

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07961

研究課題名（和文）B型肝炎ウイルス増殖におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割の解析

研究課題名（英文）The role of ubiquitin-proteasome system in hepatitis B virus replication

研究代表者

田中 康雄（TANAKA, YASUO）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40422290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではタンパク分解系であるユビキチン・プロテアソーム系のB型肝炎ウイルス複製における役割を検討した。その結果RNAヘリカーゼの一種であるDDX1(ATP-dependent RNA helicase DDX1)がB型肝炎ウイルスの産生するタンパクの一つHBxと結合し、ウイルス複製に関与していることを見出した。その機序としてDDX1のATPase活性が複製に重要である可能性が示され、この分子を標的とした抗ウイルス療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルスは既存の内服薬により増殖を抑えることが可能だが、長期投与による薬剤耐性株の出現と薬剤中止による肝炎再燃が大きな問題となっており、新規抗ウイルス薬の開発が求められている。本研究ではタンパク分解系であるユビキチン・プロテアソーム系のB型肝炎ウイルス複製における役割を検討することにより、ウイルスの増殖に関与する宿主タンパクを同定し得た。本研究の新規治療法の開発への寄与が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of ubiquitin-proteasome system in HBV replication. We identified DDX1(ATP-dependent RNA helicase DDX1) as a novel HBx-interacting protein using a tandem affinity purification method and demonstrated that DDX1 enhanced HBV RNA transcription. Furthermore, the ATPase domain of DDX1 was responsible for the enhancement of HBV replication. These results suggest that DDX1 could be an attractive therapeutic target for inhibiting HBV pathogenesis.

研究分野：肝臓学

キーワード：HBV HBV Xタンパク ユビキチン・プロテアソーム系 ユビキチンリガーゼ CUL4-DDB1

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は、急性肝炎、慢性肝炎や肝細胞癌など様々な肝疾患の主要原因の一つである。全世界で2億6千万人の感染者、年間約60万人がHBV関連疾患で死亡していると推定されており、いまだ重大な健康上の問題となっている。現時点ではHBVの複製に必須の逆転写酵素を標的とした核酸アナログ製剤によりウイルスの増殖を抑制することが可能だが、長期投与による薬剤耐性株の出現が大きな問題となっている。耐性株が一度出現すると肝炎のコントロールが困難で劇症化を引き起こし死に至る症例もある。現在海外ではHBVの受容体である sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)を標的としたHBV entry inhibitorである Myrcludex-B やHBVのヌクレオカプシドの合成阻害薬などが開発途上にあるが、単剤での効果が不十分などの問題点も多く、新規分子を標的とした抗ウイルス療法の開発は喫緊の課題である。

HBVのXタンパク (HBx) はトランスジェニック・マウスの解析からウイルス由来の癌遺伝子で肝発癌へ寄与しているものと考えられていたが、同時にHBxが欠失したHBVは肝細胞内で複製しないことから自身の複製に必須であることも明らかとなってきた。以前よりHBxはユビキチン転移酵素 (リガーゼ) である CUL4-DDB1 と複合体を形成することが知られており、タンパクのユビキチン化に関与している可能性が示唆されていた。

ユビキチンは76個のアミノ酸からなるタンパク質で種を超えて高度に保存されており、生命現象において非常に重要な役割を担っている。ユビキチンは3種の酵素であるユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン転移酵素 (リガーゼ) (E3) により鎖状につながりその標的タンパクに結合することで、プロテアソーム依存性のタンパク質の分解に関与している。ユビキチンリガーゼの CUL4-DDB1 複合体はアダプタータンパクである DDB1 and CUL4-associated factor (DCAF) により基質の特異性を決定され、基質のユビキチン化と分解を導く。

DDB1 と結合する HBx はウイルスの複製を促進する一方で DDB1 と結合できない HBx 変異体はウイルスの複製が著明に落ちることから、両者の結合がウイルス複製に重要である可能性が指摘されており、HBx も DCAF として作用し宿主制限因子を分解することにより複製が効率的に行われるような役割を果たしていると考えられている。近年染色体の高次構造と機能の制御に関わる ATPase ファミリー Smc5/6 がこの複合体に特異的な標的であることが報告されたが、HBV 複製における機序の詳細は明らかではない。一方で HBx は逆に本系による宿主因子の分解を阻害するという報告もあり、その HBV 複製における意義は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、HBV 複製におけるユビキチン・プロテアソーム系の関与を包括的に理解することにより、本系を標的とした新規抗ウイルス療法の開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) 質量分析を用いた HBx-CUL4-DDB1 による特異的基質の同定

DDB1 に結合できる HBx は基質をユビキチン化しタンパク分解へと導くが、DDB1 に結合できない HBx 変異体 (R96E) は基質と結合するものの基質の分解は誘導せず HBx と結合したまま残存する。HBx (R96E) に特異的に結合する宿主因子の同定をタンデムアフィニティー法と質量分析を用いて試みる。2種類のアフィニティータグ (myc と flag) と TEV プロテアーゼによる切断部位を直列につないだ複合体型タグを組み込んだ HBx 野生型及び DDB1 に結合しない変異体 (R96E) の発現プラスミドを 293T 細胞に導入し、タグに対する抗体を用いて HBx 複合体を 2段階精製し、HBx 結合蛋白をゲルから切り出し質量分析計にてタンパクを同定する。

(2) プロテインアレイを用いた HBx により誘導されるユビキチン化基質の同定

ユビキチン関連タンパクアレイを用いて基質の同定を行う。293T 細胞に HBx を導入し、プロテアソーム阻害剤にて刺激してタンパク分解を抑制する。その細胞溶解液をプロテインアレイと反応させて、ユビキチン化されるタンパクの同定を行う。

(3) ユビキチン・プロテアソーム系関連分子の HBV 複製における役割の検討

1, 2 で同定された分子が HBx-CUL4-DDB1 複合体により分解されるか、また HBV 複製へ関与しているかに関しては、HBV の複製系 (HepG2.2.15 細胞など) を用いて個別に検討する。

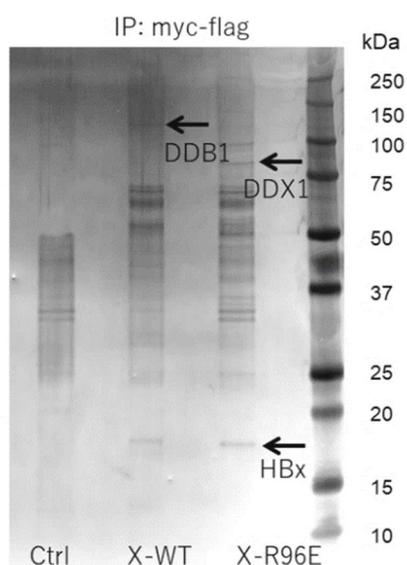
4. 研究成果

(1) 複合体型タグを組み込んだ HBx 野生型及び DDB1 に結合しない変異体 (R96E) の発現プラスミドを 293T 細胞に導入し、タグに対する抗体を用いて HBx 複合体を 2段階精製し、HBx 結合蛋白をゲルから切り出し、質量分析計にてタンパクを同定した。予備実験として DDB1 は HBx(WT) に

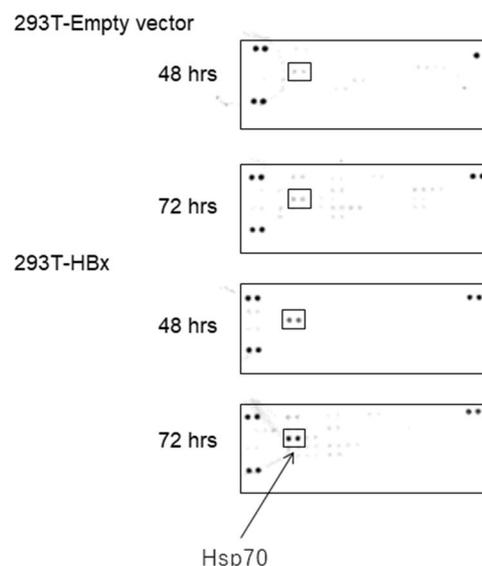
は結合するものの、HBx(R96E)には結合しないことを確認した。さらに HBx(R96E)に特異的なバンドのうち一つからは、DDX1(ATP-dependent RNA helicase DDX1) という DEAD box 型 RNA ヘリカーゼの一つが同定された(図1)。

(2) Proteome Profiler Human Ubiquitin Array Kit により HBx によりユビキチン化が誘導されるタンパクの解析を行ったところ、HBx により Hsp70 (Heat Shock Protein 70) のユビキチン化が誘導されることを見出した(図2)。

(図1)



(図2)



(図1) 293T 細胞に myc-flag-HBx(X-WT), HBx(X-R96E)を遺伝子導入し、免疫沈降を行った。解析した 80kDa のバンドから DDX1 が同定された。

(図2) 293T 細胞に myc-flag-HBx を遺伝子導入し、細胞溶解液を Proteome Profiler Human Ubiquitin Array に反応させた。ユビキチン化が誘導されるタンパクの一つとして Hsp70 を同定した。

(3) DDX1 は、ATP 加水分解のエネルギーを用いてヘリカーゼとして働き、RNA のスプライシング、核外輸送や安定化に関与しており、他のウイルスであるヒト免疫不全ウイルスや JC ウイルスの複製を正に制御していることが知られている。細胞内での検討では HBx による DDX1 のタンパク発現量の減少やユビキチン化は確認できなかった。一方で HBx と DDX1 との結合は確認され、HBx のトランス活性化ドメインの一部と DDX1 の SPRY ドメインが両者の結合に重要であった。さらに HepG2.2.15 の内在性の DDX1 のノックダウンでは DDX1 の発現低下とともに pgRNA と HBV-DNA が減少、逆に DDX1 を発現させたところ、pgRNA と HBV-DNA が増加した。DDX1 の HBx と結合しない変異体や ATPase 活性を損なう変異体は HBV 複製を増強させなかった。また HBx-DDX1 複合体は DDX1 単独に比し、その ATPase 活性を増強した。

以上より DDX1 は HBV 複製を正に制御し、DDX1 の ATPase 活性の阻害が効果的な抗ウイルス作用をもたらす可能性が示唆された。

また HBx により Hsp70 (Heat Shock Protein 70) のユビキチン化が誘導されることは、今まで報告の無い新たな知見であるが、このユビキチン化の生物学的意義に関しては、今後検討を加える予定である。

以上、本研究において HBV の複製におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割を解析することにより、新規ウイルス複製促進因子を同定することができた。特にその酵素活性を阻害することにより HBV 複製を抑制する可能性が示されたことは重要で、今後この分子を標的とした抗ウイルス療法開発の可能性を示していると考えられる。今後さらなる解析を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanaka Y, Tateishi R, Koike K	4. 巻 12
2. 論文標題 Successful treatment of chronic hepatitis C virus infection with crushed glecaprevir/pibrentasvir administered via a percutaneous endoscopic gastrostomy tube: case report and review of the literature.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 588-591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-019-00997-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wake T, Tateishi R, Nakagomi R, Fujiwara N, Kinoshita MN, Nakatsuka T, Sato M, Minami T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Tanaka Y, Shiina S, Koike K	4. 巻 49
2. 論文標題 Ischemic complications after percutaneous radiofrequency ablation of liver tumors: Liver volume loss and recovery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 453 ~ 461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Y, Tateishi R, Koike K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Proteoglycans Are Attractive Biomarkers and Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E3070.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19103070.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara N, Nakagawa H, Enooku K, Kudo Y, Hayata Y, Nakatsuka T, Tanaka Y, Tateishi R, Hikiba Y, Misumi K, Tanaka M, Hayashi A, Shibahara J, Fukayama M, Arita J, Hasegawa K, Hirschfield H, Hoshida Y, Hirata Y, Otsuka M, Tateishi K, Koike K.	4. 巻 67
2. 論文標題 CPT2 downregulation adapts HCC to lipid-rich environment and promotes carcinogenesis via acylcarnitine accumulation in obesity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gut.	6. 最初と最後の頁 1493-1504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/gutjnl-2017-315193.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakatsuka Takuma, Tateishi Keisuke, Kato Hiroyuki, Fujiwara Hiroaki, Yamamoto Keisuke, Kudo Yotaro, Nakagawa Hayato, Tanaka Yasuo, Ijichi Hideaki, Ikenoue Tsuneo, Ishizawa Takeaki, Hasegawa Kiyoshi, Tachibana Makoto, Shinkai Yoichi, Koike Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of histone methyltransferase G9a attenuates liver cancer initiation by sensitizing DNA-damaged hepatocytes to p53-induced apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-03381-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wake Taijiro, Tateishi Ryosuke, Fukumoto Tsuyoshi, Nakagomi Ryo, Kinoshita Mizuki Nishibatake, Nakatsuka Takuma, Sato Masaya, Minami Tatsuya, Uchino Koji, Enooku Kenichiro, Nakagawa Hayato, Fujinaga Hidetaka, Asaoka Yoshinari, Tanaka Yasuo, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Improved liver function in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C virus who achieve sustained virologic response is not accompanied by increased liver volume	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231836	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中塚拓馬, 立石敬介, 工藤洋太郎, 山本恵介, 中川勇人, 藤原弘明, 田中康雄, 酒井寿郎, 油谷浩幸, 眞貝洋一, 小池和彦.
2. 発表標題 肝癌前駆細胞を制御するヒストンメチル化修飾機構
3. 学会等名 第25 回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中塚拓馬, 立石敬介, 工藤洋太郎, 山本恵介, 中川勇人, 藤原弘明, 田中康雄, 酒井寿郎, 油谷浩幸, 眞貝洋一, 小池和彦.
2. 発表標題 肝癌前駆細胞を制御するヒストンメチル化修飾機構
3. 学会等名 第55 回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中康雄, 立石敬介, 小池和彦.
2. 発表標題 ATP 依存性RNA ヘリカーゼDDX1 のHBV 複製における役割の検討
3. 学会等名 第104 回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中塚拓馬、中川勇人、早田有希、和気泰次郎、山田友春、木下瑞希、中込良、佐藤雅哉、南達也、榎奥健一郎、工藤洋太郎、田中康雄、大塚基之、建石良介、小池和彦
2. 発表標題 治療後 cell-free DNA 解析による分子標的薬の治療効果予測
3. 学会等名 第23回日本肝がん分子標的治療研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	建石 良介 (TATEISHI Ryosuke) (50444089)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------