

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17064

研究課題名(和文) HBV感染におけるノンコーディングRNAを起点としたエピジェネティック制御

研究課題名(英文) Epigenetic regulation based on non-coding RNA in HBV infection

研究代表者

柿崎 正敏 (Kakizaki, Masatoshi)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・研究員

研究者番号：00778954

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)：本研究では、cccDNAに相互作用する宿主由来non-coding RNA (ncRNA) に含まれる反復配列がエピジェネティック制御を介してpgRNA転写を抑制するメカニズム解明を目的としている。本研究では、反復配列によるpgRNA転写制御は、ヒストンH3K9・H3K27のメチル化によって生じることを明らかにした。また、オービトラップLC-MS解析を用いて、反復配列と相互作用するタンパク質を網羅的に同定した。さらに、同定したタンパク質のmRNAに対するsiRNAを用いて、pgRNA転写抑制に関与するタンパク質をスクリーニングを行い、2種類の候補を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、宿主由来のncRNAに含まれる反復配列がウイルス再活性化の原因となっているcccDNAからのpgRNA転写を制御するメカニズムを解明を目指している。今回、我々の研究で、この反復配列があるタンパク質と相互作用することでH3K9とH3K27のメチル化を促進していることが明らかになった。このことは、今後のHBVの新たな治療開発に繋がるとともに、pgRNAの新たな転写制御メカニズムの発見ともなり学術的意義も大きと考えられる。

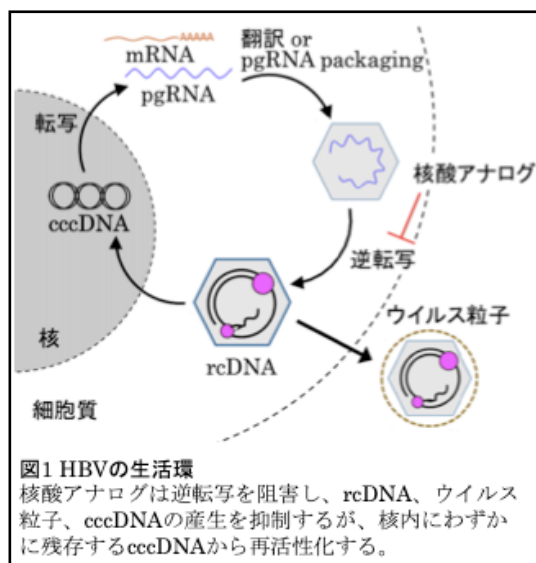
研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the mechanism by which repetitive sequences in host-derived non-coding RNAs (ncRNAs) that interact with cccDNA repress pgRNA transcription through epigenetic regulation. In this study, we found that the regulation of pgRNA transcription by repetitive sequences is caused by methylation of histones H3K9 and H3K27. Using orbitrap LC-MS analysis, we also comprehensively identified proteins that interact with repetitive sequences. Furthermore, using siRNAs against mRNAs of the identified proteins, we screened for proteins involved in pgRNA transcriptional repression and found two candidates.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV エピジェネティック制御 ノンコーディングRNA 反復配列

① 研究開始当時の背景

B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) は世界的な感染症であり、HBV 持続感染者は全世界でも 4 億人存在すると推定され、その大部分はアジア、アフリカ地域に集中しており、本邦でも HBV キャリアは約 100 万人と推定される。本邦では、母子感染予防策により新規感染は減り、核酸アナログによってウイルス複製は制御可能になりつつある。しかし、いまだ完全駆除はされがたく、C型肝炎ウイルスが新規抗ウイルス薬によりほぼ駆除できるようになった現在、ウイルス肝炎に残された問題の一つに、HBV の再活性化があげられる (図 1)。再活性化のリスクの原因となっている



のは、HBV 感染肝細胞の核内に残存する「covalently closed circular DNA (cccDNA)」である。核内で、cccDNA はヌクレオソームに結合しミニクロモソームが形成される。このミニクロモソームは非常に安定で、感染肝細胞内で潜在化し HBV 持続感染の基盤となる。このミニクロモソームを構成するヒストンタンパク質がいくつか明らかになっているが、作用機序を含め、全容は解明されていないため、制御が困難である。cccDNA を高い純度で単離し、ミニクロモソームからウイルス RNA の転写がどのように制御されているのかが解明されれば、B型肝炎の新たな治療法開発につながることが期待される。

② 研究の目的

これまで cccDNA 複合体の単離は、HBV がコードするタンパクである X タンパク (HBx) が cccDNA に結合するという知見をもとに、HBx に対する抗体で cccDNA 複合体を単離する方法でヒストン H3 タンパクなどが同定されてきた [Belloni L, et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2009]。しかし、この方法は間接的であるため、感度、特異度双方が低くなると考えられる。この問題の解決策として申請者は、CRISPR/Cas9 を応用した DNA の配列特異的にクロマチン免疫沈降を行う Engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法を採用した [Fujita T, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013] (図 2)。これまでに、tetracycline 調節下で HBV を複製する HepAD38 細胞株において、cccDNA-タンパク質-RNA 複合体の単離に成功している。興味深いことに、この複合体には高い親和性を持った数種類の **non-coding RNA (ncRNA)** が含まれており、これらの ncRNA には、7 塩基からなる反復配列が存在していた。申請者は、この反復配列が特異的に pregenomic RNA (pgRNA) の転写を抑制していることを見出し、さらに、cccDNA/ミニクロモソーム上のヒストン **H3K27** における脱アセチル化メチル化を促進することを明らかにした (未発表)。以上の結果から、この反復配列は、エピジェネティック制御を介して

pgRNA の転写を抑制していることが考えられる (図 3)。そこで、申請者は、この反復配列に着目し、エピジェネティック制御を介した pgRNA 転写抑制メカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。

③ 研究の方法

本研究では、以下の 3 点を通じて、ncRNA によるエピジェネティック制御を介した pgRNA 転写抑制メカニズムの解明を試みた。

cccDNA 複合体に含まれる ncRNA は、Y 染色体由来のものが多く含まれることから、本研究では、レンチウイルスベクターを用いて Y 染色体由来の ncRNA をトランスフェクションした HepG2 細胞 (HepG2-YncRNA) を ncRNA 過剰発現細胞として用いた。また、HBV minicircle DNA [Yan Z, et al. *J Hepatol.* 2017] をトランスフェクションしたものを HBV 複製細胞として使用した。

(1) ncRNA が脱アセチル化・メチル化を促進する箇所の同定

近年、cccDNA からウイルス RNA の転写が起こっている状態では、転写促進に働く H3K4 のトリメチル化、H3K27 と H3K122 のアセチル化が進み、転写抑制に働く、H3K9 と H3K27 のトリメチル化はほぼ起こらないことが報告されている [Tropberger P, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015]。そこで、ncRNA がヒストン H3K27 以外の箇所における脱アセチル化とメチル化を促進するかを、ChIP 法を用いて検証した。

(2) cccDNA 上に存在する CpG アイランドのメチル化と反復配列との関連

cccDNA 上には DNA のメチル化が起きやすい CpG アイランドが 3 箇所存在することが知られている。近年、この CpG アイランドのメチル化もウイルス RNA の転写制御に重要であることが報告されてきている [Zhang Y, et al. *PLoS One.* 2014]。このことから、ncRNA による pgRNA 転写制御は CpG アイランドのメチル化にも関与している可能性が考えられる。そこで、HepG2-YncRNA に HBV minicircle DNA をトランスフェクションした細胞に存在する cccDNA 上の CpG アイランドにおけるメチル化の程度をバイサルファイトシーケンス法を用いて解析した。

(3) 反復配列と相互作用し pgRNA 転写抑制に関与するタンパク質の同定

反復配列を含むビオチン化 RNA プローブ (反復配列に変異を入れたものをコントロールとして用いる) を HBV 複製細胞の核の溶解液と混合させ反復配列-タンパク質複合体を回収する。その後、オービトラップ LC-MS 解析を用いて、反復配列と相互作用するタンパク質を網羅的に同定する。HepG2-YncRNA に同定したタンパク質の mRNA に対する siRNA と HBV minicircle DNA を同時にトランスフェクションし、pgRNA 転写抑制に関与するタンパク質をスクリーニングした。

④ 研究成果

(1) ncRNA が脱アセチル化・メチル化を促進する箇所の同定

H3K4 と H3K9 のメチル化を ChIP 法を用いて検証したところ、H3K9 のトリメチル化が促進されることが明らかになった。このことから、ncRNA が H3K9 と H3K27 のトリメチル化を促進することにより pgRNA の転写が抑制されていることが示唆された。

(2) cccDNA 上に存在する CpG アイランドのメチル化と反復配列との関連

cccDNA 上の CpG アイランドにおけるメチル化の程度をバイサルファイトシーケンス法を用いて解析した結果、CpG アイランドにおいて DNA のメチル化は誘導されていなかった。これより、ncRNA は DNA のメチル化には関与しないことが明らかになった。

(3) 反復配列と相互作用し pgRNA 転写抑制に関与するタンパク質の同定

オービトラップ LC-MS 解析を用いて、反復配列と相互作用するタンパク質を網羅的に同定した結果、74 種類のタンパク質が ncRNA と結合することが明らかになった。これらのタンパク質の中に、メチル化酵素が含まれていなかったため、上位のタンパク質からノックダウンを行い、pgRNA の転写に関与するものを検索した。その結果、7 種類のタンパク質まで絞り込むことができた。次に、この 7 種類のタンパク質の中で、H3K9 と H3K27 のトリメチル化に関与するものを検索したところ、2 種類のタンパク質に絞り込むことに成功した。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kakizaki Masatoshi, Yamamoto Yuichiro, Otsuka Motoyuki, Kitamura Kouichi, Ito Masatoshi, Kawai Hideki, Derek, Muramatsu Masamichi, Kagawa Tatehiro, Kotani Ai	4. 巻 295
2. 論文標題 Extracellular vesicles secreted by HBV-infected cells modulate HBV persistence in hydrodynamic HBV transfection mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12449 ~ 12460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.ra120.014317	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 Kakizaki Masatoshi, Yamamoto Yuichiro, Nakayama Shunya, Kameda Kazuaki, Nagashima Etsuko, Ito Masatoshi, Suyama Takashi, Matsuzaki Yumi, Chiba Tetsuhiro, Sumiyoshi Hideaki, Inagaki Yutaka, Kotani Ai	4. 巻 12
2. 論文標題 Human hepatocyte-derived extracellular vesicles attenuate the carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	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） 10.1038/s41419-021-04204-7	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------