

「肝炎ウイルスによるシャペロン介在性オートファジーのハイジャックと分子病態」
 神戸大学大学院医学研究科附属感染症センター感染制御学分野 勝二 郁夫

1 研究の背景と目的

C型肝炎ウイルス(HCV) 感染は高率に持続感染し、慢性肝炎、肝硬変、やがて肝細胞癌を引き起こす。HCV 感染が糖代謝異常を引き起こし、肝線維化の促進、肝発癌のリスクを高める。私共はHCV による糖代謝異常の研究から、HCV 感染が GLUT2 遺伝子転写を抑制する(Kasai D, et al., J Hepatol, 2009)¹, HCV NS5A 蛋白質が HNF-1 α 蛋白質と相互作用し、HNF-1 α をリソソーム依存性に分解し、GLUT2 転写抑制につながる (Matsui C et al., J Virol, 2012)², NS5A 蛋白質の Val¹²¹ が HNF-1 α との相互作用に重要である (Matsui C et al., J Gen Virol, 2015)³ ことを報告してきた。本研究では、HCV によるシャペロン介在性オートファジー(Chaperone-mediated autophagy, CMA)の詳細な分子機構を明らかにし、さらに新規標的因子を同定し、HCV による新しい病原性発現機構の解明を目的とする。

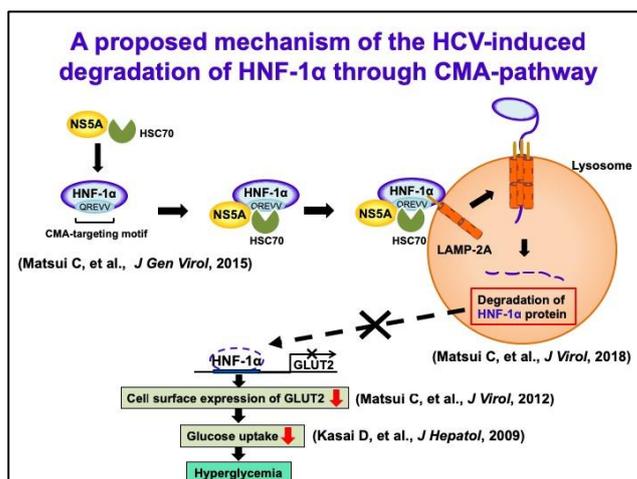


図1. HCV 感染による HNF-1 α のシャペロン依存性オートファジー

HCV NS5A 蛋白質が細胞内の転写因子 HNF-1 α と相互作用し、HSC70 と HNF-1 α 上の CMA-targeting motif の結合を促進し、HNF-1 α のリソソームへの輸送を促進し、リソソーム酵素で分解する。

2 研究方法・研究内容

HCV NS5A 蛋白質の病原性における役割は以前より多くの研究者により解析されており、130 以上の NS5A 結合因子が報告されている。データベース上のアミノ酸配列を基に CMA-targeting 配列のアルゴリズム解析から、40 種類以上の NS5A 結合因子が CMA-targeting 配列を有していることを見つけている。そこで、本研究では約 40 種類の標的候補因子からシャペロン介在性オートファジーで分解される新規標的因子を同定し、ウイルスの病原性またはウイルス増殖における役割を明らかにする。まず、HCV J6/JFH1 感染培養系を用い、HCV 感染に伴う宿主因子の蛋白量変化をウェスタンブロット法で解析する。HCV 感染で著減す

る因子に対して、CMA-targeting 配列への遺伝子変異を導入して、安定性や HSC70 との相互作用の変化を解析し、新規標的因子を同定する。次にそれらの因子の HCV の病原性やウイルス増殖における役割を解析する。

「研究方法」

a) 標的候補因子の解析

HCV 感染細胞において 70 種類ある NS5A 結合因子の蛋白質質量への影響をウェスタンブロット法で解析し、候補因子をスクリーニングする。

b) 阻害剤による解析

リソソーム酵素阻害剤 (Pepstatin A) やオートファジー阻害剤 (NH₄Cl, Bafilomycin A1) の候補蛋白質の分解への影響を解析する。

c) 変異体による解析

候補蛋白質上の CMA-targeting 配列にアミノ酸変異を導入し、HSC70 との相互作用および、リソソーム依存性蛋白質分解への影響を解析する。

d) NS5A 要求性の解析

HCV NS5A 存在下、非存在下における候補蛋白質と HSC70 の相互作用および HNF-1α 蛋白質分解へ及ぼす影響、細胞内局在を解析する。

e) 病態生理学的意義の解析

RNAi で候補因子をノックダウンし、細胞増殖、HCV 増殖への影響を解析する。

3 研究成果

HCV 感染による HNF-1α 分解の詳細な機構を解析し、HNF-1α の POU_s ドメインに存在する、QREVV が CMA-targeting motif であることを明らかにした。NS5A が HNF-1α と HSC70 の相互作用を増強し、HNF-1α のリソソームへの移行を促進させ、リソソーム依存性分解が促進されることを解明した (Matsui C et al., J Virol, 2018) ⁴ (図 1)。次に CMA 依存性分解の新規基質の候

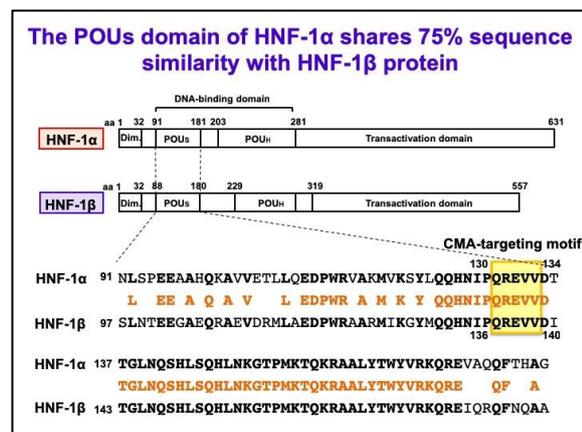


図 2. HNF-α と HNF-1β の POU_s ドメインの アミノ酸相同性

補因子をスクリーニングした結果、新規基質として HNF-1 β を同定した。アミノ酸配列を比較したところ、HNF-1 α と HNF-1 β の POU_s ドメインは 75% のアミノ酸相同性を有した (図 2)。また、HNF-1 β には CMA-targeting motif の規則に合致する配列が 4 箇所認められた。候補配列のグルタミン残基をアラニン残基に置換し、変異体 HNF-1 β 発現プラスミドを作成した。それぞれの Q \rightarrow A 変異体を作製した。Huh-7.5

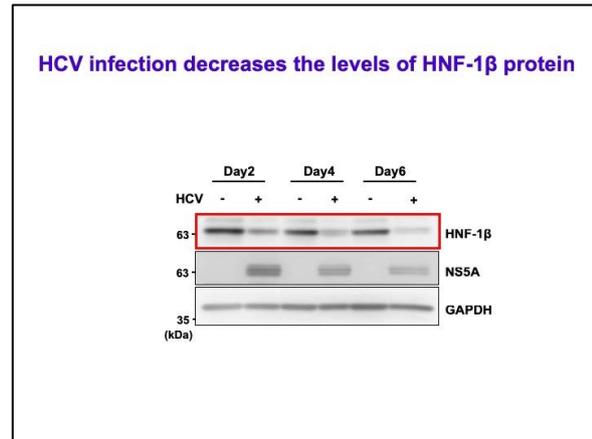


図 3. HCV 感染によるシャペロン依存性オートファジーによる HNF-1 β 蛋白質分解

細胞にトランスフェクトし、anti-HSC70 抗体で内在性 HSC70 を免疫沈降したところ、FLAG-HNF-1 β は共沈し、他の三つの変異体は共沈したが、FLAG-HNF-1 β Q136A のみ共沈しなかった。さらに HCV 感染細胞で HSC70 と FLAG-HNF-1 β の相互作用を解析したところ、HCV 感染により両者の相互作用が増強した。一方、FLAG-HNF-1 β Q136A は共沈しなかった。また、HCV 感染細胞において HNF-1 β の蛋白質量は著明に減少した (図 3)。リソソーム酵素阻害剤の NH₄Cl により、HNF-1 β の蛋白質量は増加した。また、LAMP-2A を siRNA でノックダウンしたところ、HNF-1 β の蛋白質量は回復した。以上より、HNF-1 β は HCV 感染による CMA 依存性蛋白質分解の新規基質であると結論した。HCV 感染に伴う HNF-1 β の CMA 依存性分解の生理的意義については現在、解析中である。

References

1. Kasai, D., Adachi, T., Lin, D., Nagano-Fujii, M., Sada, K., Ikeda, M., Kato, N., Ide, Y., Shoji, I., and Hotta, H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *Journal of Hepatology*, **50**, 883-94, 2009.
2. Matsui, C., Shoji, I., Kaneda, S., Sianipar, IR., Deng, L., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . *Journal of Virology*, **86** (23): 12903-11, 2012.
3. Matsui C, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H, and Shoji I. A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupts physical and functional interaction with the transcription factor HNF-1 α . *Journal of General Virology*, 2015, **96**: 2200-05.
4. Matsui C, Deng L, Minami N, Abe T, Koike K, and Shoji I. Hepatitis C virus NS5A protein promotes

the lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1 α via chaperone-mediated autophagy. *Journal of Virology*, 2018, 92: e000639-18, 1-14.

4 生活や産業への貢献および波及効果

HCV 感染によるシャペロン依存性オートファジーの活性化により、HNF-1 α と HNF-1 β が選択的にリソソームで分解されることを明らかにした。この分解機構には HCV NS5A と相互作用し、HSC70 と結合する宿主因子で、CMA-targeting motif を有することが重要であることが明らかとなった。そして、これは HCV による新規病原性発現機構として機能することが考えられた。今後はさらに新規標的因子を同定すると共に、この分解機構を抑制するような小分子を開発することで HCV の病原性の抑制法の開発へとつなげることが期待できる。HCV に対する DAA 治療法の奏功率が 90%以上と目覚ましい治療の進歩があるが、SVR 後肝癌という新たな問題が注目されており、宿主因子を標的にした新規 HCV 治療法の開発は将来の C 型肝炎の新規治療法の端緒となることが期待される。