

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790443
 研究課題名(和文) 可視化型シュードタイプC型肝炎ウイルスの作製とその細胞侵入機構の解明
 研究課題名(英文) Entry mechanisms of visualized pseudotype virus bearing the envelope proteins of hepatitis C virus.
 研究代表者
 谷 英樹 (TANI HIDEKI)
 大阪大学・微生物病研究所・特任助教
 研究者番号：20397706

研究成果の概要 (和文)：

C型肝炎ウイルス(HCV)の細胞侵入機構の解析は、ウイルスが宿主細胞に影響を及ぼす最初の段階としてHCVの生活環を理解する上で重要な課題である。HCVの細胞侵入機構の解析にはこれまでシュードタイプウイルスや細胞馴化ウイルスを用いて、HCV受容体候補の探索やその相互作用の解析が行われてきた。今回、新たな視点で細胞侵入機構を解析するために、シュードタイプウイルスの蛍光標識モデルの作製を試みた。またこのウイルスが細胞に感染する際に関与する分子を探索した結果、上皮成長因子受容体(EGFR)がレセプター直下で作用している可能性が示唆された。またその下流で作用出来るフォスホリパーゼCや更に下流に位置するプロテインキナーゼCも関与しており、これらがHCVの感染により活性化されることで最終的にアクチンの脱重合が起こり、HCV受容体群が集合してくるのではないかと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

The receptors of HCV have been characterized, yet the entry pathways of the HCV into target cells are incompletely defined. As a surrogate virus system, pseudotype viruses transiently bearing HCV envelope proteins based on the vesicular stomatitis virus (VSV) and retrovirus or cell cultured HCV (HCVcc) have been developed. Here, we have tried to develop a fluorescence-labeled pseudotype VSV or recombinant VSV for a visualized investigation of the entry mechanisms. Furthermore, to characterize the mechanisms by which HCV infection activates downstream signaling pathways, we utilized a pseudotype vesicular stomatitis virus possessing HCV envelope proteins (HCVpv) and JFH-1 virus in combination with pharmacological inhibitors. We reported that HCV utilizes the phospholipase C (PLC) / protein kinase C (PKC)-dependent signaling for the entry. Inhibition of actin rearrangement by actin-depolymerizing reagents markedly diminishes HCVpv infection. Overall, these results indicate that the activation of PLC and PKC-dependent pathway is required for the entry of HCV and is involved in setting the actin rearrangement for the endocytosis of the virus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：分子

1. 研究開始当初の背景

HCV は肝細胞癌の主要な原因ウイルスであり、HCV のスクリーニング方法の確立により現代では新たな感染者は激減した。しかしながら、本邦には未だ 150 万人以上の HCV 感染者が存在し、毎年二万数千人が HCV 感染に起因する肝癌で死亡しており、社会的にも大きな問題となっている。インターフェロンとリバビリンの併用療法が導入され、C 型慢性肝炎の著効率は 50% 程度にまで改善されたが、より効果的な治療法の開発が急務である。C 型肝炎の征圧には、まず HCV の生活環をより正確に理解する必要がある。宿主細胞への吸着、侵入、ゲノム複製、粒子形成、そして出芽といった一連の感染機構の解析は、それぞれのステップをターゲットとした治療薬の開発にも必須である。しかしながら、現在まで患者血清から直接 HCV を分離できる細胞培養系は存在しないため、HCV のゲノム複製を解析可能なレプリコン細胞や細胞への侵入プロセスを解析可能なシュードタイプウイルス(HCVpp, HCVpv)が開発されてきた。最近、ようやく限定されたクローンではあるものの、HCV の増殖を解析できる培養細胞に馴化した HCV (HCVcc)が構築されたことで、HCV の生活環に関する多くの知見が得られるようになってきている (Wakita et al., Nat Med. 2005)。

HCV の細胞侵入機構に関しては、主に HCVpp, HCVcc を用いたアッセイ系が開発されてからより簡便に解析できるようになり、細胞への結合必須分子としてヒト CD81 が (Bartosh et al., J Biol. Chem. 2003)、また結合増強因子としてヘパリンやヘパラン硫酸といった硫酸多糖類 (Barth et al., J Virol. 2006) やスカベンジャーレセプタークラス B タイプ I (Voisset et al., J Biol. Chem. 2005) などの関与が報告されてきた。最近、侵入に必要な分子として細胞のタイトジャンクション形成に作用する Claudin ファミリーの存在が明らかとなり (Evans et al., Nature 2007, Zheng et al., J Virol. 2007)、現在これらの受容体候補分子間の相互作用および受容体分子の HCV 感染における詳細な役割についての解明が求められている。

申請者は、これまでに水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用いたシュードタイプウイルスシステムを利用して、感染性を持った HCV のシュードタイプウイルス (HCVpv) および組換えウイルス (HCVrv) を作製し、これらのウイルスを用いてこれまでに新規 HCV 受容体分子の探索や、受容体候補分子のヒト CD81 や Claudin-1 の関与について解析を行ってきた (Matsuura et al., Virology 2001, Tani et al., J Virol. 2007)。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでに開発してきた HCVpv および HCVrv を改良し、リアルタイムでウイルスの細胞侵入を解析できるように蛍光標識担体を持った HCVpv および HCVrv の作製を試みる。蛍光標識された可視化型 HCVpv および HCVrv が作製できたら、これらのウイルスを用いてヒト CD81 や Claudin-1 などこれまでに報告されてきた HCV 受容体候補分子との相互作用をリアルタイムイメージング技術を用いて時間的・空間的な解析を行う。実際にウイルスが受容体に結合し、細胞内に侵入するまでにどれくらいの時間を必要とするのか、その際にどの受容体分子と細胞のこういった場所でどのように取り込まれるのか、など HCV と受容体との関係性をより詳細に明らかにする。

3. 研究の方法

蛍光標識ウイルスを作製するにあたり、蛍光標識担体としてシステインタグシステムを利用する。システインタグとは Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys の配列を持ったペプチド配列であり、この配列に結合するとフルオレセインと同様の蛍光を発する Flash という蛍光色素を反応させることで蛋白質を蛍光標識できるようになる。このタグシステムは緑色蛍光蛋白質 (GFP) タグなどに比べポストラベルする必要があるが、6 アミノ酸の挿入だけで作製可能なために 240 近いアミノ酸の GFP に比べ蛋白質の構造や機能に影響を与える可能性が少ない。このシステインタグシステムはウイルス学の分野においても、既にいくつかのウイルスにおいて作製されており、視覚的・時空間的な解析が行われている (Panchal et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2003, Sakai et al., J Virol. 2006, Turville et al., Nat Methods. 2008)。今回、これを HCV エンベロープ蛋白質 (E1 or E2) もしくは VSV のゲノムに挿入し標識したウイルスを作製する。

HCVpv シュードタイプウイルスでちゃんと蛍光標識されたウイルスが作製できているか、実際に細胞へ感染させて経時的に共焦点蛍光顕微鏡で確認する。HCVpv で作製可能なことが確認できたら、同様に HCVrv についても作製を検討する。また、HCV のシュードタイプウイルスで蛍光標識システムがうまく評価できない時のために、コントロールとして HCV エンベロープ蛋白質より効率良く VSV に取り込まれ、高い感染性を示すバキュロウイルスのエンベロープ蛋白質 gp64 を被った蛍光標識シュードタイプウイルスも作製し、このタグシステムがちゃんと機能していることを確認する。効率良く蛍光標識されているウイルスが得られたら、これらの蛍光標識ウイルスを用いて、ヒト CD81、Claudin-1 他、受容体候補分子との局在部位、経時的な相互作用の変化などをタイムラプスイメー

ジングにより検討する。

4. 研究成果

HCV のエンベロープ E2 にシステインタグを組み込んだコンストラクトを作製し、シュードタイプウイルスの作製を試みたが、感染性を持つウイルスを得ることが出来なかった。これは E2 にシステインを付加したことによるエンベロープ複合体の構造変化が原因と考えられる。そのため、次に VSV のゲノムにシステインタグの配列を組み込んだ VSV を用いて、シュードタイプウイルスを作製した。このウイルスは、システインタグを付加してもこれまで通り問題なくウイルスは複製でき、感染性のウイルスを得ることができた。また、このシュードタイプウイルスとは別にこのシステインタグの配列が組み込まれた VSV のゲノムに HCV のエンベロープ遺伝子を組み込んだシステインタグ付加 HCV 組換えウイルスの作製にも取り組んだ。その他、コントロールとして用いるバキュロウイルスエンベロープ gp64 を被ったシュードタイプウイルスの作製にも取り組み、このウイルスでは HCV のシュードタイプウイルスに比べて効率良くウイルスの産生が認められている。感染性が保持されていることを確認できたので、Flash 試薬による蛍光ラベル化を施し、細胞への感染の可視化を試みた。様々な方法を駆使して改善を試みたが、バックグラウンドである VSV そのものの細胞への結合を抑えることが難しく HCV のシュードタイプウイルス特異的な細胞侵入を解析するには至らなかった。そこで、このシュードタイプウイルスを引き続き用いて、細胞侵入に関与するシグナル伝達分子の探索を試みた。HCV 特異的な細胞侵入を観察するために、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ VSV ゲノムを用いて、HCV のシュードタイプウイルスを作製し、このウイルスが細胞に感染する際に関与する分子を探索した結果、上皮成長因子受容体(EGFR)がレセプター直下で作用している可能性が示唆された。またその下流で作用出来るフォスホリパーゼCや更に下流に位置するプロテインキナーゼCも関与しており、これらが HCV の感染により活性化されることで最終的にアクチンの脱重合が起こり、HCV 受容体群が集合してくるのではないかと考えられた。ウイルス感染による一連のレセプターの局在変化などは可視化により確認できており、今後ウイルスの直接的な可視化が望まれる。

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 4 件)

- ① Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Hiroshi Kukihara, Shuhei Taguwa, Yoshio Mori, Hideki Tani, Nobuyuki Kato, Suzuki Tetsuro, Masashi Tatsumi, Kohji Moriishi, Yoshiharu Matsuura. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. PLoS ONE. (2011). 6(1): e15967. 査読有
- ② Yuuki Kaname, Hideki Tani, Chikako Kataoka, Mai Shiokawa, Shuhei Taguwa, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, Taroh Kinoshita, and Yoshiharu Matsuura. Acquisition of complement resistance through incorporation of CD55/DAF into viral particles bearing baculovirus GP64. Journal of Virology. (2010). 84: 3210-3219. 査読有
- ③ Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, Hirotsu Kojima, Tetsuo Nagano, Takayoshi Okabe, Tetsuro Suzuki, Masashi Tatsumi, and Yoshiharu Matsuura. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. Microbiology and Immunology. (2010). 54: 206-220. 査読有
- ④ Shenwei Li, Eiichi N Kodama, Yuuki Inoue, Hideki Tani, Yoshiharu Matsuura, Jing Zhang, Takashi Tanaka, and Toshio Hattori. Procyanidin B1 purified from Cinnamomi cortex suppresses hepatitis C virus replication. Antiviral Chemistry & Chemotherapy. (2010). 20: 239-248. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治 C型肝炎ウイルスの細胞侵入におけるフォスホリパーゼCおよびプロテインキナーゼC依存的なシグナル伝達経路の関与
第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日～9日
- ② Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. Involvement of phospholipase C and protein kinase C-dependent signaling pathways in the entry of HCV.
17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Japan, 2010.9.10-14
- ③ Takasuke Fukuhara, Hideki Tani, Mai Shiokawa, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, Akinobu Taketomi, Yoshihiko Maehara, Yoshiharu Matsuura.

Intracellular delivery of serum-derived HCV.

17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Japan, 2010.9.10-14

④ Hideki Tani, Mai Shiokawa, Yuuki Kaname, Hiroto Kambara, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura.

Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus.

9th International Symposium on positive-strand RNA viruses. USA, 2010.5.17~23

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 英樹 (TANI HIDEKI)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：20397706