

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 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590731

研究課題名（和文） C型肝炎ウイルス産生調節機構の研究

研究課題名（英文） The study of molecular mechanism of hepatitis C virus production

研究代表者

勝二 郁夫 (SHOJI IKUO)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40356241

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス産生調節機構はHCV RNAレプリコン細胞やJFH1株を用いたウイルス産生系の進歩により、HCV生活環とウイルス増殖に必要な宿主因子の解析が可能となってきた。本研究ではHCV産生の分子機序を明らかにするために、HCV蛋白質と結合する宿主因子とその生理学的意義を解析した。まず、HCVコア蛋白質と結合する宿主因子hnRNPH1/H2/FとRNA結合の重要性について解析した。HCV RNAを添加したところ、コア蛋白質とhnRNPHの結合が阻害され、RNaseを添加すると結合が回復したことから、両者の結合にRNAが重要であると考えられた。hnRNPFにおいても同様の現象を認めた。この二つの因子が協調してウイルス産生を制御していることが示唆された。また、HCV NS5A蛋白質の新規結合因子として細胞内のユビキチンリガーゼp138、転写因子HNF-1a、ヒストンメチル基転移酵素SMYD3などを同定した。p138はHCVのNS5A蛋白質と相互作用するが、他のHCV蛋白質との相互作用は認められず、NS5A特異的な結合と考えられた。p138はNS5Aをユビキチン依存性に分解を促進し、ウイルス複製を制御することが示唆された。NS5A蛋白質とp138の結合部位を各々の欠損変異体を作製してマッピングを行った。両者の結合に重要な領域を同定するためには、更に欠損変異体を作製して詳細に解析する必要がある。また、NS5Aのユビキチン化部位を決定するために13種の点変異体を作製し解析を行い、複数箇所のユビキチン化部位を同定した。これらの研究はHCVの生活環と病原性の理解に貢献するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Development of HCV replicon cells and HCV production system using HCV JFH1 strain enabled us to investigate the whole life cycle of HCV and the host factors essential for HCV production. In this study, we aimed to clarify molecular mechanism of HCV production by investigating binding partners for HCV proteins. We analyzed HCV core-binding proteins, hnRNPH1/H2/F. Addition of HCV RNA inhibited the binding between the core protein and hnRNPs. RNase recovered this inhibition. These results suggest that RNA is required for the interaction between the core protein and hnRNPs. Our results suggest that these hnRNPH and hnRNPF cooperatively regulate HCV replication. We then identified HCV NS5A-binding proteins, ubiquitin ligase p138, transcription factor HNF-1a, and histone methyltransferase SMYD3. The p138 protein bound NS5A protein, but not other HCV proteins. Our data suggest that p138 protein promotes ubiquitylation of NS5A protein and enhances its proteasomal degradation, suggesting that p138 regulates HCV replication. We analyzed the p138-binding domain on the NS5A protein using a series of deletion mutants. Then we analyzed the ubiquitylation site on the NS5A protein using 13 point-mutants. These studies would contribute to the better understanding of HCV life cycles as well as the viral pathogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

| HCV の生活環は不明な点が多かったが、HCV

RNA レプリコン細胞の開発、JFH-1 株-肝細胞 Huh7 細胞での HCV 産生系の開発により HCV 複製の解析が飛躍的に進歩した。なかでも JFH-1 株による HCV 産生系の開発により、HCV の生活環を詳細に研究できるようになり、HCV 増殖に必要な宿主因子の解析や HCV 粒子形成機構の解析が可能となった。

2. 研究の目的

HCV ウイルス産生に参与する新規宿主因子を同定し、ウイルス産生における生物学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

タンデムアフィニティ精製法で同定した新規 HCV コア蛋白結合因子や新規 HCV NS5A 結合因子による HCV 増殖調節機構を HCV レプリコン細胞や HCVcc ウイルス産生系を用いて明らかにする。

4. 研究成果

C型肝炎コア蛋白質に結合する新規宿主因子として hnRNPH1/H2/F を同定し、HCV 産生調節における役割について解析した。hnRNPH と hnRNPF はアミノ酸レベルで 78% の相同性を有し、hnRNPH1 と H2 はアミノ酸レベルで 99% の相同性を有する。HCV コア蛋白質上の hnRNPH1, hnRNPF の結合領域を解析するために GST-core 蛋白質欠損変異体を大腸菌で発現させ、GST-pull down 法で解析した。いずれもコア蛋白質の aa 1-43 に強く結合することが明らかとなった。hnRNPH および hnRNPF はいずれも RNA 結合モチーフを有する RNA 結合蛋白質であることから、HCV RNA との相互作用を解析した。ビオチン化した HCV RNA とストレプトアビジンビーズを用いた pull-down 法にて解析したところ、hnRNPH と hnRNPF はいずれも HCV RNA の IRES IIIId 領域に特異的に結合することが示された。Huh7 細胞内の内在性の hnRNPH1/H2/F の蛋白質量を比較したところ、Huh7 細胞において hnRNPH は 293T 細胞と同レベル発現しているが、hnRNPF は 293T 細胞に比べて著しく発現量が低かった。次に、ウイルス産生における役割を明らかにするために、HCV JFH1 株が感染した Huh7 細胞に発現プラスミドを用いて hnRNPH または hnRNPF を一過性に発現させ、経時的に細胞内外の HCV RNA 量およびコア蛋白質量を qRT-PCR 法と ELISA 法にて測定した。hnRNPH を一過性に発現させると培養上清中の HCV 感染性粒子産生量が上昇した。一方、hnRNPF を一過性に発現させると培養上清中の HCV 感染性粒子産生量が低下した。これらの結果から、hnRNPH と hnRNPF は HCV コア蛋白質および HCV RNA への結合能を介して、HCV 産生の調

節に参与する可能性が示された。hnRNPH は HCV 産生を促進性に、hnRNPF は HCV 産生を抑制的に制御していることが示唆された。

また、HCV NS5A 蛋白質の新規結合因子として細胞内のユビキチンリガーゼ p138、転写因子 HNF-1a、ヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 などを同定した。p138 は HCV の NS5A 蛋白質と相互作用するが、他の HCV 蛋白質との相互作用は認められず、NS5A 特異的な結合と考えられた。p138 は NS5A をユビキチン依存性に分解を促進し、ウイルス複製を制御することが示唆された。NS5A 蛋白質と p138 の結合部位を各々の欠損変異体を作製してマッピングを行った。両者の結合に重要な領域を同定するためには、更に欠損変異体を作製して詳細に解析する必要がある。また、NS5A のユビキチン化部位を決定するために 13 種の点変異体を作製し解析を行い、複数箇所のユビキチン化部位を同定した。これらの研究は HCV の生活環と病原性の理解に貢献するものと考えられた。

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 15 件)

1. Shoji, I. Roles of the two distinct proteasome pathways in hepatitis C virus infection. *World Journal of Virology*, 査読有, 1, 44-50, 2012.
2. Matsui, C., Shoji, I., Kaneda, S., Sianipar, I.R., Deng, L., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . *Journal of Virology*, 査読有, 86 (23): 12903-11, 2012.
3. Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Deng, L., Shoji, I., Hotta, H., and Sada, K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinases Fyn in B cells., *PLoS One*, 査読有, 7 (10): e46634, 2012.
4. Shoji, I., Deng L., and Hotta, H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 2, Article 278, 1-5, 2012.
5. Kamada, K., Shoji, I., Deng, L., Wakita, T., and Hotta, H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus

- entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes and Infection*, 査読有, 14, 69-78, 2012.
6. Sasayama, M., Shoji, I., Adianti M, Jiang DP, Deng, L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, and Hotta, H. A point mutation at Asn-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *Journal of Medical Virology*, 査読有, 84, 229-34, 2012.
 7. El-Shamy, A., Ide, Y-H., Kim, SR., Sasase, N., Imoto, S., Deng, L., Shoji, I., and Hotta, H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin therapy. *Intervirology*, 査読有, 55, 1-11, 2012.
 8. El-Shamy, A., Shoji, I., Kim S-R., Ide, Y-H., Imoto, S., Deng, L., Yoon, S., Fujisawa, T., Tani, S., Yano, Y., Seo, Y., Azuma, T., and Hotta, H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-Interferon/Ribavirin therapy., *PLoS One*, 査読有, 2012, 7, e30513, 1-10.
 9. El-Shamy, A., Shoji, I., Saito, T., Watanabe H., Ide, Y-H., Deng, L., Kawata, S., and Hotta, H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to Pegylated-Interferon/Ribavirin combination therapy. *Microbiology and Immunology*, 査読有, 55, 418-26, 2011.
 10. Deng, L., Shoji, I., Oawa, W., Kaneda, S., Soga, T., Jiang, D. P., Ide, Y-H., and Hotta, H., Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *Journal of Virology*, 査読有, 85, 8556-68, 2011.
 11. Inoue, Y., Aizaki, H., Hara, H., Matsuda, M., Ando, T., Shimoji, T., Murakami, K., Masaki, T., Shoji, I., Homma, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., Lai, MMC, Wakita, T., and Suzuki, T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 査読有, 410, 38-47, 2011.
 12. Hayashida K, Shoji, I., Deng, L., Ide, Y-H., and Hotta, H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 査読有, 54, 684-90, 2010.
 13. Nasu, J., Murakami, K., Miyagawa, S., Yamashita, R., Ichimura, T., Wakita, T., Hotta, H., Miyamura, T., Suzuki, T., Satoh, T., and Shoji, I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 査読有, 111, 676-85, 2010.
 14. Moriishi K., Shoji, I., Mori, Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Kataoka, C., and Matsuura, Y. Involvement of PA28 γ in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 査読有, 52 411-420 2010.
 15. Sanjo M., Saito, T., Ishii, R., Nishise, Y., Haga, H., Okumoto, K., Ito, J., Watanabe, H., Saito, K., Togashi, H., Fukuda, K., Imai, Y., El-Shamy, A., Deng, L., Shoji, I., Hak, H., and Kawata, S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, 査読有, 82, 1364-70, 2010.
- [学会発表] (計 18 件)
1. Shoji I. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolism disorder. The 10th JSH single topic conference, 招待講演, 2012年11月21-22日, 東京.
 2. 陳明、甘翔、Deng Lin、勝二郁夫、堀田博. C型肝炎ウイルスNS5A蛋白質の新規結合因子ヒストンメチル基転移酵素SMYD3の同定と機能解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日, 大阪.
 3. 松井千絵子、勝二郁夫、Deng Lin、堀田博. C型肝炎ウイルスによるGLUT2遺伝子発現抑制の分子機構. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012年11月13-15日.
 4. Matsui C, Shoji I., Deng L, Hotta H. HCV infection induces lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1 α via interaction with HCV NS5A protein. 19th International

- Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October 5-9, 2012.
5. Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. Identification and characterization of a novel NS5A-interacting protein, SMYD3. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October 5-9, 2012.
 6. Shoji I, Okada N, Gan X, Miyagawa S, Makimoto M, Chieko M, Jang DP, Deng L, Ide Y-H, and Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that mediates ubiquitylation of hepatitis C virus NS5A protein. 第34回日本分子生物学会年, 2011年12月14日, 横浜.
 7. 甘翔, Lin Deng, 陳明, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスNS5Aの新規結合タンパク質であるヒストンメチル基転移酵素SMYD3の同定. 第64回日本細菌学会関西支部総会, 2011年11月19日, 大阪.
 8. Shoji I, Okada N, Gan X, Miyagawa S, Makimoto M, El-Shamy A, Deng L, Jang DP, Ide Y-H, and Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that mediates ubiquitylation of hepatitis C virus NS5A protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月16日, 札幌.
 9. Shoji I, Okada N, Gan X, Miyagawa S, Makimoto M, El-Shamy A, Deng L, Jang DP, Ide Y-H, and Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that targets hepatitis C virus NS5A protein for ubiquitylation. 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses., Sep, 10, 2011., Seattle, USA.
 10. 勝二郁夫, Ahmed El-Shamy, 堀田博. C型肝炎ウイルスのインターフェロン・リバビリン治療応答性を規定するウイルス側因子, 招待講演, 第2回神戸肝炎ウイルス学術講演会, 2011年7月22日, 神戸.
 11. Shoji I. Role of the proteasome pathways in the hepatitis C virus life cycle. 招待講演, RCC-ERI Seminar, Aug 8, 2010, National Institute of Health, Bangkok, Thailand.
 12. Shoji I, Kaneda S, Deng L, Ide Y-H, Hotta H. Molecular mechanism of HCV-induced suppression of glucose transporter (GLUT)2 expression. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses., Sep 10-14, 2010, Yokohama, Kanagawa.
 13. Deng L, Ide YH, Shoji I, Hotta H. HCV-induced generation of reactive oxygen species leads to Bax-mediated apoptosis through activation of the c-Jun NH₂-terminal kinase signaling pathway. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses., September 10-14, 2010, Yokohama, Kanagawa.
 14. Shoji I, Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Ide Y-H, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. 第33回日本分子生物学会年會, 2010年12月7-10日, 神戸.
 15. 岡田典子, 勝二郁夫, 甘翔, Deng L, 姜大鵬, 井出良浩, 堀田博. C型肝炎ウイルスNS5Aに結合するユビキチンリガーゼの同定., 第33回日本分子生物学会年會, 2010年12月7-10日, 神戸.
 16. 勝二郁夫, Deng L, 堀田博. HCVによる糖代謝障害の分子機序第58回日本ウイルス学会学術集會, 2010年11月7-9日, 徳島.
 17. Deng L, 兼田崇作, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. 糖代謝に及ぼすC型肝炎ウイルスの影響及びその分子機序の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集會, 2010年11月7-9日, 徳島.
 18. 堀田博, 井出良浩, 勝二郁夫. C型肝炎ウイルス感染は糖新生系を亢進し, 糖尿病発症に関与する. 第46回日本肝臓学会総會, 2010年5月27-28日, 山形.
- [図書] (計3件)
1. 勝二郁夫. 最新!C型肝炎治療薬の使いかた. NS5A-IRRDR変異数. 83-87, 2012, 診断と治療社, 岡上武監修, 東京.
 2. 勝二郁夫. シンプル微生物学, 247-252, 2011, 東匡伸, 小熊惠二, 堀田博 編集, 南江堂, 東京.
 3. 勝二郁夫. はじめの一歩のイラスト感染症・微生物学, 79-82, 2011, 本田武司 編集, 羊土社, 東京.
- [その他]
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/micro/1.htm>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
勝二 郁夫 (SHOJI IKUO)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40356241

(2)研究分担者

井出 良浩 (Ide Yoshihiro)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70258606

(3)連携研究者

()

研究者番号：