamauchi, S., Takeuchi, K., Chihara, K., Honjoh, C., Kato, Y., Yoshiki, H., Hotta, H., and Sada, K.

STAT1 is essential for the inhibition of hepatitis C virus replication by interferon- $\lambda$  but not by interferon- $\alpha$ .

*Sci. Rep.* 6, 38336 (2016) 査読有

Yamauchi, S., Takeuchi, K., Chihara, K., Sun, X., Honjoh, C., Yoshiki, H., Hotta, H., and Sada, K.

Hepatitis C virus particle assembly involves phosphorylation of NS5A by the c-Abl tyrosine kinase.

*J. Biol. Chem.* 290, 21857-21864 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

第 33 回日本生化学会北陸支部大会 富山大学(富山県富山市)2015年5月23日 招待講演:チロシンキナーゼによる HCV 複製の制御機構

第 63 回日本ウイルス学会学術集会 福岡国際会議場(福岡県福岡市)2015年11月23日 ポスター:C型肝炎ウイルス粒子形成における NS5A チロシンリン酸化の役割

第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)2015年12月3日 ポスター:C型肝炎ウイルス粒子形成における c-Abl の役割

〔その他〕

ホームページ等

<http://biseibutu.med.lab.u-fukui.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山内 翔太 (YAMAUCHI, Shota)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教

研究者番号:00728941

### (2)研究協力者

定 清直 (SADA, Kiyonao)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授  
研究者番号:10273765

千原 一泰 (CHIHARA, Kazuyasu)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号:00314948

竹内 健司 (TAKEUCHI, Kenji)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教  
研究者番号:40236419

堀田 博 (HOTTA, Hak)

神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号:40116249