

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590085

研究課題名（和文）C型肝炎ウイルスNS4B蛋白質の膜変形作用に関わる宿主因子の探索と機能解析

研究課題名（英文）Screening for host factors involved in membrane rearrangements induced by hepatitis C virus NS4B protein

研究代表者

齊藤 恭子 (SAITO KYOKO)

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官

研究者番号：70235034

研究成果の概要（和文）：

C型肝炎ウイルス（HCV）のNS4B蛋白質に結合する宿主因子を見つけるため、HA タグを付加したNS4B蛋白質を恒常的に発現するヒト肝癌由来細胞株を樹立した。この細胞を材料として、光反応性アミノ酸誘導体を用いて *in vivo* クロスリンクを行い、NS4B とその結合蛋白質のコンプレックス（分子量約 60KDa）を見出した。質量分析での当該結合蛋白質の同定を目指し、60 KDa コンプレックスを HA アガロースを用いて精製したが、量的に不足しており、スケールアップ並びにクロスリンク効率の改善等の条件検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To identify host proteins that bind to hepatitis C virus (HCV) NS4B protein, human hepatoma cells constitutively expressing HA-tagged NS4B protein were prepared and were crosslinked *in vivo* by using photo-reactive amino acid analogs. A crosslinked complex (ca. 60KDa) of NS4B protein and its binding protein(s) was detected in the cell lysate and purified by using HA agarose. However, the amount of the complex was not enough to be identified by mass spectrometry. Thus, scale up of the purification processes and/or improvement of crosslinking efficiency are needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	0	900,000
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	0	2,600,000

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ウイルス、感染症、生体膜、宿主因子

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では、100 万～200 万人が C 型肝炎ウイルス（HCV）に感染しているとされてお

り、HCV 感染症は健康上の大きな脅威となっている。現在の中心的治療である PEG インターフェロンとリバビリンの併用療法は、ウィ

ルスの型によっては著効せず、副作用の問題もある。従って、新たなストラテジーでの抗HCV薬の開発は急務であり、HCV複製機構の理解が重要である。

HCVはプラス鎖RNAウイルスに分類されるが、そのグループの共通点の一つは、感染細胞内の生体膜上に複製複合体を形成し、膜に囲まれた環境でゲノムの複製を行うことである。HCVの場合、membranous webと呼ばれる小胞体膜由来の膜構造が感染細胞に形成され、そこで複製が起こることが示唆されている。membranous webは、NS4B蛋白質を単独で発現するだけでも誘導される。しかしながら、NS4Bがmembranous webを誘導するメカニズム及びHCV複製におけるその膜構造の重要性については、よくわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究はNS4Bが相互作用する宿主蛋白質、脂質を検索し、その機能解析を行って、複製複合体の形成機構の手がかりを得ることを目標としている。

## 3. 研究の方法

### (1) NS4B発現細胞の樹立

HCV JFH1株のNS4B配列のN末端にHAタグ配列とTEVプロテアーゼ認識配列を付けたcDNAをpCXN2プラスミドのマルチクローニングサイトに組み込んだコンストラクトを作製する。これをヒト肝癌由来Huh-7.5細胞にリポフェクションで導入後、G418耐性を指標に選別し、NS4Bを恒常的に発現する細胞を分離する。コントロールとして、空ベクターを導入した細胞も同様に分離する。

### (2) in vivo クロスリンクと結合蛋白質の同定

HATEV-NS4B発現細胞とコントロール細胞について、光反応性アミノ酸誘導体 (Pierce, L-Photo-Leucine, L-Photo-Methionine) により新生蛋白質の代謝ラベルを行った後、UV

照射によりクロスリンクを行う。細胞を回収し、抗HA抗体でのウェスタンブロット解析により、NS4Bとコンプレックスを形成した蛋白質を検出する。UVクロスリンクを行ったHATEV-NS4B発現細胞を可溶化し、抗HA抗体結合ビーズを用いて、NS4Bと結合因子のコンプレックスを回収し、HAペプチドで溶出する。溶出画分のSDS電気泳動を行い、標的のコンプレックスを切り出し、質量分析 (MALDI/TOFMS or LC/MS) により、結合因子の同定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) NS4B発現細胞の樹立

HCV JFH1株のNS4B配列のN末端にHAタグ配列とTEVプロテアーゼ認識配列を付けたNS4B蛋白質 (以下、HATEV-NS4B) を恒常的に発現するヒト肝癌細胞Huh-7.5細胞を樹立した。抗HA抗体による細胞染色では、網目状構造とドット状の構造体が染まった (図1)。網目状構造は、小胞体マーカーとの共局在が認められ、既報と一致した。また、ドット構造は、報告されているmembranous webの蛍光染色像に似ていることから、webであると考えられた。

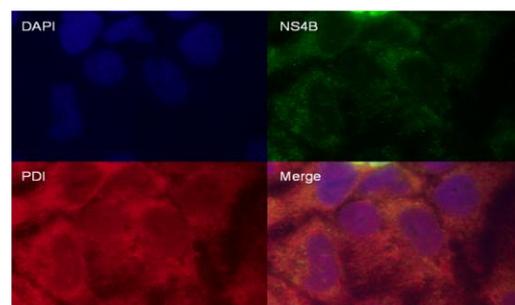


図1: NS4Bの細胞内分布

HATEV-NS4B発現細胞を固定し、抗HA抗体でNS4B蛋白質を検出した。また、抗protein disulfide isomerase (PDI)抗体で小胞体を、DAPIで核を染色した。

(2) in vivo クロスリンクと結合蛋白質の同定

HA タグ標識 NS4B 発現細胞を用いて in vivo クロスリンキングを行い、そのライセートを抗 HA 抗体で免疫沈降する方法により NS4B と相互作用する蛋白質の探索を行った。その結果、分子量約 80 kDa、70 kDa、60 kDa、55 kDa のコンプレックスを見出した (図 2)。NS4B を発現していないコントロール細胞を同様に処理しても、これらのコンプレックスは検出されなかった。また、クロスリンクを行わない NS4B 発現細胞を同様に処理しても、55 kDa のコンプレックス以外は見られなかった。コンプレックスのうち、NS4B (27 kDa) のホモオリゴマーに相当しない分子量であるのは 60 kDa のコンプレックスであり、これには NS4B 結合蛋白質が含まれている可能性が考えられた。この蛋白質は、単一蛋白質と仮定して 30-40 kDa と考えられ、既知の NS4B 結合蛋白質の分子量とは一致しておらず、新規の蛋白質と考えられた。

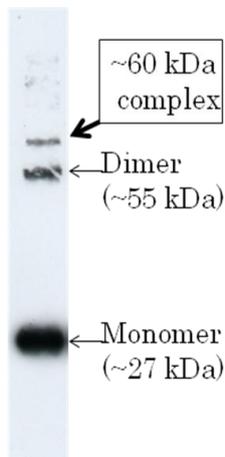


図 2 : NS4B 結合蛋白質の検出。

HA タグ付加 NS4B を発現する細胞を光反応性アミノ酸で標識して光架橋後、抗 HA アガロースで NS4B を精製し、HA ペプチドで溶出した。抗 HA 抗体で溶出画分のウエスタンブロット解析を行った。

当該結合蛋白質を同定するために、10 cm デ

ィッシュ 10 枚分の細胞から、コンプレックスの精製を試みた。しかしながら、パイロット試験の結果、質量分析での同定に必要な量を得るためには 10 倍以上のさらなるスケールアップが必要と見積もられ、コスト的・時間的に困難と予見された。結合蛋白質と NS4B のコンプレックス形成の効率の向上および安定化等の条件検討が必要であると考えられた。

(3) membranous web 形成におけるコレステロールの関与

コレステロールの生合成を阻害するスクアレン合成酵素阻害剤は HCV の RNA 複製を阻害することを見出した。そこで、NS4B 発現細胞に、スクアレン合成酵素阻害剤を添加して NS4B 蛋白質の細胞内分布の変化を調べたが、大きな変化は観察されなかった。今後は NS4B 蛋白質発現によるコレステロール含量の変化について解析し、NS4B とコレステロールとの細胞内分布の比較を行い、同脂質が web 構造の構成脂質の一つである可能性を調べる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 恭子 (SAITO KYOKO)  
国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究  
官  
研究者番号：70235034

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：