

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）]

分担研究報告書

C型肝炎ウイルスコアタンパクによるmitophagyの抑制

研究分担者：日野 啓輔 川崎医科大学肝胆膵内科学 教授

研究協力者：原 裕一 川崎医科大学肝胆膵内科学 講師

研究要旨：C型肝炎ではミトコンドリア障害が存在し、ミトコンドリア由来の活性酸素種（ROS）産生や酸化ストレスの誘導に関連している。一方、ミトコンドリアには低分子抗酸化物質や抗酸化酵素が豊富に存在し、さらには機能が低下したミトコンドリアはミトコンドリア特異的autophagy（mitophagy）で消化される。そこで本分担研究ではC型肝炎ウイルス（HCV）がmitophagyに及ぼす影響について検討した。ミトコンドリア障害により引き起こされるType 2 mitophagyではE3 ubiquitin ligaseであるParkinがリン酸化されてミトコンドリア外膜へ局在し、ミトコンドリアをautophagy経路により分解する。HCV-JFH1株感染Huh7細胞、HCVトランスジェニックマウス、HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて検討したところ、HCV感染下ではParkinのリン酸化は抑制されないもののミトコンドリアへの局在が抑制された。ParkinとHCVの共免疫沈降ではコア蛋白とParkinの結合が確認され、さらにyeast two hybrid assayではParkinのN端側（215アミノ酸）とコア蛋白の特異的結合が認められた。これによりミトコンドリア外膜のユビキチン化、mitophagosomeの形成ならびに消化はすべて抑制された。Mitophagyが抑制された細胞はROSの産生が亢進することも確認された。さらに興味深いことにParkinをsiRNAでノックアウトするとHCVコア蛋白の発現が抑制され、HCVの増殖にParkinとコア蛋白の結合が何らかの役割を果たしていると推測された。以上の成績はC型肝炎の病態や肝発癌における酸化ストレスの発現・持続機構として、コア蛋白によるmitophagyの抑制が極めて重要であることを示すものである。

A. 研究目的

HCV 感染は肝発癌の主要原因であり、HCV 起因性肝発癌機構の解明は喫緊の課題である。C 型肝炎は他の炎症性肝疾患にくらべて肝内での酸化ストレスが亢進しており、酸化ストレスは病態の進展や肝発癌に深く関与していることが明らかにされてい

る。HCV コア蛋白はミトコンドリア電子伝達系への障害を介して ROS を産生しミトコンドリア障害を惹起する。一方、ミトコンドリアにはグルタチオンなどの抗酸化物質や MnSOD などの抗酸化酵素が豊富に存在し、障害されたミトコンドリアはミトコンドリア特異的 autophagy（mitophagy）により排

除されてその品質管理がなされる。このように HCV に起因する酸化ストレスは HCV コア蛋白による直接的なミトコンドリア障害だけでは説明できない。そこで HCV が mitophagy に及ぼす影響について検討した。

## B. 研究方法

HCV-JFH1 感染 Huh7 細胞、HCV 全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス (HCV TgM) ならびに HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウス (HCV-Chimera) を用いて mitophagy 制御分子の解析を行った。なお、*in vitro* での mitophagy の誘導には carbonyl cyanine *m*-chlorophenylhydrazon (CCCP) (10  $\mu$ mol/L) を使用した。

(倫理面への配慮)

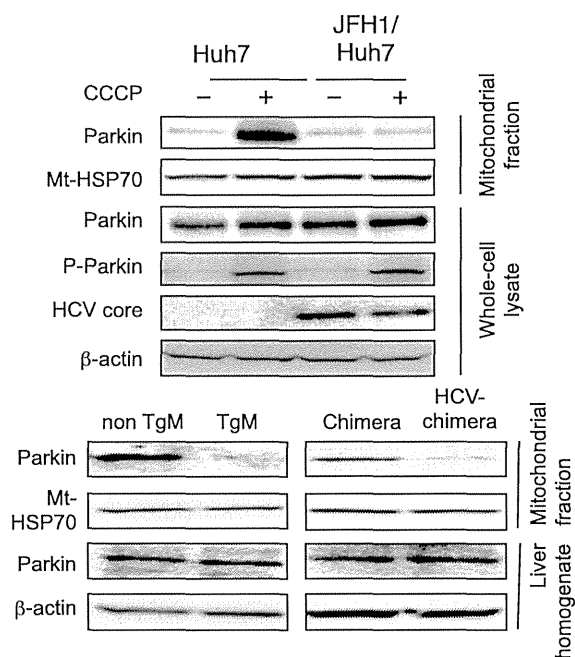
本研究は川崎医科大学動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。

## C. 研究結果

### 1. Parkin のミトコンドリア局在の抑制

ミトコンドリア障害により引き起こされる Type 2 mitophagy では E3 ubiquitin ligase である Parkin が PINK 1 によりリン酸化されてミトコンドリア外膜へ局在し、ミトコンドリアを autophagy 経路により分解する。JFH1 感染細胞ならびに HCV TgM と HCV-Chimera の肝組織では Parkin のミトコンドリア局在が有意に抑制された (図 1)。しかし、PINK 1 のミトコンドリアへの局在は HCV 感染に関係なく障害されなかった。更には siRNA で PINK 1 をノックアウトすると Parkin のリン酸化ならびにミトコンドリアへの局在は抑制された。

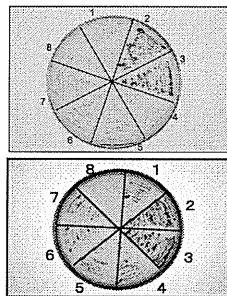
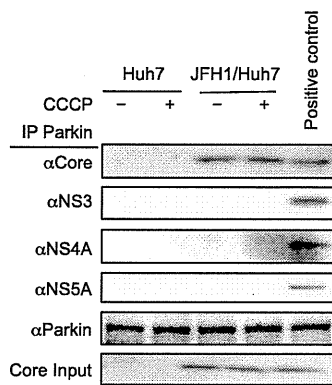
図 1



### 2. Parkin と HCV コアタンパクの結合

次に Parkin のミトコンドリアへの局在が抑制された原因を明らかにするために、Parkin と HCV タンパクとの結合を検討したところ、図 2 に示すように、共免疫沈降では Parkin と HCV コアタンパクの結合を認められた。さらに Parkin のどの部分と結合するのか yeast two hybrid assay で検討した (図 2) ところ、HCV コアタンパクは Parkin の N 端側 (215 個のアミノ酸) のみと結合した。

図 2



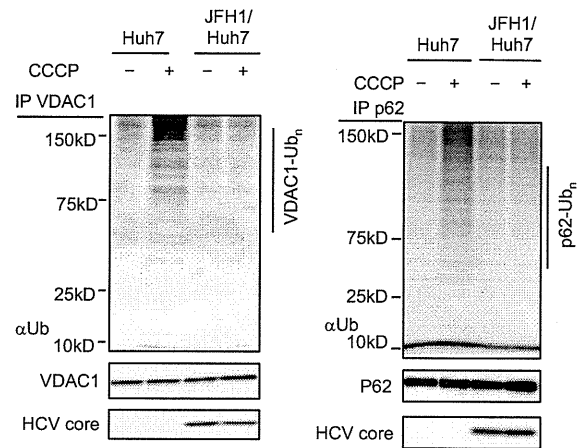
- | BAIT                | PREY           |
|---------------------|----------------|
| 1. Negative control |                |
| 2. Positive control |                |
| 3. HCV core         | Parkin 1-215   |
| 4. HCV core         | Parkin 216-465 |
| 5. HCV core         | vector         |
| 6. vector           | Parkin 1-215   |
| 7. vector           | Parkin 216-465 |
| 8. no yeast         |                |

興味深いことにParkinをsiRNAでノックアウトするとParkinの発現が有意に低下したことから、HCVコアタンパクとParkinの結合はHCV増殖に有利に作用していると考えられた。

### 3. ミトコンドリア外膜タンパクのユビキチン化抑制

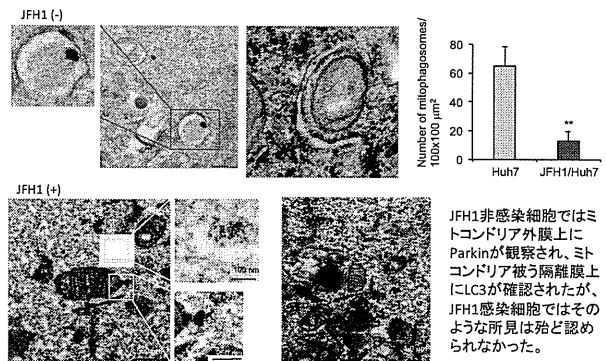
Parkinのミトコンドリアへの局在に引き続いて起こるのはミトコンドリア外膜タンパクのユビキチン化である。CCCPによるmitophagy誘導後JFH1感染細胞は非感染細胞にくらべて図3に示すようにVDAC1ならびにp62のユビキチン化が明らかに抑制された。

図 3



### 4. Mitophagosome形成の抑制

図 4



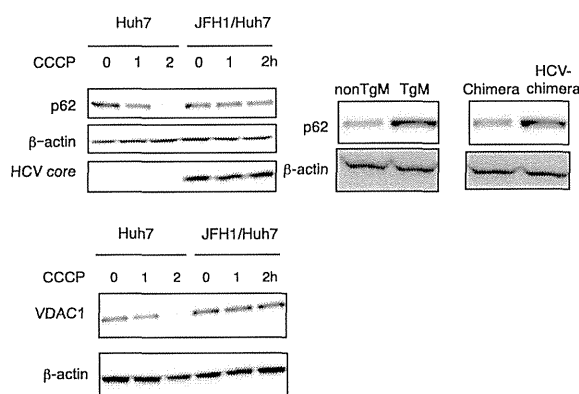
JFH1非感染細胞ではミトコンドリア外膜上にParkinが観察され、ミトコンドリア被う隔離膜上にLC3が確認されたが、JFH1感染細胞ではそのような所見は殆ど認められなかった。

JFH1感染細胞では非感染細胞に比べてLC3-IIタンパクの発現が有意に高かった。また、免疫電子顕微鏡による観察では、図4に示すようにJFH1非感染細胞にmitophagyを誘導するとミトコンドリア外膜上にParkinの局在が確認され、またミトコンドリアを被う隔離膜上にLC3の局在が確認された。一方、JFH1感染細胞ではそのような所見が殆ど観察されなかった。さらに100 μm²あたりのmitophagosomeの数はJFH1感染細胞で有意に少なかった。

## 5. 障害ミトコンドリアの消化抑制

MitophagyにおいてMitophagosome形成後はlysosomeと融合してmitophagosomeに内包される障害ミトコンドリアは消化される。障害ミトコンドリアの消化の指標としてCCCP処理後のp62とVDAC1の発現量を検討した。図5に示すように、JFH1感染細胞およびHCV TgMとHCV-Chimeraの肝組織においてはCCCP処理後のp62の減少はコントロールに比べて有意に小さかった。同様に、CCCP処理後のVDAC1の減少も有意に小さかった。

図5



## D. 考察

今回の成績は、HCV コアタンパクがParkinのN端側領域と結合することでParkinのミトコンドリアへの局在が抑制され、それより下流のmitophagyのシグナル（ミトコンドリアのユビキチン化、mitophagosomeの形成、mitophagosomeの消化）がすべて抑制されることを示している。つまり、障害されたミトコンドリアがmitophagyによって消化されることが抑制されることを意味しており、HCV感染における持続的なROS産生、酸化ストレスの増

幅を引き起こす重要な機序と考えられる。MitophagyはミトコンドリアDNAの変異を抑制することが報告されており、一方ヒトHCV関連肝細胞癌組織の癌部・非癌部においてミトコンドリアDNAの変異が蓄積されているという報告も考慮すると、HCVコアタンパクによるmitophagyの抑制は酸化ストレスを介した肝発癌機構の観点からも重要な病態であると考えられる。

## E. 結論

HCV コアタンパクはType 2 mitophagyの実行分子であり、E3 ubiquitin ligaseであるParkinのN端側領域と結合することでParkinのミトコンドリアへの局在を阻害し、これによりmitophagyを抑制する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, Kato N, Imamura M, Chayama K, **Hino K**. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with parkin in the context of mitochondrial depolarization. *Am J Pathol* 2014;184:3026-39.
- 2) Korenaga M, Nishina S, Korenaga K, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Sasaki Y, Shimonaka Y, **Hino K**. Branched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice. *Liver Int* 2014;doi 10.1111/liv.12675.
- 3) Tomiyama Y, Nishina S, Hara Y, Kawase T, **Hino K**. Hepatic oxidative stress in

- ovariectomized transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein is augmented through suppression of adenosine monophosphate-activated protein kinase/proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha signaling. *Hepatol Res* 2014;44:E229-39.
- 4) **Hino K**, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. *Hepatol Res* 2014;44:123-32.
- 5) Abe M, Miyake T, Huno A, Imai Y, Sawai Y, **Hino K**, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. Association between Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2014;doi 10.1007/s00535-014-1007-2.
- 6) Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsushashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, **Hino K**, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum genet* 2014;doi 10.1007/s00439-014-1520-7.
- 7) Nishida N, **Hino K**, et al. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 2014;9:e86449
- 8) Omata M, Nishiguchi S, Ueno Y, Mochizuki H, Izumi N, Ikeda F, Toyoda H, Yokosuka O, Nirei K, Gueda T, Umemura T, Takehara T, Sakamoto N, Nishigaki Y, Nakane K, Toda N, Ide T, Yanase M, **Hino K**, Gao B, Garrison KL, Dvory-Sobol H, Ishizaki A, Omote M, Brainard D, Knox S, Symonds WT, McHutchison JG, Yatsushashi H, Mizokami M. Sofosbuvir plus ribavirin in Japanese patients with chronic genotype 2 HCV infection: an open-label, phase 3 trial. *J Viral Hepat* 2014;doi 10.1111/jvh.12312
- 9) Nakamura M, Nakashima H, Abe T, Ensako T, Yoshida K, **Hino K**. Gemcitabine-based Adjuvant Chemotherapy for Patients with Advanced Gallbladder Cancer. *Anticancer Res* 2014;34:3125-9.
2. 学会発表
- 1) Nishina S, Hyogo H, Kawanaka M, Miyake T, Abe M, Yamashita S, Tobita H, Sato S, Hoasa Y, Chayama K, **Hino K**. Oral glucose tolerance test predicts hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease patient without overt diabetes mellitus. AASLD The liver Meeting Boston 2014.
- 2) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Chayama K, **Hino K**. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization. 5<sup>th</sup> World Congress on Targeting Mitochondria. Berlin 2014.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）]

分担研究報告書

HCVの長期複製により発現変動した宿主因子の細胞癌化に及ぼす影響

研究分担者：加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の複製が細胞内で長期に及んだ場合において、細胞機能、特に細胞癌化にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。具体的には、HCV研究に汎用されているヒト肝癌細胞株HuH-7とは異なる遺伝子発現プロファイルを示すヒト肝癌細胞株Li23由来の細胞を用いて、HCV-RNAの長期複製による細胞機能の変化の解明とともに、長期のHCV-RNAの複製により顕著に発現低下し肝病態の悪化に関与していると考えられる2つの宿主遺伝子*CPB2*と*BASPI1*に焦点を当て、それらの発現低下の分子機構を明らかにすることを目的とした。昨年度、これらの遺伝子の発現低下とDNAのメチル化度との関連性を示唆する結果を得たため、今年度はさらに詳細に解析を行い、以下に示すような研究成果を得た（1）*CPB2*遺伝子の発現低下はDNAのメチル化によることが示唆された。プロモーター領域の詳細な解析により*CPB2*遺伝子の発現は肝特異的転写因子HNF1により完全に制御されていることを明らかにした。しかしながら、HNF1結合領域のメチル化度でこの遺伝子の発現低下を説明できず、脱メチル化剤で誘導されるHNF1以外の未知の宿主因子が、この遺伝子の発現低下を引き起こすことが示唆された。（2）*BASPI1*遺伝子の発現低下の大部分は、プロモーター領域のメチル化では説明できずメチル化以外の分子機序によるものであることが分かった。以上の結果、両遺伝子の発現低下は異なる分子機序により引き起こされていると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染は肝がん患者の約7割に認められており、HCVの持続感染状態であるC型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCVを体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。C型慢性肝炎に対する治療もPEG化インターフェロン、リバビリンおよびシメプレビル（HCVプロテアーゼ阻害剤）による三剤併

用療法などにより患者の80-90%は治癒するようになった。しかしながら、治癒しても、一定の確率で発がんが起るものと予想されている。さらに、HCVの持続感染による発がん機構については、諸説あるものの未だ解明されていない。それは、HCVが宿主において持続的に増殖した場合に、宿主がどのような影響を受けるかについてよく理解されていないためである。これまで、多くの研究者が、この問題の解明を試みて来

たが、HCVが増殖する培養細胞株はヒト肝癌由来のHuH-7細胞株のみで手詰まり状態であった。ヒト肝置換キメラマウスも実験系として使われているものの、費用がかかるうえにHCVの増殖に個体差があることから発がんに関する研究にはあまり適していない。

2009年、我々は、HuH-7細胞株とは遺伝子発現プロファイルが異なるヒト肝癌細胞株Li23がHCVの増殖を許容することを見出し報告した。そして、このLi23由来の細胞を用いることによりHCV 1b遺伝子型（0株）のHCV-RNA複製細胞株として4種類（OL, OL8, OL11およびOL14細胞と名付けた）樹立することに成功した。

我々は、樹立したこれらのHCV-RNA複製細胞を用いることにより、これまでのHuH-7由来の細胞を用いた研究では得られなかった知見が新たに見出されるのではないかと考えた。また、これまで、HCVの短期的な複製増殖に関与する多くの宿主因子の同定がなされて来た。我々は、このような方向の研究ではなく、HCVの複製増殖が長期に及んだ場合に宿主側に何らかの変化が生じ、それが蓄積して結果的には不可逆的な大きな変化になるのではないかという仮説を立てた。その背景には、HCVの複製が長期に及ぶとHCVの遺伝的変異が蓄積され、それに伴い宿主因子の機能にも影響が出るのではないかという考えがある。事実、4年間、細胞を培養した場合には、細胞の増殖能が亢進し、HCVの遺伝的変異も時間に比例して蓄積し（4年間で1.3-3.2%塩基が変異する）、HCVの遺伝的多様性も時間に比例して増大（HCVのクローン間で0.2-

1.9%塩基が異なる）することを明らかにして報告した(Kato et al, PLoS ONE e91156, 2014)。

我々は、上記の仮説の検証を試み、HCV-RNAの長期複製（2年以上）により不可逆的に発現変動した9種類の宿主遺伝子（発現亢進した *WISP3*, *TBC1D4*, *ANGPT1*, *SEL1L3*および*CDKN2C*遺伝子と発現低下した *BASPI*, *CPB2*, *ANXA1*および*SLCIA3*遺伝子）を2012年に同定した。同定した9種類の宿主遺伝子の発現変動と肝病態との関係をC型慢性肝炎91症例で調査した（金沢大学の金子周一先生と本多政夫先生に依頼）。その結果、幾つかの遺伝子の発現変動と肝線維化や脂肪化と相関関係にあることが分かった。その中でも顕著な発現低下（2年間で数十分の1に低下）が観察された*CPB2*遺伝子については、その発現低下と肝線維化や脂肪化との間に相関関係があることが分かった。そこで、本研究ではHCV-RNAの長期複製による細胞形質の変化を明らかにするとともに、顕著な発現抑制が観察され肝病態の進行への関与の可能性が示唆された*CPB2* (Carboxypeptidase B2)と*CPB2*以上に顕著な発現低下が認められた*BASPI* (Brain abundant, membrane attached signal protein 1)に焦点を当て、これらの遺伝子の発現低下がどのような分子機序により起こったのかを明らかにすることを目指した。昨年度から継続して研究を遂行し今年度は、以下に示すような研究成果を得た。

## B. 研究方法

### *CPB2*と*BASPI*遺伝子の発現変動解析

OL8細胞等に脱メチル化剤である5-



azacytidine (5-azaC) (2.5-10  $\mu$ M) を添加して、1週間後に細胞からTotal RNAを調製した。このRNAを用いて、*BASP1* と *CPB2* の mRNA の発現レベルをLightCyclerを用いた定量的RT-PCR法により調べた。

#### CPB2とBASP1遺伝子のプロモーター解析

OL8細胞等から抽出調製したDNAを用いてPCRにより調製した*BASP1* と *CPB2* 遺伝子の転写開始点上流約2 kbと転写開始点下流100 baseほどを含むDNAフラグメントから、適時必要な領域や一部の配列に変異を加えたDNAフラグメントをPCRで調製して、市販のpGL4.10[luc2]ベクター（ホタルルシフェラーゼをコードしている）の*NheI* と *HindIII* サイトに導入した。得られたプラスミドベクター(0.4  $\mu$ g)を内部コントロール（レニラルシフェラーゼをコードしている）として用いたpRL-SV40(0.4 ng) 或は pRL-CMV (0.4 ng) とともにFuGENE HDにてOL8(0Y)細胞（樹立時のOL8細胞であることを示す）或はOL8(2Y)細胞（2年継代培養したことを示す）に導入した。48時間後に、ホタルルシフェラーゼとレニラルシフェラーゼを測定して、ホタルルシフェラーゼ値を補正した。このルシフェラーゼアッセイ系においてsiRNAを使用する場合には、レポータープラスミドを導入する前日にsiRNAをRNAiMAXを用いて細胞に導入して、以後同様にアッセイを行った。

#### CPB2とBASP1遺伝子のプロモーター近傍のDNAメチル化解析

OL8細胞等から抽出調製したDNAをMethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit（タカラバイオ）を用いてbisulfite（重亜硫酸塩）処理してDNAの

CytosineをUracilに変換した。処理したDNAを鋳型として、*BASP1* と *CPB2* 遺伝子プロモーター領域近傍（数百bp）をTaKaRa EpiTaq™ HS（タカラバイオ）を用いてPCRを行い増幅した。増幅産物をT-ベクターpMD19（タカラバイオ）にクローニングし、それぞれ得られた30クローン程度について塩基配列を決定した。これにより、どのCpGのCがメチル化されているかを決定し、それぞれの部位でのメチル化度を算出した。定量的RT-PCR解析とウェスタンブロット解析

OL8細胞等から調製したTotal RNAとタンパク質抽出物を用いて、目的とするmRNAの定量をLightCyclerを用いたRT-PCR法により、目的とするタンパク質の検出についてはウェスタンブロット法により解析した。

（倫理面への配慮）

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものである。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後、に廃棄した。

### C. 研究結果

#### （1）HCV-RNAの長期複製による細胞形質の変化

昨年度までにHCV-RNAの長期複製細胞では、細胞の倍加時間が短くなることを明らかにした。しかし、この現象はHCV-RNAが排除された治癒細胞を長期に培養継代した場合においても観察される現象であったことから、HCVの長期複製による効果ではなかった。

同様に、アポトーシス感受性（TNF- $\alpha$ と

Cycloheximideによるアポトーシス)もHCV-RNA複製細胞で上昇する現象が認められたが、これについても、HCV特異的な現象とは言えないことが分かった。また、足場非依存性については、HCV-RNA複製細胞および治癒細胞ともに長期培養によっても形質上の差は認められなかった。

## (2) *CPB2*遺伝子の発現低下が起こる分子機序について

昨年度までの解析で、*CPB2*遺伝子の発現レベルはOL8細胞の培養開始後、0.5年から1年の間に大きく低下すると、OL8(2Y)細胞を脱メチル化剤である5-azaC(2.5  $\mu$ M)で2日ほど処理することで発現レベルがある程度回復する現象を見出していたので、今年度はさらにこの現象を詳細に解析した。

今回は、5-azaCの濃度を2.5  $\mu$ Mと10  $\mu$ Mとし、処理時間も1週間に延ばして、OL8(OY)、OL8(2Y)およびOL8(4Y)細胞を用いて検討した。その結果、5-azaC 2.5  $\mu$ M(10  $\mu$ Mでも同様)で1週間処理すると、OL8(2Y)とOL8(4Y)細胞における*CPB2* mRNAのレベルは、OL8(OY)細胞におけるレベルの50%以上に回復することが分かった。5-azaC処理によってもOL8(OY)細胞での発現上昇は認められないことから、*CPB2*の発現低下は、DNAのメチル化により引き起こされていることが示唆された。このメチル化は*CPB2*遺伝子のプロモーター領域で起こっていると予想されたことから、次に、この遺伝子のプロモーター活性の責任領域の同定を試みた。

昨年度、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより*CPB2*プロモーター活性が転写開

始点上流-100から-25の間に存在していることを示した。この範囲にはHNF1(Hepatocyte Nuclear Factor 1;肝細胞転写制御因子)結合配列(コンセンサス配列はGTTAATNWTTAAC)に類似の配列(GTTATATTTTAAC)が存在していたので、今年度は、HNF1が*CPB2*遺伝子プロモーターの制御因子であるかどうかの検討を行った。プロモーター領域(-100から+76まで含む)の中でHNF1結合配列の5'側に存在するGTをCAに変えた変異体1、同配列の3'側に存在するTAACをATTGに変えた変異体2、同配列の中央部に存在するTAをコンセンサス配列に合うようにATに変えた変異体3を作成して、それらをOL8(OY)細胞に導入してレポーターアッセイを行った。その結果、変異体1と2ではプロモーター活性が完全に消失し、変異体3では、逆に2倍程度活性が上昇した。この結果から、*CPB2*遺伝子プロモーターは完全にHNF1により制御されていることが示唆された。次にHNF1のsiRNA(HNF1にはHNF1 $\alpha$ とHNF1 $\beta$ が存在することが知られているので、2種類のsiRNAを使用)を用いて、HNF1の発現を抑制した状態で、同様にレポーターアッセイを行った。この際、念のため、*CPB2*遺伝子上流-2600から+76までを含むようにして上記の3種類の変異体を作成してアッセイを行った。その結果、変異のないものでも、siRNAでHNF1をノックダウンさせると、プロモーター活性は著しく低下し、-100から+76までの領域で行った結果と同様、変異体1と2については、まったくプロモーター活性が検出されなくなった。これらの結果から、*CPB2*遺伝子プロモーターは完全

にHNF1により制御されていることが再確認された。変異体3についても、-100から+76までの領域を含むプラスミドを導入して行ったアッセイ結果と同様、プロモーター活性は2倍程度上昇した。しかしながら、HNF1のsiRNAを使用した場合においても、プロモーター活性がまったく低下しないという予想とは逆の結果を得た。この結果からコンセンサス配列に変えることにより、HNF1以外の未知の宿主因子が相補的に結合して、転写活性を維持していることが示唆された。

次に、*CPB2*の遺伝子プロモーター近傍(-500から+300)について、DNAのメチル化度がどの程度変化しているかについて解析した。OL8(0Y)とOL8(2Y)細胞から調製したDNAをバイサルファイトで処理してCpGにおけるメチル化度を解析した。解析した領域におけるCpG配列はそもそも5カ所と少なく、プロモーターとして同定した-100から-25の間には1カ所しか存在していない。その部位は、-31(G)から始まるHNF1の結合配列にかかる-32のCである。今回のメチル化解析では、-32(C)のメチル化度は、OL8(0Y)で10%、OL8(2Y)で20%であることが分かった。つまり、*CPB2*遺伝子の顕著な発現低下は、*CPB2*遺伝子プロモーター部位のメチル化では説明できないことが分かった。

次に、HNF1の発現レベルの低下により*CPB2*遺伝子の発現低下が引き起こされている可能性について検討した。まず、*HNF-1 $\alpha$* と*HNF1 $\beta$* のmRNAレベルをOL8(0Y)、OL8(2Y)およびOL8(4Y)細胞で定量的RT-PCR法により比較したところ、まったく低下していないことが分かった。同様にウエスタ

ンブロット解析によってもHNF-1 $\alpha$ とHNF-1 $\beta$ タンパク質の量が、OL8(0Y)、OL8(2Y)およびOL8(4Y)間でほとんど差がないことが分かった。これらの結果から、*CPB2*遺伝子の発現低下にHNF-1 $\alpha$ やHNF-1 $\beta$ が直接関与していないことが示唆された。

### (3) *BASPI*遺伝子の発現低下が起こる分子機序について

昨年度までの解析で、*BASPI*遺伝子の発現レベルはOL8細胞の培養開始後、経時的に徐々に低下することを示した。しかしながら、OL8(2Y)細胞を脱メチル化剤である5-azaC(2.5  $\mu$ M)で2日ほど処理しても、発現レベルの回復はわずかしか見られないことに示した。今年度は、まず、これまでの5-azaCの処理が不十分であったのはいかという可能性について検討を行った。

*BASPI*についても、*CPB2*の場合と同様、5-azaCの濃度を2.5  $\mu$ Mと10  $\mu$ Mとし、処理時間も1週間に延ばして、OL8(0Y)、OL8(2Y)およびOL8(4Y)細胞を用いて検討した。その結果、5-azaCの濃度を上げて1週間処理すると、5-azaCで処理されたOL8(2Y)とOL8(4Y)細胞における*BASPI* mRNAのレベルは、未処理の細胞におけるmRNAレベルと比較して、それぞれ4倍程度発現レベルの上昇が観察された。しかしながら、OL8(0Y)細胞を5-azaCで処理した際にも2倍程度発現レベルが上昇したことから、OL8(2Y)やOL8(4Y)細胞における発現レベルの回復は極めて限定的であることが分かった。OL8(2Y)細胞の場合は、10  $\mu$ Mでの5-azaC処理によっても、OL8(0Y)と比較して、未だ60分の1程度と発現レベルが低く、

OL8(4Y)細胞にいたっては、100分の1以下であった。これらの結果から、この遺伝子の発現低下は、DNAのメチル化では説明できないことが分かった。次に、*BASPI*遺伝子がどのような宿主因子により制御を受けているかを明らかにするために、遺伝子プロモーターの責任領域の同定作業を*CPB2*の場合と同様の手法により行った。昨年度はOL8(0Y)細胞を用いて、プロモーター活性の大部分は-206から-50の間に存在することを示していたので、今回は、まず、OL8(2Y)細胞でも同じ現象が認められるかどうかを検討した。その結果、OL8(2Y)細胞においてもOL8(0Y)細胞と同様プロモーター活性の大部分は-206から-50の間に存在すること、そして、-150、-100、-50と短くしていくことにより段階的にプロモーター活性が減弱していくことが分かった。-206から-50の間は、GCに富む配列が特徴的であり、転写因子Sp1等が結合するGCボックスのコンセンサス配列(GGGCGG或いはGGCGGG)が計5カ所存在することから、これらの配列に結合する宿主因子により*BASPI*の転写制御が行われていることが示唆された。しかしながら、OL8(0Y)やOL8(2Y)細胞におけるSp1の発現レベルには大きな差は認められなかったため、OL8細胞系では、Sp1以外のGCボックス結合因子の関与が示唆された。

このような解析と並行して、*BASPI*遺伝子プロモーター近傍(-400から+300)におけるCpG部位のメチル化解析も昨年度から継続して行った。昨年度、OL8(0Y)とOL8(2Y)細胞の*BASPI*遺伝子プロモーター領域のCpGのメチル化度について、*CPB2*の場

合と同様に調べた結果、OL8(2Y)細胞でも、OL8(0Y)細胞に比べて、このプロモーター近傍のメチル化度は高くなっていることが分かった。しかしながら、レポーターアッセイで判明した-206から-50の領域におけるメチル化度はOL8(0Y)細胞では0-10%程度で、OL8(2Y)細胞でも20-30%程度であった。そのため、今年度は再現性も確かめるため、再度実験を行い、クローン数も10クローンから30クローン程度に増やして解析した。その結果、昨年度に得られた実験結果が再現され、やはりOL8(2Y)細胞ではメチル化がそれほど進んでいないことが確かめられた。OL8(2Y)細胞に5-azaC(10  $\mu$ M)を添加して1週間経過した細胞における*BASPI*プロモーター領域のメチル化度についても解析し、メチル化度の低下を確認できた。それにも関わらず、*BASPI*の発現レベルの回復が認められなかったことから、*BASPI*の発現レベルの低下はメチル化以外の分子機序により生じていることが示唆された。

#### D. 考察

##### (1) HCV-RNAの長期複製による細胞形質の変化

現在までのところ、HCVの長期複製により影響を受けたと思われる細胞の形質変化は見出されていないが、今後は、各種シグナル伝達系(インターフェロン系、TGF- $\beta$ 系、IL-6系、EGF系など)における変化について検討する予定である。

##### (2) *CPB2*遺伝子の発現低下が起こる分子機序について

これまでの解析により、HCV-RNAが長期に複製した細胞で起こる*CPB2*遺伝子の発現

低下はDNAのメチル化によることが明らかとなった。しかしながら、この遺伝子のプロモーター活性をコントロールするHNF1結合部位のメチル化では説明できず、HNF1の発現低下が原因でもなかった。HNF1の局在変化による機能低下の可能性は残るものの、これまでに得られた結果から、脱メチル化剤で誘導されるHNF1以外の未知の宿主因子により、この遺伝子の発現低下が引き起こされていることが予想される。そのような因子は、OL8(0Y)細胞と比較して、OL8(2Y)細胞で発現が低下して、OL8(2Y)細胞を5-azaCで処理した際に発現レベルが大きく亢進すると予想される。OL8(0Y)とOL8(2Y)細胞を用いて、これまでに得られたDNAメチル化に関する現象が別系統の細胞系列であるOL11(0Y)とOL11(2Y)細胞でも得られるかどうかを検討し、OL8とOL11の両細胞系列を用いたcDNAマイクロアレイ解析で目的の未知宿主因子の絞り込みが可能であると考えられる。次年度はこの点を検討する予定である。

*CPB2*遺伝子の発現レベルの低下と肝病態の進展（線維化や脂肪化）に相関関係があることが慢性C型肝炎患者で認められているので、*CPB2*が何らかの役割を担っている可能性がある。具体的には*CPB2*の発現が低下したOL8(2Y)細胞に*CPB2*遺伝子を過剰発現させると、線維化シグナル（コラゲゲン等）や脂肪化シグナル（SRBP-1やFASN等）の抑制が引き起こされる可能性がある。現在、このような方向の研究を進めており、予備的な実験では、予想どおりの傾向を認めているので、次年度はこの方面の研究を推進する予定である。

（3）*BASPI*遺伝子の発現低下が起こる分子機序について

これまでの解析により、*BASPI*遺伝子の発現低下の大部分は、プロモーター領域のメチル化によるものではなく、メチル化以外の分子機序によるものであることが分かった。その1つの可能性としては、ヒストン脱アセチル化による影響が考えられる。しかしながら、この可能性については、昨年度に引き続いて今年度もHDAC阻害剤を用いて詳細に検討したが、発現回復効果はほとんど認められなかった。従って、現時点においては、この可能性はほとんどないと考えている。今年度のプロモーター解析で、プロモーター活性はGCボックス配列で制御されている可能性が高いことが明らかになったので、普遍的に発現しており2年間の培養では発現変動のなかったSp1以外のGCボックス結合因子（促進的に作用するKLF5や抑制的に作用するG10BPやSp3）がこの遺伝子の転写制御に関与している可能性について今後、調べる予定である。それ以外には、転写開始点から2kb以上上流の領域（2kbまでは変異がないことを確認済み）やmRNAの3'側下流における遺伝子変異の有無、この遺伝子の発現に関与するmiRNAの変動の有無についても検討する予定である。

#### E. 結論

今年度、以下に示した2項目の成果を得た。（1）*CPB2*遺伝子の発現低下はDNAのメチル化によることと、この遺伝子の発現はHNF1により完全に制御されていることを明らかにした。しかし、HNF1結合領域のメチル化度ではこの遺伝子の発現低下を説明できず、脱メチル化剤で誘導されるHNF1以外の未知の宿主因子が、この遺伝子の発現低下を引き起こしていることが示唆された。（2）*BASPI*遺伝子の発現低下の大部分は、

プロモーター領域のメチル化では説明できずメチル化以外の分子機序によるものであることが分かった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive 1 entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol*, 95(12):2658-2667 (2014).
- 2) Shimada H, Haraguchi K, Hotta K, Miyaike T, Kitagawa Y, Tanaka H, Kaneda R, Abe H, Shuto S, Mori K, Ueda Y, Kato N, Snoeck R, Andrei G, Balzarini J. Synthesis of 3',4'-difluoro-3'-deoxyribonucleosides and its evaluation of the biological activities: Discovery of a novel type of anti-HCV agent 3',4'-difluorocordycepin. *Bioorg Med Chem*, 22(21):6174-6182 (2014).
- 3) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, Kato N, Imamura M, Chayama K, Hino K. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization. *Amer J Pathol*, 184(11):3026-3039 (2014).
- 4) Matsuno K, Ueda Y, Fukuda M, Onoda K, Waki M, Ikeda M, Kato N, Miyachi H. Synthesis and inhibitory activity on hepatitis C virus RNA replication of 4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxy-2-propyl)aniline analogs. *Bioorg Med Chem Lett*, 27(17): 4276-4280 (2014).
- 5) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T,

Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*, 462-463: 166-174 (2014).

- 6) Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 447(2):341-345 (2014).
- 7) Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. *PLoS ONE*, 9(3): e91156 (2014).
- 8) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J Immunol*, 192(6): 2770-2777 (2014).

### 2. 学会発表

- 1) 瀬島 寛恵、佐藤 伸哉、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. 長期にわたるHCV-RNA複製によるBASP1とCPB2遺伝子の発現低下の分子機構の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月.
- 2) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスのライフサイクルにおけるRab13の重要性. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月.
- 3) 瀬島 寛恵、佐藤 伸哉、團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. HCV-RNAの長期複製によって発現低下したBASP1とCPB2

遺伝子の発現制御機構の解析. 第18回日本肝臓学会大会 (JDDW)、神戸、2014年10月.

4) 瀬島 寛恵 佐藤 伸哉 團迫 浩方 池田 正徳 加藤 宣之. C型肝炎ウイルスRNAの長期細胞内複製によって発現低下した遺伝子の発現制御機構の解析. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月.

5) Sejima H, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Analysis on transcriptional regulatory mechanisms of genes whose expressions were reduced during long-term intracellular HCV-RNA replication. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September, 2014.

6) Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 negatively regulates HCV RNA replication. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September, 2014.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）]

分担研究報告書

HCV NS5Aと宿主因子の相互作用及び細胞癌化に及ぼす影響の解析

研究分担者：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染において、宿主細胞の様々なシグナル経路が攪乱・脱制御されており、このことがHCVによる癌化、代謝異常等の多彩な病原性発現の根底にある。HCVの非構造タンパク質NS5Aは多機能タンパク質であり、多数の宿主因子と相互作用することが知られている。我々はこれまでに、タンデムアフィニティー精製／質量分析法を用いて、新規NS5A結合宿主因子として、ヒストンメチル基転移酵素SMYD3を同定した。SMYD3は乳癌をはじめ肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌などで過剰発現している。SMYD3はヒストンのメチル化を介してクロマチンの構造変換を引き起し、様々な遺伝子の発現制御に関与すると報告されたが、他に、Ras癌遺伝子のシグナル伝達経路を調節するMAP3K2をメチル化し、その経路を活性化することが最近報告された。

本研究では、NS5AとSMYD3の相互作用がSMYD3によるMAP3K2のメチル化及び下流のシグナル伝達経路に及ぼす影響を調べるとともに、HCVのライフサイクルに及ぼす影響について解析した。その結果、NS5AがSMYD3によるMAP3K2のメチル化を増強することを明らかにした。さらに、NS5AとSMYD3の相互作用により、Ras癌遺伝子シグナル伝達経路の下流に位置するAPIを介した転写が亢進することも明らかにした。一方、SMYD3の過剰発現あるいはノックダウンは、HCV RNA複製、HCVタンパク質合成、HCV粒子形成・放出に有意な影響を及ぼさなかった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染において、宿主細胞の様々なシグナル経路が攪乱・脱制御されており、このことがHCVによる癌化、代謝異常等の多彩な病原性発現の根底にある。HCV非構造タンパク質NS5Aは多機能タンパク質であり、多数の宿主因子と相互作用して細胞内シグナル伝達経路を脱制御することが知られている。

我々はこれまでに、タンデムアフィニテ

ィー精製／質量分析法を用いて、新規NS5A結合宿主因子として、ヒストンメチル基転移酵素SMYD3を同定した。SMYD3は乳癌をはじめ肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌などで過剰発現していることが知られている。SMYD3はヒストンH3のK4やヒストンH4のK5、K20等をメチル化し、クロマチンの構造変換を引き起こすことによって、様々な原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子及び癌細胞の浸潤・転移に係る遺伝子の発現制御に関与



している。また、SMYD3がRas癌遺伝子のシグナル伝達経路を調節するMAP3K2をメチル化し、その経路を活性化することが最近報告された。

本研究では、HCV NS5AとSMYD3の相互作用がMAP3K2のメチル化及び下流のシグナル伝達経路に及ぼす影響を調べるとともに、HCVのライフサイクルに及ぼす影響について解析した。

## B. 研究方法

(1) ウイルスと細胞：ウイルスはHCV J6/JFH-1株（ロックフェラー大学 C. Rice教授より分与）をHuh7.5細胞（Rice教授より分与）で長期間継代培養した適応変異株（HCV J6/JFH1-P47株）を用いた。他に、HCV全長ゲノムRNA（0株；岡山大学・加藤宣之教授より分与）が自律複製するHCVフルゲノムレプリコン細胞も用いた。

(2) NS5AとSMYD3の結合の解析：NS5A及びSMYD3の全長ならびに欠失変異タンパク質を発現するプラスミドを用いてHuh7.5細胞に一過性に共発現させ、特異抗体を用いた免疫共沈法により、両者の結合に必要な領域を解析した。

(3) SMYD3の細胞内局在に及ぼすNS5Aの責任ドメインの解析：NS5Aの全長及び欠失変異タンパク質ならびに全長SMYD3を発現するプラスミドを用いてHuh7.5細胞に一過性に共発現させ、NS5A及びSMYD3の細胞内局在の変化について、蛍光抗体法により解析した。

(4) MAP3K2を基質としたSMYD3の*in vitro*メチル基転移酵素活性の測定：精製SMYD3あるいはSMYD3過剰発現細胞の抽出液

と精製MAP3K2を、S-[methyl-<sup>14</sup>C]-adenosyl-L-methionine存在下で混合し、SMYD3によるMAP3K2メチル化反応を行った。メチル化MAP3K2は特異抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。

(5) AP1を介した転写活性の測定：AP1応答エレメントをプロモーター配列に有するルシフェラーゼレポータープラスミドを細胞にトランスフェクトし、細胞抽出液を回収して、ルシフェラーゼアッセイによりAP1を介した転写量を測定した。

(6) HCV ライフサイクルに及ぼす SMYD3 の影響の解析：発現プラスミドにより SMYD3 を過剰発現し、あるいは、siRNA により SMYD3 をノックダウンして、HCV ライフサイクルの各段階（HCV RNA 複製、HCV タンパク質合成、HCV 粒子形成・放出）について、リアルタイム PCR、免疫ブロット法、培養液中のウイルス感染価測定法により解析した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え HCV の使用は文部科学大臣の確認及び神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。ウイルス感染実験は、微生物学研究室において、遺伝子組換え実験及びバイオセーフティーに関する法令・規則及び指針等に準拠して実施した。

## C. 研究結果

（1）NS5AとSMYD3の結合領域の同定

免疫共沈法によりNS5AとSMYD3の結合領域について検討した。NS5Aのドメイン2+3は、全長NS5Aと同程度に顕著にSMYD3と共沈した。一方、NS5Aドメイン1+2はSMYD3とわずかに共沈するのみであった。ドメイン

1単独あるいはドメイン3単独はSMYD3と全く共沈しなかった。以上の結果より、NS5Aのドメイン2+3がSMYD3との結合に重要であると推測された。

SMYD3に関しては、HCVフルゲノムレプリコン細胞を用いた解析により、SMYD3のN末端48アミノ酸(aa)からなるN-SETドメインを欠失するとNS5Aとの共沈が有意に低下した。さらにMYNDドメイン(49~87aa)まで欠失すると、NS5Aとの共沈はさらに有意に低下し、わずかに共沈が認められるのみであった。以上の結果から、HCVフルゲノムレプリコン細胞において、SMYD3のN末端87aa領域(N-SET+MYNDドメイン)がNS5Aとの結合に重要であることが明らかになった。

(2) SMYD3の細胞内局在に及ぼすNS5Aの責任ドメインの同定

我々はこれまでに、発現プラスミドを用いた一過性発現系において、全長NS5Aは全長SMYD3の核移行を阻害することを観察している。今回の解析では、NS5Aの欠失変異体を発現させて、SMYD3の核移行の阻害にNS5Aのどのドメインが関与しているかを調べた。その結果、NS5Aのドメイン2+3及びドメイン3単独が、全長NS5Aと同程度に、SMYD3の核移行を阻害することがわかった。

(3) SMYD3によるMAP3K2メチル化に及ぼすNS5Aの影響

精製MAP3K2を基質として、精製SMYD3とS-[methyl-<sup>14</sup>C]-adenosyl-L-methionine (SAM)を加え、SMYD3によるMAP3K2メチル化反応を行った。特異抗体を用いた免疫ブロット法によりメチル化MAP3K2を検出し、本*in vitro*メチル基転移酵素活性アッセイ系が機能していることを確認した。

次いで、SMYD3あるいはNS5Aをそれぞれ単独で発現する細胞、SMYD3+NS5Aを共発現する細胞及び非発現対照細胞から抽出液を回収し、それを用いてMAP3K2を基質として*in vitro*メチル化反応を行い、免疫ブロット法によりメチル化MAP3K2の量を測定した。その結果、SMYD3によるMAP3K2のメチル化はNS5Aの共存下で有意に増強することが明らかになった。

(4) AP1を介した転写活性に及ぼすNS5A/SMYD3相互作用の影響

SMYD3単独、NS5A単独あるいは両者の共発現細胞と非発現対照細胞に、AP1応答エレメントを有するルシフェラーゼレポータープラスミドをトランスフェクトし、AP1を介した転写の程度を比較検討した。その結果、SMYD3+NS5A共発現細胞では、AP1を介した転写が有意に増強した。

(5) HCVのライフサイクルに及ぼすSMYD3の影響

一過性発現プラスミドによるSMYD3過剰発現細胞及びsiRNAによるSMYD3発現低下細胞において、HCV RNA複製、HCVタンパク質合成、HCV粒子形成・放出は、対照細胞に比べて有意な差異は認められなかった。

#### D. 考察

SMYD3はヒストンH3やH4の特定部位のリジン(K)残基をメチル化し、クロマチン構造変換を引き起こすことによって、様々な原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子等の発現制御に関与している。また、最近、SMYD3がRas癌遺伝子のシグナル伝達経路を調節するMAP3K2をメチル化し、その経路を活性化することが報告され注目されて

いる。臨床的にも、SMYD3 は乳癌や大腸癌、肝細胞癌、前立腺癌等で発現亢進していることが知られている。

今回の HCV フルゲノムレプリコン細胞を用いた解析で、SMYD3 の N 末端 87aa 領域 (N-SET+MYND ドメイン) が NS5A との結合に重要であることが明らかになった。NS5A に関しては、ドメイン 2+3 が SMYD3 と強く結合するが、ドメイン 3 単独では全く結合せず、また、ドメイン 1+2 ではわずかな結合が見られるのみであった。一方、SMYD3 の細胞内局在については、NS5A のドメイン 2+3 とドメイン 3 単独が、全長 NS5A と同程度に、SMYD3 の核移行を阻害した。NS5A と SMYD3 との相互作用 (結合、核移行阻害、MAP3K2 メチル化など) に係る NS5A の責任領域について、より詳細な解析が必要であると思われる。

本研究において、SMYD3 の MAP3K2 メチル化活性の測定系を構築し、これを用いて、SMYD3 による MAP3K2 のメチル化に NS5A がどのような影響を及ぼしているかについて解析した。その結果、NS5A は SMYD3 との相互作用を通して、SMYD3 による MAP3K2 のメチル化を促進し、その下流に位置する AP1 を介した転写を促進することが明らかになった。MAP3K2 は Ras 癌タンパク質による発癌シグナルを促進することが最近報告された。今回我々が見出した NS5A による SMYD3 介在性 MAP3K2 メチル化の促進及び AP1 を介した転写の促進は、HCV による肝発癌機構を考える上で興味深い知見であり、今後更に詳細に解析を進める予定である。

一方、SMYD3 の過剰発現あるいはノック

ダウンは、HCV RNA 複製、HCV タンパク質合成、HCV 粒子形成・放出に有意な影響を及ぼさないことが示された。

## E. 結論

HCV NS5A は SMYD3 と相互作用することによって、SMYD3 の核内移行を阻害し、SMYD3 による MAP3K2 のメチル化を増強し、AP1 を介した転写を促進した。

一方、SMYD3 の過剰発現あるいはノックダウンは、HCV RNA 複製、HCV タンパク質合成、HCV 粒子形成・放出のいずれにも、有意な影響を及ぼさなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Aweya JJ, Sze CW, Bayega A, Mohd-Ismail NK, Deng L, Hotta H, Tan YJ. NS5B induces up-regulation of the BH3-only protein, BIK, essential for the Hepatitis C virus RNA replication and viral release. *Virology*, 474: 41-51, 2015.
- 2) Wahyuni TS, Widyawaruyanti A, Lusida MI, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H. Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves. *Fitoterapia*, 99: 276-283, 2014.
- 3) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, Hotta H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities. *PLoS ONE*, 9(6): e98877,

- 2014.
- 4) Takei S, Omoto C, Kitagawa K, Morishita N, Katayama T, Shigemura K, Fujisawa M, Kawabata M, Hotta H, Shirakawa T. Oral administration of genetically modified Bifidobacterium displaying HCV-NS3 multi-epitope fusion protein could induce an HCV-NS3-specific systemic immune response in mice. *Vaccine*, 32(25): 3066-3074, 2014.
  - 5) El-Shamy A, Hotta H. Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: An overview. *World J Gastroenterol*, 20(24): 7555-7569, 2014.
  - 6) Adiantil M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T S, Lusida M I, Soetjipo, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiol Immunol*, 58(3): 180-187, 2014.
  - 7) Ratnoglik S L, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*, 58(3): 188-194, 2014.
  - 8) Juniastuti, Wibowo BP, Wibawa IDN, Utsumi T, Mustika S, Amin M, Wahyuni RM, Kurniawan H, Hendrayana A, Setiawan PB, Yamani LN, Soetjipto, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y, Lusida MI. Interleukin-28B polymorphisms and response of chronic hepatitis C patients from Indonesia to pegylated Interferon/Ribavirin treatment. *J Clin Microbiol*, 52(6): 2193-2195, 2014.
  - 9) Aoki C, Hartati S, Santi MR, Lydwina, Firdaus R, Hanafi M, Kardono LB, Shimizu Y, Sudarmono P, Hotta H. Isolation and identification of substances with anti-hepatitis C virus activities from *Kalanchoe pinnata*. *Int J Pharm Pharmaceut Sci*, 6(2): 211-215, 2014.
  - 10) Bai F, Yano Y, Kim SR, Seo Y, Miki A, Saito M, Hirano H, Momose K, Minami A, Hatazawa Y, Hayakumo T, Widasari DI, Rinonce HT, Sugano M, Tani S, Yoon S, Imoto S, Azuma T, Hotta H, Hayashi Y. Mutational diversity of NS5A and NS3 during triple therapy (telaprevir, pegylated-interferon- $\alpha$  2b and ribavirin) for genotype 1b chronic hepatitis C: The Kobe Hepatitis Therapeutic Group. *Int J Mol Med*, 33(6): 1652-1656, 2014.
  - 11) Juniastuti, Utsumi T, Nasronudin, Alimsardjono L, Amin M, Adianti M, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Lusida MI. High rate of seronegative HCV infection in HIV-positive patients. *Biomed Rep*, 2(1): 79-84, 2014.
2. 学会発表
- 1) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. The 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
  - 2) Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways