

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16671

研究課題名(和文) HCV感染によるシャペロン介在性オートファジーを介した蛋白質分解と分子病態

研究課題名(英文) The molecular mechanism of HCV-induced protein degradation via chaperone mediated autophagy

研究代表者

松井 千絵子 (Matsui, Chieko)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：70778414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シャペロン介在性オートファジー(CMA)は、分解を受ける標的蛋白質のCMA標的配列をシャペロン蛋白HSC70が認識し、蛋白質をライソソームへと輸送する。ライソソームに運ばれた宿主蛋白質は、ライソソーム受容体LAMP-2Aと結合することで、ライソソーム内腔へと引き込まれ、プロテアーゼにより分解される。本研究では、C型肝炎ウイルス(HCV)感染により活性化されたシャペロン介在性オートファジーで分解される新規標的蛋白質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シャペロン介在性オートファジー(CMA)は、分解される宿主蛋白質が5アミノ酸からなるCMA標的配列を有していることが条件となる選択的分解機構である。本研究では、HCV NS5A結合因子の中からシャペロン介在性オートファジーで分解誘導される新規宿主因子を同定した。さらなるHCV感染とCMAの解析により、HCV感染による新しい病原性発現機構の解明と治療法開発の端緒となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Chaperone mediated autophagy (CMA) carries a substrate protein into the lysosomal lumen using HSC70 and LAMP-2A. Substrate proteins of CMA contain a CMA-targeting motif, which is selectively recognized by HSC70. CMA promotes the degradation of a specific substrate protein that enters into the lysosome through LAMP-2A. We previously reported that HCV NS5A interacts with HSC70 and recruits HSC70 to substrate protein, thereby promoting the lysosomal degradation of substrate protein via CMA. More than 130 host proteins have been identified as NS5A-interacting proteins. In this study, we examined the potential CMA-targeting motif in NS5A interacting proteins. We found novel host proteins that are degraded by lysosomes via the CMA-dependent pathway.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス NS5A蛋白質 シャペロン介在性オートファジー HSC70 LAMP-2A 選択的蛋白質分解
CMA標的配列

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新規抗 HCV 薬(Direct Acting Antivirals; DAA)の登場により、C 型慢性肝炎の治療成績は飛躍的に向上した。しかし、DAA 薬が高価で経済上、大きな負担であること、治療奏功(SVR)後に肝癌が発症することが問題となっており、SVR 後肝癌の分子機構の解明とその対策は喫緊の課題である。C 型肝炎ウイルス(HCV)感染は肝内病変だけでなく、糖、脂質、鉄代謝異常など様々な肝外病変を引き起こし、予後に悪影響を及ぼす。そのため、HCV 感染による代謝異常の分子機構を解明し、SVR 後肝癌の分子病態の確立と新規治療法の開発はきわめて重要な課題である。

これまで私共は、HCV NS5A 蛋白質が HSC70 との相互作用を介して細胞内転写因子 HNF-1 蛋白質のシャペロン介在性オートファジー(CMA)を誘導し、HNF-1 蛋白質量を著しく減少させることを報告した。HNF-1 蛋白質の減少により GLUT2 遺伝子の転写抑制を引き起こし、それが糖代謝異常を惹起することを明らかにした。

シャペロン介在性オートファジーは、分解される基質となる宿主因子が 5 アミノ酸からなる CMA 標的配列を有していることが条件となる選択的分解である。シャペロン介在性オートファジーでは、分解される基質蛋白質の CMA 標的配列をシャペロン蛋白 HSC70 が認識し、基質蛋白質がライソソームへと輸送される。さらに基質蛋白質はライソソーム膜上の受容体である LAMP-2A と結合し、ライソソーム内の HSC70(Lys-HSC70)の働きによりライソソーム内腔へと引き込まれ、プロテアーゼにより分解される。

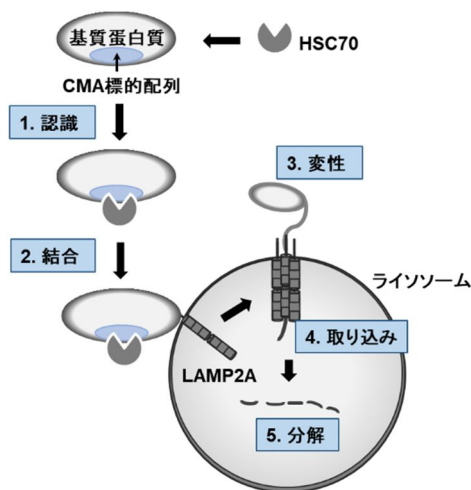


図1: シャペロン介在性オートファジーのモデル図。

1. CMA標的配列を持った基質蛋白質がHSC70によって認識される。
2. 基質/HSC70複合体がライソソーム膜上のLAMP-2Aと結合する。
3. 基質蛋白質の変性が引き起こされる。
4. Lys-HSC70により基質蛋白質がライソソーム内腔に取り込まれる。
5. プロテアーゼにより分解される。

私共は、HCV NS5A 蛋白質が HSC70 と結合し、細胞内の CMA 標的配列を有した HNF-1 へと HSC70 をリクルートし、シャペロン介在性オートファジー系をハイジャックし、HNF-1 の分解を促進させるという分子モデルを提唱した。HNF-1 以外にも HCV 感染することでシャペロン介在性オートファジー分解が誘導される宿主因子が存在することが考えられる。そのため、この経路を阻害することができれば、HCV 増殖に有利な環境の構築ができなくなり、HCV 増殖阻害、病態改善へとつながる可能性があり、新規病原性発現機構の解明と新規治療法開発につながる。

2. 研究の目的

HNF-1 の分解には、HNF-1 が CMA 標的配列を有することと、HCV NS5A との結合が重要な条件であったことから、これまでに報告されている他の HCV NS5A 結合蛋白質の中にも CMA 標的配列を有する宿主因子が多数存在し、シャペロン介在性オートファジーによって分解誘導される可能性がある。HCV NS5A と相互作用する宿主因子は 130 種以上報告されている。その中から CMA 標的配列を有するものを同定し、HCV 感染によりシャペロン介在性オートファジーで分解された宿主標的蛋白質の病態生理学的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シャペロン介在性オートファジーは、分解される基質となる宿主因子が 5 つの決まったアミノ酸からなる CMA 標的配列を有していることが条件となる選択的分解であることから、すでに報告されている HCV NS5A 結合蛋白質のうち、CMA 標的配列と同じアミノ酸配列を有している宿主因子を調べた。さらに、候補となりうる新規標的蛋白質が、HCV 感染において蛋白質量の減少がみられるかを調べるため、ヒト肝癌細胞株 Huh7.5 細胞に HCV J6/JFH1 を感染させ、候補蛋白質の蛋白質量を western blotting で調べた。

(2) HCV 感染による蛋白質量の減少に、ライソソーム依存性分解が関与しているかを調べるため、HCV 感染細胞にライソソーム阻害剤 Pepstatin A 及びオートファジー阻害剤 NH₄Cl を用いて、HCV 感染による蛋白質量の減少が回復するかどうかを検討した。

(3) HCV 感染による蛋白質量の減少に HCV 蛋白質の中で HCV NS5A が関与しているかを検討する

ため、NS5A プラスミドを 0 µg, 1 µg, 2.5 µg で Huh7.5 細胞にトランスフェクトし、候補蛋白質の蛋白質質量変化を western blotting で解析した。

(4) CMA で蛋白質分解を受けるには、蛋白質が HSC70 で認識・結合される CMA 標的配列を有していることが条件あることから、候補蛋白質の HSC70 との相互作用を調べるため、候補蛋白質の発現プラスミドを用いて免疫沈降を行った。

さらに、候補蛋白質の CMA 標的配列における、HSC70 と結合できない変異体を作製し、HSC70 との相互作用を免疫沈降法にて確認した。

(5) シャペロン介在性オートファジーにおける重要な因子である HSC70 と LAMP-2A のノックダウンにおける影響を調べるため、shRNA を用いて HSC70 と LAMP-2A のノックダウン細胞を作製し、HCV 感染における候補蛋白質の蛋白質質量変化を western blotting で調べた。

4. 研究成果

(1) HCV NS5A 結合蛋白質の中で、CMA 標的配列を有している宿主因子を調べたところ、40 個以上の候補蛋白質が見いだされた。

得られた候補蛋白質の蛋白質質量変化を非感染細胞と HCV 感染細胞で比較したところ、TRAF2 蛋白質質量が HCV 感染によって減少した。

(2) ライソソーム阻害剤及びオートファジー阻害剤を用いて、HCV 感染による TRAF2 蛋白質質量変化を検討したところ、HCV 感染による蛋白質質量の減少は阻害剤処理で回復した。

(3) HCV NS5A プラスミドを細胞にトランスフェクトしたときの TRAF2 蛋白質質量変化を調べたところ、NS5A 濃度依存的に TRAF2 蛋白質発現量の減少が見られた。

(4) FLAG-TRAF2 プラスミドを Huh7.5 細胞にトランスフェクションし、抗 HSC70 抗体で免疫沈降を行い、抗 FLAG 抗体にて両者の相互作用を確認した。その結果、FLAG-TRAF2 は内在性 HSC70 と相互作用することが示された。FLAG-TRAF2 の CMA 標的配列(¹⁹⁹REKFQ²⁰³)のグルタミン(Q)をアラニン(A)に置換した変異体を作製し、NS5A との相互作用を確認したところ、NS5A との相互作用が見られなくなった。

(5) HSC70 ノックダウン細胞と LAMP-2A ノックダウン細胞に HCV 感染させ、TRAF2 蛋白質質量変化を検討したところ、HCV 感染による TRAF2 蛋白質質量の減少が shControl 細胞と比べて、shHSC70 細胞および shLAMP-2A 細胞で回復した。

本研究において、HCV 感染におけるシャペロン介在性オートファジー(CMA)を介した選択的蛋白質分解を受ける新規宿主因子として TNF 受容体関連因子 2(TRAF2)が見いだされた。TRAF2 の減少は、NF- κ B の活性低下と核内移行を減少させることが報告されている。そのため、HCV 感染により TRAF2 蛋白質が CMA を介して分解され減少すると、免疫応答や炎症性サイトカイン分泌の抑制と、HCV 持続感染の促進に繋がると推測される。HCV 感染による CMA を介した TRAF2 の分解が HCV による免疫回避や病原性における意義を今後さらに解明する必要がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takayuki Abe, Nanae Minami, Rheza Gandhi Bawono, Chieko Matsui, Lin Deng, Takasuke Fukuhara, Yoshiharu Matsuura, Ikuo Shoji	4. 巻 94
2. 論文標題 ISGylation of Hepatitis C Virus NS5A Protein Promotes Viral RNA Replication via Recruitment of Cyclophilin A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of virology	6. 最初と最後の頁 e00532-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00532-20	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 該当する

1. 著者名 Lin Deng, Xiang Gan, Masahiko Ito, Ming Chen, Hussein H. Aly, Chieko Matsui, Takayuki Abe, Koichi Watashi, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Masashi Mizokami, Ikuo Shoji, Hak Hotta	4. 巻 93
2. 論文標題 Peroxioredoxin 1, a Novel HBx-Interacting Protein, Interacts with Exosome Component 5 and Negatively Regulates Hepatitis B Virus (HBV) Propagation through Degradation of HBV RNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of virology	6. 最初と最後の頁 e02203-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.02203-18	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松井 千絵子, Yuliandari Putu, Deng Lin, 阿部 隆之, 勝二 郁夫
2. 発表標題 HCV NS3/4AプロテアーゼはSPG20を選択的に切断し脂肪滴の巨大化を促進する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chieko Matsui, Putu Yuliandari, Lin Deng, Takayuki Abe, Ikuo Shoji
2. 発表標題 HCV NS3/4A protease cleaves SPG20 for formation of large lipid droplets
3. 学会等名 27th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Putu Yuliandari, Chieko Matsui, Lin Deng, Takayuki Abe, Ikuo Shoji
2. 発表標題 Hepatitis C Virus infection Promotes the Lysosomal Degradation of Diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1)
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Putu Yuliandari, Chieko Matsui, Lin Deng, Takayuki Abe, Ikuo Shoji
2. 発表標題 Hepatitis C Virus infection Promotes the Lysosomal Degradation of Diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1)
3. 学会等名 27th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chieko Matsui, Putu Yuliandari, Lin Deng, Takayuki Abe, Ikuo Shoji
2. 発表標題 HCV NS3/4A Protease Specifically Cleaves SPG20 and Promotes the Formation of Large Lipid Droplets
3. 学会等名 26th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井 千絵子, Yuliandari Putu, Deng Lin, 阿部 隆之, 勝二 郁夫
2. 発表標題 HCV NS3/4Aプロテアーゼは SPG20を選択的に切断し脂肪滴の巨大化を促進する
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Putu Yuliandari, Chieko Matsui, Lin Deng, Takayuki Abe, Ikuo Shoji
2. 発表標題 Hepatitis C Virus NS5A Protein Promotes the Lysosomal Degradation of Diacylglycerol Oacyltransferase 1 (DGAT1) via Chaperone-mediated Autophagy
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
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