

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 5 月 22 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590508

研究課題名（和文） プロテアソームによるウイルス感染制御の解析

研究課題名（英文） Study on proteasome-dependent regulation of viral infection

研究代表者

森石 恒司（MORIISHI KOHJI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：90260273

研究成果の概要（和文）：ユビキチン非依存プロテアソーム活性は、C 型肝炎ウイルス（HCV）感染を正に制御するが、その作用点は不明であった。ユビキチン非依存プロテアソーム活性の抑制に伴って、ウイルスゲノム複製以降の過程が低下し、マウス肝臓内における細胞増殖と DNA 修復に影響することが示唆された。本研究の結果から、HCV 感染と感染による病原性発現にユビキチン非依存プロテアソーム系が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been unknown the mechanism by which ubiquitin-independent proteasome regulates hepatitis C virus (HCV) infection. HCV propagation was suppressed by inhibition of ubiquitin-independent proteasome in cell culture system. Furthermore, ubiquitin-independent proteasome associated with cell proliferation and DNA repair in the liver of mouse model. These data suggest that ubiquitin-independent proteasome plays an important role in HCV infection and pathogenicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：プロテアソーム、フラビウイルス、ウイルス複製

1. 研究開始当初の背景

肝臓は我が国の癌死の第3位を占め、その約8割がC型肝炎ウイルス（HCV）感染に起因

しており、年間3万5千人もの尊い命が奪われている（Moriishi 2007 Rev. Med. Virol. 17:343-354）。HCVに感染すると、慢性持続性感

染を経て、脂肪肝・肝硬変・肝癌へと移行する確率が極めて高い。チンパンジー以外に感受性を示す実験動物がないなどの理由から、その肝癌発症のメカニズムの解明は困難を極めていいる。特に、慢性感染における病態を解析する適当な系はHCV蛋白質を発現する遺伝子改変マウスの系やチンパンジー感染系以外に存在しない。また、一部の2a型株のみでウイルス培養系が報告されているが、患者数が多いインターフェロン非感受性の株1aおよび1b型では樹立されていない。

HCV蛋白質は約10kbの+鎖RNAゲノムにコードされ、単一鎖の前駆蛋白質として産生される。コア蛋白質は前駆蛋白質のアミノ末端に位置し、ウイルスキャプシドを構成する191アミノ酸の構造蛋白質である。シグナルペプチダーゼおよびシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) によって切断され、コア蛋白質は成熟し、感染性をもつことを我々は明らかにした(Okamoto 2004 J. Virol. 78:6370 ; Okamoto 2008 J. Virol. 78:6370)。宿主及びウイルス蛋白分解酵素によってプロセッシングされ、VAP-B(Hamamoto J. Virol. 82:8349)やFKBP8(Okamoto, 2006. EMBO J. 25:5015-5035)などの宿主因子を介してウイルス非構造蛋白質がウイルス複製複合体を形成することを我々は明らかにしてきている。

キャプシド蛋白質であるHCVコア蛋白質を発現するトランスジェニックマウスが線維化以外ヒト患者と同じ経過を辿り、脂肪肝発症、肝発癌およびインスリン抵抗性を示し、HCV病態モデルとして期待されている。コア蛋白質による病原性発現にはPA28 γ の発現が要求されることを、我々は明らかにしてきた(J. Virol., 2007, 81:1727, PNAS, 2007, 104:1661)。最近の報告では、プロテアソーム活性化因子PA28 γ を介したユビキチン非依存プロテアソーム活性によって、細胞内基質 (p21, SRC-3, p16など) は分解されることが示唆され

ている。しかしながら、PA28 γ によるユビキチン非依存プロテアソーム系がC型肝炎ウイルス増殖に関わっているのか明らかになっていない。また、ウイルス感染がユビキチン非依存プロテアソーム系にどのように影響するか明らかになっていない。また、他のウイルス感染系とそのプロテアソーム系の関連性は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、C型肝炎ウイルス感染とユビキチン非依存プロテアソーム活性との関連性を明らかにし、蛋白質分解機構を標的にした新規予防治療法開発の基盤確立を目指す。また、シグナルペプチドペプチダーゼを含めた宿主蛋白質分解機構の他ウイルス感染性への影響も検討する。

3. 研究の方法

(1) 標的遺伝子のノックダウン

pSilencer2.1U6 hygrolにPA28 γ 遺伝子に対するshRNAを組み込んで高感受性細胞Huh70K1へ導入し、PA28 γ 遺伝子ノックダウン細胞をハイグロマイシン存在下で樹立する。PA28 γ 遺伝子を標的にした設計済みAmbion社製siRNAを高感受性細胞Huh70K1に導入し、PA28 γ ノックダウンを試みる。

(2) ウイルス量の測定

HCV感染株JFH1ウイルスを、それら樹立細胞に感染させる。各時間に細胞内および細胞外のコア蛋白質およびウイルスRNA量はオーソELISAキットおよびIRESを標的にしたreal time RT-qPCRにてそれぞれ測定する。

(3) 蛋白質の解析

培養細胞にプラスミドおよびsiRNAをリポフェクションし、24から96時間経過後、細胞を溶解し、特異抗体によりウイルス蛋白質および宿主蛋白質をウエスタンブロットング法により検出した。

(4) 細胞内局在の解析

細胞をチャンバースライドで培養し、固定および細胞膜透過処理後、特異抗体およびAlexa Fluor標識抗体で染色し、細胞内蛋白質の局在を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

(5) 培養細胞

培養細胞は10%牛胎児血清-DMEM培地で5%CO₂で37°Cで培養した。

(6) コロニーアッセイ

サブゲノムレプリコンRNAをT7ポリメラーゼによってin vitroで合成し、それを培養細胞にエレクトロポレーション法によって導入し、G418存在下で培養し、三週間後にコロニー数を計測した。

4. 研究成果

C型肝炎ウイルス感染とユビキチン非依存プロテアソーム活性との関連性を明らかにし、蛋白質分解機構を標的にした新規予防治療法開発の基盤確立を目指すことである。PA28 γ に依存してユビキチン非依存プロテアソームで分解される内在性基質は p21、p53やSRC-3などが知られているが、少なくともHCV感染に感受性である肝臓細胞では、PA28 γ のノックダウンによって変化は認められなかった。PA28 γ ノックダウン細胞にHCVを感染させたとき、培養上清中のウイルス量は1/10以下に減少し、その減少はPA28 γ の発現回復によって、ウイルス量も回復した。プロテアソーム活性化に関与するPA28 γ 内のアミノ酸残基に変異を入れたPA28 γ 変異体の強制発現によって、PA28 γ ノックダウンによって減少したウイルス量は回復しないことから、プロテアソーム活性化能によってウイルス産生が維持されているものと思われた。また、日本脳炎ウイルス感染は、PA28 γ ノックダウンに影響されず、ウイルス産生量に変化が認められなかった。プロテアソーム活性

化能によってウイルス産生が維持されているものと思われた。PA28 γ に相互作用する分子を単離したところユビキチン化酵素E3が含まれており、宿主細胞内の遺伝子発現に寄与していることが示唆された。また、CC14刺激時、コア蛋白質の発現によって、マウス肝臓内でDNA修復能は低下し、細胞増殖能は維持されていた。一方、PA28 γ をノックアウトするとコア蛋白質発現非発現に関わらずマウス肝臓内で細胞増殖能とDNA修復能は低下したことから、PA28 γ の機能はHCVコア蛋白質による肝癌発症機構に関与することが示唆された。

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11件)

1. Moriishi K, Matsuura Y:
Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 3: 54, 2012, 査読有
2. Kondo M, Moriishi K, Wada H, Murabashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, Nagano H:
Upregulation of nuclear PA28gamma expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 3: 379-385, 2012, 査読有
3. Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, Matsuura Y: CD44 participates in the IP-10 induction in cells replicating HCV RNA through an interaction with TLR2 and hyaluronan. *J. Virol.*, in press: 2012, 査読有
4. Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T,

- Tatsumi M, Moriishi K, Matsuura Y: Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One*, 6: e15967, 2011, 査読有
5. Wakita T, Suzuki T, Evans MJ, Shimotohno K, Chayama K, Matsuura Y, Hijikata M, Moriishi K, Seya T, Enomoto N, Koike K, Kato N, Kanto T, Hotta H: Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17th international meeting on hepatitis C virus and related viruses. *Gastroenterology*, 141: e1-5, 2011, 査読有
 6. Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, Matsuura Y: Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.*, 85: 13185-13194, 2011, 査読有
 7. Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, Matsuura Y: Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. *Virology*, 412: 211-219, 2011, 査読有
 8. Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K: Network based analysis of hepatitis C virus core and NS4B protein interactions. *Mol. Biosyst.*, 6: 2539-2553, 2010, 査読有
 9. Tanaka Y, Mori Y, Tani H, Abe T, Moriishi K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Suzuki T, Tatsumi M, Matsuura Y: Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol. Immunol.*, 54: 206-220, 2010, 査読有
 10. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y: Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 52: 411-420, 2010, 査読有
 11. Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, Mizuochi T: Peripheral B cells may serve as a reservoir for persistent hepatitis C virus infection. *J. Innate Immun.*, 2: 607-617, 2010, 査読有
 12. Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y: Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J. Virol.*, 83: 10427-10436, 2009, 査読有
 13. Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T: Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: a ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent mechanism. *J. Virol.*, 83: 2389-2392, 2009, 査読有
 14. Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara

- T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y: Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J. Virol.*, 83: 7959-7969, 2009, 査読有
15. Abe T, Kaname Y, Wen X, Tani H, Moriishi K, Uematsu S, Takeuchi O, Ishii KJ, Kawai T, Akira S, Matsuura Y: Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner. *J. Virol.*, 83: 7629-7640, 2009, 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. Kawakami, K., Kasai, H., Yamashita, A., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., and, Moriishi K. Regulation of HCV replication by FKBP8-dependent or -independent Hsp90 activity. 第 34 回日本分子生物学会総会 2011 年 12 月 13 日～16 日、横浜
2. Kawakami, K., Kasai, H., Yamashita, A., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., and, Moriishi K. Regulation of HCV replication by FKBP8-dependent or -independent Hsp90 activity.. 18th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 8-12, 2011 Seattle. USA..
3. Kambara H., Tani H., Mori Y., Abe T., Katoh H., Fukuhara T., Taguwa S., Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. September 11-16, 2011 Sapporo. Japan.
4. Fujimoto Y., Yamashita A., and Moriishi K. Inhibitory effect of marine natural products on the replication of hepatitis C virus., September 11-16, 2011 Sapporo. Japan.
5. Yamashita A., Fujimoto Y., and Moriishi K. Marine natural products as a source of the novel antiviral agent targeting to HCV NS3 helicase XV International Congress of Virology., September 11-16, 2011 Sapporo. Japan.
6. Moriishi K, Shoji I., Mori Y., Suzuki R., Suzuki T., Kataoka C., Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. . 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
7. Taguwa S., Kambara H., Fujita N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K, Matsuura Y. HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
8. Kambara H., Taguwa S., Fujia N., Noda T., Yoshimori T., Moriishi K, Matsuura Y. Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, September 10-14, 2010 Yokohama. Japan.
9. 加藤大志、森嘉生、寒原裕登、要祐喜、谷英樹、阿部隆之、神谷亘、森石恆司、松浦善治、核小体蛋白質 B23 は C 型肝炎ウイルス複製を抑制する第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日、徳島
10. 寒原裕登、田鍬修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治、C 型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日、徳島
11. 森石恆司、松浦善治、HCV による脂質代謝障害の分子機序、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7-9 日、徳島
12. Wen X, Abe T, Taguwa S, Mori Y, Moriishi K, Matsuura Y. Suppression of HCV Replication in Hepatocytes through a Selective Induction of IRF7. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France.
13. Abe T, Kaname Y, Moriishi K, Kanto T, Hayashi N, Matsuura Y. Hyaluronan Participates in the IP-10 Induction in Cells Infected with HCV through an Engagement of TLR2 and CD44. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7,

2009, Nice, France.

14. Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, Matsuura Y, Involvement of PA28gamma and E6AP in the Degradation of HCV Core Protein and the Viral Production. 16th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, October 3-7, 2009, Nice, France.
15. 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治、HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
16. 阿部隆之、要祐喜、森石恆司、考藤達哉、林紀夫、松浦善治、ヒアルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生と C 型肝炎の慢性化、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森石 恆司 (MORIISHI KOHJI)

山梨大学・大学院医学工学研究部・教授

研究者番号：90260273

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし