

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08656

研究課題名(和文) ウイルス感染宿主因子としてのチロシンキナーゼAblの新しい役割

研究課題名(英文) Novel function of tyrosine kinase Abl as a host factor against virus infection

研究代表者

定 清直 (Kiyonao, Sada)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：10273765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：病原性を有する微生物は、細胞内の様々な宿主因子と相互作用することが知られている。本研究では新たな感染宿主因子の同定とその役割の解析を目的として実験を遂行した。その結果、HCV感染実験系とゲノム編集により樹立した様々な細胞内因子の欠損肝細胞とを組み合わせることにより、チロシンキナーゼAblのキナーゼ活性が感染性のHCVのウイルス粒子形成に重要であることを解明した。さらに第二のCLRであるMincleの新しい役割や、Abl結合タンパク質3BP2が単球の貪食反応に重要であることを見出し、われわれが作成した3BP2欠損マウスでは、CLRに対する単球細胞の免疫応答が減弱していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、学術的な意義としてチロシンキナーゼAblと関連タンパク質3BP2が、ウイルスや結核菌などの感染を防ぐ新しい仕組みを解明するである。Ablのはたらきを阻害する薬はすでに白血病などの抗癌薬として実用化され、副作用も含めた十分の知見が蓄積している。従って本研究の成果は、感染を防ぐ仕組みの解明に留まらず、抗がん薬の感染症への応用、感染症治療の選択肢を増やすことにつながり、特にC型肝炎については有効な治療薬(DAA)耐性ウイルスに感染した患者に対する有効な手段の獲得につながる社会的意義も有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic microorganisms are known to interact with a variety of host factors in the cell. In this study, we carried out experiments to identify new host factors and analyze their roles. By combining the experimental HCV infection system with hepatocytes deficient in various intracellular factors established by genome editing, we found that the kinase activity of tyrosine kinase Abl is important for the formation of infectious HCV viral particles. We also found a novel role for Mincle, a second CLR, and that the Abl-binding protein 3BP2 is important for the phagocytic response of monocytes, and that the immune response of monocytic cells to the CLR is attenuated in our 3BP2-deficient mice.

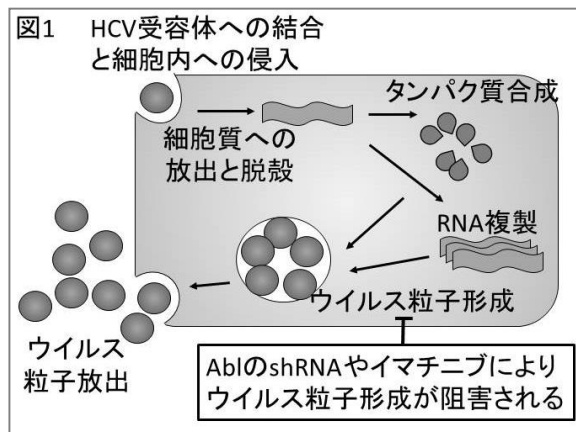
研究分野：病態医化学、ウイルス学

キーワード：感染宿主因子 チロシンキナーゼ ゲノム編集 3BP2

1. 研究開始当初の背景

病原性を有する微生物は、細胞内の様々な宿主因子と相互作用することが知られている。ヒトパピローマウイルスのように癌抑制タンパク質 Rb に会合しその機能を抑制し癌化を引き起こすものや、C型肝炎ウイルスのようにインターフェロン応答に必要な RIG-I (細胞内ウイルス受容体) を抑制して感染を持続させるなど、病原性に関わる宿主因子が数多く報告されている。

(1) 我々はこれまで、細胞内チロシンキナーゼがウイルスや真菌・結核菌などの宿主因子として作用していることを明らかにしてきた。最近ではチロシンキナーゼ Abl の shRNA によるノックダウンや Abl 特異的阻害薬イマチニブ (慢性骨髄性白血病の原因遺伝子 Bcr-Abl の分子標的治療薬) により、HCV のウイルス粒子形成過程が阻害できることを報告した (図1)。チロシンキナーゼが HCV など RNA ウイルスの生活環に影響を与えるという報告例は、エボラウイルスのタンパク質 VP40 のチロシンリン酸化等、ごくわずかに留まっており、HCV については初の報告である。



(2) 真菌や結核菌の受容体である C 型レクチン受容体 (CLR) の一つである Dectin-1 を介するマスト細胞の自然免疫応答に、チロシンキナーゼ Syk が関与することを報告した。CLR の機能は、樹状細胞やマクロファージで多数の報告があるが、マスト細胞での役割は初めてであり、Syk を介する Th2 サイトカインの産生や脱顆粒反応への関与を明らかにした。

(3) 免疫系の過剰な活性化が原因となる遺伝性疾患 (cherubism) 発症に関与する Abl 結合タンパク質 3BP2 (c-Abl SH3 binding protein-2) の解析により、3BP2 が B 細胞において Syk よりリン酸化され、転写因子 NFAT の活性化を誘導することを報告した。海外の研究室からは遺伝子変異を有する 3BP2 は修飾シグナルの異常 (ポリ ADP リボシル化酵素タンキラーゼ耐性) を有することが報告されているが、感染宿主因子としての解明は未だなされていない。

2. 研究の目的

(1) HCV 感染実験系 (組換え HCV : 2020 年にノーベル生理学・医学賞を受賞した Rice 博士より供与) を用いて、感染宿主因子としての STAT1~6 と IRF9、チロシンキナーゼ Abl や Syk の役割を解明する。

(2) 第二の CLR である Mincle について、マスト細胞の自然免疫応答における役割を Dectin-1 と対比しながら解明する。

(3) ゲノム編集により作成した Abl 結合タンパク質 3BP2 欠損単球細胞や 3BP2 遺伝子改変マウスの解析により 3BP2 の感染宿主因子としての新しい役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) HCV 感染に対する新しい感染宿主因子の解明

① ゲノム編集 (CRISPR/Cas9 システム) により STAT1~6 と IRF9 欠損培養肝細胞を作成し、インターフェロン応答への影響について解析を行った。

② ゲノム編集によりチロシンキナーゼ Abl、Syk 欠損培養肝細胞を作成し、ウイルスの感染から子ウイルス出芽までの生活環への影響について解析を行った。特に Abl 欠損細胞に野生型、キナーゼ欠損型 Abl (いずれもゲノム編集耐性) を発現させた細胞を用いて、同様に HCV の生活環における影響を解析した。さらに Abl と HCV 非構造蛋白質の一つである NS5A との相互作用を 293T 細胞を用いた再構成系を用いて解析した。

(2) 第二の CLR : Mincle の新しい役割の解明

培養マスト細胞 (RBL-2H3) を用いて、Mincle を介する細胞内シグナル伝達機構と細胞応答、遺伝子発現を網羅的に解析し、ゲノム編集によるシグナル分子欠損実験も併用し、Dectin-1 との比較検討を行った。

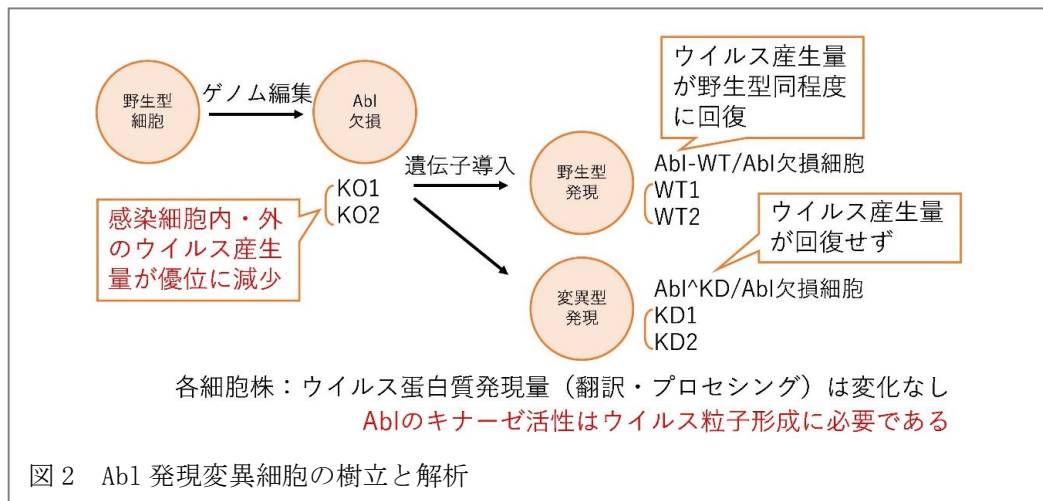
(3) 感染宿主因子としての 3BP2 の役割の解明

- ① 単球系の培養細胞 (U937) を用いて、ゲノム編集により受容体 (FcR γ)、チロシンキナーゼ (Syk、Hck、Src)、アダプタータンパク質 (3BP2) の欠損細胞、さらに 3BP2 欠損細胞に野生型、リン酸化部位変異体、タンキラーゼ耐性変異型 3BP2 を発現させた細胞をマクロファージに分化させ、貪食作用やケモカイン産生を解析するとともに、遺伝子発現のプロファイルをマイクロアレイで比較検証した。
- ② ゲノム編集による新しいノックイン法 (CORRECT 法 : Nature 2016) を用いた新たな変異型 3BP2 マウスを作成し、骨髄由来単球細胞を単離し、細胞免疫応答を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) HCV 感染に対する新しい感染宿主因子の解明

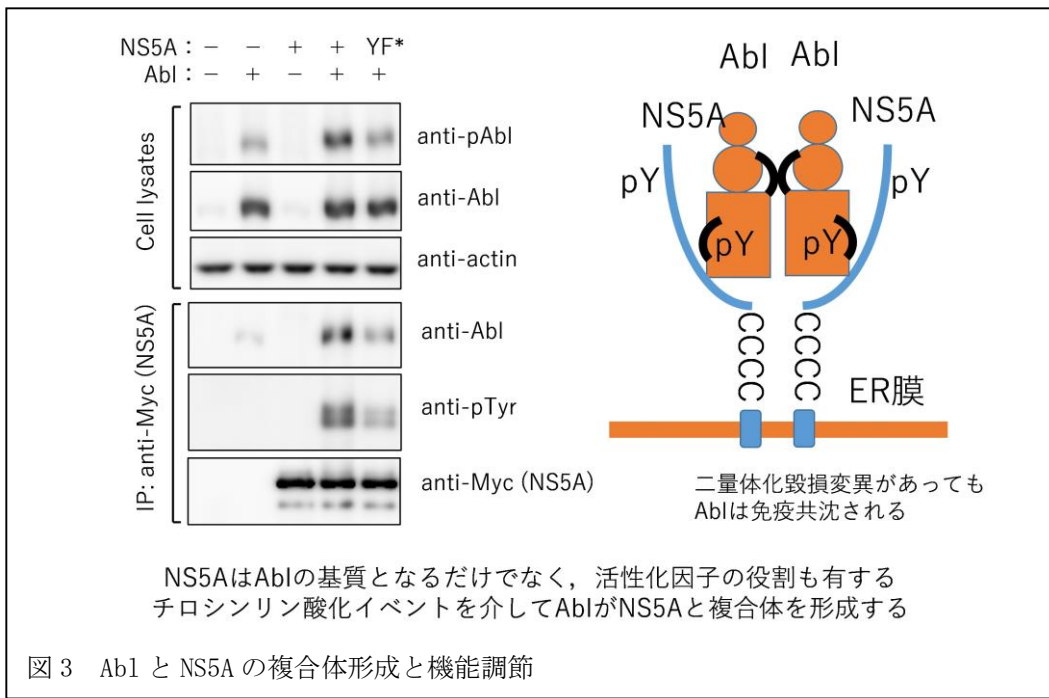
- ① STAT1~6 と IRF9 を欠損する培養肝細胞を作成し、STAT1 がインターフェロン λ による HCV の複製抑制に不可欠であることを解明し報告した (Yamauchi, et al. Sci. Rep. 2016)。



- ② ゲノム編集 (CRISPR/Cas9 システム) によりチロシンキナーゼ Abl 欠損細胞を複数樹立し、アドバック発現を目的としてゲノム編集の標的配列に変異を加えた Abl の野生型とキナーゼ活性を喪失した変異型 Abl の発現コンストラクトを作成し、それぞれを安定発現した細胞を樹立した。これらの細胞を用いて比較検討を行ったところ、Abl 欠損細胞に野生型 Abl を発現した細胞ではウイルス産生が回復したのに対し、キナーゼ活性を喪失した Abl を発現した細胞では細胞内・細胞外ともにウイルスの感染力価が回復しないままであった。これらの結果により HCV のウイルス粒子産生には Abl のキナーゼ活性が必要であることが明らかとなった。これら一連のデータは、Abl のチロシンキナーゼとしての機能が HCV のウイルス産生能に関わることを直接的に示すものであり、本研究課題調書作成時の仮説、Abl が HCV のウイルス粒子産生に関与することを示唆したわれわれの業績 (Yamauchi, et al. J. Biol. Chem. 2015) を強力に支持するものである。(図 2)

さらに 293T 細胞を用いて Abl の標的分子の一つとして NS5A との共発現 (再構成) 実験を行ったところ、NS5A は Abl の基質となるだけでなく Abl に会合して立体構造に影響を与えることにより活性化因子の役割も有すること、チロシンリン酸化イベントを介して Abl が NS5A と複合体を形成することを明らかにした。(Miyamoto, et al. 投稿準備中) (図 3)

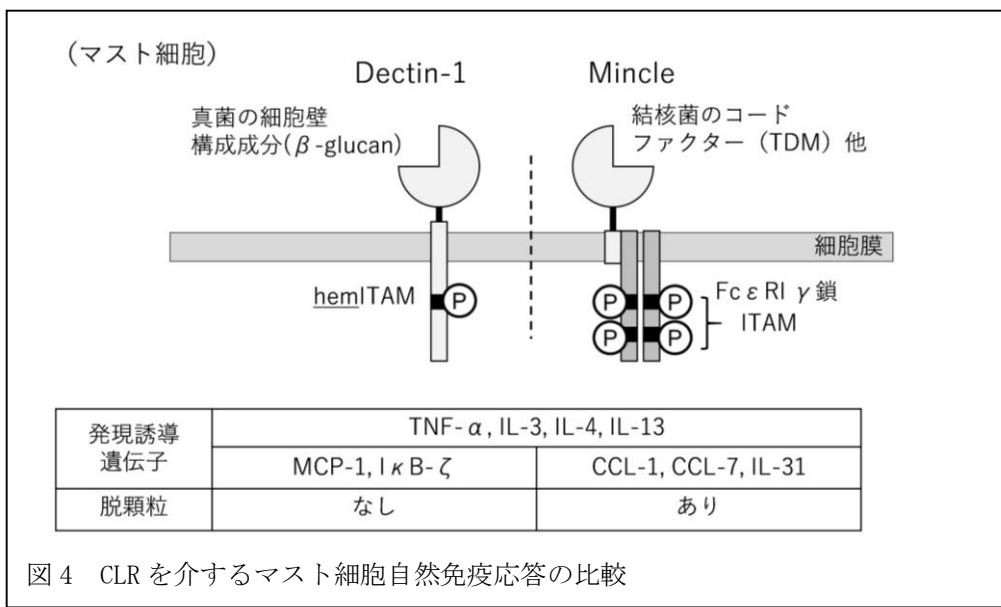
Abl とウイルス粒子の出芽・放出を制御オルガネラとの相互作用については、候補分子として Nck1, N-WASP, WAVE2 について RNA 干渉法による影響を検討したが、いずれも HCV のウイルス粒子産生への影響は限局的であり、期待した成果は得られなかった。従って今後はウイルス粒子産生を制御するオルガネラやユビキチンリガーゼとの相互作用、Abl 制御性 ISG の同定に進む予定である。



従来われわれは肝臓組織に発現するもう一種類のチロシンキナーゼ Syk が HCV の非構造タンパク質 NS5A と相互作用する可能性を指摘している (Inubushi, et al. J Gen Virol 2008)。その点を鑑み、Abl に加えて Syk のノックアウトも試みたが、Huh7.5 細胞ではウエスタンブロットで検出できるほどの Syk が発現しないことが明らかとなり、それ以上の解析は行っていない。

(2) 第二の CLR : Mincle の新しい役割の解明

結核菌受容体である Mincle がマスト細胞上に発現することを見出し、Mincle がチロシンキナーゼ Syk を介して、結核菌に対する免疫応答を行っていることを明らかにした (Honjoh, et al. Sci. Rep. 2017)。(図 4)



(3) 感染宿主因子としての 3BP2 の役割の解明

① 単球系の培養細胞である U937 細胞を用いて、ゲノム編集により貪食の受容体 (FcRγ)、チロシンキナーゼ (Syk, Hck, Src)、3BP2 の各欠損細胞を作成し、さらに 3BP2 欠損細胞に野生型、リン酸化部位変異型、タンキラーゼ耐性変異型 3BP2 を発現させた細胞をマクロファージに分化させ、貪食作用やケモカイン産生を解析するとともに、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで解析し、論文として報告した (Chihara, et al. Sci. Rep. 2017)。(図 5)

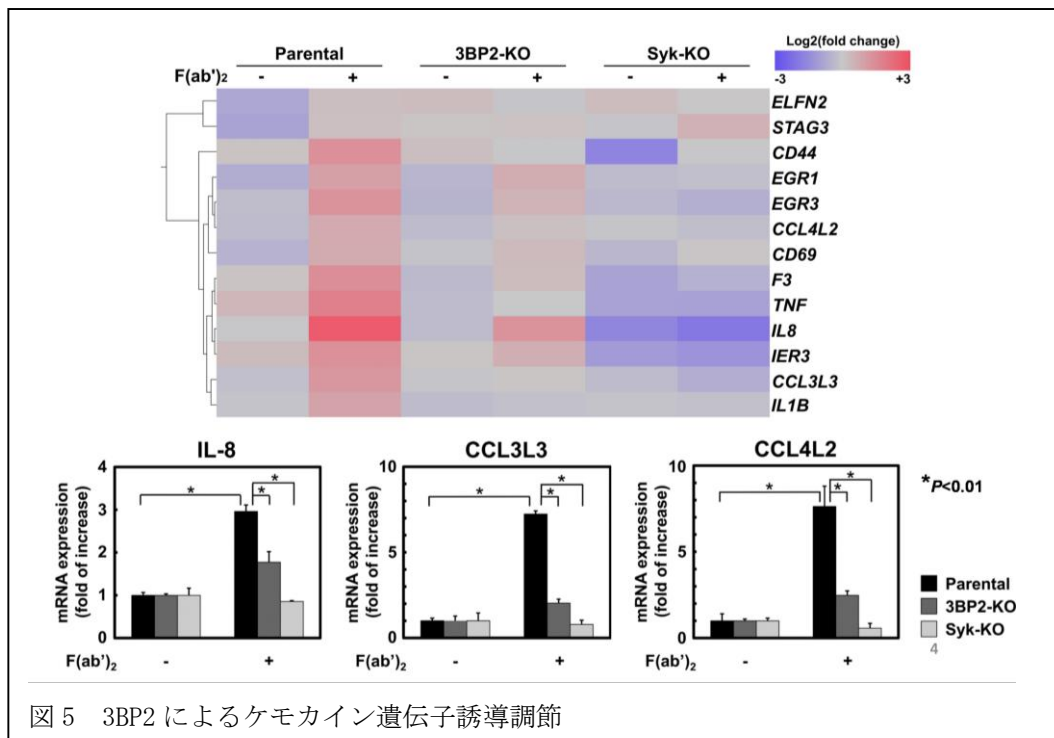


図5 3BP2によるケモカイン遺伝子誘導調節

② ゲノム編集により3BP2欠損マウス、変異型3BP2 (Sykによるリン酸化部位に変異を加えたY183F)のノックインマウスについて、バッククロス過程を8回以上繰り返すことで樹立に成功した。これらのマウスに由来する単球系細胞を用いて、様々な免疫細胞の分化と免疫応答における3BP2の役割について解析を行った。その結果、C型レクチン受容体を介する免疫応答に3BP2がエッセンシャルな役割を有することが明らかとなった。(Chihara, et al. 投稿準備中) (図6)

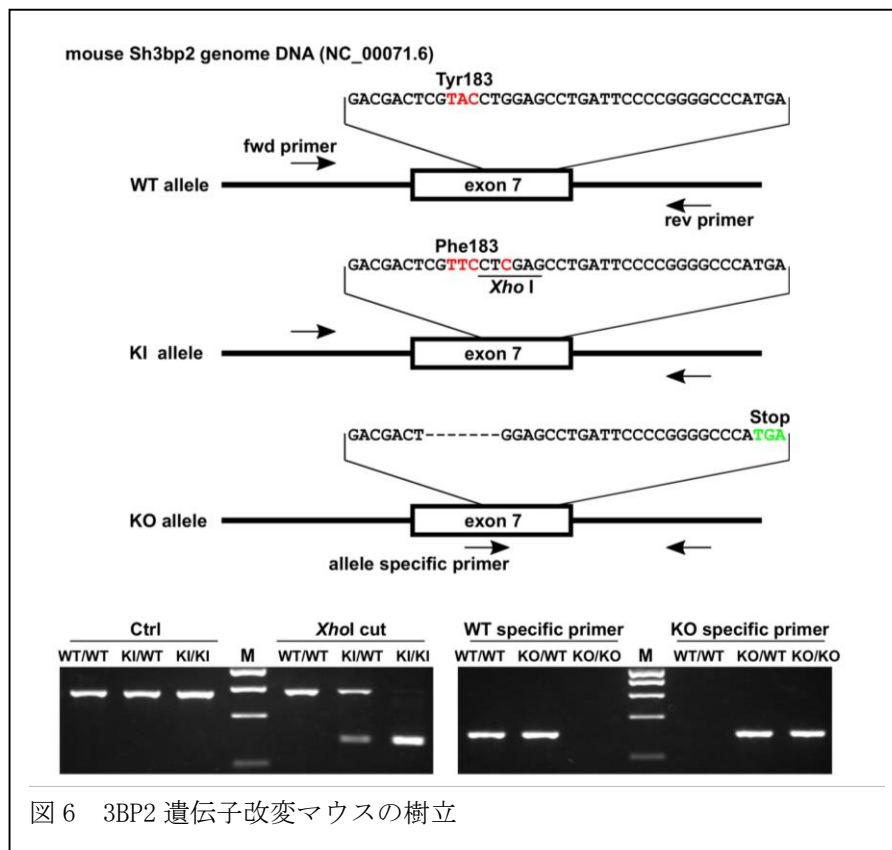


図6 3BP2遺伝子改変マウスの樹立

<引用文献>
すべて本文中に示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Muramatsu I, Uwada J, Yoshiki H, Sada K, Lee KS, Yazawa T, Taniguchi T, Nishio M, Ishibashi T, Masuoka T.	4. 巻 149(5)
2. 論文標題 Novel regulatory systems for acetylcholine release in rat striatum and anti-Alzheimer's disease drugs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 605-623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Uwada J, Yazawa T, Mikami D, Krug SM, Fromm M, Yoshiki H, Sada K, Muramatsu I, Taniguchi T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Store-operated calcium entry (SOCE) contributes to phosphorylation of p38 MAPK and suppression of TNF- signalling in the intestinal epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell signal.	6. 最初と最後の頁 109358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2019.109358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Muramatsu Ikunobu, Masuoka Takayoshi, Uwada Junsuke, Yoshiki Hatsumi, Yazama Takashi, Lee Kung-Shing, Sada Kiyonao, Nishio Matomo, Ishibashi Takaharu, Taniguchi Takanobu	4. 巻 1
2. 論文標題 A New Aspect of Cholinergic Transmission in the Central Nervous System	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection	6. 最初と最後の頁 45-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-10-8488-1_3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Honjoh Chisato, Chihara Kazuyasu, Yoshiki Hatsumi, Yamauchi Shota, Takeuchi Kenji, Kato Yuji, Hida Yukio, Ishizuka Tamotsu, Sada Kiyonao	4. 巻 7
2. 論文標題 Association of C-Type Lectin Mincle with Fc RI Subunits Leads to Functional Activation of RBL-2H3 Cells through Syk	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 46064 ~ 46064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uwada Junsuke, Yazawa Takashi, Islam Md Tariqul, Khan Md Rafiqul Islam, Krug Susanne M., Fromm Michael, Karaki Shin-ichiro, Suzuki Yuichi, Kuwahara Atsukazu, Yoshiki Hatsumi, Sada Kiyonao, Muramatsu Ikunobu, Taniguchi Takanobu	4. 巻 35
2. 論文標題 Activation of muscarinic receptors prevents TNF- α -mediated intestinal epithelial barrier disruption through p38 MAPK	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 188 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2017.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muramatsu Ikunobu, Uwada Junsuke, Masuoka Takayoshi, Yoshiki Hatsumi, Sada Kiyonao, Lee Kung-Shing, Nishio Matomo, Ishibashi Takaharu, Taniguchi Takanobu	4. 巻 143
2. 論文標題 Regulation of synaptic acetylcholine concentrations by acetylcholine transport in rat striatal cholinergic transmission	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 76 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Naoki, Sada Kiyonao (29人中23番目)、Iwano Masayuki, et al.	4. 巻 28
2. 論文標題 Tubulointerstitial Nephritis with IgM-Positive Plasma Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 3688 ~ 3698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2016101074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chihara Kazuyasu, Kato Yuji, Yoshiki Hatsumi, Takeuchi Kenji, Fujieda Shigeharu, Sada Kiyonao	4. 巻 7
2. 論文標題 Syk-dependent tyrosine phosphorylation of 3BP2 is required for optimal Fc γ R α -mediated phagocytosis and chemokine expression in U937 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11480 ~ 11480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-11915-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kowada Kazuaki, Takeuchi Kenji, Hirano Eiko, Toho Miho, Sada Kiyonao	4. 巻 90
2. 論文標題 Development of a multiplex real-time PCR assay for detection of human enteric viruses other than norovirus using samples collected from gastroenteritis patients in Fukui Prefecture, Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 67~75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.24926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本大輔, 竹内健司, 千原一泰, 定 清直
2. 発表標題 非受容体型チロシンキナーゼAbIとC型肝炎ウイルスの相互作用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 定 清直.
2. 発表標題 感染免疫を制御する宿主因子の新しい役割：チロシンキナーゼAbIとSyk
3. 学会等名 高分子学会 バイオ・高分子研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 定 清直
2. 発表標題 Syk阻害薬：基礎的背景と病態への展望
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千原一泰, 竹内健司, 千原悠里, 宮本大輔, 定 清直
2. 発表標題 ゲノム編集マウスを利用したB細胞におけるアダプタータンパク質3BP2の機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千原一泰, 加藤雄士, 竹内健司, 藤枝重治, 定 清直
2. 発表標題 アダプター蛋白質3BP2による貪食細胞の機能調節メカニズム
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第35回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 千原一泰, 本定千知, 木村幸弘, 竹内健司, 藤枝重治, 石塚 全, 定 清直	4. 発行年 2018年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 5
3. 書名 C型レクチンによるマスト細胞の活性化メカニズム、臨床免疫・アレルギー科	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ゲノム科学・微生物学 https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/genome/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	千原 一泰 (Chihara Kazuyasu) (00314948)	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授 (13401)	
研究 分 担 者	竹内 健司 (Takeuchi Kenji) (40236419)	福井大学・学術研究院医学系部門・助教 (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関