

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461003

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスの脂肪滴形成機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced lipid droplet formation

研究代表者

勝二 郁夫 (SHOJI, Ikuo)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40356241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：(1)HCVcc感染Huh-7.5細胞でSPG20が切断される。(2)HCV NS3/4Aを一過性にhuh-7細胞に発現させるとSPG20が切断される。(3)不活化型NS3/4Aを発現させてもSPG20は切断されない。(4)NS3/4A阻害剤でSPG20の切断が抑制されるが、NS5A阻害剤では変化がなかった。(5)HCVcc感染細胞Huh-7.5にNS3/4A阻害剤を投与すると脂肪滴の大きさも縮小した。以上よりHCV感染細胞においてはNS3/4AプロテアーゼがSPG20を切断し、脂肪滴の巨大化を促進することが示された。

研究成果の概要(英文)：(1) SPG20 was cleaved in HCVcc-infected Huh-7.5 cells. (2) Transient expression of HCV NS3/4A resulted in cleavage of SPG20. (3) Inactive mutant NS3/4A did not cleave SPG20. (4) NS3/4A inhibitor inhibited cleavage of SPG20, whereas NS5A inhibitor did not inhibit cleavage of SPG20. (5) Treatment of the HCVcc-infected Huh-7.5 cells decreased the size of lipid droplets. Taken together, our results suggest that HCV NS3/4A cleaves SPG20 thereby promoting enlargement of lipid droplet in HCV-infected cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HCV 脂肪滴 NS3/4A プロテアーゼ 脂肪化

### 1. 研究開始当初の背景

HCV 感染は高率に慢性化し、慢性肝炎、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。全世界に2億人、本邦に200万人のHCV感染者がいる。ペグインターフェロン/リバビリン併用療法が標準的治療法として長く使われていたが、昨年、NS3/4A セリンプロテアーゼ阻害剤が実用化され、DAA(Direct acting antiviral)の時代の幕が開かれた。慢性肝炎の治療率の向上が期待されるが、今後は DAA 抵抗性 HCV 変異株の治療法の開発、肝発癌の制御が重要な問題となると予測される。

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 感染系の開発により HCV 生活環の解析が飛躍的に進歩した。なかでも JFH-1 株による HCV 感染系の開発により、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同定や HCV 粒子形成機構の解析が可能となった。HCV Core 発現細胞で脂肪滴が著明に蓄積されることは古くから知られていたが、長らくその生理学的意義は不明であったが、HCV の Core 蛋白質が HCV 複製複合体を脂肪滴近傍の膜上に引き寄せて ER 上でウイルス粒子が形成されることが報告された。この研究を端として、肝細胞内の脂肪滴が HCV 粒子産生の中心的役割を果たすことが広く認識され、創薬の標的としても注目されるようになった。さらに HCV 粒子産生に Core と NS5A の相互作用が重要なことや、細胞内因子 DGAT1 や TIP47 が脂肪滴を介した HCV 複製および粒子形成に必須であることが報告された。また、HCV 粒子は VLDL 生合成系を利用して ApoB、ApoE などのアポリポ蛋白質に覆われて感染性粒子となることが示された。

一方、ヒト遺伝性の皮質脊髄系神経変性疾患の Hereditary spastic paraplegia(HSP)の研究で、ポジショナルクローニングにより、SPG 遺伝子が原因遺伝子として同定された。SPG の細胞内機能が解析され、SPG20(Spartin)が脂肪滴の大きさを調節する因子であることが明らかにされた。Spartin は脂肪滴に結合する蛋白質で PPxY motif を有し、AIP2/AIP4/AIP5 などの HECT 型ユビキチンリガーゼの WW domain と結合し、これらのユビキチンリガーゼを脂肪滴近傍にリクルートする。そして、脂肪滴に結合した Adipophilin をユビキチン化し、プロテアソーム依存性に分解する。

Adipophilin が存在する間は脂肪滴が大きくなり続け、Adipophilin が分解されると脂肪滴の形成は停止しやがて消退することが示されて

いた。

### 2. 研究の目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を発症するが、2 型糖尿病や肝脂肪化などの糖・脂質代謝異常を引き起こし、治療抵抗性、肝線維化、肝発癌に深く関与する。また、HCV の粒子形成は脂肪滴近傍の小胞体膜上で起こり、脂肪滴形成がウイルス産生にきわめて重要である。HCV 感染に伴う脂肪滴形成にはウイルス蛋白質 Core、NS5A や、宿主因子 DGAT1、TIP47、ApoB、ApoE が重要とされるが、未だ全貌は明らかでない。近年、脂肪滴形成の制御機構の解明が進み、宿主因子 Spartin、ユビキチンリガーゼ AIP2/AIP4/AIP5、Adipophilin が重要な調節因子として同定された。そこで、本研究では、HCV 感染における脂肪滴形成に Spartin、AIP2/AIP4/AIP5、Adipophilin などの宿主因子が果たす役割を明らかにし、HCV 粒子形成阻害に応用するための分子基盤の構築を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、HCV 感染における脂肪滴制御機構 (Spartin、AIP2/AIP4/AIP5、Adipophilin)の役割を明らかにする。解析には HCV RNA レプリコン細胞、HCV J6/JFH1、各 genotype との HCV キメラウイルス、Huh7、Huh7.5 細胞系を用いる。

1. HCV 感染による Spartin、AIP2/AIP4/AIP5、Adipophilin の mRNA 量、蛋白質量、細胞内局在
2. 細胞内脂質測定、脂肪滴計測、細胞内トリグリセリド(TG)定量
3. Adipophilin の蛋白質半減期解析
4. Spartin への翻訳後修飾の解析
5. 各 HCV 蛋白質の関与の解析

### 4. 研究成果

我々は脂肪滴の大きさを調節する宿主因子 SPG20 に注目して解析を進めた。HCV NS3/4A プロテアーゼが SPG20 を切断し、脂肪滴の巨大化を誘導することを示唆する実験結果を得た。

- (1) HCVcc 感染 Huh-7.5 細胞で SPG20 が切断される。
- (2) HCV NS3/4A を一過性に huh-7 細胞に発現させると SPG20 が切断される。
- (3) 不活化型 NS3/4A を発現させても SPG20 は切断されない。
- (4) NS3/4A 阻害剤で SPG20 の切断が抑制されるが、NS5A 阻害剤では変化がなかった。
- (5) HCVcc 感染細胞 Huh-7.5 に NS3/4A 阻害剤を投与すると脂肪滴の大きさも縮小した。

以上より HCV 感染細胞においては NS3/4A プロテアーゼが SPG20 を切断することにより、脂肪滴の巨大化を促進することが示された。

## 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 7 件)

- (1) Chen M, Gan X, Yoshino K, Kitagawa M, Shoji I, Deng L, and Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with lysine methyltransferase SET and MYND domain-containing 3 and induces activator protein 1 activation. *Microbiology and Immunology*, 2016, 60: 407-417. DOI: 10.1111/1348-0421.12383.
- (2) Aizawa S, Okamoto T, Sugiyama Y, Kouwaki T, Ito A, Suzuki T, Ono C, Fukuhara T, Yamamoto M, Okochi M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Suzuki R, Shoji I, Moriishi K, Moriya K, Koike K, and Matsuura Y. TRC8-dependent degradation of hepatitis C virus immature core protein regulates viral propagation and pathogenesis. *Nature Communications*, 2016, 7: 11379. DOI: 10.1038/ncomms11379.
- (3) Sianipar IR, Matsui C, Minami N, Gan X, Deng L, Hotta H, and Shoji I. Physical and functional interaction between hepatitis C virus NS5A protein and ovarian tumor protein deubiquitinase 7B. *Microbiology and Immunology*, 2015, 59: 466-76. DOI: 10.1111/1348-0421.12278.
- (4) Matsui C, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H, and Shoji I. A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupts physical and functional interaction with the transcription factor HNF-1 $\alpha$ . *Journal of General Virology*, 2015, 96: 2200-05. DOI: 10.1099/vir.0.000179.
- (5) Deng L, Chen M, Shoji I, and Hotta H. HCV upregulates Bim through the ROS/JNK signaling pathway, leading to Bax-mediated apoptosis. *Journal of General Virology*, 2015, 96: 2670-83. DOI: 10.1099/jgv.0.000221.
- (6) Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, and Hotta H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities. *PLoS One*, 2014, 9 (6): e98877. DOI: 10.1371/journal.pone.0098877.
- (7) Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 21 (1): 1-16. DOI: 10.1089/ars.2013.5381.

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) Matsui C, Minami N, Deng L and Shoji I. Molecular mechanism of HCV-induced lysosomal degradation of HNF-1 $\alpha$ . 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016年10月23日~10月25日, 札幌。
- (2) Matsui C, Minami N, Deng L and Shoji I. Molecular mechanism of HCV-induced lysosomal degradation of HNF-1 $\alpha$ . The 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2016年10月11日~10月15日, 京都。
- (3) Sianipar IR, Matsui C, Minami N, Chen M, Gan X, Deng L, Hotta H and Shoji I. Physical and functional interaction between hepatitis C virus NS5A protein and ovarian tumor protein deubiquitinase 7B. The 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2015年10月9日~10月13日, Strasbourg, France.
- (4) Matsui C, Sianipar IR, Minami N, Chen M, Deng L, Hotta H and Shoji I. A novel pathway for lipid droplet formation induced by hepatitis C virus. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015年11月22日~11月24日, 博多。
- (5) 勝二郁夫 C型肝炎ウイルス基礎研究の最近の話題, 第11回神戸肝炎治療研究会, 2016年2月12日, 神戸。
- (6) 勝二郁夫 C型肝炎ウイルスとプロテアソーム経路, 第21回大阪府立母子保健総合医療センターシンポジウム, 2015年2月12日, 大阪。
- (7) 勝二郁夫 C型肝炎ウイルス研究の新展開, 千里ライフサイエンスセミナー・免疫・感染症シリーズ第5回 話題のウイルス感染症の正体とその対策, 2014年10月24日, 大阪。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/infcon/>

## 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・教授  
研究者番号：40356241

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )