

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 21日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21590831

研究課題名（和文） HCV蛋白とインターフェロン系との相互作用のFRET/BRET解析

研究課題名（英文） FRET/BRET analysis of interaction between HCV protein and interferon signaling

研究代表者

藤田（田坂） めぐみ（FUJITA (TASAKA) MEGUMI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：50510369

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス(HCV)のNS4B蛋白、インターフェロン(IFN)シグナル分子であるCardif、STINGの蛋白-蛋白間相互作用について検討した。その結果、CardifとHCV-NS4Bの間に弱い結合が見られた。一方で、STINGについても同様に解析した結果、BiFC解析で強い結合を認め、NS4BとSTINGの相互作用が示された。同じ結果を免疫沈降法、免疫染色法でも確認下。以上の結果より、NS4BとSTINGは直接結合し、STINGを介したIFN発現誘導を抑制していることを示した。

研究成果の概要（英文）：We investigated protein interaction between Hepatitis C virus (HCV)-NS4B and signaling molecules associated with interferon (IFN) production, including Cardif, and STING. The weak interaction between HCV-NS4B and Cardif was observed. Our data, including BiFC analysis, immunoprecipitation assay, and immunostaining, demonstrated that HCV-NS4B specifically binds STING. We showed that NS4B suppresses STING-mediated IFN production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：HCVレプリコン、インターフェロン、RIG-I、HCV-NS4B、STING

1. 研究開始当初の背景

HCV排除においてインターフェロン(IFN)の重要性が知られており、チンパンジーを用

いた急性肝炎モデルの報告からも感染経過中に多数のIFN関連遺伝子が発現することが確認されている。ウイルスの侵入は toll like

receptor や retinoic-inducible gene I (RIG-I)、melanoma-differentiation-associated gene 5 (MDA5) などに認識され、宿主の抗ウイルス反応が活性化され、I 型或いは III 型 IFN が産生される。RIG-I は短い二重鎖 RNA (dsRNA) または dsRNA の 5' 末端 3 リン酸化を認識し Cardif (MAVS/VISA/IPS-1) の caspase recruitment domain (CARD) と結合する。その後 Cardif は TANK binding kinase 1 (TBK1)、I κ B kinase ϵ (IKK ϵ) kinases と結合し IFN regulatory factor 3 (IRF3) をリン酸化し活性化する。また TBK1、IKK ϵ の活性化により IRF-3 または IRF-7 がリン酸化されると核へ移動し IFN- β mRNA の転写が誘導される。

これらの宿主細胞における抗ウイルス反応を HCV Core 蛋白や NS3/4A 蛋白が抑制する事がこれまで報告されていた。NS3/4A は Cardif の Cys-508 を切断することによりミトコンドリアから遊離し、宿主 IFN 経路を阻害するとされる一方で、別の研究では Cardif はミトコンドリアから離れても二量体を形成し下流の IFN 産生シグナルを活性化することが可能と報告もされている。

これらの結果から下流の IFN シグナル活性化に際して Cardif のミトコンドリアとの結合よりも多量体化が重要と考えられ、かつ、NS3/4A 以外のウイルス由来因子も関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、HCV-NS4B が NS3/4A 同様に TBK1、IKK ϵ を介する interferon-stimulated response element 活性 (ISRE) は抑制しないが、RIG-I、Cardif を介する ISRE 活性を抑制する事を報告していた。これらの結果から NS4B は Cardif または Cardif と TBK1/IKK ϵ の間の未知の分子を標的として IFN 産生シグナルを抑制する可能性を考えた。

一方近年、RIG-I によって仲介される IFN シグナルの調整因子として新たに stimulator of interferon genes (STING/MITA/ERIS/MPYS/TMEM173) が報告された。この分子は小胞体に局在して RIG-I、Cardif、TBK1、IKK ϵ と結合することが知られ、ウイルス感染時に Cardif/TBK1/IRF-3 複合体の足場になると予測された。

これらの報告を基に、HCV-NS4B が RIG-I を介する IFN 発現系を抑制する分子的機序に

ついて更に詳細に解析することを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) HCV-NS4B truncated plasmid, Cardif, STING 発現プラスミドの作成、発現解析：NS4B, Cardif, STING を PCR で増幅しそれぞれ断片化した monomeric Kusabira-Green (mKG) vector に挿入し、N 末端または C 末端に truncate された mKG と結合した NS4B, Cardif, STING の発現プラスミドを作成した。相補的な mKG 融合プラスミドを様々な組み合わせで 293T 細胞に遺伝子導入した。

(2) HCV-NS4B と Cardif, STING の免疫染色：NS4B は 5 カ所の膜貫通ドメインを持ち小胞体膜に局在する。一方、Cardif は C 末端の膜貫通ドメインでミトコンドリア外膜にアンカーしている事が報告されている。これらの蛋白の相互作用を確認するため、それぞれ局在をと小胞体膜との位置関係を解析するべく共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫蛍光染色による解析を行った。

(3) HCV-NS4B と Cardif, STING の BiFC アッセイ、免疫沈降：Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法とは、結合能を調べようとする 2 つの蛋白質のそれぞれと、N 末側半分と C 末側半分に分割した YFP の間で融合蛋白質を作成し、2 つの蛋白質が結合する場合に YFP の立体構造が再生され、蛍光が観察されるという、原理に基づくものである。この手法を用いて HCV-NS4B と Cardif 及び STING との相互作用の解析を行い、解析した。また免疫沈降法による解析を行った。

4. 研究成果

(1) Cardif と HCV-NS4B の相互作用

N-Cardif と NS4B-C、N-Cardif と C-NS4B、C-Cardif と NS4B-N、C-Cardif と N-NS4B の組み合わせで弱い蛍光が見られた。また BiFC シグナル陽性細胞の割合は N-Cardif と NS4B-C、C-Cardif と NS4B-N の組み合わせで増加していた。

蛍光顕微鏡では mKG-Cardif の一部がミトコンドリアと共局在していた。この共局在は Cardif-mKG では見られず、C 末端への mKG の融合によりミトコンドリア結合ドメインが障害されたためと考えられた。

(2) STING と HCV-NS4B の相互作用

STING についても切断した mKG 蛋白と N 末端もしくは C 末端で融合した蛋白発現プラスミドを作成し、様々な組み合わせで遺伝子導入した。その結果全ての組み合わせで強い蛍光を認め、NS4B と STING の相互作用が示唆された。フローサイトメトリーでも NS4B と STING-mKG 融合蛋白の全ての組み合わせ強い BiFC シグナルを認めた。またコントロールと比較し NS4B と STING-mKG 群において BiFC 陽性細胞の比率は有意に高かった。

また NS4B が STING と反応することにより、Cardif と STING の直接作用を阻害する可能性を考え、免疫沈降を用いて検討した。

まず、NS4B と Cardif または NS4B と STING を発現するプラスミドを HEK293T 細胞または Huh7 細胞に遺伝子導入し免疫沈降した。NS4B は HEK293T 細胞、Huh7 細胞の両方で STING と強く結合していた。一方で NS4B と Cardif との間にはいずれの細胞でも結合はみられなかった。また、既報のとおり STING と Cardif の間に強い結合を確認した。更に興味深いことに HEK293T 細胞、Huh7 細胞の両方で、STING と Cardif、NS4B の共発現により NS4B の容量依存性に STING と Cardif の相互作用は減少し、最終的に完全に阻害された。

これらの結果から、HCV-NS4B と STING は直接結合しうること、NS4B と Cardif の結合は不安定で有り、むしろ Cardif と STING の結合によるシグナル伝達を、NS4B は干渉する形で結合して阻害し、IFN- β 発現誘導を抑制していることを明らかにし、発表した

(*Hepatology*, 2013)。

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 10 件)

1. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakiyama S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 57(1):46-58, 2013. 査読有 doi: 10.1002/hep.26017.
2. Kakinuma S, Kiyohashi K, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, and *Watanabe M. Wnt5a Signaling Mediates Biliary Differentiation of Fetal Hepatic Stem/Progenitor Cells. *Hepatology in press*, 2013. 査読有 doi: 10.1002/hep.26293.
3. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. α -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology in press*, 2013. 査読有 doi: 10.1002/hep.26442.
4. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M. Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother* 56(3):1315-23, 2012. 査読有 doi:10.1128/AAC.05764-11
5. Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol* 85:5986-94, 2011. 査読有 doi: 10.1128/JVI.02583-10.
6. Watanabe T, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Oooka S, Watanabe M. Inhibitory effect of a triterpenoid compound, with or without interferon-alpha, on hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agent Chemother* 55:2537-45, 2011. 査読有 doi: 10.1128/AAC.01780-10.
7. Ueyama M, Nakagawa M, Sakamoto N,

- Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Kitazume A, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Sekine-Osajima Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M and the Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Serum interleukin-6 levels correlate with resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon- α 2b plus ribavirin. *Antivir Ther* 16:1081-1091, 2011. 査読有 doi: 10.3851/IMP1864.
8. Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res* 41:258-269, 2011. 査読有 doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00771.x.
 9. Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Ito Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M, and the Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Medical Virol* 83:871-878, 2011. 査読有 doi: 10.1002/jmv.22038.
 10. Itsui Y, Sakamoto N, Kakinuma S, Nakagawa M, Sekine-Osajima Y, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Suda G, Karakama Y, Mishima K, Yamamoto M, Watanabe T, Ueyama M, Funaoka Y, Azuma S, Watanabe M. Antiviral effects of the interferon-induced protein guanylate binding protein 1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. *Hepatology* 50(6):1727-37, 2009. 査読有 doi: 10.1002/hep.23195.
- [学会発表] (計 19 件)
1. Sayuri Nitta, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Akiko Kusano Kitazume, Miyako Murakawa, Megumi Tasaka-Fujita, Yasuhiro Asahina, Mamoru Watanabe. HCV-NS4B protein binds STING and blocks the RIG-I mediated IFN pathway. 10th single topic conference. November 21-22, 2012, Tokyo.
 2. Sayuri Nitta, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Kako Mishima, Akiko Kusano-Kitazume, Kei Kiyohashi, Miyako Murakawa, Kohei Yoshino, Megumi Tasaka-Fujita, Yasuhiro Asahina, Mamoru Watanabe. HCV-NS4B blocks the RIG-I mediated IFN pathway through targeting of STING. 19th International Symposium of Hepatitis C Virus and Related Viruses. 5-9 October, 2012, Venice, Italy
 3. 新田沙由梨、坂本直哉、吉野耕平、村川美也子、北詰晶子、幾世橋佳、東正新、柿沼晴、中川美奈、朝比奈靖浩、渡辺守. HCV NS4B蛋白によるRIG-I誘導性Interferon発現経路の抑制機構についての解析. JDDW 2012、2012年10月10日-13日、神戸
 4. 新田沙由梨、朝比奈靖浩、坂本直哉、村川美也子、北詰晶子、幾世橋佳、東正新、柿沼晴、中川美奈、渡辺守. IFN不応例における宿主自然免疫応答とHCV逃避機構 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会、2012年6月21日-22日、神戸.
 5. 新田沙由梨、坂本直哉、吉野耕平、村川美也子、北詰晶子、幾世橋佳、東正新、柿沼晴、中川美奈、朝比奈靖浩、渡辺守. HCV NS4B蛋白はSTINGを介しRIG-I誘導性Interferon産生応答を抑制する 第48回肝臓学会総会、2012年6月7-8日、金沢
 6. 藤田めぐみ、脇田隆宇、加藤孝宣.HCV genotype 1b株キメラウイルスを用いたHCV core領域アミノ酸70/91変異株の解析 第48回 日本肝臓学会総会、2012年6月8日、金沢
 7. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. November 4, 2011, San Francisco
 8. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume

- A, Kiyohashi K, Murakawa M, Yoshino K, Tasaka-Fujita M, Watanabe M. HCV-NS4B targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immune response. September 8, 2011, Seattle
9. 新田沙由梨、坂本直哉、藤田めぐみ、北詰晶子、幾世橋佳、船岡祐介、渡辺貴子、植山真由美、小野塚泉、東 正新、中川美奈、柿沼 晴、渡辺 守. HCV-NS4B蛋白とIFN発現シグナル分子との分子間相互作用の解析 第48回 日本消化器免疫学会、2011年7月21日、金沢
 10. 新田沙由梨、坂本直哉、藤田めぐみ、柿沼晴、村川美也子、北詰晶子、幾世橋佳、船岡祐介、渡辺貴子、植山真由美、小野塚泉、櫻井 幸、中川美奈、東 正新、渡辺 守. HCV-NS4B蛋白とRIG-I惹起性IFN産生シグナル関連蛋白との分子間相互作用の解析 第47回 日本肝臓学会総会、2011年6月2日、東京
 11. Itsui Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Osajima Y, Tasaka M, Sakurai Y, Suda G, Karakama Y, Mishima K, Yamamoto M, Watanabe T, Ueyama M, Funaoka Y, Azuma S (Chen CH), Kakinuma S, Yauchi T, Watanabe M. Antiviral effects of interferon-induced proteins GBP-1 and its interactions with hepatitis C virus NS5B protein. 60th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. November 2, 2009, Boston
 12. 田坂めぐみ. インターフェロン発現・作動機構とHCV蛋白 第13回 日本肝臓学会大会、2009年10月14日、京都
 13. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Wakita T, Watanabe M. Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. 3 October, 2009, Nice
 14. 渡辺貴子、中川美奈、船岡祐介、植山真由美、三島果子、山本満千、小貫優子、須田剛生、櫻井 幸、田坂めぐみ、箆島裕子、井津井康浩、陳 正新、坂本直哉、渡辺 守. Genotype 2型C型慢性肝炎のインターフェロン治療再燃例に対する再治療の試み 第45回 日本肝臓学会総会、2009年6月4日、神戸
 15. 井津井康浩、坂本直哉、中川美奈、箆島裕子、田坂めぐみ、櫻井 幸、須田剛生、三島果子、山本満千、植山真由美、渡辺貴子、船岡祐介、渡辺 守. HCV増殖を制御するInterferon誘導蛋白とHCV非構造蛋白の相互作用の解析 第45回 日本肝臓学会総会、2009年6月4日、神戸
 16. 三島果子、坂本直哉、中川美奈、井津井康浩、箆島裕子、田坂めぐみ、櫻井 幸、須田剛生、山本満千、植山真由美、渡辺貴子、船岡祐介、渡辺 守. 細胞障害性HCV-JFH1 subcloneの単離と機能解析 第45回 日本肝臓学会総会、2009年6月4日、神戸
 17. 須田剛生、坂本直哉、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井 幸、小貫優子、山本満千、渡辺貴子、植山真由美、船岡祐介、井津井康浩、陳 正新、今村道雄、茶山一彰、渡辺 守. Genotype 2b急性肝炎由来HCVクローンの構築と増殖・粒子形成能の解析 第45回 日本肝臓学会総会、2009年6月4日、神戸
 18. 船岡祐介、坂本直哉、井津井康浩、須田剛生、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井 幸、小貫優子、山本満千、渡辺貴子、植山真由美、陳 正新、渡辺 守. HCVコア変異株培養系を用いたインターフェロン感受性、細胞内増殖、粒子分泌能の解析 第45回 日本肝臓学会総会、2009年6月4日、神戸
 19. 櫻井 幸、坂本直哉、中川美奈、井津井康浩、田坂めぐみ、小貫優子、須田剛生、三島果子、山本満千、植山真由美、船岡祐介、渡辺貴子、陳 正新、渡辺 守. HCV複製増殖に関連する糖脂質代謝ネットワークの網羅的解析 第45回 日本肝臓学会総会、2009年6月4日
- 〔図書〕 (計 0 件)
- 〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
ホームページ等
6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 (田坂) めぐみ

(Fujita-Tasaka Megumi)

東京医科歯科大学

大学院医歯学総合研究科 特任助教

研究者番号：50510369

(2)研究分担者

朝比奈 靖浩 (Asahina Yasuhiro)

東京医科歯科大学

大学院医歯学総合研究科 教授

研究者番号：00422692

東 正新 (Azuma Seishin)

東京医科歯科大学 医学部附属病院

講師

研究者番号：10376783

坂本 直哉 (Sakamoto Naoya)

北海道大学 医学系研究科 教授

研究者番号：10334418

(H24：研究協力者)

(3)連携研究者

なし