

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03479

研究課題名(和文) HCVコア蛋白質のSPPによる切断機構とそのウイルス学的意義の解明

研究課題名(英文) Significance of interaction between SPP and HCV core protein on viral life cycle.

研究代表者

松浦 善治 (MATSUURA, Yoshiharu)

大阪大学・微生物病研究所・特任教授(常勤)

研究者番号：50157252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)は宿主の免疫機構を回避することで、持続的に増殖する。本研究課題では、HCVが宿主因子のSignal peptide peptidase (SPP)を利用し免疫を回避するメカニズムを見出した。SPPは免疫関連因子のMHCクラスI分子の産生に重要であり、SPP阻害時にはHRD1を介したMHCクラスI分子の分解が誘導されることを明らかにした。また、HCVのウイルスタンパク質であるコアタンパク質が成熟化にSPPを利用する過程で、HRD1を介したMHCクラスI分子の分解を誘導す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

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓に感染すると高率に慢性化・持続感染し、慢性肝疾患の主要な原因となる。HCVが免疫を回避し、持続感染を行う分子メカニズムには解明されていない点が多く存在する。本研究では、HCVがSignal peptide peptidase (SPP)を利用して増殖する過程が、ウイルスによる免疫回避や持続感染に寄与していることを見出した。本研究結果により、HCVの免疫回避の分子機序の詳細や、免疫回避に関与する新規の宿主因子に関する知見が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis C virus (HCV) evades host immune severance system to achieve chronic infection. In this study, we identified the mechanism of immune evasion of HCV by utilizing host signal peptide peptidase (SPP). SPP is crucial for production of MHC class I, which involves in elimination of viral infected cells. Inhibition of SPP induces HRD1 dependent degradation of MHC class I. Moreover, we identified core protein of HCV utilizes SPP during maturation and induces HRD1 dependent degradation of MHC class I.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HCV SPP MHC 慢性C型肝炎 蛋白質分解

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) は世界に2億人、日本に170万人の感染者がいるとされており、血液や血液製剤を介して感染する。HCVは感染後、慢性化・持続感染し、脂肪肝や肝線維化、肝硬変、肝がんといった慢性疾患の主要な原因となるウイルスである。

HCVは約10kbの長さのプラス鎖一本鎖RNAウイルスである。細胞に感染後、HCVのタンパク質は単一鎖の前駆タンパク質として翻訳され、ウイルスおよび宿主のプロテアーゼによって切断され、成熟したウイルスタンパク質が産生される。HCVのウイルスタンパク質のうち、コアタンパク質はウイルス粒子の構成要素であり、感染性ウイルスの産生に必須のタンパク質である。コアタンパク質の成熟は、前駆タンパク質が宿主のプロテアーゼであるシグナルペプチダーゼ (SP) とシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) による2回の切断によって行われる。また、SPPを抑制した場合には、コアタンパク質はE3ライゲースのTRC8を介した経路で分解され、ウイルスの粒子形成が阻害されることが知られている。SPPはウイルスタンパク質だけでなく宿主タンパク質の切断にも関与することが知られており、その基質としてはMHCクラスI分子やHO-1、XBP1 α 、Prolactin等が報告されているが、SPPによる宿主タンパク質切断の生物学的意義については知られていない部分が多く存在する。

HCVと同じく肝臓で持続感染するB型肝炎ウイルスの場合では、5%の感染者で持続的な感染が起こる一方、HCV感染後ではその割合はおよそ80%とされており、非常に高率である。HCV感染時の肝細胞では、T細胞やNK細胞、樹状細胞といった免疫細胞が機能的に改変されることが知られているが、HCV感染の場である肝細胞にウイルスが与える影響や、持続感染の分子メカニズムの詳細は知られていない。近年開発された治療薬により日本国内におけるHCV感染者数は減少傾向にあるが、HCVが長期間持続感染した肝臓ではウイルスの排除後も病態が進行する。このため、HCV持続感染に関与する宿主因子や、HCVが免疫を回避する分子メカニズムを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、宿主因子SPPに着目し、HCVが免疫を回避する分子メカニズムやそのプロセスに関与する因子を明らかにすることである。本研究によりHCVが肝細胞および免疫細胞に与える影響を分子レベルで解析することで、HCV持続感染が病態に与える影響や、ウイルス排除後の肝臓における関連因子の動態に関する知見が得られることが期待される。

3. 研究の方法

(1) SPPが欠損した細胞に、これまでSPPの基質として報告のある宿主タンパク質 (MHCクラスI分子、HO-1、XBP1 α 、Prolactin) を発現させ、発現状態に変動がある因子を同定する。
(2) SPP欠損時に発現が低下するMHCクラスI分子の性状解析を実施する。SPPの酵素活性を欠失させた変異体発現下でMHCクラスI分子の発現が回復するか検討することで、SPPの酵素活性の有無がMHCクラスI分子の発現に影響するか検討する。また、SPP阻害下で細胞にシクロヘキシミドを処理し、MHCクラスI分子の発現を経時的に確認することで、MHCクラスI分子が分解されているか確認する。MHCクラスI分子が分解されている場合、MHCクラスI分子の分解に関与することが知られているHRD1やTRC8といったE3ユビキチンライゲースが関与しているか欠損細胞を使用して検討する。

(3) HCVのコアタンパク質はSPPにより切断されることで成熟するため、同じくSPPの基質であるMHCクラスI分子の発現がコアタンパク質の存在下で影響を受けるか確認する。特にコアタンパク質の発現下でMHCクラスI分子の発現が低下した場合、MHCクラスI分子がプロテアソームを介して分解されているか検討するとともに、その分解経路に関与するE3ユビキチンライゲースについて解析を行う。

(4) コアタンパク質を発現するHCVの病態モデルマウス (CoreTgマウス) においてMHCクラスI分子の発現が低下しているか検討する。また、肝がん患者の非がん部の肝臓の臨床検体を使用し、HCVの感染と非感染、ウイルス排除後のそれぞれの検体におけるMHCクラスI分子の発現を確認することで、実際のHCV感染時にMHCクラスI分子の発現が低下しているか検討する。

(5) MHCクラスI分子の分解を誘導するウイルスタンパク質として、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) のUS2タンパク質が報告されている。HCMVのUS2タンパク質とHCVのコアタンパク質のMHCクラスI分子の分解経路を比較することで、各ウイルスにおける免疫回避の方法やその違いについて知見を得る。

4. 研究成果

(1) SPPを欠損した細胞にMHCクラスI分子の一つのHLA-Aを発現させた場合、発現がタンパク質レベルで低下することを見出した(図1)。この現象はHLA-BやHLA-Cにおいても確認されたことから、SPPは多くのMHCクラスI分子の発現に重要であることが示唆された。

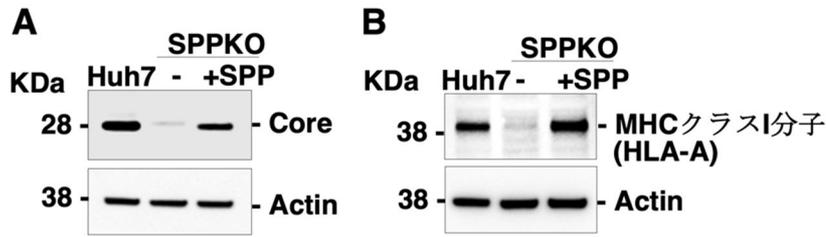


図1: (A) SPP欠損細胞にコアタンパク質を発現させた場合、発現が抑制された。(B) コアタンパク質の場合と同様に、SPP欠損細胞にMHCクラスI分子(HLA-A)を発現させた場合には、発現が抑制された。

(2) SPP 欠損細胞に野生型の SPP を発現させたところ MHC クラス I 分子の発現が回復するのに対して、酵素活性を欠失させた変異体の発現によっては、MHC クラス I 分子の発現は低下したままであった。このことから、SPP の酵素

活性が MHC クラス I 分子の発現には重要であることが示唆された。また、SPP 阻害下において細胞にシクロヘキシミドを処理した場合、MHC クラス I 分子の発現が経時的に低下し、プロテアソーム阻害剤処理により発現が回復した。このことから、SPP 阻害時に MHC クラス I 分子はプロテアソームを介した経路で分解されることが分かった。さらに、この分解経路に關与する E3 ユビキチンライゲースとして HRD1 を見出した。

(3) SPP の基質であるコアタンパク質を細胞に発現した場合、MHC クラス I 分子の発現が低下することを見出した。また、コアタンパク質の存在下では、SPP とコアタンパク質が相互作用する過程で、MHC クラス I 分子がプロテアソームを介して分解を受けること、その経路に HRD1 が關与していることを明らかにした。

(4) 細胞にコアタンパク質を発現させた場合や、CoreTg マウスの肝臓では、MHC クラス I 分子の発現が顕著に低下していた。また、肝がん患者の非がん部の肝臓の臨床検体を解析した結果、HCV 感染群では MHC クラス I 分子の発現が低下している一方 (図 2)、非感染群では MHC クラス I 分子の発現は低下していなかった。また、HCV 排除後の肝臓検体では、統計的に優位ではない程度の、若干の MHC クラス I 分子の発現亢進が認められた。

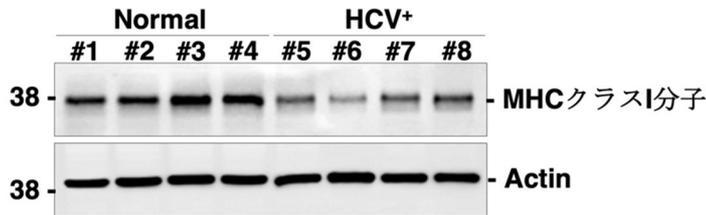


図2: HCV陽性患者の非がん部の肝臓の臨床検体(HCV+)では、MHC クラスI分子の発現が低下していた。

また、HCV 排除後の肝臓検体では、統計的に優位ではない程度の、若干の MHC クラス I 分子の発現亢進が認められた。

(5) HCMV の US2 タンパク質による MHC クラス I 分子の分解経路を解析した結果、US2 による MHC クラ

ス I 分子は E3 ライゲースの TRC8 に依存し、HRD1 には依存しないことを見出した。HCV のコアタンパク質による MHC クラス I 分子の分解は HRD1 に依存し、TRC8 には依存しないことから、HCV と HCMV は別種の経路を使用することで MHC クラス I 分子の分解を誘導していることが示唆された。このため、HCV と HCMV は共通する宿主因子 SPP を標的とし、異なる経路・戦略で MHC クラス I 分子の分解誘導を行い、免疫を回避していることが明らかとなった(図 3)。

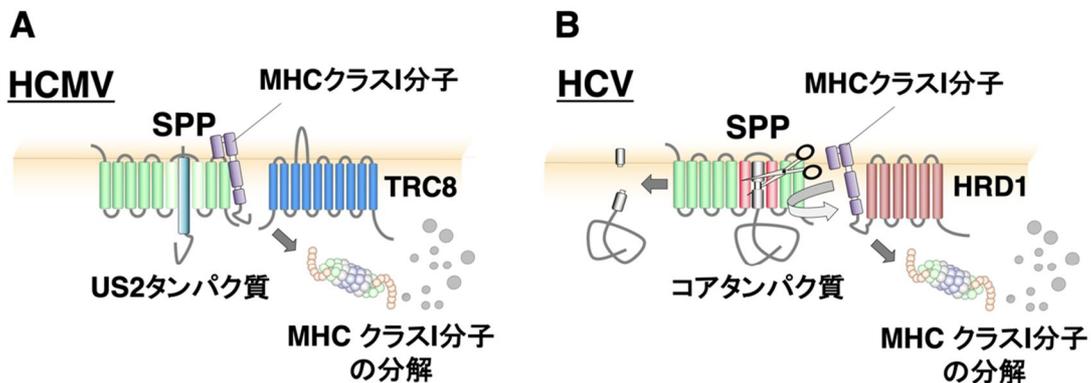


図3: (A) HCMV感染時には、US2タンパク質とSPPが相互作用し、MHCクラスI分子の分解が誘導される。この経路はE3ユビキチンライゲースのTRC8に依存的である。(B) HCV感染の場合では、SPPとコアタンパク質が相互作用し、MHCクラスI分子はE3ユビキチンライゲースのHRD1に依存的な経路で分解される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamura T, garashi M, Enkhbold B, Suzuki T, Okamatsu M, Ono C, Mori H, Izumi T, Sato A, Fauzyah Y, Okamoto T, Sakoda Y, Fukuhara T, and Matsuura Y.	4. 巻 93
2. 論文標題 In vivo dynamics of reporter Flaviviridae viruses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01191-19	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 Shinji Kusakabe S, Suzuki T, Sugiyama Y, Haga S, Horike K, Tokunaga M, Hirano J, He Z, Chen D. V, Ishiga H, Komoda Y, Ono C, Fukuhara T, Yamamoto M, Ikawa M, Satoh T, Akira S, Tanaka T, Moriishi K, Fukai M, Taketomi A, Yoshio S, Kanto T, Suzuki T, Okamoto T and Matsuura Y.	4. 巻 93
2. 論文標題 USP15 participates in HCV propagation through the regulation of viral RNA translation and lipid droplet formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 1708-1718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01708-18	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 Tokunaga M, Miyamoto Y, Suzuki T, Otani M, Inuki S, Esaki T, Nagao C, Mizuguchi K, Ohno H, Yoneda Y, Okamoto T, Oka M, and Matsuura Y.	4. 巻 541
2. 論文標題 Novel anti-flavivirus drugs targeting the nucleolar distribution of core protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 41-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2019.11.015	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 Fukuhara T, and Matsuura Y.	4. 巻 63
2. 論文標題 Roles of secretory glycoproteins in particle formation of Flaviviridae viruses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 345-355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12733	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8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Junki Hirano, Toru Okamoto, Tatsuya Suzuki, Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, and Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 ER stress sensor protein PERK participates in the degradation of immature HCV core protein.
3. 学会等名 The 38th Annual Meeting of the American Society for Virology (Minnesota, USA). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuya Suzuki, Toru Okamoto, Yuka Miyata, Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Akatsuki Saito, Yasuko Orba, Yuki Eshita, Hirofumi Sawa, and Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 TLR ligands stimulate in vivo pathogenicity of Japanese encephalitis virus
3. 学会等名 The 38th Annual Meeting of the American Society for Virology (Minnesota, USA). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Hiroyuki Mori, Asuka Sato, Takuma Izumi, Yuzy Fauzyah, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Involvement of various miRNAs for an efficient replication of HCV
3. 学会等名 The 38th Annual Meeting of the American Society for Virology (Minnesota, USA). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Shiho Torii, Chikako Ono, Kentaro Kajiwara, Yuhei Morioka, Takuya Yamamoto, Yuzy Fauzyah, Takuma Izumi, Yoshihiro Sakoda, Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Flavivirus NS1 protein plays a crucial role in the infectious particle formation
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Hiroyuki Mori, Asuka Sato, Takuma Izumi, Yuzy Fauzyah, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Involvement of various miRNAs for an efficient replication of HCV
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Yuzy Fauzyah, Shiho Torii, Asuka Sato, Takuma Izumi, Takuya Yamamoto, Yuhei Morioka, and Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Characterization of mutation in the 5' UTR of HCV in miR-122-dependent propagation
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takasuke Fukuhara, Tomokazu Tamura, Shiho Torii, Chikako Ono, Kentaro Kajiwara, Yuhei Morioka, Takuya Yamamoto, Yuzy Fauzyah, Takuma Izumi, Yoshihiro Sakoda, Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Flavivirus NS1 protein plays a crucial role in the infectious particle formation
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松浦善治
2. 発表標題 C型肝炎対策の残された課題
3. 学会等名 第23回日本ワクチン学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------