

## 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15日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009年度～ 2011年度

課題番号：21590867

研究課題名（和文） C型肝炎ウイルス複製複合体に含まれる蛋白の同定とウイルス複製における役割の解析

研究課題名（英文） Identification of molecular chaperones as regulators for HCV RNA replication through proteomics approaches

研究代表者

相崎 英樹 (AIZAKI HIDEKI)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究者番号：00333360

研究成果の概要（和文）：プロテオミクス技術を利用して HCV の複製複合体（RC）を構成する宿主因子を同定し、その機能解析を行った。レプリコン細胞を対数増殖期と非増殖期からそれぞれ回収し、HCV RC を含む膜分画を粗精製し質量分析法によって HCV RC 分画に含まれる宿主因子を同定し、その中には CCT5 が含まれていた。免疫沈降法により CCT5 が HCV NS5B と結合し、CCT5 siRNA によって HCV RNA 複製が低下するなどを見出した。CCT5 が NS5B との結合を介して HCV RC へ取り込まれ RNA 複製調節に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To identify the host factors implicated in the regulation of hepatitis C virus (HCV) genome replication, we performed comparative proteome analyses of HCV replication complex (RC)-rich membrane fractions prepared from cells harboring genome-length bicistronic HCV RNA at the exponential and stationary growth phases. We found that CCT plays a role in the replication possibly through an interaction between subunit CCT5 and the viral RNA polymerase NS5B. siRNA-mediated knockdown of CCT5 suppressed RNA replication. These suggest that recruitment of the chaperonin by the viral nonstructural proteins to the RC, which potentially facilitate folding of the RC component(s) into the mature active form, may be important for efficient replication of the HCV genome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	0	1,400,000
2010年度	1,200,000	30,000	1,230,000
2011年度	900,000	30,000	930,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	60,000	3,560,000

研究分野：7202

科研費の分科・細目：19590799・5001

キーワード：ウイルス、感染症、癌、内科、プロテオーム

#### 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム複製を担う複製複合体 (RC) は HCV 非構造蛋白質と宿主因子から構成されると考えられるが、HCV 複製調節に関わる宿主因子は十分に明らかにされていない。

#### 2. 研究の目的

本研究では、プロテオミクス技術を利用して HCV RC を構成する宿主因子を同定し、その機能解析を行った。

#### 3. 研究の方法

Membrane flotation assay により HCV RC を含む膜分画を粗精製し、二次元蛍光ディフュージョンゲル電気泳動と質量分析法によって HCV RC 分画に含まれる宿主因子を同定し、siRNA、薬物処理等の方法でその機能解析を行った。

#### 4. 研究成果

二次元電気泳動にて約 1300 蛋白が検出され、45 蛋白 (3.5%) が、高 HCV 複製期に 1.5 倍以上増加していた。その中には二種類の分子シャペロン T-complex polypeptide 1 ring complex subunit  $\epsilon$  (CCT5) 及び Heat shock cognate protein 70 が含まれていた。ウエスタンブロット解析から、両蛋白は細胞の増殖相によって発現レベルに差は認められないものの、高 HCV 複製細胞の膜分画で明らかな量的増加を確認した。また、エピトープタグ免疫沈降法により、CCT5 が HCV NS5B 蛋白と特異的に結合することを見出した。さらに、CCT5 siRNA によって HCV RNA 複製レベルが低下すること、また薬剤処理によって T-complex polypeptide 1 ring complex を細胞内で誘導したところ HCV 複製が亢進することを見出した。CCT5 を含む T-complex polypeptide 1 ring complex は、本来細胞質でシャペロンとして作用し、蛋白質の機能的な立体構造形成に寄与する。今回同定された分子シャペロンが NS5B 蛋白との結合を介して HCV RC へ取り込まれ RNA 複製調節に関与する可能性が示唆された。

#### 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 10 件)

- 1) Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol.* 50:1943-9, 2012.
- 2) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. *PLoS Pathogen* 8:e1002561, 2012.
- 3) Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, The structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus, *J Gen. Virol.* 2011;92:2082-1.
- 4) Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407:135-40.
- 5) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology.* 2011;410:38-47.
- 6) Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res.* 2010;85:520-524.
- 7) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki

- N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol.* 2010;84:5824-5835.
- 8) Liu HM, Aizaki H, Choi KS, Machida K, Ou JJ, Lai MM. SYNCRIP (synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) is a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 2009;386:249-256
- 9) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 2009;50:378-386.
- 10) Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol.* 2009;47:4141-4143.
- [学会発表] (計 34 件)
- 1) Aizaki H, Matsumoto Y, Goto K, Watashi K, Suzuki R, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Motojima K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 2) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Identification and functional analysis of small molecules inhibiting the late step of hepatitis C virus life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 3) Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Sekizuka T, Kuroda M, Wakita T. Discovery of full-length HCV genome quasispecies by deep sequencing. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 4) Goto K, Kimura T, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Miyamura T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 5) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 6) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita T, Aizaki H. Signal peptidase complex 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with NS2. 18<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. WA, USA 2011.
- 7) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus. International meeting of molecular biology of hepatitis B virus, Florida, USA 2011.
- 8) Suzuki R, Suzuki T, Saito K, Matsuda M, Watashi K, Matsuura Y, Wakita K, Aizaki H. Identification of host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. 2011.
- 9) 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、井本正哉、脇田隆宇、小嶋聡一、HCV NS3 Protease Mimics TGF- $\beta$ 2 and Activates TGF- $\beta$  Signals via Type I Receptor. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011.
- 10) 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲朗、渡邊則幸、相崎英樹、高谷大輔、松本武久、

- 井本正哉、脇田隆宇、小嶋聡一、C型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼによるTGF- $\beta$  I型受容体を介したTGF- $\beta$  シグナルの活性化. 第25回肝臓洞壁細胞研究会、東京、2011.
- 11) 相崎英樹、C型肝炎ウイルス研究の進歩と展望、第58回日本感染症学会総会・学術講演会・教育講演、東京、2011.
- 12) 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆宇、HCV感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
- 13) 相崎英樹、多田有希、松本善弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆宇、1999年から2009年における日本のC型急性肝炎の発生状況、第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
- 14) 加藤考宣、村上麻子、政木隆博、相崎英樹、国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルスパネル検体の作製とウイルス量測定法の評価、第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
- 15) 松浦知和、丸島秀樹、前橋はるか、大川清、松本善弘、永妻啓介、田中賢、高木一郎、石井雄二、斎藤勝也、政木隆博、相崎英樹、ヒト肝細胞癌細胞の3次元培養系は“肝癌モデル”なのか、“肝臓モデル”なのか？-glucose 代謝からの検討-、第47回日本肝臓学会総会・シンポジウム、東京、2011.
- 16) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 17<sup>th</sup> International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.
- 17) Saito K, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M, Inhibition of cellular squalene synthase impairs hepatitis C virus proliferation in cultured cells, 17<sup>th</sup> International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Yokohama, 2010.
- 18) 相崎英樹、HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析、第46回日本肝臓学会総会、山形、2010.
- 19) 相崎英樹、HCV 粒子形成と脂質の役割、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 20) 渡辺則幸、村山麻子、Saeed Mohsan、伊達朋子、加藤孝宣、相崎英樹、脇田隆宇、HCV エンベロープタンパク質に付加されるN型糖鎖の機能解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 21) 安東友美、今村博臣、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス複製複合体におけるATP制御の可視化と機能解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 22) 山本真民、相崎英樹、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス粒子感染における粒子表面のコレステロールの役割、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 23) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T, Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells, 第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 24) 鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇、鈴木哲朗、分割ユビキチン法を利用したHCVNS2と結合する宿主因子の探索およびウイルス粒子形成への関与、第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 25) 斎藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆宇、西島正弘、深澤征義、Squalene synthase 阻害剤のC型肝炎ウイルス増殖阻害機構の解析、第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 26) Aizaki H, Yamamoto M, Goto K, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production. 16<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France 2009.
- 27) Yamamoto M, Aizaki H, Goto K, Hamano K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Structural requirement of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity. 16<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France 2009.
- 28) Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Wakita T, Suzuki T: HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines. 16<sup>th</sup> International Symposium on

Hepatitis C Virus & Related Viruses,  
Nice, France, 2009.

- 29) 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV 粒子形成に關与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
- 30) 山本真民、相崎英樹、宮村達男、濱野国勝、脇田隆宇、鈴木哲朗：C型肝炎ウイルス粒子形成、感染性に重要なコレステロール構造の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
- 31) 渡邊則幸、相崎英樹、松浦知和、脇田隆宇、鈴木哲朗：C型肝炎ウイルス subgenomic replicon RNAを複製するヒト肝星細胞株の樹立。第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.
- 32) 相崎英樹、山本真民、後藤耕司、原弘道、森川賢一、谷英樹、松浦善治、斎藤恭子、深澤征義、花田賢太郎、西島正弘、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルス粒子の脂質成分の感染における役割、第16回肝細胞研究会、山形、2009.
- 33) 相崎英樹、脇田隆宇、感染性 HCV 粒子形成における宿主生体膜の役割、第 4 5 回日本肝臓学会総会、シンポジウム、神戸、2009.
- 34) 相崎英樹、生体膜脂質の C 型肝炎ウイルス生活環における役割、第 31 回日本膜学会、シンポジウム、東京、2009.

〔図書〕(計 6 件)

- 1) 田中純子、小山富子、相崎英樹. C 型肝炎ウイルス(HCV)による感染. 日本臨床ウイルス学会、臨床とウイルス、40:28-35, 2012.
- 2) 相崎英樹、脇田隆宇、HCV感染における脂質代謝の変化とメタボロミクス解析、肝胆臓、東京、2011:948-953.
- 3) 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博、C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成、日本ウイルス学会、雑誌ウイルス、東京、2011:60:87-92.
- 4) 相崎英樹、HCVの生活環における脂質の役割、日本臨床、東京、2011:999:59-63.
- 5) 相崎英樹、コレステロールとスフィンゴ脂質のC型肝炎ウイルス生活環における役割、ミノファージェン製薬、Minophagen medical review、東京、2010:1-10.
- 6) 相崎英樹：生体膜脂質のC型肝炎ウイルス生活環における役割、日本膜学会誌、膜 2009;34: 259-265.

〔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

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-vir2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相崎 英樹 (AIZAKI HIDEKI)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長  
研究者番号：00333360

(2) 研究分担者

鈴木 哲朗 (SUZUKI TETUROU)

浜松医科大学・感染症講座・教授  
研究者番号：00250184

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：