

平成21年 6月15日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19041074

研究課題名（和文） ウイルスの生活環における脂質の役割に関する解析

研究課題名（英文） Analysis of the role of lipid in viral life cycles

研究代表者

脇田 隆字（WAKITA TAKAJI）

国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長

研究者番号：40280789

研究成果の概要：

本研究ではC型肝炎ウイルス（HCV）粒子の感染、粒子形成における脂質の役割を明らかにすることを目的とした。成熟HCV粒子表面にはコレステロール、スフィンゴ脂質が存在したことから、HCV粒子が脂質ラフトを含む膜を被っている可能性が示された。HCV粒子形成過程における脂質の関与を解析したところ、ウイルスが存在する分画は脂肪滴分画と一致した。HCV蛋白を含む脂肪滴近傍の脂質に富んだ生体膜分画と精製脂肪滴分画で比較プロテオーム解析を行うことで、HCV粒子形成の“場”に存在する蛋白が検出された。本研究で見いだしたウイルス粒子関連脂質および蛋白質はC型肝炎治療薬開発の新たな標的となる可能性がある。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	0	7,700,000
2008年度	7,900,000	0	7,900,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,600,000	0	15,600,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：研究領域：520，感染マトリックス、研究項目番号：A02

キーワード：HCV、ウイルス、感染実験、コレステロール、スフィンゴ脂質、ラフト

## 1. 研究開始当初の背景

エンベロープウイルスは脂質および蛋白質で構成された二重膜で包まれている。また、RNAウイルスゲノムの複製の場として細胞内の膜構造が重要であることが知られている。これらの事実から膜構造の成分である脂質が重要であることが推測できる。しかし、ウイルスの生活環における脂質の役割はまだ十分に解明されていない。

一方、C型肝炎ウイルス（HCV）感染は我が国だけでなく世界中に多くの患者が存在する重要な感染症である。しかし、HCVに

は効率の良いウイルス培養細胞系が存在しなかった。このため、ウイルス学的な研究が困難であった。最近、申請者らは劇症肝炎患者から分離したJFH-1株を用いて、培養細胞でウイルス粒子を産生させることに成功した。このJFH-1感染増殖培養細胞系を用いることでHCVの感染増殖の生活環の全てが実験室内で再現可能となった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ウイルス培養系を用いて、HCVの生活環における脂質の役割について

解析する。多くのエンベロープウイルスでは感染細胞表面または細胞内の膜構造から出芽してくることが知られているおり、ウイルス粒子を包む膜を解析することで粒子形成の“場”やメカニズムを明らかにできると期待できる。さらに、エンベロープウイルスではウイルス粒子表面のコレステロールがウイルス感染性に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、HCV感染におけるウイルス粒子表面の脂質の役割についての検討を行う。精製ウイルス粒子に含まれる蛋白や脂質の解析をプロテオーム、リポドームの手法を用いて解析を行う。同定された蛋白や脂質の本来の機能をもとにしてHCV感染における役割を解析することにより、病原性発現機構の研究にも役に立つと期待できる。また、宿主蛋白や脂質を標的とする化合物は耐性ウイルスが出現しにくい全く新しい薬剤開発が期待できる。以上のように、ウイルス粒子に含まれる蛋白や脂質の情報はHCV研究に新たな展開をもたらすことが期待できる。さらに、本研究で得られる情報は、他のウイルスあるいは細胞内の脂質に関する研究に応用が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### 1) 精製HCVウイルス粒子の解析

ウイルス粒子の網羅的脂質分子種解析

脂質がウイルス粒子の性状に与える影響

ウイルス粒子と脂質ラフトの結合の解析

#### 2) ウイルス感染過程における脂質の役割

脂質のウイルス感染性に与える影響

脂質は感染のステップのどこに主に影響

を与えているか

#### 3) ウイルスゲノム複製過程における脂質の役割

スフィンゴ脂質合成阻害剤のウイルス

ゲノム複製に与える影響

#### 4) ウイルス粒子形成・分泌過程における脂質の役割

ウイルス粒子形成における脂質ラフトの

解析

スフィンゴ脂質合成阻害剤のウイルス

粒子産生に与える影響

### 4. 研究成果

本研究では培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルス(HCV)粒子の膜脂質の性状を調べ、HCVの感染、粒子形成におけるウイルス膜脂質の役割を明らかにすることを目的とした。Huh-7細胞で産生されたHCV JFH-1株を、培養上清から限外濾過法、ショ糖密度勾配超遠心法、親和性クロマトグラフィ法により粗精製した。HCV粒子に含まれる脂質を生化学的に解析すると、HCV粒子にコレステロールが濃縮されている可能性が示唆された。そこで、膜からコレステロールを除去す

るメチル-β-シクロデキストリン(B-CD)でHCV粒子を処理すると、HCV粒子の密度が増加し、感染性が顕著に低下した。B-CD処理後のHCV粒子にコレステロールを添加したところ、HCV粒子の密度および感染性が回復した。また、膜のスフィンゴミエリンを加水分解する作用のあるスフィンゴミエリン分解酵素(SMase)でHCV粒子を処理すると、感染性が減弱した。これらの薬剤のウイルス感染の初期過程に与える影響を解析した。粒子をB-CD処理、あるいはSMase処理しても、HCV粒子の細胞へのBindingには影響を与えなかったものの、B-CD処理、SMase処理いずれもInternalization効率が著明に低下した。以上から、ウイルス粒子の膜脂質のコレステロールとスフィンゴミエリンが感染初期過程に重要な役割を果たしていることが示された。これらの脂質はラフト様マイクロドメインの主要構成成分であることから、HCV粒子が脂質ラフトを含む膜を被っている可能性が示唆された。成熟したHCVの粒子表面にはコレステロール、スフィンゴ脂質が存在し、ウイルス感染に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。ウイルス粒子関連脂質はC型肝炎治療薬開発の新たな標的となる可能性がある。

HCV粒子の生成過程には細胞内の脂肪滴の関与が報告されている。そこで感染細胞の生体膜をショ糖密度遠心勾配法で分画に分けたところ、HCV蛋白は本来生体膜が存在する密度の分画以外に軽い分画にも検出された。この分画は脂肪滴分画と一致したことから、脂肪滴近傍の脂質に富んだ生体膜を含む可能性がある。さらに、この分画から脂肪滴の精製を行うと生体膜蛋白とHCV蛋白が外れ、脂肪滴成分だけになった。HCV蛋白を含む脂肪滴近傍の脂質に富んだ生体膜分画と精製脂肪滴分画で比較プロテオーム解析を行うことで、HCV粒子形成の“場”に存在する蛋白の同定を行い、約50個の候補蛋白が検出された。現在siRNAによるスクリーニングを進め関与する宿主因子の同定を試みている。ウイルス粒子関連脂質および蛋白質はC型肝炎治療薬開発の新たな標的となる可能性があると考えられた。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計23件)

1. Tasaka M, 他9名 Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. J Gen Virol. 2007 88:3323-33.

2. Zeisel MB, 他5名 Wakita T, 他11名 Scavenger receptor class B type I is a key

- host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology*. 2007 46(6):1722-1731.
3. Sekine-Osajima Y, 他 9 名 Wakita T, Enomoto N, Watanabe M. Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology*. 2008 371(1):71-85.
  4. Ariumi Y, 他 4 名 Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2007 81(24):13922-6.
  5. Miyanari Y, 他 6 名 Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007 9(9):1089-97.
  6. Delgrange D, 他 5 名 Wakita T, Duverlie G, Wychowski C. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol*. 2007 88(9):2495-503.
  7. Kim CS, Jung JH, Wakita T, 他 2 名 Monitoring the antiviral effect of alpha interferon on individual cells. *J Virol*. 2007 81(16):8814-20.
  8. Murayama A, 他 9 名 Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3' X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol*. 2007 81(15):8030-40.
  9. Hiraga N, 他 15 名 Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett*. 2007 581(10):1983-7.
  10. Aizaki H, M 他 7 名 Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2008 82(12):5715-24.
  11. Hara H, 他 10 名 Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol*. 2009 83(10):5137-47.
  12. Kondo Y, 他 4 名 Wakita T, Shimosegawa T, Lai MM. Hepatitis C Virus Infection of T Cells Inhibits Proliferation and Enhances Fas-Mediated Apoptosis by Down-Regulating the Expression of CD44 Splicing Variant 6. *J Infect Dis*. 2009. 199(5):726-736.
  13. Kuroki M, 他 3 名 Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits Hepatitis C Virus RNA Replication through Modulation of the Glutathione Redox System and Oxidative Stress. *J Virol*. 2009. 83(5):2338-48.
  13. Suzuki R, 他 5 名 Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T. Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28{gamma}-Dependent Mechanism. *J Virol*. 2009. 83(5):2389-92.
  14. Nitahara-Kasahara Y, 他 5 名 Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. Cellular vimentin content regulates the protein level of hepatitis C virus core protein and the hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology*. 2009. 383(2):319-27.
  15. Akazawa D, 他 10 名 Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *BBRC*. 2008. 377(3):747-51.
  16. Lan L, 他 7 名 Wakita T, 他 5 名 Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *J Immunol*. 2008 181(7):4926-35.
  17. Kimura T, 他 16 名 Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2008 89(9):2108-13.
  18. Kato T, 他 6 名 Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*. 2008 48(3):732-40.
  19. Ariumi Y, 他 4 名 Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2008 82(19):9639-46.
  20. Murakami K, 他 5 名 Wakita T, Shoji I. Virological characterization of the hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol*. 2008 89(7):1587-92.
  21. Masaki T, 他 8 名 Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein

is critical for the production of infectious virus particles. J Virol. 2008 82(16):7964-76.

22. Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. Virol. 2008. 376(2):397-407.

23. Ishii K, 他8名 Wakita T, Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. BBRC. 2008 371(3):446-50.

〔学会発表〕(計28件)

1. 脇田隆宇, C型肝炎ウイルス培養系の開発とその応用、第43回肝形態科学研究会、2007, 5.30、ホテルグランパシフィックメリディアン

2. 脇田隆宇, Infection and replication of hepatitis C virus、アジア太平洋消化器病週間 Asian Pacific Digestive Week 2007サテライトシンポジウム、2007, 10.17、神戸商工会議所会館

3. 脇田隆宇, C型肝炎ウイルスに対するワクチン開発、第11回日本ワクチン学会学術集会、2007, 12.8-9、パシフィコ横浜

4. 相崎英樹、原弘道、森川賢一、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、脂質のC型肝炎ウイルス感染、粒子形成における役割、第43回日本肝臓学会総会、2007, 5.31-6.1、ホテルグランパシフィックメリディアン

5. 伊達朋子、他6名、脇田隆宇、遺伝子型2a/2b間でのキメラウイルスの作製および性状解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、2007, 10.21-23、札幌コンベンションセンター

6. 村山麻子、他5名、脇田隆宇、HCV JFH-1株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、2007, 10.21-23、札幌コンベンションセンター

7. 加藤孝宣、脇田隆宇、HCV JFH-1株のin vivoでの病原性の検討、日本ウイルス学会第55回学術集会、2007, 10.21-23、札幌コンベンションセンター

8. 赤澤大輔、他7名、脇田隆宇、肝細胞株における感染性HCV粒子の作製と性状解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、2007, 10.21-23、札幌コンベンションセンター

9. T Wakita, H Aizaki, Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, The 7<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International

Conference Center, (2007 9/1-5)

10. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Ishii K, Wakita T, The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

11. Akazawa D, 他7名, Wakita T, Characterization of infectious HCV particles produced from various liver-derived cell lines, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

12. Masaki T, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Analysis of NS5A region for hepatitis C virus particle production, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

13. 脇田隆宇, C型肝炎ウイルス研究の進展:ウイルス増殖からワクチン開発へ、第134回日本医学会シンポジウム「感染症をめぐる最近の話題」、2008, 7. 17、日本医師会館

14. 森川賢一、脇田隆宇、培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルス粒子の免疫原性の解析およびワクチン応用への可能性、第44回日本肝臓学会総会、2008, 6.5-6、愛媛県民文化会館

15. 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆宇、HCV JFH-1株のチンパンジーへの感染実験:in vivo適応変異の機能的解析、第44回日本肝臓学会総会、2008, 6.5-6、愛媛県民文化会館

16. 脇田隆宇、C型肝炎ウイルス研究の最先端、第12回日本肝臓学会大会、2008, 10.1、グランドプリンスホテル新高輪

17. 脇田隆宇、ウイルス培養系を用いたC型肝炎ウイルス研究、日本ウイルス学会第56回学術集会、2008, 10.26-28、岡山コンベンションセンター

18. 原弘道、相崎英樹、他5名、脇田隆宇、鈴木哲朗、creatine kinase BはC型肝炎ウイルスNS4Aとの相互作用によりウイルスゲノム複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働く、日本ウイルス学会第56回学術集会、2008, 10.26-28、岡山コンベンションセンター

19. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、他5名、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV粒子形成におけるNS5A蛋白の役割、日本ウイルス学会第56回学術集会、2008, 10.26-28、岡山コンベンションセンター

20. 山下篤哉、他6名、脇田隆宇、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦、In silico screeningによるHCV NS3プロテアーゼ阻害

化合物の検索、日本ウイルス学会第56回学術集会、2008、10.26-28、岡山コンベンションセンター

21. 脇田隆字、C型肝炎ウイルスのウイルス培養とワクチン開発、第67回日本癌学会学術総会、2008、10.28-30、名古屋国際会議場

22. 有海康雄、他4名、脇田隆字、加藤宜之、ATM DNA 損傷センサーはC型肝炎ウイルスのRNA複製に必要である、第67回日本癌学会学術総会、2008、10.28-30、名古屋国際会議場

23. 脇田隆字、C型肝炎ウイルスの細胞内粒子形成過程の解析、感染現象のマトリックス横糸の会2008、5.29-30、東京大学医科学研究所

24. 相崎英樹、脇田隆字、C型肝炎ウイルスの生活環における脂質の役割に関する研究、感染現象のマトリックス横糸の会、2008、6.28-29、兵庫医科大学

25. 相崎英樹、他7名、花田賢太郎、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗、脂質のC型肝炎ウイルス感染における役割、第31回日本分子生物学会年会、2008.12.9-12、神戸ポートアイランド

26. T Wakita. HCV culture system and antiviral development, 21<sup>st</sup> International Conference on Antiviral Research (ICAR), Montreal, Quebec, Canada (April 13-17, 2008)

27. T Wakita. Hepatitis C virus replication and virus particle formation, Symposium: Emerging Viruses and the Control of Viruses, XIVth International Congress of Virology, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey

28. H Aizaki, 他4名, K Hanada, Y Matsuura, M Lai, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki, Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, XIVth International Congress of Virology, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

脇田 隆字 (WAKITA TAKAJI)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長

研究者番号：40280789

### (2) 研究分担者

花田 賢太郎 (HARADA KENTARO)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号：30192701

相崎 英樹 (AIZAKI HIDEKI)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・

主任研究官

研究者番号：00333360

### (3) 連携研究者

なし