

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07354

研究課題名(和文)チロシンキナーゼAblによるウイルス粒子産生の制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of virus particle production by protein-tyrosine kinase Abl.

研究代表者

定 清直 (Sada, Kiyonao)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)のゲノムにコードされたタンパク質は、様々なヒト宿主因子と相互作用し、HCVの生活環を制御し病原性の発現に関与する。本研究ではCRISPR/Cas9法によりAbl欠損培養肝細胞を作製し、野生型Ablまたはキナーゼ活性欠失型Ablを安定発現させたadd-back細胞との比較により、HCVの粒子形成にはAblのキナーゼ活性が必要であることを明らかにした。またAblとHCVタンパク質NS5Aの相互作用機序を解明した。さらにAbl結合蛋白質3BP2の遺伝子改変マウスを作製し、その骨髄由来樹状細胞の解析より、C型レクチン受容体を介する免疫応答に3BP2が必要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた我々の知見は、Abl阻害薬を用いた新しいC型肝炎の治療戦略基盤を提供するものと考えられる。現在のHCV感染症治療は、直接作用型抗ウイルス薬の登場により飛躍的に改善されているが、DAA耐性ウイルスの出現による難治例など、新たな課題も生じており、チロシンキナーゼ阻害薬は作用機序の違いから今後の研究開発の基盤となることが期待される。また我々は、BMDCのデクチン-1により誘導される種々のサイトカインの発現に3BP2が重要であることを明らかにした。この新たなシグナル経路の調節機構の解明と、深在性真菌症の病因と病態との因果関係が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Proteins encoded in the genome of hepatitis C virus (HCV) interact with various human host factors to regulate the life cycle of HCV and contribute to its virulence. In this study, we generated Abl-deficient cultured hepatocytes by the CRISPR/Cas9 method and compared them with add-back cells stably expressing wild-type Abl or Abl lacking kinase activity, and found that the kinase activity of Abl is required for HCV particle formation. We also elucidated the mechanism of interaction between Abl and HCV protein NS5A. Furthermore, we generated Abl-binding protein 3BP2 transgenic mice and analyzed their bone marrow-derived dendritic cells and found that 3BP2 is required for C-type lectin receptor-mediated immune responses.

研究分野：病態医化学

キーワード：感染宿主因子 チロシンキナーゼ ゲノム編集 HCV Abl 3BP2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原性を有するウイルスは感染細胞内の様々な因子を生活環の一部として取り入れるとともに、疾病を引き起こすメカニズムに活用することが知られている。肝細胞がん発症の原因となる C 型肝炎ウイルス(HCV)は、宿主細胞のペプチターゼを活用し、ウイルス自らのプロテアーゼとともに前駆体蛋白質のプロセッシングを行い、3種類の構造蛋白質と7種類の非構造蛋白質を生ずる。非構造蛋白質の一つである NS3/4A はミトコンドリア膜上にてアダプター分子 IPS-1 を切断し自然免疫応答の受容体である RIG-I のシグナル伝達を抑制し、慢性感染を持続させる。また構造蛋白質であるコア蛋白質を発現する遺伝子改変マウスは高頻度で肝臓がんを発症する。以上のように宿主因子は病原性の発現に密接に関わっている。

(1) 我々はこれまで HCV の病原性発現機構や、免疫系における細胞内チロシンキナーゼの役割に注目し、培養肝細胞を用いたウイルス感染実験系 [米国ロックフェラー大学の C. Rice 教授 (2020 年ノーベル生理学・医学賞受賞) より提供] において、チロシンキナーゼ Abl の特異的阻害薬イマチニブ(慢性骨髄性白血病の治療薬)や、Abl の shRNA によるノックダウンが、肝細胞において HCV のウイルス粒子産生を阻害することを明らかにしてきた(Yamauchi *et al.* J Biol Chem. 2015)。

またゲノム編集法 (CRISPR/Cas9 法) によりインターフェロン (IFN) 応答に関わる STAT1~6 と IRF9 欠損細胞をそれぞれ作成し、IFN- による HCV 複製抑制に STAT1 が必須であることを報告した(Yamauchi *et al.* Sci Rep. 2016)。

(2)我々は Abl 結合蛋白質 3BP2 (SH3 binding protein-2)が、マクロファージや B リンパ球にて細胞応答を促進することを報告した (Shukla *et al.* J Biol Chem. 2009、Chihara *et al.* Sci Rep. 2017)。3BP2 は Syk 型チロシンキナーゼ(Syk, ZAP-70)により直接リン酸化され、真菌や結核菌の受容体である C 型レクチン受容体 (CLR) を介して、マスト細胞の新しい自然免疫応答を制御する役割を持つことを報告した(Kimura *et al.* J Biol Chem. 2014、Honjoh *et al.* Sci Rep. 2017)。

これらの背景により、Abl はウイルス病原体の感染に対する宿主因子としての役割を有すると考えられる。

2. 研究の目的

(1) ゲノム編集により作製した Abl 欠損細胞、さらに正常型あるいは変異型の Abl の発現を戻した add-back 細胞を樹立し、HCV のライフサイクルにおける Abl の役割を解明するとともに、Abl と HCV タンパク質を用いた再構成実験によりその作用機序を解明する。

(2) ゲノム編集により作製した 3BP2 の遺伝子改変マウスを樹立し、真菌感染に対する免疫細胞応答での 3BP2 の役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) HCV のライフサイクルにおける Abl の役割の解明

ゲノム編集法により Abl 欠損細胞を作製し、HCV の生活環における Abl の宿主因子としての役割について、HCV の感染実験系を用いて検討した。

Abl と NS5A との相互作用を、HEK293T 細胞を用いた再構成実験により解析した。

STAT1~6 と IRF9 を欠損する培養肝細胞を用いて、IFN により誘導される遺伝子群についての網羅的解析を、国際共同研究として実施した。

(2) 真菌感染に対する免疫細胞応答における 3BP2 の役割の解明

ゲノム編集により 3BP2 機能欠損マウスを作製し、免疫担当細胞の分化と機能を解析した。

3BP2DL/DL マウス由来で GM-CSF 刺激因子によって誘導される骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いて、CLR の一つであるデクチン-1 を介するサイトカイン産生を解析した。

3BP2 と CARD9 との共役による NF- B 活性化機構について解析した。

4. 研究成果

(1) HCV の感染宿主因子: Abl

Abl 欠損細胞の解析

CRISPR/Cas9 法により作製した 2 種類の Abl 欠損細胞 (KO#1・KO#2) では、*abl* 遺伝子にフレームシフト変異と、新たな終止コドンが生じていた。そのうちの一つの Abl 欠損細胞 (KO#1) に野生型またはキナーゼ活性欠失型 Abl (いずれもゲノム編集耐性同義変異を導入) を安定発現させた add-back 細胞を 2 種類ずつ樹立し、感染実験を行った。その結果、HCV の肝細胞内への侵

入、タンパク質の発現とプロセッシング、ゲノム RNA の複製については、各細胞間で有意差がなかった。

一方、細胞内、細胞外から HCV 粒子を回収し感染力価を比較した結果、Abl 欠損細胞では細胞内での HCV の粒子形成が抑制され、その効果は野生型 Abl の add-back 細胞では有意に回復したが、キナーゼ活性欠失型 Abl では回復しなかった。よって HCV の粒子形成には Abl のキナーゼ活性が必要であることが明らかとなった (図 1)。なお、異なるガイド RNA により作製した別種の 2 種類の Abl 欠損細胞 (K0#3・K0#4) でも HCV の粒子形成の抑制が観察された。

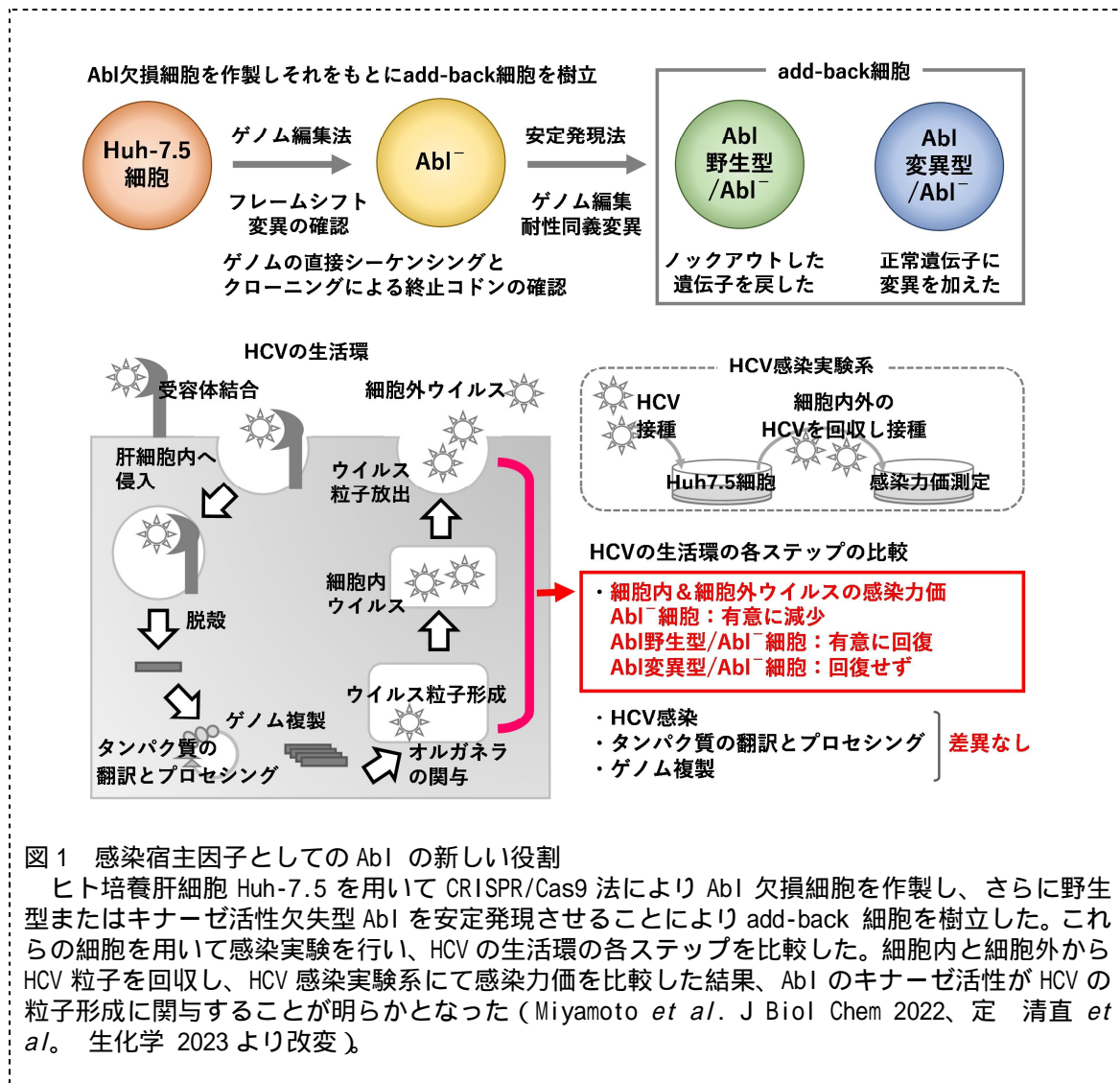


図 1 感染宿主因子としての Abl の新しい役割

ヒト培養肝細胞 Huh-7.5 を用いて CRISPR/Cas9 法により Abl 欠損細胞を作製し、さらに野生型またはキナーゼ活性欠失型 Abl を安定発現させることにより add-back 細胞を樹立した。これらの細胞を用いて感染実験を行い、HCV の生活環の各ステップを比較した。細胞内と細胞外から HCV 粒子を回収し、HCV 感染実験系にて感染力価を比較した結果、Abl のキナーゼ活性が HCV の粒子形成に関与することが明らかとなった (Miyamoto *et al.* J Biol Chem 2022、定 清直 *et al.* 生化学 2023 より改変)。

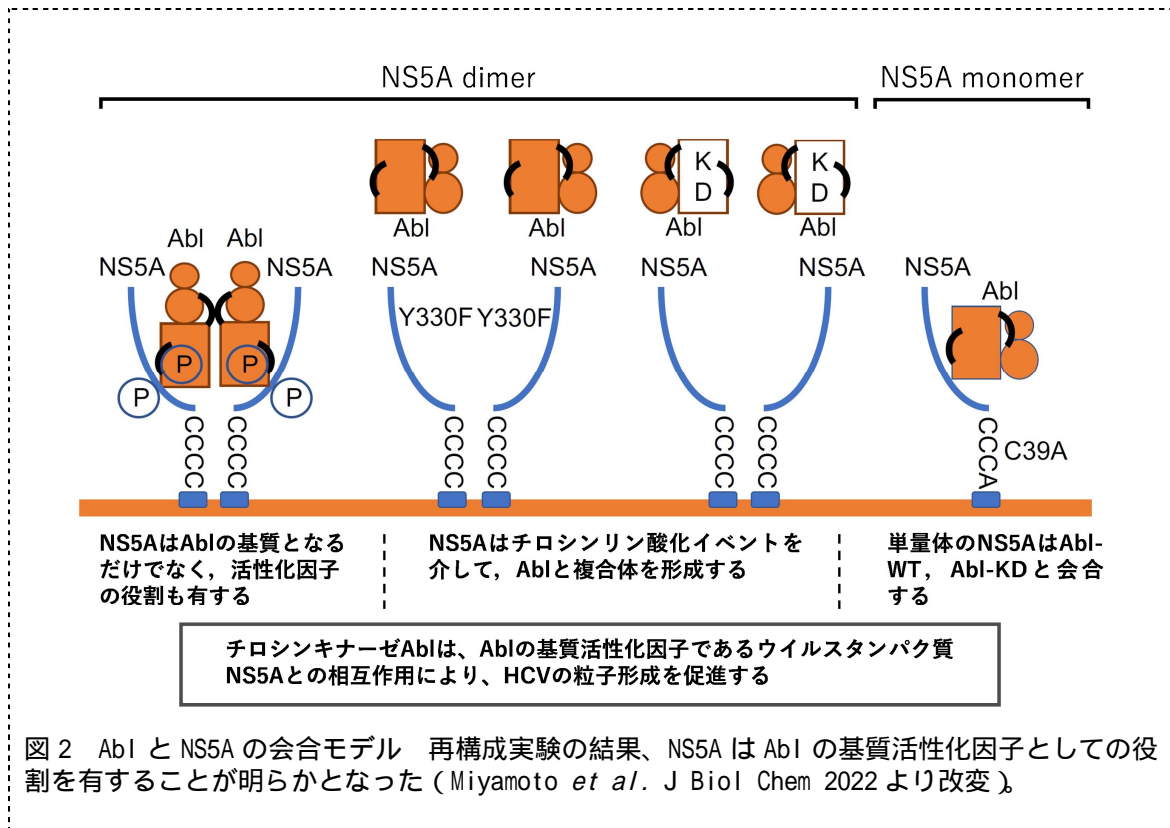
Abl の作用機序の解析

Abl のキナーゼドメインの活性化ループのチロシンリン酸化は Abl のキナーゼ活性化指標であり、HEK293T 細胞では Abl が NS5A と共発現することにより促進された。この現象は、Abl による NS5A リン酸化部位を他のアミノ酸に置換すると観察されないことから、NS5A は Abl の基質活性化因子として機能することが示唆された。

また Abl と NS5A との複合体形成は、NS5A のリン酸化部位の変異や、Abl のキナーゼ活性欠失により顕著に減弱していた。一方、NS5A の二量体化に必要なシステイン残基を別のアミノ酸に置換した単量体型 NS5A は Abl の野生型、キナーゼ活性欠失型と同等の複合体形成がみられた。

以上より、NS5A は Abl の活性化因子として作用し、チロシンリン酸化イベントを介して Abl と複合体を形成すること、単量体型の NS5A はチロシンリン酸化の有無にかかわらず Abl と複合体を形成しうることが明らかとなり、両者の相互作用と分子機序が明らかとなった (図 2)。

なお 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、候補分子である Nck1、N-WASP、WAVE2 について RNA 干渉法により解析を行ったが、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。



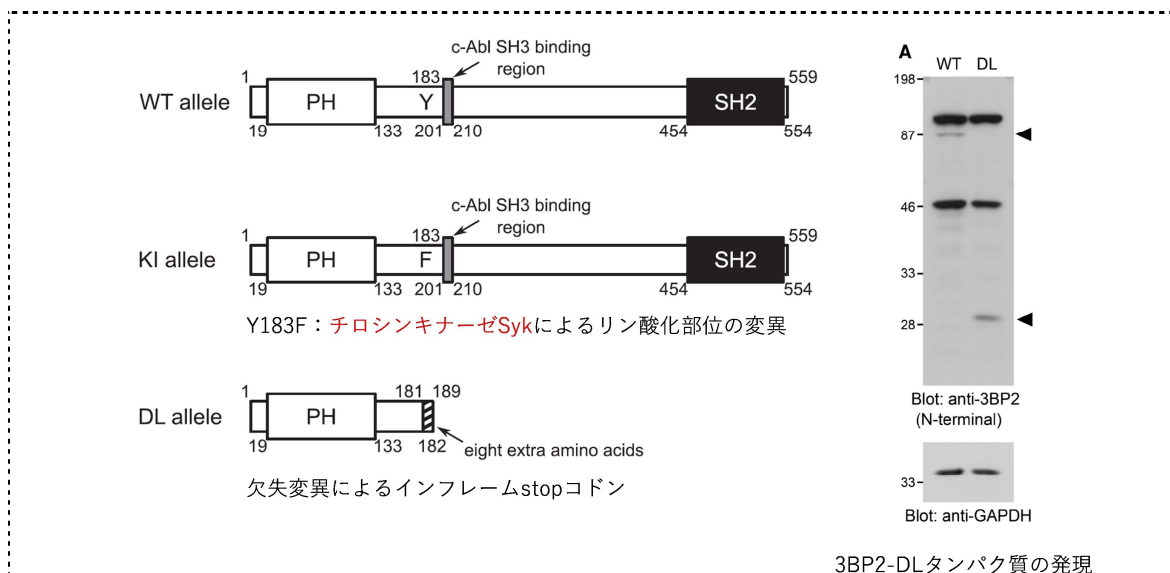
IFN と IFN 応答における STAT ファミリー分子の使い分け

ポーランドのアダム・ミツキェヴィチ大学 Hans Bluysen 教授より共同研究の申し込みがあり、現在その成果を学術誌に投稿中である (タイトル: Time-dependent recruitment of GAF, ISGF3 and IRF1 complexes shapes IFN and IFN activated transcriptional responses and explains mechanistic and functional overlap)。なおこの論文は査読前の状態でオンラインにて公開されている。

(2) 真菌の感染宿主因子: 3BP2

3BP2 欠損マウスの解析

ゲノム編集により 3BP2 機能欠損マウス (3BP2^{DL/DL} マウス) と、Syk による主要なリン酸化部位である Tyr¹⁸³ を Phe に置換した 3BP2 変異体を発現するノックインマウス (3BP2^{KI/KI} マウス) を作製し、免疫担当細胞の分化と機能について解析を行った (図3)。



その結果、3BP2^{DL/DL} マウスでは GM-CSF 刺激因子によって誘導される BMDC の細胞表面マーカーの解析により、CD11b と MHCII 画分に相違が認められた。また、3BP2^{DL/DL} マウス由来の細胞では第二の CLR : ミンクルの発現が減弱していた。

3BP2^{DL/DL} マウス由来の BMDC の解析

デクチン-1 のリガンドであるカードランに対する細胞応答を解析すると、3BP2^{DL/DL} マウス由来の BMDC では、デクチン-1 が誘導するサイトカイン産生と NF- κ B の活性化に減弱がみられた。これらの細胞機能の低下は、レンチウイルスを用いて野生型 3BP2 を強制発現させことにより回復した。3BP2 の機能欠損によるデクチン-1 シグナル経路への影響は、IKK / 、NF- κ B p65、JNK、p38 MAPK の活性化に影響がみられたのに対し、PKC 、 ERK には影響がみられなかった。3BP2^{KI/KI} マウスの解析から、3BP2 の Tyr¹⁸³ のリン酸化はサイトカイン発現に必須ではないことが明らかとなった。この結果はリンパ球で見られた Syk による 3BP2 のチロシンリン酸化が、BMDC の真菌感染免疫応答ではあまり重要ではないことを示唆している (図 4)。

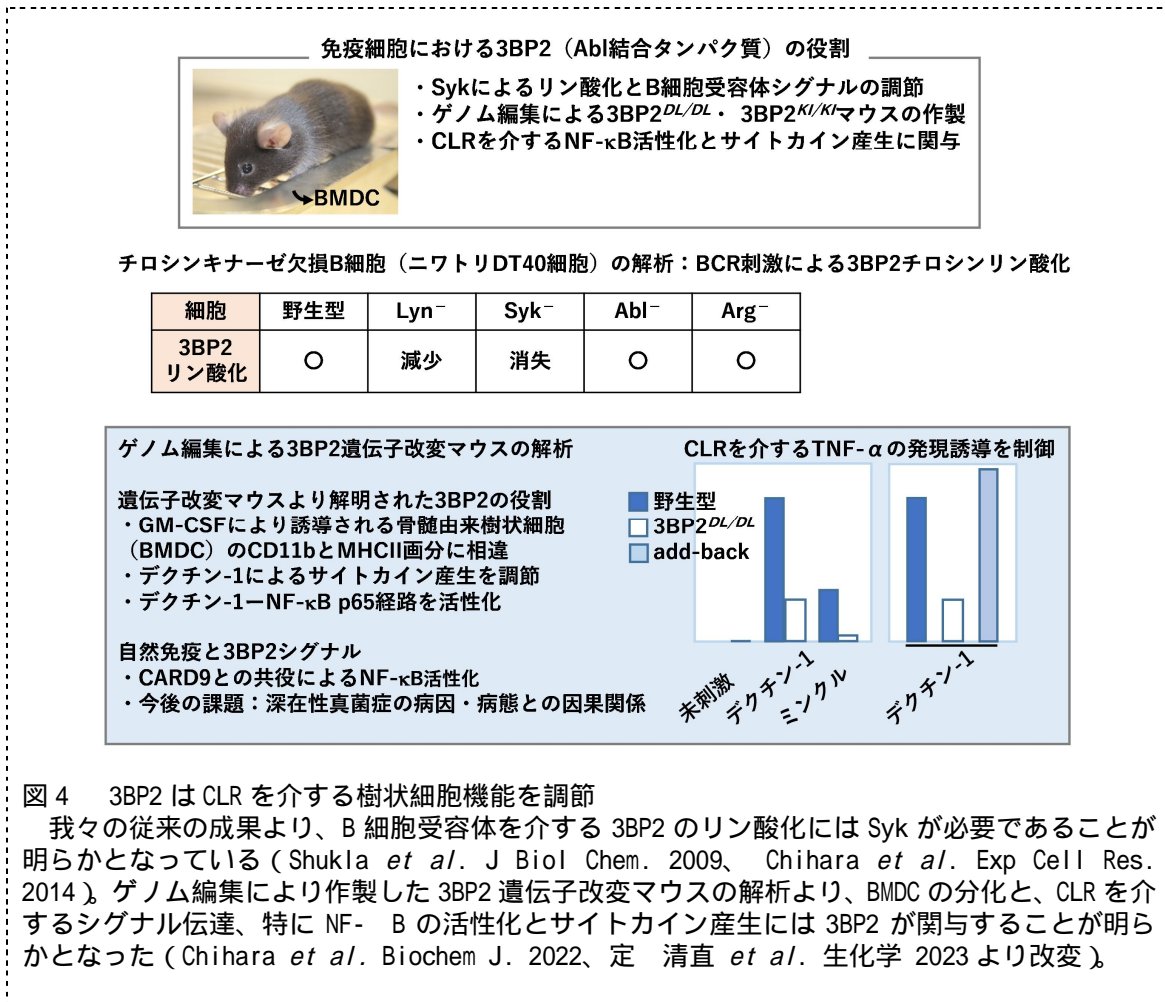


図 4 3BP2 は CLR を介する樹状細胞機能を調節

我々の従来の成果より、B 細胞受容体を介する 3BP2 のリン酸化には Syk が必要であることが明らかとなっている (Shukla *et al.* J Biol Chem. 2009、Chihara *et al.* Exp Cell Res. 2014)。ゲノム編集により作製した 3BP2 遺伝子改変マウスの解析より、BMDC の分化と、CLR を介するシグナル伝達、特に NF- κ B の活性化とサイトカイン産生には 3BP2 が関与することが明らかとなった (Chihara *et al.* Biochem J. 2022、定 清直 *et al.* 生化学 2023 より改変)。

3BP2 と CARD9 の共役による NF- κ B 活性化機構の解析

HEK293T 細胞を用いた一過性発現系を用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、CARD9 と 3BP2 を共発現させると NF- κ B の転写活性の亢進がみられた。

< 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6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Muramatsu Ikunobu, Uwada Junsuke, Chihara Kazuyasu, Sada Kiyonao, Wang Mao Hsien, Yazawa Takashi, Taniguchi Takanobu, Ishibashi Takaharu, Masuoka Takayoshi	4. 巻 160
2. 論文標題 Evaluation of radiolabeled acetylcholine synthesis and release in rat striatum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 342 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15556	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 Chihara Kazuyasu, Chihara Yuri, Takeuchi Kenji, Sada Kiyonao	4. 巻 479
2. 論文標題 Adaptor protein 3BP2 regulates dectin-1-mediated cellular signalling to induce cytokine expression and NF- B activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 503 ~ 523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20210707	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 Morita Naoko, Tanaka Yukie, Takeuchi Kenji, Kitagawa Yoshinori, Sakuma Ryusuke, Koide Naoki, Komatsu Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 SeV C Protein Plays a Role in Restricting Macrophage Phagocytosis by Limiting the Generation of Intracellular Double-Stranded RNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.780534	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 Miyamoto Daisuke, Takeuchi Kenji, Chihara Kazuyasu, Fujieda Shigeharu, Sada Kiyonao	4. 巻 298
2. 論文標題 Protein tyrosine kinase Abl promotes hepatitis C virus particle assembly via interaction with viral substrate activator NS5A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101804 ~ 101804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101804	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 定 清直、竹内 健司、千原 一泰	4. 巻 95
2. 論文標題 感染宿主因子としてのチロシンキナーゼAbIの新しい役割	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 96 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950096	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 定 清直	4. 巻 95
2. 論文標題 ケルビズム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 117-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hasegawa T, Sada, K., and Hasegawa M.
2. 発表標題 Covid-19 epidemic in Fukui Prefecture
3. 学会等名 UNAIR The 12th International Nursing Conference “Reframing Nursing Education, Research and Practice: COVID-19 as Catalyst for Innovation” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 定 清直
2. 発表標題 感染症教育と国際交流
3. 学会等名 第128回関西形成外科学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千原一泰, 千原悠里, 竹内健司, 定 清直
2. 発表標題 アダプター蛋白質3BP2はC型レクチンDect in-1を介するサイトカインの産生とNF- Bの活性化を制御する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 定 清直, 酒巻一平, 岩崎博道
2. 発表標題 福井大学における感染症医療人材養成事業 (UF-IDEEP) と特色あるカリキュラム「感染症」の新設
3. 学会等名 第65回日本感染症学会中日本地方会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本大輔, 竹内健司, 千原一泰, 藤枝重治, 定 清直
2. 発表標題 チロシンキナーゼAbIはウイルス基質活性化因子NS5Aとの相互作用によりC型肝炎ウイルス粒子形成を促進する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千原一泰, 坪川亜優美, 千原悠里, 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はC型レクチン受容体dect in-1を介するサイトカインの産生とNF- Bの活性化を制御する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 定 清直
2. 発表標題 ウイルス感染・免疫応答を制御する宿主因子の新しい役割
3. 学会等名 2022年度北陸腸内細菌研究会・研究発表会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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			
ポーランド	アダム・ミツェヴィチ大学			