

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780226
 研究課題名 (和文) 日本脳炎ウイルスコア蛋白質によるウイルス増殖促進機構の解明
 研究課題名 (英文) Study on enhancement of Japanese encephalitis virus replication by the core protein
 研究代表者
 森 嘉生 (MORI YOSHIO)
 大阪大学・微生物病研究所・助教
 研究者番号：40379095

研究成果の概要：

日本脳炎ウイルスのコア蛋白質はウイルス粒子を形成する以外にも、ウイルス RNA の複製促進にも機能している。コア蛋白質はカテプシン L によって切断を受け、特定の細胞内での増殖性に関与していることが明らかとなった。また、同じフラビウイルス科ウイルスである C 型肝炎ウイルスのコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによる切断は、コア蛋白質の界面活性剤耐性膜局在およびウイルス粒子形成に必須であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：病原ウイルス学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：フラビウイルス、日本脳炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、コア蛋白質、カテプシン L、シグナルペプチドペプチダーゼ

1. 研究開始当初の背景

日本脳炎ウイルスをはじめとするフラビウイルスは、宿主細胞の細胞質内で複製・増殖を行うことが知られている。一方で、ヌクレオキャプシドの構成成分であるコア蛋白質は、感染細胞の細胞質だけでなく、粒子形成とは関係なく核内に局在することが知られている。これまでに研究代表者は核移行したコア蛋白質がウイルスの複製に重要な役割を果たすことを示唆してきた。また、フラビウイルス

のコア蛋白質は、さまざまな宿主蛋白質と相互作用し、アポトーシス誘導や細胞周期の調節をしていることが報告されている。日本脳炎ウイルスにおいては核タンパク質である B23 とコア蛋白質との相互作用を既に報告している。フラビウイルスのコア蛋白質がこのような多機能性を発揮するためには、何らかの翻訳後修飾が関与していることが示唆されている。

2. 研究の目的

- (1) 日本脳炎ウイルスコア蛋白質と B23 の結合によるウイルス増殖促進の分子メカニズムの解明を目的とする。
- (2) カテプシン L で切断された日本脳炎ウイルスコア蛋白質によるウイルス増殖促進の分子メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

フラビウイルスのコア蛋白質のプロセッシングがウイルス複製にどのように関与するかを、日本脳炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスについて以下の方法で検討した。

- (1) コア蛋白質を細胞内で切断するプロテアーゼの同定。
- (2) 各種プロテアーゼによって切断を受けるコア蛋白質の部位の同定。
- (3) 各種プロテアーゼの阻害によるウイルス増殖等への影響の検討。
- (4) 各種プロテアーゼ切断に耐性を持つ変異ウイルスの作製とその性状解析。

4. 研究成果

- (1) SiRNA によるノックダウンあるいはカテプシンLの過剰発現による検討により、日本脳炎ウイルスコア蛋白質がカテプシンLによって、アミノ酸17位と18位間で切断を受けることが明らかとなった(図1)。

コア蛋白質はアミノ酸17位のロイシンをアラニンに置換することでカテプシンLに耐性となることが分かった。この変異を導入した変異ウイルスは、マクロファージや神経細胞内での増殖性およびマウスに対する病原性が著しく減弱しており、これらの細胞での増殖あるいは病原性に関与していることが明らかとなった(図2)。

カテプシンLによって切断を受けたコア蛋白質は核移行能を維持しており、B23への結合能も変化は認められないことから、切断を受けたコア蛋白質は粒子形成には関与せず、細胞内での調節蛋白質として何らかの機能を果たしていることが示唆された。以上のことから、コア蛋白質の詳細な機能を解析する有用な情報を得ることが出来た。また、カテプシンLに対する阻害薬が日本脳炎ウイルスに対する抗ウイルス薬の候補として考えられた。

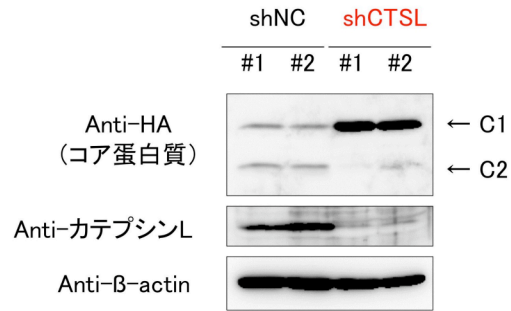


図1 カテプシンLのノックダウンによる日本脳炎ウイルスコア蛋白質プロセッシングの影響

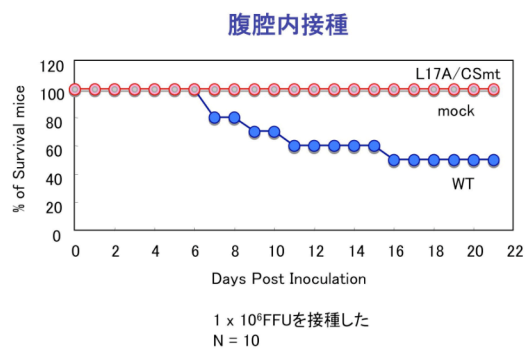


図2 カテプシンL耐性コア蛋白質を持つ変異日本脳炎ウイルス(L17A/CSmt)のマウスに対する病原性

- (2) C型肝炎ウイルスコア蛋白質がペプチドペプチダーゼによって切断を受ける部位をアミノ酸177位と178位間であることを初めて哺乳動物細胞で同定した(図3)。また、SPPに対する阻害剤や、SPPのドミナントネガティブ変異体あるいは、SPP切断耐性ウイルスを用いた検討から、この切断がコア蛋白質の界面活性剤耐性膜局在およびウイルス粒子形成に必須であることを明らかにした。これにより、SPPによって切断されたコア蛋白質は界面活性剤耐性膜画分(DRM)に移行し、そこでウイルス粒子形成が行われる可能性が示唆された(図4)。また、ペプチドペプチダーゼに対する阻害薬がC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス薬の候補として考えられた。

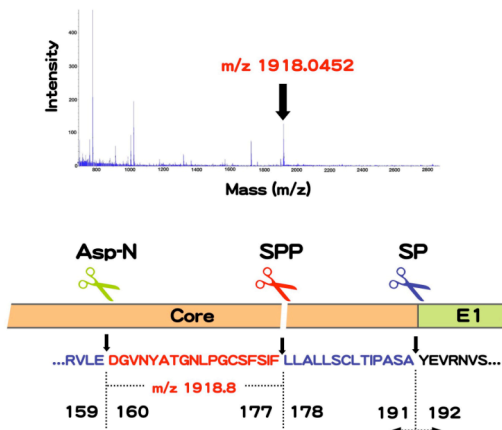


図3 ヒト由来培養細胞でC型肝炎ウイルスのコア蛋白質を発現精製し、マスマスペクトロメトリーにより、シグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) による切断部位を同定した。

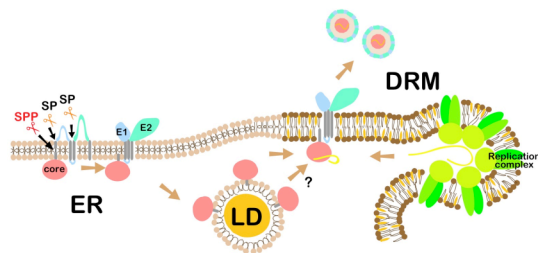


図4 C型肝炎ウイルスコア蛋白質の成熟とウイルス粒子形成の模式図。SPPによって切断されたコア蛋白質は界面活性剤耐性膜画分 (DRM) に移行し、そこでウイルス粒子形成が行われる可能性が示唆される。

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6件)

- ① Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation.
K. Okamoto*, Y. Mori*, Y. Komoda, T. Okamoto, M. Okochi, M. Takeda, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008)
*These authors equally contributed to this work. (査読有り)

- ② Hepatitis C virus core protein: Its coordinate roles with PA28gamma in metabolic abnormality and carcinogenicity in the liver
Y. Mori, K. Moriishi, and Y. Matsuura. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 40, 1437-1442 (2008). (査読有り)

- ③ Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å.
T. Yamashita, H. Unno, Y. Mori, H. Tani, K. Moriishi, A. Takamizawa, M. Agoh, T. Tsukihara, and Y. Matsuura. *Virology*, 373, 426-436 (2008). (査読有り)

- ④ Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication.
S. Tagawa, T. Okamoto, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008). (査読有り)

- ⑤ 森 嘉生、森石恆司、松浦善治 HCV複製に必須な宿主因子の同定と創薬の可能性、細胞工学、27、1226-1231、(2008)。(査読無し)

- ⑥ Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells.
Y. Mori, T. Yamashita, Y. Tanaka, Y. Tsuda, T. Abe, K. Moriishi, and Y. Matsuura. *J. Virol.*, 81, 8477-8487, (2007). (査読有り)

[学会発表] (計2件)

- ① Y. Mori et al. Intramembrane processing by SPP regulates membrane of HCV core protein and viral propagation.
14th International symposium on hepatitis C virus & related viruses. 2007年9月10日 Glasgow, UK
- ② 森 嘉生 ほか C型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼに

よるプロセッシングの生物学的意義
第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007
年 10 月 22 日 札幌

〔図書〕 (計 1 件)

「タンパク質の事典」 猪飼篤・伏見譲・ト
部格・上野川修一・中村春木・浜窪隆雄編、
朝倉書店、2008 173-178
森 嘉生、谷 英樹、松浦善治

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 嘉生 (MORI YOSHIO)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：40379095

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし