

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月 7日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590519

研究課題名（和文）C型肝炎ウイルス NS2 蛋白質が感染性粒子形成に関与するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Dissect the role of hepatitis C virus NS2 protein in virus assembly

研究代表者

鈴木 亮介（SUZUKI RYOSUKE）

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：50342902

研究成果の概要（和文）：分割ユビキチン法を利用した酵母 Two-Hybrid スクリーニング系を用い、C型肝炎ウイルス（HCV）の NS2 蛋白質と相互作用を示す宿主因子を探索し、ヒト肝臓ライブラリーより 37 種類の候補遺伝子を同定した。これらの宿主蛋白質の発現レベルの低下が HCV 増殖に及ぼす影響を調べ、ウイルス産生を顕著に抑制する新規宿主因子を見いだした。この宿主因子のノックダウンはウイルスの感染およびゲノム複製には影響しないことから、粒子形成に関与すると考えられた。さらにこの宿主因子のノックダウンは HCV の NS2 と E2 の相互作用を減弱させる事を見だし、HCV NS2 が感染性粒子形成に関与するメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 2 (NS2) is a membrane-associated cysteine autoprotease that mediates cleavage of its own carboxyl terminus from NS3. In addition to its role in polyprotein processing, emerging evidence indicates that NS2 plays crucial role in assembly of infectious virus particle. However, biological significance of NS2 in the HCV assembly remains unclear. In this study, we screened human liver cDNA libraries by split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid assay using NS2 as a bait, and identified several NS2-interacting proteins. Following siRNA screening identified a membrane-associated cellular protein that is involved in HCV production. Gene silencing of the host factor resulted in no effect on the entry and RNA replication of HCV, suggesting that this host factor is involved in HCV assembly step. Interaction of the host factor with NS2 in mammalian cells was confirmed. Finding of this study may provide important information for understanding the molecular mechanism of assembly and formation of infectious HCV particles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	0	1,700,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	600,000	15,000	615,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	15,000	3,415,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HCV、NS2、粒子形成、感染性粒子、宿主因子

1. 研究開始当初の背景

HCV 感染者は国内でも 200 万人以上と言われ、その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと移行し、肝癌による死亡者は年間 3 万人を超えている。HCV はその発見以来、効率の良いウイルス培養細胞系が存在しなかったため、ウイルス生活環の情報に乏しく、抗ウイルス剤の研究開発も遅れていた。しかし 2005 年に劇症肝炎患者からの分離株 (JFH-1) が培養細胞で効率良く増殖する事が報告されて以来、JFH-1 由来のクローンを用いる事により、リバーシジェネティクスも可能となり、HCV の生活環に関する研究は近年急速に進展しつつある。

HCV の NS2 蛋白質は膜 3 回貫通蛋白質であり、C 末端側に NS2/3 間を切断するプロテアーゼ活性を有する。ウイルス粒子を構成しない非構造蛋白質であるにもかかわらず、ウイルスゲノムの複製には必須ではない。最近になって、この NS2 蛋白質がプロテアーゼ活性の他に、ウイルス感染性粒子の形成に重要な役割を担っている事を示唆する事が報告されているが、そのメカニズムは依然として全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HCV の NS2 蛋白質がどのようなメカニズムで感染性粒子形成に関わっているのかを明らかにするために、NS2 蛋白質と相互作用を示す宿主蛋白質を同定し、その機能を明らかにする事である。

3. 研究の方法

(1) NS2 蛋白質は 3 回膜貫通蛋白質であると考えられており、従来の酵母 Two-Hybrid スクリーニング法では結合蛋白質のスクリーニングが困難である。その為、膜蛋白質の蛋白質相互作用を解析する事が可能な分割ユビキチン法を利用した酵母 Two-Hybrid スクリーニング系を用いて、ヒト肝臓ライブラリーより新規蛋白質の同定を行う。

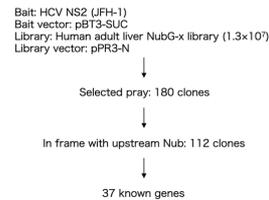
(2) 同定した宿主蛋白質について遺伝子をクローニングし、HCV NS2 蛋白質と相互作用を哺乳動物細胞で確認する。また互いの相互作用責任領域を各種欠損変異体を用いて決定する。

(3) 同定した宿主蛋白質を siRNA によりノックダウンさせ、細胞内の宿主蛋白質の発現レベルの低下が HCV の増殖にどう影響するかを、HCV 感染 3 日後の培養上清中のウイルス力価を測定する事により評価する。

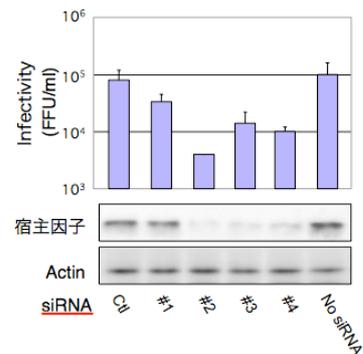
(4) HCV の増殖に重要な宿主因子がウイルスの生活環のどの過程に関わっているかを解析する。

4. 研究成果

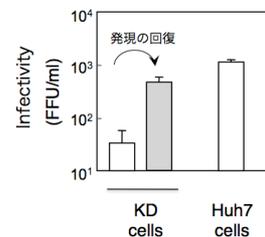
(1) ヒト肝臓ライブラリーより JFH-1 株の NS2 蛋白質を bait としてスクリーニングした結果、37 種類の NS2 結合蛋白質候補遺伝子を同定した。



(2) siRNA の導入により顕著にウイルス産生を抑制する宿主因子を見いだした。ウイルスの産生量は細胞内での発現レベルと逆相関を示した。



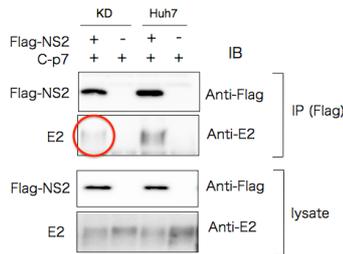
(3) この宿主因子の shRNA 発現プラスミドを構築し、HCV の感染、複製を許容するヒト肝臓由来培養細胞から、この宿主因子が恒常的にノックダウンされている細胞株を樹立した。この細胞株では HCV の増殖は顕著に抑制されていたが、shRNA のターゲット領域に変異を持つ宿主因子の遺伝子を用いてその発現を回復させると、HCV の増殖能も回復した。



(4) この宿主因子のノックダウンはウイルスの感染およびゲノム複製には影響しなかった。

(5) HCV の NS2 蛋白質は他のウイルス蛋白質と相互作用する事により、ウイルスの粒子形

成に関わると考えられている為、この宿主因子のノックダウンが HCV 蛋白質同士の相互作用に及ぼす影響を解析したところ、宿主因子のノックダウンは HCV の NS2 と E2 の相互作用を減弱させる事が明らかとなった。



(6) 以上の結果から、HCV NS2 に結合し、さらに感染性粒子形成に関与する新規宿主因子の同定に成功すると共に、そのメカニズムの一端を明らかにする事が出来た。

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 Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol.* 2010 ;84:5824-35. 2010

DOI:10.1128/JVI.02397-09

② Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology.* 2010;52:411-20.

DOI:10.1002/hep.23680

③ Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol.* 2009 ;47:4141-3.

DOI:10.1128/JCM.01437-09

④ Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem.* 2011;286:37264-73.

DOI:10.1074/jbc.M111.259085

⑤ Winkelmann ER, Widman DG, Suzuki R, Mason PW. Analyses of mutations selected

by passaging a chimeric flavivirus identify mutations that alter infectivity and reveal an interaction between the structural proteins and the nonstructural glycoprotein NS1. *Virology.* 2011;421(2):96-104.

DOI:10.1016/j.virol.2011.09.007

⑥ Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002561.

DOI:10.1371/journal.ppat.1002561

[学会発表] (計 19 件)

① Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma and E6AP in the degradation of HCV core protein and the viral production. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France 2009. 10. 3-7.

② Suzuki R, Saito K, Ando T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Plasmid-based production of trans-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France 2009. 10. 3-7.

③ 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治. HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御. 日本ウイルス学会第 57 回学術集会, 東京, 2009 年 10 月 25-27 日.

④ 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗. C 型肝炎ウイルスの trans-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析. 日本ウイルス学会第 57 回学術集会, 東京, 2009 年 10 月 25-27 日.

⑤ 木村敬郎、鈴木亮介、山越智、鈴木健裕、堂前直、勝二郁夫、松浦善治、千葉丈、脇田隆字、鈴木哲朗. Prohibitin 2 は C 型肝炎ウイルス (HCV) NS5A 蛋白と相互作用し HCV 複製調節に働く. 日本ウイルス学会第 57 回学術集会, 東京, 2009 年 10 月 25-27 日.

⑥ Suzuki R, Alazawa D, Ishii K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Entry mechanisms of hepatitis C virus examined by trans-complemented particles. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses. Atlanta, GA, USA 2010. 5. 17-23.

⑦ Suzuki R, Alazawa D, Ishii K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Efficient

production of trans-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Yokohama, Japan 2010. 9. 10-14.

⑧鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗. C型肝炎ウイルスの trans-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析. 日本ウイルス学会第58回学術集会, 徳島, 2010年11月7-9日.

⑨鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、鈴木哲朗. 分割ユビキチン法を利用した HCV NS2 と結合する宿主因子の探索およびウイルス粒子形成への関与. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2010年12月7-10日.

⑩Aizaki H, Matsumoto Y, Goto K, Watashi K, Suzuki R, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Motojima K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.

⑪Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.

⑫Takebe Y, Uenishi R, Tani H, Suzuki R, Takagi M, Hase S, Liao H, Tsuchiura T, Shinya K, Wakita T, Matsuura Y, Patel A. Small molecules that elicit strong anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptor. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.

⑬ Fukasawa M, Shirasago Y, Saito K, Murakami Y, Fukazawa H, Suzuki T, Suzuki R, Wakita T, Hanada K, Chiba J. Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.

⑭Goto K, Kimura T, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Miyamura T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.

⑮Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.

⑯Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, Aizaki H. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with NS2. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seattle, WA, USA 2011.9. 8-12.

⑰Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, Aizaki H. Identification of host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011 9. 11-16.

⑱Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011 9. 11-16.

⑲ Matsumoto Y, Watashi K, Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011 9. 11-16.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計2件)

名称: C型肝炎ウイルス粒子高生産系
発明者: 脇田隆字、石井孝司、鈴木哲朗、鈴木亮介、宮村達男、田邊純一、曾根三郎

番号: 1956087

国内外の別: E P

名称: 新規組換え型ヒトC型肝炎ウイルス様粒子とその産生方法

発明者: 脇田隆字、石井孝司、鈴木哲朗、鈴木亮介、宮村達男、田邊純一、曾根三郎

番号: 1930416

国内外の別: E P

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亮介 (SUZUKI RYOSUKE)
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：50342902

(2) 研究分担者

鈴木 哲朗 (SUZUKI TETSURO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：00250184

(3) 連携研究者

なし