

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830140

研究課題名(和文)無細胞プロテインアレイによるHCVプロテアーゼにより切断される新規宿主因子の探索

研究課題名(英文)Comprehensive screening of novel host proteins cleaved by HCV protease

研究代表者

室井 敦(Muroi, Atsushi)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：60609402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HCVはC型肝炎の原因ウイルスとして知られ、世界で1億8000万人以上の感染者が存在するとされる。本研究ではHCVの持つプロテアーゼによって切断されるヒトタンパク質を網羅的に選抜することで、HCV治療のターゲットとなりうる新たな宿主タンパク質を同定することを目的とした。その結果、HCVプロテアーゼによって切断される新たなヒトタンパク質を同定し、培養細胞を用いた解析から、これらのタンパク質がHCVの感染・増殖に関わる因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive screening of novel host proteins cleaved by HCV protease  
HCV is known as a causative virus of hepatitis C. Approximately 180 million people are infected by the virus worldwide partially leading to hepatic cirrhosis and carcinoma. In this study, I attempted to comprehensively screen host proteins, which were potential target molecules for HCV treatment, cleaved by HCV protease. Novel host proteins, which affected HCV amplification in cells, were identified by the screening.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス プロテアーゼ 宿主因子

### 1. 研究開始当初の背景

HCV は C 型肝炎の原因ウイルスとして知られ、世界中で 1 億 8 0 0 0 万人以上の感染者が存在するとされる。感染後、その一部は肝硬変を経て肝がんへと進行し、国内だけで年間 3 万人以上が死亡する肝臓がん患者の 8 割以上に感染が認められる。現在 HCV 研究には、劇症肝炎患者血清から単離された JFH1 株と、それを複製・培養する系として、ヒト肝がん由来の細胞である Huh-7 およびそこから作成されたいくつかの細胞ラインが用いられている。これらを用いた研究から、HCV が細胞に吸着・侵入する際に必要な受容体候補や、ウイルス RNA の翻訳に関与するタンパク質などが報告されているが、JFH1 株以外の HCV に対する効率的な培養系は未だ実用化されていない。この事実は未知の宿主因子が一般的な感染・増殖に重要であることを強く示唆する。HCV はプラス鎖一本鎖 RNA をゲノムとして持ち、それを鋳型として一つのポリプロテインが合成されたのち、宿主細胞およびウイルス自身が持つプロテアーゼによって切断され、10 種のウイルスタンパク質が産生される。HCV の持つプロテアーゼは主にウイルスポリプロテインの切断を行っていると考えられていたが、近年になって HCV プロテアーゼである NS3 およびその補因子 NS4A が、インターフェロンの産生に関与する MAVS および TRIF を切断することが報告された (Li et al. 2005a, 2005b)。これにより、ウイルスが既存の細胞内因子を利用するに留まらず、自らの持つプロテアーゼを用いて宿主タンパク質を切断し、積極的に自らの増殖にとって有利な細胞環境を構築している可能性が示唆された。そのため、HCV プロテアーゼによって切断される新規宿主タンパク質因子を網羅的に同定・解析することは、新たな HCV 培養系や治療法の開発につながるのみならず、HCV による細胞環境の改変という新たなコンセプトを実証するものである。また本研究で得られる成果は、HCV と同様に自身のウイルスプロテアーゼを持つ HIV などの他のウイルスの研究にも応用可能である。

### 2. 研究の目的

本研究では、特に 1 回膜貫通型膜タンパク質に着目し、HCV プロテアーゼによって切断されるヒトタンパク質を同定し、HCV 感染におけるそれらの生物学的機能を明らかにすることを目的とする。各候補タンパク質およびその切断が HCV の感染・増殖において果たす役割を解明する。

### 3. 研究の方法

従来法では、多数の宿主タンパク質を合成しその切断を検出することは困難であった。しかし本研究室ではこれまでコムギ無細胞タンパク質合成系を用いて数千種ものタンパク質合成を行う技術開発を進め (Sawasaki et al. 2002)、最近、タンパク質間相互作用

解析技術である AlphaScreen 法を用いた切断基質選抜技術を確立し、カスパーゼ 3 をモデルにタンパク質切断を網羅的に検出することに成功した (Tadokoro et al. 2010)。本研究ではこれらの技術を用い、ヒト由来の 576 種類の 1 回膜貫通型膜タンパク質から HCV プロテアーゼによって切断される基質タンパク質のスクリーニングを行った。本システムでは N 末端を flag タグで、C 末端をビオチンで標識したタンパク質、抗 flag タグ抗体および 2 種類のビーズを用いることで目的タンパク質の切断を検出可能である。非切断時にはビーズ間のエネルギー伝達により化学発光が検出されるが、切断時には発光が低下する。そのため、発光強度の変化をもとに切断の有無を網羅的に検出することが可能である (図 1)。得られた候補タンパク質に関しては、レンチウイルスベクターを用い

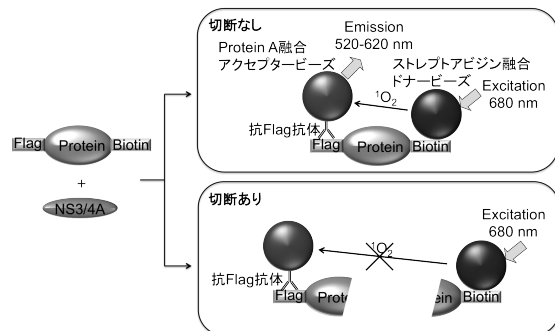


図 1 AlphaScreen 法を用いたプロテアーゼ切断基質探索法

て作製したノックダウン細胞株および過剰発現細胞株を用い HCV を感染させることで、各候補タンパク質の HCV の感染・増殖への関与について解析を行った。HCV の感染・増殖能の変化はウェスタンブロットによるウイルスタンパク質の定量、および RT-PCR 法によるウイルスゲノム RNA の定量によって解析した。更に、HCV プロテアーゼとの反応によって得られた切断断片のサイズ、および既知の HCV プロテアーゼ切断基質タンパク質の配列を元に各候補タンパク質の切断部位を予測し、予測切断部位における変異型タンパク質を合成することで、各候補タンパク質の切断部位の同定を行った。

### 4. 研究成果

本研究ではまず、コムギ無細胞タンパク質合成技術によって 576 種のヒト 1 回膜貫通型膜タンパク質を合成し、HCV プロテアーゼによって切断される基質候補タンパク質を AlphaScreen 法によって選抜した。その結果、コントロールと比較して HCV プロテアーゼ添加時に大きくシグナルの減少する 53 種の候補を得た。そこで、これらの候補タンパク質および HCV プロテアーゼを合成し反応させた後ウェスタンブロットによって切断の確認を行ったところ、19 種のタンパク質で切断断片が確認された。続いて、これら 19 種の候補タンパク質を野生型および機能

欠損変異型の HCV プロテアーゼと培養細胞に共発現させた。その結果、13種のタンパク質において、変異型プロテアーゼと共発現させた場合と比較して、野生型プロテアーゼと共発現させた際にタンパク質量の減少がみられたことから(図2)、これらの候補タンパク質は細胞内で実際に切断される可能性が高いと考え、切断基質候補タンパク質とした。

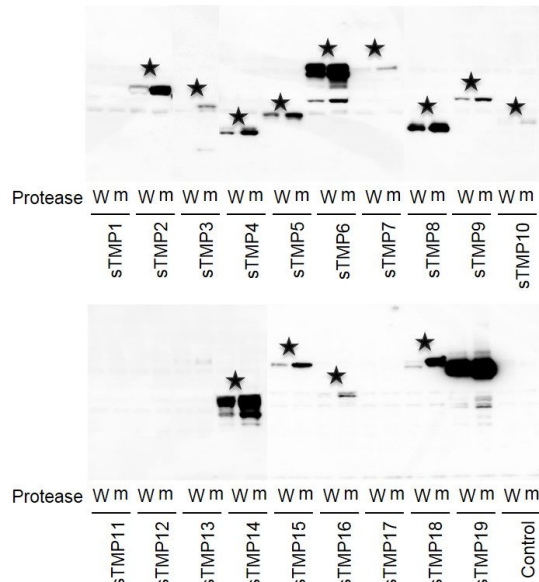


図2 候補タンパク質の細胞内での切断確認

続いて、これらの候補のうち、HCVの感染・増殖に影響を与えるタンパク質の選抜を試みた。shRNA技術およびレンチウイルスベクターを用いてこれらのタンパク質をノックダウンした培養細胞を作製し、HCVを感染させ、一定時間後の細胞内HCVタンパク質量を定量することで、各候補タンパク質がHCVの細胞への感染・増殖に与える影響について解析を行った。その結果、少なくとも3種の候補タンパク質については、ノックダウンによってウイルスタンパク質量が増加し、HCVの感染・増殖能が亢進したことが示唆された。この結果を検証するため、レンチウイルスベクターを用い、これら3種のタンパク質を過剰発現する細胞をそれぞれ作製し、同様にHCVの感染を行ったところ、2種のタンパク質の過剰発現細胞ではコントロール細胞と比較して感染後の細胞内ウイルスタンパク質量が減少し、HCVの感染・増殖能が低下したことが示唆された。そこで、HCVを感染させたノックダウン細胞の培地上清を用い、新たに用意した野生型の培養細胞へHCVの感染を行うことで、培地上清に含まれる感染性HCV粒子の定量を試みた。感染処理後一定時間後に細胞内に含まれるHCVゲノムRNA量を定量したところ、3種のノックダウン細胞の培地上清を用いてHCV感染を行った際にはコントロールと比較してHCVタンパク質量が増加しており、各ノックダウン細胞から産生されるウイルス粒子が増加していることが明らかになった。これらの結果から、この2種

のタンパク質はHCVの感染・増殖に対し、抑制的に働く因子である可能性が示唆された。

続いて、HCVプロテアーゼによるこれらのタンパク質の切断部位の同定を試みた。無細胞合成した候補タンパク質およびHCVプロテアーゼを反応させ、ウェスタンブロットによって切断断片のサイズを確認した後、既知のHCVプロテアーゼ切断配列情報に基づき、切断部位の予測を行った。その後、各タンパク質の切断部位配列を置換した変異体を作製し、HCVプロテアーゼによる切断の有無を確認することで切断部位の同定を行った。その結果、上記2種を含む4種のタンパク質の切断サイトを同定した(図3)。

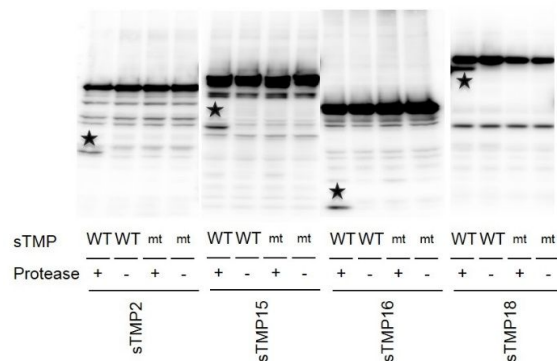


図3 候補タンパク質の切断部位同定

#### <引用文献>

Li et al. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity, Proc Natl Acad Sci USA, 102 (49), 2005, 17717-22.

Li et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF, Proc Natl Acad Sci USA, 102 (8), 2005, 2992-7.

Sawasaki et al. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics, Proc Natl Acad Sci USA, 99 (23), 2002, 14652-7.

Tadokoro et al. Characterization of a caspase-3-substrate kinome using an N- and C-terminally tagged protein kinase library produced by a cell-free system, Cell Death Dis, e89, 2010.

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

室井 敦 (MUROI, Atsushi)  
神奈川県立がんセンター・臨床研究所・  
特別研究員

研究者番号：60609402

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：