

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590555

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス持続感染の成立とRNA干渉の分子機構に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Basic research on persistent infection of HCV and molecular mechanisms of RNA interference

研究代表者

葛西 正孝 (KASAI, MASATAKA)

国立感染症研究所・免疫部・研究員

研究者番号：10142134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：TRAX分子は、miRNA(siRNA)の取り込み・相補的RNAの切断に関わるRISC(RNA-induced silencing complex)の構成因子である。我々は、RNA干渉に係わるTRAXの役割に着目し、HCVの持続感染機構への関与を解析して以下の事実を明らかにした。1)TRAX分子は、単独では細胞内で存在できない。2)TRAXは、通常Translinと複合体を形成して存在し、ユビキチン非依存的なプロテアソーム分解を回避している。3)TRAXのC末端領域が分解に重要である。更に様々な検討を行ったが、研究期間内にTRAXのHCV持続感染への影響を明確に結論づけるに至らなかった。

研究成果の概要(英文)：TRAX (Translin-associated factor X) is known as a component of RISC (RNA-induced silencing complex) that is involved in RNA interference (RNAi). Given the significant role of TRAX on RNAi machinery, we analyzed its effect on the mechanism of persistent infection of hepatitis C virus (HCV). Although we could not prove the involvement of TRAX in HCV infection during the study period, we obtained the following results for the nature of TRAX molecule: 1)TRAX protein alone cannot be cellularly expressed. 2)TRAX protein usually exists as a complex with Translin protein to escape from ubiquitin-independent proteasome degradation pathway 3) The C-terminal region of TRAX protein is susceptible to degradation.

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持続感染 RNA干渉 TRAX Translin

科学研究費助成事業 研究成果報告書

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・基礎医学 細目：ウイルス学

キーワード：HCV 持続感染, RNA 干渉, TRAX, Translin,

1. 研究開始当初の背景

C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus, HCV) 感染者数は、国内で 200 万人、全世界で 1 億 7,000 万人以上と推測されている。HCV 感染によって急性肝炎を発症した後、その 70-80% では持続感染が成立して慢性肝炎へ移行する。さらに 20-30 年の年月を経て、肝硬変や肝がんへと病態悪化の道をたどることが知られている。肝疾患の進行を防ぐためには、慢性肝炎の段階でウイルスを排除することであるが、HCV 持続感染成立機構が明らかになっていないことが大きな障害となっている。また、ウイルス envelope アミノ酸の易変異領域の存在によって HCV が宿主の免疫監視機構から逃れていると考えられるため、最も有効な予防法と考えられてきた HCV ワクチン開発は暗礁に乗り上げている。

一般に、哺乳類では、ウイルスが感染すると宿主側はウイルス核酸を感知して増殖抑制効果を持つインターフェロンを産生することが知られている。一方、下等生物では、塩基配列特異的な RNA 分解機構である RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) を主体とした抗ウイルス反応が働くと考えられている。しかし、RNA 干渉がウイルス抑制あるいは排除機構として、哺乳類においても機能していることを示唆する結果は、Dicer の発現抑制による抗ウイルス応答の低下などの実験からも示唆されている。このように、RNA 干渉の研究は、HCV 持続感染成立機構を解明する上で期待されるアプローチの一つである。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、HCV の持続感染成立に関わる分子機構の一端を明らかにすることである。申請者らが発見した DNA, RNA 結合タンパク質である Translin およびその類似タンパク質である TRAX は Translin/TRAX 複合体を形成し、miRNA (siRNA) の取り込み・相補的 RNA の切断に関わる RISC (RNA-induced silencing complex) の構成タンパク質となることが明らかにされ注目されている。そこで本研究では、RNA ウイルスである HCV 持続感染において、Translin/TRAX の関与する RNA 干渉 (RNAi) の役割に着目して検討を行うことを計画した。

3. 研究の方法

1) Translin ノックダウンによる TRAX 分子への影響

48well プレートに HEK293T 細胞を播種して 37 で一晩培養した後に siRNA を 1 日おきに 2 回トランスフェクションした。2 回目のトランスフェクションから 1 日後に細胞溶解液を調製し、イムノブロット解析によって Translin のノックダウン及び TRAX の発現を確認した。

2) TRAX 分子の分解に対するリソソーム阻害剤、プロテアソーム阻害剤の処理

FLAG タグまたは 6xHis タグを付加した TRAX 分子の発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 2 日後にプロテアソーム阻害剤である MG132 (50 μ M), Lactacystin (25 μ M) またはリソソーム阻害剤である E64d (28 μ M) 等を含む血清培地に置換して 16 時間処理した。

3) TRAX のプロテアソーム分解の評価方法

HEK293T 細胞に TRAX 発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから 2 日後に MG132 を 10 μ M 添加して 16 時間 37 で処理した。TRAX 分子の発現はイムノブロット解析により行った。

4) TRAX の HCV 感染への影響

siRNA を用いて Huh7 細胞の Translin, TRAX の発現をノックダウンさせたときの HCV 感染への影響を調べた。48well プレートに Huh7 細胞を播種して 37 で一晩培養した後に siRNA を 2 日おきに 2 回トランスフェクションした。2 回目のトランスフェクションから 2 日後に HCV を感染させ、4-5 日後に細胞内の HCV RNA のコピー数を逆転写定量 PCR によって測定した。

4. 研究成果

Translin/TRAX の HCV 感染における機能解析を行うために、siRNA を用いて Huh7.5.1 細胞における Translin 分子のノックダウンを行ったところ、Translin だけでなく TRAX まで蛋白質レベルで発現が減少していた。これは TRAX が Translin と複合体を形成する時は細胞内で安定に存在しているが、Translin 非存在下では TRAX は速やかに分解されてしまうことが原因であることが考えられた。そこでまず、この TRAX の分解のメカニズムを調べることにした。この分解現象は Huh7.5.1 細胞に限らず、HEK293T 細胞など様々な細胞で起こることがわかった。まずは、どのような経路で TRAX が分解しているかを調べることにした。HEK293T 細胞に TRAX を単独で過剰

発現させ、リソソーム阻害剤またはプロテアソーム阻害剤の影響を検討した。その結果、TRAX の発現はリソソーム阻害剤では変化が見られず、プロテアソーム阻害剤では蛋白質の蓄積が見られた。このことから単独の TRAX 分子はプロテアソーム依存的に分解を受けることが判明した。そこで次に、TRAX の欠失変異体を作製し TRAX の分解に重要な部位の探索を行った。その結果、C 末側にプロテアソーム分解系の認識に重要な部位が存在することが判明した。プロテアソーム分解系は一般に基質のリジン残基のポリユビキチン化を介して進行する。そこで、C 末にあるリジン残基をアラニンに置換した TRAX 分子を用いて、プロテアソーム分解系に対する感受性を調べた。予想外に、この TRAX 変異体はプロテアソーム依存的に分解を受けていた。このことから、TRAX 分子はユビキチン非依存的に分解していることが判明した。

以上のことから 1)TRAX 分子単独では肝培養細胞内で存在できないこと、2)TRAX は Translin と複合体を形成しており、単独ではプロテアソーム分解系によりタンパク質レベルで分解を受けること、3) TRAX の C 末端領域が分解に重要であること、4)TRAX はユビキチン非依存的に分解できること、がわかった。

この分解現象は、肝細胞以外の複数の細胞でも観察された。ユビキチン非依存的なプロテアソーム分解系は最近注目されており、TRAX は当該分解系の性状を解析するツールとしても有望であると考えられた。

HCV 感染が可能である複数のヒト肝培養細胞系を用いて、TRAX 分子の siRNA によるノックダウンを行い HCV 感染・増殖を検討した結果、当初すべての場合で有意に HCV 増殖抑制が見られたが、複数の siRNA コンストラクトを検討した結果、TRAX の発現低下を示すものの有意な HCV 増殖抑制が見られないものも存在した。TRAX/Translin の共発現による効果も検討したが、HCV 増殖に有意な変化は見られなかった。これらの結果から、残念ながら、現在のところ TRAX の HCV 持続感染への影響の有無は明確に結論づけられなかった。

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 7 件)

1. Ishida, R., Aoki, K., Nakahara, K., Fukuda, Y., Ohhori, M., Saito, Y., Kano, K., Matsuda, J., Asano, S., Maziarz, RT., and Kasai, M. Translin/TRAX deficiency affects mesenchymal differentiation programs and induces bone marrow failure. *Stem Cells and Human Diseases* (Springer-Verlag, Chapter 21 p468-476) (2012)

2. Hirai, S., Miwa, A., Ohtaka-Maruyama C, Kasai, M., Okabe, S., Hata, Y., and Okado, H. [RP58 controls neuron and astrocyte differentiation by downregulating the expression of Id1-4 genes in the developing cortex.](#) *EMBO J.* 31, 1190-1202 (2012)
3. Ohtaka-Maruyama C, Hirai, S., Miwa, A., Heng, JI., Shitara, H., Ishii, R., Taya, C., Kawano, H., Kasai, M., Nakajima, K., and Okado, H. [RP58 regulates the multipolar-bipolar transition of newborn neurons in the developing cerebral cortex.](#) *Cell Reports* 21, 458-471 (2013)
4. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, and Fukazawa H. "Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle." *Microbes and Infection*, 15, 45-55 (2013)
5. Maehama T, Fukasawa M, Date T, Wakita T, Hanada K. "A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 440(1), 150-156 (2013)
6. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, and Fukazawa H. "Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling." *Microbes and Infection*, 16, 114-122 (2014)
7. Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y, Chu P-S, Usui S, Ishibashi Y, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Saito Y, Fukasawa M, Saito K, Yamagishi Y, Wakita T, Takaku H, Hibi T, Saito H, Kanai T. "Prominent Steatosis with Hypermetabolism of the Cell Line Permissive for Years of Infection with Hepatitis C Virus" *PLOS ONE* 9(4), e94460, 1-18 (2014)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 白砂圭崇、穴井涼、花田賢太郎、葛西正孝、深澤征義、ヒト TRAX 蛋白質の発現量の制御、日本薬学会第 132 年会 北海道、2012.3.29
2. Masayoshi Fukasawa, Ryo Anai, Yoshitaka Shirasago, Kyoko Saito, Yuko Murakami, Hidesuke Fukazawa, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Jo Chiba, Kentaro Hanada "Isolation and characterization of a mutant hepatitis C virus adapted to mouse CD81" The

19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Italy, 2012.10.5-9

3. 白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、千葉丈、安部良、深澤征義 “高感染能を有する HCV JFH-1 適応変異株の性状解析” 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.11.13-15
4. Kasai, M., Ishida, R., Strominger, J.L., and Asano, S. The role of Translin/TRAX complex in mesenchymal differentiation programs. AsiaCORD2013: New Perspectives in Mesenchymal Stem Cell Research (招待講演) 神戸、2013.4.19-20
5. 白砂圭崇、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、安部良、深澤征義 “C 型肝炎ウイルスへの感染感受性を欠損した宿主肝細胞変異株の分離と性状解析” 第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013.9.11-13
6. 谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、花田賢太郎、HCV 感染における Vimentin の細胞内分布変化、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013.11.10-12
7. Masayoshi Fukasawa, Shotaro Nagase, Mayo Yamashita, Kentaro Hanada, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Masuo Kondoh, In vitro and in vivo inhibition of hepatitis C virus infection by mouse anti-human claudin 1 monoclonal antibodies, The 2013 ASCB Annual Meeting, New Orleans, USA, 2013.12.14-18
8. 白砂圭崇、葛西正孝、花田賢太郎、安部良、深澤征義、TRAX はユビキチン非依存的なプロテアソーム分解を受ける、日本薬学会第 134 年会、熊本、2014.3.27-30

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西 正孝 (国立感染症研究所免疫部)

研究者番号 : 10142134

(2) 研究分担者

深澤 征義 (国立感染症研究所細胞化学部)

研究者番号 : 20291130

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :