

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590545

研究課題名(和文)細胞内スペckルによるRNAウイルスゲノム動態制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on regulatory mechanism of RNA viral genome by cellular bodies

研究代表者

有海 康雄 (ARIUMI, YASUO)

熊本大学・エイズ学研究センター・准教授

研究者番号：60303913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)のゲノム動態を制御する因子として、ストレス顆粒因子を同定した。興味深いことにHCV感染36時間後にストレス顆粒が形成され、同時にP-body形成の崩壊が見られた。HCV48時間以後は、脂肪滴に周辺にストレス顆粒因子 G3BP1、Ataxin-2、poly(A)-binding protein (PABP)1がハイジャックされることを見出された。さらにこれらストレス顆粒因子G3BP1、Ataxin-2、PABP1ノックダウン細胞において、HCV複製が顕著に抑制された。以上の結果、ストレス顆粒因子はHCV複製に関する宿主因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified stress granule components as the hepatitis C virus (HCV) genome regulatory proteins. Notably, we noticed that HCV infection induces stress granules 36h post-infection. Furthermore, HCV hijacked these stress granule components, including G3BP1, ataxin-2, poly(A)-binding protein (PABP)-1, around lipid droplets. Importantly, HCV replication was significantly suppressed in these knockdown cells. Thus, we suggested that stress granule components are required for HCV replication.

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：HCV P-pody ストレス顆粒 RNAヘリケース APOBEC3G HIV-1

1. 研究開始当初の背景

細胞質スペckルである P-body は APOBEC3G、DDX3 や DDX6 の貯蔵場所であり、RNA ウイルスの感染制御における重要な細胞内構造体である。これまでに HIV-1 複製に必要な DDX3 が、HCV 複製にも必要な宿主因子であることを報告してきた (Ariumi et al. *J Virol* 2007)。この結果、DDX3 が HIV-1 と HCV の両者の分子治療標的として期待された。最近、microRNA effector である DDX6 が HCV 感染に伴い HCV にハイジャックされ、HCV のゲノム増殖作用があることを見出している (Ariumi et al. *J Virol* under minor revision)。一方、HIV-1 に対して DDX6 は抗ウイルス作用がある。何故、DDX6 が HCV ゲノムに対しては、positive に、そして HIV-1 には negative に作用するのか解明したい。また、APOBEC3G が DDX6 などの P-body 因子と相互作用するのか検討を行い、抗 HIV-1 因子 APOBEC3G の microRNA 制御における新しい役割についても模索したい。

2. 研究の目的

宿主細胞内には、PML-NBs や SC35 body など核内スペckルや P-body や stress granule など細胞質スペckルが存在する。これら細胞内スペckルの C 型肝炎ウイルス (HCV) やヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) など RNA ウイルスゲノム動態における役割について、明らかにする。P-body 因子である DDX6 DEAD-box RNA ヘリケースは HCV ゲノムに対しては増殖作用、一方、HIV-1 ゲノムに対しては抗 HIV-1 作用を示すので、この P-body 因子の相反するメカニズムについて明らかにする。また、5'Cap 構造や 3'poly(A) 構造を保持しない HCV ゲノムが宿主細胞内で長期間にわたり持続感染を維持出来る機序についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HCV 感染による stress granule 形成の観察

ヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来 RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、HCV 感染に伴う stress granule 因子 G3BP1、Ataxin2、そして poly(A)-binding protein 1 (PABP1) の局在変化を経時的に観察する。細胞を固定後、抗 HCV Core 抗体および抗 G3BP1 抗体、抗 Ataxin2 抗体あるいは抗 PABP1 抗体で処理後、Core は Cy3 により、G3BP1、

Ataxin2 あるいは PABP1 は fluorescein isothiocyanate (FITC) により可視化した。さらに、外来的なストレスに対する評価系として、HCV 感染細胞の培養温度を 42 にシフトさせ 30 分間培養を行った。また、HCV 感染細胞を 0.5mM 亜ヒ酸ナトリウムで 30 分間処理した。

(2) Stress granule 因子の HCV 生活環における役割の検討

Stress Granule 因子である G3BP1、Ataxin2 及び PABP1 に対する siRNA (Dharmacon, 25nM) を HuH-7 由来 RSc 細胞に Oligofectamine (Invitrogen) を用いてトランスフェクションし、各々の stress granule 因子をノックダウンさせた細胞を調製し、HCV-JFH1 株を感染させる。感染 24 時間後の感染細胞内の HCV RNA の複製レベルをリアルタイム RT-PCR (Lightcycler, Roche) 法にて定量した。

4. 研究成果

(1) HCV 感染による stress granule の形成

HCV 非感染細胞においては、stress granule 因子である G3BP1、Ataxin2 そして PABP1 は細胞質に散在していたが、HCV 感染 36 時間後に stress granule の形成が観察された。さらに、感染 48 時間後にはリング状の構造体を形成し、HCV Core と共局在が観察された。このリング状構造体の中心は脂肪滴であり、HCV 感染に伴い、stress granule 因子が脂肪滴にリクルートされることが明らかとなった。昨年、我々は P-body 因子である DDX6 も HCV 感染後リング状構造を形成し、HCV Core と共局在することを報告したので、DDX6 が G3BP1 や Ataxin2 と共局在するのか検討を行った。その結果、DDX6 は G3BP1 や Ataxin2 とリングを形成し共局

在することを見出した。一方、細胞の培養温度を 42 にシフトし 30 分間培養すると HCV 非感染細胞では stress granule の誘導が見られたが、HCV 感染細胞（感染 72 時間）では、42 で培養してもリング構造を維持し、HCV Core と共局在したままで顕著な局在の変化が見られなかった。同様に細胞を 0.5mM 亜ヒ酸ナトリウムで 30 分間処理しても非感染細胞では stress granule の誘導が見られたが、HCV 感染細胞ではリング構造を維持したままで顕著な局在の変化は観察されなかった。

(2) Stress granule 因子の HCV 生活環における役割

25nM siRNA を用いて、Stress Granule 因子である G3BP1、Ataxin2 あるいは PABP1 をノックダウンさせた RSc 細胞に HCV-JFH1 株を感染させると、感染 24 時間後の細胞内 HCV RNA 量はコントロール細胞に比べて、各々、約 40%、約 60%、約 60% の HCV RNA の顕著な減少が見出された。

(3) HCV による APOBEC3G 及び MOV10 の P-body 局在の変化

HCV 非感染 RSc 細胞において、APOBEC3G 及び MOV10 は P-body に局在し、内在性 DDX6 と共局在した。一方、HCV-JFH1 感染細胞では、APOBEC3G 及び MOV10 の P-body 局在は破綻し、脂肪滴周辺にリクルートされ、HCV Core と共局在した。

(4) APOBEC3G 及び MOV10 と HCV Core との相互作用

APOBEC3G-HA あるいは HA-MOV10 を強制発現させた 293T 細胞及び HCV-JFH1 感染細胞のライゼートを混合し、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降法により、APOBEC3G 及び MOV10 は HCV Core タンパク質と結合することが判明した。

(5) APOBEC3F 及び APOBEC3G の HCV 複製における役割

レンチウイルスベクターを用いて、HCV-JFH1 感染 RSc 細胞に APOBEC3F あるいは APOBEC3G を恒常的に発現させても、細胞内 HCV RNA レベル、細胞内及び培養上清中に放出される HCV Core 発現レベル、そして産生された HCV の感染性は抑制されなかった。同様に 0 細胞に APOBEC3F や APOBEC3G を強制発現させても、HCV 複製レベルは抑制されなかった。

(6) 内在性 MOV10 の HCV 複製における役割

shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて内在性 MOV10 をノックダウンさせても、細胞内 HCV RNA レベル、細胞内及び培養上清中に放出される HCV Core 発現レベル、そして産生された HCV の感染性の増強はみられなかった。同様に 0 細胞の MOV10 をノックダウンさせても、HCV 複製レベルは増強されなかった。

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 15 件)

- (1) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. *Hepatology* 58:1236-1244, 2013 査読有
- (2) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:592-597, 2013 査読有
- (3) Yasuda-Inoue M, Kuroki M, Ariumi Y. DDX3 RNA helicase is required for HIV-1 Tat function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441:607-611, 2013 査読有
- (4) Yasuda-Inoue M, Kuroki M, Ariumi Y. Distinct DDX DEAD-box RNA helicases cooperate to modulate the HIV-1 Rev function. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun. 434:803-808, 2013 査読有
- (5) Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson J, Chikata T, Brumme Z, Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 escape patterns selected by CTLs with identical epitope specificity. *J. Virol.* 87:2253-2263, 2013 査読有
- (6) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 167:74-85, 2012. 査読有
- (7) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter-assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 93:1422-1431, 2012. 査読有
- (8) Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. *FEBS Open Bio* 22:279-283, 2012. 査読有
- (9) Osugi K, Suzuki H, Nomura T, Ariumi Y, Shibata H, Maki M. Identification of the P-body component PATL1 as a novel ALG-2-interacting protein by in silico and far-Western screening of proline-rich proteins. *J. Biochem.* 151:657-666, 2012. 査読有
- (10) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes* 44:374-381, 2012. 査読有
- (11) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J Virol*, 85(14): 6882-6892, 2011. 査読有
- (12) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res*, 157(1): 61-70, 2011. 査読有
- (13) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. *Biochem Biophys Res Commun*, 409(4): 663-668, 2011. 査読有
- (14) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C. *Liver Int*, 31(6): 871-880, 2011. 査読有
- (15) 有海康雄、加藤宣之「HCV による肝発癌機構」*日本臨床* (日本臨床社) 増刊号 新時代のウイルス性肝炎学 -基礎・臨床研究の進歩-69 巻、増刊 4 号、64-68、2011 査読無
- 〔学会発表〕(計 23 件)
- (1) 有海康雄「P-body 因子による RNA ウィルス、寄生ゲノムの制御機構」東京大学医科学研究所 第 2 回感染症国際研究センターシンポジウム、2014 年 3 月 18 日、東京
- (2) Yasuo Ariumi, Misao Kuroki. Host factors involved in LINE-1 retrotransposition. Keystone symposia Mobile Genetic

- Elements and Genome Evolution (C2),
March 9 - 14, 2014, Santa Fe, New Mexico,
USA
- (3) Kodai Kawano, Misao Kuroki, Yasuo Ariumi. HIV-1 interacts with LINE-1
Keystone symposia Mobile Genetic
Elements and Genome Evolution (C2),
March 9 - 14, 2014, Santa Fe, New Mexico,
USA
- (4) 黒木美沙緒、井上万里子、中島詩織、
有海康雄. がん抑制因子はLINE-1のレト
ロトランスポジションを抑制する. 第6
1回日本ウイルス学会学術集会, 2013
年11月10日~12日, 神戸国際会議場、神
戸
- (5) 川野広大、黒木美沙緒、有海康雄. HIV-1
によるLINE-1レトロトランスポジシ
ョンの抑制. 第61回日本ウイルス学会学
術集会, 2013年11月10日~12日, 神戸国
際会議場、神戸
- (6) Yasuo Ariumi. P-body, RNA helicase, and
HIV-1 life cycle. 14th Kumamoto AIDS
Seminar. October 29-31, 2013, 阿蘇リゾ
ートグランヴィリオホテル、Kumamoto,
Japan
- (7) Kodai Kawano, Misao Kuroki, Yasuo
Ariumi. HIV-1 suppresses LINE-1
retrotransposition. 14th Kumamoto AIDS
Seminar. October 29-31, 2013, 阿蘇リゾ
ートグランヴィリオホテル、Kumamoto,
Japan
- (8) 有海康雄「レトロエレメントの転移と
宿主因子」国立遺伝学研究所研究集会
「転移因子と宿主の相互作用による生
命機能」2013年10月10日-11日、国
立遺伝学研究所、三島、静岡
- (9) Yasuo Ariumi, Mariko Yasuda-Inoue,
Misao Kuroki. Distinct DDX DEAD-box
RNA helicases cooperate to modulate the
HIV-1 Rev and Tat function. Frontiers of
retrovirology, 16-18 September, 2013,
Churchill College, Cambridge University,
UK
- (10) Misao Kuroki, Mariko Yasuda-Inoue,
Shiori Nakashima, Yasuo Ariumi. Tumor
suppressor proteins restricts LINE-1
retrotransposition. Frontiers of
retrovirology, September 16-18, 2013,
Churchill College, Cambridge University,
UK
- (11) Yasuo Ariumi and Misao Kuroki. Tumor
suppressor proteins negatively regulates the
life cycle of LINE-1. FASEB meeting
Mobile DNA in mammalian genomes, June
9-14, 2013, Big Sky, Montana, USA
- (12) Yasuo Ariumi, Mariko Yasuda-Inoue,
Misao Kuroki. Distinct DDX DEAD-box
RNA helicases cooperate to modulate the
HIV-1 Rev and Tat function. Cold Spring
Harbor Retroviruses Meeting. Cold Spring
Harbor, New York, USA, May 20-25, 2013
- (13) Misao Kuroki, Mariko Yasuda-Inoue,
Shiori Nakashima, Yasuo Ariumi.
Identification and characterization of novel
restriction factors of LINE-1. Cold Spring
Harbor Retroviruses Meeting. Cold Spring
Harbor, New York, USA, May 20-25, 2013
- (14) 黒木 美沙緒、井上 万里子、有海 康
雄: P-body 因子 MOV10 は HIV-1 複製と
LINE-1 のレトロトランスポジションを
抑制する. 第35回日本分子生物学会年
会. 2012年12月11-14日、福岡国際会
議場、福岡

- (15) 黒木 美沙緒、井上 万里子、有海 康雄： P-body 因子 MOV10 は HIV-1 複製と LINE-1 のレトロトランスポジションを抑制する．第 60 回日本ウイルス学会学術集会． 2012 年 11 月 13-15 日、グランキューブ大阪、大阪．
- (16) 井上 万里子、黒木 美沙緒、有海 康雄： DDX DEAD-box RNA helicase family による HIV-1 複製調節タンパク Rev, Tat の機能制御．第 60 回日本ウイルス学会学術集会． 2012 年 11 月 13-15 日、グランキューブ大阪、大阪
- (17) 有海 康雄、黒木 美沙緒、井上 万里子、土方 誠、池田 正徳、脇田 隆字、下遠野 邦忠、加藤宣之：P-body と HCV-1 のクロストーク．第 60 回日本ウイルス学会学術集会． 2012 年 11 月 13-15 日、グランキューブ大阪、大阪．
- (18) Misao Kuroki, Mariko Inoue, Yasuo Ariumi: The P-body component MOV10 inhibits HIV-1 replication and LINE-1 retrotransposition. 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, 2012 年 10 月 24-26 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル、熊本．
- (19) Mariko Inoue, Misao Kuroki, Yasuo Ariumi: DDX DEAD-box RNA helicase family modulates HIV-1 Rev and Tat function. 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, 2012 年 10 月 24-26 日、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル、熊本．
- (20) Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Mariko Inoue, Makoto Hijikata, Masanori Ikeda, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Nobuyuki Kato: Dynamic regulation of cytoplasmic mRNA-containing bodies in HCV systems. 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2012 年 10 月 5-9 日、ベニス、イ

タリア.

- (21) Misao Kuroki, Mariko Inoue, Makoto Hijikata, Masanori Ikeda, Takaji Wakita, Kunitada Shimotohno, Nobuyuki Kato, Yasuo Ariumi: Can P-body associated host factors APOBEC3G and MOV10 restrict HCV infection? 19th international symposium on hepatitis C virus and related viruses, 2012 年 10 月 5-9 日、ベニス、イタリア.
- (22) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (23) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV production requires the PML tumor suppressor protein. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有海 康雄 (ARIUMI YASUO)
熊本大学・エイズ学研究センター・准教授
研究者番号：60303913

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし