

図1 HCV ゲノム複製複合体の形成

翻訳された前駆体蛋白は宿主細胞のシグナルペプチダーゼ、シグナルペプチドペプチダーゼ及び2種類のHCVプロテアーゼによって切断される。NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B蛋白は相互に会合、また宿主蛋白を取り込んだ形で複製複合体を形成する。複製複合体が膜上で高密度化すると、ウイルス蛋白間の相互作用等により膜構造の変化がおり、小胞構造体が形成される。その際、取り込まれたプラス鎖ゲノムRNAからマイナス鎖(点線で記載)が作られさらにプラス鎖RNAが合成される。新生されたゲノムRNAとNS5A蛋白との複合体がCore蛋白と会合しヌクレオキャプシド形成が進む。

にVAP, FKBP3, Hsp90, hBind-1, FBL2, Cyclophilin Bなど10数種類の蛋白が同定されている。VAP-A/B及びSNARE様蛋白はNS5A, NS5Bと結合し、複製複合体形成に働くと考えられる^{9, 12)}。最近、VAP-BのスプライシングバリエーションであるVAP-Cが、VAP-A/BとNS5Bとの結合を競合的に阻害することによってHCV複製を抑制しうることも報告された²¹⁾。また、NS5Aと相互作用するFKBP8やhBind-1などのコシャペロンがHsp90を複製複合体へ運ぶことがHCV複製に重要であることが示された^{30, 31, 36, 37)}。Cyclophilin Bの関与については、免疫抑制剤シクロスポリンの持つ抗HCV活性の作用機序解析を端緒として明らかとなった⁴¹⁾。FBL2はガラニルガラニル化されてNS5Aと結合し複製複合体に取り込まれる⁴⁰⁾。しかしながら、HCV複製複合体の形成過程、機能などについて未だ十分に解明されているとは言えない。

CKB：新たに見出されたHCV複製関連因子

そこで我々は、比較プロテオーム解析によって、HCV複製複合体を構成し複製調節に働く新規宿主因子の探索を行った。すなわち、前述のようにHCVゲノムが複製する細胞中のDRM分画では複製活性が保持されることから、サ

ブゲノムレプリコンを有するHuh-7細胞及び親株細胞からそれぞれDRM分画を調製し、各蛋白レベルを両分画間で比較し、レプリコン細胞のDRMで存在量が顕著に高かった蛋白27種類を同定した¹³⁾。その中には、分子シャペロンなど蛋白ホールディングに関わるもの、代謝、生合成系の酵素、細胞骨格形成蛋白などが含まれていた。これらの蛋白が実際にHCVの複製に関与するかどうかを調べるため、各分子に対するsiRNAをレプリコン細胞へ導入し細胞内HCV RNAレベルの変化を解析した結果、HCVゲノム複製を正に制御しうる因子としてcreatine kinase B (CKB)などを同定した。CKBについては、遺伝子ノックダウンの他、阻害剤cyclocreatineの添加、ドミナントネガティブ体の強制発現によってもHCV複製、感染性ウイルス産生が抑制されることを示した¹³⁾。creatine kinaseは、エネルギーを多く必要とする、あるいはエネルギーを急速に必要とする組織でのATPの供給、ATPレベルの維持に重要な酵素であり、高エネルギーリン酸結合を持つクレアチンリン酸からADPへリン酸基を転移しATP生成に働く。ATPのエネルギーを必要とする生化学反応系において、クレアチンリン酸と共にATPの再生系として利用される。CKBはcreatine kinaseのアイソフォームの一種であり肝

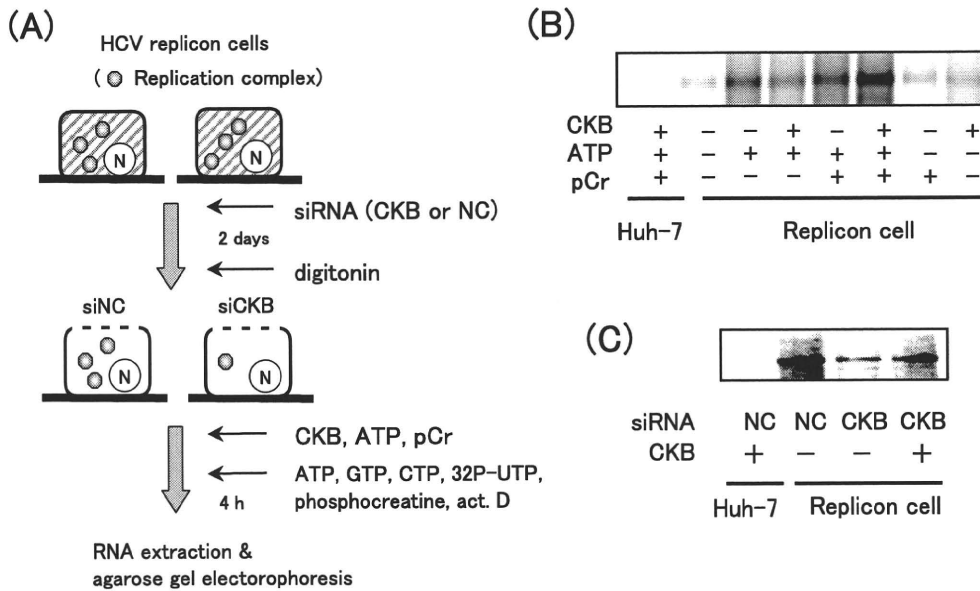


図 2 CKB は HCV replicase 活性を亢進させる¹³⁾

(A) セミインタクトレプリコン細胞を用いた HCV replicase assay. (B) 作製したセミインタクト細胞 (Huh7 または Replicon cell) に精製 CKB, ATP, クレアチンリン酸 (pCr) を図のように添加し複製活性を調べた. (C) レプリコン細胞に CKB に対する siRNA または陰性コントロール siRNA (NC) を導入した後セミインタクト化した. それぞれに CKB を添加 (または未添加) し複製活性を解析した.

臓を含む多様な組織で発現している. 興味深いことに, CKB は HCV の感染や複製によってその発現が亢進する訳ではないが, HCV レプリコン細胞では DRM 分画に enrich されることが示された¹³⁾. すなわち, HCV ゲノムが複製している細胞においては, CKB が特定の細胞内分画に集積する現象が起こりうると考えられたため, 次に, CKB が HCV 蛋白と相互作用し, それによって CKB が DRM ヘリクルートされるという作業仮説を立て検証を行った. 免疫沈降解析の結果, CKB は, HCV 非構造蛋白のうち NS4A と相互作用すること, その相互作用には CKB の C 末端側と NS4A の中央領域が重要であることが明らかとなった¹³⁾. NS4A は 54 アミノ酸残基からなるポリペプチドで, その中央部を介して NS3 と結合し NS3 セリンプロテアーゼ活性の cofactor として機能している. また, N 末端側は膜貫通領域⁷⁾, C 末端側は NS5A の高リン酸化に関わる領域²³⁾ と報告されている. CKB との相互作用に重要な NS4A 領域は NS3 との結合に関わる領域に近接すると考えられたが, 免疫沈降法の結果, CKB は NS3-4A 結合を阻害する訳ではなく, CKB-NS4A-NS3 三者の複合体が形成されることが示された. また, NS4A との結合部位を欠損した CKB では, DRM 分画局在性が低下し, HCV 複製への関与がキャンセルされた¹³⁾.

さらに, 複製複合体への CKB の介入が HCV replicase 活性に重要かどうかを明らかにするため, セミインタクトレプリコン細胞を使った replicase assay を行った. これ

は Miyanari らによって開発された方法で, レプリコン細胞をジギトニン処理したセミインタクト状態で HCV RNA 複製をモニターし, 複製活性に対するプロテアーゼ, 界面活性剤処理などの影響を解析することができる²⁸⁾ (図 2A). セミインタクトレプリコン細胞に ATP を加えると replicase 活性の上昇が認められるが, ここへさらに精製 CKB 及びクレアチンリン酸 (pCr) を添加すると同活性が顕著に上昇することがわかった (図 2B). また, レプリコン細胞から CKB をノックダウンしておいたセミインタクト細胞では replicase 活性は低下するが, そこへ CKB を添加すると活性の回復が観察された (図 2C). replicase 活性のうち, NS3-4A が関与する ATP 依存的反応は RNA helicase 活性であるが, 実際にこの活性が CKB, pCr 添加によって亢進することを *in vitro* helicase assay で確認した¹³⁾.

以上の成績より, CKB を介した HCV 複製分画への ATP 供給が同ウイルスのゲノム複製調節に寄与していると結論づけた. CKB は NS4A との結合を通じて HCV 複製複合体ヘリクルートされ, HCV ゲノム複製調節に役割を果たすと考えられた.

HCV 粒子形成機構に関する最近の見解

細胞内中性脂肪に蓄積に用いられる脂肪滴が HCV の感染性粒子形成に重要な役割を果たすことが 2007 年に報告²⁷⁾ されて以来, HCV 粒子形成の分子機構に関する研究は, 脂肪滴のバイオロジー, リポ蛋白産生などの脂質代謝と関連

づけながら進められている。脂肪滴は小胞体由来膜構造等の小器官と相互作用しながら細胞質内で動的な振舞いを見せる。HCV増殖細胞の中では、脂肪滴膜上にHCVヌクレオキャプシド形成を担うCore蛋白が局在しており、膜構造に伴ったE1, E2蛋白また非構造蛋白も、膜間またはCore蛋白との相互作用によって脂肪滴周辺へ集合する。このようにして感染性HCV粒子の形成は脂肪滴周辺環境で効率よく進行すると考えられる^{27, 29)}。筆者らは、非構造蛋白NS5Aが脂肪滴の周囲で粒子形成の初期過程に関与することを報告した²⁶⁾。複製複合体で新生されたウイルスゲノムRNAをNS5Aが捕捉した後、NS5AのC末端領域とCoreとの相互作用を介して、ゲノムRNA-NS5A-Core複合体が作られる。これによりCoreによるRNAパッケージングが開始される、というモデルを提唱した(図1)。HCV粒子形成におけるNS5Aの役割は他の研究グループからも報告されている^{4, 38)}。

HCV感染患者の血中ウイルスは多様な密度(約1.05から1.25g/mL)を示すことが知られている。低密度域のHCV粒子は、アポリポ蛋白を含みトリグリセリドに富んだ超低比重リポ蛋白VLDLが会合したかたちで存在するものと推定され、このような低密度粒子は高い感染性を有することがチンパンジー、培養細胞での感染実験で示されている^{6, 14, 24)}。また筆者らはHCV粒子表面のコレステロール、スフィンゴ脂質が感染性に重要であることを示した²⁾。VLDLの構成因子であるアポリポ蛋白B(apoB)及びアポリポ蛋白E(apoE)がHCV粒子形成に関与すると報告されており^{5, 8, 10, 15, 18)}、HCVエンベロープ蛋白の細胞外への分泌はapoB陽性リポ蛋白のアセンブリーに依存している¹⁶⁾。apoEについては遺伝子ノックダウンによってHCVの細胞への侵入過程、ゲノム複製は影響をうけないものの感染性HCVの産生は顕著に低下すること¹⁸⁾、NS5Aと相互作用することなどが見出されている⁵⁾。また、VLDLの産生を低下させるミクロソームトリグリセリド転移蛋白阻害剤によって感染性HCV産生は有意に抑制される¹⁸⁾。

最近、HCV非構造蛋白についてNS5A以外にNS3, NS2も感染性粒子の形成に関与することが報告されている。NS3のC末端側helicase領域が粒子形成に係わっているとされている²⁵⁾。NS2についてもmutagenesis解析から膜貫通領域、C末端領域など粒子形成に重要な領域が見出されている^{17, 19, 20, 34)}(鈴木ら未発表)。

おわりに

インターフェロンを基軸とした化学療法の進歩により、最近テレビで流れているように「C型肝炎は治る病気になりました」と言っても過言でないのかもしれない。しかしながら、現行の治療法に対する無効例、治療終了後に肝炎が再燃するケースも依然として多い。化学療法の治療効果をより高め、症状、体質などの異なる様々な症例に対応す

るためには、作用標的の異なる種々の抗HCV剤の創薬化が重要である。現在、HCVプロテアーゼ、ポリメラーゼ、NS5Aをそれぞれ標的とした化合物あるいはシクロスポリン誘導体などによるHCV複製阻害剤の開発が進んでいる。本稿で紹介したように、HCVゲノム複製調節に働く種々の宿主因子が同定され、感染性粒子形成の分子機構も明らかになれつつある。これらは次世代抗HCV薬開発のための新たな標的になるものと期待される。

文献

- 1) Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM.: Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324: 450-461, 2004.
- 2) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J Virol.* 82: 5715-5724, 2008.
- 3) Ali N, Tardif KD, Siddiqui A.: Cell-free replication of the hepatitis C virus subgenomic replicon. *J Virol.* 76: 12001-12007, 2002.
- 4) Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, Kallis S, Engel U, Bartenschlager R.: Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* 4: e1000035, 2008.
- 5) Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, Hildt E, Luo G, McLauchlan J, Baumert TF, Schuster C.: Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51: 43-53, 2010.
- 6) Bradley D, McCaustland K, Krawczynski K, Spelbring J, Humphrey C, Cook EH.: Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol.* 34: 206-208, 1991.
- 7) Brass V, Berke JM, Montserret R, Blum HE, Penin F, Moradpour D.: Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 14545-14550, 2008.
- 8) Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G.: Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol.* 81: 13783-13793, 2007.
- 9) Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM.: Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol.* 78: 3480-3488, 2004.
- 10) Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV.: Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol.* 82: 2120-2129, 2007.
- 11) Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R,

- Blum HE, Bienz K, Moradpour D. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol.* 77: 5487-5492, 2003.
- 12) Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y.: Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol.* 79: 13473-13482, 2005.
 - 13) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol.* 83: 5137-5147, 2009.
 - 14) Hijikata M, Shimizu YK, Kato H, Iwamoto A, Shih JW, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H.: Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol.* 67: 1953-1958, 1993.
 - 15) Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Ye J.: Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 5848-53, 2007.
 - 16) Icard V, Diaz O, Scholtes C, Perrin-Cocon L, Ramière C, Bartenschlager R, Penin F, Lotteau V, Andr P.: Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One.* 4: e4233, 2009.
 - 17) Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Bin Z, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 371: 446-450, 2008
 - 18) Jiang J, Luo G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol.* 83: 12680-12691, 2009.
 - 19) Jirasko V, Montserrent R, Appel N, Janvier A, Eustachi I, Brohm C, Steinmann E, Pietschmann T, Penin F, Bartenschlager R.: Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem.* 283: 28546-28562, 2008.
 - 20) Jones CT, Murray CL, Eastmann DK, Tassello J, Rice CM.: Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol.* 81: 8374-8383, 2007.
 - 21) Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y.: Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J Virol.* 83: 7959-7969, 2009.
 - 22) Lai VC, Dempsey S, Lau JY, Hong Z, Zhong W.: In vitro RNA replication directed by replicase complexes isolated from the subgenomic replicon cells of hepatitis C virus. *J Virol.* 77: 2295-2300, 2003.
 - 23) Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, Rice CM.: The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol.* 81: 8905-8918, 2007.
 - 24) Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM.: Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 3805-3809, 2006.
 - 25) Ma Y, Yates J, Liang Y, Lemon SM, Yi M.: NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol.* 82: 7624-7639, 2008.
 - 26) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, and Suzuki T.: Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol.* 82:7964-76, 2008.
 - 27) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9: 1089-1097, 2007.
 - 28) Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K.: Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* 278: 50301-50308, 2003.
 - 29) Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K.: Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85: 217-228, 2009.
 - 30) Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y.: A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J Virol.* 82: 3480-3489, 2008.
 - 31) Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y.: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.* 25: 5015-5025, 2006.
 - 32) Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M.: Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol.* 1: 333-337, 2005.
 - 33) Shi ST, Lee KJ, Aizaki H, Hwang SB, Lai MM.: Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol.* 77: 4160-4168, 2003.
 - 34) Steinmann E, Brohm C, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T.: Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol.* 82: 7034-7046, 2008.
 - 35) Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T.: Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev.* 59: 1200-1212, 2007.

- 36) Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y.: Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J Virol.* 83: 10427-10436, 2009.
- 37) Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y.: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J Virol.* 82: 2631-2641, 2008.
- 38) Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J.: Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 4: e1000032, 2008.
- 39) Umehara T, Sudoh M, Yasui F, Matsuda C, Hayashi Y, Chayama K, Kohara M.: Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 346: 67-73, 2006.
- 40) Wang C, Gale M Jr, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J.: Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell.* 18: 425-434, 2004.
- 41) Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K.: Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell.* 19: 111-122, 2005.

Advances in research on HCV replication and virion formation

Tetsuro SUZUKI*, **Hiromichi HARA**, **Hideki AIZAKI**,
Ryosuke SUZUKI, **Takahiro MASAKI**

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases.

*Present address: Department of Infectious Diseases,
Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan
tesuzuki@hama-med.ac.jp

Hepatitis C virus (HCV) establishes a persistent infection and is recognized as a major cause of chronic liver diseases worldwide. Although much work remains to be done regarding the viral life cycle, significant progress has been made with respect to the molecular biology of HCV, especially the viral genome replication and virion formation. A variety of host cell factors, which play roles in replication of the viral genome RNA, have been identified. Involvement of lipid droplet, lipid metabolism and the viral nonstructural proteins in the production of the infectious particles has also been revealed.

