

C型肝炎ウイルス感染による病原性発現機構の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2010-11-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 定, 清直, 竹内, 健司, 羽溪, 朋子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/2808

C型肝炎ウイルス感染による病原性発現機構の解析

研究代表者：定 清直（医学部、教授）

電話：0776-61-8323、メールアドレス：ksada@u-fukui.ac.jp

共同研究者：竹内 健司（医学部、助教）羽溪 朋子（医学部、助教）

概 要	
	C型肝炎ウイルス（HCV）の感染実験系を立ち上げ、感染の有無による細胞内蛋白質発現プロファイルと比較し、発現量に変化が見られた蛋白質（感染により発現増加する蛋白質が23スポット、減少する蛋白質が34スポット）について、MALDI-TOF/MSを用いて同定を行った。そのうちの1つである脂質代謝制御に関わる蛋白質（A）について、HCVのレプリコンや感染実験系を用いて、HCVに対する影響を解析した。その結果、（A）の発現量は、HCVのレプリコンや感染実験系において発現量に変化が見られた。一方、（A）に対するsiRNAによりその発現量を低下させても、HCVのコア蛋白質や非構造蛋白質の一つであるNS5Aの発現量、さらに感染性ウイルスの産生には影響が認められなかった。 本研究は立ち上げたばかりであり、今後他の候補分子について同様に解析を進めて行きたい。
関連キーワード	C型肝炎ウイルス、感染実験系、プロテオーム解析、シグナル伝達

研究の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は、持続感染の後に高率に肝細胞癌を引き起こし、2型糖尿病などの合併症を併発することが知られているが、その分子機序については依然不明の点が多い。

HCVが発見されて以来、ウイルスの培養実験系が存在しないことがHCVの基礎研究の妨げになってきた。当研究室では、ハイデルベルグ大学のBartenschlager博士らのグループにより報告されたHCV subgenomic replicon (SGR)システムや、岡山大学の加藤教授らのグループが開発した全長のHCVゲノム(O株)を用いたfull genomic replicon (FGR)システムを導入し、さらに最近劇症肝炎患者から分離された2a型のJ6株の構造領域とJFH-1株の非構

造領域との感染性キメラウイルス(J6/JFH1、HCV複製の感受性の高い培養細胞であるHuh7.5細胞に導入すると、高い感染力価を示す培養上清が調整可能、ロックフェラー大学Rice教授より分与)を用いた最新の感染実験系を当研究室にて立ち上げた。

HCVの感染の有無により発現量の異なる幹細胞内蛋白質についてMALDI-TOF/MSを用いてプロテオミクス解析を行った結果、HCV感染後に発現量が増加あるいは減少する蛋白質群が網羅的に同定された。これらの分子がHCV感染にどのような影響を及ぼすのかについて、更なるウイルス学的解析が必要となった。

研究の目的

昨年までのプロテオーム解析により、HCV感染後に発現量が増加あるいは減少する肝細胞内蛋白質群が網羅的に同定された。各候補蛋白質の発現量を変化させて、HCVの遺伝子増幅やHCV蛋白質の機能、ビリオン産生などのウイルスのライフサイクルにどのような影響が及ぼされるのか、次に癌化のプロセスの観点からp53やRB蛋白質、Syk

チロシンキナーゼなどの癌抑制蛋白質にどのような影響が及ぼされるのか、さらにグルコーストランスporterへの影響等、幅広く解析を進める計画を立てたが、本年度は、同定された蛋白質の一つである（A）について、まず蛋白質発現量の変化によるウイルスのライフサイクルへの影響について解析を行った。

研究の成果

1. レプリコン複製細胞を用いた検討

Huh7.5 (RIG-I 欠損細胞、コントロール)、2 種類のレプリコンである SGR と FGR をそれぞれ導入した Huh7.5 細胞について、(A) に対する抗体を用いて解析を行った。その結果、SGR が複製している細胞ではコントロールと比較して特に影響は見られなかったが、全長の FGR が複製している細胞では、(A) の蛋白質発現量がやや高く検出された。この結果は、プロテオーム解析の結果（非感染細胞に対して感染細胞で発現量が増加していること）を裏付けるものであり、同時に、SGR では欠損している HCV の構造タンパク質領域（Core を含む）の重要性が強く示唆された。

2. 蛋白質発現量の変化による検討

(A) に対する siRNA を、全長のレプリコン(FGR) を複製する Huh7.5 細胞にリポフェクタミン法を用いて一過性に導入し、その影響について解析を行った。その結果、(A) に対する siRNA は HCV 蛋白質である NS5A、Core の発現量にともに影響を与えなかった。

また、RT-PCR 法を用いてヒト (A) 遺伝子の全長 cDNA をクローニングした。今後過剰発現型への応用を検討中である。

3. 感染実験系の立ち上げ

ヒト組換え HCV を用いた感染実験系(組換え HCV である J6/JFH1 を、Huh7.5 細胞に感染させ継代)を当研究室にて立ち上げた。

(A) に対する siRNA を導入して 48 時間後に HCV を Huh7.5 細胞に感染させ、感染後 (d.p.i.) 1 日目と 2 日目に細胞を可溶化した。それぞれの試料を SDS-PAGE で分離後、イムノブロット法により解析を行った (図 1)。siRNA により (A) の蛋白質発現量が減少していることが確認された (上のパネル)。同様に HCV 蛋白質について解析を行ったところ、Core の蛋白質発現量の変化は認められなかった。また、HCV 感染性粒子の放出について同様に解析したところ、siRNA による影響は検出されなかった。

感染実験系

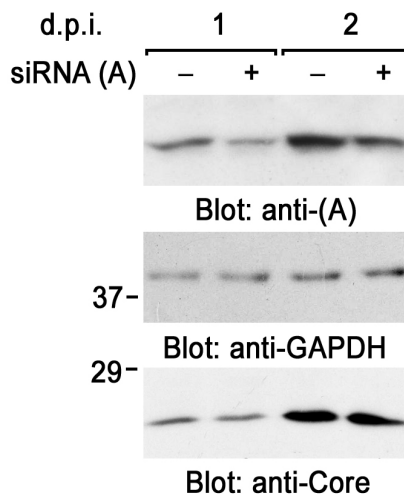


図 1. 感染実験系を用いた検討

以上により、siRNA を用いた (A) の発現量低下は HCV の蛋白質発現量、感染性ウイルス産生に影響しないことが明らかとなった。一方、レプリコン複製細胞において、FGR を複製する細胞のみ (A) の発現が高く観察された。今後はウイルス蛋白質の局在など、異なる確度からの検証が必要であると考えられる。

本研究は立ち上がったばかりであり、今後他の候補分子 (B) (C) (D) について同様の解析が必要であると考えられる。また、HCV は肝細胞以外に B リンパ球に感染することが知られており、免疫系のかく乱が慢性肝炎発症のメカニズムの一つではないかと考えられている。肝細胞同様に B リンパ球における動態や当初の計画に挙げられたシグナル伝達機構への影響についても解析する必要があると考えられる。

特記事項・発表論文など

「特記事項」

平成 20 年度学内共同研究等に採択された研究課題「B 細胞における抗原認識メカニズムとアダプター蛋白質 3BP2」(研究代表者：定 清直 (医学部、教授)、共同研究者：羽溪 朋子 (医学部、助教)) については、今年度研究成果を論文発表した。

Shukla, U., Hatani, T., Nakashima, K., Ogi, K., and Sada, K. Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates B cell receptor-mediated activation of NFAT. *J. Biol. Chem.* 284(49):33719-33728 (2009)

「本研究に関わる発表論文」

なし

「本研究に関わる学会発表」

定 清直
C 型肝炎ウイルスの病原性発現機構
日本小児感染症学会総会 2009 年 11 月 福井

定 清直
C 型肝炎ウイルスの病原性発現機構
日本感染症学会総会 2010 年 4 月 京都

定 清直、竹内健司、羽溪朋子
C 型肝炎ウイルス感染のプロテオーム解析
北陸腸内細菌研究会 2010 年 7 月 金沢 (予定)