

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04735

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスの選択的ゲノムパッケージング機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for the selective 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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)ゲノムがどのように粒子へパッケージングされるのか長く不明であったが、本研究グループの先行研究で、HCVゲノムの3'非翻訳領域(3'UTR)がパッケージングシグナルとして働き、その3'末端側stem-loop(SL1、SL2)が重要であることなどが明らかにされた。本研究ではさらに詳細な解析を行い、SL1、SL2内loop領域配列がHCVゲノムパッケージングに特に重要であること、HCV遺伝子型が違っても同程度の活性を有すること、フラビウイルス科ウイルスのゲノムパッケージングは種特異性を有すること、ゲノム複製と粒子形成のステップが機能的にリンクする可能性などが示された。

研究成果の概要(英文)：Our former study demonstrated that the 3' untranslated region (UTR) of HCV genome functions as a cis-acting element for the viral RNA packaging; however, the detailed functional mechanisms of packaging signal still remain unclear. In this study, mutations within the conserved stem-loops of the 3' UTR were observed to diminish packaging efficiency, suggesting the conserved apical loop motifs of the 3' end-side of 3' UTR are important for the packaging. A foreign reporter gene flanked by the 3' UTR was encapsidated by supplying both viral NS3-NS5B proteins and Core-NS2 in trans. The 3' UTRs derived from GT-2a and -1a supported the packaging at comparable level. It is highly likely that specific recognition of the HCV genome via the packaging signal and coupling with replication are not mutually exclusive, but rather cooperate for the best beneficial of encapsidation and nucleocapsid formation.

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

慢性肝疾患の主要な原因因子の一つである C 型肝炎ウイルス (HCV) のライフサイクルに関する基礎研究は、レプリコンシステム、JFH-1 株による感染増殖系など培養細胞での実験法が開発されたことから今世紀に入り大きな進展を遂げた。粒子形成過程の分子機構については、粒子を構成する構造タンパク質だけでなく NS2、NS5A などの非構造タンパク質が必要であること、粒子アセンブリ、分泌には、細胞の脂質代謝系が関与することなどが明らかになった。その中にあって、「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かった。申請者は、24 年度より研究課題「C 型肝炎ウイルス粒子形成過程におけるゲノムパッケージングの分子機構」(基盤研究(B))を開始し、これまでに 1) deep sequencing 解析より、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'非翻訳領域 (UTR) 配列 ~200 塩基がパッケージングに重要であり、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、などを明らかにした。

## 2. 研究の目的

HCV の粒子形成過程において、ゲノム RNA のパッケージングのしくみ、選択性などは明らかにされていない。本研究では、1) パッケージング活性に特に重要な RNA 配列、二次構造を同定し、2) ゲノムパッケージングにおける非構造タンパク質の役割、3) HCV 遺伝子型によるパッケージング能の違い、4) ゲノム複製系と非複製系のパッケージング効率の違い、5) パッケージングのウイルス種特異性、を明らかにする。これにより、HCV ゲノムパッケージング機構の全容が解明され、HCV ライフサイクルの制御機構に理解が深まると共に新規作用機序を持つ抗 HCV 薬の開発へ繋がるものと期待される。

## 3. 研究の方法

HCV トランスパッケージング (HCVtcp) の基本システムでは、レポーターサブゲノムプラスミドと HCV Core-NS2 発現プラスミドをヒト肝がん HuH-7 細胞へ共トランス

フェクションし粒子形成させ、細胞外へ放出されたウイルス粒子を HCV 高感受性 Huh7.5.1 細胞へ添加し細胞内でのレポーターサブゲノム発現レベルを定量することでパッケージング、粒子形成効率を評価した。HCV 3' UTR stem-loop 領域内で特に重要な RNA 配列、二次構造を明らかにするため、SL1、SL2 内の各 loop 領域、stem 領域に種々の塩基置換変異または部分欠損を導入して HCVtcp システムでパッケージング能を比較検討した。

パッケージングシグナル同定実験では、上記 HCVtcp システムを一部改変し、NS5B ポリメラーゼを変異させた非複製型の HCV サブゲノム RNA を粒子に取り込ませる手法を構築し解析に用いた。それをさらに改変し、非 HCV 由来のレポーター遺伝子にパッケージングシグナルを付加することによりレポーター遺伝子が HCV 粒子に取り込まれる実験系を作出した。シグナル付加レポーター遺伝子発現プラスミド、HCV Core ~NS2 発現プラスミドに加え、HCV 非構造タンパク質 (NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B) 発現プラスミドを種々の組み合わせで細胞へ共導入しパッケージング、粒子形成効率を評価した。

## 4. 研究成果

1) ゲノムパッケージングに重要な HCV RNA 配列、二次構造の同定

HCV のレポーターサブゲノムと HCV 粒子形成タンパク質 (Core-E1-E2-p7-NS2 ; 以下 Core-NS2) 遺伝子を別コンストラクトから共発現させることによって粒子を形成させるトランスパッケージング (HCVtcp) システムを利用したこれまでの解析から、HCV 3'UTR 内の 3'末端側の二カ所の stem-loop 領域 (SL1、SL2) が HCV ゲノムパッケージングに必要なことが示されている。この領域内でゲノムパッケージングに特に重要な RNA 配列、二次構造を明らかにするため、SL1、SL2 内の各 stem 領域、loop 領域に種々の塩基置換変異を導入して HCVtcp システムでパッケージング活性を比較検討した。SL1、SL2 の stem 領域を非相補配列に置換し stem 構造を維持できなくなった場合もパッケージング効率に大きな変化は見られなかった。それに対し、SL1、SL2 の両 loop 領域の配列を

loop 構造を保持したまま置換したところパッケージング効率は顕著に低下することが示された。HCV ゲノム 3'UTR SL1, SL2 内 loop 上の配列が HCV ゲノムパッケージングに特に重要であることが示唆された。

## 2) 非 HCV レポーター遺伝子パッケージングモデルの樹立とそれを用いたパッケージング機構の解析

HCVゲノム由来でない遺伝子に HCV パッケージングシグナルを付加することによって HCV 粒子にパッケージングされるかを明らかにするため、Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP) 遺伝子を利用したパッケージングレポーターを構築した。CAG プロモーター支配下で EmGFP または EmGFP-3'UTR を発現するコンストラクトを作製し HCV Core-NS2 発現プラスミドと共発現させた HuH-7 細胞の培養上清を HCV 高感受性 Huh7.5.1 細胞に添加したところ、パッケージングシグナル 3'UTR の有無に関わらず Huh7.5.1 細胞での EmGFP 発現は認められなかった。しかしながら、EmGFP-3'UTR、Core-NS2 に加え HCV 非構造タンパク質 NS3-NS5B の発現プラスミドを産生細胞へ共トランスフェクションすることによって EmGFP 遺伝子がパッケージング可能であることが示された。新たに樹立したパッケージングモデル系によりパッケージングシグナルの重要性、機能の解析に有用であること、HCV 粒子形成に非構造タンパク質が必要であることを示すことができた。

## 3) HCV 遺伝子型によるウイルスゲノムパッケージング能の違い

樹立した HCV パッケージングシステムは HCV 遺伝子型 2a の JFH-1 株を基盤としている。HCV は株間で遺伝子配列が多様であることが知られているが、2a 以外の遺伝子型由来の 3'UTR 配列でも同様にパッケージングシグナルとして働くかを調べた。遺伝子型 1a の感染性クローンである H77 株の 3'UTR を非複製型の HCV<sub>tcp</sub> システムに導入して、HCV<sub>tcp</sub> producer 細胞で発現させたところ、JFH-1 3'UTR の非複製系の場合とほぼ同等のパッケージング効率を示した。HCV 遺伝子型が違っていても同程度のパッケージングシ

グナル活性を有する可能性が示された。

## 4) ゲノム複製系と非複製系のパッケージング効率の比較

複製型サブゲノムでは非複製型に比べパッケージング、粒子形成能は有意に高いが、通常この実験では producer 細胞内のサブゲノム RNA レベルは複製型の方が顕著に高いため、細胞内のサブゲノム RNA 量の違いを反映している可能性を否定できない。「ゲノム複製がパッケージング効率に影響するか」を調べるため、HCV 複製を許容しない 293T 細胞を producer 細胞とし、HuH-7 細胞での複製型の場合とパッケージング効率を比較した。両 producer 細胞でサブゲノムレポーター RNA また Core-NS2 タンパク質発現レベルを揃えて解析したところ、粒子形成能、パッケージング効率は複製型 producer 細胞の方が明らかに高かった。ゲノム複製と粒子形成のステップが機能的にリンクする可能性はフラビウイルス、ポリオウイルスなどで従来から示唆されているが、HCV でも同様の傾向があることを新たな実験系で示すことができた。

## 5) ゲノムパッケージングのウイルス種特異性

HCVゲノム RNA パッケージングのウイルス種特異性を明らかにするため、フラビウイルス科の日本脳炎ウイルス (JEV) の粒子形成タンパク質 (Core-prM-E 発現) によって HCV RNA がパッケージングされるか、逆に、HCV Core-NS2 発現によって JEV RNA がパッケージングされるかをそれぞれトランスパッケージングシステムで解析した。その結果、JEV Core-prM-E 発現によって JEV レプリコン、および同じフラビウイルス属のデングウイルスレプリコンはパッケージングされるもののヘパシウイルス属の HCV レプリコンのパッケージングは認められなかった。他方、HCV Core-NS2 発現によって JEV またデングウイルスのレプリコンはパッケージングされなかった。フラビウイルス科ウイルスのゲノムパッケージングはウイルス種の特異性を有しており、同じフラビウイルス科であっても粒子形成タンパク質とウイルスゲノムのウイルス属が異なる組み合わせではヌクレオカプシド形成は容易でない

可能性が示唆された。

HCV と JEV のコアタンパク質はアミノ酸配列の相同性は 10%以下であるもののどちらも塩基性アミノ酸リッチ (30%以上) である。本研究グループのこれまでの解析から、HCV Core の N 末端側に存在する塩基性アミノ酸クラスターが HCV RNA との結合、粒子産生に重要であること、クラスター 3 か所のうち 2 番目、3 番目 (CL2、CL3) は Core-RNA 結合後の粒子形成過程にも関与する可能性が示されている。HCV ゲノムパッケージングの種特異性を規定するカプシド側要因を明らかにするため HCV Core の CL2~CL3 領域を JEV Core に挿入または JEV Core 領域と置換したキメラコアタンパク質を作製し JEV 粒子が HCV ゲノムのパッケージングを可能にするか解析したがいずれのキメラコアタンパク質においても HCV ゲノムはパッケージングされなかった。

#### 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 18 件)

1. Sun S, Nakashima K, Ito M, Li Y, Chida T, Takahashi H, Watashi K, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of PUF60 in Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Expression. *Sci Rep*. 7: 12874 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-12497-y.
2. Chida T, Ito M, Nakashima K, Kanegae Y, Aoshima T, Takabayashi S, Kawata K, Nakagawa Y, Yamamoto M, Shimano H, Matsuura T, Kobayashi Y, Suda T, Suzuki T. Critical role of CREBH-mediated induction of transforming growth factor  $\beta$ 2 by hepatitis C virus infection in fibrogenic responses in hepatic stellate cells. *Hepatology*. 66: 1430-1443 (2017). doi: 10.1002/hep.29319.
3. Ito M, Sun S, Fukuhara T, Suzuki R, Tamai M, Yamauchi T, Nakashima K, Tagawa YI, Okazaki S, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Development of hepatoma-derived, bidirectional oval-like cells as a model to study host interactions with hepatitis C virus during differentiation. *Oncotarget*. 8: 53899-53915 (2017). doi: 10.18632/oncotarget.19108.
4. Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Matsuda N, Nomoto A, Suzuki T, Saito I, Kanegae Y. Efficient genome replication of hepatitis B virus using adenovirus vector: a compact pregenomic RNA-expression unit. *Sci Rep*. 7:41851 (2017). doi: 10.1038/srep41851.
5. Tsutsumi T, Okushin K, Enooku K, Fujinaga H, Moriya K, Yotsuyanagi H, Aizaki H, Suzuki T, Matsuura Y, Koike K. Nonstructural 5A Protein of Hepatitis C Virus Interferes with Toll-Like Receptor Signaling and Suppresses the Interferon Response in Mouse Liver. *PLOS One*. 12: e0170461 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0170461.
6. Li Y, Ito M, Sun S, Chida T, Nakashima K, Suzuki T. LUC7L3/CROP inhibits replication of hepatitis B virus via suppressing enhancer II/basal core promoter activity. *Sci Rep* 6: 36741 (2016). doi: 10.1038/srep36741.
7. Shirasago Y, Shimizu Y, Tanida I, Suzuki T, Suzuki R, Sugiyama K, Wakita T, Hanada K, Yagi K, Kondoh M, Fukasawa M. Occludin-Knockout Human Hepatic Huh7.5.1-8-Derived Cells Are Completely Resistant to Hepatitis C Virus Infection. *Biol Pharm Bull*. 39: 839-48 (2016). doi: 10.1248/bpb.b15-01023.
8. Shi G, Ando T, Suzuki R, Matsuda M, Nakashima K, Ito M, Omatsu T, Oba M, Ochiai H, Kato T, Mizutani T, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of the 3' Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. *PLOS Pathog*. 12: e1005441 (2016). doi: 10.1371/journal.ppat.1005441.
9. Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Shi G, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single-domain Intrabodies against HCV Core Inhibit Viral Propagation and Core-induced NF- $\kappa$ B Activation. *J Gen Virol*. 97: 887-92. (2016). doi: 10.1099/jgv.0.000423.

10. Kong L, Fujimoto A, Nakamura M, Aoyagi H, Matsuda M, Watashi K, Suzuki R, Arita M, Yamagoe S, Dohmae N, Suzuki T, Sakamaki Y, Ichinose S, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Prolactin Regulatory Element Binding Protein Is Involved in Hepatitis C Virus Replication by Interaction with NS4B. *J Virol.* 90(6):3093-111. doi: 10.1128/JVI.01540-15 (2016). doi: 10.1128/JVI.01540-15.
  11. Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, Yamashita A, Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, Moriishi K. Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci Rep.* 5:17047. doi: 10.1038/srep17047. (2015).
  12. Park C, Min S, Park EM, Lim YS, Kang S, Suzuki T, Shin EC, Hwang SB. Pim Kinase Interacts with Nonstructural 5A Protein and Regulates Hepatitis C Virus Entry. *J Virol.* 89: 10073-10086 (2015). doi: 10.1128/JVI.01707-15
  13. Fukumoto H, Li TC, Kataoka M, Hasegawa H, Wakita T, Saeki H, Suzuki T, Katano H. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in Japan. *J Clin Virol.* 65: 76-82 (2015). doi: 10.1016/j.jcv.2015.02.014.
  14. 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.
  15. 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. eCollection 2015.
  16. 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).
  17. 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.
  18. Masaki T, Suzuki T. NS5A phosphorylation: its functional role in the life cycle of hepatitis C virus. *Future Virology* 10: 751-762 (2015).
- 〔学会発表〕(計7件)
1. Critical role of CREBH-dependent transcriptional activation of TGF- $\beta$ 2 by HCV infection in profibrogenic responses in hepatic stellate cells. Ito M, Chida T, Nakashima K, Kawata K, Kobayashi Y, Suda T, Suzuki T. 第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2018/10/25.
  2. CREBH-dependent up-regulation of profibrogenic response induced by HCV in a mouse model as well as in co-cultured cells. Chida T, Ito M, Nakashima K, Suzuki T. 24<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cape Cod (USA), 2017/9/26.
  3. PLA2G4C is Involved in HCV induced lipid droplet accumulation, Ito M, Fukasawa M, Kohara M, Suzuki T, 23<sup>rd</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 京都、2016/10/13.
  4. Critical Role of the Basic Residue Clusters within Domain- of HCV Core in Interaction with Viral Genome and Particles assembly, Shi G, Matsuda M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T, 23<sup>rd</sup>

International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 京都、2016/10/13.

5. C型肝炎ウイルス感染による脂肪滴蓄積へのPLA2G4Cの関与について 伊藤昌彦, 深澤征義, 小原道法, 鈴木哲朗, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌、2016/10/24.
6. Lipidome analysis of the livers in HCV-infected humanized mice by imaging mass spectrometry. Ito M, Fukasawa M, Kohara M, Suzuki T. 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, 2015/10/10.
7. Activation of liver-enriched transcription factor CREBH induced by HCV infection plays a key role in up-regulation of TGF- $\beta$ 2 expression and fibrogenesis. Chida T, Ito M, Suzuki T. 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, 2015/10/10.

〔図書〕(計2件)

1. Suzuki T. Hepatitis C Virus Replication. In Tagaya M, Simmen T. (ed.), Organelle Contact Sites, From Molecular Mechanism to Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer, Singapore, pp. 199-209 (2017).
2. Suzuki T, Suzuki R. Role of Nonstructural proteins in HCV replication. In Miyamura T, Lemon SM, Walker C and Wakita T. (ed.), Hepatitis C Virus I Cellular and Molecular Virology. Springer, Singapore, pp. 129-148 (2016).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

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

ウイルス・寄生虫学講座

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

ウイルス・寄生虫学講座

助教

研究者番号: 50385423