

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390111

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス粒子形成におけるゲノムパッケージングの分子機構

研究課題名(英文) Identification of cis-acting element for packaging of hepatitis C virus genome

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、C型肝炎ウイルス(HCV)の生活環の分子機構が明らかになりつつあるが、HCVゲノムがどのようにして粒子内へパッケージングされるのかはまったくと言っていいほど明らかにされていなかった。本研究では、1) HCV粒子の中に含まれるHCV RNAは大部分全長サイズであること、2) HCVゲノムの中で、3' UTR配列(~200塩基)がパッケージングに必要であり、特にその3'末端側に存在するstem-loop二箇所がゲノムパッケージングに重要であること、3) HCV Coreタンパク質の塩基性アミノ酸クラスターはHCV RNAとの結合、粒子産生に重要であることなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mechanism(s) by which the hepatitis C virus (HCV) genome becomes encapsidated remains unknown. Deep sequencing demonstrated that a majority of particle-associated HCV RNAs are genome-sized. In cell cultures producing HCV, molecular ratios of 3' end viral RNA to 5' end positively correlated with infectivity of fractions and that of virion-rich fraction was the highest, suggesting selective encapsidation of genome RNA. Using trans-complementation systems, the 3' untranslated region (UTR) of the genome was identified as a cis-acting element for RNA packaging. Mutations within the stem-loops at the 3' end of the 3' UTR were observed to diminish packaging efficiency. A foreign gene flanked by the 3' UTR was encapsidated by supplying both viral NS3-NS5B proteins and Core-NS2 in trans. This study provides the first direct evidence of selective packaging of the HCV genome into the viral particles potentially through 3' UTR-Core binding.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス ゲノムパッケージング 粒子形成 C型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎は我が国の国民病とも言われ、現在、C型肝炎ウイルス(HCV)感染者は約200万人とされる。その多くが慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと移行し、肝臓での年間死亡者は3万人を超える。HCVは発見以来効率の良いウイルス培養細胞系が存在しなかったため、従来のウイルス学的な研究手法は使えず、HCVの感染や複製といったウイルス生活環についての情報は少なく、また抗ウイルス剤の開発研究も遅れていた。しかしながら、最近、劇症肝炎患者から分離されたJFH-1株を用いることにより、感染性HCVを効率よく産生する培養細胞系が確立された。これにより、同ウイルスの生活環に関する研究が大きく進展することが期待されるに至り、ゲノム複製機構などの研究で数々の新しい知見が報告されている。しかしながら、HCVのゲノムがどのようにして粒子内へパッケージングされるのかはまったくと言っていいほど明らかにされていない。

HCVのゲノムは9.6 kbの一本鎖RNAであり、これが宿主細胞で新たに作られたウイルス粒子に取り込まれることで、遺伝情報が次世代のウイルスに伝えられる。HCVの構造蛋白質Core, E1, E2のうちCore蛋白質は塩基性アミノ酸クラスターを有し、近縁ウイルスとのアミノ酸配列比較などから、RNA(またはDNA)結合能を有し、ウイルスゲノムを内包した粒子構造(ヌクレオキャプシド)の外殻となるものと推定されている。

2. 研究の目的

本研究では、1) HCV粒子内に取り込まれるHCV RNA及び宿主細胞由来遺伝子配列解析、2) HCVゲノムが粒子へ特異的に取り込まれるために必要なゲノム構造・配列の同定、及び3) HCVゲノムRNAと会合しヌクレオキャプシド形成に重要な役割を果たす構造蛋白質領域の同定、を行った。

3. 研究の方法

次世代シーケンサーGAIIシステムにより、精製HCV粒子内に含まれるHCV RNA配列及び宿主細胞由来遺伝子を網羅的に解析した。

ゲノムパッケージングに関与すると考えられるHCV RNA領域を部分欠損させた様々な変異サブゲノムを作製し、HCC Core~NS2発現プラスミドと同時にヒト肝がん細胞Huh7へトランスフェクションし、サブゲノムを内包したHCV粒子(HCVtcp)を作製、細胞外へ分泌させた。この細胞内トランスパッケージングシステムで得られたHCVtcpをnaïveなHuh7.5.1細胞に接種し1日後の細胞内HCV RNAを定量RT-PCRで測定した。

HCV Core部分変異体を発現するプラスミドを作製した。試験管内転写、翻訳系にて種々のCoreタンパク質を産生させ、in vitro合成したHCV RNA断片との結合をAlphaScreen法にて解析した。

4. 研究成果

(1) HCV粒子内に含まれる遺伝子の網羅的解析

HCV粒子の中には選択性を持ってHCVゲノムが取り込まれるのか、非HCV遺伝子も含まれるのか、を明らかにするため部分精製HCV粒子からRNAを抽出しcDNAを次世代シーケンサーで網羅的に解析した。その結果、HCV粒子内のHCV配列の大部分は全長遺伝子であること、HCV配列以外に宿主細胞由来の人遺伝子も数多く検出されることが示された。断片化されたHCV遺伝子はminor populationであったことから、ゲノムサイズのHCV遺伝子が選択的にパッケージングされる機構が機能していることが示唆された。

(2) HCVゲノムRNAのパッケージングに必要なHCV RNA領域の同定

フラビウイルスなどではウイルスゲノム複製と粒子へのパッケージングがリンクすることが知られている。HCVでもゲノム複製

効率が高い場合にパッケージング効率も高いかどうかを調べた。トランスパッケージングシステムの producer 細胞として HCV ゲノム複製を許容する Huh7 細胞または非複製許容細胞 293T を用いた。両細胞ではほぼ同等の HCV タンパク質産生が認められるものの産生される HCVtcp レベルは Huh7 細胞の方が有意に高かった。HCV においてもウイルスゲノム複製と粒子へのパッケージングはリンクする可能性が示された。その上で、複製能とは独立に、粒子へのパッケージングを規定する HCV RNA 配列が存在する可能性を考え、トランスパッケージングシステムを駆使して HCV パッケージングシグナルアッセイ系を構築し、以下の研究を行った。ウイルス遺伝子のパッケージングには遺伝子末端領域の二次構造が関与する可能性が考えられるため、HCV RNA の 5' または 3' 非翻訳領域 (UTR) をランダムに変異させたミニライブラリーを挿入したサブゲノムレプリコンを作製した。この変異ライブラリーレプリコンを Huh7 細胞へ導入、複製能を調べると、3' UTR 変異では複製能を保持した変異レプリコンが 20 種類以上存在することが示された。これらの変異体について、トランスパッケージング解析により、パッケージング能を調べたところ、3' UTR 内の stem-loop 構造の stem 部分の変異体では HCV 粒子にパッケージングされなくなることが明らかとなった。5' UTR について同様の手法で解析を行ったが、今のところ複製を許容しパッケージング能を持たない変異は見出されていない。このように、HCV ゲノムのパッケージングに 3' UTR が関与することが示唆されたが、3' UTR 中で特に重要な領域を明らかにすべくさらに変異解析を行った。3' UTR には 3 カ所の stem-loop 構造 (末端側から SL1, SL2, SL3) が存在するが、詳細な部分変異解析を進めた結果、ゲノムパッケージングには SL1 及び SL2 が特に重要であることを見出した。

一方、HCV 3' UTR 配列は非 HCV 遺伝子に対しても HCV 粒子へのパッケージングシグナルとして機能するかを調べるため、GFP 遺伝子の末端に HCV 3' UTR を付加して Core~NS2 発現プラスミド及び NS3~NS5B 発現プラスミドと共に細胞へ導入しパッケージング能を解析した。その結果、GFP 遺伝子は HCV 3' UTR 付加によって HCV 粒子に取り込まれることが示された。3' UTR を HCV パッケージングシグナルと結論づけた。

(3) HCV ゲノム RNA のパッケージングに必要な Core タンパク質領域の同定

キャプシドタンパク質である Core には 3 カ所の塩基性アミノ酸クラスター; aa 6-13 (CL1), 39-43 (CL2), 59-70 (CL3) が存在する。各クラスターのリジンまたはアルギニンをそれぞれアラニンに置換した変異 HCV ゲノムを作製し細胞に導入して、ウイルス産生能が保持されるかを調べた。その結果、CL2、CL3 変異ではウイルス産生能は完全に消失するのに対し、CL1 変異ではウイルス産生能は維持されることが示された。次に、CL2、CL3 がゲノムパッケージングに重要であることを明らかにするためトランスパッケージング (HCVtcp) 解析を行った。CL2 または CL3 変異を持つ Core の場合、HCVtcp は全く産生されなかった。さらに、CL2、CL3 変異が Core-HCV RNA 結合能に影響するかを検証するため、試験管内で合成、精製した変異型また野生型 Core について 3' UTR RNA との結合効率を AlphaScreen で解析した。その結果、CL2 または CL3 変異 Core は野生型 Core と同等の RNA 結合能を有することが示された。CL1/CL2/CL3 とともに変異させた場合、RNA との結合は顕著に低下した。以上の結果より、HCV Core の塩基性アミノ酸クラスターは HCV RNA との結合、粒子産生に重要であることが示され、CL2 及び CL3 は Core-RNA 結合後の過程 (例えばヌクレオキャプシドアセンブリ

一) にも関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

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). DOI: 10.1371/journal.ppat.1002561.

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). DOI: 10.1016/j.virol.2012.05.033.

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). DOI: 10.1053/j.gastro.2012.09.017.

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). DOI: 10.1016/j.micinf.2012.10.003.

Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal Peptidase Complex Subunit 1 Participates in the Assembly of Hepatitis C Virus through an Interaction with E2 and NS2. PLOS Pathog. 9: e1003589 (2013). DOI: 10.1371/journal.ppat.1003589.

Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H,

Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. PLoS One 8: e68992 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0068992.

Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi SI, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- type I receptor. Sci Rep. 3: 3243 (2013). DOI: 10.1038/srep03243.

Mawatari S, Uto H, Ido A, Nakashima K, Suzuki T, Kanmura S, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Shimada Y, Sudoh M, Shoji I, Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4. PLOS One 8: e82094 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0082094.

Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T, Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. Sci Rep. 3:3575 (2013). DOI: 10.1038/srep03575.

Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling. Microbes Infect. 16: 114-122 (2014). DOI: 10.1016/j.micinf.2013.10.016.

Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for

virus detection. *Biosens Bioelectron.* 58:33-39 (2014). DOI: 10.1016/j.bios.2014.02.039.

Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, Tagawa YI. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. *J Biosci Bioeng.* 118: 107-111 (2014). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.016.

Shirasago Y, Sekizuka T, Saito K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuroda M, Abe R, Fukasawa M. Isolation and Characterization of A Huh.7.5.1-Derived Cell Clone Highly Permissive to Hepatitis C Virus. *Jpn J Infect Dis.* 68: 81-88 (2015). DOI: 10.7883/yoken.JJID.2014.231.

Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- in Infectious Virus Production. *J Virol.* 88: 7541-7555 (2014). DOI: 10.1128/JVI.03170-13.

Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. *J Virol Methods* 207: 38-44 (2014). DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.06.007.

Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 95: 2658-2667 (2014). DOI: 10.1099/vir.0.068528-0.

Lee J, Ahmed SR, Oh S, Kim J, Suzuki T, Parmar K, Park SS, Lee J, Park EY. A plasmon-assisted fluoro-immunoassay using gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for monitoring the influenza virus. *Biosens Bioelectron.* 64: 311-317 (2014). DOI: 10.1016/j.bios.2014.09.021.

Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting cellular squalene synthase, an enzyme essential for cholesterol biosynthesis, is a potential antiviral strategy against hepatitis C virus. *J Virol.* 89: 2220-2232 (2015). DOI: 10.1128/JVI.03385-14.

Li TC, Iwasaki K, Katano H, Kataoka M, Nagata N, Kobayashi K, Mizutani T, Takeda N, Wakita T, Suzuki T. Characterization of self-assembled virus-like particles of Merkel cell polyomavirus. *PLoS One.* 10: e0115646 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0115646.

Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuniyasu H, Kondoh M. Monoclonal Antibodies against Extracellular Domains of Claudin-1 Block Hepatitis C Virus Infection in a Mouse Model. *J Virol.* 89: 4866-4879 (2015). DOI: 10.1128/JVI.03676-14.

[学会発表](計 4件)

Shi G, Suzuki T et al. Possible mechanism for selective packaging of HCV genome into the infectious particles. 20th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses, October 8, 2013.

Ito M, Suzuki T, et al. Loss of susceptibility to HCV infection and decreased tumorigenicity mediated by reprogramming of human hepatoma cells. 20th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses, October 8, 2013.

Shi G, Suzuki T et al. HCV 3' UTR as a cis-acting packaging signal. 21th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses, September 10, 2014.
Ito M, Suzuki T, et al. Use of HuH7-derived, bidirectional oval-like cells to identify differentiation-dependent host factors that are involved in regulation of HCV lifecycle. 21th International Symposium on hepatitis C virus and related viruses, September 10, 2014.

〔図書〕(計2件)

中島謙治、鈴木哲朗. 進歩するC型肝炎治療. 感染・炎症・免疫. 医薬の門社. pp.81-82, 2015.
鈴木哲朗. C型肝炎ウイルスのゲノム複製や粒子形成を制御するしくみ. 化学の領域. 医薬ジャーナル. pp.97-103, 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 肝炎組織体、肝炎ウイルスの感染方法、肝炎組織体の製造方法、肝炎ウイルスの増殖方法、肝炎ワクチンの製造方法、スクリーニング方法、及びキット
発明者: 鈴木哲朗 他
権利者: 浜松医大 他
種類: 特許
番号: 特願 2014-052754
出願年月日: 2014年3月14日
国内外の別: 国内

名称: HCV RNA複製抑制剤
発明者: 鈴木哲朗 他
権利者: 浜松医大 他
種類: 特許
番号: 特開 2012-171870
公開年月日: 2012年9月10日
国内外の別: 国内

取得状況(計3件)

名称: 感染性C型肝炎ウイルス粒子高産生系
発明者: 鈴木哲朗 他
権利者: 国立感染症研 他
種類: 特許
番号: 特許第 5035985号(日本), U.S.Patent No.8,143,022(米国)
取得日: 2012年3月27日(米国)
国内外の別: 国内、国外

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 他
種類: 特許
番号: 特許第 5030065号(日本), U.S.Patent No.8,183,044(米国)
取得日: 2012年5月22日(米国)

名称: 糖類固定化親水性樹脂化合物、ウイルス除去用高分子基材、及び生体適合性材料
発明者: 鈴木哲朗 他
権利者: 浜松医大 他
種類: 特許
番号: 特許第 5673894号
取得日: 2015年1月9日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 哲朗 (SUZUKI, Tetsuro)
浜松医科大学・医学部感染症学講座・教授
研究者番号: 00250184

(2) 研究分担者

鈴木 亮介 (SUZUKI, Ryosuke)
国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任
研究官
研究者番号: 50342902

伊藤 昌彦 (Ito, Masahiko)

浜松医科大学・医学部感染症学講座・助教
研究者番号: 50385423