

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590767

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス蛋白と相互作用する脂質ラフト構成宿主蛋白の解析

研究課題名(英文) Identification of the host lipid raft protein which interacts with hepatitis C virus protein

研究代表者

井上 泰輔 (INOUE TAISUKE)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・講師

研究者番号：90422691

研究成果の概要(和文)

HCV 蛋白と結合し複製複合体を形成する宿主蛋白の同定の為、Proteomics 解析である Tandem affinity purification(TAP)と、Mass spectrometry analysis で検討した。NS5B と結合する宿主蛋白として α -tubulin が同定された。HCV レプリコン発現細胞で α -tubulin を抑制すると、レプリコン RNA 量は 60% へと減少した。 α -tubulin は NS5B と結合し、複製複合体の構成に関与し、この結合は HCV RNA 増殖に重要な役割を持つことが示された。

研究成果の概要(英文)

Hepatitis C virus(HCV) non structural proteins and host proteins are believed to be involved in HCV replication complex on lipid raft. To identify these host proteins that interact with HCV proteins, we employed the proteomics approach, combination of tandem affinity purification(TAP) method and mass spectrometry analysis. α -tubulin was identified as a novel HCV NS5B binding protein. Interaction between these two proteins was confirmed by the immunohistochemistry study and the co-immunoprecipitation study. To examine the effect of the interaction between these two proteins, α -tubulin expression was suppressed by siRNA on the HCV replicon stably expressing cells. By real-time PCR method, the HCV replicon RNA level was suppressed to 60% on the α -tubulin knock down cells. These results suggest that α -tubulin interacts with HCV NS5B protein and this interaction may be important for the HCV RNA replication. Further studies to identify direct interacting domain are required.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：C型肝炎ウイルス、HCV NS5B、 α -tubulin、複製複合体、プロテオミクス解析

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルスは1989年に発見され20

年余りが経つが、現在までのところ効果が十分といえる抗ウイルス治療が確立されてい

ない。本邦での 150 万人以上と推測されるキャリアー中約 7 割を占める Genotype 1b、高ウイルス量の、いわゆる難治性なタイプでのインターフェロン治療効果は約 50%であり、無効例では肝硬変、肝癌、肝不全への進行が高頻度で起こりうる。こうした抗 HCV 治療の研究が困難である背景として、ウイルス培養系が確立されておらず、ウイルス増殖のメカニズムが十分解明されていないことが大きな要因といえる。そうした中で近年、HCV 遺伝子を含む構造の細胞内発現が可能となり、HCV 増殖を模したシステムである、HCV レプリコンが開発され HCV 増殖様式の解明について新たな道が開けた。HCV の増殖は HCV レプリコンを用いた研究により、HCV 非構造蛋白のうち NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B が、脂質ラフトと呼ばれる脂質に富み細胞核周辺に存在する特殊な膜上で複製複合体を形成して行われるとされている。多くの他のウイルスの場合がそうであるように、この複製複合体には宿主蛋白も複数関与すると考えられている。こうしたウイルス蛋白と相互作用する宿主蛋白の同定のためにはイースト 2 ハイブリッド法が多く報告で用いられてきた。HCV NS 蛋白のパートナー蛋白も数種類報告されているが、複製複合体の全体像を把握するには至っていない。

近年、質量分析機を用いたプロテオミクス解析が進歩しており、新たなウイルス-宿主蛋白相互作用の検討へ利用可能と考え、本研究が立案された。今回用いた tandem affinity purification (TAP) と Tandem mass spectrometry (MS/MS) を組み合わせた手法は、当初イーストを用いた系で蛋白相互作用を検出する手法として報告され、本研究開始当初、哺乳類細胞を用いた系での研究はそれほど進んでいない状況であった。TAP プラス MS/MS と、イースト 2 ハイブリッド法での蛋白相互作用同定の比較をした検討では、わずか 10 数パーセントがオーバーラップのみであったとの報告もあり、新たな手法により、これまで検出不可能であった新たな宿主蛋白の同定を可能とする期待が持たれた。

2. 研究の目的

HCV 複製複合体を構成する HCV 非構造蛋白と相互作用する宿主蛋白を同定し、複製複合体の構造を解明すること、その宿主蛋白の HCV 増殖への影響を検討することにより、HCV RNA 増殖に必要な宿主蛋白を発見することが本研究の目的である。こうした蛋白が同定されれば、HCV 増殖のウイルス学的な解明に加え、相互作用を阻害することによるウイルス増殖の抑制、ひいては HCV 感染症への治療についての検討にも繋がる可能性を秘め、重要な意味を持つと考えられる。

また研究手法として、近年新たな蛋白相互

作用の解明に導入されたプロテオミクス解析を当初報告され始めたイーストでの系で無く、哺乳類細胞で行うことにより、新たな実験系を確立することも 1 つの目的とした。

3. 研究の方法

解析対象 HCV 非構造蛋白として、HCV RNA ポリメラーゼであり HCV 複製複合体の中心的な蛋白と考えられる HCV NS5B を選択した。プロテイン A とカルモジュリン結合蛋白の間に TEV 切断部を持つ TAP タグとよばれる精製用タグを付加した HCV NS5B を 293 細胞に発現させ、IgG ビーズとカルモジュリンビーズによる 2 重の精製法である TAP 法をおこなう事により、バックグラウンドの少ない HCV NS5B 結合蛋白が精製可能であった。

TAP により精製された HCV NS5B 結合蛋白を、SDS-PAGE 電気泳動で分離すると、数本の特異的なバンドが分離された。このうち目立つバンド数本をゲルから切り出し、質量分析機を用いた MS/MS で同定した。こうして同定された蛋白は数種類認められたが、その中で解析対象宿主蛋白とした。

HCV NS5B と α -tubulin の結合の確認のため、まず抗 HCV NS5B 抗体と抗 α -tubulin 抗体で HCV NS5B 発現細胞の免疫組織染色をおこない、共焦点顕微鏡で観察した。次に免疫沈降法での確認をおこなった。HCV レプリコン発現細胞において抗 α -tubulin 抗体で免疫沈降し、抗 HCV NS5B 抗体でのウエスタンブロットティングにより検出した。また逆に抗 HCV NS5B 抗体で免疫沈降した場合は、精製にもちいたプロテイン A が α -tubulin と分子量が近く、ウエスタンブロットティング時に重なってしまい検出が困難なため、35S でラベルしてオートラジオグラフィで検出し、ポジティブコントロールとの分子量の比較で確認した。免疫沈降実験時の細胞溶解液作成条件は困難であり、HCV NS5B が存在すると考えられる脂質ラフトは脂溶性であるため、溶解液中に十分分離するには十分な界面活性剤が必要であるが、過剰となると宿主蛋白との結合を阻害することとなりうる。そのため数種類の条件の検討が必要であったが、最終的にはサポニンを添加することにより良好な条件が設定できた。

α -tubulin の HCV RNA 増殖への影響を検討するため、HCV レプリコン RNA を持続発現する Huh7 細胞において、 α -tubulin を siRNA で抑制し、HCV レプリコン RNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。

4. 研究成果

TAP と MS/MS を組み合わせたプロテオミクス解析により HCV NS5B 結合蛋白がヒートショック蛋白等数種類同定された。その 1 つに、細胞骨格の 1 種である微小管を構成

する α -tubulinが認められた。HCV感染細胞内では特徴的な微小管凝集が観察されると、HCV発見以前に非A非B型肝炎といわれていた時代から報告されており、HCV感染において微小管構造の変化がもたらされると考えられ、両者の相互作用がHCV増殖に関与する可能性を考慮し、その後の解析対象宿主蛋白として α -tubulinを選択した。

免疫組織染色と共焦点顕微鏡観察でHCV NS5Bと α -tubulinは、脂質ラフトが存在すると考えられている細胞核周囲に同一の局在を示した。免疫沈降法では抗NS5B抗体と抗 α -tubulin抗体を沈降用、検出用に入れ替えた両方向で検出された。これら2種の解析によりHCV NS5Bと α -tubulinの結合が確認された。

Huh7細胞において α -tubulinに対するsiRNAを用いて α -tubulin発現を抑制したところ、コントロールに比較し約30%へと減少した。この条件でHCVレプリコンを持続発現しているHuh7細胞において α -tubulinをsiRNAで抑制したところ、HCVレプリコンRNA発現量は、コントロールに比較し約60%へと減少した。 α -tubulinの抑制によりHCVレプリコンRNAが減少したことにより、両蛋白の相互作用がHCV RNA増殖において重要な意味を持つことが示唆された。

文献的にも、C型肝炎ウイルスや同じフラビウイルス族のKunjinウイルスで微小管重合阻害薬のvinblastin sulfateやcolchicine、nocodazoleなどが、これらのウイルス増殖を抑制するとの報告があり、本研究により導かれたHCV増殖への微小管の関与を裏付けるものと考えられる。しかしこれまでHCV NS5Bと α -tubulinが直接相互作用することは報告されておらず、今回の知見はHCV感染と微小管の関連についての新たな解明に繋がる情報といえる。

HCV NS5Bと α -tubulin両蛋白の直接の結合ドメインを同定すること、そのドメインへの変異導入がHCV RNA増殖へ与える影響についての検討が、今後の課題である。また、今回のプロテオミクス手法により同定され、今回さらなる追加検討を行っていない、HCV NS5B結合宿主蛋白候補が数種類あり、それら別蛋白についての検討も興味深い。

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3件)

1. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading

frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. Hepatol Int. 2011 Mar 査読あり

2. Matsui A, Yamaguchi T, Markawa S, Miyazaki C, Takano S, Uetake T, Inoue T, Otaka M, Otsuka H, Sato T, Yamashita A, Takahashi Y, Enomoto N. DICKKOPF-4 and -2 genes are upregulated in human colorectal cancer. Cancer Sci. 2009 Oct 100(10):1923-30. 査読あり

3. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. J Infect Dis. 2008 Feb 1;197(3):361-70. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

1. Inoue T, Amemiya F, Stanley M. Lemon, Makino S, Enomoto N. α -tubulin is Identified as an Interacting Partner of Hepatitis C NS5B by Proteomics Analysis. 17th APASL Conference, Kyoto, Japan. Mar 27-30 2007.

2. Inoue T, Huang C, Sugiyama K, Mizutani T, Soon B Hwang, Enomoto N, Makino S. Proteomics analysis identifies an interaction between Hepatitis C Virus NS5B and α -tubulin. 13th International Meeting on Hepatitis C virus and Related Viruses, Cairns, Australia. Aug 27-31 2006.

〔図書〕(計1件)

1. 井上 泰輔, Cheng Huang, Kazuo Sugiyama, Tetsuya Mizutani, Soon B Hwang, Stanly M Lemon, Shinji Makino, 榎本 信幸. Proteomics解析の手法を用いたC型肝炎ウイルス蛋白と宿主細胞蛋白の相互作用の検討. 消化器発癌における炎症・再生・細胞応答の役割 小俣 政男(学術アドバイザー) アークメディア 2007年

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 泰輔 (INOUE TAISUKE)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・講

師

研究者番号：90422691

(2)研究分担者

榎本 信幸 (ENOMOTO NOBUYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：20251530

(3)連携研究者

なし