

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25年 8月23日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590285

研究課題名（和文） C型肝炎ウイルスによるB細胞蛋白質チロシンリン酸化への影響

研究課題名（英文） Influence on protein-tyrosine phosphorylation by hepatitis C virus in B cells

研究代表者

定 清直 (KIYONAO SADA)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10273765

研究成果の概要（和文）：

B細胞におけるC型肝炎ウイルス(HCV)による病源性発現機構として、ウイルス蛋白質のチロシンリン酸化に着目、NS5A蛋白質がB細胞で癌や免疫系のシグナル伝達を調節するチロシンキナーゼ Fyn に会合し活性化することを見出した。B細胞の機能障害や免疫監視機構への影響が示唆された。またプロテオーム解析にて、HCVの複製が血糖コントロールやAMP依存性プロテインキナーゼにより調節されていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We have focused on tyrosine phosphorylation of viral proteins as the pathogenesis of Hepatitis C virus (HCV) in B cells, and identified that HCV-NS5A protein associates with and activates protein-tyrosine kinase Fyn which regulates the tumor and immune signal transduction in B cells. This suggests that HCV infection may affect the dysfunction of B cells and immunological surveillance. In addition, we found the blood glucose concentration and AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates HCV replication through the proteome analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 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・病態医化学

キーワード：分子病態学

1. 研究開始当初の背景

(1) C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓に慢性の炎症を起こし、高率に肝細胞癌を引き起こすことが知られている。また、B細胞にも感染し、リンパ腫(non-Hodgkin's lymphoma)を引き起こすと考えられているが、その分子メカニ

ズムは不明である。HCVの蛋白質はウイルスゲノムの複製や粒子形成のみならず、感染した組織における病理作用にも関与していることが知られているが、B細胞におけるHCVの病原性はまだまだあまりよくわかっていない。
(2) Syk (Spleen Tyrosine Kinase)は脾臓から単

離された非受容体型チロシンキナーゼで、免疫受容体の凝集やサイトカイン刺激、細胞接着、ストレスに応じて活性化し、B細胞の分化と増殖に不可欠の分子である。さらに乳がんやメラノーマの研究から、癌抑制作用を有する事が明らかとなっている。最近では、新しく開発された Syk 阻害剤が関節リウマチの治療に対し有効であることが注目されている。

2. 研究の目的

- (1) HCV 感染により発現するウイルス蛋白質、特に非構造タンパク質 NS5A が B 細胞の活性化シグナル伝達にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにする。
- (2) Syk が HCV の感染や複製にどのような影響を及ぼしているのかを解析し、HCV による B リンパ腫発症機構について解析を行う。

3. 研究の方法

- (1) HCV 蛋白質を発現するヒト B 細胞の実験系を確立する
- (2) HCV 蛋白質発現による B 細胞の分化と増殖に不可欠であるチロシンリン酸化反応への影響を解析する。HCV 蛋白質と B 細胞シグナル伝達分子の相互作用について、特にチロシンキナーゼ Syk について解析する。
- (3) HCV 感染のプロテオーム解析を行う。
- (4) プロテオーム解析の結果をもとに、HCV の複製機構の分子メカニズムの解析を行う。

4. 研究成果

- (1) ヒト B 細胞を用いて HCV 蛋白質の発現系を構築し、細胞内シグナル伝達機構、特に蛋白質チロシンリン酸化反応への影響を網羅的に解析する目的で、HCV の非構造タンパク質の一つである NS5A を安定発現させた細胞株を樹立した。
- (2) B 細胞をチロシンホスファターゼの阻害剤 pervanadate (PV) 処理すると、NS5A はチロシンリン酸化される (図 1)。特異的なアミノ酸配列中にあるリン酸化チロシンを認識する Src homology 2 (SH2) 領域と GST との融合蛋白質を用いて、結合蛋白質の探索実験を行った。その結果 Fyn の SH2 領域が PV 処理された B 細胞 NS5A に特異的に結合する事が明らかとなった (図 2)。

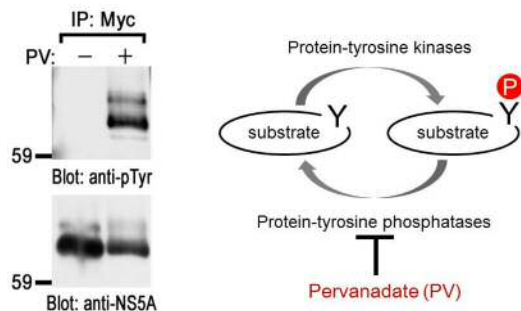


図 1. 免疫沈降法により B 細胞を PV 処理することによる NS5A のチロシンリン酸化が明らかとなった (左)。PV はチロシンホスファターゼの阻害薬であり、結果として細胞内蛋白質チロシンリン酸化を増強する (右)。

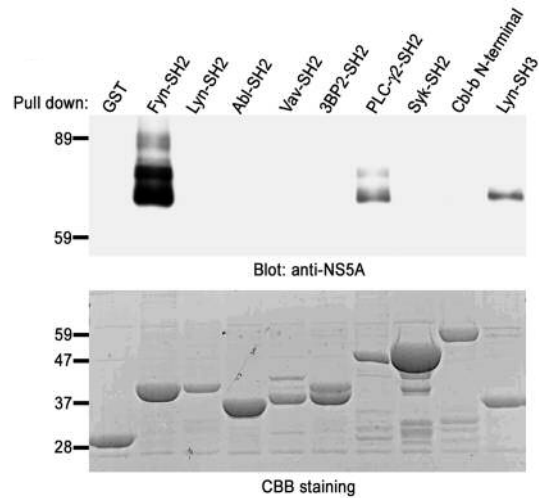


図 2. NS5A に会合するシグナル伝達分子の同定。B 細胞において PV 処理によりチロシンリン酸化された NS5A に、チロシンキナーゼ Fyn の SH2 ドメインが特異的に会合することを GST 融合蛋白質を用いたプルダウン実験により見出した (Nakashima *et al.* PLoS One 2012)。

Fyn の SH2 領域内でリン酸化チロシンと会合すると 176 番目のアルギニンをリジンに置換すると NS5A との会合は消失した。また様々な欠失・置換変異体を用いて調べた結果、NS5A のアミノ末端側は両者の会合には寄与しないこと、さらに NS5A の 334 番目のチロシン残基がリン酸化部位であることがそれぞれ明らかとなった (図 3)。

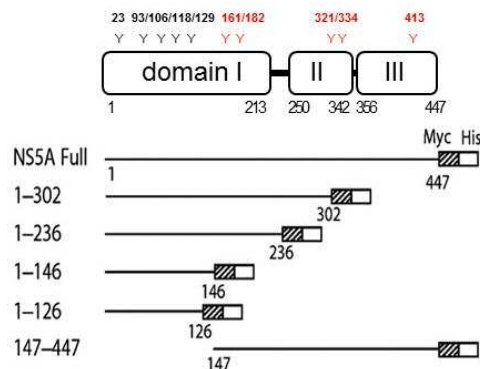


図 3. 本研究に用いられた NS5A の変異体。これらを用いて Fyn の SH2 ドメインとの会合部位の検索を行った。NS5A のチロシン 334 はドメイン II に位置する。

Far-western 法やシヨ糖密度勾配遠心法により、両者は直接会合し、脂質ラフトにて共局在していることが見出された。両者の共局在は叡

光顕微鏡を用いた観察でも確認された。これらの結果は NS5A がチロシンリン酸化依存性に Fyn の SH2 領域に会合することを示している。さらに、NS5A により Fyn のキナーゼドメインの自己リン酸化部位のリン酸化が亢進していることや、キナーゼとしての酵素活性が上昇していることが明らかとなった (図 4)。

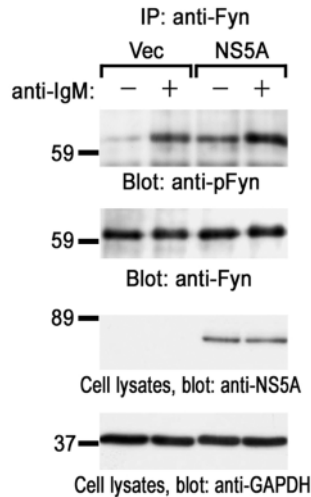


図 4. B 細胞におけるチロシンキナーゼ Fyn の活性化ループチロシンのリン酸化は NS5A により増強されている。in vitro kinase assay でも Fyn のキナーゼ活性の増強が確認された (Nakashima *et al.* PLoS One 2012)。

以上の成果は論文 (Nakashima *et al.* PLoS One 2012) や学会にて発表した。今後、本研究結果を更に発展させるためには、①チロシンリン酸化部位として同定された 334 番目のチロシン残基を置換することで HCV の複製やウイルス粒子賛成、さらには HCV の病原性にどのような影響が及ぼされるか、②一部の HCV 蛋白質のみならず、全長のウイルスゲノム・蛋白質、さらには HCV 感染動物モデルを含むより高度な実験系の構築が必要であると考えられる。動物モデルについては既に予備実験を行っている。

なお、当初念頭においていたチロシンキナーゼ Syk に対する影響の有無を解析したが、当初の予想に反し、影響は認められなかった。これに関連し、チロシンキナーゼ Syk とその阻害薬についての総説の発表と学会発表を行った。また Syk の基質として同定したアダプター蛋白質 3BP2 の B 細胞やマスト細胞における生理的・役割についても治験が得られたためそれぞれ論文・学会発表を行った。

(3) 肝細胞について HCV 感染により発現が変化する蛋白質についてのプロテオーム解析を実施し、HCV の複製に関与すると考えられる分子を網羅的に同定することに成功した。特に細胞内のエネルギーセンサーである

AMPK 活性化に関与する酵素 ATIC の発現に変化を見だし、更なる解析を進めた (図 5)。

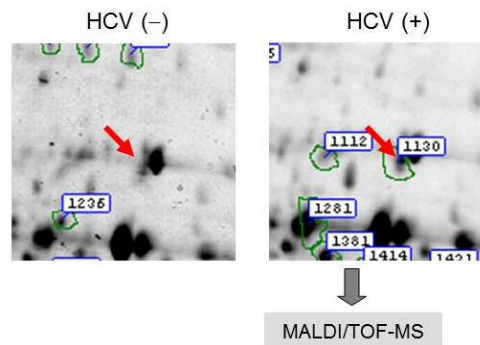


図 5. プロテオーム解析により AMPK 活性化に関与する酵素 AICAR を同定した。矢印は ATIC の位置を示しており、HCV 感染による蛋白質発現レベルの上昇は実際にウエスタンブロット法により確認された。

(4) AMPK は細胞内 AMP 濃度依存的に酵素活性が上昇し、糖新生、脂肪酸合成、コレステロール合成を抑制することが知られている。また AMPK は経口糖尿病治療薬メトホルミンの標的分子である。AMPK の活性化薬と阻害薬を用いた解析により、HCV のウイルスゲノムの複製は、AMPK の活性化により負に調節されていることを見いだした。一方、培養液中のグルコース濃度を高濃度から正常域に下げることや(450mg/dl から 100mg/dl への低下: 血糖値 450 から 100 に相当)、糖尿病治療薬であるメトホルミンの添加により、AMPK 非依存性に HCV の複製が抑制されることも明らかとなった (図 6)。糖尿病治療薬メトホルミンはミトコンドリア Complex 1 の機能を阻害し ATP 産生量を減少させることが知られている。これらのことは糖尿病のコントロールや経口糖尿病薬の投与が HCV 複製を抑制することを示しており、新たな HCV 治療に対する道を開くものと考えられる。以上の成果は論文 (Nakashima *et al.* Microbiol. Immunol. 2011) や学会にて発表した。AMPK は抗 HCV 薬開発の新たなターゲットであると考えられる。

| AMPK Activator | Effect on HCV replication | Additional effect by AMPK inhibitor compound C |
|-----------------|---------------------------|--|
| AICAR | Suppression | Suppression of anti-HCV effect |
| Metformin | Suppression | Enhancement of anti-HCV effect |
| 1.0 g/L glucose | Suppression | Enhancement of anti-HCV effect |

図 6. AMPK 活性化薬/条件 (AICAR、メトホ

ルミン、グルコース濃度低下)はHCV複製を抑制するが、AMPKの特異的阻害薬(compound C)は効果は異なっており、AMPK依存性と非依存性のHCV複製調節メカニズムが存在することが明らかとなった(Nakashima *et al.* *Microriol. Immunol.* 2011)。

なお本研究期間においては、HCVの感染や複製にチロシンリン酸化がどのような影響を及ぼすかについては十分に解析することが出来なかった。前述のように、本研究では単一蛋白質のB細胞における発現系で実験を行ったために、今後はより高度な実験系を用いて更なる解析を行う必要があると考えられる。

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11件)

- ① Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Horiguchi, T., Sun, X., Deng, L., Shoji, I., Hotta, H., and Sada, K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS ONE* 7(10): e46634 (2012). 査読あり. doi: 10.1371/journal.pone.0046634.
- ② 千原一泰, 中島謙治, 竹内健司, 定清直. Spleen tyrosine kinase (Syk)の生理的役割とその阻害薬の作用. *リウマチ科* 47(6):694-699 (2012). 査読なし.
- ③ 定清直. Syk阻害薬. 特集 リウマチ治療薬の新展開. *医薬ジャーナル* 48(6):1531-1534 (2012). 査読なし.
- ④ 定清直. Syk阻害薬-チロシンキナーゼ Sykの基礎と臨床-. 炎症疾患におけるキナーゼ阻害薬の進歩. *医学のあゆみ* 240(7):567-570 (2012). 査読なし.
- ⑤ 中島謙治, 千原一泰, 竹内健司, 定清直. 次世代低分子化合物: Syk阻害薬. 特集 関節リウマチの最新情報-寛解を目指した診断と治療の新展開-. *最新医学* 67(2):101-106 (2012). 査読なし.
- ⑥ Chihara, K., Nakashima, K., Takeuchi, K., and Sada, K. Association of 3BP2 with SHP-1 regulates SHP-1-mediated production of TNF- α in RBL-2H3 cells. *Genes Cells* 16(12):1133-1145 (2011). 査読あり. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01557.x.
- ⑦ Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Hotta, H., and Sada, K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and independent pathways. *Microbiol. Immunol.* 55(11):774-782 (2011). 査読あり. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00382.x.
- ⑧ Ogi, K., Nakashima, K., Chihara, K., Takeuchi, K., Horiguchi, T., Fujieda, S., and Sada, K. Enhancement of B cell receptor signaling by a point mutation of adaptor protein 3BP2 identified in human inherited disease cherubism. *Genes Cells* 16(9): 951-960 (2011). 査読あり. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01539.x.
- ⑨ Horiguchi, T., Ishiguro, N., Chihara, K., Ogi, K., Nakashima, K., Sada, K., and Hori-Tamura, N. Inhibitory effect of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp on IgE-mediated mast cell activation. *J. Agric. Food. Chem.* 59(10):5595-5601 (2011). 査読あり. doi: 10.1021/jf2005707.
- ⑩ 千原一泰, 定清直. 関節リウマチ治療における Syk 阻害薬の可能性を探る. 特集 次世代の低分子量化合物は生物学的製剤を超えることができるか. *分子リウマチ治療* 3(4):186-189 (2010). 査読なし.
- ⑪ 定清直. C型肝炎ウイルスの病原性発現機構. *小児感染免疫* 22(1): 35-41 (2010). 査読なし.

[学会発表] (計19件)

- ① 中島謙治, 竹内健司, 千原一泰, 堀口朋子, 孫雪東, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. C型肝炎ウイルス NS5A蛋白質の Src homology 2/3 ドメイン結合能と B細胞での発現による Src ファミリーキナーゼ Fyn の活性化. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡.
- ② 中島謙治, 竹内健司, 千原一泰, 堀口朋子, 孫雪東, Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. C型肝炎ウイルス NS5Aは B細胞のチロシンキナーゼ Fyn を活性化する. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 2012年11月14日, 大阪.
- ③ 定清直. Syk 標的治療. 第40回日本臨床免疫学会, 2012年9月27日, 東京.
- ④ Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Horiguchi, T., Sun, X., Deng, L., Shoji, I., Hotta, H., and Sada, K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *IUBMB&FEBS*, 2012年9月6日, Sevilla, Spain.
- ⑤ 定清直. Syk 阻害薬. SLE の新規治療, 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2012年4月27日, 東京.
- ⑥ 定清直. C型肝炎ウイルス研究の今日の話. 第2回医学教育アフリカ支援国際セミナー, 2012年3月17日, 福井.

- ⑦ 千原一泰, 中島 謙治, 竹内 健司, 定 清直. Association of 3BP2 with SHP-1 regulates SHP-1-mediated production of TNF- α in RBL-2H3 cells. 第34回日本分子生物学会年会(MBSJ2011), 2011年12月16日, 横浜.
- ⑧ Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Hotta, H., and Sada, K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and independent pathways. IUMS 2011, 2011年9月15日, Sapporo, Japan.
- ⑨ 定 清直. Syk の基礎と臨床 新しい標的分子と疾患制御. 第39回日本臨床免疫学会総会(免疫疾患学会連合 2011), 2011年9月15日, 東京.
- ⑩ 定 清直. 次世代低分子化合物を用いた治療-Syk 阻害薬-, 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会, 講演, 2011年7月19日, 神戸.
- ⑪ 中島謙治, 竹内健司, 千原一泰, 堀田 博, 定 清直. C 型肝炎ウイルス複製におけるエネルギーセンサーAMPK の役割. 日本生化学会北陸支部第29回大会, 2011年5月28日, 金沢.
- ⑫ Sada, K., Nakashima, K., Ogi, K., and Chihara, K. Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates BCR-mediated activation of NFAT. Immunology 2011, 2011年5月15日, San Francisco, USA.
- ⑬ 扇 和弘, 中島謙治, シュクラ ウパサナ, 千原一泰, 藤枝重治, 定 清直. アダプタータンパク質の点突然変異による B 細胞シグナル伝達への影響. BMB2010, 2010年12月8日, 神戸.
- ⑭ 石黒奈穂子, 堀口朋子, 福本菜奈子, 定 清直, 田村(堀) 奈緒子. ハスカップ果実によるマスト細胞の脱顆粒抑制機構の解析. BMB2010, 2010年12月7日, 神戸.
- ⑮ 中島謙治, 竹内健司, 千原一泰, 堀田 博, 定 清直. エネルギーセンサーAMPK の活性化による C 型肝炎ウイルス複製の抑制. BMB2010, 2010年12月7日, 神戸.
- ⑯ 中島謙治, 竹内健司, 千原一泰, 堀田 博, 定 清直. エネルギーセンサーAMPK の活性化による C 型肝炎ウイルス複製の抑制. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010年11月7日, 徳島.
- ⑰ 扇 和弘, 羽溪朋子, 中島謙治, Upasana Shukla, 千原一泰, 藤枝重治, 定 清直. アダプタータンパク質の点突然変異による B 細胞シグナル伝達の増強. 日本生化学会北陸支部第28回大会, 2010年5月29日, 福井.
- ⑱ 定 清直. Syk 阻害剤. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010年4月24

日, 神戸.

- ⑲ 定 清直. C 型肝炎ウイルスの病原性発現機構. 第84回日本感染症学会総会, 2010年4月5日, 京都.

[その他]

ホームページ等

<http://biseibutu.labos.ac/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定 清直 (KIYONAO SADA)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 10273765

(2) 研究分担者

千原 一泰 (CHIHARA KAZUYASU)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号: 00314948

竹内 健司 (TAKEUCHI KENJI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 40236419

(3) 連携研究者

堀田 博 (HOTTA HAK)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 40116249