

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659228

研究課題名（和文） RNA ウイルスゲノムの品質管理機構に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Quality control of genomes of RNA viruses

研究代表者

鈴木 哲朗 (SUZUKI TETSURO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00250184

研究成果の概要（和文）：

RNA ウイルスのライフサイクルにおいて、不要になった RNA の分解などゲノム RNA の品質管理に寄与する分子機構が存在する可能性が考えられるが、その実態は全く不明である。本研究では、C 型肝炎ウイルス (HCV) をモデルとして、ウイルスゲノムの複製に重要で、RNA の不安定化に関与する可能性が考えられるゲノム末端非翻訳領域 (UTR) に結合するタンパク質を探索した。その結果、5'UTR の III_d 領域に選択的に結合する因子として PSF、hnRNP-H、p54-nrb を同定した。このうち、hnRNP-H は HCV Core タンパク質とも会合し、この会合によって RNA 安定化に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Little is known about quality control of genomes of RNA viruses such as in order to prevent accumulation of nonfunctional viral RNAs in cells. As a first approach to address possible molecular mechanism(s) involved in quality control degradation of viral RNA in virus lifecycles, we searched host cellular proteins that bind the untranslated regions (UTR) of hepatitis C virus RNA genome, and identified PSF, hnRNP-H and p54-nrb as 5'UTR III_d-binding factors. It may be likely that hnRNP-H is involved in the viral RNA stability via its interacting with the viral nucleocapsid protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

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：分子・構造

1. 研究開始当初の背景

真核動物細胞の mRNA にはその寿命を規定するシス因子が末端の非翻訳領域 (untranslated region; UTR)、特に 3'UTR に存在することが知られている。代表的なも

のは mRNA を不安定化する ARE (AU-rich element) 及び逆に安定化する PRE (pyrimidine-rich element) である。このようなシス因子は細胞におけるストレス応答などのシグナルによって制御され、主にポリ A

鎖の分解制御を介して mRNA の安定性を規定していると考えられている。このような正常な mRNA の分解開始機構とは別に異常蛋白質の合成に関与するナンセンス mRNA を認識し急速に分解する mRNA 監視機構

(NMD: nonsense-mediated mRNA decay) が存在することが近年明らかとなってきた。

RNA ウイルスの多くはゲノムの修復機構を欠くことから、複製細胞内では多様なゲノム配列が混在する (quasispecies) ことが知られている。RNA ウイルスの複製細胞におけるウイルス遺伝子の多様性は宿主免疫系からの逃避に寄与している。しかしながら、ゲノム RNA として許容できない変異が生じた場合、異常ウイルス蛋白質の産生を抑えるため、変異 RNA を選択的に認識して分解するしくみが重要であると考えられるが、このような分子機構が存在するか否か明らかにされていない。すなわち、ゲノム RNA の品質を管理する機構がウイルスの生活環に備わっている可能性は十分に考えられるが、「異常なウイルス RNA はどのように認識され処理されるのか」「相補鎖 RNA 合成、翻訳が終了した後のゲノム RNA は何を引き金として分解するのか」は全くと言ってよいほど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、C 型肝炎ウイルス (HCV) をモデルとして、ゲノム RNA の UTR に結合し、ウイルス RNA の不安定化または安定化に寄与する宿主因子あるいはウイルス因子を同定する。

3. 研究の方法

HCV の 5' UTR 及び 3' UTR (図 1) に存在する各 stem-loop 領域の RNA 配列を試験管内合成した。その際、各 RNA の 5' 末端をビオチン化修飾した。一方、ヒト肝がん細胞株 Huh-7 の細胞質ライセートから S10 画分を調製した。RNA 結合タンパク質スクリーニングの概略は図 2 にまとめた。ビオチン化 RNA と S10 画分を十分混和した後、磁気マイクロビーズを加えさらに混和した。混合液を磁気ビーズセパレーター (magnetic field) に供し、HCV RNA またタンパク質-RNA 複合体を捕捉し

たビーズを磁気で回収した。非特異接着をよく洗浄した後、磁石を外し、チューブにビーズを回収した。RNA 結合タンパク質をビーズから溶出、SDS-PAGE 展開し、バンドを切り出しトリプシン処理によってペプチド化を行い、質量分析 (LC-MS 解析) を行った。

AlphaScreen technology (PerkinElmer 社) を利用して、RNA-タンパク質相互作用を定量的に解析するため、HCV Core タンパク質を N 末端に FLAG tag を融合させた形で試験管内転写、小麦胚芽ライセートによる翻訳系で合成し精製した。AlphaScreen による結合検出のため、Protein A acceptor beads 及び Streptavidin donor beads を用いた。結合解析は、マルチモードプレートリーダー EnSpire (PerkinElmer 社) を用いて行った。

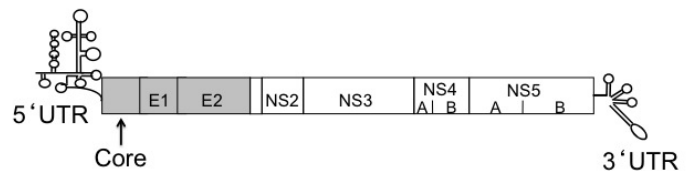


図1. HCVゲノムRNAとウイルスタンパク質

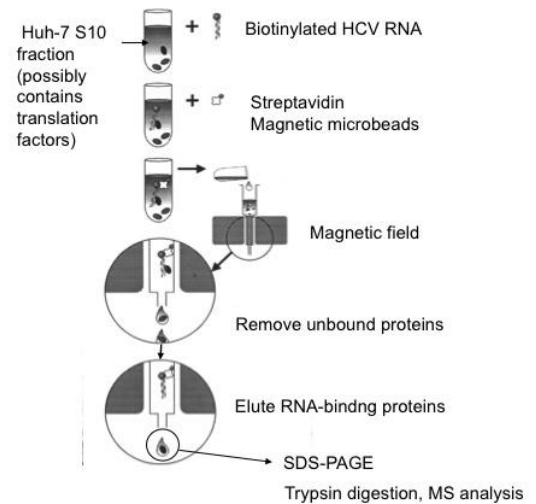


図2. HCV RNA結合因子のスクリーニング

4. 研究成果

各ビオチン化合成 HCV RNA に結合する細胞タンパク質を探索した結果、5'UTR の IIIId 配

列に選択的に結合するタンパク質が同定された。結合タンパク質群のうちで、同配列によって compete されないもの、および相補鎖配列にも結合の認められたものを排除したところ、6種類 (40-, 46-, 52-, 63-, 66-, 90-kDa) の IIIId 結合タンパク質が得られた。各タンパク質バンドを切り出しトリプシン消化し質量分析を行ったところ、p54-nrb、PSF (PTB-associated splicing factor) および hnRNP-H を同定することができた。さらに、得られたサンプルについてウェスタンブロット解析を行い各タンパク質を確認した。代表的な実験結果を図3に示した。

PSF: PTB-associated splicing factor. mRNAのスプライシングに関与。RNA結合能。PTBと結合。

hnRNP-H: RNA結合能。PTBと結合。

p54-nrb: RNAプロセシングに関与。RNA結合能。PSFと interaction。

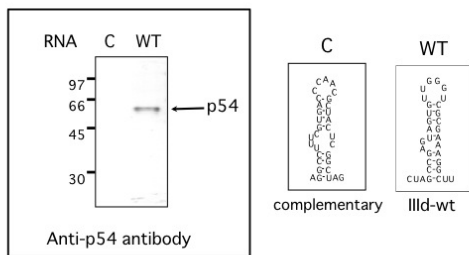


図3. 同定されたHCV 5' UTR RNA結合タンパク質

PSF、hnRNP-H、p54-nrbともRNA結合能、RNAプロセシングへの関与などが知られているが、HCV RNAとの結合性はこれまで論文報告されていない。

IIIId以外の5' UTRまた3' UTRについても結合を示すタンパク質は認められたものの、同RNAの過剰添加によって結合の競合阻害が認められないなど選択的な結合を示すタンパク質はこれまでのところ得られていない。

一方、同定した3種類のHCV RNA結合タンパク質の中で、hnRNP-Hはヌクレオキャプシド形成に働くHCV Coreタンパク質とも結合能を有することを確認した。さらに、hnRNP-H、HCV RNA存在下にCoreタンパク質を添加することによってHCV RNAが安定化される傾向にあることが示唆された。

前述のように、これまでのスクリーニングでは3' UTRに選択的に結合する細胞タンパク質は見出されなかったが、Coreタンパク質はHCV RNAの安定性に関与する可能性が示さ

れた。CoreはHCV 5' UTRとの結合性が知られているものの3' UTRへの関与は十分解析されていない。そこで、近年、高感度、低バックグラウンドの分子間相互作用解析法として開発されたAlphaScreen法を利用して、Coreと3' UTR RNAの相互作用解析を行った。その結果、3' UTRの3種類のstem-loopそれぞれ、及びvariable regionの配列とCoreとの結合は限定的(バックグラウンドに近いレベル)であったのに対し、3' UTR全長を用いた場合、極めて強い結合を示すことが明らかとなった。3' UTR全長では、部分領域の場合に比べ数十倍以上の高いCore結合性が示された。

以上のことから、Coreと3' UTRとの結合には単一のstem-loop構造だけでなく複数箇所のRNA二次構造/領域が関与する可能性が示唆された。本研究におけるHCV RNA結合因子の探索は単一の各stem-loop RNAを標的として行ってきたが、3' UTRとの結合タンパク質の探索にはより長いRNA領域を用いる必要があるかもしれない。今後、スクリーニング系を改良し探索を続けるとともに、これまでに同定したHCV RNA結合タンパク質がRNAゲノムの品質管理にどのように関与するかを明らかにしていきたい。

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6件)

1. Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Front. Microbiol.* 3: 38, 2012.
2. Ando T., Imamura H., Suzuki R., Aizaki H., Watanabe T., Wakita T, and Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 8: e1002561, 2012.
3. Suzuki R., Saito K., Kato T., Shirakura M., Akazawa D., Ishii

- K., Aizaki H., Kanegae Y., Matsuura Y., Saito I., Wakita T., and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*, 432: 29-38, 2012.
4. Fukazawa H, Suzuki T, Wakita T, Murakami Y. A cell-based, microplate colorimetric screen identifies 7,8-benzoflavone and green tea gallate catechins as inhibitors of the hepatitis C virus. *Biol Pharm Bull.* 35: 1320-1327, 2012.
5. Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a in Cultured Cells. *Gastroenterology* 144: 56-58, 2013.
6. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect.* 15: 45-55, 2013.

[学会発表] (計1件)

Ito M, Suzuki T, et al. Permissivity of HuH-7-derived oval-like cells to HCV infection and replication. 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, Venice, Italy, 2012.

[図書] (計1件)

[産業財産権]

○取得状況 (計3件)

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：鈴木哲朗 他
権利者：国立感染症研究所、東レ

種類：特許
番号：8,183,044
取得年月日：2012年5月22日
国内外の別：国外（米国）

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：鈴木哲朗 他
権利者：国立感染症研究所、東レ
種類：特許
番号：第5035985号
取得年月日：2012年7月13日
国内外の別：国内

名称：感染性C型肝炎粒子高産生系
発明者：鈴木哲朗 他
権利者：国立感染症研究所、東レ
種類：特許
番号：第5030065号
取得年月日：2012年7月6日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

伊藤 昌彦 (ITO MASAHIKO)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：50385423