

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890105

研究課題名(和文) ウイルス感染における Bcl-2 タンパク質の制御

研究課題名(英文) Regulation of Bcl-2 protein family proteins by virus infection

研究代表者

岡本 徹 (Okamoto, Toru)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：80628595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：日本脳炎ウイルス感染によってアポトーシスを抑制するタンパク質Mcl1が顕著にプロテアソームによって分解を受けることを示しCRISPR/Cas9を用いた遺伝子破壊技術を用いてヒトの肝癌由来細胞株であるHuh7で、Mcl1欠損細胞とBcl-x欠損細胞を作製し、各ウイルス感染における細胞死の変化を調べた。すると、日本脳炎ウイルス感染では、Bcl-x欠損細胞で顕著に細胞死が亢進したが、Mcl1欠損細胞では野生型のHuh7と同程度だった。Bcl-x欠損細胞では、その生存がMcl1に依存しているため、日本脳炎ウイルス感染によってMcl1が分解され、死に至ったと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Japanese Encephalitis virus (JEV) infection was found to degrade Mcl1, which is a prosurvival Bcl-2 protein family, through a proteasome dependent mechanism. Bcl-x deficient human cancer cell lines were induced cell death by JEV infection. On the other hands, Mcl1 deficiency was not induced cell death. These data suggested that JEV-infected cells were dependent on Bcl-x for their survive.

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：ウイルス 細胞死

1. 研究開始当初の背景

アポトーシスは損傷を受け、不要となった細胞を除去するメカニズムであり、免疫機構の維持、発癌など、様々な生理現象に関与する最も重要な生体機能の一つである。中でも Bcl-2 タンパク質ファミリーはその中心的役割を担っている。Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 といった Bcl-2 タンパク質は Bax/Bak の活性化を抑制することで定常状態を維持している。しかし、細胞が何らかの障害を受けると Bim, Bad, Noxa などの BH3-only タンパク質が発現誘導され、Bcl-2 タンパク質による Bax/Bak の抑制をキャンセルすることで、アポトーシスが実行される。BH3-only タンパク質は、Bim のようにすべての Bcl-2 タンパク質を抑制する分子や、Noxa や Bad のように特異性を持ち、ある種の Bcl-2 タンパク質の活性を抑制する BH3 タンパク質もあり、多様な手法でアポトーシスを制御していると考えられている。近年、米国のアボットラボラトリーズから Bcl-2 タンパク質の阻害剤 ABT-737/263 (ノビトクラックス)が開発された。この薬剤は BH3 mimetics として、BH3-only タンパク質の Bad と同じ特徴を示し、Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL を阻害し、Mcl-1 が発現していない細胞ではアポトーシスを誘導する。一方、病原体は宿主細胞のアポトーシスを制御する戦略を持っている。例えば、EBV を始めとする多くの DNA ウイルスは自身のゲノムに Bcl-2 様の遺伝子をコードし、宿主細胞のアポトーシスを抑制し、優位なウイルス複製能を獲得している。このようにウイルスは、様々な方法でアポトーシスを制御することによって、効率よく宿主細胞で複製していると考えられる。その一方、RNA ウイルスでは細胞死制御のメカニズムの研究は乏しく、ER ストレス応答により、細胞死が促進されるという報告が主となっている。

2. 研究の目的

RNA ウイルス感染における Bcl-2 タンパク質ファミリーの動態を解析し、その分子メカニズムを検討し、細胞死への関わりを考察する。

3. 研究の方法

日本脳炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスを各 Bcl-2 ファミリータンパク質欠損マウス繊維芽細胞やヒト肝ガン細胞に感染させ、その細胞死への変化を調べた。

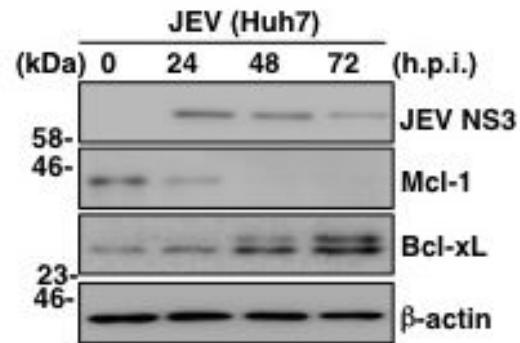
ウイルス感染細胞から RNA を調整し、遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイで調べた。

4. 研究成果

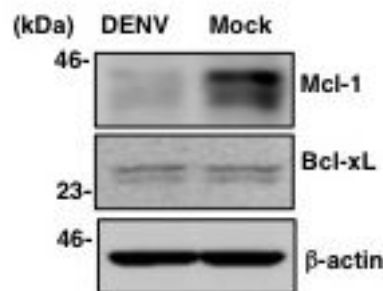
フラビウイルス科に属するウイルスが感染した細胞はMcl1を分解に導く。

フラビウイルス科に属している、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、C型肝炎ウイルスを用いて、各種ウイルスを感染後、感染細胞をウェスタンブロット法でBcl-x、Mcl-1のタンパク質量を比較したところ、どのウイルスを

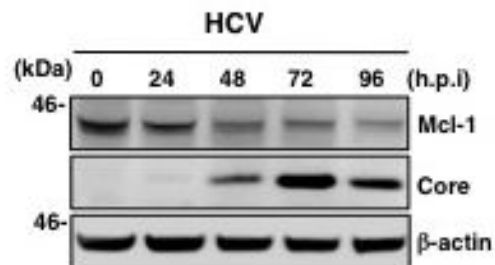
感染させても、Mcl-1が分解されていることが分かった(図1)。



(図1A)日本脳炎ウイルス感染によるMcl-1の分解

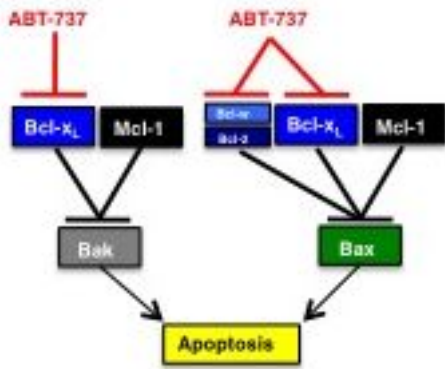


(図1B)デングウイルス感染細胞はMcl1が分解される

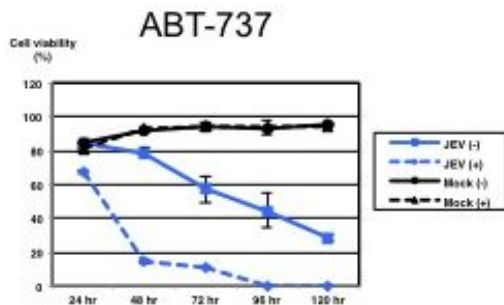


(図1C)C型肝炎ウイルス感染によってもMcl1が分解される

この結果から、ウイルス感染によりMcl-1が分解され、感染細胞はその生存をBcl-xに依存していることを示唆している。それを証明するため、Bcl-x阻害剤であるABT-737をウイルス感染細胞に加え、生存率を調べた(図2)。すると、ABT-737を加えることで、顕著にウイルス感染細胞で細胞死を誘導した。



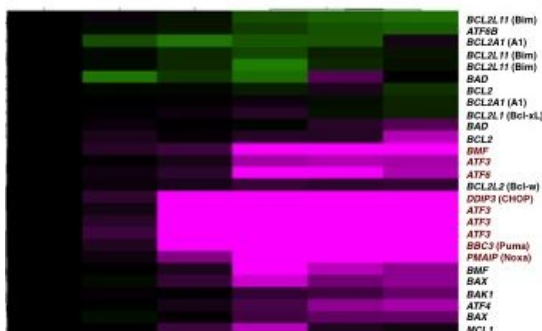
(図2A) ABT-737はBcl-x, Bcl-2, Bcl-wを阻害する化合物であり、細胞の生存がMcl-1に依存する。



(図2B) 日本脳炎ウイルス感染細胞にABT-737を処理すると、顕著に細胞死が誘導される。

以上の結果から、フラビウイルス科のウイルスが感染すると、細胞内のMcl-1が分解されることが分かった。

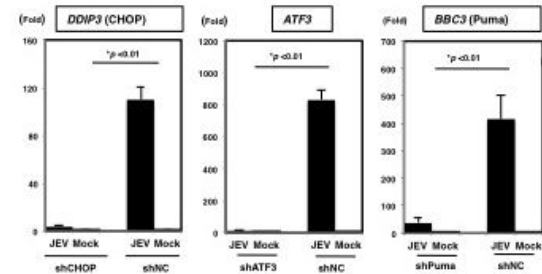
ウイルス感染による遺伝子変動の解析次に、日本脳炎ウイルス感染細胞からRNAを抽出し、遺伝子の変化をマイクロアレイを使って調べた(図3)。すると、CHOPやATF3、Puma、Noxaと言ったERストレスで応答してくる遺伝子の発現上昇が見られた。



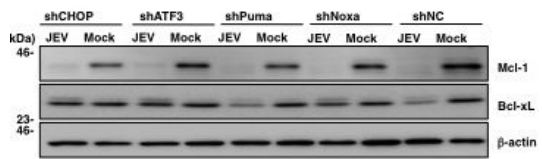
(図3A) 日本脳炎ウイルス感染により経時的にERストレス応答関連遺伝子の発現上昇が見られた。

そこで、ATF3、CHOP、Pumaのノックダウン細胞を作製し、ウイルス感染によるMcl-1の分解に及ぼす影響を調べた。すると、各種ノック

ダウンした遺伝子は、ウイルス感染により発現が見られないが、Mcl-1の分解は正常に起こることが分かった(図3B, C)。



(図3B) CHOP, ATF3, Puma ノックダウン細胞の樹立。日本脳炎ウイルス感染により、各種ノックダウンした遺伝子の発現上昇は見られない。

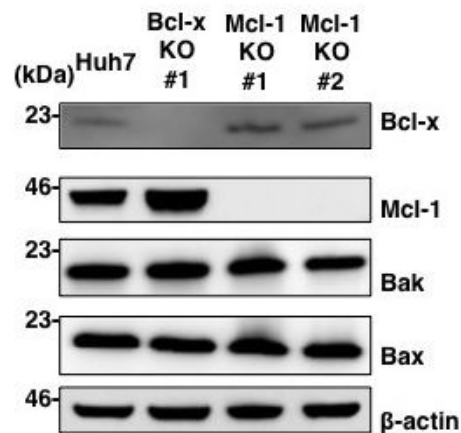


(図3C) 各遺伝子ノックダウン細胞におけるMcl-1の分解への影響。

以上のことから、ウイルス感染によりMcl-1が分解されるのは、感染細胞のERストレス応答による結果ではないことが分かった。

CRISPR/Cas9システムを用いたBcl-x, Mcl-1欠損ヒト肝ガン細胞株の樹立とその解析

より詳細に Mcl-1 分解がウイルス感染細胞に及ぼす影響を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて Bcl-x, Mcl-1 欠損 Huh7 細胞を作製した(図 4A)。

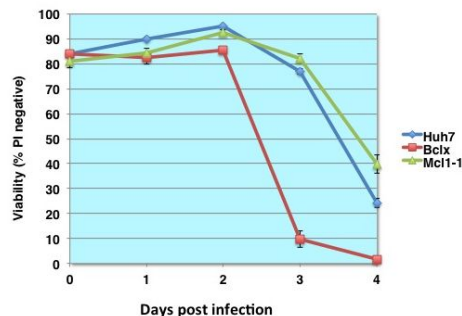


(図 4A) Bcl-x, Mcl-1 欠損 Huh7 細胞株の樹立

樹立した細胞株に日本脳炎ウイルスを感染させると、Bcl-x 欠損細胞で顕著な感染細胞の細胞死を認めた(図 4B)。

(図 4B) Bcl-x 欠損細胞では日本脳炎ウイルス感染に感受性を持つ。

これは C 型肝炎ウイルスでも見られたことが



ら、フラビウイルス感染細胞は、その生存が Bcl-x に依存していることをさらに示唆するデータである

## 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 4 件)

1. Okamoto T, Coultas L, Metcalf D, van Delft M, Glasser SP, Takiguchi M, Strasser A, Bouillet P, Adams JM, Hunag DCS. Enhanced Mcl1 stability can blunt stress-induced apoptosis, cause male sterility and promote tumorigenesis, 111, 261-266. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2014) 査読あり
2. Okamoto T, Zobel K, Fedorova A, Quan C, Yang H, Fairbrother WJ, Huang DC, Smith BJ, Deshayes K, Czabotar PE. Stabilizing the Pro-Apoptotic BimBH3 Helix (BimSAHB) Does Not Necessarily Enhance Affinity or Biological Activity, 8, 297-302. *ACS Chemical Biology*, (2013) 査読あり
3. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation, 87, 489-502. *Journal of Virology*, (2012) 査読あり
4. Okamoto T, Campbell S, Mehta N, Thibault J, Colman PM, Barry M, Huang DC, Kivsanakul M. Sheeppox Virus SPPV14 Encodes a Bcl-2-Like Cell Death Inhibitor That Counters a Distinct Set of Mammalian Proapoptotic Proteins, 86, 11501-11511. *Journal of Virology*, (2012) 査読あり

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 徹 (OKAMOTO, Toru)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：80628595