

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790693

研究課題名（和文） C 型肝炎ウイルスの粒子形成を制御する分子機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms underlying the assembly of hepatitis C virus particles

研究代表者

政木 隆博（Takahiro Masaki）

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：60535657

研究成果の概要：

C型肝炎ウイルス（HCV）の生活環は、ウイルス蛋白質同士あるいはウイルス蛋白質が様々な細胞性宿主因子と相互作用することによって維持されている。特に、生活環において最も重要なステップの一つである粒子形成には、非構造蛋白質 5A（NS5A）とコア蛋白質（Core）間の相互作用が必須であること、また、NS5A-Core 間相互作用には、NS5A の C 末端領域に存在するセリン残基クラスターのリン酸化が必要である可能性が示されている。本研究目的は、HCV 粒子形成に重要な NS5A-Core 間相互作用を制御する分子機構を明らかにすることであり、(1) NS5A-Core 間相互作用に関わる相互作用領域の同定、(2) NS5A-Core 間相互作用に関与する細胞性宿主因子の同定、(3) NS5A のリン酸化及び粒子形成を制御するプロテインキナーゼ（PK）の同定、を目指し解析を行った。(1)に関しては、精製 Core、NS5A 蛋白質を用いた pull-down 解析により、相互作用領域として Core の aa 117-173 領域、NS5A の domain 3 領域を見出した。(2)に関しては、蛋白質間相互作用をハイスループットで解析可能な AlphaScreen 法を用いて、NS5A 及び Core の両者に結合親和性の高い細胞性宿主因子である CK2 α 2 を同定した。(3)に関しては、AlphaScreen 解析及び *in vitro* リン酸化アッセイを施行し、NS5A と相互作用し、NS5A をリン酸化する PK を 9 種類同定した。さらに、siRNA を用いたノックダウン実験により、これらの中から HCV の粒子形成過程に関与する PK を 3 種類（CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2）取得した。本研究は、HCV 粒子形成機構の解明に加え、新たな創薬標的の同定や創薬開発に道を拓く可能性を有する。

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,900,000	0	1,900,000
平成 22 年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

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：HCV、NS5A、Core、粒子形成、リン酸化、プロテインキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス（HCV）は、公衆衛生上きわめて重要なウイルスである。本邦では約200万人の感染者が存在し、持続感染後肝硬変を

経て高率に肝細胞癌を引き起こす。主たる治療法であるペグインターフェロンとリバビリンの併用療法もその効果は未だ充分とはいえない。また、HCVは変異しやすいウイルスで

あり、多剤併用療法が望ましい。そのため、従来の抗HCV薬とは異なる作用点をもつ治療法の開発が急務である。

HCV の生活環は、ウイルス蛋白質同士あるいはウイルス蛋白質が様々な細胞性宿主因子と相互作用することによって維持されている。特に、生活環において最も重要なステップの一つである粒子形成には、非構造蛋白質 5A (NS5A) とコア蛋白質 (Core) 間の相互作用が必須であることが示されている。また、NS5A-Core 間相互作用には、NS5A の C 末端領域に存在するセリン残基クラスターのリン酸化が必要であることから、プロテインキナーゼ (PK) などの細胞性宿主因子がこの相互作用の制御に関わっている可能性がある。NS5A-Core 間相互作用やこの相互作用に関与する細胞性宿主因子は、粒子形成過程を制御する新規治療法の標的としても魅力的である。

2. 研究の目的

本研究目的は、HCV の粒子形成を制御する分子機構を解析することであり、具体的には以下の 3 項目、(1) NS5A-Core 間相互作用に関わる相互作用領域の同定、(2) NS5A-Core 間相互作用に関与する細胞性宿主因子の同定、(3) NS5A のリン酸化及び粒子形成を制御する PK の同定、を行う。

3. 研究の方法

(1) NS5A-Core間相互作用に関わる相互作用領域の同定

NS5A及びCoreについて様々なdeletion蛋白質を発現するプラスミドを作製し、細胞に導入後、免疫沈降-ウエスタンブロッティング法により相互作用に重要なNS5A領域及びCore領域を解析した。また、精製蛋白質を用いた *in vitro*での相互作用解析も行なった。

(2) NS5A-Core間相互作用に関与する細胞性宿主因子の同定

NS5A-Core 複合体に特異的に結合する細胞性宿主因子を探索するために、野生型 JFH-1 RNA と変異型 JFH-1 RNA (NS5A の C 末端領域に変異が導入されており、NS5A-Core 間相互作用及びウイルス粒子形成効率が著しく障害されるもの) をエレクトロポレーション法により HuH-7 細胞に導入し、抗 NS5A 抗体で免疫沈降後、免疫沈降産物を SDS-PAGE で分離した。泳動後のゲルを銀染色し、両サンプル間においてバンドパターンの比較を行った。また、両蛋白質を Myc もしくは Flag タグを融合させた形で細胞内に発現させ、抗 Myc 抗体、抗 Flag 抗体による二段階の免疫沈降反応後に得られたサンプルに対しても同様の解析を行った。

(3) NS5Aのリン酸化及び粒子形成を制御するPKの同定

1. NS5Aを基質とするPKの網羅的探索

NS5Aを基質とするPKを探索するために、まず、NS5Aと相互作用するPKの同定を試みた。具体的には、NS5A蛋白質をコムギ胚芽無細胞転写・翻訳系で合成した。また、404種類のPKを包括するcDNAライブラリーから同様の方法でPKを取得した。その後、NS5AとPKの相互作用をハイスループットな定量解析が可能である *AlphaScreen*法を用いて解析した。次に、NS5Aとの間に強い相互作用が認められたPKに関して、NS5Aに対するリン酸化能を調べた。リン酸化能の評価は、精製PKを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在化において精製NS5A蛋白質と混和し、SDS-PAGEで展開後、オートラジオグラフィーを用いてリン酸化NS5Aのバンドを検出することにより行った (*in vitro*リン酸化アッセイ)。

2. HCVの粒子形成を制御するPKの同定

HCV の細胞侵入過程の解析には、HCV エンペロープ蛋白質を粒子表面に被ったシュードタイプウイルスを使用した。HCV ゲノム複製能はサブゲノミックレプリコン RNA を用いて、また、粒子形成能は全長 HCV RNA もしくは感染性ウイルス粒子を用いて解析した。細胞には HuH-7 細胞及びその派生株を使用した。候補宿主因子及び PK の細胞内発現を siRNA によりノックダウンした後、HCV 感染もしくは HCV RNA の導入を行い、HCV の細胞侵入効率、ゲノム複製能、粒子形成能を評価した。また、NS5A のリン酸化状態をウエスタンブロッティング法により解析した。培養上清中の感染性ウイルス粒子量の測定は、培養上清を非感染細胞に処理後、感染巣 (フォーカス) をカウントし、1 mL あたりのフォーカス形成単位 (FFU) を算出することにより行った。

4. 研究成果

(1) NS5A-Core間相互作用に関わる相互作用領域の同定

プラスミド導入後の免疫沈降-ウエスタンブロッティング法では相互作用領域の同定には至らなかったが、精製Core、NS5A蛋白質を用いたpull-down解析により、相互作用領域としてCoreのaa 117-173領域、NS5Aのdomain 3領域を見出した。

(2) NS5A-Core間相互作用を制御する細胞性宿主因子の同定

抗NS5A抗体による免疫沈降産物のバンドパターンに関して、野生型JFH-1 RNA導入細胞と変異型JFH-1 RNA導入細胞との間に幾つかの相違がみられた。具体的には、約200 kDaと約170 kDaのバンドは野生型JFH-1 RNA導入細胞に多く、約35 kDaのバンドは変異型JFH-1 RNA導入細胞に多く認められた。しかし、免疫沈降産物の精製度を高めることが困難であり、特定の細胞性宿主因子の同定には至らなかった。Myc付加NS5A及びFlag付加Coreを

細胞内に共発現させた系では、抗Myc抗体、抗Flag抗体による二段階の免疫沈降反応後に沈降産物をSDS-PAGEで分離し銀染色を行ったが、明らかなバンドを確認することはできなかった。*AlphaScreen*解析によりNS5A及びCoreの両者に結合親和性の高い細胞性宿主因子であるCK2 α 2を同定した。

(3) NS5Aのリン酸化及び粒子形成を制御するPKの同定

1. NS5Aを基質とするPKの網羅的探索

1-1. NS5Aと強く相互作用するPKの探索

*AlphaScreen*法による解析において発光シグナル強度 1,300 以上を強固な蛋白質間相互作用と想定した時、このカットオフ値以上のシグナル強度を示した PK は 89 種類であった。このうち 79 種類が NS5A のリン酸化に重要とされるセリン/スレオニン PK であった。

1-2. NS5Aに対するリン酸化能の評価

*AlphaScreen*解析でスクリーニングされた79種類のセリン/スレオニンPKに対して*in vitro*リン酸化アッセイを行ったところ、9種類 (TSSK2、PLK1、PKAC β 、CK1 α 、CK1 γ 1、CK1 γ 2、CK1 γ 3、CK1 ϵ 、CK2 α 2) にNS5Aに対する強いリン酸化活性が認められた。

2. HCVの粒子形成を制御するPKの同定

NS5A をリン酸化する 9 種類の PK が HCV 生活環に役割を有するか否かを調べるために、各 PK の細胞内発現をノックダウンした状態で HCV を感染させ、感染後のウイルス粒子産生量を解析した。CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2 ノックダウン細胞から分泌される感染性ウイルス粒子量 (ウイルス感染力価) が mock 処理細胞もしくはコントロール siRNA 導入細胞の 1/5~1/10 に抑制された。次に、これら 3 種類の PK が HCV 生活環の中のどのステップに関わっているのかをより詳細に調べるために、シュードタイプウイルスを用いて HCV の細胞侵入過程を、サブゲノミックレプリコンシステムを用いて RNA 複製能を、また、ウイルス感染が成立しない Huh7-25 細胞を用いて HCV 粒子形成能を解析した。HCV の細胞侵入効率及び RNA 複製は、レポーターとしてウイルスに組み込まれた (シュードタイプウイルス)、もしくは、レプリコンに挿入されたルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標にして定量的に評価した。3 種類の PK ノックダウン細胞における HCV の細胞侵入効率及び RNA 複製能は、mock 処理細胞もしくはコントロール siRNA 導入細胞と同程度であり、これらの PK の作用点は HCV の細胞侵入やゲノム複製のステップではないことが示唆された。HCV 粒子形成能の評価は、全長 HCV RNA を PK siRNA とともにエレクトロポレーション法で Huh7-25 細胞に導入し、導入後 3 日目の上清中 Core 蛋白量を測定することにより行った。3 種類の PK ノックダウ

ン細胞から分泌される Core 蛋白量は mock 処理細胞もしくはコントロール siRNA 導入細胞における分泌 Core 蛋白量の 1/3~1/2 に減少したことから、HCV RNA 複製能の結果と合わせて、ウイルス粒子形成以降の過程がこれらの PK の作用点である可能性が示唆された。最後に、3 種類の PK が培養細胞内においても NS5A のリン酸化に関与するか否かを調べるために、PK ノックダウン細胞に HCV を感染させ、NS5A のリン酸化状態を解析した。CK1 α ノックダウン細胞では、コントロール siRNA 導入細胞と比べて、高リン酸化型 NS5A の発現低下及び高リン酸化型 NS5A/低リン酸化型 NS5A 比の減少を認めた。一方、CK2 α 2 ノックダウン細胞における NS5A のバンドパターンは、コントロール siRNA 導入細胞と比べて、低リン酸化型 NS5A の発現低下及び高リン酸化型 NS5A/低リン酸化型 NS5A 比の上昇を認めた。CK1 ϵ ノックダウン細胞における NS5A のバンドパターンはコントロール siRNA 導入細胞の NS5A 像と同様のパターンを呈していた。

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 7 件)

(欧文論文)

1. Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Watanabe H, Yokosuka O, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 in press.
2. Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 2011;410:38-47.
3. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, 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;84:5824-5835.
4. Ueno M, Niwa T, Ohkawa S, Amano A, Masaki T, Miyakawa K, Yoshida T. The usefulness of perfusion-weighted magnetic resonance imaging in advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 2009;38:644-648.

5. Nagatsuma K, Hayashi Y, Hano H, Sagara H, Murakami K, Saito M, Masaki T, Lu T, Tanaka M, Enzan H, Aizawa Y, Tajiri H, Matsuura T. Lecithin: retinol acyltransferase protein is distributed in both hepatic stellate cells and endothelial cells of normal rodent and human liver. *Liver Int* 2009;29:47-54.

(邦文論文)

1. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、脇田隆字、澤崎達也、鈴木哲朗. HCV NS5A 蛋白質のリン酸化に關与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. *消化器内科*, 51 卷、PP. 627-631, 2010.
2. 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博. C 型肝炎ウイルスの複製と粒子形成. *ウイルス*, 60 卷、PP. 87-92, 2010.

[学会発表] (計 14 件)

(国際学会発表)

1. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Identification of novel hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010. 9. 10-14.
2. Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Kato T, Watanabe H, Wakita T. Effects of NS5A replacement in HCV JFH-1 genome on viral replication and infectious particle production in cell culture. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010. 9. 10-14.
3. Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Tomonaga M, Masaki T, Kato T, Wakita T, Suzuki T. Role of ERAD pathway in quality control of HCV envelope proteins and maturation of the viral particles. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010. 9. 10-14.
4. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Miyamura T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Identification of novel serine/threonine protein kinases responsible for HCV NS5A phosphorylation. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France, 2009. 10. 3-7.

(国内学会発表)

1. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤

孝宣、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗. HCV NS5A 蛋白質のリン酸化に關与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの同定と機能解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.

2. 岡本有加、政木隆博、村山麻子、加藤孝宣、渡邊治雄、脇田隆字. HCV JFH-1 株における NS5A の置換がウイルス増殖に及ぼす影響の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
3. Mohsan Saeed, 鈴木亮介、渡邊則幸、政木隆博、加藤孝宣、脇田隆字、鈴木哲朗. Role of ERAD pathway in life cycle of hepatitis C virus. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
4. 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆字. HCV の増殖適応変異とその意義. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
5. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗. HCV NS5A 蛋白質のリン酸化に關与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010. 5. 27-28.
6. 岡本有加、政木隆博、村山麻子、加藤孝宣、野本明男、脇田隆字. HCV 遺伝子型 2b MA 株を用いた感染増殖系開発の試み. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第 8 回感染症沖繩フォーラム、沖繩、2010. 2. 11-13.
7. 金ソレイ、岡本有加、政木隆博、渡邊治雄、脇田隆字、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルス genotype 2b の感染増殖系作成の試み. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第 8 回感染症沖繩フォーラム、沖繩、2010. 2. 11-13.
8. 政木隆博. HCV NS5A 蛋白質のリン酸化に關与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの網羅的探索. HCV キャンプ in Yamanashi、山梨、2009. 12. 13-14.
9. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗. HCV NS5A 蛋白質のリン酸化に關与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009. 10. 25-27.
10. 政木隆博. C 型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析 (非構造蛋白 NS5A をリン酸化するプロテインキナーゼの探索). 第 6 回ウイルス学キャンプ in 湯河原、熱海、2009. 6. 29-30.

〔図書〕（計 1 件）

1. 政木隆博、鈴木哲朗. HCV の分子生物学.
肝癌-基礎・臨床研究のアップデート.
日本臨床、67 巻増刊号 3、PP. 134-137、
2009.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

政木 隆博 (Takahiro Masaki)
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：60535657

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし